

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengobatan kanker masih menjadi masalah dalam bidang kesehatan karena pengobatan yang tersedia masih belum memuaskan bagi penderita penyakit kanker. Secara umum penatalaksanaan kanker meliputi pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, terapi radiasi dan terapi radiologi (Kumar *et al.*, 2005). Tujuan pengobatan dengan kemoterapi adalah untuk mematikan sel kanker atau membatasi perkembangan dan pertumbuhan sel kanker yang terus tumbuh (Hortobagyi, 2012).

Pengobatan kemoterapi mempunyai efek samping yang mengganggu pasien dan memberikan rasa tidak nyaman pada pasien seperti rambut rontok, mual, muntah, diare, gangguan tidur, gangguan kulit dan penurunan berat badan (Faisal *et al.*, 2012). Penggunaan agen kemoterapi yang berkepanjangan dapat menimbulkan efek samping dan resistensi karena kurang selektifnya agen kemoterapi terhadap sel kanker (Rachmani & Sehesti, 2012). Demikian juga dengan pengobatan dengan metode lain menimbulkan efek samping yang sangat tidak menguntungkan pasien, di samping itu harga obat-obatan tersebut mahal. Penanganan kanker pada umumnya masih bergantung pada kemoterapi yang berasal dari bahan kimia sintesis.

Idealnya obat antikanker akan membunuh sel kanker tanpa merusak jaringan normal. Akan tetapi, antikanker dengan senyawa kimia sintesis tidak hanya akan mempengaruhi sel kanker tetapi juga mempengaruhi sel normal yang ada disekitarnya. Belum ada agen kemoterapi yang tersedia saat ini tidak menimbulkan toksisitas sama sekali pada pasien (Kusumawati, 2013). Untuk mengatasi hal tersebut maka para

peneliti berusaha melakukan penelitian dengan memanfaatkan sumber daya alam yang ada. Berbagai macam senyawa telah dikembangkan untuk melawan kanker, meliputi senyawa-senyawa pengalkilasi, antimetabolit, obat-obatan radiomedis, hormon dan senyawa antagonis, tetapi sampai saat ini belum ada hasil yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan dari berbagai jenis antikanker yang telah dikembangkan.

Pertumbuhan sel kanker dapat disebabkan oleh terjadinya pertumbuhan yang tidak terkontrol dari sel akibat mutasi gen yang mengendalikan pertumbuhan, seperti onkogen, tumor supresor gen dan gen yang mengendalikan apoptosis. Apoptosis pada sel kanker merupakan tujuan akhir dari pengobatan kanker. Apoptosis pada sel dapat terjadi akibat faktor ekstrinsik dan intrinsik. Faktor ekstrinsik diinisiasi melalui stimulasi oleh reseptor kematian sedangkan faktor intrinsik diinisiasi oleh pelepasan faktor sinyal dari mitokondria dalam sel (Kumar *et al.*, 2005; Oka *et al.*, 2010).

Peristiwa apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari adanya pelepasan molekul sinyal yang disebut dengan ligan oleh sel lain tetapi bukan berasal dari sel yang mengalami apoptosis (Oka *et al.*, 2010). Ligan yang dilepaskan akan berikatan dengan *death receptor* (DR) yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. *Death receptor* yang terletak di permukaan sel adalah famili reseptor *tumor necrosis factor* (TNF) yang meliputi *tumor necrosis factor*-R1 (TNF-R1), *cluster of differentiation* 95 (CD 95) atau Fas dan *tumor necrosis related apoptosis inducing ligand*-R1 (TRAIL)-R1 dan *tumor necrosis factor related apoptosis ligand*-R2 (TRAIL)-R2.

Ligan yang berikatan dengan reseptor tersebut akan mengaktifkan caspase inisiator 8 setelah membentuk trimmer dengan adaptor *Fas associated death domain*

(FADD). Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan FADD disebut dengan *death inducing signaling complex* (DISC), CD 95, TRAIL-R1 dan TRAIL R2 terikat dengan FADD sedangkan TNF-R1 terikat secara tidak langsung melalui molekuler adaptor lain seperti *tumor necrosis factor receptor death domain protein* (TRADD) (Kumar *et al.*, 2005; Oka *et al.*, 2010).

