

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Ekstrak metanol daun ketapang memiliki aktivitas antitumor yang poten terhadap sel EAC. Venkatalaksmi *et al.* (2014) meneliti aktivitas antioksidan dan antitumor kulit batang ketapang secara in-vitro. Aktivitas antioksidan kulit batang ketapang semakin meningkat dengan seiring peningkatan konsentrasi ekstrak (50-1000 µg/ml). Aktivitas antitumor menunjukkan bahwa ekstrak ketapang memiliki aktivitas sitotoksik yang dilakukan dengan metode pewarnaan *trypan blue* pada sel EAC dengan peningkatan % kematian sel dari perlakuan ekstrak dengan konsentrai 50-1000 µg/ml. Pada konsentrasi 1000 µg/ml dapat membunuh 57,9% sel EAC. Pada uji sitotoksik yang dilakukan dengan metode MTT *assay* menunjukkan sitotoksisitas 57,37% pada perlakuan sel EAC (*Ehrlich's Ascites Carcinoma*) dengan konsentrasi ekstrak 250 µg/ml. Fraksi flavonoid ketapang terbukti memiliki aktivitas antitumor pada tikus yang diinokulasi sel EAC (*Ehrlich's Ascites Carcinoma*) melalui modulasi lipid peroksidasi dan menambah sistem pertahanan antioksidan (Saroja *et al.*, 2012)

Ekstrak daun ketapang (25-00 µg/mL) dan komponen tanin utamanya, punicalagin, telah diteliti dapat melindungi sel CHO-K1 terhadap frekuensi mutasi gen hgp_rt yang diinduksi bleomycin. Ekstrak ketapang menunjukkan aksi kemopreventif pada kanker kolon dengan cara mereduksi proliferasi sel kanker kolon (Morioka *et al.*, 2005). Ekstrak daun ketapang menunjukkan efek kematian yang tinggi pada metastasis sel A549 dan Lewis Lung Carcinoma (LLC).

Ekstrak supercritical CO₂ (SC-CO₂) daun ketapang memiliki potensi antimutagenik. Aktivitas antimutagenik ekstrak SC-CO₂ meningkat seiring dengan menurunnya suhu (60, 50, dan 40 °C) dan tekanan (4000, 3000, dan 2000 psi) yang digunakan pada saat ekstraksi. Aktivitas antimutagen yang paling poten ditentukan pada ekstrak yang menggunakan suhu 40 °C dengan tekanan 2000 psi. Pada dosis 0,5 mg/plate menunjukkan penghambatan mutagenisitas benzo[a]pyrene sekitar 80% dan 46% mutagenisitas N-methyl-

N⁻-nitroguanidine. Ekstrak SC-CO₂ yang diberikan pada sel hepatoma (Huh 7) dan sel liver normal (Chang Liver) telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan kedua sel tersebut. Ekstrak SC-CO₂ memiliki efek sitotoksik pada sel Huh 7 (Ko *et al.*, 2003). Yeh *et al.* (2014) membuktikan bahwa ekstrak daun ketapang dapat menghambat transkripsi protein nuklear faktor SP-1 dan NF-κB dan menghambat efek u-PA dengan mereduksi fosforilasi jalur ERK1/2.

B. Landasan Teori

1. Kanker

Kanker merupakan kumpulan sel yang abnormal dan bersifat ganas, suatu kelompok sel yang menjadi liar secara mendadak dan memperbanyak diri secara pesat dan terus-menerus (Tjay dan Kirana, 2007). Kanker disebabkan oleh adanya kerusakan gen yang menyebabkan terganggunya proses siklus sel dan apoptosis. Kerusakan gen ini dapat disebabkan oleh faktor eksternal seperti rokok, bahan kimia, radiasi, dan infeksi mikroorganisme serta faktor internal seperti mutasi bawaan, hormon, dan kondisi imunitas (ACS, 2008).

