

B A B I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (OSCC, *Oral Squamous Cell Carcinomas*) merupakan masalah dalam bidang kesehatan gigi dan mulut karena merupakan karsinoma yang sering terjadi di dunia. Insidensi dan kematian juga telah meningkat selama dekade terakhir (Baykul *et al.*, 2010; Noguti *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2013). Diperkirakan lebih dari 405.000 pasien per tahun menderita kanker mulut di seluruh dunia (Peng *et al.*, 2011) dan lebih dari 100.000 pasien meninggal per tahun karena kanker mulut (Gasche and Goel, 2012). Pada tahun 2012 ditemukan lebih dari 300.000 kasus baru dan 145.000 kematian (Min *et al.*, 2015).

Sebagian besar pasien dengan karsinoma sel skuamosa didiagnosis pada stadium lanjut sehingga sering gagal untuk merespon terapi yang tersedia. Bahkan kurang dari 50% pasien dengan karsinoma sel skuamosa bertahan hidup lebih dari 5 tahun setelah diagnosis dan terapi (Peng *et al.*, 2011; Lo and Chang, 2013; Jafari *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2017). Kanker mulut merupakan penyakit dengan tingkat rekurensi dan kematian yang sangat tinggi (Lo and Chang, 2013). Sekitar 90-95% kasus dari semua kanker mulut adalah karsinoma sel skuamosa (Baykul *et al.*, 2010; Lo and Chang, 2013; Vigneswaran and Williams, 2014; Maji *et al.*, 2015).

Kanker mulut merupakan salah satu jenis tumor yang paling sering terjadi pada leher dan kepala (38%), dengan insidensi 75% pada laki-laki lebih dari 60 tahun. Lidah dan dasar mulut merupakan daerah yang paling sering terkena, sekitar 90% dari seluruh malignansi pada rongga mulut (Tanaka and Ishigamori, 2011; Noguti *et al.*, 2012; Rivera, 2015). Menurut Reksoprawiro (2008) insiden kanker mulut di Rumah

Sakit DR. Soetomo Surabaya dari tahun 1998-2007 terdapat 184 kasus. Rasio antara laki-laki dan perempuan 50%:50% dan frekuensi usia pada perempuan 41-50 tahun dan laki-laki 51- 60 tahun (Syafriadi,2008).

Perkembangan Karsinoma Sel Skuamosa Leher dan Kepala (*HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) melibatkan perubahan genetik dan epigenetik pada onkogen dan gen supresor tumor yang melibatkan aktivitas menyimpang dari jaringan molekular yang mengakibatkan pertumbuhan sel, migrasi dan survival (Vitale-Cross *et.al.*, 2009). *OSCC* melalui proses yang kompleks melibatkan perubahan genetik selama proses karsinogenesis yang multistep, regulasi pertumbuhan, apoptosis, immortalisasi, angiogenesis, invasi, dan metastasis. *OSCC* muncul sebagai akibat dari beberapa peristiwa molekuler yang berkembang dari pengaruh gabungan predisposisi genetik individu dan paparan karsinogen lingkungan (Califano *et al.*, 1996; Kim *et.al.*, 2015).

Terdapat beberapa faktor predisposisi yang dapat mempengaruhi perkembangan kanker. Faktor-faktor tersebut dibagi menjadi faktor ekstrinsik dan intrinsik. Faktor-faktor intrinsik seperti hereditas, faktor-faktor perkembangan. Faktor-faktor ekstrinsik seperti bakteri, virus, jamur, zat kimia, obat-obatan, radiasi, trauma, panas, dingin dan makanan. Agen tersebut dapat beraksi secara individual, kombinasi dengan karsinogen yang lain (*co-carcinogen*) atau kombinasi dengan agen lain yang tidak menyebabkan kanker (*promotor*), tetapi membantu karsinogen untuk mutasi atau menekan sel-sel (Syafriadi,2008).

Tembakau merupakan faktor etiologi primer, faktor-faktor lain seperti alkohol, predisposisi genetik dan diet yang kurang mikronutrien. Pada studi epidemiologi dan bukti-bukti eksperimental mengindikasikan hubungan antara beberapa karsinogen dengan kanker mulut seperti mengunyah sirih, mengunyah tembakau, merokok dan

alkohol, tetapi penyebab yang pasti tidak diketahui (Beevi *et.al.*, 2004; Deshpande *and* Wong, 2008; Vigneswaran *and* Williams, 2014; Kim *et.al.*, 2015).

Karsinogenesis mulut merupakan proses multifaktorial yang melibatkan banyak peristiwa genetik yang mengubah fungsi normal onkogen dan tumor supresor gen. Hal ini dapat meningkatkan produksi faktor-faktor pertumbuhan atau jumlah reseptor pada permukaan sel, dan/atau meningkatkan faktor transkripsi atau *messenger* sinyal intraseluler (Pasek, 2008; Nijel *et.al.*, 2014). Baru-baru ini, beberapa peneliti telah menunjukkan bahwa overekspresi reseptor dan faktor pertumbuhan, aktivasi onkogen dan inaktivasi gen penekan tumor adalah akar penyebab pengembangan fenotip kanker yang agresif dan resisten. Disfungsi jalur sinyal intraseluler juga telah terlibat dalam perkembangan dan progresi kanker (Seshacharyulu *et.al.*, 2012).

Terapi utama dari kanker mulut selama ini adalah radioterapi atau pembedahan radikal, tergantung dari lokasi dan ukuran tumor yang sering dikombinasikan dengan kemoterapi (Deshpande *and* Wong, 2008; Adhim, 2012; Ichwan, 2012; Bundela, 2014). Terapi tergantung pada tahap perkembangan kanker. Sebagian besar kemoterapi kanker diberikan pada dosis maksimum ditoleransi (*maximum-tolerated dose* (MTD) pada siklus yang pendek dengan istirahat pengobatan) (Adhim, 2012).

Kekuatan obat yang digunakan pada dosis yang tinggi sering membawa efek samping yang dapat menyebabkan ketidaknyamanan. Studi genetik molekuler telah mengidentifikasi keterlibatan sejumlah jalur akuisisi kemoresisten *OSCC* termasuk faktor-faktor onkogenik/sinyal faktor pertumbuhan dan defek pada jalur kematian sel (Wang *et.al.*, 2011; Huang *et.al.*, 2012; Wise-Draper *et.al.*, 2012; Maseki *et.al.*, 2012). Strategi baru terapi kimia-gen berkembang dalam beberapa tahun terakhir.

Mengkombinasikan kemoterapi tradisional dengan terapi gen dapat mengurangi dosis obat sambil meningkatkan efektivitas terapi gen (Jiang *et.al.*, 2014).

Terapi ini bertujuan untuk membunuh sel kanker melalui jalur apoptosis. Apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik dilakukan melalui jalur p73, sedangkan jalur ekstrinsik melalui aktivasi ligan DRs (*Death Receptors*).

Protein famili p53 (*p53* dan *p73*) merupakan faktor transkripsi yang mengatur banyak gen yang terlibat pada kontrol siklus sel dan apoptosis. Semua protein famili p53 berfungsi sebagai sinyal molekuler jaringan yang sangat saling berhubungan yang berfungsi mengatur proliferasi, diferensiasi dan kematian sel, dalam respon input fisiologis dan stress onkogenik (Ichwan *et.al.*, 2006; Klanrit *et.al.*, 2009; Bisso *et.al.*, 2011; Ethayathulla *et.al.*, 2012).

Mutasi pada gen p53 adalah peristiwa molekuler yang paling sering terjadi pada kanker manusia termasuk OSCC (Peltonen *et.al.*, 2010; Ichwan *et.al.*, 2012). Gen p53 bermutasi lebih dari 50% dari semua keganasan pada manusia, sedangkan gen p73 bermutasi kurang dari 0,5% tumor manusia (Blandino and Dobbstein, 2004; Bisso *et.al.*, 2011; Ethayathulla *et.al.*, 2012).

Beberapa bukti secara *in vivo* menunjukkan bahwa p73 memiliki peran dalam menekan tumor. Bahkan p73 dapat memicu penahanan siklus sel, penuaan seluler dan apoptosis pada kerusakan DNA, dengan mendorong transkripsi pada banyak gen target p53. Oleh karena itu tidak hanya jalur p53, tetapi seluruh jalur famili p53 merupakan target utama untuk pengembangan terapi kanker. Secara khusus protein p73 terkait p53 memiliki peran penting dalam menentukan respon seluler terhadap kemoterapi. Biologi dan regulasi p73 adalah kompleks, karena gen TP73 menggabungkan kedua fungsi supresor tumor dan proto-onkogen. Oleh karena gen

p73 jarang bermutasi pada tumor, sehingga manipulasi farmakologis yang tepat sesuai jalur *p73* merupakan pendekatan yang sangat menjanjikan untuk terapi kanker (Bisso *et.al.*, 2011 ; Ethayathulla *et.al.*, 2012).

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, *erbB1*) merupakan anggota famili ErbB reseptor tirosin kinase. Terjadi overekspresi EGFR pada 80-90% pada *HNSCC* dan dihubungkan dengan prognosis yang buruk (Sun *et.al.*, 2009; Rahman *et.al.*, 2010; Yang *et.al.*, 2011). EGFR merupakan protein yang penting dalam kontrol selular proliferasi, diferensiasi dan survival (Sun *et.al.*, 2009). Secara luas merupakan biomarker untuk lesi premalignant dan sangat penting dalam patogenesis *HNSCC*. Mutasi, amplifikasi gen dan overekspresi EGFR telah terlibat sebagai kontributor penting untuk berbagai kanker. Peningkatan ekspresi sinyal EGFR berkorelasi dengan pertumbuhan dan metastasis dalam berbagai tumor. Ketika regulasi EGFR menurun akan melindungi pertumbuhan sel-sel *HNSCC* (Rahman *et.al.*, 2010). Dengan demikian EGFR merupakan target terapi yang potensial untuk pengobatan *HNSCC* (Sun, *et.al.*, 2009; Rahman *et.al.*, 2010; Bundela *et al.*, 2014).

Banyak bukti yang menunjukkan fungsi regulasi NFκB dapat berkontribusi pada banyak proses patologis, termasuk kanker (Molinolo *et.al.*, 2008). NFκB mendorong ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 pada *HNSCC*. Gangguan fungsi NFκB pada *HNSCC* memicu pengurangan yang luar biasa dalam survival sel, pertumbuhan tumor, downregulasi gen *IL-6* dan ekspresi protein. NFκB juga memicu pengurangan pelepasan sejumlah sitokin dan kemokin, meliputi *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-12*, *IL-17*, *GM-CSF*, yang sangat meningkat pada serum pasien *HNSCC* (Molinolo *et.al.*, 2008). NFκB merupakan faktor antiapoptosis sebagaimana yang terlibat dalam aktivasi transkripsi protein yang meningkatkan survival sel seperti Bfl1, Nr13, IAPs, Bcl-xL dan Survivin (Arbab, 2012). NFκB yang konstitutif diekspresikan

pada hampir semua jenis kanker dan menekan apoptosis dalam berbagai tumor (Sung *et.al.*, 2012).

Gen yang diregulasi oleh NFκB meliputi gen yang mengendalikan apoptosis, adesi sel, proliferasi, respon imun *innate* dan adaptif dan remodeling jaringan. Kelas utama target seluler NFκB adalah kemokin (IL1α dan IFNγ), regulator apoptosis (Bcl-xL, IAP), faktor-faktor transkripsi (G-CSF, GM-CSF), dan regulator siklus sel (cyclin D1, mdm2). Jalur sinyal NFκB telah diteliti sebagai target untuk aplikasi terapeutik pada banyak kanker. Beberapa obat-obatan atau inhibitor yang digunakan secara klinis memiliki efek yang signifikan pada aktivitas NFκB dan aktivitas anti tumor. Dengan demikian pendekatan kombinasi yang berbeda termasuk agen kemopreventif alami perlu diselidiki, terutama perkembangan NFκB sebagai inhibitor untuk pengobatan dan pencegahan kanker (Rahman *et.al.*, 2010).

Caspase dapat menonaktifkan sinyal jalur NFκB sehingga dapat menghambat sinyal survival. Selama apoptosis, beberapa komponen kunci dari jalur NFκB, termasuk NFκB sendiri, adalah target dari Caspase, yang aksi demikian dapat mengakhiri transmisi sinyal survival yang berasal dari NFκB (Kurokawa and Kornbluth, 2009). Caspase-3 merupakan Caspase efektor yang berperan dalam memicu apoptosis (Li *et.al.*, 2014). Terdapat bukti eksperimental yang kuat yang menyatakan bahwa gangguan regulasi aktivasi Caspase adalah sentral untuk menghindari kematian sel kanker, baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Ollson and Zhivotovsky, 2011).

Gen lain yang juga berperan dalam apoptosis adalah Bax. Bax merupakan salah satu gen yang termasuk ke dalam famili Bcl-2 yang berfungsi mengatur keseimbangan antara kehidupan dan kematian sel. Bax termasuk golongan protein eksekusioner yang mendorong terjadinya apoptosis. Bax memiliki fungsi yang

berlawanan dengan Bcl-2, meskipun memiliki tingkat homologi yang tinggi (Walensky *et.al.*, 2011; Shamas-Din *et.al.*,2013). Aktivitas pro-apoptosis protein Bax dan protein antiapoptosis Bcl-2 bekerja sama. Bax bergerak ke mitokondria dan memicu perubahan fungsi mitokondria dengan pembentukan pori-pori transisi membran mitokondria dan reduksi MMP, yang memicu potensi apoptosis yang disebabkan oleh agen kemoterapi (Arbab *et.al.*, 2013).

Survivin merupakan protein penting untuk survival sel dan berfungsi untuk mengatur pembelahan sel dan menghambat apoptosis. Sebagai anggota famili protein inhibitor apoptosis (IAP, Inhibitor of Apoptosis Protein), Survivin awalnya ditandai sebagai inhibitor fisik Caspase, menyediakan step sitoprotektif *downstream* dari reseptor kematian dan apoptosis mitokondria. Namun sekarang diketahui bahwa inhibitor X-linked apoptosis protein (XIAP) adalah satu-satunya inhibitor fisiologis Caspase-3, -7, dan -9. Hubungan antara Survivin dan XIAP memicu penghambatan sinergis aktivasi Caspase-9. Survivin overekspresi pada berbagai kanker manusia dan secara keseluruhan dikaitkan dengan prognosis yang buruk. Lebih khusus ekspresi Survivin berkorelasi dengan prognosis yang buruk dan kemoresisten pada kanker mulut. Selanjutnya penghambatan Survivin pada kanker leher dan kepala yang berbeda secara signifikan meningkatkan aktivitas anti-tumorigenik beberapa target terapi dan sitotoksik (Lo and Chang, 2013; Jaiswal *et.al.*, 2015).

Selama beberapa tahun terakhir ini telah berkembang minat terhadap senyawa fitokimia alami dengan potensi antikanker, karena relatif non-toksik, murah, tersedia dalam bentuk ingestif (Gali-Muhtasib *et.al.*, 2006). Senyawa alami ini digunakan sebagai agen tunggal. Senyawa ini kemudian dapat berfungsi sebagai agen *chemosensitizing* bila dikombinasikan dengan obat kemoterapi standar (Vinod *et.al.*, 2013). Senyawa kemopreventif yang ideal seharusnya tidak toksik, memiliki khasiat

yang tinggi, murah, tersedia untuk konsumsi oral, mekanisme kerjanya diketahui, dan aspek yang paling penting dari penerimaan manusia. (Ramshankar and Khrisnamurthy, 2014). Beberapa senyawa fitokimia telah dilaporkan mempunyai efek *chemosensitizing* yang potensial seperti curcumin (alkaloid), genistein (isoflavon) dan polyphenon-E (polifenol) telah dievaluasi dalam uji klinis. Sedangkan senyawa yang lain seperti quercetin (flavonoid), emodin (anthraquinone), dan resveratrol (polifenol) telah menjadi subyek penelitian yang serius. Sejumlah coumarin juga telah dilaporkan mempunyai efek *chemosensitizing* potensial seperti cnidiadin (Barthomeuf *et.al.*, 2005), conferone, mogoltacin, dan feselol (Iranshabi *et.al.*, 2014).

Clausena excavata Burm. F adalah semak liar dari famili Rutaceae yang merupakan tanaman endemik di Malaysia, Thailand dan Indonesia. Telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit termasuk kanker (Arbab, 2011; Albaayit, 2014). Aktivitas antikanker *C. excavata* telah dikaitkan dengan bahan aktif carbazole alkaloid dan coumarin (Kawaii *et.al.*, 2001; Su *et.al.*, 2009).

Carbazole alkaloids dan coumarin merupakan komponen mayor dari tanaman ini. Diperkirakan sekitar enam puluh carbazole alkaloid dan lima puluh coumarin yang diisolasi dari berbagai bagian dari tanaman ini. Dalam jumlah kecil terdapat tetranortriterpenoids, flavonoid dan minyak esensial (Spirisut *et al.*, 2012).

Salah satu coumarin yang terdapat pada tanaman ini adalah nordentatin ($C_{19}H_{20}O_4$). Senyawa nordentatin menunjukkan sitotoksisitas yang tinggi melawan sel KB (Kanker mulut) dengan nilai IC_{50} 5,95 $\mu\text{g/mL}$. Diantara 13 senyawa yang terdapat dalam *C. excavata* yang diperiksa (binorponcitrin, dentatin, nordentatin, clausenidin, scopoletin, dictamine, clausine D, clausine F, murrayafoline A, murrayanine, clauszoline I, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole, 3-formyl-2,7-dimethoxycarbazole, clauszoline J, clausine H, murrayacine, dan heptaphylline),

nordentatin mempunyai sitotoksitas yang paling tinggi melawan sel KB (Sripisut *et.al.*, 2012).

Penelitian ini diawali dengan melihat sitotoksitas nordentatin terhadap *cell lines HSC-4* yang dilanjutkan dengan *flowcytometry* untuk mengetahui pengaruh nordentatin terhadap apoptosis *cell lines HSC-4*. Penelitian ini dilanjutkan dengan analisis *in silico* ligan nordentatin terhadap protein anti-apoptosis (Bcl-2, EGFR, NFkB, dan Survivin) dan protein pro-apoptosis (Caspase-3 dan Caspase-7), dengan *molecular docking* untuk mengetahui interaksi nordentatin terhadap beberapa protein yang terlibat dalam apoptosis. Selanjutnya dilakukan penelitian secara *in vitro* kembali untuk mengetahui aktivitas protein Caspase-3 dan Caspase-7 *cell lines HSC-4* setelah pemberian nordentatin untuk mengkonfirmasi hasil *molecular docking* yang telah dilakukan.