Stres mitokondria yang menginduksi apoptosis pada faktor intrinsik disebabkan oleh senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria sehingga menyebabkan terjadinya pelepasan sitokrom C dari intermembran mitokondria. Protein caspase 8 akan memotong anggota famili Bcl 2 yaitu Bid. Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax di dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul proapoptotik seperti sitokrom C, *Samc/Diablo*, *apoptosis inducing factor* (AIF) dan *omi/Htr2* dengan adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom C, Apaf 1 dan caspase 9 yang disebut dengan apoptosom.

Senyawa protein caspase 9 akan mengaktifkan *downstream* pro-caspase 3 (Joza *et al.*, 2001). Senyawa protein caspase 3 yang aktif akan memecah berbagai macam substrat diantaranya enzim *DNA-repair* seperti *poly-ADP Ribose Polymerase* (PARP) dan DNA protein kinase yaitu protein struktural seluler dan nukleus termasuk diantaranya aparatus mitotik, lamina nukleus dan aktin serta endonuklease seperti *inhibitor caspase activated deoxyribonuclease* (ICAD) (Chaitanya *et al.*, 2010).

Selain itu caspase 3 juga mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya seperti pro-caspase 6 dan pro-caspase 7 yang memberikan amplifikasi terhadap kerusakan seluler. Adanya stres seluler akan dapat meningkatkan ekspresi dari protein

p53 yang akan meningkatkan terjadinya G1 *arrest* atau apoptosis (Nicolier *et al.*, 2009). Anggota dari *apoptotic specific regulator* p53 (ASPP) yaitu ASPP-1 dan ASPP-2 secara spesifik menstimulasi fungsi transaktivasi p53 pada promotor gen proapoptotik seperti Bax dan p53 *inducible gene 3* (PIG3), tetapi tidak pada promotor gen yang menyebabkan *cell cycle arrest* yaitu p21 dan *mouse double minute 2* (Mdm2) (Kumar *et al.*, 2005; Nicolier *et al.*, 2009).

Berbeda dengan apoptosis, maka kematian sel lainnya disebut dengan nekrosis. Nekrosis merupakan kematian sel yang disebabkan oleh adanya kerusakan pada sistem membran. Kerusakan membran disebabkan adanya aktivitas suatu enzim lisozim. Aktivitas enzim lisozim dapat terjadi karena adanya kerusakan sistem membran oleh suatu faktor tertentu yang mengakibatkan membran pembungkus enzim lisozim mengalami kebocoran. Kebocoran tersebut mengakibatkan lisozim tumpah ke sitosol maupun protein-protein penyusun sistem membran dari sel tersebut (Sudiana, 2008).

Sel yang mengalami nekrosis akan mengeluarkan seluruh isi sel termasuk mediator-mediator inflamasi sehingga menyebabkan reaksi inflamasi. Inflamasi yang berlebih akan menyebabkan respon nyeri dan dalam jangka waktu yang panjang dapat menimbulkan terjadinya autoimun, sehingga kematian sel secara apoptosis dalam terapi pengobatan kanker lebih diharapkan (Corwin, 2008). Pada nekrosis, perubahan terutama terletak pada inti, yaitu piknosis, karioreksis dan kariolisis (Lestari, 2011).

Obat antikanker yang efektif seharusnya dapat mematikan sel kanker tanpa membahayakan jaringan yang sehat. Akan tetapi sampai sekarang belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria demikian. Selain itu, adanya resistensi dari sel kanker terhadap obat-obatan anti kanker sehingga tidak sensitif lagi terhadap sel kanker. Usaha

penelitian terus dilakukan untuk menemukan obat antikanker yang efektif. Salah satunya adalah pencarian senyawa antikanker dari bahan alam yang bersifat spesifik pada sel kanker tertentu dan menghambat protein spesifik yang menyebabkan sel kanker terus berproliferasi tanpa kendali (Gomes *et al.*, 2015)

