BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. *Citrus reticulata*

Citrus reticulata yang biasa dikenal dengan jeruk Mandarin berasal dari daerah Melayu dan sekarang tersebar luas di seluruh wilayah tropis dan subtropis di dunia. Menurut Backer dan Bakhhuizen (1965), klasifikasi *Citrus reticulata* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Rosidae

Ordo : Sapindales

Famili : Rutaceae

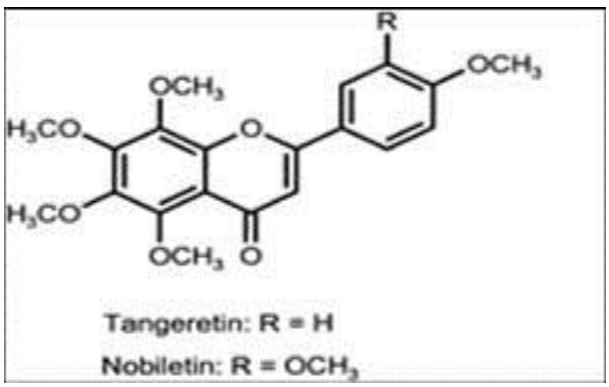
Genus : Citrus

Species : *Citrus reticulata*

Gambar 1. *Citrus reticulata* (Mulyanto, 2016)

Citrus reticulata atau yang dikenal dengan tanaman jeruk Mandarin tumbuh optimal pada temperature 25-30°C dengan kelembaban optimum 70-80% (Rahardi, 1999). Tanaman jeruk mandarin merupakan pohon dengan tinggi 2-8 meter. Rantingnya tidak berduri. Tangkai daunnya bersayap sangat sempit dengan panjang 0,5-1,5 cm. Helaian daun berbentuk bulat telur memanjang, elliptis, atau berbentuk lanset dengan ujung tumpul, melekuk ke dalam sedikit, tepinya bergerigi beringgit sangat lemah dengan panjang 3,5-8 cm. Bunganya berdiameter 1,5-2,5 cm dengan mahkota putih. Buahnya berbentuk bola tertekan dengan panjang 5-8 cm, tebal kulit buah 0,2-0,3 cm, dan daging buah berwarna oranye. (Van Steenis, 1975).

Kulit jeruk Mandarin mengandung *polyhydroxyl flavonoid* (PHFs) seperti hesperidin, neohesperidin, dan naringin, dan hampir satu-satunya sumber *polymethoxyflavones* (PMFs) dengan kandungan tinggi, terutama diwakili oleh nobiletin, tangeretin, sinesetin, 3,5,6,7,8,3’,4’-heptamethoxyflavone, dan 3,5,6,7,3’,4’-hexamethoxyflavone. (Rawson *et al.*, 2014).



Gambar 2. Struktur Tangeritin dan Nobiletin (Murakami *et al*., 2000)

Penelitian dalam aktivitas antikanker dari flavonoid kulit jeruk Mandarin telah banyak difokuskan pada percobaan in vitro untuk menjelaskan mekanisme tindakan seperti efek antiproliferasi, penghambatan enzim, dan antikanker. Dari PMF, tangeretin memainkan peran penghambatan penting dalam proliferasi sel kanker tahap metastasis dengan menghambat adhesi sel dan invasi. Tangeretin dapat menginduksi peristiwa *cell-cycle G1 arrest* serta memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil dibandingkan beberapa flavonoid lain pada sel kanker kolon (COLO 205) dengan adanya peningkatan ekspresi CDK inhibitor seperti p27 dan p21. (Pan *et al*., 2002). Penelitian in vitro menunjukkan bahwa senyawa tangeretin dalam kulit jeruk Mandarin mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7, sel kanker payudara MDA-MB-435, dan sel kanker kolon HT-29 yang diamati selama 4 hari perlakuan dan fase *G1 arrest* setelah pengamatan pada jam ke-24, 48, dan 72. (Morley *et al*., 2007). Senyawa PMF lain dalam kulit jeruk mandarin, nobiletin ditemukan secara efektif menghambat aktivitas sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker paru NCI-H460 (Zhang *et al*., 2004). Selain itu, ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin menunjukkan aktivitas sitotoksik moderat dengan IC_{50} = 77,8 μg/mL terhadap sel HL-60.

