

## BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA PEMIKIRAN

### 2.1 Kajian Pustaka

#### 2.1.1 Kanker payudara

Kanker payudara merupakan penyakit yang timbul akibat sel pada payudara berkembang tanpa terkendali. Dimana terdapat beberapa jenis kanker payudara, tergantung dari sel payudara mana yang mengalami kanker.<sup>19</sup>

Terdapat kurang lebih 2,1 juta kasus kanker payudara baru di seluruh dunia pada wanita di tahun 2018, kanker ini menjangkit 1 dari 4 kasus penyakit kanker pada wanita. Kanker payudara banyak terdiagnosa pada kurang lebih 154 negara dari 185 negara dan penyakit kanker payudara ini telah menyebabkan banyak kematian akibat kanker di lebih dari 100 negara. Tingkat insidensi kanker payudara tertinggi terjadi di negara Australia/New Zealand, *Northen Europe* (United Kingdom, Sweden, Finland, dan Denmark), *Western Europe* (Belgium (paling tinggi didunia), Netherlands, dan Prancis), *Southern Europe* (Italia).<sup>1</sup>

Terdapat 61 ribu kasus baru kanker payudara di Indonesia pada tahun 2013, nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan tahun sebelumnya.<sup>4</sup>

Faktor risiko yang dapat menyebabkan munculnya kanker payudara, perlu diketahui apabila seseorang memiliki faktor risiko belum tentu orang tersebut pasti akan mengalami kanker payudara, karena faktor risiko hanyalah sebagai peningkatan

kemungkinan seseorang mengalami suatu penyakit. Berikut beberapa faktor risiko yang dapat menyebabkan seseorang mengalami adanya kanker payudara<sup>19</sup>:

a. Faktor risiko yang tidak dapat dirubah:

Usia, risiko terjadinya kanker payudara biasanya meningkat pada usia tua, dimana kebanyakan kanker payudara terdiagnosa setelah usia 50 tahun.<sup>3, 19</sup> Mutasi genetic, terjadinya mutasi pada beberapa gen seperti BRCA1 dan BRCA2, wanita dengan mutasi gen tersebut memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjangkit kanker payudara dan kanker ovarium.<sup>3, 19</sup> Riwayat reproduksi, risiko meningkat pada perempuan yang mengalami menstruasi lebih dini kurang dari 12 tahun dan mulai mengalami *menopause* setelah usia 55 tahun. Hal ini diakibatkan adanya paparan hormon esterogen yang lebih lama pada tubuhnya, sehingga meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara.<sup>8, 19</sup> Riwayat penyakit, perempuan dengan riwayat kanker payudara sebelumnya, maupun penyakit payudara yang bukan kanker, seperti *atypical hyperplasia* atau *lobular carcinoma in situ*, biasanya memiliki risiko tinggi untuk mengalami kanker payudara.<sup>19</sup> Riwayat keluarga, perempuan yang memiliki keluarga yang pernah mengalami kanker payudara baik ibu, kakak, atau adik dari keluarga ayah maupun keluarga ibu akan memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjangkit kanker payudara dibandingkan dengan perempuan tanpa adanya riwayat keluarga terjangkit kanker payudara.<sup>3, 19</sup> Pengobatan menggunakan terapi radiasi terdahulu, perempuan yang pernah melakukan terapi radiasi pada dada ataupun payudara seperti treatment pada penyakit *hodgki's lymphoma* sebelum 30 tahun memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terkena kanker payudara.<sup>3, 19</sup> Konsumsi obat *diethylstilbestrol*,<sup>20</sup> penggunaan obat ini biasanya diberikan pada wanita hamil di Amerika diantara tahun 1940 dan

1971 untuk mencegah adanya *miscarriage* (hilangnya fetus sebelum 20 minggu kehamilan “aborsi spontan”). Perempuan yang mengkonsumsi obat ini ketika kehamilan memiliki risiko untuk terkena kanker payudara.<sup>19</sup>

b. Faktor risiko yang dapat dirubah:

Aktivitas fisik, perempuan dengan aktivitas fisik yang kurang biasanya mengalami risiko terkena kanker payudara.<sup>19</sup> Obesitas setelah *menopause*, perempuan yang telah mengalami menopause yang mengalami berat badan berlebih atau obesitas memiliki risiko tinggi terkena kanker payudara dibandingkan dengan perempuan tua yang memiliki berat badan normal.<sup>3, 19</sup> Penggunaan hormon, terapi penambahan hormon baik estrogen maupun progesteron yang dilakukan pada usia tua akan meningkatkan risiko terkena kanker payudara apabila dilakukan terus menerus lebih dari 5 tahun. Dan obat kontrasepsi oral (pil pengatur kehamilan) dapat juga meningkatkan risiko kanker payudara.<sup>19</sup> Riwayat reproduksi, kehamilan pertama setelah usia 30 tahun, tidak menyusui anak, dan tidak pernah memiliki kehamilan yang total selama 9 bulan dapat meningkatkan kanker payudara.<sup>3, 19</sup> Konsumsi alkohol, semakin banyak alkohol yang dikonsumsi oleh perempuan maka akan semakin meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara dikemudian hari.<sup>3, 19</sup>

Meskipun penyebab kanker payudara belum mengerti sepenuhnya. Namun, terdapat beberapa penyebab utama terjadinya kanker payudara ini diantaranya:

1. Perubahan genetik

Seperti semua kanker, kanker payudara ini disebabkan karena adanya mutasi yang mempengaruhi *proto-oncogene* dan *tumor suppressor gene* pada epithelium payudara, yang paling berkarakter adalah ekspresi berlebih dari HER2/NEU *proto-*

*oncogene*, hal ini dapat menyebabkan lebih dari 30% kanker payudara yang invasive. Amplifikasi dari gen RAS dan MYC juga dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara pada manusia. Selain itu mutasi pada *tumor suppressor gene RB* dan *TP53* juga dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara pada manusia.<sup>3</sup>

Munculnya subtype dari kanker payudara ini disebabkan karena adanya sejumlah besar gen termasuk gen reseptor estrogen mengalami inaktivasi akibat adanya promotor *hypermethylation*. Sehingga menyebabkan adanya beberapa perubahan genetik yang didapat.<sup>3</sup>

Sekitar 1/3 perempuan dengan kanker payudara turunan mengalami adanya mutasi pada BRCA1 pada lokus kromosom 17q21.3 atau BRCA2 yang berlokasi pada pita kromosom 13q12-13. Gen-gen ini mengkode protein besar dan complex yang memiliki keunikan tersendiri. BRCA1 dan BRCA 2 ini merupakan tumor supresor gen klasik yang dipercaya memiliki fungsi dalam *DNA repair pathway*. Apabila gen BRCA1 dan BRCA 2 ini mengalami kerusakan atau mutasi, maka proses dalam *DNA repair pathway* juga akan terganggu dan menyebabkan DNA yang rusak tidak dapat dihancurkan sehingga terjadilah kondisi abnormalitas pada sel, yang nantinya akan berujung pada kanker.<sup>3</sup> Selain itu terdapat beberapa penyakit genetik yang terkadang dapat menyebabkan adanya kanker payudara diantaranya *Fraumeni Syndrome* (disebabkan oleh adanya mutasi *germline* pada TP 53), *cowden syndrome* (adanya mutasi *germline* pada *PTEN*).<sup>3</sup>