Sel kanker berbeda dengan sel normal. Perbedaan antara sel kanker dengan sel normal menurut Hanahan dan Weinberg (2000) antara lain:

- a. Sel kanker mampu mencukupi sendiri kebutuhan sinyal pertumbuhannya

Sel-sel normal untuk melakukan proliferasi membutuhkan sinyal pertumbuhan (*Mitogenic Growth Factor*). Tanpa adanya rangsangan tersebut sel-sel normal tidak mampu berkembang. Sedangkan sel kanker dapat memproduksi sendiri *growth factor* sehingga tidak bergantung pada rangsangan sinyal pertumbuhan dari luar untuk berproliferasi yang menyebabkan sel kanker tumbuh tak terkendali.

- b. Tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferatif

Pada sel normal banyak sinyal antiproliferatif untuk mengatur homeostasis jaringan dan mengatur daur hidup sel. Pada sel kanker

terdapat gangguan yang menyebabkan tidak ada (*deleted*) gen-gen yang memproduksi protein antiproliferatif.

- c. Sel kanker mampu menghindari mekanisme apoptosis (kematian sel yang terprogram)

Kematian sel adalah suatu proses normal yang mempunyai peranan untuk perbaikan jaringan dan pelepasan sel rusak yang membahayakan tubuh (King, 2000). Sel normal mempunyai mekanisme kematian sel yang terprogram yaitu apoptosis. Apoptosis terjadi dengan melibatkan *apoptotic regulator* yang terdiri atas proapoptosis dan antiapoptosis. Tumor *supressor* gen p53 menimbulkan apoptosis dengan men-upregulasi ekspresi dan proapoptosis. Sedangkan pada sel kanker umumnya terjadi mutasi pada gen p53 sehingga kehilangan regulator proapoptosis.

- d. Sel kanker mempunyai potensi untuk replikasi tidak terbatas

Sel kanker dapat melakukan replikasi yang tidak terbatas karena sel kanker menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri dan adanya upregulasi ekspresi enzim telomerase.

- e. Sel kanker dapat menginvasi jaringan di sekitarnya dan membentuk metastasis

Pada perkembangannya, sebagian besar kanker akan membentuk massa tumor primer yang mampu melepaskan diri dari jaringan awal, memasuki aliran darah maupun pembuluh limfa dan membentuk tumor sekunder (metastasis) dibagian tubuh yang lain. Kanker akan semakin sulit untuk disembuhkan jika jangkauan metastasis meluas.

Proses terjadinya kanker bermula dari satu sel kanker yang kemudian berubah menjadi suatu koloni pada jaringan disebut dengan karsinogenesis (Sukardja, 2000). Terdapat 4 tahapan dalam karsinogenesis meliputi tahap inisiasi, tahap promosi, tahap progresif dan tahap metastasis.

Tahap yang pertama yaitu tahap inisiasi. Pada tahap ini terdapat zat yang mampu menyebabkan mutasi pada gen (mutagen). Sel yang awalnya normal dengan adanya mutagen akan membentuk menjadi premalignan.

Zat karsinogen akan berinteraksi dengan DNA sehingga menyebabkan amplifikasi dan membentuk produk *copy multiple gen* (Sukardja, 2000). Pada tahap inisiasi juga terjadi kelainan pada kromosom yang disebabkan karena adanya mutasi gen kemudian dapat diturunkan pada anak-anak sel dan begitu seterusnya (Tjay dan Rahardja, 2002). Tahap inisiasi ini berlangsung sangat cepat (Kartawiguna, 2001).

Kesalahan acak selama proses pembelahan sel atau terpapar oleh karsinogen spesifik, misalnya hormon merupakan penyebab terjadinya tahap promosi (Schneider, 1997). Pada saat proliferasi sel diperlukan adanya zat karsinogen tambahan (*co-carcinogen*) sebagai promotor. Promotor adalah zat yang tidak bersifat mutagen namun mampu menaikkan reaksi karsinogen serta tidak menimbulkan amplifikasi gen, dengan demikian sel-sel rusak menjadi ganas (Tjay dan Rahardja, 2002).