2. Kanker

2.1. Tinjauan Umum Kanker

Kanker merupakan istilah untuk menggambarkan neoplasia yang ganas. Neoplasia adalah akumulasi abnormal dari sel akibat ketidakseimbangan antara proliferasi (pembelahan) sel dan atrisi sel.

Proliferasi sel terjadi melalui mitosis sel dan atrisi sel merupakan kematian sel terprogram melalui proses normal yang disebut apoptosis. Proliferasi (pembelahan) yang tidak terkontrol menyebabkan terbentuknya massa atau tumor (Nussbaum *et.al*, 2001). Tumor terbagi menjadi dua yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Dalam pertumbuhannya, tumor jinak tidak menyebar ke organ tubuh lain, tumor jinak hanya akan berkembang dan membesar di organ lokal tempat sel-sel abnormal muncul (Rachman *et al.*, 2016). Tumor jinak dapat berkembang menjadi tumor ganas atau disebut kanker saat pertumbuhannya tidak terkendali dan tumor tumbuh langsung di jaringan sekitarnya (invasi), menyebar ke tempat yang lebih jauh (metastasis) atau keduanya. (Nussbaum *et al*., 2001).

Sebagian besar kanker disebabkan oleh faktor ekstrinsik, yaitu karsinogen kimia (asap rokok yang dapat menyebabkan kanker paru), radiasi (radiasi sinar X yang dapat menyebabkan kerusakan gen sehingga menyebabkan kanker ataupun paparan berulang sinar ultraviolet yang dapat menyebabkan kanker kulit), virus (*Human Papiloma Virus* yang berhubungan erat dengan risiko kanker serviks), dan kekurangan zat tertentu dalam makanan (diet makanan tinggi lemak menyumbang 35-50% untuk timbulnya kanker saluran pencernaan). Selain itu, kanker dapat disebabkan oleh faktor intrinsik seperti ketidakseimbangan hormonal (hormon estrogen yang tinggi meningkatkan risiko terkena kanker payudara), genetik, dan imunitas

tubuh (imunitas tubuh yang menurun menyebabkan seseorang rentan terhadap kanker) (Elna, 2001).

Ada lima kelompok besar yang digunakan untuk mengklasifikasikan kanker yaitu karsinoma, sarkoma, limfoma, adenoma, dan leukemia (National Cancer Institute, 2009).

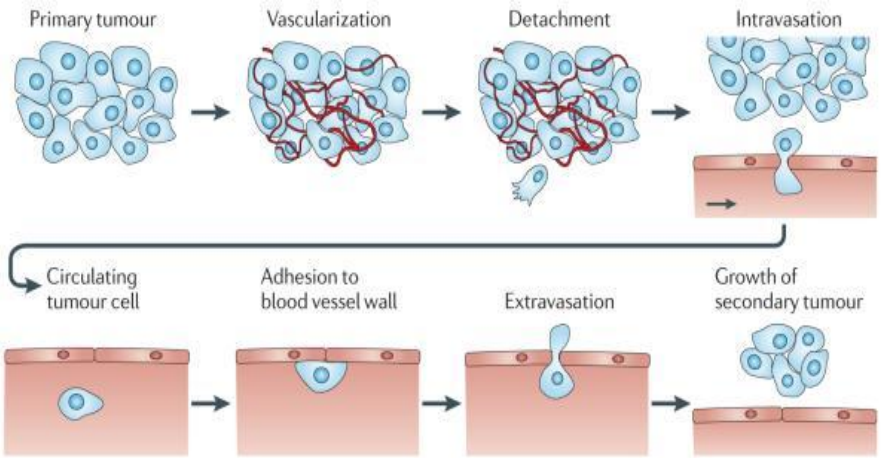
a. Karsinoma merupakan kanker yang berasal dari kulit atau jaringan yang menutupi organ internal.
b. Sarkoma merupakan kanker yang berasal dari tulang, tulang rawan, lemak, otot, pembuluh darah, atau jaringan ikat.
c. Limfoma merupakan kanker yang berasal dari kelenjar getah bening dan jaringan sistem kekebalan tubuh.
d. Adenoma merupakan kanker yang berasal dari kelenjar tiroid, kelenjar pituitary, kelenjar adrenal dan jaringan kelenjar lainnya.
e. Leukemia merupakan kanker yang berasal dari jaringan pembentuk darah seperti sumsum tulang dan sering menumpuk dalam aliran darah.