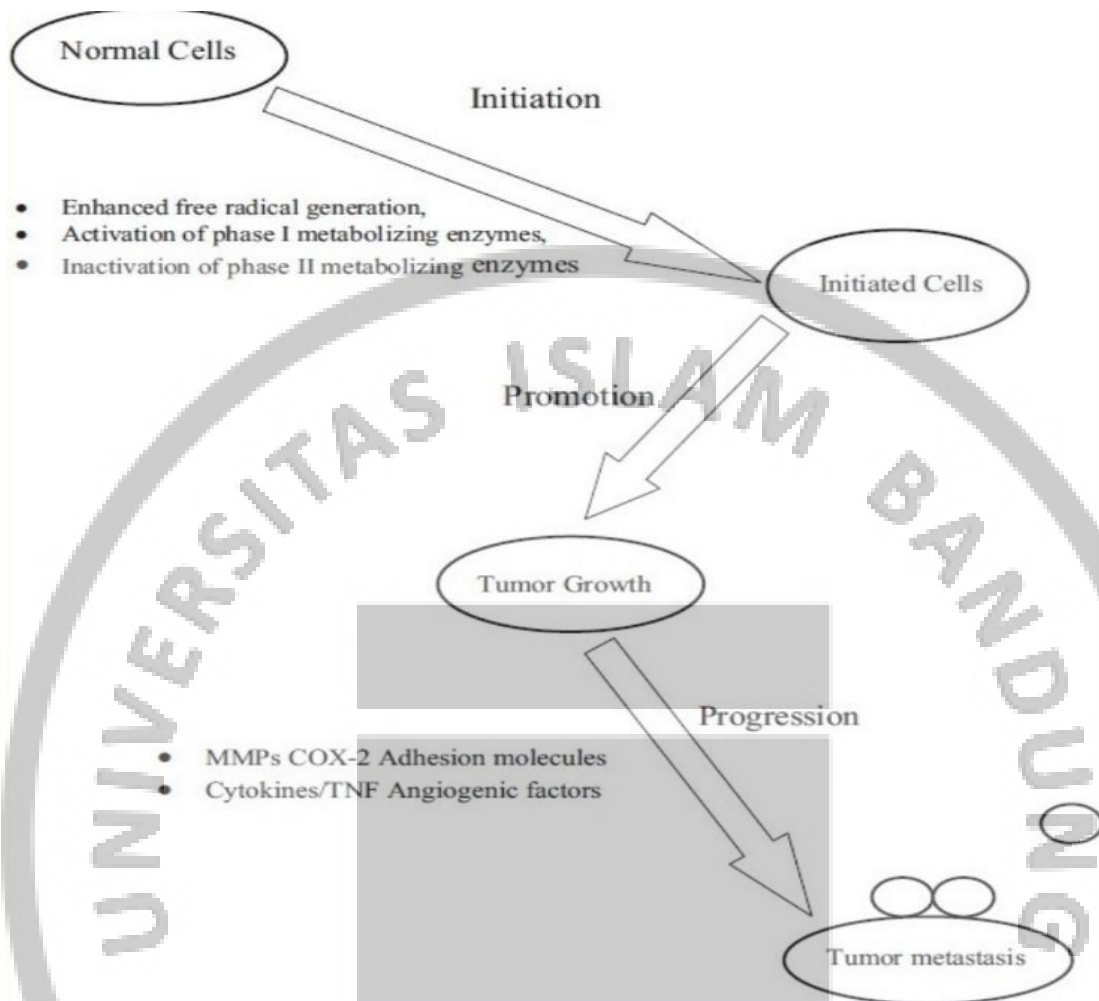
## 2. Pengaruh hormonal

Paparan estrogen, memainkan peran yang sangat penting, dimana pada paparan yang lama dari hormon estrogen yang tidak diimbangi dengan hormon progesteron dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara pada wanita. Hal ini disebabkan karena estrogen akan meningkatkan *growth factor*, seperti membentuk *growth factor- $\alpha$* , *platelet derived growth factor*, dan *fibroblast growth factor* dan lainnya, yang mana akan dapat mendorong perkembangan tumor.<sup>3</sup>

## 3. Pengaruh lingkungan

Paparan dari lingkungan seperti radiasi dan polusi dapat meningkatkan risiko terjadinya kerusakan genetik yang akan memicu terjadinya kanker.<sup>3</sup>

Akibat terjadinya beberapa hal di atas maka sel kanker memiliki kemampuan untuk bertahan hidup yang sangat tinggi dan memiliki kemampuan untuk berkembang lebih cepat dibandingkan dengan sel yang lain. Sel kanker memiliki kemampuan untuk melakukan penyebaran yang sangat baik membuatnya semakin sulit untuk dihilangkan.<sup>3</sup> Gambaran skematik proses pembentukan sel kanker dapat dilihat pada Gambar 2.4.



**Gambar 2.1 Tiga Tahap Karsinogenesis<sup>21</sup>**

Gambar 2.1 menunjukkan 3 fase pembentukan sel kanker,<sup>5</sup> tahap inisiasi yang merupakan fase cepat, disebabkan karena paparan dan interaksi sel terutama DNA dengan agen karsinogenik sehingga sel menjadi abnormal,<sup>5</sup> promosi merupakan tahap lanjutan, sel abnormal menetap, bereplikasi dan merupakan sel preneoplastik,<sup>6</sup> progresi, merupakan fase akhir dari tumorigenesis yang bertahap berubah menjadi sel neoplastik dengan peningkatan kemampuan invasive, metastasis dan pembentukan pembuluh darah baru “*angiogenesis*”.<sup>21</sup>

Beberapa treatment yang dapat diberikan pada pasien kanker payudara:

#### 1. Operasi

Terdapat 2 jenis operasi yang dapat dilakukan untuk menangani kanker payudara:

a. *Breast conserving surgery*

Operasi dilakukan hanya pada daerah lokal disekitar lokasi tumor berada, operasi ini hanya mengangkat jaringan kanker beserta sedikit jaringan payudara sehat disekitar kanker tersebut, yang bertujuan untuk memastikan tidak ada jaringan kanker yang tertinggal setelah dilakukan operasi. Setelah dilakukan operasi biasanya pasien disarankan untuk melakukan radioterapi yang bertujuan untuk memastikan seluruh jaringan kanker mati serta menurunkan kemungkinan untuk terjadinya kanker payudara kembali.<sup>8</sup> Operasi ini dapat dilakukan pada pasien kanker payudara stadium I.<sup>22, 23</sup>

b. Mastektomi

Merupakan operasi yang dilakukan untuk mengangkat seluruh jaringan payudara dari mulai bagian kelenjar hingga bagian puting, operasi dapat dilakukan pada pasien yang mengalami kanker payudara stadium I-III. Setelah melakukan pengangkatan jaringan payudara total, pasien dapat memilih prosedur rekonstruksi payudara atau tidak.<sup>8</sup> Mastektomi dapat diberikan pada perempuan dengan kanker payudara stadium I-III.<sup>22, 23</sup>