Pada saat ini para peneliti melakukan penelitian dengan gencarnya mencari obat-obatan antikanker yang berasal dari alam. Pemanfaatan produk bahan alam telah menjadi alternatif dan banyak diminati dalam pengobatan kanker (Hussain *et al.*, 2012). Di Amerika dan Eropa diperkirakan 65 % obat kanker komersial berasal dari alam (Wei *et al.*, 2007). Obat kanker yang berasal dari alam seperti dari tanaman, mikroba dan organisme laut jumlahnya lebih dari 60 %. Senyawa derivat dari bahan alam mempunyai target bioaktif yang spesifik dan mempunyai efek samping yang rendah (Iwamaru *et al.*, 2007). Oleh karena itu pencarian obat-obat kemoterapi dari bahan alam terutama dari laut masih terus dilakukan (Nobili *et al.*, 2009).

Senyawa yang berasal dari alam memiliki keragaman struktural dan menghasilkan mekanisme aktivitas biologis baru (Kinghorn *et al.*, 2009), sehingga diyakini bahwa sumber terbesar senyawa antikanker berasal dari alam (Tao *et al.*, 2010). Hampir semua senyawa obat antikanker saat ini diisolasi atau berasal dari tumbuhan dan mikroorganisme terestrial. Setelah 50 tahun seleksi yang intensif dari tanaman dan mikroba terestrial, laju penemuan dan pengembangan produk alami telah menurun selama dua dekade terakhir (Xiong *et al.*, 2013).

Sebagian besar wilayah Indonesia, sekitar 75 % merupakan wilayah kelautan. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut dalam pencarian metabolit sekunder senyawa bioaktif baru (Chasanah, 2008).

Lautan adalah lingkungan yang sangat kompleks dan terdapatnya berbagai kumpulan mikroba yang dapat bertahan hidup dalam kondisi ekstrim seperti tekanan, salinitas, dan suhu (Mitchell *et al.*, 2004). Oleh karena itu mikroorganisme laut telah menarik perhatian yang besar karena mempunyai kemampuan metabolisme dan fisiologis yang unik yang tidak hanya memastikan kelangsungan hidup di habitat ekstrim tetapi juga menawarkan potensi untuk menghasilkan senyawa dengan antitumor dan aktivitas farmakologis menarik yang tidak akan diamati dalam mikroorganisme terestrial (Blunt *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009; Blunt *et al.*, 2009). Tren terbaru dalam penemuan obat menekankan bahwa mikroorganisme laut adalah sumber yang berpotensi produktif dari metabolit sekunder baru dan memiliki potensi besar untuk meningkatkan jumlah produk alami laut dalam uji klinis (Waters *et al.*, 2010).

Di antara berbagai biota laut, spons merupakan sumber bahan bioaktif yang paling kaya (Belarbi *et al.*, 2003). Misalnya, spons mengandung senyawa anti virus (Wipf & Lim, 1995; Cutignano *et al.*, 2000; Welington *et al.*, 2000), antibakteri (Cafieri *et al.*, 1998; Pettit *et al.*, 1997), antijamur (Sata *et al.*, 1999; Clarks *et al.*, 1998), dan antikanker (Septic *et al.*, 1997). *X. testudinaria* (kelas Demospongiae, filum porifera) yang dikenal sebagai spons barel adalah anggota komunitas terumbu karang yang besar dan umum di kedalaman lebih dari 10 meter.

Spons laut *Xestospongia* sebagai sumber yang kaya akan kandungan kimia termasuk alkaloid, kuinon, terpenoid, sterol, dan asam lemak (Zhou *et al.*, 2010). Metabolit yang terkandung dalam spons sangat terkait dengan metabolit yang disintesis oleh mikroorganisme simbiotiknya. Di antara jenis mikroorganisme simbion, jamur simbion dari spons merupakan penghasil senyawa bioaktif yang paling bagus (Bhadury

et al., 2006). Jumlah metabolit sekunder yang diisolasi dari jamur laut yang bersimbion dengan alga, spons, invertebrata lainnya dan sedimen sebagai antibakteri, antijamur dan sitotoksik rata-rata 75 % memiliki aktivitas biologis (Reddy *et al.*, 2011). Mikroorganisme laut juga berpotensi untuk menghasilkan senyawa yang penting dan diharapkan untuk pengembangan obat atau farmakologis. Mikroorganisme laut memiliki kemampuan fisiologis yang dapat menjamin kelangsungan hidupnya pada habitat ekstrim (Losung *et al.*, 2015). Pada tahun 2002 sampai tahun 2004 dari jamur laut telah ditemukan 272 produk alami baru dan hal ini membuktikan bahwa jamur laut memiliki potensi farmakologi (Samuel *et al.*, 2011).