Sel kanker mempunyai enam karakter perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang menyebabkan pertumbuhannya bersifat malignant (ganas) yaitu (1) mempunyai kemampuan untuk mempertahankan sinyal proliferatif, (2) menghindari sinyal penekan pertumbuhan, (3) mampu melawan program apoptosis, (4) mampu mengadakan replikasi yang tidak terbatas, (5) mempu menginduksi angiogenesis sehingga

dapat bertahan hidup, dan (6) mampu melakukan invasi dan metastasis. (Hanahan dan Weinberg, 2011).

2.2 Metastasis sel kanker

Proses metastasis kanker terdiri dari serangkaian tahap yang semuanya harus dilalui sel kanker untuk menimbulkan tumor metastatik (tumor maligna) atau yang disebut kanker itu sendiri. Sebagai tumor primer yang telah melakukan proliferasi, sel tumor perlu untuk mengembangkan suplai darah sendiri untuk mendukung kebutuhan metaboliknya, yang biasa disebut dengan proses angiogenesis. Pembuluh darah baru ini menyebabkan sel tumor dapat meninggalkan tempat asalnya atau bermigrasi ke organ lain. Sel tumor dapat bermigrasi melalui peredaran darah tubuh, yang dikenal sebagai intravasasi. Sel tumor juga dapat masuk ke sistem peredaran darah secara tidak langsung melalui sistem limfatik. Sel-sel perlu bertahan dalam sirkulasi sampai mereka ditangkap oleh organ baru. Disini, sel tumor menempel pada dinding pembuluh darah untuk kemudian berekstravasasi dari sirkulasi dan membentuk koloni untuk menjadi tumor sekunder. Proses inilah yang disebut metastasis. Setelah berada di organ baru, sel harus memulai dan mempertahankan pertumbuhan dengan membentuk mikrometastasis (Chambers, 2002).

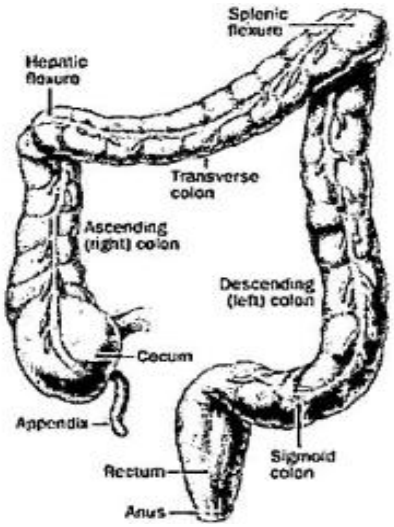


Gambar 3. Metastasis Sel Kanker (Wirtz, 2011)

3. Kanker Kolon

3.1.Definisi

Kanker kolon merupakan tumor malignant yang muncul pada jaringan epithelial dari colon. Sekitar 96% dari semua kanker kolon adalah adenokarsinoma yang berasal dari lapisan epitel kelenjar di mukosa kolon. Adenokarsinoma kolon berevolusi dari neoplasma jinak yang dikenal sebagai polip adenoma yang kemudian berkembang menjadi adenokarsinoma (Taylor, 2007) Sedangkan sisanya, 2% karsinoma lainnya (termasuk karsinoid tumor), 0,4% epidermoid karsinoma, dan 0,08% berupa sarkoma (Stewart, 2006).