Pada tahap progresi terjadi pengaktifan gen-gen pertumbuhan karena adanya kerusakan DNA yang mengakibatkan perkembangan kanker menjadi ganas (Tjay dan Rahardja, 2002). Selain itu pada tahap progresi terjadi perubahan bentuk benignan menjadi pra-malignan dan malignan (Sukardja, 2000).

Tahap selanjutnya yaitu tahap metastasis. Tahap ini dapat menyebabkan gejala klinis bahkan hingga kematian (King, 2000). Pada tahap metastasis, terjadi pemisahan sel kanker dari sel induk, masuk ke pembuluh darah dan kelenjar limfe kemudian membentuk jaringan baru (Schneider, 1997). Kemampuan dalam membentuk jaringan baru disebabkan oleh adanya produksi protease yang berlebih. Protease memegang peranan dalam interaksi sel dan pergerakan sel melalui matriks ekstraseluler.

2. Kanker Serviks

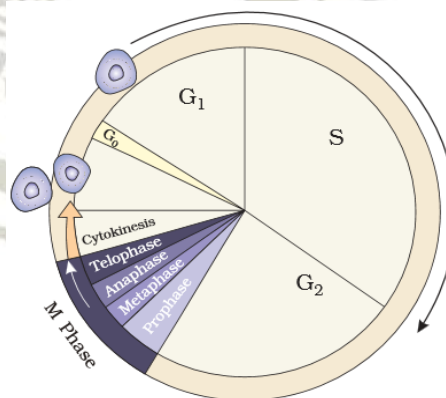
Kanker serviks adalah kanker primer dari serviks yang berasal dari metaplasia epitel di daerah sambungan skuamo kolumnar (SSK) yaitu daerah peralihan mukosa vagina ke mukosa kanalis servikalis (Andrijino, 2009). Kanker serviks terjadi karena adanya infeksi *human papiloma virus*

(HPV) yang mengekspresikan protein onkogen E6/E7 yang mengganggu regulasi siklus sel normal (Snijders *et al.*, 2006). Onkogen E6 akan mengikat p53 sehingga p53 akan kehilangan fungsinya. Sedangkan onkogen E7 akan mengikat Rb yang menyebabkan terlepasnya E2F yang merupakan faktor transkripsi sehingga siklus sel berjalan tanpa kontrol.

Perempuan biasanya terinfeksi HPV saat usia belasan tahun sampai tiga puluhan, tetapi kanker akan muncul 10-20 tahun sesudahnya. Faktor resiko terjadinya infeksi HPV adalah hubungan seksual pada usia dini, berhubungan seks dengan berganti-ganti pasangan dan memiliki pasangan yang suka berganti-ganti pasangan. Ko-faktor yang memungkinkan infeksi HPV berisiko menjadi kanker serviks antara lain status imunitas (pasien HIV positif), jumlah paritas yang banyak, merokok, ko-infeksi dengan penyakit menular seksual lainnya atau penggunaan jangka panjang (lebih dari 5 tahun) kontrasepsi oral (WHO, 2006).

3. Siklus Sel

Proliferasi sel merupakan salah satu ciri makhluk hidup untuk tumbuh, berkembang dan mempertahankan kehidupannya. Pada sel normal proliferasi terjadi melalui siklus sel yang terdiri dari 4 fase, seperti yang terlihat pada Gambar 2.1, yaitu fase G₁, fase S, fase G₂, dan fase M (Collin *et al.*, 1997).



Gambar 2.1. Siklus sel (sumber: www2.le.ac.uk)

Pada saat sel mitosis, sel memasuki fase G₁, dimana sel aktif namun tidak mensintesis DNA atau sel memasuki fase G₀ untuk istirahat.