Spesies jamur yang diisolasi dari biota laut mempunyai mekanisme metabolisme yang unik dan sangat potensial dalam penemuan dan pengembangan obat (Zhang *et al.*, 2008). Dalam beberapa tahun terakhir, jamur simbiosis telah ditemukan sebagai sumber utama produk alami yang memiliki struktur yang unik dan lebih jauh menunjukkan aktivitas biologis yang menarik, misalnya sebagai obat antitumor potensial atau sebagai antibiotik baru (Aly *et al.*, 2010; Debbab *et al.*, 2011; Aly *et al.*, 2011). Metabolisme sekunder dari jamur mewakili sebagian besar obat dan model obat dalam industri farmasi, termasuk antibiotik, statin dan immunosupresan (Newman & Gragg, 2016; Lee *et al.*, 2016). Rute biosintesis jamur yang digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder juga berguna untuk melakukan modifikasi struktur pada senyawa xenobiotik (Santos *et al.*, 2018).

Di antara jenis-jenis mikroorganisme simbiosis, jamur yang bersimbiosis pada spons dikenal sebagai produsen senyawa bioaktif yang paling menarik (Bhadury *et al.*, 2006). Jamur yang diisolasi dari spons laut adalah salah satu sumber untuk

menghasilkan metabolit sekunder baru sebagai antikanker. Metil Verantin adalah senyawa metabolit sekunder yang diisolasi *Aspergillus versicolor* yang memiliki aktivitas terhadap sel tumor (XF498) dengan IC_{50} 0,41 $\mu\text{g/mL}$ (Reteb & Ebel, 2011). Kelompok meroterpenoid dari *Alternaria* sp. diisolasi dari *Callyspongia* sp. sebagai inhibitor NF-kB terhadap sel kanker RAW264,7 dengan IC_{50} 39 μM , dan pada sel leukemia limfositik (P388) dengan IC_{50} 57 $\mu\text{g/mL}$ (Lee *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Amagata *et al.*, 2013). Namun sampai saat ini belum jelas apakah ada jamur spesifik yang hidup pada biota tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan jamur laut sangat kaya akan keanekaragaman senyawa kimia dan berpotensi sebagai sumber obat baru (Wiese, 2011).

Jamur *P. citrinum* adalah salah satu isolat jamur yang diisolasi dari biota laut yang memiliki aktivitas sitotoksik (Liu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015) dengan kandungan metabolit sekundernya adalah asam tumonat (Chen *et al.*, 2011), benzen derivat metil-2-(2-asetil-3,5-dihidroksi-4,6-dimetilfenil) asetat, penicillenols (Lin *et al.*, 2008), dihydrocitrinone, asam fenol A (Clark *et al.*, 2006), dan 2,4,5-trimethylbenzene-1,3-diol (Lu *et al.*, 2008), penicitrinol dan penicillenol (Chen *et al.*, 2015), citriquinochroman, asam tanzawaik, asam 6-metilcurvulinik, 8-methoxy-3,5-dimetilisoquinolin-6-ol, tetraquinolactacid (El-Neketi *et al.*, 2013).

Dari penelitian pendahuluan telah berhasil mengisolasi jamur *P. citrinum* XT6 dari spons *X. testudinaria*. Ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 tersebut memiliki aktivitas sitotoksik. Dari uji pendahuluan yang sudah dilakukan dengan metode MTT terhadap kultur sel T47D didapatkan nilai IC_{50} sebesar 60,6 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etil asetat *P. citrinum* XT6 di *defatting* menggunakan pelarut metanol dan *n*-heksana dan

diskrining aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT. Hasil skrining aktivitas didapatkan nilai LC_{50} fraksi metanol 25,7 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi heksan 366 $\mu\text{g/mL}$.