Gambar 4. Anatomi Kolon (Monash University, 2010)

Secara klinis, lokasi kanker kolon dibagi menjadi kolon kanan dan kiri, dimana kolon kanan mencakup caecum, kolon asenden, dan 2/3 kanan kolon transversum, sedangkan kolon kiri mencakup 1/3 kolon transversum, kolon asenden, dan kolon sigmoid (Zhizhong, 2008). Kanker yang menyerang kolon ascenden (kanan) lebih cenderung menimbulkan perdarahan yang tersembunyi dan berulang karena massa karsinoma yang timbul lebih sering berbentuk polipoid atau bunga kubis. Sehingga, menimbulkan gejala klinis yang tidak khas, pasien lebih sering mengeluhkan perubahan kebiasaan BAB, badan lemah, dan lesu yang disertai penurunan berat badan pada saat dilakukan pemeriksaan laboratorium akan didapatkan gambaran anemia defisiensi besi yang terjadi karena perdarahan kronik masa tumor pada saluran cerna, namun pada feses tidak tampak keluar darah (Robbins, 2007). Sedangkan kanker pada kolon transversum, desenden dan sigmoid (kiri) menimbulkan gejala buang air besar berdarah, dan

susah buang air besar. Keluhan ini sebagian besar akibat dari penyumbatan kolon yang disebabkan ukuran lumen lebih kecil dan cenderung melingkar sehingga sering timbul gangguan obstruksi (Price, 2006).

Secara umum, perkembangan kanker kolon merupakan interaksi anatara faktor genetik yaitu riwayat kanker kolon atau polip adenoma pada keluarga dan faktor lingkungan. Faktor lingkungan atau yang dapat dimodifikasi meliputi inaktivitas, obesitas, konsumsi tinggi daging merah, merokok, dan konsumsi alkohol (Kemenkes RI, 2017)

3.2.Patofisiologi

Karsinoma kolorektal merupakan penyakit yang berasal dari sel epitel kolon atau rektum akibat faktor herediter atau mutasi somatic yang memicu pembelahan sel tanpa batas. Sekitar 96% dari semua kanker kolon adalah adenokarsinoma yang berasal dari lapisan epitel kelenjar di mukosa kolon. Namun, kejadian karsinoma tanpa bukti adenometues prekursor mencadangkan bahwa ada beberapa lesi displastik dapat menjadi malignant tanpa melalui tahapan polipoid. Ada dua jalur patogenetik yang menjelaskan perkembangan kanker kolorektal, yaitu adanya mutasi yang berulang, namun yang membedakannya adalah gen yang terlibat dan mekanisme akumulasi mutasi.

Alur pertama adalah APC (*antigen presenting cell*)/ β-catherin, diakibatkan oleh instabilitas kromosom yang menyebabkan akumulasi

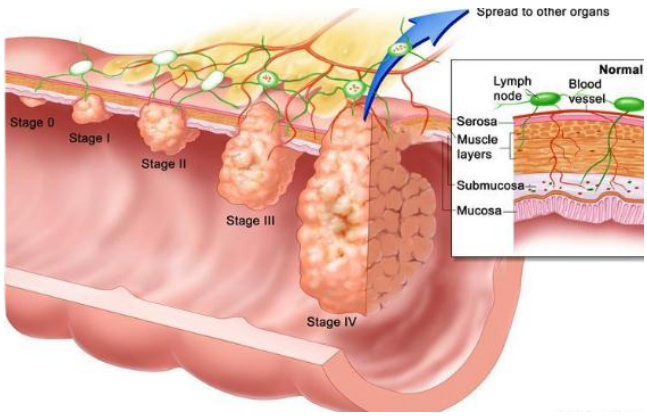
mutasi dalam onkogen dan gen tumor suppressor. Pada alur ini, mukosa kolon normal berkembang menjadi adenoma dan kemudian menjadi karsinoma. Alur kedua adalah alur instabilitas mikrosatelite. Karakteristik dari alur ini adalah lesi genetic pada DNA *mismatch repair genes*. Seperti pada alur pertama, pada alur kedua ini ada mutasi, tetapi pada alur kedua melibatkan gen yang berbeda, tidak ada *adenoma-carcinoma sekuens* atau tahapan indentifikasi morfologi. Defek DNA repair yang disebabkan oleh inktivasi DNA *mismatch repair genes* menginisiasi permulaan kanker kolorektal. Mutasi inheritan dalam gen yang terlibat dalam DNA repair bertanggungjawab untuk familial sindrom (Kumar *et al.*, 2010).