2. Radioterapi

Radioterapi bertujuan untuk membunuh sel-sel kanker, biasa diberikan setelah pasien melakukan operasi. Terapi radiasi diberikan 3-5x dalam 1 minggu selama 3-6 minggu, terapi ini memakan waktu beberapa menit,<sup>8</sup> Beberapa efek samping yang dapat ditimbulkan dari pemberian radioterapi, diantaranya iritasi dan kulit payudara menjadi gelap, mudah lelah, pembengkakan *lymph node*. Terapi ini dapat diberikan pada kanker stadium I-III.<sup>22, 23</sup>

### 3. Kemoterapi

Kemoterapi dapat diberikan sebelum (*Neoadjuvant chemotherapy*) ataupun setelah (*adjuvant chemotherapy*) dilakukannya operasi, kemoterapi dilakukan dengan memberikan zat sitotoksik pada tubuh, bertujuan untuk menghancurkan atau membunuh sel kanker. Namun terapi tidak spesifik untuk membunuh sel kanker saja melainkan dapat membunuh sel yang memiliki kemampuan regenerasi yang cepat, seperti sel rambut dan sel usus halus (sel pada sistem pencernaan).<sup>8</sup> Kemoterapi juga dapat menyebabkan efek samping lainnya seperti Infeksi, penurunan nafsu makan, mual dan muntah, mengantuk, rambut rontok, sariawan. Dengan demikian pemberian kemoterapi biasanya diiringi dengan pemberian obat-obat lain untuk menurunkan efek samping yang ditimbulkan. Terapi ini dapat diberikan mulai dari stage I hingga stage IV, kemoterapi pada stage II dan III dapat diberikan secara *neoadjuvan*.<sup>22, 23</sup>

### 4. Terapi hormon

● Terapi ini bertujuan untuk menurunkan kadar hormon estrogen/progesteron, atau menghilangkan efek yang ditimbulkan oleh hormon tersebut. Terapi dapat diberikan sebelum operasi maupun sesudah operasi, ataupun pada pasien dengan kondisi tidak bisa melakukan operasi, kemoterapi maupun radioterapi. Namun apabila kanker payudara yang diderita oleh pasien tidak sensitif terhadap hormon maka terapi ini tidak akan berefek,<sup>8</sup> contohnya *Aromatase inhibitor*, obat ini bekerja dengan cara memblokade *aromatase*, *aromatase* merupakan substansi yang membantu proses pembentukan hormon *estrogen* setelah tubuh mengalami *menopause*, jika *aromatase* dihambat maka kadar



*estrogen* dalam tubuh akan berkurang. Efek samping yang ditimbulkan antara lain berkeringat, kehirangan gairah seksual, mual dan muntah, mudah lelah dan mengantuk, sakit sendi dan tulang, pusing, dan kemerahan pada kulit.<sup>22</sup> salahsatu yang termasuk dalam keolompok ini adalah tamoksifen.

#### 5. Terapi bertarget

Terapi bertarget merupakan terapi secara molekular dengan tujuan langsung menargetkan sel kanker yang menjadi masalah sehingga sel kanker mengalami kematian. Dengan pemahaman yang baik tentang etiologi kanker payudara, obat yang ditargetkan secara molekular telah dikembangkan dan sedang diuji untuk pengobatan dan pencegahan kanker payudara.<sup>24</sup> Beberapa kanker payudara dapat timbul akibat stimulasi protein “*human epidermal growth factor receptor 2* (HER2). Kanker akibat stimulasi protein disebut HER2-positif. Salahsatu dari terapi bertarget bekerja dengan menghambat efek dari HER2 sehingga membantu sistem imun melawan sel kanker. Contoh obat tratuzumab, biasa diberikan secara IV terkadang melalui injeksi subkutan, obat ini diketahui sebagai *monoclonal* antibody. Antibodi tratuzumab akan menarget dan menghancurkan sel kanker HER2-positif. Efek samping yang muncul seperti reaksi alergi (mual, suara mengi, demam dan meriang), diare, mudah lelah, gatal dan sakit.<sup>8</sup>

#### 2.1.2 Doksorubisin

Doksorubisin (Dox) merupakan antibiotik turunan dari bakteri *streptomyces peucetius*, telah digunakan secara luas sebagai pengobatan kemoterapi dari 1960. Obat

ini biasa digunakan untuk mengobati *soft tissue*, kanker payudara, ovarium, kandung kemih, dan tiroid. Obat ini akan menghambat sintesis DNA dan RNA, dengan cara berinteraksi enzim topoisomerase II sehingga menyebabkan kerusakan DNA dan menyebabkan apoptosis,<sup>25</sup> Enzim tersebut akan terlibat dalam pemisahan DNA, lalu akan memperbaiki ikatan protein yang rusak, doksorubisin akan menyebabkan penghentian perbaikan tersebut, sehingga nantinya akan mentrigger program *caspase-dependent* apoptosis yang akan melibatkan aktivasi dari p53, FOXO3 dan mensupresi jalurs sinyal pertumbuhan yang nantinya akan berdampak pada perubahan rasio anti atau pro-apoptosis keluarga protein Bcl-2.<sup>26</sup>

### 2.1.3 Tamoksifen

Obat ini biasa digunakan pada pasien dengan kanker payudara ER-positif, karena kanker payudara ER-positif merupakan kanker yang disebabkan oleh rangsangan hormon estrogen berlebih dalam tubuh, sehingga menyebabkan sel mengalami peningkatan proliferasi yang tidak terkendali pada payudara.<sup>27, 28</sup>

Tamoksifen merupakan obat yang berfungsi untuk menurunkan efek yang ditimbulkan dari hormon estrogen dengan cara berkompetisi secara langsung dengan estrogen untuk berikatan dengan reseptor estrogen sehingga menurunkan proses tumorigenesis, Tamoksifen juga dapat berasosiasi dengan protein kinase C6 yang selanjutnya akan berikatan dengan *calmodulin*, sehingga mengganggu sintesis DNA. Tamoksifen menyebabkan sel kanker payudara ER positif tertahan pada fase G1 selama siklus sel karena obat ini akan menurunkan ekspresi TGF  $\alpha$  dan meregulasi ekspresi

TGF  $\beta$ 1 dan TGF  $\beta$ 2. Efek samping yang dapat ditimbulkan diantaranya menjadi mudah lelah, periode menstruasi berubah, mual dan muntah, pusing, penambahan berat badan, dan nyeri sendi.<sup>8, 29</sup>

#### 2.1.4 Apoptosis

Apoptosis merupakan jalan kematian sel yang terprogram tanpa melepaskan substansi yang berbahaya untuk sekitarnya, dalam prosesnya akan melibatkan enzim yang akan mendegradasi inti DNA, nuclear dan juga protein sitoplasmiknya. Terdapat beberapa penyebab apoptosis:

- Apoptosis Fisiologis

Dapat terjadi ketika perkembangan awal organisme, dimana sel akan mati dan digantikan dengan sel lainnya, pada situasi seperti ini kematian sel disebabkan karena apoptosis, dimana hal ini juga penting untuk memastikan tidak adanya sel yang tidak diinginkan sehingga dapat diatasi dan tidak menimbulkan inflamasi.<sup>3</sup>

Contoh kondisi terjadinya apoptosis ini:

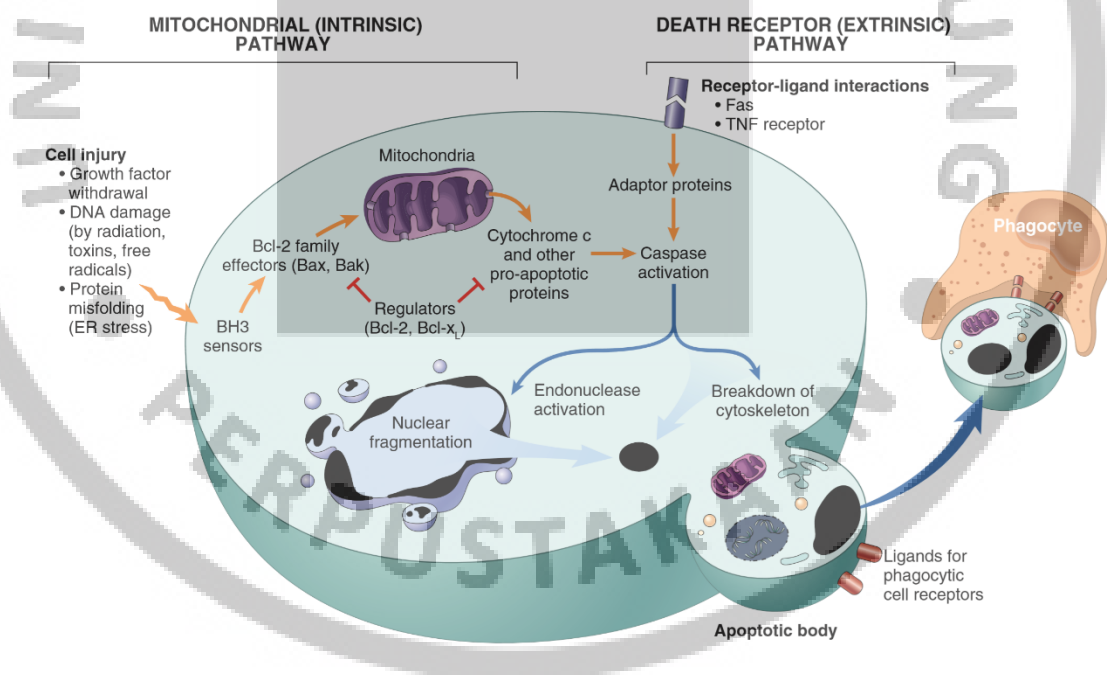
- Ketika embriogenesis
- Pergantian dari jaringan yang cepat melakukan proliferasi
- Pembunuhan *self reactive lymphocyte*

- Apoptosis Patologis

Biasanya dilakukan untuk mengeliminasi sel-sel yang rusak dan sudah tidak dapat diperbaiki. Apoptosis jenis ini dapat dilihat ketika sel mengalami kerusakan DNA yang sangat parah contoh:

- Paparan radiasi
- *Cytotoxic drugs*

Apoptosis ini akan diregulasi oleh sejumlah jalur biokimia yang akan mengatur keseimbangan sinyal kematian dan kehidupan dan juga akan mengaktifasi beberapa enzim yang disebut dengan caspase, dinamai *caspase* karena mereka merupakan *cysteine protease* yang akan memotong protein setelah residu asam aspartik.<sup>3</sup> Terdapat 2 jalur apoptosis seperti yang terdapat pada Gambar 2.2.



**Gambar 2.2 Gambar Jalur Apoptosis**

Gambar 2.2 menunjukkan 2 jalur apoptosis sel intrinsik dan ekstrinsik.

- Mitokondrial (jalur intrinsik)

Jalur yang paling sering terjadi baik dalam keadaan fisiologis maupun patologis. Dimulai dengan peningkatan terjadinya kerusakan atau kelainan dalam sel akan menyebabkan aktivasi sensor BH3 yang nantinya akan mengaktivasi dari keluarga Bcl-2 efektor (Bax, Bak) yang akan berakibat terhadap peningkatan permeabel membran mitokondria, sehingga terjadinya pelepasan sitokrom c dan protein mitokondria keluar dan masuk kedalam sitoplasma, setelah dalam sitoplasma dia akan mengaktivasi kaspase-9 dan aktivasi caspase lain yang akan menyebabkan fragmentasi *nuclear* dan pembentukan *apoptotic bodies*. Yang mengatur permeabilitas mitokondria adalah protein keluarga Bcl-2.<sup>3</sup>

- Reseptor (ekstrinsik) pathway

Banyak sel yang mengekspresikan molekul permukaan yang disebut dengan *cell death receptor*, yang akan menyebabkan apoptosis. Kebanyakan dari reseptor ini adalah keluarga reseptor *tumor necrosis factor* (TNF), yang mengandung “*death domain*”, karena pada daerah ini akan terjadi interaksi antar protein yang dapat menyebabkan kematian sel. Prototipe reseptor kematian adalah type 1 TNF reseptor dan Fas (CD95). Fas Ligand (FasL) merupakan membrane protein yang diekspresikan oleh *T lymphocyte*. Ketika sel T mengetahui adanya ekspresi Fas pada target akan terjadi *cross link* oleh FasL dan nantinya akan berikatan pada *death domain*. Sehingga akan mengaktivasi kaspase 8 yang nantinya akan mengaktivasi kaspase lainnya, selanjutnya akan terjadi kaspase lainnya yang akan mengaktivasi enzim yang akan mendegradasi protein sel dan *nucleus*.<sup>3</sup>

Sel apoptosis dan fragmennya akan menghasilkan sinyal “*eat me*” sel akan memunculkan *phosphatidyleserine* ke *outer leaflet* yang nantinya akan dikenali oleh makrofag, dan akan memicu fagositosis dari sel apoptosis.<sup>3</sup>

### 2.1.5 Bcl-2

BCL-2 merupakan singkatan dari B cell lymphoma-2 protein ini berlokasi bukan hanya di membrane mitokondria luar saja tapi berada juga di retikulum endoplasma,<sup>30</sup> dimana keluarga protein ini memiliki fungsi utama dalam memprogram kematian sel dengan cara mengatur *proapoptotic* dan *antiapoptotic* sinyal dalam sel. BCL-2 ini termasuk kedalam *subfamily prosurvival* Bersama Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, dan A1. Bcl-2 famili ini bekerja dengan cara meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan berikatan kepada *multi domain proapoptotic* Bcl-2 famili member dan menghambat kemampuan aktivitas apoptosis mereka.<sup>31</sup>

