

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker serviks adalah masalah kesehatan global yang terus meningkat, baik di negara berkembang maupun negara industri (Vu *et al.*, 2018). Kanker serviks merupakan salah satu kanker yang paling umum terjadi pada wanita di dunia, menempati urutan keempat setelah kanker payudara, kanker kolorektal dan kanker paru. Kanker serviks menyebabkan angka kematian tahunan 266.000 dan mencatat 528.000 kasus baru pada tahun 2012 (Torre *et al.*, 2015). Diperkirakan terdapat 570.000 kasus dan 311.000 kematian akibat kanker serviks pada tahun 2018 di seluruh dunia (Bray *et al.*, 2018).

Kanker serviks adalah jenis kanker paling umum kedua pada wanita di wilayah Asia Tenggara dan merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di kalangan wanita dari negara berpenghasilan rendah dan menengah (Shrestha *et al.*, 2018). Pusat Data dan Informasi Kesehatan Kementerian RI (2015) menyatakan, secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Penyakit kanker serviks merupakan penyakit dengan prevalensi tertinggi di Indonesia yakni 0,8%, sementara untuk kanker payudara memiliki prevalensi sebesar 0,5%. Diperkirakan 32.469 wanita Indonesia setiap tahun didiagnosis dengan kanker serviks dengan kematian 18.279 orang (Bruni *et al.*, 2019).

Data epidemiologis dan molekuler menunjukkan bahwa infeksi persisten HPV (*Human Papillomavirus*) merupakan penyebab utama kanker serviks terinfeksi HPV dan 87,0% telah berkembang menjadi kanker serviks invasif (Bruni

et al., 2019). HPV dibagi menjadi dua subkelompok berdasarkan potensi onkogenesisnya yaitu *high risk* (hrHPV) dan *low risk* (lrHPV). LrHPV seperti HPV 6, 11, 5 dan 8 berperan dalam pengembangan kutil dan lesi jinak sedangkan hrHPV seperti HPV 16, 18, 31, 33 berperan sebagai pendorong utama perkembangan lesi dan kanker (Okunade, 2020). Faktor seksual dan reproduksi, penggunaan kontrasepsi oral (Roura *et al.*, 2016), merokok (Aguayo *et al.*, 2020), wanita dengan HIV (UNAIDS, 2016) dan infeksi *Chlamydia trachomatis* (Dahlström *et al.*, 2011) juga terlibat dalam perkembangan kanker serviks.

Genom HPV dapat dibagi menjadi 3 domain yaitu *early region*, *late region* dan *non-coding region*. *Early region* terdiri dari 6 *open reading frames* (ORFs) yaitu protein E1, E2, E4, E5, E6 dan E7. *Late region* dengan 2 ORFs yaitu L1 (protein kapsid utama) dan L2 (protein kapsid minor) (Ruttkay-nedecky *et al.*, 2013). Protein E5, E6 dan E7 merupakan penyebab utama terjadinya onkogenesis pada kanker serviks (Kuguyo *et al.*, 2018). Protein E5 bekerja mengganggu fungsi normal MHC kelas I, protein E6 menekan aktivitas p53 sedangkan protein E7 berperan dalam meningkatkan ekspresi gen retinoblastoma. Gen tersebut merupakan beberapa gen yang berperan mengendalikan pertumbuhan sel normal, diferensiasi, dan fungsi kekebalan tubuh dalam perkembangan kanker serviks (Venuti *et al.*, 2011).

Onkoprotein E6 pada kanker serviks yang mengandung hrHPV melalui ikatan dengan *E6 associated protein* (E6AP) ligase ubiquitin menyebabkan degradasi dan menonaktifkan fungsi p53 (Prati, Marangoni and Boccardo, 2018). Sebagian besar sel kanker serviks memiliki *wild type* gen p53, tetapi kadarnya sangat rendah (Garima *et al.*, 2016). Mengembalikan fungsi p53 yang tidak aktif

pada tumor yang mempertahankan *wild type* p53 adalah strategi penting dan target terapi yang potensial dalam pengobatan kanker (Hu *et al.*, 2021).

Regulasi p53 melibatkan berbagai jalur sinyal, termasuk jalur PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Mutasi yang mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K/Akt dan menonaktifkan gen penekan tumor p53 adalah mekanisme umum yang dibutuhkan sel kanker untuk berkembang biak dan menghindari kematian sel yang telah diprogram sebelumnya. Akt memediasi tingkat p53 melalui peningkatan penargetan p53 untuk didegradasi yang dimediasi MDM2 (*murine double minute 2*). Penekanan terhadap jalur ini sangat penting untuk menjaga aktivitas p53 dalam menghambat perkembangan kanker (Abraham and O'Neill, 2014).

Ikatan E6 dengan E6AP juga berperan dalam aktivasi *human Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT) dan aktivitas telomerase (Pańczyszyn, Boniewska-Bernacka and Głąb, 2018). Aktivitas telomerase terdeteksi sebanyak 96,5% pada kasus kanker serviks (Reddy *et al.*, 2001). Aktivitas hTERT dan telomerase diregulasi secara post-transkripsi oleh onkoprotein E6 melalui protein seluler NFX1-123. Ikatan HrHPV E6/E6AP berfungsi sebagai induktor utama telomerase dan subunit katalitiknya, hTERT (Katzenellenbogen, 2017).

Telomerase merupakan ribonucleoprotein yang dapat memperpanjang telomer dengan menambahkan pengulangan hexameric (TTAGGG) ke ujung kromosom dan sangat penting untuk melindungi kromosom terhadap degenerasi (Fathi *et al.*, 2019). Aktivitas telomerase terbatas pada jaringan janin serta jaringan dewasa tertentu seperti testis, folikel, sel *crypt* usus dan sel induk hematopoietik. Penelitian telah menunjukkan telomerase diaktifkan pada banyak kanker manusia

maupun *cell line*. Reaktivasi telomerase merupakan peristiwa penting yang berperan dalam pembentukan keganasan (Healy, 1995).

Telomerase terdiri dari dua komponen utama yaitu komponen RNA (hTR) dan subunit katalitik (hTERT). hTR diekspresikan di semua jaringan terlepas dari aktivitas telomerase (Zhu *et al.*, 2011). Ekspresi hTERT diperkirakan kurang dari 1 hingga 5 salinan per sel dan terkait erat dengan aktivitas telomerase dalam sel. hTERT umumnya ditekan dalam sel normal dan diupregulasi dalam sel kanker. Hal ini menunjukkan bahwa hTERT adalah penentu utama dalam aktivitas telomerase (Yi *et al.*, 1999).

Ekspresi hTERT yang menghasilkan aktivitas telomerase sangat penting untuk tumorigenesis. Sebanyak 85% sel tumor mempertahankan panjang telomernya dengan menginduksi aktivitas telomerase melalui upregulasi transkripsi hTERT. Aktivitas telomerase diperlukan untuk kelangsungan hidup jangka panjang sel tumor. Peningkatan aktivitas telomerase menyebabkan sel epitel *immortal* dan memicu terjadinya tumorigenesis, namun penghambatan aktivitas telomerase pada sel tumor dapat menyebabkan penuaan atau apoptosis (Dang *et al.*, 2018).

Kemoterapi merupakan terapi kanker yang paling umum digunakan. Penatalaksanaan kanker melalui kemoterapi seringkali tidak selektif sehingga dapat merusak sel normal yang sehat yang dapat mengakibatkan efek samping yang merugikan. Fokus baru dalam pengobatan kanker adalah pengobatan dengan toksisitas selektif suatu zat yang hanya merusak atau membunuh sel tertentu (sel kanker) tanpa menimbulkan efek berbahaya pada sel normal (Cohen *et al.*, 2015). Penghambatan hTERT adalah pilihan terapi yang potensial karena aktivitas telomerase di upregulasi pada sebagian besar sel tumor. Telomerase merupakan

biomarker diagnostik dan terapeutik yang baik untuk terapi kanker karena kebanyakan sel somatik tidak atau hanya memiliki aktivitas telomerase tingkat rendah (Ganesan and Xu, 2018). Inaktivasi selektif dari ekspresi telomerase dalam sel kanker tidak mempengaruhi sebagian besar sel sehat (Sprouse, Steding and Herbert, 2012).

Penelitian telah menunjukkan bahwa beberapa bahan alam (*natural product*) dapat menghambat aktivitas telomerase. Bahan alam menghambat proliferasi sel, mengurangi mRNA dan protein hTERT dan kemudian mempromosikan apoptosis di berbagai lini sel kanker. Para peneliti mengemukakan bahwa bahan alam dapat menekan aktivitas telomerase dengan penekanan pada level transkripsi dan pasca transkripsi (Ganesan and Xu, 2018). Beberapa zat aktif yang berasal dari bahan alam telah memperlihatkan adanya aktivitas inaktivasi telomerase dan destabilisasi telomer, salah satunya adalah piperin.

Piperin merupakan alkaloid piperidin yang diisolasi dari spesies tanaman yang telah digunakan selama berabad-abad yaitu *Piper nigrum* (lada hitam) dan *Piper longum* (lada panjang). Senyawa ini adalah salah satu alkaloid piperidin, strukturnya mengandung cincin piperidin yang merupakan sebuah cincin heterosiklik yang terdiri dari lima atom karbon dan satu atom nitrogen (Yaffe *et al.*, 2015). Penelitian yang mendukung kemungkinan adanya aktivitas piperin terhadap telomerase dan telomer telah dilakukan. Penelitian ini membuktikan aktivitas piperin secara *in silico* dalam penghambatan kanker dengan menjadikan urutan DNA quadruplex manusia sebagai target. DNA non-kanonik ini dibentuk oleh sekuens yang kaya guanin dan tersebar luas dalam genom manusia. Kira-kira 300.000 sekuens memiliki kemampuan untuk membentuk struktur G-quadruplex

diantaranya telomer DNA, wilayah promotor c-kit21 dan wilayah promotor c-myc. Oleh karena itu, daerah ini sangat potensial untuk dijadikan sebagai target farmakologis untuk anti-tumor atau terapi anti-kanker. Piperin dilaporkan memiliki afinitas yang kuat dengan struktur G-quadruplex secara *in silico* dan dapat menstabilkan struktur ini. Ikatan piperin pada stuktur ini dapat menghambat aktivitas telomerase yang diperlukan untuk mempertahankan telomer (Tawani *et al.*, 2016).

Piperin secara *in-silico* menunjukkan potensi penghambatan pemanjangan telomer yang merupakan salah satu proses kunci dalam proliferasi sel kanker. Oleh karena itu, piperin memiliki potensi sebagai agen antikanker yang selektif karena menargetkan pemendekkan telomer pada sel kanker sehingga tidak mengganggu metabolisme sel normal. Potensi selektivitas piperin diharapkan dapat menargetkan sel kanker dengan lebih presisi, mengurangi kerusakan pada sel normal, dan meminimalkan efek samping yang sering terjadi pada terapi kanker konvensional. Penelitian menunjukkan ekstrak kasar *Piper nigrum* menunjukkan efek sitotoksik yang lebih rendah pada sel payudara normal (MCF-12A) dibandingkan pada sel kanker MCF-7, MDA-MB-231, dan MDA-MB-468. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki aktivitas antikanker yang selektivitas terhadap sel kanker payudara (Sriwiryajan *et al.*, 2014). Potensi ini membuat piperin memiliki prospek sebagai pilihan terapi yang lebih aman dan efektif dalam melawan kanker.

Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya aktivitas anti-kanker piperin secara *in vitro* terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} $61,94 \pm 0,054$ $\mu\text{g/mL}$ (Paarakh *et al.*, 2015). Penelitian untuk menemukan mekanisme kerja piperin khususnya pada kanker serviks *cell line* HeLa telah dilakukan. Piperin mampu menghambat

pertumbuhan sel kanker serviks yang resisten terhadap pengobatan mitomycin-C melalui pemblokiran p-STAT3 / p65 (Han *et al.*, 2017).

Hasil uji viabilitas sel menunjukkan bahwa piperin secara signifikan mampu mengurangi proliferasi sel HeLa. Piperin dapat menginduksi kerusakan sel dan menyebabkan kematian sel melalui jalur stress oksidatif. Piperin secara signifikan dapat menginduksi kondensasi dan fragmentasi inti sel HeLa. Hasil pengujian depolarisasi Mitokondria Membran Potensial (MMP) menunjukkan bahwa piperin secara signifikan mengurangi MMP sel HeLa sehingga dapat menginduksi terjadinya apoptosis seluler. Piperin mampu menekan pertumbuhan karsinoma serviks dengan menghambat siklus sel dan aktivasi caspase-3 (Jafri *et al.*, 2019).

Aktivitas piperin juga dibuktikan terhadap kanker payudara. Piperin menghambat pertumbuhan tumor dan metastasis *in-vitro* dan *in-vivo* pada kanker payudara murine 4T1 (Lai *et al.*, 2012), tetapi piperin tidak mengganggu jaringan payudara normal (Kakarala *et al.*, 2010). Piperin sangat kuat menghambat proliferasi dan migrasi sel serta menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara HER2 *overexpression*. Piperin secara signifikan menekan ekspresi HER2 dan FAS (Do *et al.*, 2013). Piperin juga menghambat angiogenesis pada sel kanker payudara secara *in-vivo* (Doucette *et al.*, 2014).

Sebuah studi juga menunjukkan aktivitas piperin dalam melemahkan inisiasi jalur pensinyalan PI3K/AKT/GSK-3 β dalam sel osteosarkoma. Penekanan pada jalur ini dapat meningkatkan ekspresi p53 melalui penargetan MDM2 yang menghalangi terjadinya degradasi p53 (Qi *et al.*, 2023).

Penelitian lain menunjukkan bahwa piperin memiliki peranan dalam proses apoptosis. Piperin dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada

kanker paru-paru manusia sel A549 melalui jalur pensinyalan mitokondria yang bergantung p53, yang melibatkan terhentinya siklus sel dalam fase G2 / M, aktivasi caspase-3 dan caspase-9, meningkatkan ekspresi Bax dan p53, serta menurunkan ekspresi Bcl-2. Piperin tidak menunjukkan toksisitas terhadap fibroblas paru-paru manusia sel WI38 (Lin *et al.*, 2014). Piperin juga meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker melanoma. Ekspresi XIAP dan Bid mengalami downregulasi setelah pemberian piperin dengan jalur kematian mitokondria. Piperin juga menyebabkan pembelahan yang signifikan dari caspase-3 dan *poly ADP ribose polymerase* (PARP) (Wang *et al.*, 2014; Fofaria, Kim and Srivastava, 2014).

Piperin juga terbukti Mutasi yang mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K (fosfoinositida 3-kinase)/Akt dan menonaktifkan gen penekan tumor TP53 adalah mekanisme umum yang dibutuhkan sel kanker untuk berkembang biak dan menghindari kematian sel yang telah diprogram sebelumnya. Dalam mekanisme yang dijelaskan dengan baik, Akt memediasi kontrol negatif tingkat p53 melalui peningkatan penargetan p53 yang dimediasi MDM2 (murine double menit 2) untuk degradasi. Bukti yang terkumpul mulai menunjukkan bahwa, dalam keadaan tertentu, PTEN (homolog fosfatase dan tensin yang dihapus pada kromosom 10)/PI3K/Akt juga mendorong translasi p53 dan stabilitas protein, menunjukkan bahwa mekanisme tambahan mungkin terlibat dalam regulasi p53 yang dimediasi oleh Akt. dalam tumor.

Penelitian tentang mekanisme anti-kanker piperin pada sel kanker serviks masih sangat terbatas. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme anti-kanker piperin masih dirasa perlu untuk dilakukan. Perlu dilakukan penelitian terhadap mekanisme piperin terutama terhadap ekspresi gen p53, hTERT dan

panjang telomer pada kanker serviks. Penelitian diharapkan dapat menemukan mekanisme molekuler piperin dalam mengeliminasi sel kanker serviks *cell line* HeLa.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian piperin terhadap ekspresi p53 pada kanker serviks *cell line* HeLa?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian piperin terhadap ekspresi hTERT pada kanker serviks *cell line* HeLa?
3. Apakah terdapat pengaruh pemberian piperin terhadap rasio panjang telomer pada kanker serviks *cell line* HeLa?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengkaji pengaruh pemberian piperin dan dosis terhadap ekspresi p53, hTERT dan, rasio panjang telomer serta pada kanker serviks *cell line* HeLa.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian piperin terhadap ekspresi p53 pada kanker serviks *cell line* HeLa.
2. Menganalisis pengaruh pemberian piperin terhadap ekspresi hTERT pada kanker serviks *cell line* HeLa.
3. Menganalisis pengaruh pemberian piperin terhadap rasio panjang telomer pada kanker serviks *cell line* HeLa.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan

Hasil dari penelitian ini mampu menjelaskan mekanisme molekuler piperin dalam mengeliminasi sel kanker serviks. Selain itu, penelitian ini diharapkan mampu menemukan konsentrasi/dosis yang dapat menghambat dan mematikan sel kanker dapat menjadi rujukan bagi penelitian lanjutan baik pengujian praklinis maupun klinis.

1.4.2 Kepentingan Masyarakat

Bertambahnya pilihan pengobatan dalam masyarakat dengan mempertimbangkan piperin dalam pengobatan kanker serviks.

1.4.3 Terapan

Piperin dapat dipertimbangkan sebagai senyawa aktif dalam pengobatan kanker serviks.