Jalur patogenetik diatas menjelaskan awal terbentuknya kanker kolorektal. Setelah sel kanker terbentuk di kolon atau rektum, sel melakukan proliferasi pada epitel dinding kolon atau rektum. Kemudian, sel kanker yang terdapat pada dinding usus mengembangkan suplai darah sendiri atau disebut sebagai angiogenesis untuk memasok kebutuhan metaboliknya. Pembuluh darah baru ini menyebabkan sel kanker dapat bermigrasi ke organ lain melalui peredaran darah tubuh (intravasasi). Sel kanker juga dapat masuk ke sistem peredaran darah secara tidak langsung melalui sistem limfatik. Sel tumor yang menempel pada dinding pembuluh darah kemudian berekstravasasi dari sirkulasi dan membentuk koloni ke organ sekitar kolon seperti hati, paru-paru, atau menyebar melalui

rongga perut ke darah lain seperti ovarium. Proses inilah yang disebut metastasis (American Cancer Society, 2014).

Secara garis besar, perkembangan kanker kolorektal dapat dilihat melalui beberapa stadium. Ada lima kelompok stadium kanker kolorektal (National Cancer Institute, 2006)

a. Stadium 0 (Carcinoma in situ) : kanker hanya pada lapisan terdalam dari kolon atau rektum
b. Stadium I : sel kanker tumbuh pada dinding kolon atau rektum, namun belum menembus keluar dinding
c. Stadium II : sel kanker telah menyebar ke dalam lapisan otot dari kolon atau rektum, tetapi sel kanker di sekitarnya belum menyebar ke kelenjar getah bening
d. Stadium III : kanker telah menyebar ke satu atau lebih kelenjar getah bening di daerah tersebut, tetapi tidak ke bagian tubuh yang lain
e. Stadium IV : kanker telah menyebar di bagian lain dari tubuh seperti hati, paru-paru, atau tulang.



Gambar 5. Stadium Kanker

3.3.Migrasi Sel

Migrasi sel merupakan salah satu tahapan dari metastasis sel. Sel kanker bermigrasi atau mengalir melalui lingkungan mikro yang berbeda seperti stroma, pembuluh darah endothelium, sistem vaskular dan jaringan di organ sekunder. Kemampuan sel untuk berhasil melakukan migrasi tergantung pada interaksi fisik dan kekuatan mekanik antara sel kanker dan lingkungan mikro seperti interaksi sel dan matriks ekstraseluler merupakan kunci sel dalam bermigrasi dari tumor primer ke pembuluh darah di dekatnya (Wirtz, 2011).

Sel kanker dapat bermigrasi melalui serat matriks ekstraseluler (ECM) ke pembuluh darah dari tumor primer menggunakan lamellipodia. Lamellipodia merupakan tonjolan membrane seperti lembaran datar yang terbentuk di bagian terdepan sel yang bermigrasi. Lamellipodia memiliki peran utama dalam migrasi sel yang bekerja dengan cara menempel pada substrat dan mengasilkan kekuatan untuk menarik sel tubuh ke depan (Yamaguchi *et al.*, 2007).

Terdapat banyak mekanisme yang berperan dalam migrasi sel dan metastasis. Salah satu jalur signaling yang juga mempengaruhi pembentukan lamellopodia dan berperan dalam migrasi sel adalah jalur phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Alaoui, 2005). *Epidhermal growth factor* (EGF) mengaktivasi jalur phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang kemudian akan mengaktifkan ekspresi protein-protein yang berperan dalam proses migrasi sel. Protein tersebut akan memicu

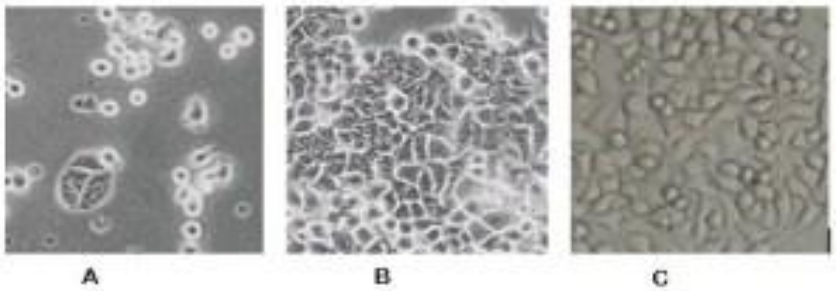
polimerisasi aktin serta menginisiasi terbentuknya lamellipodia sehingga proses migrasi sel dapat terjadi (Yamaguchi *et al*., 2007).

