BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan salah satu penyakit tidak menular. Prevalensi kejadian kanker cukup tinggi dan menjadi penyebab kematian ke-2 (13%) setelah penyakit kardiovaskuler. Kanker tertinggi di Indonesia pada perempuan adalah kanker payudara dan kanker leher rahim (serviks), sedangkan pada laki-laki adalah kanker paru dan kanker kolorektal (KemenkesRI, 2016). Berdasarkan data estimasi dunia tahun 2012, kanker paru pada laki-laki dan kanker payudara pada perempuan sebagai penyebab kematian tertinggi untuk penderita kanker. Di Indonesia pada tahun 2013, prevalensi penyakit kanker payudara berada di urutan ke dua setelah kanker serviks dengan jumlah penderita 61.682 orang (KemenKesRI, 2015). Terapi yang dapat dilakukan untuk penderita kanker diantaranya operasi, radioterapi, terapi target, dan kemoterapi. Pengobatan penyakit kanker bekerja dengan mekanisme penghambatan pembelahan sel dan induksi apoptosis. Efek samping yang tidak nyaman dan adanya resistensi dari obat kemoterapi, mendorong penggunan alternatif tanaman obat tradisional sebagai penyembuhan kanker (Ma'at, 2004).

Tanaman obat tradisional yang digunakan sebagai obat dapat dalam bentuk simplisia dan harus berkualitas sesuai dengan standar mutu simplisia. Persyaratan kualitas simplisia terdapat dalam monografi simplisia salah satunya yaitu kandungan kimia senyawa (BPOM RI, 2008). Simplisia yang memenuhi syarat monografi dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan. Lengkuas (*Alpinia galanga*) merupakan tanaman famili *Zingiberacea.* Lengkuas mengandung senyawa fenilpropanoid diantaranya 1'-asetoksi kavikol asetat, 1'-asetoksieugenol asetat, trans-p-kumaril diasetat, 1'-hidroksikavikol asetat, trans-p-kumaril alkohol (Matsuda, 2005). Senyawa 1'-asetoksi kavikol asetat telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7) (Chauhan Vimal Singh, Swapna M, 2014). Nilai sitotoksisitas IC_{50} yang diperoleh senyawa 1'-asetoksi kavikol asetat pada sel MCF7 sebesar 23,9 µM (Lee and Houghton, 2005). Selain

uji sitotoksik, senyawa 1'-asetoksi kavikol asetat ini memiliki aksi dalam penghambatan aktivasi NF-kB yang akan memicu aktifnya *Cyclin* D (Ito *et al.*, 2005). Penghambatan dalam aktivasi *cyclin* menyebabkan tidak terjadinya fosforilasi pRb, sehingga sel tidak akan memasuki fase sintesis. Mekanisme tersebut digunakan sebagai pengamatan proliferasi sel pada siklus sel kanker. Ekstrak lengkuas yang mengandung senyawa 1'-asetoksi kavikol asetat di analisis menggunakan metode MTT dan *flow cytometer* dapat menghambat proliferasi sel pada fase G0-G1 dengan IC_{50} 20 µM (Hasima *et al.*, 2010). Hasil penelitian tersebut memiliki nilai IC_{50} yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antiproliferatif dari ekstrak terstandar lengkuas berdasarkan senyawa 1'-asetoksi kavikol asetat pada sel kanker payudara MCF7.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka penelitian ini dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah kandungan senyawa 1'-Asetoksi kavikol asetat dalam ekstrak terstandar rimpang lengkuas mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF7?
2. Apakah ekstrak terstandar rimpang lengkuas memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara MCF7?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah maka tujuan penelitian ini untuk :

1. Mengetahui pengaruh kandungan senyawa 1'-Asetoksi kavikol asetat dalam ekstrak terstandar rimpang lengkuas terhadap aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara MCF7.
2. Mengetahui aktivitas antiproliferatif ekstrak terstandar rimpang lengkuas pada sel kanker payudara MCF7.