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan kultur sel T47D dalam pengamatan aktivitas sitotoksik. Kultur sel T47D memiliki karakteristik mutasi gen p53 yang berperan dalam peristiwa apoptosis. Kultur sel T47D termasuk pada subtipe luminal A dengan marker ER^+ , PR^+ , $HER2^-$ (Holliday & Speirs, 2011). Angka kejadian kanker payudara dengan subtipe luminal A adalah sekitar 50-60 % dari populasi penderita kanker payudara. Pasien dengan kanker payudara tipe luminal A memiliki prognosis yang baik dan yang lebih rendah dibandingkan subtipe lainnya (Yersal & Barutca, 2014). Pada kanker payudara dengan subtipe luminal A yang tidak respon dengan kemoterapi, pilihan terapi ajuvan utamanya adalah hormonal (Komite Nasional Penanggulangan Kanker, 2017). Selain itu, kultur sel T47D mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003).

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut lagi mengenai bahan yang bersifat sitotoksik dari ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan pengaruh dari fraksi dan senyawa hasil isolasi dari jamur *P. Citrinum* XT6 terhadap kematian kultur sel T47D secara *in-vitro*. Penelitian ini penting dilakukan, karena dengan menentukan fraksi mana yang mempunyai aktivitas sitotoksik dapat dilakukan pengembangan selanjutnya yang dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif dari penyakit kanker.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Berapakah jumlah fraksi yang didapat dari fraksinasi ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6?
2. Apakah ada pengaruh pemberian fraksi ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 terhadap aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D?
3. Di antara fraksi ini, fraksi mana yang paling mempunyai aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D?
4. Apakah ada pengaruh pemberian senyawa hasil isolasi dari fraksi potensial ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 terhadap aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D?
5. Apakah ada pengaruh pemberian senyawa hasil isolasi dari ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 dalam menginduksi kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis kultur sel T47D?
6. Bagaimanakah karakterisasi dari senyawa yang didapat dari hasil isolasi fraksi struktur senyawa sitotoksik dari jamur *P. citrinum* XT6?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh dari pemberian fraksi dan senyawa hasil isolasi ekstrak etil asetat jamur *Penicillium citrinum* XT6 terhadap kematian kultur sel kanker payudara T47D

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Melakukan fraksinasi dari ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6
2. Menganalisis pengaruh pemberian fraksi ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 terhadap aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D
3. Menentukan fraksi mana yang paling mempunyai aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D
4. Menganalisis pengaruh pemberian senyawa hasil isolasi dari fraksi potensial ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 terhadap aktivitas sitotoksik pada kultur sel T47D
5. Menganalisis pengaruh pemberian senyawa hasil isolasi dari ekstrak etil asetat jamur *P. citrinum* XT6 dalam menginduksi kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis kultur sel T47D
6. Menganalisis hasil karakterisasi dari senyawa yang didapat dari hasil isolasi dengan menentukan struktur senyawa sitotoksik dari jamur *P. citrinum* XT6

1.4 Manfaat Penelitian

Bila penelitian ini berhasil, maka penelitian ini akan memberikan manfaat untuk:

1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan

1. Melengkapi data informasi kandungan senyawa bioaktif dari jamur *P. citrinum* XT6.
2. Hasil isolasi senyawa potensial dari jamur *P. citrinum* XT6 dari spons laut *X. testudinaria* dapat dijadikan sebagai (*lead compound*) memiliki potensi sebagai kandidat obat baru untuk pengobatan kanker payudara.

3. Hasil Penelitian ini menghasilkan karya ilmiah berupa disertasi dan artikel ilmiah di jurnal internasional bereputasi

1.4.2 Terapan

Diharapkan dapat diperoleh obat alternatif dalam pengobatan kanker yang memanfaatkan sumber daya alam kelautan serta penemuan *lead compound* yang dapat dimanfaatkan sebagai obat antikanker.