4. Sel WiDr

Sel WiDr merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun dan merupakan turunan dari sel kanker kolon HT-29 (Chen *et al.,1987*). Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk menyelesaikan satu daur sel. Sel WiDr memiliki karakteristik dapat mengekspresikan siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu proliferasi sel WiDR (Palozza *et al*., 2005). Sel WiDr mengalami mutasi P53 GA pada posisi 273 sehingga terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin (Noguchi *et al.*, 1979). Namun, p21 pada sel WiDr yang masih normal memungkinkan terjadinya penghentian daur sel (Liu *et al*., 2006). Apoptosis sel WiDr terjadi melalui jalur *independent* p53, diantaranya melalui aktivasi p73 (Levrero *et al*., 2000).

Sel WiDr yang dikembangbiakkan dalam medium kultur terlihat berbentuk lebih bulat jika dibandingkan dengan sel normal dan menunjukkan peningkatan rasio nukleus terhadap sitoplasma yang ditandai dengan peningkatan ukuran inti, membesarnya nukleoli, dan distribusi kromatin yang tidak teratur. Kelebihan sel WiDr yaitu dapat membentuk tumor secara histologikal dengan efisiensi mendekati 100% pada empat host yang berbeda selama 1-4 tahun inokulasi, memiliki waktu daur sel yang singkat sekitar 15 jam, mudah dikultur, dan memiliki mekanisme

resistensi terhadap agen kemoterapi yang cukup tinggi (Palozza *et al*., 2005).



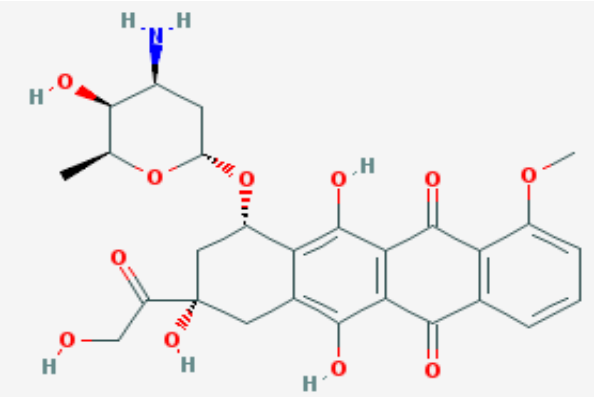
Gambar 6. Sel WiDr

WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas rendah terhadap perlakuan dengan 5-florouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolite. Transfeksi WiDr dengan P53 normal tidak menyebabkan peningkatan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti *et al*., 2007). Resistensi sel WiDr terhadap 5-FU salah satunya diperantarai terjadinya peningkatan ekspresi enzim timidilat sintase yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond *et al*., 2003).

5. Doxorubicin

Doxorubicin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang banyak digunakan untuk terapi kanker seperti leukemia, kanker payudara, kanker ovarium, dan kanker tulang (Childs *et al*., 2002). Senyawa ini diisolasi dari Streptomyces peucetius var caesius pada tahun 1960-an dan digunakan secara luas (Minotti *et al*., 2004). Penggunaan doxorubicin jangka panjang dapat menyebabkan *cardiomyopathy* dan *congestive heart*

failure, hal ini menyebabkan penggunaan secara klinis sangat terbatas (Han *et al*., 2008)



Gambar 7. Stuktur kimia doxorubicin

Doxorubicin sebagai antibiotic antrasiklin memiliki mekanisme sitotoksik melalui empat mekanisme yaitu

(1) Prenghambatan topoisomerase II

(2) Interkalasi DNA sehingga menghambat sintesis DNA dan RNA

(3) Pengikatan membran sel yang menyebabkan aliran dan transport ion

(4) Pembentukan radikal bebas semiquinon dan radikal bebas oksigen melalui proses yang tergantung besi dan proses reduktif yang diperantarai enzim. Mekanisme radikal bebas ini bertanggungjawab pada kardiotoksisitas akibat antibiotic antrasiklin (Bruton *et al*., 2005).