Selain itu penelitian sebelumnya juga mengatakan bahwa Bcl-2 protein tidak hanya bekerja dalam mengontrol kematian sel, namun juga dapat meregulasi sel migrasi, invasi dan metastasis kanker. Peningkatan keluarga Bcl-2 juga dapat menyebabkan peningkatan produksi ROS dari respirasi mitokondria, dan ROS ini yang nantinya akan meningkatkan invasi sel.<sup>32</sup>

### 2.1.6 Anaplasia

Anaplasia merupakan suatu kondisi patologis, sel anaplasia merupakan sel indikator dari keganasan, secara istilah anaplasia bebrarti pembentukan kebelakang (*backward formation*) yang berarti sel tesebut kehilangan diferensiasi secara struktural, maupun fungsional sehingga memiliki penampilan sel yang berbeda dari sel normal sekitarnya atau sel asalnya. Sel anaplastic memiliki gambaran morfologi seperti berikut: <sup>5</sup> *pleomorphism* (sel memiliki bentuk dan ukuran yang beragam),<sup>5</sup> <sup>5</sup> inti yang abnormal, dimana biasanya inti terwarnai sangat hiperkromatis (terwarnai hitam pekat), memiliki bentuk dan ukuran inti yang beragam serta terkadang jumlahnya lebih dari satu dengan rasio sitoplasma dan inti 1:1 yang normalnya 1:4 atau 1:6,<sup>6</sup> terdapat *tumor giant cell*, dimana sel ini memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan sel tetangga dan terkadang memiliki inti lebih dari 1, (4) *atypical mitosis*, ditemukan beberapa *anarchic multiple spindle* yang dihasilkan dari *tripolar* atau *quadripolar mitotic figure*, (5) *loss of polarity*, sel anaplastic memiliki pola orientasi yang berbeda satu dengan lainnya sehingga tidak dapat dikenali satu sama lainnya. Sel ini dapat tumbuh dalam lapisan dengan kehilangan total struktur komunal seperti kelenjar atau *stratified squamous architecture*.<sup>28</sup>

Sel anaplastik juga memiliki aktivitas fungsional yang berbeda dari sel normal dan sesama sel anaplastic tergantung dari lokasi asal mula sel anaplastik tersebut terbentuk, beberapa sel anaplastik memiliki kemampuan untuk menghasilkan keratinin, bile, dan hormon etopik. Seperti *adrenocorticotropic hormone* (ACTH), hormon paratiroid, insulin, dan glucagon.<sup>3</sup>

### 2.1.7 Sel Kanker Payudara T47D

Sel T47D memiliki karakteristik ER (*Estrogen Reseptor*)/ PR (*Progesteron Reseptor*) positif. Sel jenis ini mengalami mutasi pada p53. Sehingga sel ini akan kehilangan regulasi siklus sel,<sup>33</sup> hal ini disebabkan sel kanker ini dapat menahan siklus sel pada fase G2/M sehingga akan menghalangi proses apoptosis yang seharusnya terjadi.<sup>6</sup>

Dalam struktur morfologinya sel ini mengandung *desmosome*, *tonofilaments* dan *intracytoplasmic duct like vacuoles* yang menunjukkan asal epithelialnya. Sel ini juga memiliki *cytoplasmic steroid receptor* yang merupakan salahsatu karakteristik dari *mammary cell*, receptor ini mirip dengan reseptor yang terdapat pada MCF-7 line.<sup>34</sup>

### 2.1.8 IC<sub>50</sub>

*Inhibitory concentration* (IC<sub>50</sub>) merupakan proses yang dilakukan dalam pencarian konsentrasi atau dosis untuk evaluasi kecocokan dan kinerja suatu obat, konsentrasi yang dicari ini merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% reaksi enzimatik dalam konsentrasi substrat spesifik dalam proses pertumbuhan sel.<sup>35, 36</sup> Proses pencarian IC<sub>50</sub> dapat dilakukan menggunakan *Microtetrazolium* (MTT) Assay, MTT akan menentukan kemampuan sitotoksitas suatu senyawa berdasarkan penurunan aktivitas *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) *dependent oxireductase activity*.<sup>37</sup> Prinsipnya dari metode MTT adalah terjadinya pereduksian MTT oleh mitokondria sel hidup sehingga menghasilkan kristal formazan



berwarna ungu yang tidak larut air, penambahan reagen stopper akan melarutkan kristal formazan tersebut dan akan diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*.<sup>38</sup>

### 2.1.9 PCR dan qPCR

PCR berasal dari singkatan *Polymerase chain reaction*, PCR merupakan reaksi enzimatik yang digunakan untuk mengandakan dna, dna ini merupakan pasangan komplementari untaian *polynucleotida* yang dihubungkan untuk membentuk *double helix*. Untaian ini dibentuk dari 4 basa yaitu: Adenin, Thymine, Guanine dan Cytosine (yang disingkat dengan A, T, G, dan C) pasangan dari basa tersebut biasanya A dengan T, C dengan G pada helaian komplementarinya. Pada prose PCR DNA *solution* akan dipanaskan, ikatan hidrogen yang tidak *kovalent* yang menghubungkan 2 helaian *polynucleotida* akan melemah dan akhirnya berpisah “*denaturate* atau *melt*”.<sup>39</sup>

qPCR merupakan singkatan dari *quantitative PCR*, dimana ini merupakan metode yang paling sensitif untuk mengetahui dan menghitung jumlah asam nucleat. Pengaplikasiannya terbagi menjadi 2 tipe utama<sup>18</sup> yaitu:

- *relative quantification*  
dalam kuantifikasi relatif mRNA atau microRNA sering ditranskripsikan terbalik, dikuantifikasi relatif terhadap referensi *endogenous*.
- *absolute quantification*

pada *absolute quantification* asam nukleat target akan diukur menggunakan seperangkat standar untuk membentuk standar kurva yang disebut dengan “*absolute quantification*”.

qPCR ini merupakan ‘*gold standar*’ pada analisis kuantitatif asam nukleat, pada DNA, RNA atau molekul micro RNA.<sup>39</sup>

#### 2.1.10 Daun Sirsak

Daun sirsak memiliki nama latin *Annona Muricata*. Yang dikenal sebagai salahsatu tanaman buah torpis yang tersebar hampir dibanyak negara, buahnya dapat digunakan untuk berbagai makanan seperti jus, permen dan lainnya. Bagian akarnya biasanya digunakan sebagai obat tradisional.<sup>40</sup> Sedangkan untuk bagian daun dari tanaman ini memiliki kandungan antiinflamasi dan juga antikanker.<sup>13</sup>

*Annona muricata* biasanya tumbuh pada area yang tropis hangat seperti selatan dan *central* Amerika dan juga Caribbean. Namun sekarang sudah tersebar dan ditemukan pada regio tropis dan subropis dari central dan Amerika selatan, *western* Amerika dan asia tenggara pada ketinggian 1.200m ditas permukaan laut dengan temperature berkisar 25-28 °C dan kelembaban berkisar 60-80% dan curah hujan pertahun diatas 1500mm. Tanaman ini meiliki ketinggian 5-8m dengan diameter batang 15-83cm, memiliki daun yang besar, mengkilap dan berwarna hijau gelap.<sup>13</sup> tanaman *Annona muricata* tersaji dalam Gambar 2.3.