Hasil nilai *molecular docking* berupa ΔG yaitu energi bebas Gibbs (*binding affinity*, kkal/mol) menunjukkan kestabilan interaksi (ikatan) ligan dengan reseptor pada *binding site*. Semakin negatif nilai ΔG maka semakin stabil ikatan antara ligan dengan reseptor (Arwansyah *et.al*, 2014; Ferencz and Muntean, 2014; Kim and Ryu, 2016).

Penelitian *in silico* yang telah dilakukan oleh Karthik (2014) dengan melakukan *molecular docking* terhadap beberapa derivat coumarin dan anthraquinone (ligan) dengan *kinase suppressor of RAS-1 (KSR-1)* (reseptor) menghasilkan ikatan afinitas dengan nilai aesculin (-5,9 kkal/mol), aesculetin (-4,7 kkal/mol), morindone (-5,7 kkal/mol), rubiadin (-5,6 kkal/mol), damnacanthal (-5,2 kkal/mol), dan nordamncanthal (-5,7 kkal/mol). Dapat disimpulkan bahwa derivat coumarin dan anthraquinone mempunyai ikatan afinitas yang cukup baik terhadap kinase suppressor of RAS-1 (KSR-1).

Sampai sekarang efek nordentatin terhadap protein yang memicu apoptosis sel-sel *OSCC* belum pernah dilaporkan. Mekanisme molekular yang mendasari antikanker nordentatin masih belum jelas. Untuk itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antikanker nordentatin secara *in vitro* dan *in silico* dalam memicu apoptosis baik melalui jalur intrinsik maupun ekstrinsik pada *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.

1.2. Perumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan dapat dirumuskan masalah yaitu :

1. Apakah nordentatin berpengaruh terhadap sitotoksisitas *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut?
2. Apakah nordentatin berpengaruh terhadap apoptosis *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut?
3. Apakah nordentatin dapat berinteraksi dengan protein anti-apoptosis Bcl-2, EGFR, NFkB dan Survivin secara *in silico*?
4. Apakah nordentatin dapat berinteraksi dengan protein pro-apoptosis Caspase-3 dan Caspase-7 secara *in silico*?
5. Apakah nordentatin berpengaruh terhadap aktivitas protein pro-apoptosis Caspase-3 dan Caspase-7 *cell lines HSC-4* secara *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum:

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antikanker nordentatin terhadap daya apoptosis *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut secara *in silico* dan *in vitro*.

1.3.2. Tujuan Khusus:

1. Membuktikan nordentatin bersifat toksik terhadap *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.
2. Membuktikan nordentatin berpengaruh terhadap apoptosis *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.
3. Membuktikan nordentatin dapat berinteraksi dengan protein anti-apoptosis Bcl-2, EGFR, NFκB dan Sp1 secara *in silico*.
4. Membuktikan nordentatin dapat berinteraksi dengan protein pro-apoptosis Caspase-3 dan Caspase-7 secara *in silico*.
5. Membuktikan nordentatin berpengaruh terhadap aktivitas protein pro-apoptosis Caspase-3 dan Caspase-7 *cell lines HSC-4* secara *in vitro*.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Untuk perkembangan ilmu pengetahuan

Hasil penelitian ini mampu menjelaskan mekanisme molekuler aktivitas antikanker nordentatin yang merupakan ekstrak coumarin dari *Clausena excavata* terhadap *cell lines HSC-4* Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.

1.4.2. Untuk kepentingan masyarakat

1. Masyarakat semakin banyak pilihan pengobatan dengan mempertimbangkan nordentatin untuk membantu penyembuhan penyakit kanker mulut.
2. Data yang diperoleh dari penelitian ini dapat membantu pemerintah dan masyarakat untuk mengembangkan Usaha Kecil Menengah (UKM) untuk



berinvestasi pada produk alam khususnya *Clausena excavata* dalam penyembuhan penyakit kanker mulut.

1.4.3. Terapan

Nordentatin dapat dipertimbangkan sebagai salah satu senyawa aktif untuk membantu penyembuhan kanker mulut.