D. Tinjauan Pustaka

1. Kanker

Kanker merupakan penyakit dengan karakteristik pertumbuhan sel yang tidak normal, invasi pada jaringan lokal dan terjadi metastasis (Dipiro *et al*, 2008). Kanker yaitu suatu neoplasma, neoblastoma, tumor yang berupa jinak atau ganas. Kanker dapat dibedakan menjadi sarkoma dan kasinoma. Sarkoma bersifat mesensimal sedangkan karsinoma bersifat epithelial, seperti pada kanker payudara dan kanker lambung. Jumlah sel di tubuh menjadi berlebih dengan adanya pembelahan sel terus menerus (Mulyadi, 1996). Terapi yang diberikan pada penderita kanker dilakukan berdasarkan stadium keparahan kanker. Pengobatan penyakit kanker dapat dilakukan dengan pembedahan, radioterapi, kemoterapi, terapi biologis (imunologi) atau penggunaan terapi hormonal (Manuaba, 2010). Sekitar 40% penyakit kanker ini bisa dicegah dan bahkan beberapa kanker dapat disembuhkan jika dapat terdeteksi secara dini seperti pada kanker leher rahim, kanker kolorektal, dan kanker payudara (KemenKesRI, 2016).

Kanker payudara merupakan suatu keganasan yang terjadi pada jaringan payudara (Dipiro *et al*., 2008). Faktor resiko kanker ini diantaranya faktor endokrin, genetik (riwayat keluarga, mutasi pada gen BRCA1 dan BRCA2), lingkungan dan gaya hidup (Wells *et al*., 2015), usia, riwayat laktasi, menstruasi, pemakaian obat-obat hormonal (Manuaba, 2010). Sel dapat berkembang menjadi kanker payudara berdasarkan resikonya dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelainan payudara nonproliferatif (fibrositik), penyakit kelainan payudara proliferatif, dan hiperplasia atipikal (Kumar *et al.,* 2010). Sel Michigan Cancer Foundation 7 (MCF7) merupakan salah satu sistem sel yang biasa digunakan dalam model penelitian kanker payudara. Sifat sel MCF7 yaitu memiliki resistensi terhadap agen kemoterapi (Aouali *et al.*,2003), tidak dapat membentuk caspase 3 (Prunet *et al.*,2003), adanya ekspresi reseptor estrogen (Butt et al 2000), dan pembentukan Bcl2 yang berlebihan (Amundson *et al.*,2000).

2. Lengkuas

a. Tanaman lengkuas

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivision : Spermatophyta
Division : Magnoliophyta
Class : Liliopsida
Subclass : Zingiberidae
Order : Zingiberales
Family : Zingiberaceae – *Ginger family*
Genus : Alpinia Roxb – Alpinia
Species : *Alpinia galangal* (L.) Sw. – *Greater galangal*
(NRCS, 2016)

Rimpang lengkuas berbentuk menjalar, berdaging warna merah atau kuning pucat dengan berbau harum dan rasa yang pedas. Tanaman ini berbatang semu yang tumbuh tegak 1 – 3 meter. Lengkuas memiliki nama daerah yang berbeda-beda, nama Sumatera yaitu Langkueueh (Aceh), laos (Jawa), Langkuwas (Kalimantan), langkuwas (Makasar), galisa (Ternate). Sinonim penamaan lengkuas dalam bahasa latin diantaranya *Alpinia pyramidata* BI, *Languas galangal* (L.). Rimpang ini bisa dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk penderita gatal kulit, sakit perut dan disentri (BPOM RI, 2010). Rimpang lengkuas mengandung berbagai zat kimia yang bermanfaat baik dalam bidang kesehatan maupun keperluan sehari–hari. Senyawa kimia rimpang lengkuas diantaranya terdapat komponen kamfer dengan minyak atsiri, 1’-Asetoksikavikol asetat, asam metil sinamat, metil eugenol dan eugenol asetat, zerumbon, 1,8-sineol, beta bisabolen (BPOM RI, 2010).

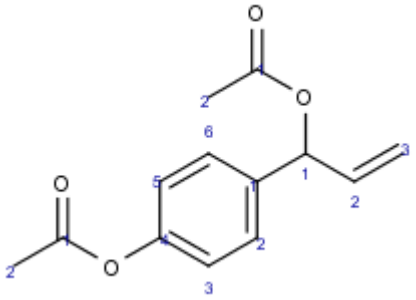
b. Efek farmakologis

Rimpang lengkuas sudah digunakan oleh orang-orang terdahulu sebagai pengobatan tradisional. Berdasarkan beberapa hasil penelitian, lengkuas memiliki efek sebagai antiinflamasi, senyawa 1,8-Cineole mempunyai aktivitas antibakteri,

antidiabetes, antioksidan dengan adanya flavonoid (Suja, 2008). Tanaman yang memiliki khasiat sebagai antikanker sudah mulai banyak ditemukan oleh beberapa peneliti. Bahan alam yang sudah banyak di teliti salah satunya rimpang lengkuas. Senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman ini salah satunya 1'-asetoksikavikol asetat sebagai antikanker (Lee & Houghton, 2005)

