

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Kanker Serviks dan Karsinogenesis

Kanker adalah kelompok penyakit yang memiliki karakteristik pertumbuhan yang tidak terkontrol dan abnormal yang menyebar. Pebaran kanker yang tidak terkontrol dapat menyebabkan kematian. Di dunia, kanker disebut sebagai pembunuh nomor dua setelah penyakit jantung (Blecher *et al.*, 2008). *American Cancer Society* menyatakan, kanker adalah kelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan dan perkembangan sel-sel yang tidak terkontrol dan abnormal (Blecher *et al.*, 2015). Kanker dapat muncul oleh faktor eksternal maupun faktor internal yang memicu terjadinya proses karsinogenesis (proses pembentukan kanker). Faktor eksternal bisa berupa infeksi, radiasi, zat kimia tertentu dan juga konsumsi tembakau. Faktor internal bisa berupa mutasi (baik yang diturunkan maupun akibat metabolisme), hormon dan kondisi sistem imun (Steben *et al.*, 2007).

Kanker serviks adalah tumor ganas yang tumbuh pada serviks yang merupakan pintu masuk ke arah rahim (uterus) yang terletak antara rahim dan liang senggama (vagina). Kanker ini peminatnya terjadi pada wanita yang telah berumur diatas 30 tahun, tetapi bukti statistik menunjukkan bahwa kanker serviks juga dapat terjadi pada wanita yang berumur antara 20 sampai 30 tahun (Diananda, 2009). Pada serviks terdapat 2 jenis sel yang melapisi, sel *squamous* (ektoserviks) dan sel kelenjar (endoserviks). *Transformation zone*

merupakan tempat dimana kedua sel ini bertemu. Kebanyakan kasus kanker serviks mulai terjadi pada bagian ini. Kanker serviks kebanyakan mulai pada sel yang melapisi serviks. Sel ini tidak berubah dengan sekejap, tetapi sel yang normal berkembang secara bertahap. Perkembangan bertahap ini disebut pra kanker, istilah untuk pra kanker ini adalah *cervical intraepithelial neoplasia (CIN)*, *squamous intraepithelial lesion (SIL)* dan *dysplasia*. Kanker serviks dan pra kanker serviks dibedakan dengan gambaran mikroskopiknya. (Blecher *et al.*, 2015)

Terdapat dua tipe utama kanker serviks, yaitu *squamous* sel karsinoma dan adenokarsinoma. *Squamous* sel karsinoma merupakan jenis terbanyak dengan prosentase 80%-90% dari kanker serviks. Kanker ini berasal dari sel *squamous* yang menutupi permukaan dari ektoserviks. *Squamous* sel karsinoma lebih sering mulai dimana ektoserviks bergabung dengan endoserviks. (Blecher *et al.*, 2015)

Kanker serviks merupakan jenis kanker terbanyak kedua pada wanita dan menjadi penyebab lebih dari 250.000 kematian pada tahun 2005. Kurang lebih 80% kematian tersebut terjadi di negara berkembang. Kanker serviks disebabkan oleh infeksi yang terus menerus dari HPV. Penularan penyakit kanker ini dapat melalui hubungan seksual, ditemukan lebih tinggi pada perempuan yang mulai berhubungan seksual sebelum usia 16 tahun. Kanker serviks merupakan penyebab kematian utama kanker pada wanita di negara berkembang termasuk di Indonesia.

Pada tahun 2010 estimasi jumlah insiden kanker serviks adalah 454.000 kasus. Data ini didapatkan dari registrasi kanker berdasarkan populasi, registrasi data vital, dan data otopsi verbal dari 187 negara dari tahun 1980 sampai 2010. Per

tahun insiden dari kanker serviks meningkat 3.1% dari 378.000 kasus pada tahun 1980. Ditemukan sekitar 200.000 kematian terkait kanker serviks, dan 46.000 diantaranya adalah wanita usia 15-49 tahun yang hidup di negara sedang berkembang. Berdasarkan *Global Cancer Observatory* 2012 kanker serviks menduduki urutan ke-7 secara global dalam segi angka kejadian (urutan ke urutan ke-6 di negara kurang berkembang) dan urutan ke-8 sebagai penyebab kematian (menyumbangkan 3,2% mortalitas, sama dengan angka mortalitas akibat leukemia). Kanker serviks menduduki urutan tertinggi di negara berkembang, dan urutan ke 10 pada negara maju atau urutan ke 5 secara global. Di Indonesia kanker serviks menduduki urutan kedua dari 10 kanker terbanyak berdasar data dari Patologi Anatomi tahun 2010 dengan insidens sebesar 12,7%.

Karsinogenesis adalah proses multi tahap yang merupakan proses perubahan genetik sel normal menuju bentuk progresif dan akhirnya menjadi malignan (ganas). Pemahaman mengenai karsinogenesis mengawali upaya pengembangan strategi baru yang menjanjikan untuk pencegahan kanker yaitu penemuan senyawa kemopreventif. Senyawa kemopreventif merupakan suatu senyawa yang dapat digunakan untuk menghambat, menunda, dan mengembalikan proses terjadinya kanker. Senyawa ini dibagi menjadi dua kategori yaitu *blocking agent* dan *suppressing agent*. *Blocking agent* mencegah karsinogen mencapai target aksinya baik melalui penghambatan aktivasi metabolisme atau menghambat interaksi dengan target makromolekul. *Suppressing agent* menghambat pembentukan malignan dari sel yang telah terinisiasi pada tahap promosi atau progresi (Akrom, 2013).

2. Apoptosis

Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram yang terjadi pada organisme multiseluler. Kejadian biokimia ini menyebabkan perubahan karakteristik sel dan kematian. Perubahan ini meliputi *blebbing*, penyusutan sel, fragmentasi inti sel, kondensasi kromatin, fragmentasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) kromosom, dan peluruhan *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) global. Sejumlah 50 -70 miliar sel mati setiap hari karena apoptosis pada manusia dewasa (Green, 2011). Terdapat dua jalur apoptosis yaitu ekstrinsik dan intrinsik.

Jalur ekstrinsik

Jalur ekstrinsik melibatkan *Fas Ligan*(FASL) yang dimiliki oleh sel Tc. Sel Tc yang terkenal untuk *recovery* ini, akan berkeliling dan bisa mengenali reseptor FAS. Ketika ada *target* sel yang akan dibunuh (karena rusak), maka sel tadi mengekspresikan reseptor FAS. Hal inilah yang membuat sel bisa dikenali oleh *FAS ligand*. Ketika mereka saling menempel, terjadi perubahan bentuk pada *domain cytosolic (death domain)* dari reseptor FAS. Reseptor FAS sendiri adalah protein 20 integral yang memiliki domain ekstraseluler dan *domain cytosolic*. Perubahan *domain* dari *death domain* ini akan dikenali oleh protein *adaptor* yaitu *Fas Associated protein with Death Domain* (FADD). Kompleks FADD tersebut dapat mendegradasi *procaspase* menjadi *caspace 8*(aktif). *Caspase 8* selanjutnya bisa mendegradasi *procaspase 3* menjadi *caspace 3* (aktif). *Caspase 3* memiliki banyak peran, dia bisa memotong banyak substrat lain (Yau, 2004).

Jalur intrinsik

Pada membran mitokondria terdapat protein B *Cell Lymphoma 2* (Bcl-2) atau B *Cell Lymphoma Extra Large* (Bcl-XL) yang berikatan dengan *Associated X Protein* Bax(Bcl-2). Kompleks protein tersebut menjaga sitokrom C supaya tidak keluar dari mitokondria. Jika ada protein Bad datang, maka akan mengganggu kompleks tadi dengan berikatan pada Bcl-2 atau Bcl-XL sehingga Bax terpisah. Bax kemudian berkolaborasi dengan Bax lain membentuk *channel formation* (suatu kanal). Kanal ini menjadi tempat masuknya *ion Ca²⁺*. Ketika *ion* ini masuk maka keluarlah sitokrom C. Sitokrom C yang berada di sitosol membentuk kompleks dengan *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (Apaf 1), *Adenosine Triphosphate* (ATP), dan *caspase 9* dinamakan *Apoptosom* (suatu *holoenzyme*, gabungan beberapa protein). Kompleks ini adalah suatu *protease* yang bertugas memotong atau mendegradasi protein lain. Salah satunya adalah *procaspase 3* menjadi *caspase 3*. *Caspase 3* yang jumlahnya berlimpah ini akan memotong sitoskeleton (kerangka sel), *Poly (ADP-ribose) Polymerase* (PARP), *Inhibitor Caspase Activated Dnase*(ICAD) (Yau, 2004).

Apoptosis-inducing factor (AIF) dan *Caspase Activated Dnase* (CAD) *endonuklease* juga dilepaskan dari intermembran mitokondria, pindah ke nukleus dan mendegradasi kromatin sehingga membentuk *DNA ladder*. CAD semula terikat ICAD dan kompleks ini tidak aktif. Namun jika kedatangan *caspase 3*, maka ICAD lepas dan CAD bisa masuk inti dan terjadi proses pemotongan DNA. Sel yang sudah terpotong-potong ini dinamakan *apoptotic bodies*, yang selanjutnya akan dikenali oleh *makrofag* untuk di fagositosis (Yau, 2004).

3. *Caspase 3*

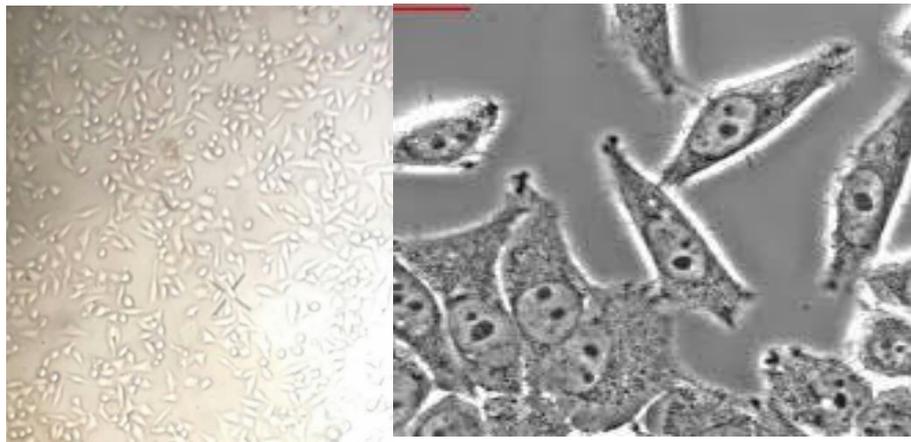
Caspase merupakan kelompok dari *cysteine-aspartic acid protease*. *Caspase* yang disintesis sebagai rantai tunggal *zymogen* tidak aktif dengan N-terminal *prodormain* ditambah subunit besar dan kecil katalisis. *Caspase* dapat dibagi menjadi kelompok inisiasi dan kelompok eksekusi. *Caspase 3* merupakan salah satu contoh dari *caspase* kelompok eksekusi. Aktivasi *caspase 3* adalah salah satu poin kunci dalam transmisi dari sinyal apoptosis karena aktifitas pemecahan *caspase 3* menghasilkan berbagai morfologi dan jenis biokimia dari apoptosis (Meergans *et al.*, 2000). *Caspase 3* merupakan bentuk aktif dari *procaspase 3* yang diaktifkan oleh *caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 9*, *caspase 10*, CPP32 activating protease, *granzyme B*. Ketika *caspase 3* aktif maka akan menstimulasi pelepasan dari PARP. Pelepasan dari PARP ini akan mengakibatkan degranulasi sel dan akhirnya di kenali oleh makrofag dan di fagositosis (Fan *et al.*, 2005). Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa HPV tidak hanya menghambat gen p53 namun menghambat aktivasi dari gen *caspase 3* (Aréchaga-Ocampo *et al.*, 2008). Ekspresi mRNA *caspase 3* yang rendah dihubungkan dengan prognosis yang buruk. Ekspresi gen *caspase 3* yang tinggi dihubungkan dengan meningkatnya sensitivitas terhadap terapi. Oleh karena itu, gen ini merupakan faktor prognosis yang signifikan dalam tumor.

4. Sel HeLa

Sel HeLa merupakan salah satu dari beberapa sel kanker turunan dari sel epitel serviks. Sel HeLa adalah sel yang dibiopsi dari salah satu pasien penderita

kanker serviks yang bernama Henrietta Lacks. Henrietta Lacks meninggal di tahun 1951 karena adenokarsinoma serviks. Biopsi jaringan dilakukan untuk evaluasi diagnosis pada laboratorium John Hopkins. Sel kanker telah tumbuh secara cepat dan menjadi *human cell line* pertama kali.

Gambar 2.1 Sel Hela kanker serviks



Sel HeLa diketahui mengandung HPV 18 DNA dan telah diteliti terhadap *caspase 3* (Aréchaga-Ocampo *et al.*, 2008; Lucey, Nelson-Rees & Hutchins, 2009). Sel HeLa pada sampai saat ini digunakan untuk penelitian di seluruh dunia. Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur *RPMI 1640-serum*. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Lucey, Nelson-Rees & Hutchins, 2009).

5. Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Merupakan semak berimpang, tinggi mencapai 2,5 m. Batangnya semu terbentuk dari pelepah daun yang saling bertautan, lunak, pada pangkalnya membentuk rimpang dasar berwarna kuning muda, globular, kulit rimpang kuning tua atau cokelat kemerahan. Daging rimpang orange kecoklatan, bercabang dengan warna cabang kuning pucat. Bau merangsang, berasa agak pahit. Rimpang terdiri dari rimpang induk berbentuk bulat telur dengan anakan rimpang yang lebih langsing berjumlah 3-4. Daunnya berbentuk oval, tunggal, dengan ujung meruncing, permukaan licin dan tepinya rata. Pertulangan daun menyirip, warna daun hijau dengan tulang daun yang di tengah ungu. Bunga tumbuh pada bagian dekat dengan tanah, berupa bunga majemuk berbulir, memiliki banyak daun pelindung, kelopaknya berambut putih, mahkota juga putih berbentuk tabung, benang sari kuning muda (Sudarsono *et al*, 1996).

Gambar 2.2 Tanaman Temulawak

Dikutip dari : <https://www.alibaba.com>



Kingdom : Plantae

Subdivisi : Angiospermae

Divisi : Manoliophyta

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Zingiberales

Genus : Curcuma

Famili : Zingiberaceae

Spesies : *Curcuma xanthorrhiza*

Kandungan zat aktif pada rizoma temulawak. Zat warna kuning 1-2% (*Curcumin* dan *monodesmethoxy-curcumin*). Minyak atsiri 5% (dengan komponen utama 1-Cycloisoprenemyrcene 85%), *Curcuminoid*, yang terdiri dari 1,2-2% *Curcumin* dan *monodesmethoxycurcumin*. Komponen minyak atsiri lainnya adalah *β-curcumene ar-curcumene*, *xanthorrhizol*, *germacon* (Sudarsono *et al.*, 1996). *Curcumin* dan *xanthorrhizol* merupakan zat aktif utama pada temulawak yang memiliki aktifitas sebagai antioksidan, antikanker dan imunomodulator yang berperan penting pada penghambatan karsinogenesis (Base *et al.*, 2015).

Secara tradisional rimpang temulawak digunakan untuk peluruh batu empedu, pelancar ASI, pelancar pencernaan, penurun panas, peluruh batu ginjal, menurunkan kolesterol, dan anti jerawat. Pada kalangan masyarakat biasanya digunakan sebagai penambah nafsu makan (Sudarsono *et al.*, 1996). *Curcuminoid* berkhasiat menetralkan racun, menghilangkan nyeri sendi, menurunkan kolesterol dan trigliserida darah, anti bakteri, antioksidan penangkal senyawa radikal bebas yang bahaya.

6. *Immunocytochemistry*

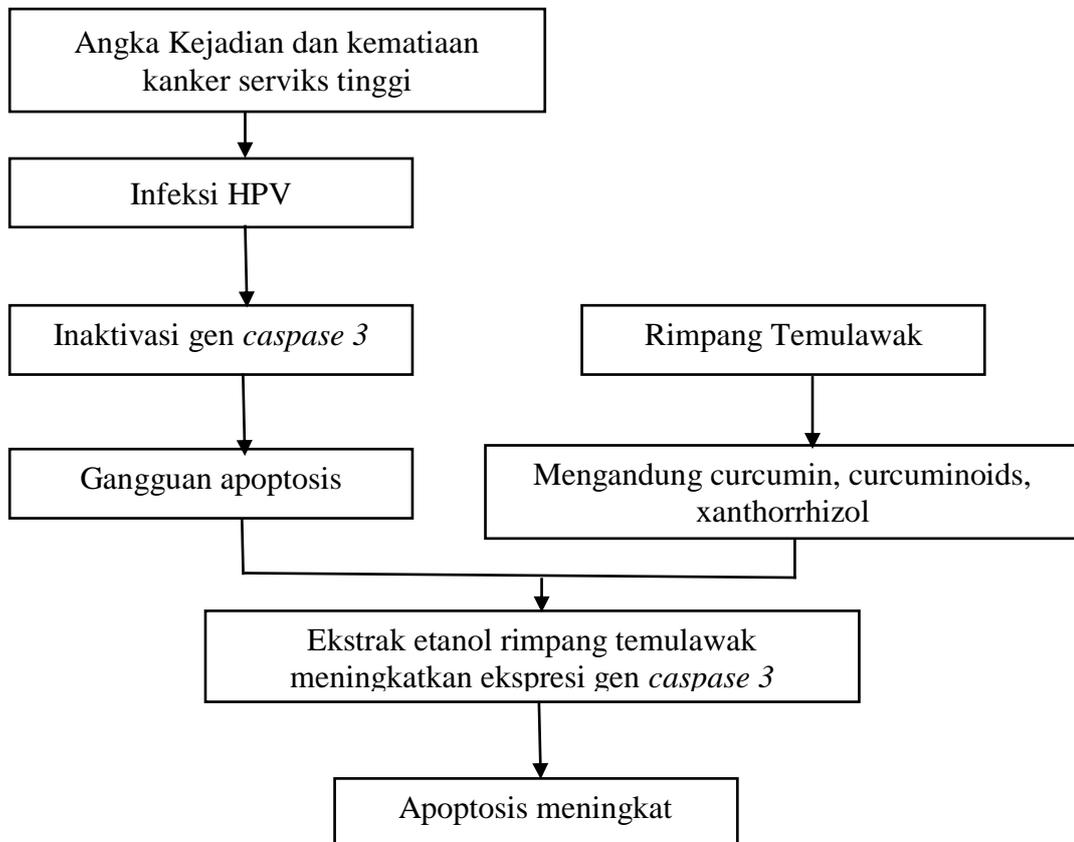
Immunocytochemistry atau imunositokimia merupakan metode untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan antigen.

Ada dua jenis metode imunositokimia, yaitu metode langsung dan metode

tidak langsung. Pada metode langsung, antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan pada metode tidak langsung, antigen diikat pada antibodi primer secara langsung, kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer. Selanjutnya ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel. Sel harus difiksasi dengan ditempelkan pada bahan pendukung padat sehingga antigen akan *immobile*. Hal ini dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan sel pada slide mikroskop, *coverslip*, atau bahan pendukung plastik yang sesuai. Ada dua macam metode fiksasi, yaitu pelarut organik dan reagen *cross-linking*. Pelarut organik seperti alkohol dan aseton akan memindahkan lipid, mendehidrasi sel, dan mengendapkan protein. Reagen *cross-linking* seperti paraformaldehid membentuk jembatan intermolekuler melalui gugus amino bebas. Imunositokimia melibatkan inkubasi sel dengan antibodi. Antibodi akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik di dalam sel. Antibodi yang tidak berikatan dipisahkan dengan pencucian, sedangkan antibodi yang berikatan dideteksi secara langsung dengan antibodi primer berlabel, maupun secara tidak langsung dengan antibodi sekunder berlabel enzim atau fluoresen (CCRC, 2009).

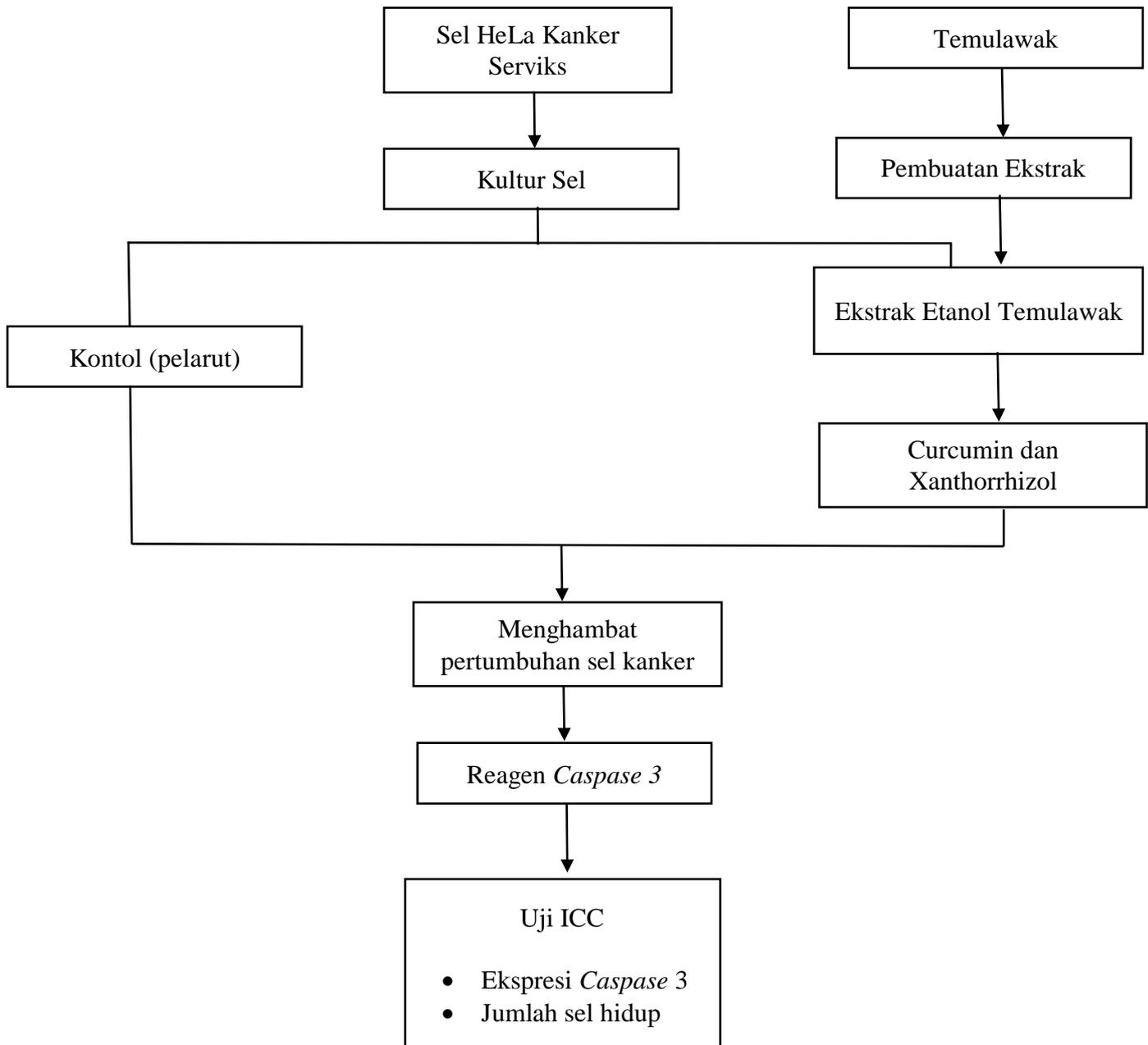
B. Kerangka Teori

Gambar 2.3 Bagan Kerangka Teori



C. Kerangka Konsep

Gambar 2.4 Bagan Kerangka Konsep



D. Hipotesis

H0 : Ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) tidak memiliki pengaruh pada peningkatan ekspresi gen *Caspase 3* yang menginduksi apoptosis pada sel HeLa.

H1 : Ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) memiliki pengaruh pada peningkatan ekspresi gen *Caspase 3* yang menginduksi apoptosis pada sel HeLa.