**Gambar 2.3 Tanaman *Annona muricata*** <sup>13</sup>

Gambar 2.3 a menunjukkan keseluruhan tanaman, b menunjukkan bentuk daun dari tanaman sirsak, c bunga tanaman sirsak, d. buah sirsak, e gambaran biji tanaman sirsak.

Taksonomi dari *Annona Muricata*:

**Tabel 2.1 Taksonomi Daun Sirsak**

Klasifikasi Ilmiah	
<i>Kingdom:</i>	<i>Plantae</i>
<i>Division:</i>	<i>Angiosperm</i>
<i>Class:</i>	<i>Magnolids</i>
<i>Order:</i>	<i>Magnoliale</i>
<i>Famili:</i>	<i>Annonaceae</i>
<i>Genus:</i>	<i>Annona</i>
<i>Species:</i>	<i>Annona muricata</i>

Tabel 2.1 menunjukkan taksonomi dari tanaman sirsak yang memiliki keluarga *annonaceae* dan spesies *Annona muricata*.

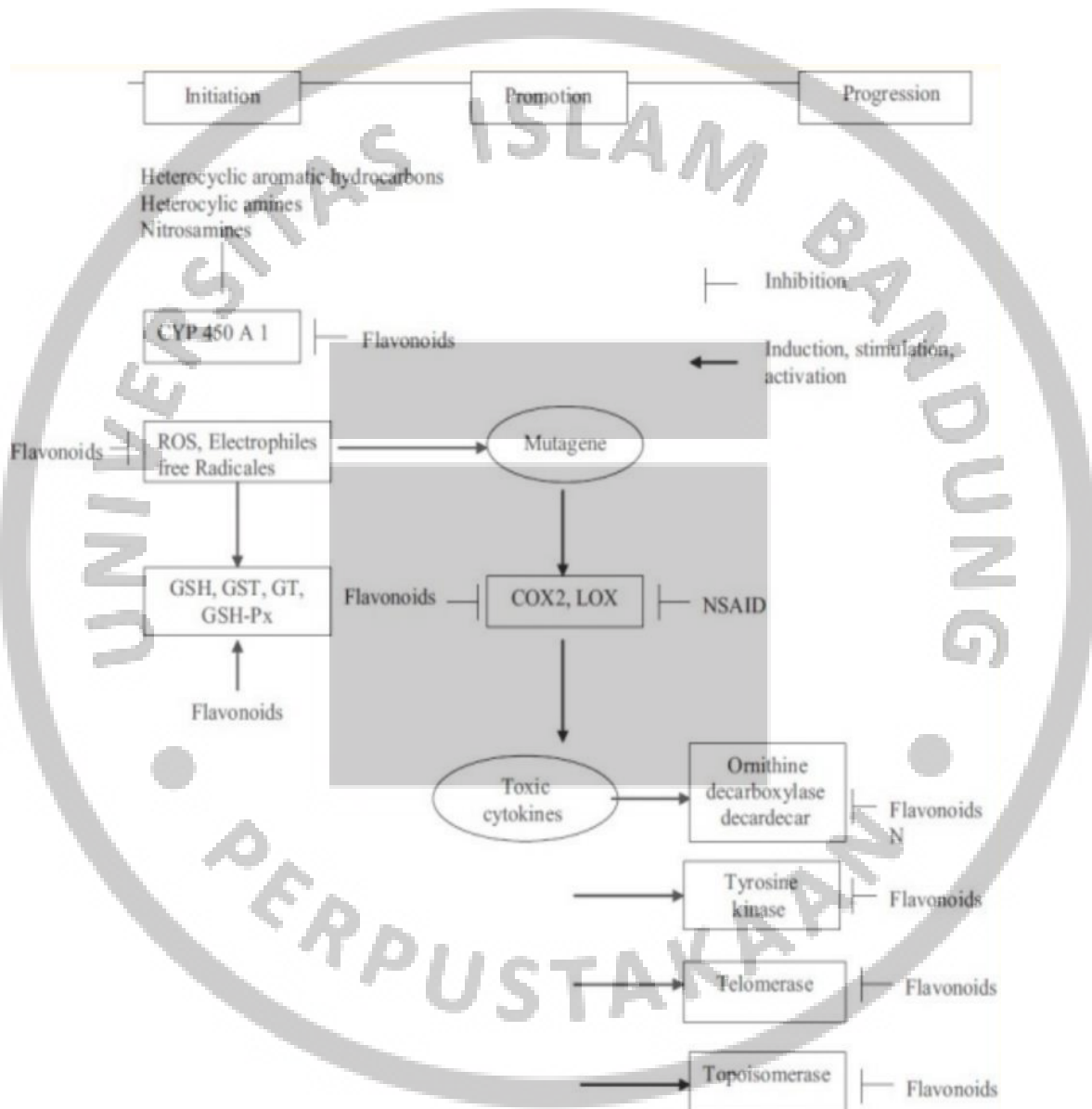
Beberapa kandungan bioaktif daun sirsak yang memiliki kegunaan sebagai antikanker, antitumor, antiinfeksi dan antioksidan adalah *flavonoid*, alkaloid, *phenolic acid*, *Triterpenoid*.<sup>13</sup>

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan substansi natural dengan berbagai macam struktur *phenolic*, biasanya ditemukan pada buah-buahan, sayuran, akar, batang, dan bunga. Produk natural ini juga diketahui memiliki efek yang bermanfaat bagi tubuh. Senyawa ini biasanya dipergunakan sebagai komponen dari obat-obatan dan juga kosmetik. Karena manfaatnya yang banyak diantaranya memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, dan antikarsinogenik.<sup>41</sup> Mekanisme penting flavonoid adalah dengan mencegah aktivasi metabolisme karsinogen melalui interaksi enzim metabolisme fase I (sitokrom P450) yang secara metabolis dapat mengaktivasi sebagian besar *prokarsinogen* yang dapat memicu karsinogenesis. Senyawa flavonoid ini bekerja dengan cara menghambat aktivitas isozim P450 tertentu, seperti CYP1A1 dan CYP1A2, sehingga memiliki peran perlindungan terhadap induksi kerusakan sel oleh aktivasi karsinogen. Mekanisme lain dari flavonoid adalah menginduksi enzim metabolisme fase II seperti GST, *Kuinon reductase*, dan UDP-GT, enzim ini berfungsi untuk mendetoksifikasi karsinogen dan menghilangkannya dari tubuh,<sup>21</sup> mekanisme dapat dilihat pada Gambar 2.4.