Senyawa kimia yang memiliki aktivitas sebagai antikanker antara lain Pinostrobin chalcone *(A. mutica),* Sumadain C *(A. katsumadai),* 1'Asetoksieugenol asetat, 1'-Asetoksi kavikol asetat dan p-kumaril alkohol c-O-metil eter *(A. galangal),* 7-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-en-3-heptanone *(A. officinarum)* (Malek *et al.*, 2011; Hasima, 2010; *An et al.,* 2008). 1'-asetoksikavikol asetat merupakan salah satu target dalam isolasi senyawa anti kanker pada rimpang lengkuas spesies *Alpinia galangal*.

c. Senyawa 1'-asetoksikavikol asetat



Gambar 1. Struktur senyawa 1'-asetoksikavikol asetat

Senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat yang terdapat pada rimpang lengkuas termasuk golongan fenilpropanoid (Won *et al*., 2005). Fenilpropanoid mengandung struktur dasar berupa siklik fenil C6 dengan rantai samping propanoid C3 sehingga disebut juga dengan C9 atau kelipatannya. Pembentukan fenilpropanoid berdasarkan jalur asam sikimat (Saifudin, 2014). Efek antikarsinogenik dari ekstrak etanol rimpang lengkuas berkaitan dengan adanya kandungan antioxidan yang banyak dan adanya metabolit sekunder seperti flavonoid (Suja, 2008). Ekstrak etanol lengkuas merah mengandung senyawa 1'-

Asetoksikavikol asetat. Senyawa ini berpotensi sebagai antikanker melalui mekanisme induksi apoptosis dan aktivasi jalur Caspase-3 (Asri & Winarko, 2016). Caspase merupakan enzim yang dapat menghambat protein yang berakibat pada proses apoptosis sel. Aktivasi jalur caspase 3 akan meningkatkan apoptosis dan menurunkan aktivitas proliferasi (Hartono, 2009). Sel epitel duktus payudara yang di induksi *benzo(a)pyrene* dapat mengalami penghambatan proliferasi sel dengan adanya senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat (Liangan, 2015).

Senyawa ini juga memiliki efek antiinflamasi dengan penghambatan dari Nitrit Oksida dan COX-2. Efek antioxidan dengan menghambat xanthin oksidase, dan oksidasi NADPH sistem penghasil O_2 (Asri & Winarko, 2016). Xanthin oksidase ini berperan dalam proses katabolisme purin serta sebagai katalis hipoxanthin menjadi xanthin dan pembentukan asam urat (Pacher *et al.*, 2006). Aktivitas penangkal radikal bebas yang kuat berperan sebagai penghambat lipooxigenase. Senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat juga memiliki aktivitas sitotoksik dan berpotensi sebagai antiangiogenik (Asri & Winarko, 2016). Penelitian sebelumnya senyawa 1'-asetoksikavikol asetat dapat menghambat efek NF-kB, menginduksi apoptosis dari sel *myeloma* secara *in vivo* dan *in vitro* (Ito *et al.*, 2005). Senyawa 1'-asetoksikavikol asetat juga dapat menghambat regulasi ekspresi gen dan aktivasi NF-kappaB. Mekanisme ini terjadi melalui perubahan apoptosis dan menghambat invasi (Ichikawa *et al.*, 2005).

3. Ekstrak

Ekstrak merupakan hasil penyarian simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang dapat dilakukan yaitu dengan maserasi, sokletasi, perkolasi, refluks, dan destilasi uap. Pemilihan metode ini berdasarkan sifat bahan dan senyawa yang akan dicari. Maserasi salah satu metode yang paling banyak digunakan dan merupakan metode yang sederhana. Ekstrak simplisia yang bertujuan untuk pengobatan dan pemeliharaan kesehatan harus memenuhi persyaratan mutu yang berlaku untuk simplisia. Pengobatan obat herbal yang berkualitas ditentukan salah satunya dari mutu bahan baku (simplisia) atau ekstrak yang digunakan. Persyaratan mutu simplisia berdasarkan monografi standarisasi

ekstrak antara lain parameter spesifik dan non spesifik. Parameter spesifik diantaranya kandungan kimia simplisia sedangkan parameter non spesifik diantaranya susut pengeringan, kadar abu, kadar air, kadar etanol (BPOM RI, 2010).

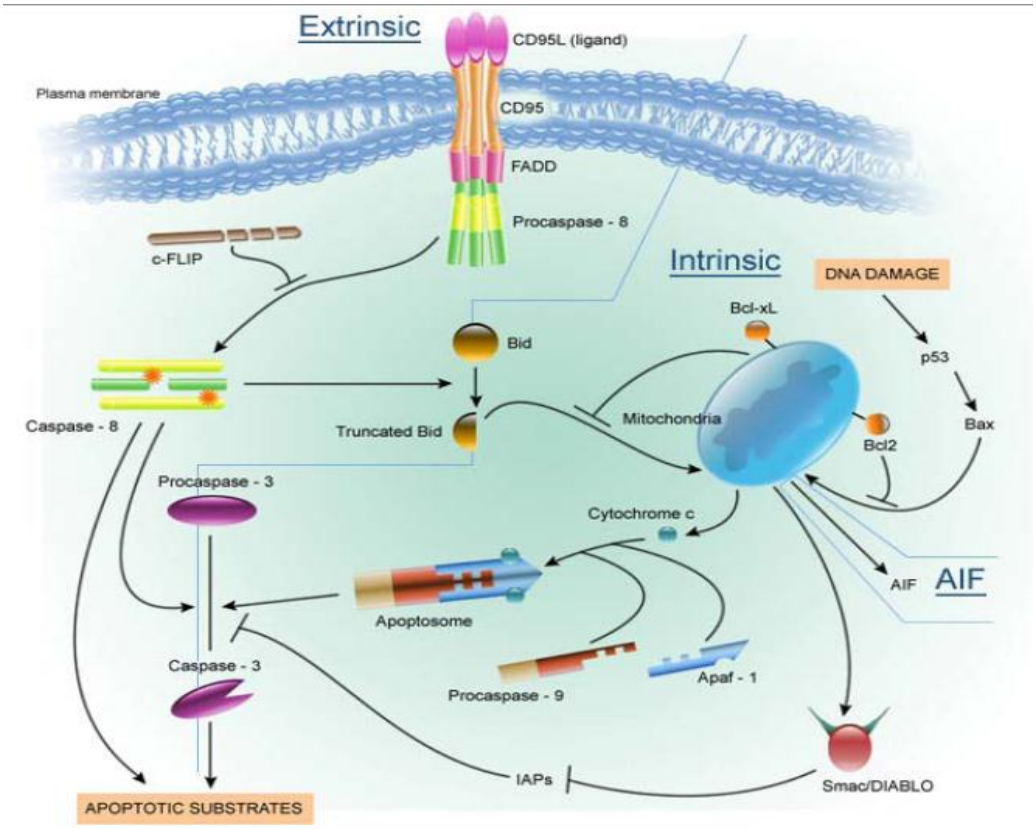
4. Apoptosis

Apoptotis adalah proses kematian sel yang terprogram secara internal pada kondisi fisologis normal (Subowo, 2011). Mekanisme apoptosis berbeda dengan nekrosis sel. Nekrosis juga merupakan kematian sel melalui kerusakan sel yang akut dan dapat menimbulkan peradangan. Induksi apoptosis berdasarkan penyebabnya dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

a. Hilangnya sinyal positif sel (*Growth-Stimulating factors*) seperti faktor pertumbuhan dapat memicu terjadinya apoptosis.

b. Induksi sinyal negatif. Reseptor mengikat *death ligands* yang dapat mengakibatkan terjadinya kematian sel. Selain itu aktivasi apoptosis dapat terjadi melalui sinyal internal sel. Contohnya ketika terjadi perbaikan sel-sel yang rusak, infeksi virus, atau terjadi stress kekurangan nutrisis dan oksigen (Hejmadi, 2010).

