

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan tidak normal sel jaringan tubuh secara terus menerus dan tidak terkontrol. Secara umum penyakit kanker ini merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia. Kanker payudara merupakan salah satu penyebab terbesar kematian setiap tahunnya. Di Indonesia sendiri kanker payudara menduduki peringkat pertama penyebab kematian yang disebabkan oleh kanker pada wanita. Prosentasi angka kejadian kanker payudara pada wanita adalah 43,3% dan 12,9% diantaranya menyebabkan kematian pada tahun 2012 (DepKes, 2015). Prevalensi penyakit kanker di Indonesia pada tahun 2013 sekitar 330.000 orang berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar. *International Agency for Research on Cancer (IARC)* menyebutkan bahwa pada tahun 2012 angka kejadian kanker payudara mencapai 40 orang dalam 100.000 perempuan. Perempuan memiliki resiko lebih tinggi terkena kanker payudara dibandingkan laki-laki. Perbandingan angka kejadian kanker payudara pada laki-laki dan wanita adalah 1:100 (Heti, 2008).

Tujuan utama pengobatan kanker adalah membunuh sel kanker, menghambat pertumbuhan sel kanker, dan mencegah penyebaran ke organ sekitar sehingga dapat memperpanjang harapan hidup seseorang. Pengobatan umum penyakit kanker dilakukan dengan cara pembedahan, radiasi, kemoterapi, dan terapi hormon. Obat-obatan antikanker yang sering digunakan untuk terapi dihasilkan oleh sintesis obat, produk alam dari tanaman, dan produk alam dari bakteri. Salah satu contohnya adalah 5-fluorourasil, metotreksat, siklofosamid, paklitaksel, doksetaksel, vinkristin, vinblastin, antrasiklin, bleomisin, mitomisin, dan daktinomisin (Katzung, 2007). Akan tetapi obat-obatan kanker yang digunakan untuk terapi mempunyai efek samping yang tidak diinginkan antara lain mual, muntah, rambut rontok, dan berkurangnya jumlah sel leukosit (Medicastore, 2011). Selain efek samping, masalah yang timbul dalam pengobatan kanker adalah biaya untuk penyembuhan relatif besar (Kemenkes RI,

2015). Dari permasalahan tersebut, para peneliti diharapkan mampu menemukan terobosan obat antikanker yang mempunyai efektivitas tinggi dan efek samping seminimal mungkin. Eksplorasi bahan alam untuk mendapatkan obat antikanker yang baru tengah dilakukan para peneliti baik dengan memanfaatkan mikroba, tanaman, dan hewan laut (Sunaryanto *et al.*, 2010).

Penghasil mikroba terbesar salah satunya di dapatkan dari dalam tanah. Pemanfaatan kultur mikroba tanah banyak digunakan untuk obat kemoterapi kanker, seperti deksorubisin hidroklorida, bleomisin, daunorobisin, dan mitomisin (Mohamed, 2012). Isolat jamur tanah *Fusarium solani* dan *Emericella nidulans* dari tanah Mesir mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker Caco-2 dengan nilai IC_{50} jamur tanah *Fusarium solani* $6,24 \pm 5,21 \mu\text{g/mL}$ dan jamur tanah *Emericella nidulans* $9,84 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$ (Mohamed, 2012). Isolat dari tanah lintang tinggi Arktik didapatkan isolat jamur *Eutypella* sp. D-1. Jamur ini mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker MCF-7 dengan nilai IC_{50} $9,88 \mu\text{M}$ (Liu, 2014). MCF-7 merupakan satu model sel yang umum digunakan dalam uji efek kanker payudara secara *in vitro* (Widowati dan Mudahar, 2009). Selain itu MCF-7 resisten terhadap agen kemoterapi doxorubicin. Resistensi sel MCF-7 terhadap doxorubicin terjadi melalui mekanisme pengeluaran obat oleh protein pompa pada membran sel dan kegagalan inisiasi apoptosis (Meiyanto *et al.*, 2009).

Atas dasar penelitian tersebut, metabolit aktif dari isolat jamur tanah dapat dijadikan sebagai salah satu terobosan pengembangan obat baru untuk kanker. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat luas dan tanah yang sangat subur. Keadaan ini berdampak pada komponen ekosistem yang ada dalam tanah seperti mikroba dan jamur untuk tiap-tiap wilayah berbeda dan beraneka ragam jenisnya. Hal ini menyebabkan metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing jamur akan sangat bervariasi sehingga meningkatkan peluang untuk ditemukannya metabolit aktif dari jamur tanah yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka akan dilakukan penelitian uji antikanker ekstrak metanol jamur yang diisolasi dari tanah di Solo terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah ekstrak metanol jamur yang diisolasi dari 5 sampel tanah di Solo mempunyai efek antikanker terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*?
2. Berapa nilai IC_{50} ekstrak metanol jamur dari isolat lima sampel tanah yang berbeda ekosistemnya beserta media pertumbuhannya?