6. Uji Sitotoksik menggunakan MTT Assay

Uji Sitotoksisitas merupakan evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Evaluasi ini digunakan pada uji obat, kosmetik,

zat tambahan makanan, pestisida, dan obat antikanker. Dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen kemoterapi kanker, uji sitotoksisitas merupakan evaluasi klinik yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplastik (CRCC, 2013).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai *Inhibitor Concentration* (IC_{50}). Nilai IC_{50} merupakan besarnya konsentrasi suatu senyawa yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebanyak 50% sehingga dapat menunjukkan potensi ketoksikan senyawa tersebut (Doyle dan Griffths, 2000).

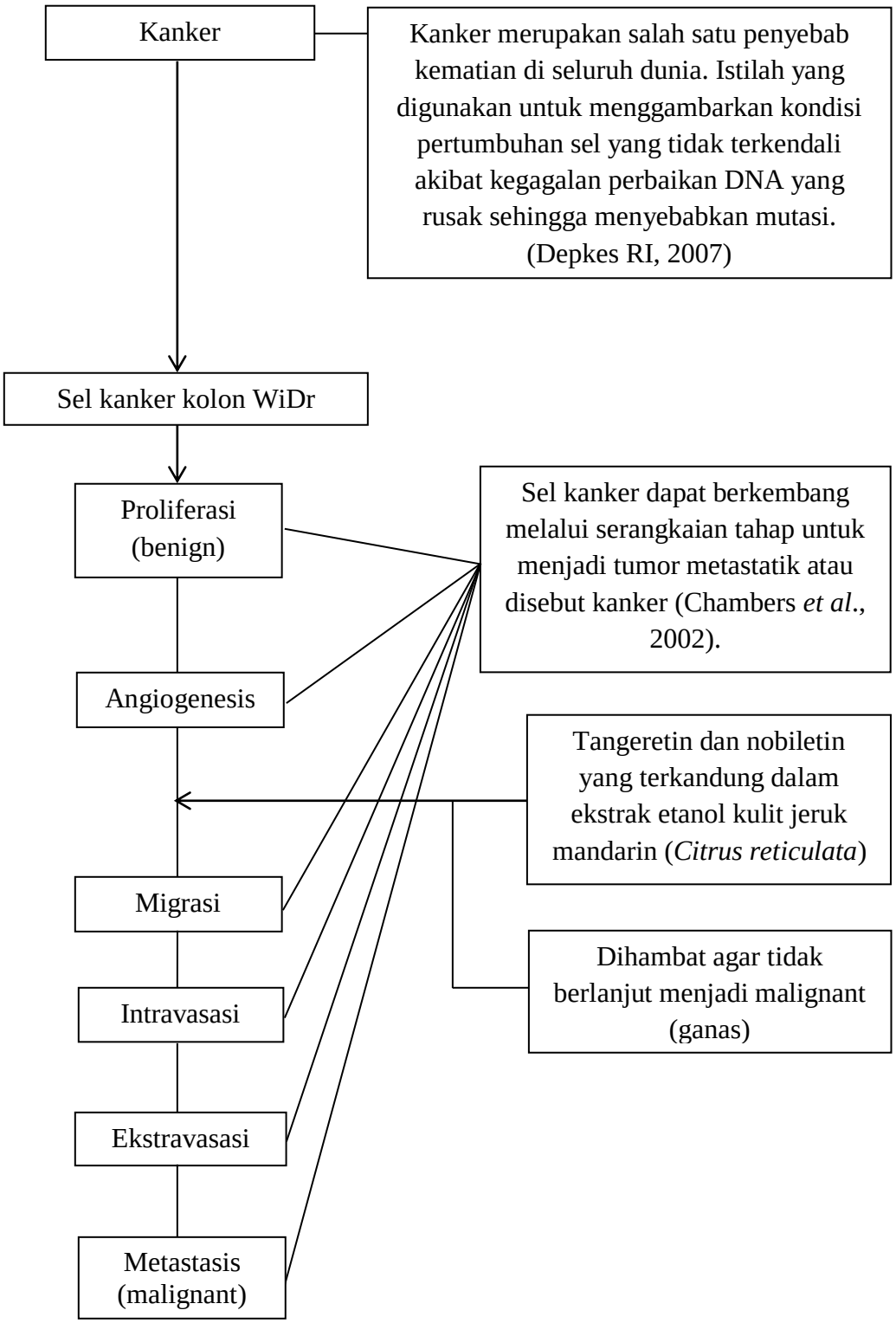
Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT. Prinsip metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) menjadi kristal formazan warna ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase akibat aktivitas metabolik seluler oleh NAD(P)H-dependent enzim seluler oksireduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria (Berridge *et al.*, 2005). Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CRCC, 2013).