Pada saat fase G₀/G₁ sel mengandung DNA diploid (2N) yang selanjutnya akan memasuki fase S dan terjadi sintesis DNA sehingga kandungan DNA menjadi 4N. Sel selanjutnya melalui fase G₂ sebelum fase M, sel membelah diri menjadi 2 sel diploid (Kresno dan Romadhon, 2013). Siklus sel diregulasi oleh aktivitas *cyclin dependent kinase* (CDK) yang berikatan dengan sub unit regulator *cyclin*.

Proliferasi pada sel kanker terjadi secara tidak terkendali yang diakibatkan oleh adanya mutasi gen, sehingga menyebabkan instabilitas genomik dan instabilitas kromosom. Mutasi gen juga menyebabkan kompleks CDK-cyclin kehilangan kemampuan dalam regulasi siklus sel, sehingga proliferasi berjalan secara terus menerus atau tidak terkontrolnya siklus sel. Keadaan tersebut merupakan karakteristik dari pertumbuhan sel tumor yang dapat menginfiltrasi jaringan sekitarnya (Olivia, 2014).

4. Sel HeLa

Sel HeLa merupakan salah satu jenis sel kanker pada penyakit serviks. Sel tersebut diisolasi dari wanita bernama Henreitta Lacks oleh Dr. George O. Gey pada tahun 1951. Nama HeLa diambil dari dua kata pertama dari nama depan dan akhir dari nama wanita Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker serviks (Brenden *et al.*, 2009).

Sel HeLa banyak digunakan sebagai model sel uji dalam penelitian. Sel HeLa merupakan sel kanker serviks yang diakibatkan oleh infeksi HPV 18 (Goodwin dan Dimaio, 2000). Sel tersebut berproliferasi dengan mengekspresikan protein E6 dan E7 agar proliferasi dapat berlangsung optimal (DeFillippis *et al.*, 2003). Selain itu, sel HeLa juga dapat mengekspresikan gen N-Myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) yang berperan penting pada kemosisitivitas terhadap sel HeLa.

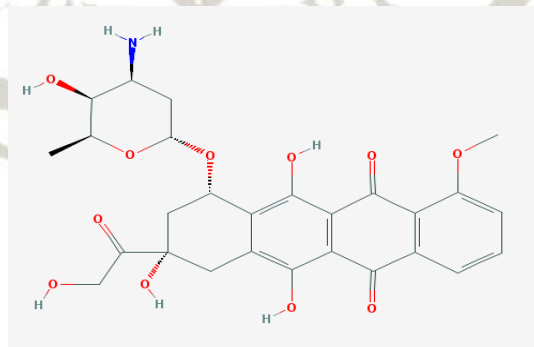
Sel HeLa yang ditumbuhkan dalam media kultur dapat tumbuh dengan pesat dan agresif. Media kultur digunakan yaitu RPMI 1640-serum. Pada media kultur RPMI 1640-serum terkandung asam amino, vitamin, garam organik dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon pertumbuhan (Freshney, 1986).

5. Doxorubicin

Doxorubicin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang digunakan untuk kemoterapi berbagai jenis kanker (Tjay dan Rahardja, 2003). Doxorubicin dapat menyebabkan kardiotoxicitas pada penggunaan jangka panjang, sehingga penggunaannya secara klinis jadi terbatas. Efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya *cardiomyopathy* dan gagal jantung kongestif (Han *et al.*, 2008). Pada umumnya doxorubicin digunakan dalam bentuk kombinasi dengan agen antikanker lainnya seperti siklofosamid, cisplatin dan 5-FU. Peningkatan respon klinis dan pengurangan efek samping cenderung lebih baik pada penggunaan kombinasi dengan agen lain dibandingkan penggunaan doxorubicin tunggal (Bruton *et al.*, 2005).