Aktivasi apoptosis sel terjadi karena adanya rangsangan secara ekstrinsik maupun intrinsik. Faktor ekstrinsik diantaranya TNF yang memicu apoptosis melalui aktivitas dengan *cascade-caspase*, TGF-β, neurotransmitter, radikal bebas, sinar UV, serta radiasi ionisasi. Faktor intrinsik sering disebut sebagai produk onkogen (*rel* dan *myc*), tumor supresor p53 (Subowo, 2011).

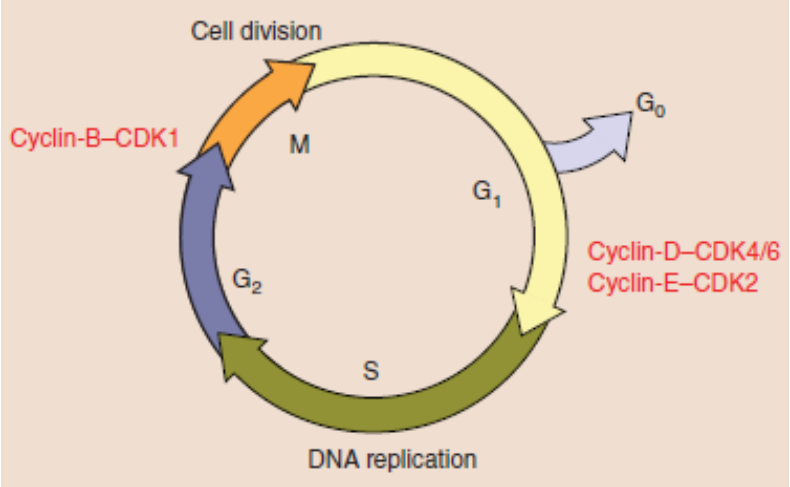


Gambar 2. Apoptosis sel

Faktor ekstrinsik terjadi karena adanya ikatan antara ligan dengan reseptor mengakibatkan terjadinya aktivasi FADD (*Fas-Associated Death Factor*) dan DED (*Death Efector Domain*). DED mengawali proses apoptosis melalui jalur caspase 8. Proses ini dapat terjadi secara langsung membentuk Substrat Apoptosis atau melalui pembentukan pro-caspase-3. Aktivasi caspase 8 menyebabkan terjadinya perubahan BID menjadi tBID. tBID kemudian mengalami translokasi ke dalam mitokondria, melepaskan SMAC yang kemudian membentuk IAPs pada induksi apoptosis caspase 3. Jalur apoptosis intrinsik terjadi di mitokondria karena adanya stimulus kerusakan DNA. Bcl2 menghambat proses perbaikan DNA yang rusak pada permeabilitas membrane melepaskan SMAC, AIF, dan Sitokrom-c. Sitokrom-c berperan dalam pembentukan apoptosom untuk proses caspase-3. Sedangkan AIF berperan dalam degradasi DNA (Hejmadi, 2010).

5. Siklus sel

Sel di dalam tubuh mengalami pembelahan secara berkelanjutan membentuk suatu siklus sel. Pada keadaan normal siklus sel berperan dalam regenerasi sel, atau pembentukan organisme baru. Siklus sel terdiri dari 4 tahapan. Fase G0 merupakan fase istirahat sel. Fase G1 (gap 1) sel mempersiapkan diri untuk memasuki fase sintesis DNA. Fase S (Sintesis DNA) terjadi sintesis DNA, biosintesis RNA dan protein. Fase G2 (gap 2) sel akan melakukan replikasi DNA untuk pembelahan sel. Fase M (Mitosis) terjadi replikasi kromosom yang memisah dan membentuk 2 sel yang sama melalui sitokinesis.



Gambar 3. Siklus sel (Duronio and Xiong, 2013)

Proses transisi pada fase G2 ke fase M diatur oleh kompleks *cyclin* B/cdc2 (*Mitosis Promoting Factor*, MPF). Transisi dari fase G1 ke fase S sering terganggu pada kanker. Perkembangan ini terjadi dengan adanya *growth factor* yang berikatan dengan reseptor. Keadaan ini mengaktifkan jalur sinyal transduksi yang memproduksi *cyclin* D. Dipertengahan fase G1 terjadi fosforilasi dari protein retinoblastoma (RB) dengan adanya *cyclin* D-Cdk4 kinase, Cdk6 kinase. Diakhir fase G1 proses fosforilasi RB berakhir dengan adanya cyclin E-Cdk2 melepaskan E2F dan menuju transisi fase G1/S. E2F merupakan faktor transkripsi yang menstimulasi terjadinya sintesis DNA (Braunwald, 2001; Hartl, 2000; Kumar *et al*, 2010).