3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antikanker ekstrak metanol jamur yang diisolasi dari tanah di Solo terhadap sel MCF-7 secara *in vitro* dan menentukan nilai IC_{50} dengan metode MTT assay.

4. Tinjauan Pustaka

1. Jamur Tanah

a. Tanah

Tanah tersusun atas beraneka ragam makhluk hidup di dalamnya. Selain mengandung unsur hara di dalam tanah terdapat makhluk hidup seperti bakteri, archaea, jamur, serangga, annelida, invertebrata, tanaman, dan ganggang. Metabolit yang dihasilkan oleh mikroba tanah mampu mendaur ulang elemen-elemen yang ada dalam tanah seperti nitrogen, karbon, dan fosfat (Aislabie & Deslippe, 2013). Jenis-jenis tanah sangat bervariasi tergantung dari letaknya dan iklim yang ada. Tanah dibagi atas 5 katagori utama yaitu partikel mineral, bahan organik, air, gas, dan jasad hidup. Lingkungan sangat berpengaruh terhadap seleksi mikroba dan menentukan jenis-jenis mikroba yang dapat hidup serta berkembangbiak dalam suatu ekosistem tanah (Budyanto, 2004). Aktivitas biologis dalam tanah biasanya dilakukan oleh mikroba dan fauna untuk melakukan proses kehidupan maupun melakukan berbagai macam metabolisme. Faktor yang berpengaruh ada tidaknya mikroorganisme tanah ditentukan oleh kondisi fisika, kimia, dan biologi (Saraswati *et al.*, 2007).

Umumnya mikroorganisme paling banyak ditemukan pada permukaan tanah. Semakin dalam kedalaman tanah maka akan sangat sedikit mikroorganisme yang hidup. Pada permukaan tanah akan banyak dijumpai protozoa, bakteri, alga, actinomycetes, dan jamur (Suendra et al, 1991).

b. Skrining Tanah

Untuk mengetahui adanya aktivitas mikroba maupun fauna dalam tanah biasanya digunakan teknik analisis biologi berupa skrining tanah. Untuk melakukan skrining tanah harus memperhatikan teknik pengambilan sampel tanah, kedalaman pengambilan tanah, dan penyimpanan sampel tanah karena dapat mempengaruhi aktivitas mikroba maupun mikroorganisme lain didalamnya. Suhu optimum untuk penyimpanan tanah selama satu bulan yaitu 2-4°C (Saraswati et al., 2007).

Metode agar cawan adalah salah satu metode yang paling umum digunakan untuk skrining tanah. Metode ini menggunakan prinsip pengenceran suspensi tanah yang mengandung mikroba supaya tumbuh dan membentuk suatu koloni dalam kondisi lingkungan yang sesuai. Pengenceran suspensi tanah yang digunakan untuk memperoleh jamur yaitu 10^{-2} - 10^{-5} , sedangkan untuk bakteri 10^{-4} - 10^{-7} . Media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan jamur tanah adalah agar streptomisin dan agar ekstrak malt. Sedangkan untuk bakteri menggunakan media agar nutrisi dan agar ekstrak tanah (Saraswati et al., 2007).

c. Jamur

Jamur adalah mikroorganisme eukariotik yang berbentuk filamen, mempunyai dinding sel, menghasilkan spora, dan tidak memiliki klorofil. Fungi banyak dijumpai pada tempat-tempat yang mengandung substratorganik (Saraswati dkk, 2007). Jamur memperoleh makanan dari organisme lain yang membusuk dalam tanah. Dinding sel jamur tersusun atas glukukan dan kitin (Aislabie & Deslippe, 2013). Produk-produk metabolit dari jamur tanah memiliki nilai komersial antara lain mitotoksin, peptida non ribosom, diketopiperazin, alkaloid, dan poliketida. Poliketida mempunyai peran penting dalam aktivitas antikanker (Mohamed, 2012).

Emericella nidulans adalah salah satu contoh jamur tanah yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel 36 human tumor karena mengandung senyawa alkaloid. Selain itu jamur *Eutipella* sp. memiliki senyawa lakton yang berperan dalam aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7 (Kharwar et al., 2011).

d. Ekstraksi

Ekstraksi adalah sediaan dalam bentuk kering, kental, ataupun cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang cocok. Menurut DepKes RI (2000) dalam bukunya yang berjudul "Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat" memaparkan dua teknik ekstraksi menggunakan pelarut yaitu sebagai berikut:

- 1) Cara dingin, antara lain:
 - a) Perkolasi adalah ekstraksi yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan dengan pelarut yang selalu baru sampai hasil yang diinginkan (*exhaustive extractive*)
 - b) Maserasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut dengan proses beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar. Remaserasi berarti pengulangan penambahan pelarut setelah penyarian maserat pertama dan seterusnya.
- 2) Cara panas, antara lain:
 - a) Refluks adalah ekstraksi dengan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik, dilakukan selama waktu tertentu dengan suhu titik didihnya.
 - b) Sokletasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya ekstraksi berlangsung secara kontinu menggunakan alat khusus dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
 - c) Digesti adalah ekstraksi dengan pengadukan terus-menerus atau maserasi kinetik, secara umum dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar (40-50⁰C).
 - d) Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada suhu penangas air (suhu terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

- e) Dekok adalah infus dengan waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan suhu sampai 100°C .

e. Media Kultur

Media kultur yang umum digunakan, seperti *potato glucose agar*, *malt extract agar*, *yeast extract*, *glucose yeast extract*, atau *corn meal agar*. Semua media kultur menyediakan nutrisi penting untuk pertumbuhan kebanyakan jamur. Ph media yang optimum disarankan berkisar 6,0-6,5. Modifikasi pH disesuaikan dengan tujuan percobaan yang akan dilakukan. Media agar merupakan pilihan sebagian besar pada percobaan mikologi umum. Untuk isolasi jamur tanah, jamur kayu yang membusuk, dan jamur dari habitat lain, media agar lebih sesuai (Stevens, 1981).

Menurut Stamets dan Chilton (1983) beberapa media dan kegunaannya adalah sebagai berikut:

- 1) *Antibiotic Agar (AA)* – digunakan untuk isolasi jamur dari permukaan substrat yang tidak steril, atau untuk membersihkan kultur yang terkontaminasi bakteri.
- 2) *Czapex Dox* – media pertumbuhan mikroorganisme tanah.
- 3) *Sabouraud* – media pertumbuhan, isolasi, dan identifikasi jamur patogen.
- 4) *Malt Agar (MA)* – tidak memiliki pepton, baik untuk pembiakan *Ascomycota* dan sporulasi pada beberapa spesies yang dihambat oleh pepton.
- 5) *Malt Extract Agar (MEA)* – media pertumbuhan yang baik untuk jamur tanah, jamur yang diisolasi dari kayu, *Basidiomycetes*, dan lain-lain.
- 6) *Potato Dextrose Agar (PDA)* – media yang cukup kaya untuk pertumbuhan berbagai jamur.

2. Kanker Payudara

a. Kanker

Kanker atau neoplasma merupakan penyakit pertumbuhan sel yang terjadi karena dalam tubuh timbul dan berkembang biak sel-sel baru yang bentuk, sifat dan kietiknya berbeda dari sel normal asalnya (Sitorus, 2013). Penyimpangan sel yang tidak normal didalam tubuh kemudian menyebar ke bagian sel normal yang

ada pada bagian tubuh disekitarnya menyebabkan terjadinya kerusakan fatal pada organ tubuh (Alison, 2001).

Sel normal berubah menjadi sel kanker disebabkan oleh onkogen, yaitu gen yang mengkode protein untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker. Pada sel normal mempunyai proto-onkogen yang mampu mengkode protein yang diperlukan oleh tubuh. Proto-onkogen mempunyai peranan penting dalam regulasi siklus sel dan membantu mengontrol pertumbuhan sel. Proto-onkogen diubah menjadi onkogen melalui berbagai macam cara salah satunya adalah multi tahap yang didorong oleh suatu karsinogen, baik itu agen kimia maupun fisika sehingga menimbulkan terjadinya kanker (O'day, 2009).

b. Kanker Payudara

Kanker payudara terjadi karena adanya pertumbuhan abnormal pada sel kelenjar payudara atau mutasi tertentu pada DNA sel payudara, tumbuh dan berkembang di dalam kelenjar susu, saluran susu, dan jaringan lemak. Sebagian mutasi gen bersifat diwariskan, sementara yang lain dapat terjadi dengan sendirinya tanpa diketahui penyebab pastinya (Soebachman, 2011).

1) Tahapan terjadinya kanker

Kanker melalui beberapa tingkat yaitu fase inisiasi, fase promosi dan fase progresi.

- a) Fase inisiasi dipengaruhi karena zat inisiator seperti akibat radiasi dan zat karsinogen, yang mengganggu proses reparasi sehingga terjadi kerusakan DNA dengan kelainan pada kromosomnya.
- b) Fase promosi yaitu co-carsinogen sebagai pencetus proliferasi sel, dengan demikian sel-sel yang mengalami mutasi tersebut menjadi ganas.
- c) Fase progresi yaitu kerusakan DNA dapat mengaktifasi pertumbuhan sel, sehingga pertumbuhan sel menjadi cepat dan ganas. Tumor menjadi manifes (Tjay dan Rahardja,2002).