Aktivitas antibiotik seperti doxorubicin melalui empat mekanisme yaitu:

- Penghambatan topoisomerase II.
- Interkalasi DNA sehingga mengakibatkan penghambatan sintesis DNA dan RNA.
- Peningkatan membran sel yang menyebabkan aliran dan transport ion.
- Pembentukan radikal bebas semiquinon dan radikal bebas oksigen melalui proses yang tergantung besi dan proses reduktif yang diperantarai enzim. Mekanisme radikal bebas ini telah diketahui bertanggungjawab pada kardiotoxicitas akibat antibiotik antrasiklin (Bruton *et al.*, 2005).



Gambar 2.2. Struktur Doxorubicin (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Doxorubicin dapat berinteraksi dengan DNA yang secara langsung akan mempengaruhi transkripsi dan replikasi. Doxorubicin mampu membentuk kompleks tripartit dengan topoisomerase II dan DNA.

Topoisomerase II adalah suatu enzim tergantung ATP yang bekerja mengikat DNA dan menyebabkan double-strand break pada ujung 3' fosfat sehingga memungkinkan penukaran penukaran strand dan penelusuran DNA superkoil. Penelusuran strand ini diikuti dengan penyambungan strand DNA oleh topoisomerase II. Topoisomerase ini sangat penting fungsinya dalam replikasi dan perbaikan DNA. Pembentukan kompleks tripartit tersebut akan menghambat penyambungan kembali strand DNA, menyebabkan penghambatan daur sel terhenti di fase G1 dan G2 serta memacu terjadinya apoptosis (Gewirtz, 1999; Minotti *et al.*, 2004). Adanya gangguan pada sistem perbaikan DNA double strand akan memicu kerusakan sel, sedangkan overekspresi transkripsi untuk perbaikan DNA mungkin terlibat dalam fenomena resistensi obat.

Gugus quinon pada doxorubicin mampu menghasilkan radikal bebas baik pada sel normal maupun sel kanker (Gewirtz, 1999). Doxorubicin dapat membentuk intermediate radikal semiquinon, yang dapat bereaksi dengan oksigen menghasilkan radikal anion superoksida, yang selanjutnya akan menghasilkan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang menyerang DNA dan mengoksidasi basa pada DNA. Pembentukan radikal bebas distimulasi oleh interaksi antara doxorubicin dengan besi. Pertahanan enzimatik dalam sel seperti superoksida dismutase dan katalase merupakan hal penting untuk menjaga sel dari toksisitas doxorubicin (Bruton *et al.*, 2005).

Mekanisme toksisitas doxorubicin telah banyak diketahui. Toksisitas kronis doxorubicin kemungkinan diperantarai oleh konversi metabolik doxorubicin menjadi doxorubicinol yang melibatkan berbagai enzim antara lain karbonil reduktase. Mekanisme utama toksisitas doxorubicinol terjadi karena interaksinya dengan besi dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang merusak makromolekul sel (Minotti *et al.*, 2004).

Selain adanya efek samping, penggunaan doxorubicin juga menunjukkan penurunan efikasi pada terapi kanker karena adanya fenomena resistensi obat. Mekanisme yang menyebabkan resistensi doxorubicin adalah adanya overekspresi PgP yang menyebabkan

doxorubicin dipompa keluar sel dan konsentrasi doxorubicin dalam sel turun. Perubahan biokimiawi lain pada sel yang resisten doxorubicin antara lain peningkatan aktivitas glutathion peroksidase, peningkatan aktivitas maupun mutasi topoisomerase II, serta peningkatan kemampuan sel untuk memperbaiki kerusakan DNA (Bruton *et al.*, 2005).

6. Ketapang (*Terminalia catappa*)

Sistematika klasifikasi ketapang adalah sebagai berikut (Jones dan Luchsinger, 1987):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Myrtales
Suku : Combretaceae
Marga : Terminalia
Jenis : *Terminalia catappa* L.



Gambar 2.3. Ketapang

Combretaceae merupakan salah satu keluarga terbesar tanaman berbunga. Terminalia merupakan marga terbesar dari combretaceae. Tanaman jenis ini telah diketahui mengandung metabolit sekunder seperti triterpen siklik dan derivatnya, flavonoid, tanin, dan aromatik lainnya (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

Terminalia catappa (ketapang) merupakan pohon yang tinggi dan tegak mencapai 25-40 m, dengan diameter 1-1,5 m. Ketapang tumbuh dengan baik pada iklim tropis dan pohon ini juga dapat tumbuh pada daerah pantai berpasir dan berbatu serta dapat berkembang pada batu kapur. Di sebagian wilayah daun ketapang gugur dua kali dalam setahun dengan tampilan warna merah dan kuning cemerlang. Daun yang gugur tersebut membantu mentolerir ketika terjadi musim panas.

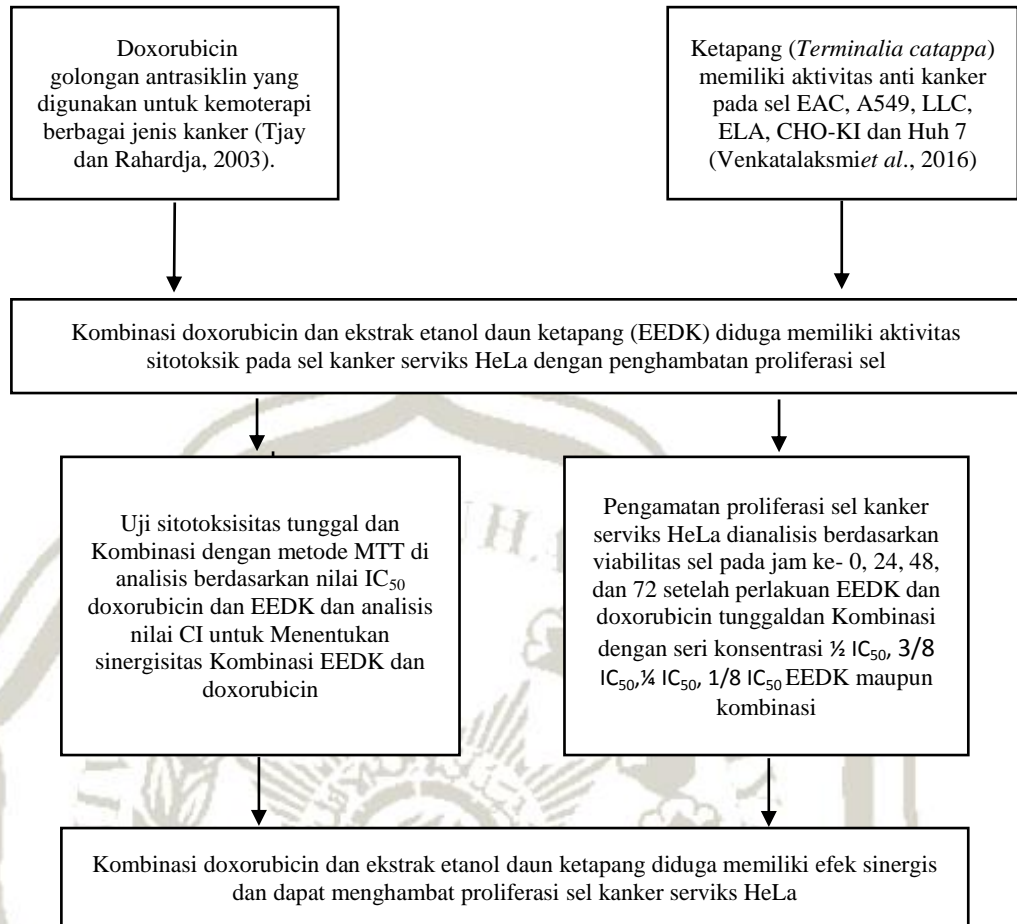
Ketapang merupakan tanaman yang banyak mengandung tanin (punicalagin, punicalin, terflavin A dan B, tergallagin, tercatatin, chebulagic acid, geranin, granatin B, corilagin), flavonoid (isovitexin, vitexin, isoorientin, rutin) dan triterpenoid (asam ursolat, 2a, 3a, 23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid) (Ahmed *et al.*, 2005). Distribusi kandungan kimia dari ketapang dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan kimia ketapang