6. *Flow cytometer*

Flow cytometer merupakan metode yang dapat digunakan dalam analisis proliferasi di siklus sel dan analisis induksi apoptosis. Proliferasi sel ditentukan berdasarkan kecepatan terbentuknya sel baru dalam jaringan. Jumlah sel yang tidak normal disebabkan adanya peningkatan proliferasi sel, perubahan sel, dan terjadinya penurunan apoptosis sel (kematian sel). Faktor pemicu proliferasi diantaranya pertumbuhan intrinsik, mortalitas dan morbiditas sel, adanya jejas, dan lingkungan dengan mediator biokimiawi. Kanker timbul karena adanya stimulus yang berlebih dan kurangnya peran inhibitor (Hartono, 2009). Sebelum analisis proliferasi sel, sampel dilakukan uji sitotoksik sebagai awal penentuan aktivitas antikanker.

Uji sitotoksik dan *cell viability* digunakan untuk *screening* obat dan pengujian sitotoksik pada bahan kimia. Fungsi dari sel seperti aktivitas enzim, permeabilitas sel, pertahanan sel, produksi ATP, produksi *co-enzim*. Penggunaan metode MTT berdasarkan aktivitas enzim dengan adanya reduksi warna dari reagen dan dehidrogenase pada sel yang masih hidup untuk menetapkan ketahanan sel dengan metode kolorimetri. MTT merupakan metode yang terbaik untuk mengetahui aktivitas dehidrogenase pada mitokondria sel hidup. MTT mereduksi warna ungu formazan dengan NADH yang larut dalam air dan berbentuk kristal jarum ungu pada sel. Sehingga, sebelum menentukan absorbansi perlu penambahan pelarut organik untuk melarutkan kristal. (Dojindo, 2013).

E. Landasan Teori

Kandungan senyawa kimia pada rimpang lengkuas memiliki banyak manfaat terutama dalam kesehatan. Lengkuas (*Alpinia galangal)* mengandung senyawa yang berkhasiat sebagai antikanker salah satunya pada sel kanker payudara MCF7 (Lee & Houghton, 2005). Penelitian sebelumnya, hasil ekstrak etanol *Alpinia galangal* memiliki aktivitas antikanker terhadap kanker payudara dengan mekanisme penghambatan aktivitas proliferasi sel dan pertumbuhan volume tumor. Pengujian secara *in vivo* dilakukan pada mencit galur C3H dengan dosis ekstrak 675 mg/kgBB (Asri & Winarko, 2016). Selain itu, penelitian secara

in vitro terhadap ekstrak spesies *Alpinia* (*Alpinia galangal* dan *Alpinia officinarum*) terhadap sel kanker MCF7 diperoleh nilai IC_{50} 23,9 µM (48) jam (Lee & Houghton, 2005). Secara signifikan senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat dapat menurunkan viabilitas sel pada konsentrasi 10 - 50 µM yang dipengaruhi oleh waktu dan dosis (Campbell *et al.*, 2007). Senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat pada *Alpinia conchigera* juga memiliki sifat sitotoksik terhadap MCF7 dengan IC_{50} 20 µM selama 36 jam (Hasima, 2010).

Nilai IC_{50} dari *Alpinia conchigera* terhadap sel MCF7 diperoleh IC_{50} 30 µM (24 jam). Analisis siklus sel menggunakan reagen PI menunjukkan bahwa senyawa 1'-Asetoksi kavikol asetat dapat menyebabkan *cell cycle arrest* di fase G0-G1 (Awang *et al.*, 2010). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman lengkuas mengandung senyawa 1'-Asetoksikavikol asetat. Sifat sitotoksik dan nilai IC_{50} kecil menjadi salah satu dasar suatu senyawa memiliki aktivitas antiproliferatif.

F. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori maka hipotesis yang dapat ditentukan yaitu ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga*) terstandar mengandung senyawa 1'-asetoksikavikol asetat yang berpotensi sebagai antikanker dan dapat menghambat proses proliferasi sel fase G0-G1 pada sel kanker payudara MCF7.