Selain itu flavonoid berfungsi sebagai anti proliferasi dengan menghambat *xanthine oxidase*, COX atau LOX55, yang berperan untuk menghambat proliferasi sel tumor, flavonoid ini juga dapat menghambat *ornithine decarboxylase* yang diinduksi

oleh promotor tumor yang menyebabkan penurunan *poliamin* dan penghambatan sintesis DNA dan protein,<sup>21, 42</sup> mekanisme dapat dilihat pada Gambar 2.4.



**Gambar 2.4 Hipotesis Inhibisi karsinogenesis oleh flavonoid<sup>21</sup>**

Gambar 2.4 menunjukkan gambaran mekanisme aksi dari flavonoid dalam menghambat terjadinya kanker

Pada saat siklus sel terdapat *cyclin dependent kinase* (CDK) yang berfungsi dalam mengatur perkembangan siklus sel, perubahan dari CDK ini merupakan ciri dari sel neoplasma. Kandungan *flavonoid* seperti *silymarin*, *genistein*, *quercetin*, *daidzein*, *luteolin*, *kaempferol*, *apigenin*, dan *epigallocatechin 3-gallate* dapat mengganggu cekpoin sel antara G1/S dan G2/M. penelitian lain mengatakan jenis *flavonoid* lain seperti *flavopiridol* dapat memicu penahanan sel ketika G1 atau G2/M dengan cara menghambat CDK.<sup>21</sup>

Peran lain flavonoid dalam antikanker adalah dengan cara memicu apoptosis sel. Namun untuk mekanisme flavonoid dalam memicu apoptosis belum diketahui sepenuhnya. Beberapa mekanisme yang dapat dilakukan dengan cara inhibisi aktivitas topoisomerase DNA I/II, menurunkan ROS, menurunkan faktor transkripsi *nuclear kappa B* (NF- $\kappa$ B), mengaktifasi endonuklease, dan menekan protein Mcl-1.<sup>21</sup> Selain itu efek antioksidan yang dimiliki *flavonoid* dapat menginduksi transkripsi dari p21<sup>WAF1/CIP1</sup> tanpa membutuhkan bantuan dari p53, yang mana hal ini akan menginaktivasi hampir 1/3 kanker pada manusia.<sup>43</sup> selain itu flavonoid ini akan memicu apoptosis dengan cara menurunkan tingkat Bcl-2 dan Bcl-xL sehingga akan menurunkan kemampuan sel dalam bertahan hidup, dan meningkatkan regulasi dari p53 sehingga akan mengembalikan siklus kembali secara semula.<sup>3, 44, 45</sup> Selain itu senyawa ini juga dapat menyebabkan pengaktifasian apoptosis jalur ekstrinsik dengan cara meningkatkan ekspresi gen Fas dan menghentikan siklus sel dengan menghambat enzim topoisomerase.<sup>46, 47</sup>

b. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa alami yang banyak dihasilkan dari tanaman, alkaloid telah digunakan selama 3000 tahun sebagai bahan pembuatan obat. Strukturnya dibentuk dari formasi garam dengan asam mineral atau asam organik serta memiliki sifat larut dalam air dan mencair dalam alcohol.<sup>48</sup>

c. *Phenolic acid*

*Phenolic acid* merupakan kandungan yang dapat ditemukan pada buah dan sayuran, senyawa ini memiliki kemampuan antikanker seperti mencegah radikal bebas, meregulasi ekspresi gen, dan memodulasi jalur signaling sel yang dapat memicu DNA repair pada sel yang rusak, apoptosis sel dan menghambat proliferasi sel secara berlebihan serta mencegah invasi, selain itu kandungan ini juga memiliki kemampuan antiinflamasi dengan menekan ekspresi *Cyclooxygenase* (COX-2) yang berlebihan. Sehingga akan mengurangi perubahan asam *arachidonic* menjadi prostaglandin sehingga menurunkan stimulasi inflamasi, mitogen, sitokin yang dapat menyebabkan proliferasi sel.<sup>49</sup> *phenolic acid* juga dapat menghambat ekspresi dan aktivitas enzim sitotoksik termasuk *nitric oxide synthase* caspase dan *cyclooxygenase* dan memodulasi p53, Bax dan GADD45 sehingga akan menurunkan Bcl-2 sehingga akan menyebabkan apoptosis.<sup>50</sup>

d. *Triterpenoids*

*Triterpenoids* diproduksi pada sitosol dan retikulum endoplasma (RE) sel tanaman. Triterpenoid memiliki fungsi sebagai antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, antivirus, *hepatoprotektif*, *gastroprotectif*, antikanker, regulasi sistem kekebalan tubuh, dan cardio protektif. Senyawa ini dapat menghambat beberapa sinyal molekul sel dan



faktor transkripsi, sehingga dapat meregulasi proliferasi sel tumor, transformasi, ketahanan hidup, invasi, pembentukan pembuluh darah baru, dan menghambat penyebarannya.<sup>51</sup> Senyawa bio aktif ini juga dapat menekan ekspresi dari antiapoptotik Bcl-2 tapi tidak pada Bcl-xL sehingga akan memicu apoptosis sel lebih cepat.<sup>52</sup> Selain dengan menekan ekspresi gen Bcl-2 *triterpenoid* juga mampu bekerja dengan cara meningkatkan aktivitas reseptor Fas, dan reseptor faktor nekrosis tumor1 (TNFR1), sehingga akan memicu kematian sel jalur ekstrinsik.<sup>53</sup>

## 2.2 Kerangka Pemikiran

Kanker payudara terjadi ketika sel pada payudara mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali, pertumbuhan tak terkendali tersebut dapat disebabkan karena berbagai macam faktor. Diantaranya, faktor internal dan juga faktor eksternal, Faktor internal seperti riwayat keluarga dan genetik, sedangkan faktor eksternal karena paparan radiasi atau polusi. Faktor risiko tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada DNA yang berakibat pada keabnormalitasan sel, sehingga sel memiliki kemampuan untuk melakukan proliferasi yang tak terhingga, serta kemampuan untuk mencegah terjadinya kematian sel "*apoptosis*".<sup>3</sup>

Salahsatu jenis sel kanker -payudara yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah sel T47D, sel ini memiliki kemampuan dalam mengekspresikan gen Bcl-2 yang tinggi. Peningkatan gen Bcl-2 akan menyebabkan penghambatan pada ekspresi Bcl-2 efektor yang berperan penting dalam proses sel apoptosis intrinsik.<sup>33</sup>



Terapi yang digunakan untuk mengatasi penyakit kanker adalah operasi, kemo terapi, radio terapi, terapi bertarget dan terapi hormon,<sup>7, 22</sup> terapi hormon yang paling sering digunakan adalah obat tamoksifen, tamoksifen memiliki kemampuan untuk menurunkan efek hormon estrogen didalam tubuh dengan cara berkompetisi secara langsung dengan estrogen untuk berikatan pada reseptor estrogen. Selain itu tamoksifen juga dapat berasosiasi dengan protein kinase C6 yang selanjutnya akan berikatan dengan calmodulin untuk mengganggu sintesis DNA sel. Efek samping yang dapat ditimbulkan oleh tamoksifen adalah mudah lelah, periode menstruasi berubah, mual dan muntah, pusing, penambahan berat badan, dan nyeri sendi.<sup>24</sup>