Bagian	Kandungan kimia	Referensi
Kulit	(+)-catechin, (-)-epicatechin, 3,3',4-tri-o-methyl-ellagic-acid, 3,3',di-o-methyl-ellagic-acid, asam arjunalat, 28-o-β-glukosida asam arjunalat, β-sitosterol, asam betulinat, daukosterol, asam elagat, leukosianidin, asam oleanolat, asam oksalat, tanin	Dukes, 2008
	2,3-(S)-HHDP-D-glukosa, punikalagin, korilagin, terkatain, kausarinin, kastalagin, grandinin, kastalin, 3-metoksi-4-hidroksifenol-1-O-b-D-(6é-O-galoil)-glukosida, 3,5-dimetoksi-4-hidroksifenol-1-O-b- D-(6é-O-galoil)-glukosida, (-)-epikatekin-3-O-galat, (-)-epigalokatekin-3-O-galat, prosianidin B-1, 3é-O-galoil prosianidin B-2, akutiisimin A, dan eugenigrandin A	Lin dan Hsu, 1999
Daun	1-degaloil-eugenin, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-heksahidroksi-difenoil)-glukosa, asam kebulagat, korilagin, asam gentisat, geraniin, granatin-b, kaemferol, punikalagin, punikalin, kuersetin, terkatain, terflavin-a, terflavin-b, tergalagin	Dukes, 2008
	Daun berwarna coklat kemerahan mengandung flavonoid apigenin 6-c-(2- galoil)-L-Dglikosida, apigenin 8-c-(2- galoil)- L-Dglikosida, isoviteksin, viteksin, isoorientin, rutin dan tanin, asam galat, asam elagat, punikalagin, punikalin	Chen <i>et al.</i> , 2000
	Asam ursolat dan 2, 3â, 23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid yang diisolasi dari fraksi kloroform	Yun-Lian <i>et al.</i> , 2000
	Ekstrak air dari daun ketapang merah yang gugur mengandung enam senyawa fenolik seperti asam p-hidroksi benzoat, asam 4-hidroksifenilpropionat, asam m-kumarat, asam 3,4-dihidroksibenzoat, asam p-kumarat, dan asam galat	Fan <i>et al.</i> , 2004
Biji	Asam arachidat, asam askorbat, karbohidrat, beta karoten, lemak, serat, besi, kilokalori, asam linoleat, asam miristat, niasin, asam oleat, asam palmitat, asam palmitoleat, fosfor, kalium, protein, riboflavin, asam sstearat dan tiamin	Dukes, 2008
Buah	Korilagin, asam brevifolin-karboksilat, beta-karoten, sianidin-3-glukosida, asam elagat, asam galat, glukosa, pentosans, tanin	Dukes, 2008
Nuts	Fosfor, karbohidrat, lemak sederhana, magnesium, kalsium, besi, zink, sodium, mangan, vitamin A dan C	Christian dan Ukhun, 2006

Sumber: Venkatalakshmi *et al.*, 2016

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep

D. Hipotesis

1. Kombinasi ekstrak etanol daun ketapang dan doxorubicin memiliki aktivitas sitotoksik yang sinergis pada sel kanker serviks HeLa.
2. Kombinasi ekstrak etanol daun ketapang dan doxorubicin dapat menghambat proliferasi sel kanker serviks HeLa.