2) Mekanisme Kerja Antikanker Dengan Siklus Sel Kanker

Pembelahan sel terjadi dalam beberapa fase yaitu mitosis, pascamitosis, fase sintesis DNA dan fase pramitosis. Ditinjau dari siklus sel, obat antikanker dibagi kedalam 2 golongan. Golongan pertama ialah yang memperlihatkan

toksistas selektif terhadap fase-fase tertentu dalam siklus sel yang disebut *cell cycle – spesific* (CSS) dan golongan kedua yang disebut *cell cycle-nonspesific* (CCNS) misalnya zat alkilator dan antibiotik antikanker. Penelitian pengaruh obat terhadap siklus sel diharapkan dapat menemukan pengobatan antikanker yang efektif dan aman (Tjay dan Rahardja,2002).

3. Sel MCF-7

Sel MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) adalah salah satu model sel kanker payudara yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro*. Sel ini diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun bergolongan darah O dengan Rh⁺, etnis kaukasian. Sel MCF-7 bersifat *adherent* sehingga metode kultur yang tepat adalah metode monolayer (Sitorus, 2013).

MCF-7 merupakan model sel kanker payudara yang lebih resisten terhadap agen kemoterapi dibandingkan T47D. Sel MCF-7 adalah jenis sel yang mengekspresikan ER terutama ER alfa (ER- α) (Zampieri et al, 2002). Sel kanker MCF-7 memiliki karakteristik overekspresi PgP, overekspresi Bcl-2 dan tidak mengekspresikan caspase-3 sehingga mampu menghindari apoptosis (Simstein et al, 2003). Resistensi obat dapat terjadi melalui mekanisme pengeluaran obat oleh protein pompa pada membran sel, inaktivasi obat, kegagalan inisiasi apoptosis dan mutasi target obat (Notarbartolo et al., 2005). Resistensi sel MCF-7 terhadap doxorubicin dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, yaitu pemberian doxorubicin pada sel MCF-7 menunjukkan adanya aktivasi Raf-1 (terfosforilasi) secara berlebihan sehingga RAF-1 menginduksi gen MDR-1 untuk mengekspresikan PgP yang merupakan suatu transporter membran plasma yang memompa keluar doxorubicin dari sel (Kitagawa, 2005). Kegagalan inisiasi apoptosis doxorubicin terhadap MCF-7 disebabkan oleh doxorubicin yang tidak mampu melakukan penekanan terhadap Bcl-2 yang diekspresikan oleh sel MCF-7 (Meiyantoet al, 2009).

4. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* menggunakan kultur sel untuk mengevaluasi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Prinsip dasar uji tersebut, sistem

penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Sistem tersebut adalah uji kualitatif dengan menghitung jumlah kematian sel (Winarno, 2011)

Parameter dalam uji sitotoksik adalah nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi yang menunjukkan adanya hambatan poliferasi sel 50% dan adanya potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Uji sitotoksik berkaitan dengan informasi konsentrasi suatu senyawa yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung secara spesifik tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel (Amalina, 2008).

Ada berbagai metode yang digunakan untuk menguji sitotoksitas suatu bahan yaitu metode MTT assay, metode pewarnaan dengan trypanblue, dan metode pembebasan isotop kromiun (Siregar& Hadijono 2000). Metode yang paling sering digunakan untuk menetapkan jumlah sel dalam uji sitotoksik yaitu metode MTT assay (Putri, 2013). Kelebihan metode MTT assay yaitu ujinya cukup sensitif, cepat, semiotomatis, dapat untuk mengukur sampel yang banyak dalam satu waktu, dan tidak menggunakan isotop radioaktif (Siregar& Hadijono, 2000).

Prinsip metode MTT adalah terjadi reduksi dari garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetil thiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium bromide) oleh sel-sel yang aktif secara metabolik dengan melibatkan enzim dehidrogenase yang dapat menyebabkan reduksi pada NADH dan NADPH (American Type Culture Collection, 2011). Uji ini berdasarkan kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan farmazan yang berwarna biru ungu dan tidak larut. Dengan demikian jumlah sel yang hidup dapat diukur sebagai konsentrasi hasil produk MTT yang di ukur dengan spektrofotometer (Siregar dan Hadijono, 2000). Penambahan reagen SDS (Sodium Dodesil Sulfat) dan HCl akan melarutkan kristal sehingga absorbansinya dapat diukur menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel hidup (Putri, 2013).

5. Keterangan Empiris

Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh data ilmiah efek antikanker ekstrak metanol jamur yang diisolasi dari tanah daerah Solo, dengan pengambilan sampel yang berbeda ekosistem yaitu sawah, pekarangan rumah, selokan, tempat pembuangan sampah, dan tepi sungai bengawan Solo. Efek antikanker diketahui dengan memperoleh nilai IC_{50} dari sampel.