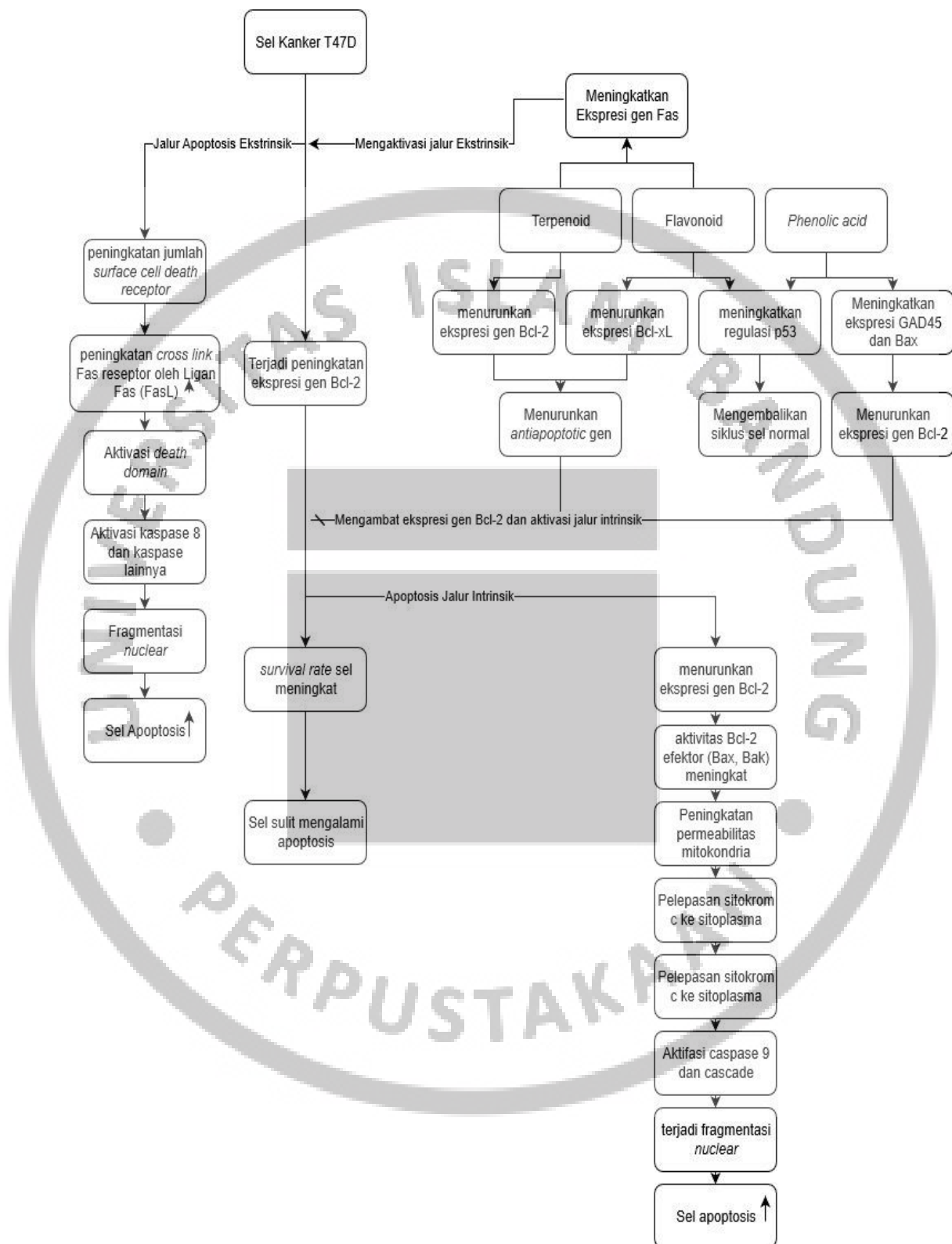
Karena terapi yang digunakan masih memiliki banyak kekurangan dan efek samping, maka banyak peneliti yang mulai melakukan percobaan pada tanaman herbal untuk menciptakan terapi kanker yang lebih efektif dan lebih efisien untuk mengobati penyakit kanker. Salahsatu tanaman herbal yang telah diuji memiliki adalah ekstrak air daun sirsak.<sup>11, 42</sup>

Ekstrak air daun sirsak memiliki kandungan *flavonoid*, alkaloid, *triterpenoids*, dan *phenolic acid* yang memiliki efek antikanker. Mekanisme penting flavonoid adalah dengan mencegah aktivasi metabolis karsinogen melalui interaksi enzim metabolisme fase I (sitokrom P450) yang secara metabolis dapat mengaktivasi sebagian besar *prokarsinogen* yang dapat memicu karsinogenesis. Senyawa flavonoid ini bekerja dengan cara menghambat aktivitas isozim P450 tertentu, seperti CYP1A1 dan CYP1A2, sehingga memiliki peran perlindungan terhadap induksi kerusakan sel oleh aktivasi karsinogen.<sup>21</sup>

Alkaloid dan *phenolic acid* memiliki kemampuan untuk menghambat proses proliferasi sel, merangsang apoptosis dan menghambat pembentukan pembuluh darah baru (*Angiogenesis*).<sup>21, 48, 54</sup> *Phenolic acid* merupakan salahsatu kandungan daun sirsak yang memiliki *bioactivities* seperti antioksidan tinggi.<sup>55</sup> Alkaloid juga memiliki kemampuan untuk menghambat kelangsungan hidup sel, proliferasi, invasi dan angiogenesis pada *human lioma cells*. Selain itu memiliki kemampuan untuk menginduksi *HeLa cervical cell death* dengan apoptosis dan nekrosis.<sup>54</sup>

Triterpenoid dapat menghambat beberapa sinyal molekul sel dan faktor transkripsi, sehingga dapat meregulasi proliferasi sel tumor, transformasi, ketahanan hidup, invasi, pembentukan pembuluh darah baru, dan menghambat penyebarannya.<sup>51</sup>

*Phenolic acid* merupakan salahsatu kandungan daun sirsak yang memiliki *bioactivities* seperti antioksidan tinggi.<sup>55-57</sup> bagan kerangka penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Bagan Kerangka Pemikiran

### 2.3 Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran tersebut, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

1. Ekspresi gen Bcl-2 pada kultur sel kanker payudara T47D yang diberi ekstrak air daun sirsak lebih rendah dibandingkan dengan yang tidak diberi.
2. Ekspresi gen Bcl-2 pada kultur sel kanker payudara T47D yang diberi ekstrak air daun sirsak lebih rendah dibandingkan dengan yang diberi doksorubisin.
3. Ekspresi gen Bcl-2 pada kultur sel kanker payudara T47D yang diberi ekstrak air daun sirsak lebih rendah dibandingkan dengan yang diberi tamoksifen.