7. Uji Migrasi

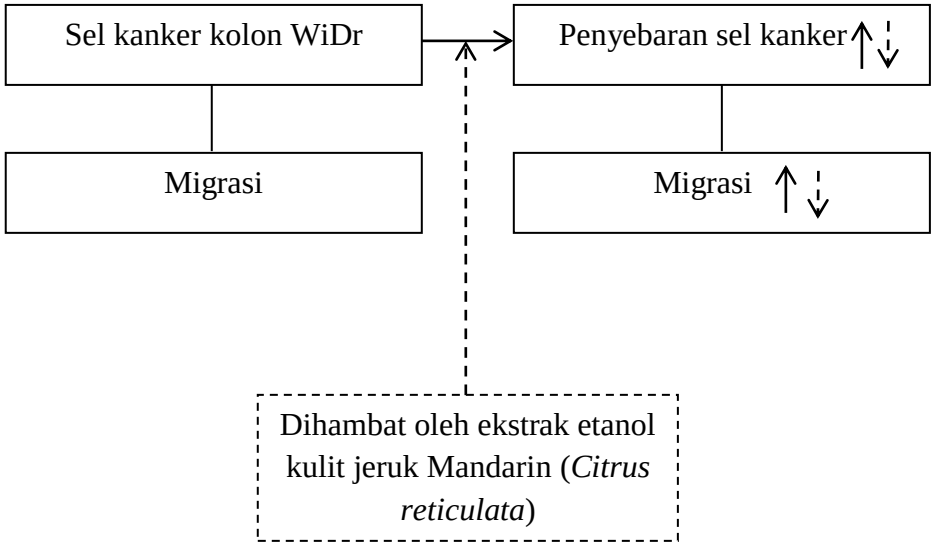
Migrasi sel merupakan fenomena kompleks yang berhubungan dengan banyak proses seluler. Salah satu metode untuk mempelajari kemampuan migrasi sel secara in vitro adalah wound healing (CRCC, 2015). *Scratch wound healing assay* adalah sebuah metode yang mudah, murah, dan dikembangkan dengan baik untuk mengukur migrasi sel secara in vitro. Prinsip *scratch wound healing assay* diadopsi dari proses migrasi sel selama penyembuhan luka secara in vivo (Liang *et al*., 2007).

Langkah dasar dalam metode ini dimulai dengan membuat goresan pada sel monolayer menggunakan yellow tip steril, kemudian mengamati sel dengan mengambil gambar secara berkala selama proses migrasi sel berlangsung dari jam ke-0 dan pada interval waktu yang ditentukan hingga sel yang bermigrasi menutup goresan. Langkah selanjutnya adalah membandingkan gambar untuk mengukur tingkat migrasi sel. Pengukuran ini memungkinkan untuk mengetahui efek suatu senyawa dengan konsentrasi yang berbeda terhadap kemampuan interaksi sel-sel selama melakukan migrasi sel (CRCC, 2015).

B. Kerangka Teori



C. Kerangka Konsep



Keterangan :
------ Diterapi
——— Tidak diterapi

D. Hipotesis

H0 : Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro.

H1 : Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro.