

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia dan menduduki peringkat kedua setelah penyakit kardiovaskular. Kanker payudara adalah jenis kanker yang paling sering didiagnosis dan menjadi penyebab kematian kelima secara global, serta merupakan penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita di seluruh dunia. Pada tahun 2020, sekitar 6,9% dari total kematian akibat kanker secara global disebabkan oleh kanker payudara (Arzanova, 2022)

Data Globocan tahun 2020 menunjukkan bahwa di Indonesia terdapat 68.858 kasus baru kanker payudara, yang merupakan 16,6% dari total 396.914 kasus kanker baru. Jumlah kematian akibat kanker payudara di Indonesia pada tahun tersebut mencapai lebih dari 22.000 jiwa. (Lumban, 2023)

Metode pengobatan kanker dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, antara lain pembedahan, radioterapi, imunoterapi, kemoterapi dan terapi target. Di antara metode tersebut, kemoterapi sering dianggap efektif untuk mengobati beberapa jenis kanker. Namun, kemoterapi memiliki keterbatasan, seperti munculnya efek samping yang serius, perkembangan resistensi obat, serta daya efikasi yang belum optimal. Karena potensi efek samping dari kemoterapi dan radioterapi yang dapat mengganggu kualitas hidup pasien, pengembangan metode pengobatan alternatif yang aman dan efektif dengan efek samping minimal atau tanpa efek samping sangat diperlukan untuk pencegahan dan terapi kanker (Usman, 2022)

Akhir-akhir ini, banyak penelitian yang difokuskan pada pengembangan obat kanker baru berbasis sumber alami dari tumbuhan. Obat-obatan yang berasal dari bahan alami umumnya lebih dapat ditoleransi oleh tubuh dan memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah terhadap sel sehat dibandingkan dengan obat sintesis. Beberapa senyawa fitofarmaka yang ditemukan pada tanaman obat, seperti saponin, lectin, lignan, taxane, dan cyanogenic glycoside, memiliki aktivitas sitotoksik yang selektif. Senyawa-senyawa ini bersifat sitotoksik terhadap sel kanker, namun relatif tidak toksik terhadap sel normal. Beberapa

obat kemoterapi yang populer, seperti paclitaxel dan camptothecin, juga berasal dari senyawa yang diisolasi dari tanaman (Nasution, 2021)

Bauhinia purpurea merupakan salah satu tanaman dari genus *Bauhinia* yang banyak dimanfaatkan secara tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Beberapa penelitian melaporkan bahwa tanaman ini memiliki berbagai aktivitas farmakologis, antara lain sebagai antioksidan, hepatoprotektif, hipoglikemik, serta memiliki efek antiproliferasi (Shajiselvin, 2011)

Tanaman *Bauhinia purpurea* mengandung berbagai senyawa fitokimia, antara lain glikosida, saponin, senyawa fenolik, tanin, flavonoid, flavon glikosida, asam lemak, tokoferol, karbohidrat, alkaloid, sterol, steroid, flavanon, lutein, dan beta-sitosterol (Arora, 2020)

Pettit et al. telah berhasil mengisolasi empat senyawa penghambat pertumbuhan sel kanker dari *Bauhinia purpurea* yang dinamakan Bauhiniastatins 1-4 yang secara kimia diidentifikasi sebagai dibenzo [b,f]oxepin (2a, 3-5).. Dari keempat senyawa tersebut, Bauhiniastatin 1 menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan yang signifikan terhadap sel kanker P388. (Pettit, 2006)

Penelitian yang dilakukan oleh Nafees et al mengenai efek kemopreventif *Bauhinia purpurea* terhadap hepatokarsinogenesis pada tikus Wistar yang diinduksi oleh Diethylnitrosamine dan 2-Acetylaminofluorene menunjukkan bahwa *Bauhinia purpurea* mampu menginduksi apoptosis melalui penurunan regulasi Bcl-2 serta peningkatan regulasi Bax dan caspase-3. Efek kemopreventif ini diduga disebabkan oleh konstituen aktif tanaman tersebut, yaitu kaempferol, quercetin, dan isorhamnetin. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa *Bauhinia purpurea* memiliki efek protektif terhadap kanker hati yang diinduksi secara kimiawi melalui aktivitas antioksidan, antiproliferasi, dan induksi apoptosis (Nafees, 2013)

Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas sitotoksik tanaman *Bauhinia purpurea* terhadap sel kanker payudara MCF-7. Kumar menyebutkan bahwa ekstrak kulit batang *Bauhinia purpurea* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang signifikan terhadap sel kanker payudara. (Kumar, 2011). Penelitian oleh Zakaria et al terhadap ekstrak air, kloroform, dan metanol dari daun *Bauhinia purpurea* melaporkan efek antiproliferasi yang bersifat sitotoksik terhadap berbagai garis sel kanker, termasuk sel kanker payudara MCF-7, namun tidak menunjukkan sitotoksitas terhadap sel

normal 3T3. Kandungan saponin pada daun *Bauhinia purpurea* diketahui dapat menyebabkan nekrosis pada sel tumor, menghambat siklus pembelahan sel tumor, serta menginduksi apoptosis. Selain itu, flavonoid yang terkandung dapat menginduksi apoptosis melalui jalur *calcium* (Ca^{2+})-*dependent*, penghambatan *cyclin dependent kinase*, modulasi penghentian siklus sel pada fase G1/S, serta penurunan ekspresi protein produk gen anti-apoptosis. (Zakaria, 2011)

Karsinogenesis merupakan proses multistep dan multifaktorial yang meliputi tahapan inisiasi, promosi, dan progresi, di mana terjadi perubahan genetik yang kompleks. Proses ini melibatkan aktivasi onkogen, inaktivasi gen penekan tumor, gangguan pada gen pengatur apoptosis, serta kerusakan pada gen yang berperan dalam perbaikan DNA. Proto-onkogen adalah gen yang mengkode protein penting untuk regulasi pertumbuhan, diferensiasi, dan perkembangan sel. Mutasi atau amplifikasi proto-onkogen dapat mengubahnya menjadi onkogen, dan mendorong proliferasi sel abnormal. (Rahmawati, 2021).

Salah satu proto-onkogen yang berperan dalam kanker adalah *CCND1*, yang mengkode protein Cyclin D1. Cyclin D1 berperan sebagai regulator siklus sel dengan mengontrol transisi dari fase G1 ke fase S melalui pembentukan kompleks dengan CDK4/CDK6 yang memfosforilasi protein retinoblastoma (Rb), sehingga sel terdorong untuk memasuki fase S dan melanjutkan pembelahan. Amplifikasi atau overekspresi *CCND1* menyebabkan peningkatan kadar Cyclin D1, yang berkontribusi pada tumorigenesis dan progresi berbagai kanker, termasuk kanker payudara, kanker usus besar, limfoma, melanoma, dan kanker prostat. Ekspresi Cyclin D1 yang berlebihan dilaporkan pada 35–80% kasus kanker payudara melalui pemeriksaan imunohistokimia (Fu, 2004; Siraj, 2021).

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang terjadi melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik, yang dimediasi oleh aktivasi caspase efektor. Selain itu, apoptosis juga dapat dipicu oleh granzim dan perforin yang terkandung dalam butiran sitotoksik limfosit T atau sel *Natural Killer* (NK). Proses apoptosis memegang peranan penting dalam karsinogenesis di mana sel-sel yang mengalami mutasi biasanya akan dihancurkan melalui mekanisme ini untuk mencegah proliferasi sel abnormal. Gangguan pada gen atau protein yang terlibat dalam jalur apoptosis dapat menyebabkan pertumbuhan sel kanker yang tidak terkendali serta resistensi terhadap kemoterapi. (Abaza, 2022)

Caspase (*cysteine aspartate-specific proteases*) merupakan komponen utama dalam proses apoptosis. Caspase yang terlibat dalam apoptosis dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu caspase inisiator (caspase-8, -9, dan -10) serta caspase efektor (caspase-2, -3, -6, dan -7). Caspase-3 yang dikode oleh gen *CASP3* memegang peran sentral dalam jalur apoptosis baik melalui *death receptor* yang dimediasi caspase-8 maupun jalur mitokondria yang dimediasi caspase-9. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa aktivasi caspase-3 sangat diperlukan untuk induksi apoptosis, khususnya dalam respons terhadap pemberian obat kemoterapi. (Fristiody, 2020). Penurunan regulasi caspase-3 telah dikaitkan dengan perkembangan kanker payudara. Beberapa studi juga menemukan bahwa tingkat ekspresi caspase-3 berkorelasi dengan prognosis pasien kanker payudara. (Yang, 2018)

Sel MCF-7 merupakan lini sel kanker payudara yang secara molekuler diklasifikasikan sebagai tipe luminal A, dengan karakteristik positif untuk reseptor estrogen (ER) dan progesteron (PR), serta negatif untuk HER2. Lini sel ini banyak digunakan sebagai model *in vitro* dalam penelitian kanker payudara karena stabilitasnya dan sensitivitasnya terhadap pengaruh hormonal. Karakteristik tersebut menjadikan MCF-7 ideal untuk mengevaluasi efek antikanker dari berbagai senyawa, baik yang berasal dari bahan alami maupun sintesis, termasuk senyawa yang bekerja melalui mekanisme penghambatan proliferasi dan induksi apoptosis. (Gandhi, 2009)

Sel kanker payudara MCF-7 diketahui mengalami gangguan ekspresi gen *CASP3* akibat adanya delesi fragmen genetik sepanjang 47 pasangan basa (bp) yang menyebabkan terbentuknya transkrip mRNA yang tidak lengkap dan menghambat pembentukan protein caspase-3 yang fungsional (Wang, 2016; Tian, 2023).

Pemilihan pelarut dengan polaritas yang berbeda sangat berpengaruh terhadap ekstraksi senyawa bioaktif dari bahan alam. Lee et al. menjelaskan bahwa pelarut polar, semi-polar, dan non-polar mengekstraksi kelompok senyawa yang berbeda, sehingga menghasilkan variasi komposisi kimia pada ekstrak yang dihasilkan. Perbedaan komposisi ini selanjutnya menentukan potensi aktivitas biologis ekstrak, oleh karena itu, pemilihan fraksi pelarut yang tepat sangat penting dalam memaksimalkan efektivitas terapeutik ekstrak bahan alam (Lee, 2024).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi antikanker ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diperoleh melalui tiga jenis pelarut dengan tingkat polaritas berbeda, yaitu etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menganalisis pengaruh masing-masing ekstrak terhadap ekspresi gen *CCND1* sebagai penanda proliferasi sel dan *CASP3* sebagai penanda apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 secara in vitro.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, penelitian ini mengangkat beberapa permasalahan yang menjadi fokus kajian, yaitu:

1. Bagaimana efek sitotoksik ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi dengan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi dengan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap ekspresi gen *CCND1* sebagai indikator proliferasi pada sel kanker payudara MCF-7?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi dengan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap ekspresi gen *CASP3* sebagai indikator apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek antikanker ekstrak daun *Bauhinia purpurea* serta pengaruhnya terhadap proliferasi dan apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7, yaitu dengan tujuan khusus sebagai berikut :

- 1 Menilai efek sitotoksik ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7.
- 2 Menganalisis pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap ekspresi gen *CCND1* sebagai indikator proliferasi pada sel kanker payudara MCF-7.
- 3 Menganalisis pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana terhadap ekspresi gen *CASP3* sebagai indikator apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7

1.4 Kegunaan Penelitian

1.4.1 Manfaat untuk Pengembangan Ilmu

Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi ilmiah dan memperluas literatur di bidang farmasi dan biomedis, khususnya mengenai farmakodinamik tanaman obat herbal *Bauhinia purpurea*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperdalam pemahaman tentang pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* terhadap proliferasi dan apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 secara in vitro, sekaligus menjadi referensi bagi penelitian lanjutan dalam pengembangan obat herbal antikanker.

1.4.2 Manfaat Aplikasi

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar ilmiah untuk pemanfaatan *Bauhinia purpurea* sebagai obat herbal antikanker, khususnya dalam konteks terapi kanker payudara, sekaligus menjadi landasan bagi pengembangan formulasi fitofarmaka atau uji pra-klinis lanjutan yang menekankan efektivitas dan keamanan ekstrak daun *Bauhinia purpurea*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Bunga Kupu-Kupu (*Bauhinia purpurea*)

Bauhinia purpurea adalah pohon yang tumbuh di daerah tropis dengan ketinggian yang dapat mencapai 17 kaki. Daunnya memiliki dua lobus, lebar, bulat dengan panjang 10 sampai 20 cm. Bunganya berwarna merah muda dengan lima kelopak. Buahnya berupa polong sepanjang 30 cm, berisi 12 hingga 16 biji dan muncul di bulan Desember. *Bauhinia purpurea* berasal dari Cina dan ditemukan di seluruh India. Tanaman ini merupakan tanaman asli dari Asia Selatan, Asia Tenggara dan tersebar luas di seluruh dunia dan banyak ditemukan di Himalaya, dan jalur barat India. Seluruh tanaman atau bagian tanaman memiliki kegunaan obat yang luas. Bunganya bersifat pencahar, campuran kuncup bunga dan bunga digoreng dengan mentega murni bermanfaat untuk mengobati disentri. Kulit batang berguna untuk mengatasi gangguan pernapasan dan masalah menstruasi. Akar digunakan dalam pengobatan hemoroid, penyakit tiroid dan sebagai karminatif. Tanaman ini bermanfaat dalam pengobatan berbagai penyakit seperti diare, disentri, amuba disentri, pembengkakan karena inflamasi, perdarahan, pilek dan batuk serta gangguan yang berhubungan dengan saluran kemih dan berbagai penyakit kulit. (Arora, 2020 ; Marimuthu, 2014)

Klasifikasi taksonomi *Bauhinia purpurea* adalah sebagai berikut (Arora, 2020):

<i>Domain</i>	- <i>Eukaryotes</i>
<i>Kingdom</i>	- <i>Plantae</i>
<i>Phylum</i>	- <i>Spermatophyta</i>
<i>Subphylum</i>	- <i>Angiospermae</i>
<i>Class</i>	- <i>Dicotyledonae</i>
<i>Order</i>	- <i>Fabales</i>
<i>Family</i>	- <i>Fabaceae</i>
<i>Subfamily</i>	- <i>Caesalpinioideae</i>
<i>Genus</i>	- <i>Bauhinia</i>
<i>Species</i>	- <i>Bauhinia purpurea</i>



Gambar 1. Tanaman bunga kupu kupu (*Bauhinia purpurea*)
(Sumber : Marimuthu & Dhanalakshmi, 2014)

2.2 Kandungan Fitokimia *Bauhinia purpurea*

Tumbuhan *Bauhinia* mengandung senyawa flavonoid, saponin, kumarin, tanin, triterpenoid, sianoglikosida, steroid, kuinon dan fenolik. Senyawa flavonoid merupakan metabolit sekunder yang paling banyak dijumpai pada tanaman *Bauhinia purpurea* dan memiliki aktivitas antikanker. (Pahwa, 2010) Penelitian Kumar dari kulit batang *Bauhinia purpurea* melaporkan terdapatnya senyawa β -sitosterol, isokuersitin dan astragalin yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara (Kumar, 2011)

Pada tabel 1 terdapat kandungan fitofarmaka dari daun *Bauhinia purpurea* pada berbagai metoda ekstraksi.

Tabel 1. Kandungan fitofarmaka daun *Bauhinia purpurea* pada berbagai ekstrak

S. No.	Plant constituents	Petroleum ether extract	Chloroform extract	Ethyl acetate extract	Acetone extract	Methanol extract	Aqueous extract
1	Alkaloids	-	-	-	-	-	-
2	Carbohydrates	-	-	-	-	-	-
3	Glycosides	-	+	-	-	+	-
4	Saponins	-	-	-	-	+	+
5	Phenolic compds & Tannins	+	-	-	+	+	+
6	Flavonoids	+	+	+	+	+	+
7	Phytosterols	+	+	+	+	+	+

Pahwa, dkk; 2010. Land. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22557422/>

Telah dilaporkan empat senyawa yang diisolasi dari bagian akar, batang, polong dan daun *Bauhinia purpurea* yang disebut bauhinia statin 1 hingga 4, yang secara kimia diidentifikasi sebagai dibenzo [b,f]oxepin (2a, 3-5). Keempat senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan terhadap sel kanker manusia. Bauhinia statin 1-(2a) menunjukkan potensi untuk menghambat proliferasi sel kanker leukemia P388 (Arora, 2020 ; Pettit, 2006)

Penelitian yang dilakukan oleh Nafees tentang efek kemopreventif *Bauhinia purpurea* terhadap hepatokarsinogenesis yang diinduksi secara kimia melalui perbaikan kerusakan oksidatif, proliferasi sel dan induksi apoptosis pada tikus wistar menyebutkan bahwa *Bauhinia purpurea* dapat menginduksi apoptosis dengan menurunkan regulasi Bcl-2, meningkatkan regulasi Bax dan caspase-3. Efek ini diduga disebabkan oleh kandungan kaempferol, quercetin, dan isorhamnetin pada tanaman *Bauhinia purpurea* (Nafees, 2013).

Senyawa flavonoid yang terkandung pada *Bauhinia purpurea* dilaporkan dapat menyebabkan penghambatan terhadap *cyclin dependent kinase* (CDK), modulasi *cell cycle arrest* pada fase G1/S, menginduksi Ca^{2+} - *dependent apoptosis* dan penurunan regulasi protein anti-apoptosis. Saponin memiliki aktivitas antiproliferasi dengan menyebabkan gangguan siklus sel melalui penghambatan *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) atau melalui penurunan jumlah sel dalam fase G0/G1. Saponin juga dapat menginduksi apoptosis melalui permeabilisasi membran mitokondria. (Zakaria, 2011)

Studi yang dilakukan oleh Salatino et al melaporkan bahwa daun *Bauhinia purpurea* mengandung beberapa jenis flavonoid seperti quercetin, rutin, quercitrin, apigenin, dan apigenin-7-O-glukosida. (Salatino, 1999) Quercetin dan apigenin diketahui dapat menghambat jalur pensinyalan MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase / Extracellular signal-regulated kinase*) (Shukla, 2008). Apigenin juga dilaporkan dapat menyebabkan penghambatan jalur Wnt/ β -catenin. (Turktemir, 2011) Jalur pensinyalan MAPK/ERK dan Wnt/ β -catenin berperan penting dalam proliferasi sel, termasuk dalam regulasi ekspresi gen *CCND1*. Aktivasi MAPK/ERK merangsang transduksi sinyal dari permukaan sel ke inti, yang mengarah pada transkripsi gen-gen yang mengatur siklus sel, seperti *CCND1*. Jalur Wnt/ β -catenin memungkinkan akumulasi β -catenin di sitoplasma dan translokasinya ke inti dan kemudian berinteraksi dengan faktor transkripsi TCF/LEF untuk menginduksi ekspresi *CCND1*. Kedua jalur ini mendukung progresi siklus sel dan pertumbuhan sel kanker.

Menurut Zughaibi et al. (2021), flavonoid memiliki potensi kemopreventif dengan menargetkan jalur PI3K/Akt/mTOR, yang merupakan jalur pensinyalan *pro-survival* penting dalam regulasi pertumbuhan, siklus sel dan apoptosis. Flavonoid mampu menghambat fosforilasi Akt sehingga menurunkan proliferasi dan meningkatkan apoptosis melalui aktivasi caspase-3. Studi oleh Zhang et al (2018) mendukung temuan ini dengan menunjukkan bahwa flavonoid menghambat jalur PI3/AKT/mTOR dan mendorong aktivasi caspase-3 pada sel kanker payudara.

2.3 Mekanisme Karsinogenesis

Setelah sel terpapar karsinogen terdapat periode waktu yang lama untuk sel tersebut mengalami transformasi keganasan. Tahapan awal yang terjadi adalah inisiasi, kemudian sel-sel ini mengalami perkembangan selanjutnya yaitu tahapan promosi, dimana sel yang telah mengalami mutasi pada tahapan inisiasi tersebut memperbanyak diri dan mengalami ekspansi klonal menjadi massa sel pre-neoplastik atau neoplastik jinak. Pada tahapan akhirnya, sel tersebut harus mengalami mutasi tambahan dalam perkembangannya (progresi) dari pre-neoplasia atau neoplasma jinak menjadi neoplasma ganas. (Malarkey, 2013)

Karsinogenesis dibagi menjadi tiga tahapan yaitu : Inisiasi, promosi, dan progresi. Pada tahapan inisiasi terjadi perubahan atau mutasi gen baik secara spontan atau disebabkan oleh paparan agen karsinogenik. Perubahan genetik yang terjadi pada tahapan ini mengakibatkan disregulasi pada jalur pensinyalan biokimia yang terkait dengan proliferasi, kelangsungan hidup dan diferensiasi sel yang dapat memberikan potensi untuk menyebabkan terjadinya proliferasi sel secara abnormal. Promosi adalah tahapan terjadinya proliferasi dan mutasi tambahan pada sel yang telah mengalami tahapan inisiasi. Progresi ditandai oleh perubahan neoplastik lebih lanjut yang ditandai dengan peningkatan laju pertumbuhan sel tumor, kemampuan invasi, dan metastasis dari sel tumor (Lopez, 2021)

Karsinogenesis diinisiasi oleh agen biologis, fisik atau kimia yang menyebabkan kerusakan / mutasi pada DNA sel yang permanen dan tidak bersifat letal. Perubahan pada DNA yang ireversibel ini pada akhirnya dapat menyebabkan pembentukan tumor (neoplasma) apabila tidak terjadi perbaikan terhadap kerusakan DNA pada sel yang mengalami mutasi. Sel yang mengalami proses inisiasi secara fenotip adalah normal, tetapi secara genotip berbeda dari sel

normal. Karsinogen yang bekerja langsung (*direct carcinogen*) bersifat reaktif elektrofilik dan berinteraksi langsung dengan DNA untuk menghasilkan kerusakan, sedangkan karsinogen yang bekerja tidak langsung (*indirect carcinogen*) harus mengalami aktivasi metabolik terlebih dahulu didalam sel untuk menghasilkan zat reaktif yang bersifat genotoksik. Pada umumnya sel yang mengalami kerusakan DNA memiliki kemampuan untuk memperbaiki DNA, tetapi apabila sel membelah sebelum terjadinya perbaikan terhadap kerusakan DNA tersebut, maka kerusakan DNA tersebut tidak dapat diperbaiki dan akan diwariskan kepada sel turunannya. Fase inisiasi relatif singkat dan dapat terjadi dalam beberapa jam atau hari. Sebaliknya fase promosi merupakan proses yang panjang dan memerlukan waktu berbulan-bulan atau bertahun-tahun (Malarkey, 2013 ; Baptista, 2024)

Karsinogenesis melibatkan perubahan pada gen yang meliputi : Aktivasi onkogen, inaktivasi gen penekan tumor, inaktivasi gen pro-apoptosis, dan kerusakan pada gen perbaikan DNA. Onkogen adalah gen struktural yang mengkode produk protein yang mampu mengubah fenotipe sel. Onkogen pertama kali diidentifikasi sebagai transformasi gen oleh retrovirus. Onkogen tidak diperlukan untuk siklus hidup virus tetapi menimbulkan perubahan pada sel yang terinfeksi oleh virus dan menghasilkan kanker pada sel inangnya. Virus terintegrasi ke dalam genom sel tubuh dan setelah penataan ulang sebagian dari gen seluler normal berasimilasi ke dalam genom virus (transduksi). Onkogen yang ditransduksi dalam genom virus disebut sebagai onkogen virus (v-onc) dan gen yang homolog didalam genom sel tubuh disebut onkogen seluler (c-onc) atau proto-onkogen. Transduksi retrovirus menyebabkan mutasi titik, delesi atau fusi gen kedalam urutan pengkodean proto-onkogen yang ditransduksi dan hal ini menyebabkan perubahan fungsi dan ekspresi dari protein produk gen tersebut. Retrovirus juga dapat mempengaruhi ekspresi proto-onkogen melalui mutagenesis insersional, dimana DNA retrovirus berintegrasi ke dalam DNA sel tubuh yang berdekatan atau didalam urutan pengkodean proto-onkogen. Promotor gen retrovirus kemudian mendorong transkripsi dari proto-onkogen. Mutasi pada proto-onkogen juga dapat terjadi tanpa keterlibatan retrovirus seperti misalnya terdapat mutasi titik, translokasi atau amplifikasi gen yang menyebabkan produk protein yang abnormal. (Malarkey, 2013 ; Lopez, 2021)

Produk protein onkogen umumnya mewakili komponen jalur transduksi sinyal, termasuk faktor pertumbuhan, reseptor faktor pertumbuhan, GTPase, protein kinase, atau faktor transkripsi, sebagai contoh adalah produk protein (Myc)

dari proto-onkogen c-myc yang terlibat dalam regulasi proses seluler dasar seperti : Kontrol pertumbuhan, metabolisme, proliferasi dan diferensiasi sel serta apoptosis. Mutasi pada proto-onkogen c-myc yang menyebabkan peningkatan kadar protein Myc terjadi pada sekitar 30% dari semua kanker pada manusia (Harti, 2013)

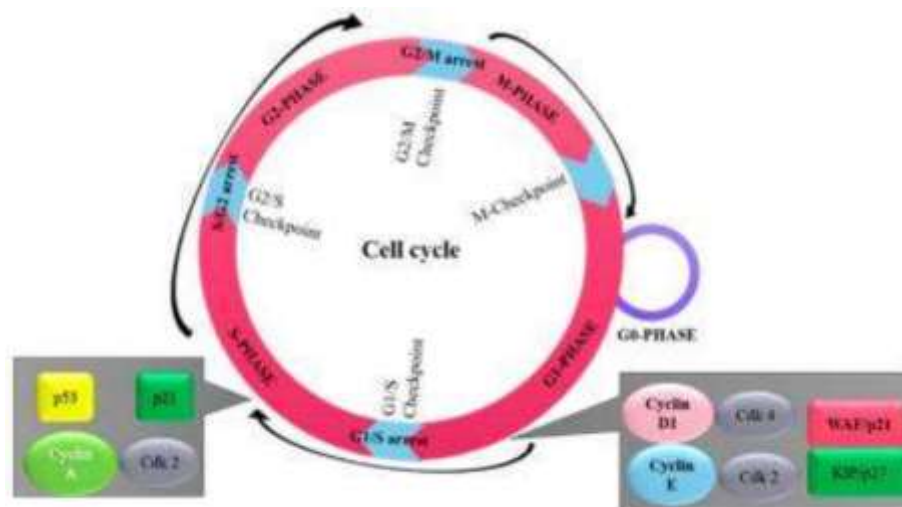
Gen penekan tumor adalah gen pengatur yang berfungsi untuk membatasi atau menekan pertumbuhan sel normal dengan menghambat aktivitas gen struktural yang bertanggung jawab untuk pertumbuhan sehingga memiliki fungsi yang berlawanan dengan onkogen. Pada proses karsinogenesis proto-onkogen harus diaktifkan dan gen penekan tumor harus dinon-aktifkan. Aktivasi proto-onkogen umumnya akibat mutasi somatik. Bentuk mutan dari gen penekan tumor mungkin terdapat di dalam sel germinal dan bersifat hereditas. Umumnya diperlukan mutasi pada kedua alel dari gen penekan tumor agar gen ini menjadi tidak aktif. Inaktivasi gen penekan tumor p53 sering ditemukan pada banyak jenis kanker. Inaktivasi atau hilangnya gen penekan tumor bersama dengan aktivasi onkogen memegang peranan penting dalam proses karsinogenesis. (Lopez, 2021 ; Harti, 2013)

Siklus sel terdiri dari fase S (sintesis DNA) dan fase M (mitosis) yang dipisahkan oleh fase G1 dan G2. Kemajuan siklus sel dikontrol secara ketat oleh sekelompok protein kinase heterodimerik yang terdiri dari cyclin sebagai elemen pengatur dan subunit katalitik nya yaitu : Cyclin dependent kinase (Cdk). Terdapat lima kelas utama cyclin (disebut A – E). Cyclin C, D1–3 dan E mencapai puncak sintesis dan aktivitasnya selama fase G1 dan mengatur peralihan dari fase G1 ke fase S. Cyclin A dan B1–2 mencapai puncaknya pada fase G2 dan S serta dianggap sebagai pengatur transisi ke mitosis. (Malarkey, 2013 ; Kashyap, 2021)

Check point pada siklus sel memungkinkan terjadinya perbaikan DNA sebelum perkembangan lebih lanjut dari siklus pembelahan. Komponen kendali pada *check point* “mengerem” siklus tersebut apabila terdapat kerusakan pada materi genetik dari sel yang akan membelah diri. Terdapat dua *check point* yang penting pada siklus sel, yaitu sebelum terjadinya replikasi DNA (G1) dan sebelum segregasi kromosom (G2). Hilangnya *check point* pada fase G1 memicu ketidakstabilan genomik dan menyebabkan sel menjadi rentan terhadap pertumbuhan yang tidak terkontrol dan meningkatkan kemungkinan perubahan kearah fenotipe neoplastik. Kontrol pada *check point* G1 tergantung pada Cyclin D1 (terdegradasi pada transisi G1/S) dan Cyclin E (terdegradasi dalam fase

pertengahan S). Ekspresi berlebih dari salah satu Cyclin D1 atau Cyclin E menyebabkan peningkatan laju siklus sel dari fase G1 ke S dan penurunan waktu fase G1. Cyclin D1 diekspresikan secara berlebihan pada banyak jenis kanker, termasuk kanker payudara, karsinoma paru jenis bukan sel kecil (NSCLC), sarkoma, melanoma, limfoma sel B, dan karsinoma sel skuamosa kepala leher. Kompleks cyclin D1/Cdk4 memfosforilasi pRB yaitu produk protein dari gen retinoblastoma. Setelah fosforilasi oleh cyclin/Cdk kompleks, pRB berdisosiasi dari protein faktor transkripsi E2F dan menyebabkan terjadinya transkripsi gen yang mendorong entri kedalam tahapan siklus pembelahan selanjutnya yaitu fase S. (Malarkey, 2013 ; Lopez 2021 ; Harti, 2013; Kashyap, 2021)

Gen penekan tumor p53 diperlukan untuk penghentian siklus sel pada fase G1 apabila terjadi kerusakan pada DNA. Mutasi gen p53 adalah yang paling sering terjadi pada banyak jenis kanker. Salah satu fungsi utama p53 adalah memastikan apabila terdapat kerusakan gen pada sel yang akan membelah diri maka akan terjadi *cell cycle arrest* di fase G1 dan selanjutnya terjadi upaya untuk memperbaiki kerusakan pada DNA melalui gen perbaikan DNA sebelum sel melanjutkan untuk membelah diri. Apabila terjadi kerusakan DNA, p53 mengaktifkan transkripsi dari beberapa gen hilir. Salah satu gen tersebut mengkode protein p21 yang akan menyebabkan inaktivasi Cyclin E-Cdk2, Cyclin A-Cdk2, dan kompleks Cyclin D1-, D2-, dan D3-Cdk4 sehingga menghambat fosforilasi pRB dan mencegahnya perkembangan siklus sel melewati fase G1. Protein p53 juga mengaktifkan gen BAX yang terlibat dalam regulasi apoptosis (Malarkey, 2013 ; Kashyap, 2021)



Gambar 2.. Siklus pembelahan sel (Sumber : Kashyap, 2021)

2.4 Mutasi Gen Pada Kanker Payudara

1. Gen *BRCA*

Sekitar 20% wanita dengan riwayat keluarga kanker payudara mengalami mutasi pada gen *BRCA* (*breast cancer susceptibility genes*). Gen *BRCA1* terletak pada kromosom 17 sedangkan gen *BRCA2* terletak pada kromosom 13. Mutasi pada gen ini diwariskan secara autosom dominan. Protein *BRCA* berperan dalam perbaikan kerusakan DNA sehingga merupakan salah satu gen yang menghambat tumorigenesis. Gen perbaikan DNA yang berinteraksi dengan *BRCA* antara lain : *ATM*, *PALB2*, *BRIP1* dan *CHEK2*. Mutasi berupa delesi atau duplikasi / atau hilangnya fungsi gen *BRCA* menyebabkan gangguan perbaikan DNA yang meningkatkan risiko sebanyak lima sampai enam kali lipat untuk perkembangan kanker payudara. (Feng, 2018)

2. Onkogen *PIK3CA*

Phosphatidylinositol 3-kinase (*PI3K*) dibagi dalam tiga kelas berdasarkan struktur dan spesifisitas substratnya dan kelas I *PI3K* selanjutnya dikategorikan menjadi kelas IA dan IB. Kelas IA *PI3K* adalah yang paling erat kaitannya dengan kanker. Pensinyalan *PI3K* dimulai oleh faktor pertumbuhan yang diaktifkan reseptor tirosin kinase atau protein *RAS* melalui interaksi langsung dengan *p85* atau melalui protein adaptor sehingga *PI3K* direkrut ke membran. *PI3K* yang teraktivasi kemudian mengaktifkan mediator hilir *AKT* dan *mTOR*, yang mengarah pada peningkatan pertumbuhan melalui perkembangan siklus sel dan translasi serta anti-apoptosis. Jalur *PI3K/AKT/mTOR* adalah jalur onkogenik yang sering terganggu pada kanker payudara. Amplifikasi gen *PIK3CA* telah dilaporkan pada berbagai keganasan, termasuk sekitar 10% kasus kanker payudara. Mutasi onkogen *PIK3CA* menyebabkan dediferensiasi sel progenitor payudara luminal atau basal. Mutasi yang meningkatkan regulasi jalur *PI3K* pada kanker payudara dengan ER positif dapat menyebabkan resistensi terhadap terapi hormonal. Mutasi *PIK3CA* lebih banyak ditemukan pada kanker payudara tipe luminal (HR-positif/HER2-negatif). (Feng, 2018)

3. *ATM* (*ataxia-telangiectasia*)

Mutasi pada gen *ataxia-telangiectasia* (*ATM*) terjadi pada sekitar 0,78% pasien kanker payudara. Gen *ATM* mengekspresikan protein yang berperan dalam perbaikan DNA dan regulasi siklus sel. Carrier heterozigot memiliki risiko 2–5x lebih besar untuk terkena kanker payudara dan kebanyakan adalah subtype dengan reseptor hormon atau *HER2* yang positif. Sel kanker payudara dengan

mutasi ATM memiliki kemungkinan metastasis ke kelenjar getah bening yang lebih tinggi, perilaku biologis tumor yang lebih agresif dan prognosis lebih buruk (Alves, 2023)

4. *TP53*

Mutasi pada gen TP53 telah ditemukan pada banyak jenis keganasan termasuk kanker payudara. Sindrom Li-Fraumeni adalah kelainan autosomal dominan yang disebabkan oleh mutasi gen TP53 pada germline cells dan menyebabkan peningkatan risiko berbagai keganasan, seperti : Kanker payudara, osteosarkoma, leukemia, tumor otak dan karsinoma pada adrenal. Risiko terkena kanker payudara sebelum usia 45 tahun adalah 18 kali lipat lebih tinggi pada wanita dibandingkan pada umumnya. P53 terlibat dalam penghentian siklus sel, pertumbuhan, diferensiasi, penuaan, apoptosis dan perbaikan DNA. Degradasi P53 berhubungan dengan pembentukan, progresi dan metastasis tumor. (Feng, 2018 ; Alves, 2023)

5. *PTEN*

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) adalah salah satu gen penekan tumor yang mengalami mutasi pada berbagai kanker termasuk kanker payudara. Gen ini memiliki peran dalam perkembangan siklus sel, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel. Delesi atau mutasi pada PTEN meningkatkan proliferasi, kemampuan invasi dan metastasis dari sel tumor. Pada sel kanker payudara yang bermetastasis kadar PTEN lebih rendah dibandingkan pada sel kanker primernya. Hilangnya fungsi PTEN menyebabkan aktivasi onkogenik PI3K/Akt yang berlebihan. Inaktivasi PTEN terjadi karena mutasi somatik. Hilangnya PTEN berdampak negatif pada sensitivitas terhadap inhibitor CDK4/6 yang memulai pensinyalan kaskade melalui hiperaktivasi cyclin/CDK. (Alves, 2023)

6. *PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2)*

PALB2 termasuk dalam kelompok gen penekan tumor yang berinteraksi dengan BRCA1 dan BRCA2. Mutasi yang terjadi pada salah satu alel dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker payudara. Mutasi yang menyebabkan hilangnya fungsi PALB2 merupakan penyebab penting kanker payudara yang bersifat hereditas. Risiko kumulatif untuk menderita kanker payudara pada pasien dengan mutasi PALB2 hingga usia 70 tahun mencapai 35% dengan angka ketahanan hidup 10 tahun lebih rendah dibandingkan dengan pasien tanpa mutasi PALB. Mutasi pada gen ini sering didapatkan pada kanker payudara yang bermetastasis. Pasien kanker payudara dengan mutasi pada gen PALB2 lebih banyak menunjukkan

fenotip triple-negatif, tahapan penyakit yang lanjut, ekspresi Ki-67 yang lebih tinggi dan survival pasien yang lebih rendah. (Feng, 2018 ; Alves, 2023)

7. *CHEK2 (Checkpoint kinase 2)*

Checkpoint kinase 2 (CHEK2) adalah serin/treonin kinase yang diaktifkan apabila terdapat kerusakan pada DNA dan memiliki peranan penting dalam penghentian siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis. Hilangnya fungsi kinase akibat mutasi berhubungan dengan beberapa jenis kanker terutama kanker payudara. (Feng, 2018)

8. *CDH1 (CaDherin Human 1)*

Gen CDH1 mengkode molekul adhesi E-cadherin yang berperan dalam menghambat metastasis sel tumor. Berkurangnya fungsi dan ekspresi E-cadherin menyebabkan gangguan atau hilangnya adhesi antar sel sehingga memungkinkan sel kanker untuk menginvasi membran basal dan jaringan ikat stroma sekitarnya. Pasien dengan hipermetilasi promotor CDH1 mengalami peningkatan resiko sebesar 5,83 kali lipat untuk menderita kanker payudara. Hipermetilasi CDH1 umumnya terjadi pada subtipe kanker payudara dengan HER2- dan ER-negatif tanpa adanya hubungan dengan PR (Alves, 2023)

9. *BARD1 (BRCA1-associated ring domain1)*

BARD1 adalah protein pengikat BRCA yang berperan dalam perbaikan kerusakan DNA. Sel kanker payudara yang resisten terhadap tamoxifen dan kemoterapi dengan cisplatin atau adriamycin mengekspresikan lebih banyak BARD1 dan BRCA1. Ekspresi BARD1 dan BRCA1 yang tinggi dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk terutama pada pasien kanker payudara yang menerima radioterapi sehingga terdapat potensi penggunaan inhibitor PI3K untuk mengatasi kemoresistensi dan radioresistensi pada pasien kanker payudara ER-positif. (Alves, 2023)

10. *BRIP1*

Gen BRIP1 (*breast cancer 1 interacting helicase 1*) diperlukan untuk perbaikan DNA yang mengalami kerusakan untuk menjaga stabilitas genom. Mutasi atau overekspresi gen BRIP1 berhubungan dengan tumorigenesis kanker payudara. Gen BRIP1 berada di lengan panjang kromosom 17 dan mengkode protein RecQ DEAH yang membantu memperbaiki DNA rusak melalui interaksi dengan BRCA1. Oleh karena itu, jika BRIP1 tidak lengkap atau hilang maka tidak akan terjadi interaksi dengan BRCA1 sehingga tidak terjadi perbaikan DNA yang rusak. (Alves, 2023)

2.5 Jalur Pensinyalan pada Karsinogenesis Kanker Payudara

Berikut adalah jalur pensinyalan utama yang berhubungan dengan karsinogenesis kanker payudara (Feng, 2018 ; Ortega, 2020 ; Ordaz, 2023) :

1. Pensinyalan ER dan kanker payudara dengan ER-Positif.

Reseptor estrogen (ER) terdiri dari reseptor estrogen membran dan reseptor estrogen inti (ERa, ERb). ERa dan ERb merupakan faktor transkripsional yang mengaktifkan atau menekan ekspresi gen target pada pengikatan ligan. Dalam proses regulasi transkripsi yang dimediasi ER, banyak ko-aktivator dan ko-represor termasuk BRCA1 yang memainkan peranan penting. BRCA1 bertindak sebagai penekan tumor dengan menghambat pensinyalan ERa. ERa memainkan peran utama dalam patogenesis kanker payudara dimana sekitar 75% kanker payudara mempunyai ekspresi positif dari jenis reseptor hormonal spesifik ini. Salah satu mekanisme ERa dalam mendorong pertumbuhan sel kanker payudara adalah melalui interaksinya dengan Cyclin D1, yang merupakan aktivator penting dari cyclin-dependent kinases (CDKs) 4 dan 6 yang mendorong siklus sel dari fase G1 ke S.

2. Pensinyalan HER2 dan kanker payudara HER2-Positif.

Human epidermal growth factor receptors (EGFRs, atau HERs) 1 sampai 4 merupakan keluarga reseptor tirosin kinase yang diekspresikan di jaringan normal dan banyak sel kanker. HER2 adalah reseptor tirosin kinase yang terdiri dari domain pengikat ligan ekstraseluler, domain transmembran, dan domain intraseluler. Pengikatan ligan dan dimerisasi yang terjadi selanjutnya akan menyebabkan fosforilasi residu tirosin dalam domain intraseluler HER2 yang mengaktifkan beberapa jalur sinyal hilir seperti jalur mitogen activated protein kinase (MAPK) dan fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3-kinase (PI3K). Jalur pensinyalan ini sangat berhubungan dengan tumorigenesis kanker payudara. Amplifikasi sinyal HER2 menghasilkan ekspresi berlebih protein HER2 yang berhubungan dengan proliferasi dan perkembangan sel kanker.

3. Jalur pensinyalan kanonik Wnt/ β -catenin.

Protein Wnt adalah keluarga protein yang berperan penting dalam berbagai proses perkembangan termasuk induksi embrio, pembentukan polaritas sel dan menjaga homeostasis jaringan dewasa. Pensinyalan Wnt/ β -catenin dimulai dengan pengikatan protein Wnt pada ko-reseptor Frizzled dan protein terkait reseptor lipoprotein densitas rendah 5 dan 6 (LRP5/6). Interaksi Wnt dengan reseptornya

menyebabkan perekrutan protein Axin dan Dishevelled ke membran sel, yang kemudian menginduksi penghambatan *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β), suatu regulator negatif pada jalur pensinyalan Wnt. Penghambatan GSK-3 β menyebabkan akumulasi β -catenin di sitoplasma untuk selanjutnya bertranslokasi ke dalam nukleus dan bertindak sebagai aktivator ko-transkripsi bersama dengan protein pengikat CREB (CBP), faktor transkripsi sel T/faktor peningkat limfoid (TCF/LEF) dan onkogen, seperti MYC, CCND1 serta gen target lainnya. Pada kanker payudara, pensinyalan Wnt kemungkinan besar diaktifkan melalui mekanisme autokrin. Meskipun mutasi pada pensinyalan Wnt tidak umum terjadi pada kanker payudara, sekitar 50% kasus kanker payudara menunjukkan tingkat β -catenin yang tinggi. Regulator positif dari sinyal Wnt Dvl diperkuat pada 50% kanker payudara. Sebaliknya, penghambat Wnt yang disekresikan, *Frizzled-related protein 1* (FRP1) dilaporkan hilang pada 78% kanker payudara dan dikaitkan dengan prognosis yang buruk. Penurunan regulasi penghambat Wnt Dickkopf 1 (DKK1) menunjukkan pentingnya regulasi Wnt dalam proses metastasis pada kanker payudara.

4. Jalur pensinyalan lain pada kanker payudara

Terdapat jalur lain yang juga memiliki peran penting dalam perkembangan kanker payudara. Berikut ini adalah beberapa jalur pensinyalan yang penting :

a. *Cyclin dependent kinase* (CDK).

Perkembangan siklus sel diatur oleh Cyclin, CDK, dan CDK inhibitor (CDKI). Sel kanker mengaktifkan siklus sel untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Ekspresi berlebih dari Cyclin D1, Cyclin E dan penurunan ekspresi CDKI p27Kip1 terdapat pada banyak sel kanker payudara. Amplifikasi Cyclin D1 terlihat pada hampir 60% kanker payudara. Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi dan overekspresi HER2 dikaitkan dengan penurunan *recurrence free survival* pada pasien dan respon yang buruk terhadap pemberian tamoxifen. Obat yang merupakan inhibitor CDK4/6 yaitu palbociclib dapat menghambat perkembangan siklus sel pada *cell line* kanker payudara dengan ER-positif dan amplifikasi HER2.

b. Pensinyalan notch.

Pensinyalan Notch terdiri dari lima ligan Notch yaitu *Delta-like* (Dll) 1, 3, 4, dan Jagged (JAG) 1, 2 yang merupakan protein transmembran tunggal. Ada empat reseptor Notch yang bekerja melalui jalur pensinyalan dasar yang sama dan diaktifkan dengan mengikat ligan Notch pada satu sel ke domain ekstraseluler reseptor Notch. Kompleks ligand-reseptor Notch kemudian mengalami beberapa

pembelahan proteolitik utama, menghasilkan domain ekstraseluler Notch dan domain intraseluler Notch (NICD). NICD bertindak sebagai faktor transkripsional dan mengatur target gen hilir. Dilaporkan bahwa ekspresi tingkat tinggi Jag1 (Jag1High) dan/atau Notch1 (Notch1High) pada tumor berkorelasi dengan hasil yang buruk dan merupakan indikator prognostik independen pada kanker payudara. Pada sel kanker payudara, Notch 3 dan Jag1 memiliki peran dalam pembaruan untuk sel punca kanker dan ketahanan sel kanker terhadap kondisi hipoksia. Selain itu, pensinyalan Notch juga berinteraksi dengan jalur pensinyalan HER2 yang berhubungan dengan sub tipe kanker payudara yang lebih agresif.

c. Sinyal *Sonic Hedgehog* (SHH):

Pensinyalan SHH memiliki peran penting dalam mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel selama perkembangan embrional. Gangguan pada target transkripsional hilirnya, yaitu *Patched homolog-1* (PTCH-1) atau *glioma-associated oncogene-2* (GLI-2) mengakibatkan gangguan morfogenesis pada duktus kelenjar payudara. Gangguan pada gen-gen ini terjadi pada kanker payudara dan menunjukkan adanya peran jalur SHH dalam tumorigenesis kanker payudara. Aktivasi SHH berkontribusi terhadap rekurensi tumor dan dapat berfungsi sebagai prediktor untuk rekurensi pasca operasi. Ekspresi yang tinggi dari PTCH-1 dan GLI-1 pada kanker payudara berkorelasi dengan kemampuan invasi sel tumor.

d. *Breast tumor kinase* (BRK)

Terdapat ekspresi berlebih dari BRK pada lebih dari 60% kasus kanker payudara. Berkurangnya ekspresi BRK dalam sel kanker payudara mengganggu pensinyalan yang diatur oleh EGFR. Aktivasi BRK dengan mengekspresikan BRK-Y447F meningkatkan proliferasi dan migrasi sel kanker payudara.

e. Jalur PI3K/AKT/mTOR

Mutasi onkogenik PI3K yaitu PIK3CA pada kanker payudara dapat menyebabkan dediferensiasi dari sel progenitor payudara luminal dan basal. Hiperaktivasi AKT dan hiperaktivasi mTOR hilir mendasari resistensi terhadap terapi endokrin. Penghambatan mTOR dapat mengembalikan sensitivitas terhadap pemberian anti-estrogen.

f. NF- κ B

NF- κ B adalah keluarga faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen terkait dengan respon imun, peradangan, survival dan diferensiasi sel yang terdiri dari lima jenis protein : RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p105/p50), dan NF κ B2

(p100/p52). Anggota NF- κ B dipertahankan dalam sitoplasma oleh protein penghambat NF- κ B (I κ B) (I κ B α , I κ B β , dan I κ B ϵ) dan protein lain yang menyimpan pengulangan ankyrin. Setelah menerima stimulus aktivasi, protein NF- κ B membentuk homo atau heterodimer yang bertranslokasi ke dalam nukleus dan mengatur ekspresi gen targetnya. NF κ B diaktifkan oleh dua cabang sinyal utama: jalur kanonik dan non-kanonik. Pensinyalan kanonik dikaitkan dengan peran imunologis dan inflamasi. Sinyal ini diaktifkan oleh beragam rangsangan eksternal yang memicu peradangan, seperti sitokin proinflamasi termasuk *tumor necrosis factor α* (TNF- α), *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs), dan *damage-associated molecular pattern* (DAMPs). Interaksi ligan dengan reseptornya mendukung perekrutan protein yang mengarah pada aktivasi kompleks penghambat kappa B kinase (IKK), yang terdiri dari modulator esensial protein perancah NF- κ B (NEMO) dan dua subunit katalitiknya yaitu: IKK α dan IKK β . Setelah aktivasi, kompleks IKK mengkatalisis fosforilasi protein penghambat NF- κ B (I κ B), memicu poliubiquitinasi I κ B dan degradasi selanjutnya pada proteasome. Dalam kondisi non-aktif, protein I κ B berikatan dengan dimer NF- κ B dan mencegah translokasi NF- κ B ke dalam nukleus. Pensinyalan non-kanonik dikaitkan dengan diferensiasi, perkembangan, dan kelangsungan hidup sel imun. Jalur ini diaktifkan oleh sejumlah ligan termasuk ligan CD40 (CD40L), faktor pengaktif sel B (BAFF), aktivator reseptor ligan faktor nuklear kappa B (RANKL), dan limfotoksin β (LT β). Pada sel kanker payudara, aktivasi jalur NF- κ B telah diamati pada sel kanker payudara MCF7 dan MDA MB-231. Baik jalur kanonik maupun jalur non-kanonik berpartisipasi dalam tumorigenesis dan kemoresistensi kanker payudara. Pensinyalan kanonik NF κ B berperan dalam resistensi terhadap kemoterapi. Aktivator reseptor ligan faktor nuklir kappa B (RANKL) dan reseptornya (RANK) berpartisipasi dalam aktivasi jalur NF- κ B non-kanonik. Ekspresi RANK dikaitkan dengan prognosis buruk pada pasien kanker payudara. Reseptor RANK meningkatkan tumorigenesis, migrasi dan resistensi sel tumor terhadap kemoterapi. Pensinyalan NF- κ B berhubungan dengan invasi dan metastasis sel kanker payudara.

2.6 Peran Cyclin D1 Terhadap Proliferasi Sel Kanker

Proto-onkogen Cyclin D adalah pengatur penting untuk transisi dari fase G1 ke S selama siklus sel. Cyclin D akan berikatan dengan CDK4 dan CDK6 membentuk kompleks cyclin D-CDK4/6 aktif yang kemudian memfosforilasi protein retinoblastoma (Rb) untuk mendorong perkembangan siklus sel. Cyclin D juga

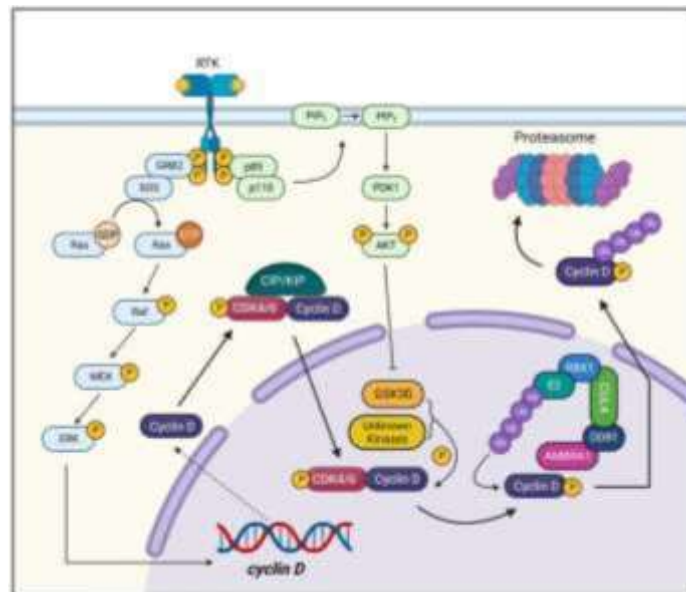
dapat memodulasi aktivitas berbagai protein faktor transkripsi dan enzim histone deacetylase. Cyclin D memiliki waktu paruh 24 menit dan akan terdegradasi di dalam sel melalui aktivitas proteasome 26S dengan cara yang bergantung pada protein ubiquitin dan Skp2 F-box. Terdapat peran Cyclin D1 dalam tumorigenesis kanker payudara (Saleban, 2023 ; Montalto, 2020)

Siklus pembelahan sel dikontrol secara ketat oleh *cyclin dependent kinase* (CDK) dan protein-protein cyclin. CDK diaktifkan melalui ikatan dengan masing-masing cyclin pasangannya diikuti fosforilasi oleh CDK-activating kinase (CAK). Transisi dari setiap fase siklus sel dikendalikan oleh aktivitas kinase dari kompleks cyclin-CDK yang spesifik. Fase S dari siklus sel mengawali replikasi DNA yang diperlukan untuk pembelahan sel. Cyclin D membentuk kompleks aktif dengan CDK4 dan CDK6 (CDK4/6), yang menggerakkan transisi fase G1-S dengan memfosforilasi protein penekan tumor Retinoblastoma (Rb). Protein Rb kemudian mengalami fosforilasi oleh kompleks cyclin E-CDK2, menyebabkan terlepasnya faktor transkripsi E2F. Pelepasan ini memulai transkripsi beberapa protein utama diperlukan untuk kemajuan siklus sel dan mendorong terjadinya proliferasi sel. Gangguan pada fungsi pengatur siklus sel ini menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tidak terkendali dan ketidakstabilan genom yang berkontribusi terhadap tumorigenesis. (Radenkovic et al., 2021 ; Wang et al., 2023)

Cyclin D-CDK4/6 juga dapat memajukan siklus sel dengan mengikat dan memecah CDK inhibitor (CKI) p21 dan p27 yang menghambat aktivitas kompleks cyclin E-CDK2. Cyclin D-CDK 4/6 juga memfosforilasi Smad3, faktor transkripsi jalur pensinyalan TGF- β , dan FOXM1 yang terlibat dalam proliferasi sel dan tumorigenesis. Fosforilasi Smad3 oleh CDK4 menghambat respon anti-proliferasi. Fosforilasi FOXM1 oleh CDK4/6 menyebabkan progresi fase G1/S dan mencegah *senescence* pada sel kanker (Radenkovic et al., 2021 ; Wang et al., 2023)

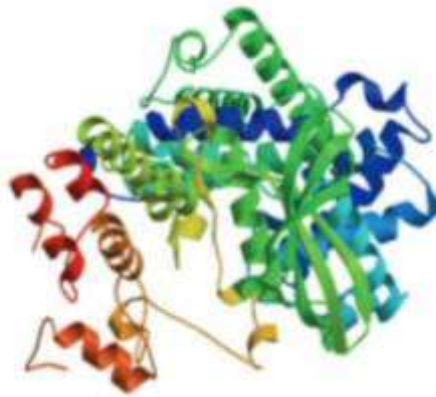
Protein Cyclin D dikode oleh gen terpisah pada tiga kromosom (*CCND1*: 11q13.3, *CCND2*: 12p12.23, *CCND3*: 6p21.1). Cyclin D diekspresikan sebagai respons terhadap stimulasi mitogenik melalui jalur Ras dan PI3K-Akt. Proses penghambatan protein / kinase yang berinteraksi dengan CDK protein (CIP/KIP) seperti p21 dan p27 menstabilkan dan memfasilitasi pembentukan kompleks cyclin D-CDK4/6. Di dalam inti sel aktivitas kompleks ini dihentikan oleh fosforilasi gugus terminal-C treonin oleh GSK3 β atau oleh kinase lain yang tidak diketahui. Setelah terfosforilasi, Cyclin D selanjutnya mengalami poliubikuitas oleh ligase ubiquitin

CRL4AMBRA1 E3 dan kemudian terdegradasi (Radenkovic, et al., 2021 ; Wang., 2023)



Gambar 3. Regulasi Cyclin D1 (Sumber : Saleban, 2023)

Cyclin D1 adalah protein 36-kDa yang dikode oleh gen *CCND1* pada kromosom 11q13. Cyclin D1 berperan didalam nukleus, sebagai pengatur perkembangan siklus sel. Cyclin D1 memodulasi transisi dari fase G1 ke S melalui aksinya sebagai pengatur alosterik *cyclin dependent kinase 4* (CDK4) dan CDK6. Kompleks Cyclin D1/CDK4 yang aktif bertranslokasi ke nukleus, memfosforilasi protein retinoblastoma (RB) bersama dengan Cyclin E/CDK2, dan menghilangkan penghambatan pada faktor transkripsi E2F yang mengatur transkripsi gen spesifik untuk proliferasi sel. Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi mendorong proliferasi seluler yang tidak terkendali, mendorong pertumbuhan se; tumor sehingga Cyclin D1 memiliki peran yang penting dalam proses karsinogenesis. (Abdullah et al., 2019; Radenković et al., 2021; Wang et al., 2023) Amplifikasi atau overekspresi gen *CCND1* sering ditemukan pada berbagai jenis kanker termasuk kanker payudara. (Wu et al., 2020)

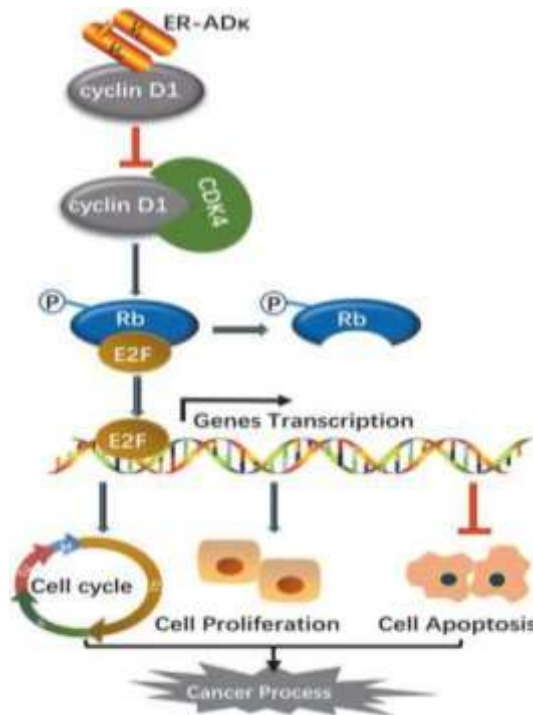


Gambar 4. Struktur protein Cyclin D1 (Sumber : Abdullah, 2019)

2.7. Cyclin D1 pada Sel Kanker Payudara

Gen yang mengkode protein Cyclin D1 yaitu *CCND1* berada pada kromosom 11q13.3. Gen ini mengalami amplifikasi pada sekitar 10-35% kasus kanker payudara dan dikaitkan dengan peningkatan ekspresi protein Cyclin D1. Ekspresi berlebih dan amplifikasi gen *CCND1* terdapat masing-masing pada sekitar 20% dan 50% kasus kanker payudara. Peningkatan ekspresi Cyclin D1 juga diamati pada sekitar 67,5% kasus invasive ductal carcinoma yang berkorelasi kuat dengan ekspresi reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR). Penelitian yang dilakukan oleh Zhang dkk. menyebutkan bahwa peningkatan ekspresi gen *CCND1* ditemukan pada 82% tumor payudara manusia, dan amplifikasi gen terjadi pada sebanyak 17% kasus. (Saleban, 2023) Terdapat peran penting Cyclin D1 dalam karsinogenesis kanker payudara, melalui peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel, memperpendek transisi G1/S dan interaksi dengan ER. Ekspresi berlebih Cyclin D1 yang dinilai dengan pemeriksaan imunohistokimia telah dilaporkan pada 35-80% kasus kanker payudara (Siraj et al, 2021)

Perkembangan siklus sel diatur oleh beberapa protein cyclin dan cyclin dependent kinase. Selama fase G0, protein retinoblastoma (Rb) menghambat faktor transkripsi E2F, sehingga mencegah transkripsi gen yang diperlukan untuk transisi fase G1/S. Kompleks Cyclin D1-CDK4 atau D1-CDK6 memfosforilasi Rb, menyebabkan disosiasi Rb dari protein E2F sehingga mengaktifkan transkripsi gen untuk transisi fase G1/S dari siklus sel.



Gambar 5. Peran Cyclin D1 dalam siklus sel dan karsinogenesis
(Sumber : Wu. 2020)

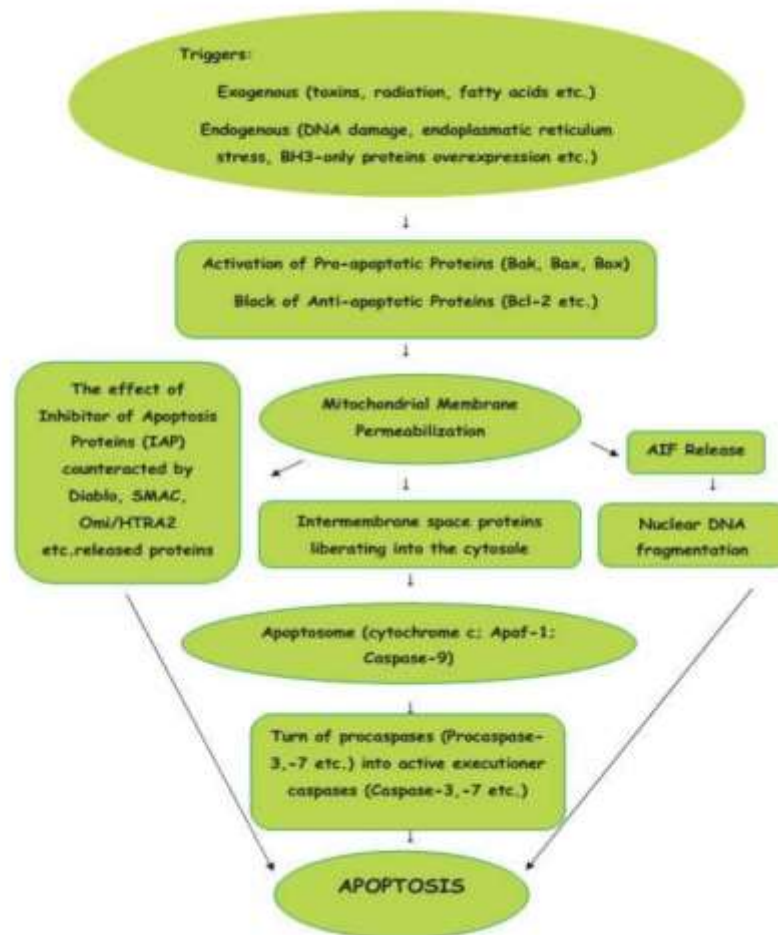
Terdapat interaksi antara gen ER dan *CCND1* dimana ER mendorong transkripsi gen *CCND1*. ER diekspresikan pada sekitar 75% kanker payudara. Amplifikasi *CCND1* sering didapatkan pada kanker payudara dengan ER positif dan dikaitkan dengan penurunan survival pasien. Banyak pasien kanker payudara dengan ER positif mendapatkan terapi endokrin yang menghambat jalur ER namun hingga 50% pasien mengalami resistensi. Amplifikasi *CCND1* adalah salah satu mekanisme yang dianggap berhubungan dengan terjadinya resistensi terapi endokrin pada pasien kanker payudara. Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara amplifikasi *CCND1* dengan respon terapi yang buruk terhadap aromatase inhibitor dan tamoxifen, sementara beberapa penelitian lainnya tidak menunjukkan adanya hubungan bermakna antara amplifikasi *CCND1* dengan respon terhadap terapi tamoxifen. Penelitian lain menyebutkan bahwa *CCND1* dapat memprediksi resistensi terhadap aromatase inhibitor tetapi tidak terhadap tamoxifen. Ekspresi berlebih Cyclin D1 adalah prediktor yang buruk untuk kanker payudara dengan ER positif (Jeffreys et al., 2022)

2.8 Mekanisme Apoptosis

Apoptosis atau kematian sel yang terprogram adalah proses yang sangat terkontrol. Inisiasi apoptosis melalui salah satu dari dua jalur, yaitu: Jalur intrinsik dan ekstrinsik. Pada jalur intrinsik atau disebut juga jalur mitokondria, sel yang mengalami stres seluler akan 'membunuh' dirinya sendiri, sedangkan pada jalur ekstrinsik kematian sel disebabkan oleh sinyal dari luar (Hussar, 2022 ; Yilmaz, 2022)

1. Jalur intrinsik

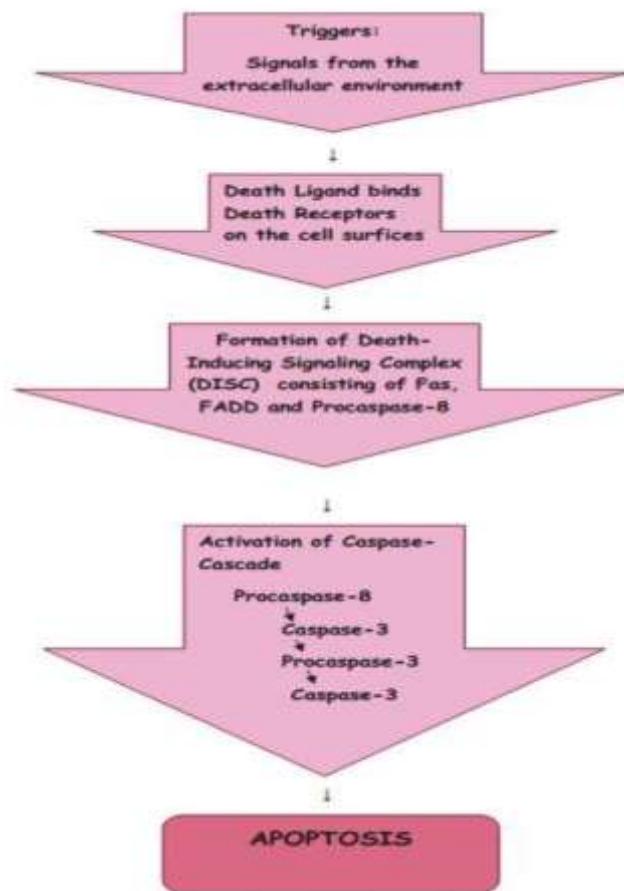
Jalur intrinsik apoptosis merupakan respon seluler terhadap perubahan lingkungan intraseluler. Jejas yang menyebabkan perubahan pada sel dapat bersifat eksogen atau endogen. Jejas eksogen seperti : Zat toksik, radiasi, asam lemak dan lain-lain, sedangkan jejas endogen antara lain : Kerusakan DNA, stres retikulum endoplasma, translokasi mitokondria, aktivasi p53, ekspresi berlebih protein BH3, dan homeostasis Ca^{2+} . Sinyal yang ditimbulkan oleh kedua jenis penyebab tersebut mempengaruhi mitokondria dan menimbulkan perubahan pada permeabilitas bagian dalam atau luar membran mitokondria yang menyebabkan protein dalam ruang antar membran dibebaskan ke dalam sitosol. Protein pro-apoptosis aktif yaitu : Bak, Bax, dan Bok, menyebabkan pembentukan makropori yang memungkinkan protein dari ruang antar membran mitokondria untuk memasuki sitosol. Protein dari ruang antar membran mitokondria yaitu cytochrome c kemudian dilepaskan ke dalam sitosol membentuk kompleks protein apoptosom yang berikutnya akan membelah procaspase-9 menjadi caspase-9 yang aktif. Aktivasi Caspase-9 mengaktifkan procaspase-3 menjadi caspase-3 yang merupakan casapase efektor untuk apoptosis. Pengaruh dari protein inhibitor apoptosis (IAP) yang mencegah aktivasi caspase-3 dapat dihambat oleh beberapa protein seperti : Arts, Diablo, *second mitochondria-derived activator caspase* (SMAC) dan Protein Omi/HTRA2 yang dilepaskan dari kerusakan mitokondria.



Gambar 6. Jalur intrinsik apoptosis (Sumber : Hussar, 2022)

2. Jalur Ekstrinsik

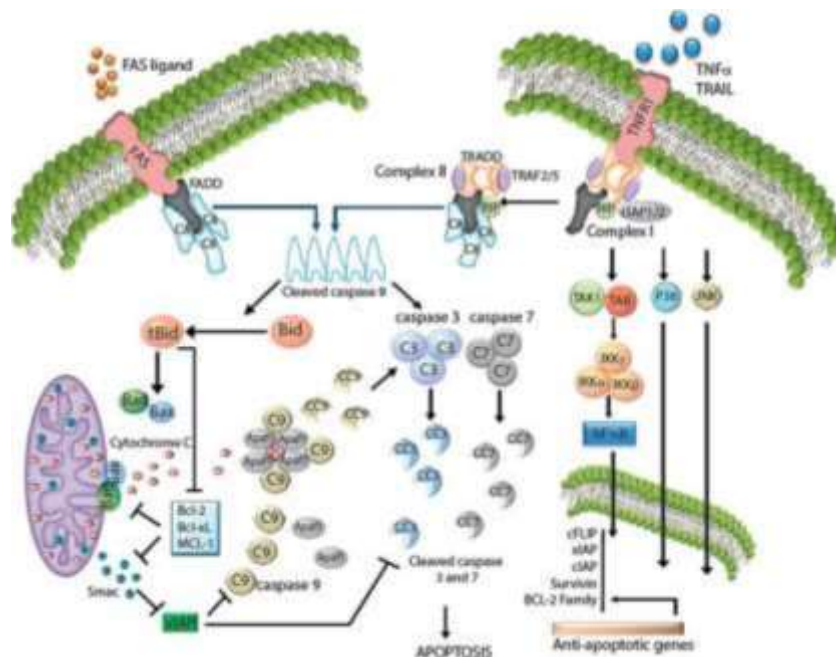
Reseptor kematian (*Death Receptor*) seperti : TNFR-1 (*Tumor necrosis factor-1*), Reseptor Fas-L (Fas Ligand) dan reseptor TRAIL (*TNF-Related apoptosis-inducing ligand*) pada permukaan sel memiliki peran penting dalam jalur ekstrinsik apoptosis. Reseptor kematian pada membran sel memiliki domain kematian (*death domain*). Ikatan antara death ligand dengan death domain pada reseptor kematian akan memicu pembentukan *death-inducing signaling complex* (DISC) bersama protein adaptor FADD (*Fas-associated death domain*) dan procaspase-8. Setelah pembentukan DISC, procaspase-8 akan menjadi caspase-8 aktif dan memulai apoptosis melalui aktivasi caspase -3, -6, -7.



Gambar 7. Jalur ekstrinsik apoptosis (Sumber : Hussar, P. 2022).

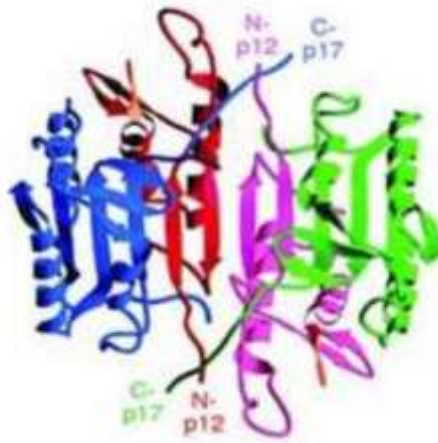
3. Jalur apoptosis lainnya

Selain jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik yang bergantung pada caspase, terdapat jalur yang dimediasi oleh faktor penginduksi apoptosis (*apoptosis-Inducing Factor/AIF*). Modulasi terhadap aktivitas mitokondria dapat mengaktivasi sinyal kematian sel yang menyebabkan pelepasan cytochrome c dan AIF ke dalam sitoplasma. Ikatan cytochrome c dengan faktor pengaktif protease apoptosis dan deoksi-ATP mengaktifkan caspase-9 dan menyebabkan aktivasi kaskade caspase. Jun N-terminal kinase (JNK), yaitu kelompok enzim dalam jalur MAPK yang diaktifkan oleh berbagai stres seluler, termasuk radiasi UV, sitokin proinflamasi, stres oksidatif, dan kerusakan DNA. JNK dapat menginduksi apoptosis melalui dua mekanisme utama, yaitu meningkatkan ekspresi gen proapoptosis melalui transaktivasi faktor transkripsi c-Jun/AP-1, dan melalui jalur yang bergantung pada protein p53 atau p73, yang berperan dalam regulasi gen-gen proapoptosis seperti BAX, PUMA, dan NOXA. (Yang, 2017 ; Koff, 2015)



Gambar 8. Mekanisme apoptosis (Sumber : Koff JL, 2015)

Caspase (cysteine aspartate–specific proteases) merupakan enzim proteolitik yang menjadi komponen utama dalam jalur apoptosis. Di dalam sel, caspase berada dalam bentuk tidak aktif yang disebut zimogen. Setiap caspase terdiri atas domain prodomain, subunit besar p20, dan subunit kecil p10. Aktivasi zimogen terjadi sebagai respons terhadap berbagai rangsangan ekstrinsik maupun intrinsik. Secara fungsional, caspase diklasifikasikan menjadi dua subfamili, yaitu caspase proapoptosis dan proinflamasi. Caspase proapoptosis (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, dan -10) berperan dalam transduksi sinyal kematian sel terprogram, sedangkan caspase proinflamasi (caspase-1, -4, -5, -11, dan -12) terlibat dalam pematangan sitokin selama proses inflamasi. (Hussar, 2022 ; Yilmaz, 2022)



Gambar 9. Struktur caspase (Sumber : Yuan et al., 2022)

2.9 Apoptosis pada Sel Kanker

Sel kanker memiliki kemampuan untuk menghindari apoptosis dengan berbagai cara misalnya melalui ketidakseimbangan antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis, penurunan fungsi caspase, dan kemunduran mekanisme sinyal kematian. Berikut mekanisme sel tumor untuk menghindari apoptosis (Yilmaz.2022 ; Koff, 2015)

1. Protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis

Keluarga protein Bcl-2 terdiri dari protein pro-apoptosis (Bak, Bax, Bcl-Xs, Bim, Bid, Hrk/DP5, Bim/Bod, Bmf, Noxa, Puma/Bbc-3) dan protein anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1). Kelompok protein anti-apoptosis Bcl-2 memungkinkan pembentukan dan perkembangan kanker melalui tahapan promosi dari sel yang bermutasi atau bertransformasi. Protein ini menjaga fungsi mitokondria dan mencegah degradasi mitokondria dan pelepasan cytochrome c kedalam sitoplasma yang akan menginisiasi jalur intrinsic apoptosis. Bcl-2 dan Bcl-XL adalah protein stabil di dalam sel, tetapi protein anti-apoptosis lainnya dibentuk oleh poliubiquitinasi dan degradasi proteasomal. Protein Bcl-2 pro-apoptosis memiliki 9-16 domain homolog asam amino (BH3). Domain BH3 ini diperlukan untuk ikatan dengan protein anti-apoptosis dan menginduksi apoptosis. Protein BAX dapat meningkatkan permeabilisasi membran luar mitokondria dan pelepasan cytochrome-c kedalam sitoplasma untuk menginduksi apoptosis. Penurunan ekspresi gen pro-apoptosis yang hanya mengandung wilayah BH3 yang dikodekan mendorong pembentukan tumor. Protein pro-apoptosis Bim terlibat dalam apoptosis pada sel tumor yang diinduksi oleh onkogen Myc.

Ekspresi berlebih dari protein pro-apoptosis Bid bekerja sebagai penekan tumor pada sel-sel jenis kanker asal myeloid seperti kanker prostat, ovarium, usus besar, dan otak. Protein pro-apoptosis Puma dapat memicu kelangsungan hidup sel kanker dan meningkatkan resistensi apoptosis

2. Flip dan anti-apoptosis

FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) adalah protein anti-apoptosis yang diekspresikan secara berlebihan dalam sel kanker dan berhubungan dengan prognosis yang buruk. FLIP berperan pada jalur apoptosis eksogen. Cellular-FLIP (c-FLIP) diekspresikan dalam dua bentuk, FLIP panjang (l-FLIP) dan FLIP pendek (s-FLIP), berikatan dengan FADD, caspase-8, caspase-10, atau reseptor kematian TRAIL-5. FLIP menghambat pengaktifan caspase-8 dan caspase-10. Pada beberapa jenis kanker pembentukan sel tumor dan resistensi terhadap kemoterapi berhubungan dengan ekspresi c-FLIP dan menjadi salah satu protein target dalam terapi kanker.

3. Ekspresi Protein Inhibitor Apoptosis

Protein inhibitor apoptosis (IAP) mencegah pengikatan caspase-9 ke apoptosom setelah sinyal apoptosis diterima dan menghambat apoptosis. Survivin yang merupakan salah satu protein penghambat apoptosis dapat secara langsung menghambat caspase-3. Ekspresi berlebih survivin mendorong pertumbuhan tumor, mengganggu mekanisme apoptosis, penghambatan caspase dan resistensi terhadap obat anti-tumor. Protein penghambat apoptosis, IAP, berfungsi sebagai pengatur negatif mekanisme kaspase dan kematian sel. Jalur pensinyalan yang diatur oleh IAP dapat terdegradasi pada sel kanker.

4. Inaktivasi P53

Protein p53 yang dikode oleh gen TP53 berfungsi sebagai protein penekan tumor di dalam sel. Fungsi gen ini sangat penting untuk melindungi kerusakan DNA, termasuk aktivasi onkogen yang dapat disebabkan oleh berbagai jejas.. Mutasi pada gen TP53 yang mengkode protein p53 terdapat pada sekitar 50% kasus kanker. P53 tipe mutan membentuk tetramer yang mirip dengan p53 tipe wild, tetapi aktivitasnya jauh lebih rendah daripada p53 wild type dan memiliki peran pro-apoptosis yang rendah.

5. Inaktivasi APAF-1

Protein Apaf-1 adalah protein pro-apoptosis yang memungkinkan aktivasi caspase-9 melalui interaksi dengan cytochrome c yang dilepaskan dari

mitokondria dan penting untuk sinyal kematian sel pada jalur apoptosis intrinsik. Inaktivasi Apaf-1 menghambat apoptosis pada sel kanker yang dimediasi p53.

6. Hilangnya reseptor kematian (*death receptors*)

Resistensi terhadap apoptosis berhubungan dengan reseptor kematian (DR) pada banyak jenis kanker. Hilangnya alel pada gen di lokus kromosom 10q24 dan 8p21-22 yang mengkode FAS dan TRAIL-R2 telah diidentifikasi pada kanker payudara. Apoptosis yang dimediasi TRAIL dapat menghambat kanker pankreas, melanoma, dan neuroblastoma. Terdapat polimorfisme DR4 pada kanker ovarium manusia dan kanker kandung kemih. Dalam polimorfisme ini, terjadi perubahan nukleotida A1322G pada gen DR4 yang menyebabkan penggantian lisin dengan arginin dari asam amino di wilayah DD protein DR4. Polimorfisme DR4 mengakibatkan resistensi terhadap apoptosis pada kanker paru-paru dan kanker kepala leher. Mutasi pada gen DR5 terdapat pada limfoma daerah kepala dan leher, kanker paru-paru dan kanker payudara. Mutasi ini terjadi di wilayah domain kematian (death domain / DD) dan menghambat apoptosis yang diinduksi TRAIL. Mutasi pada gen DR5 menyebabkan FADD dan Caspase-8 tidak dapat berinteraksi dengan daerah domain kematian dan menyebabkan penghambatan apoptosis. Mutasi pada ligan FAS menyebabkan penghambatan apoptosis yang dimediasi oleh FAS.

7. Inaktivasi caspase

Caspase memiliki peran penting dalam apoptosis. Aktivitas caspase menjaga keseimbangan antara agresivitas dan kematian sel kanker. Kurangnya ekspresi Caspase-8 yang memulai jalur apoptosis meningkatkan keganasan pada sel NCI-H82 (model kanker paru-paru). Hilangnya fungsi caspase-8 mengakibatkan resistensi terhadap jalur ekstrinsik apoptosis yang diperantarai oleh ligan kematian seperti TNF, TRAIL, dan CD95. Hilangnya fungsi mutasi pada gen *CASP10* yang mengkode protein caspase-10 menyebabkan terganggunya fungsi FAS (CD95), reseptor kematian yang mengaktifkan jalur eksogen.

2.10. Caspase-3 pada Sel Kanker Payudara

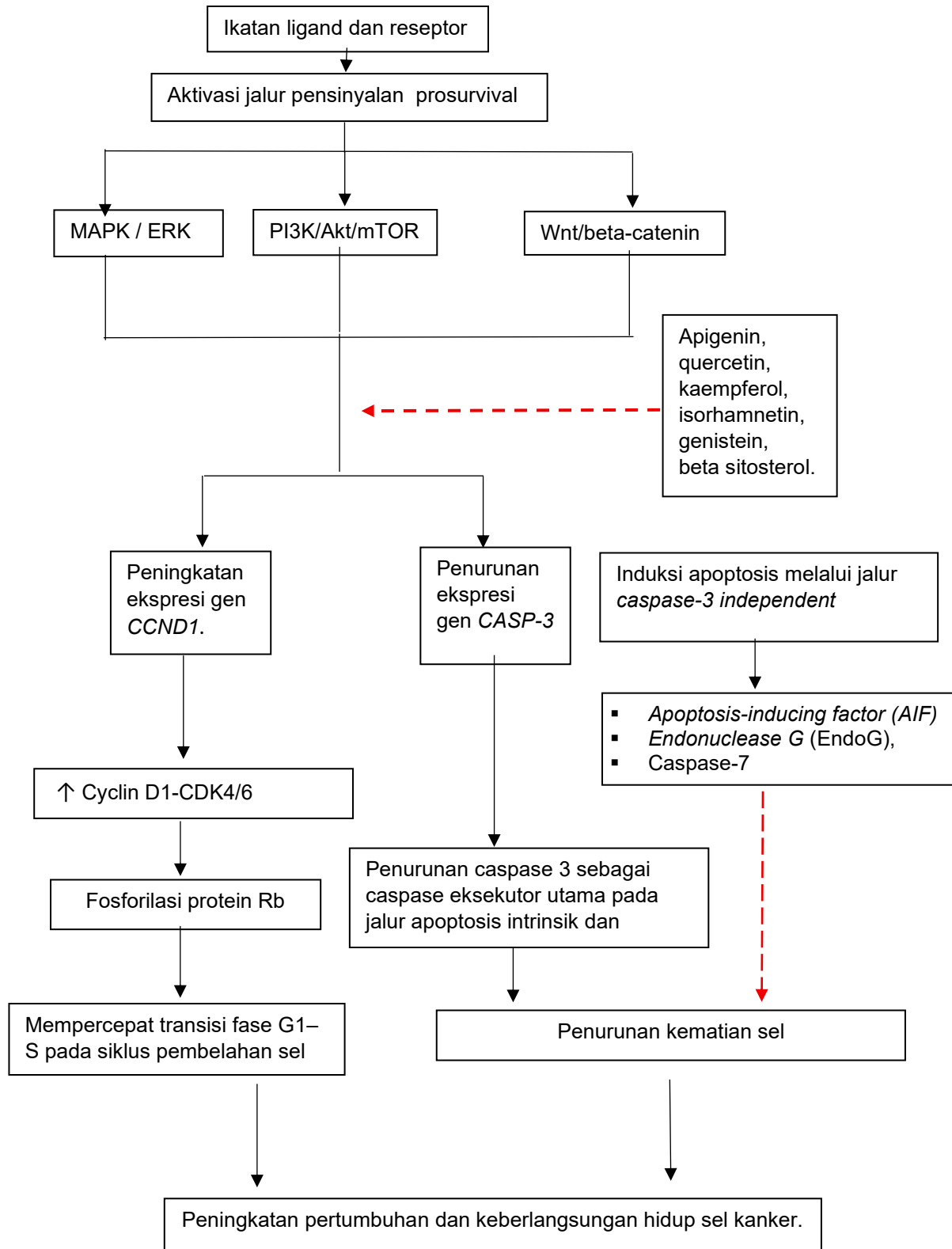
Pada sel payudara normal, terdapat keseimbangan antara proliferasi sel dan apoptosis untuk mempertahankan homeostasis jaringan. Aktivasi jalur sinyal anti-apoptosis atau gangguan pada jalur pro-apoptosis dapat memicu proliferasi sel yang tidak terkendali, resistensi terhadap terapi, dan kekambuhan kanker. Pada kanker payudara, berbagai faktor seperti faktor pertumbuhan, kerusakan

DNA, spesies oksigen reaktif (ROS), dan radiasi UV dapat menginduksi pertumbuhan sel yang tidak terkontrol melalui aktivasi jalur mitokondria, FasL/Fas, PI3K/AKT, ROS, serta NF- κ B. Aktivasi jalur-jalur tersebut mengganggu keseimbangan antara sinyal pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Oleh karena itu, penargetan jalur apoptosis menjadi strategi yang menjanjikan dalam pengembangan obat antikanker, termasuk yang berasal dari produk alami, untuk terapi kanker payudara. (Yuan, 2022)

Penghambatan apoptosis merupakan faktor penting dalam inisiasi dan perkembangan kanker payudara. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kadar caspase-3 pada sel kanker payudara lebih rendah dibandingkan dengan sel normal. Caspase-3 merupakan faktor penting dalam apoptosis dan merupakan penanda potensial untuk memprediksi respon atau resistensi terhadap kemoterapi. (Dou et al., 2023)

Caspase-3 terlibat dalam apoptosis yang disebabkan oleh obat anti-neoplastik. Beberapa penelitian menunjukkan hilangnya caspase-3 berkorelasi dengan resistensi terhadap apoptosis yang diinduksi oleh pemberian obat kemoterapi pada berbagai cell line kanker manusia, termasuk sel kanker payudara. Pemulihan ekspresi caspase-3 pada sel kanker payudara MCF-7 dapat menyebabkan sensitivitas terhadap doxorubicin dan etoposide yang menginduksi apoptosis sel tumor dan hal ini menunjukkan bahwa defisiensi caspase-3 mungkin merupakan mekanisme yang berperan dalam resistensi terhadap kemoterapi pada kanker payudara. (Wagle, 2023)

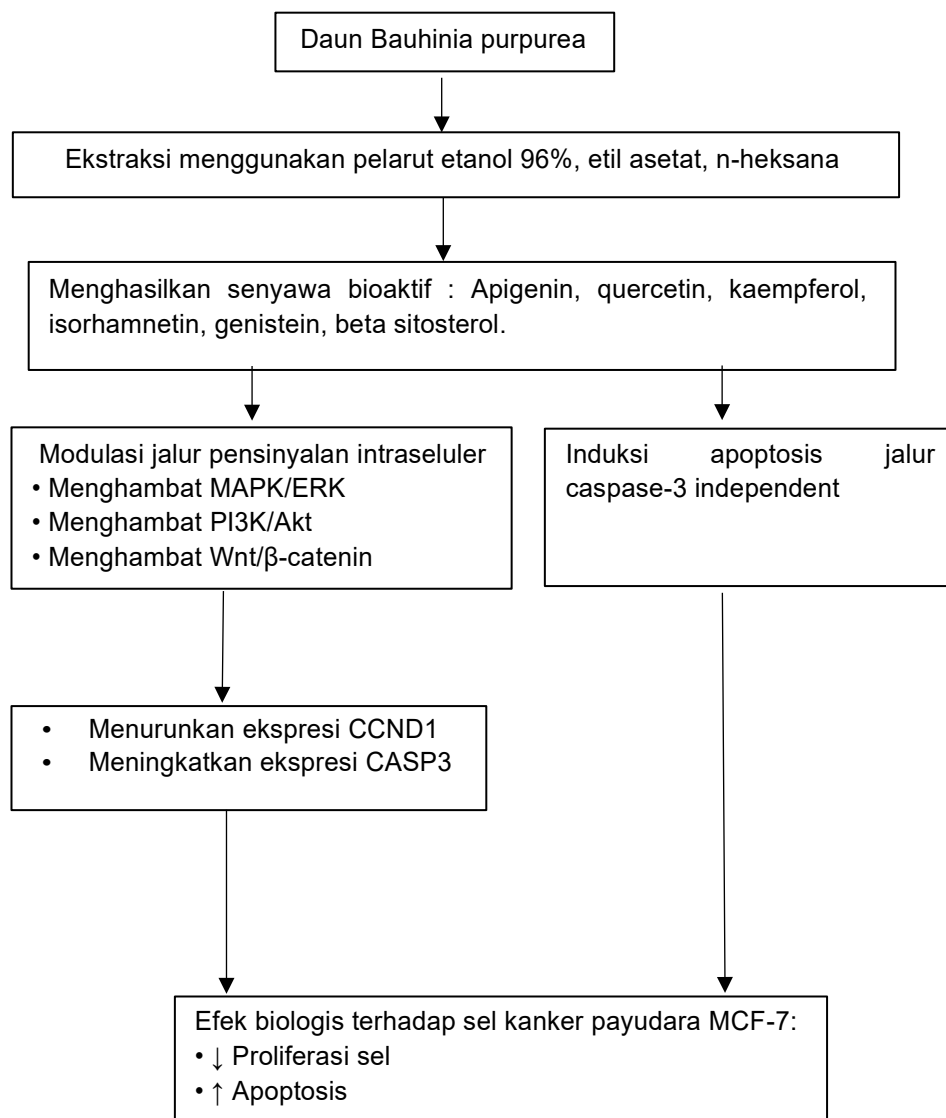
2.11. Kerangka Teori



Ikatan ligand dengan reseptor spesifik pada permukaan sel menginisiasi aktivasi jalur pensinyalan pro-survival, termasuk MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, dan Wnt/ β -catenin. Aktivasi jalur-jalur ini meningkatkan ekspresi *CCND1* dan mendorong pembentukan serta aktivasi kompleks cyclin D1–CDK4/6, yang berperan dalam fosforilasi protein retinoblastoma (Rb) dan percepatan transisi siklus sel dari fase G1 ke fase S, sehingga meningkatkan proliferasi sel. Secara bersamaan, aktivasi jalur pro-survival tersebut berkontribusi terhadap penurunan ekspresi gen *CASP3*, yang mengkode caspase-3 sebagai eksekutor utama apoptosis pada jalur intrinsik dan ekstrinsik. Selain menekan apoptosis yang bergantung pada caspase-3, jalur-jalur ini juga menghambat mekanisme apoptosis jalur caspase-3–independent melalui stabilisasi mitokondria dan pencegahan pelepasan mediator kematian sel non-caspase. Kombinasi percepatan transisi siklus sel dan hambatan apoptosis, baik yang bergantung maupun yang tidak bergantung pada caspase-3, menyebabkan penurunan kematian sel dan pada akhirnya mendukung pertumbuhan serta keberlangsungan hidup sel kanker.

Senyawa bioaktif seperti apigenin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin, genistein, dan β -sitosterol, yang termasuk dalam golongan flavonoid, isoflavon, dan fitosterol, diketahui dapat memodulasi jalur pensinyalan seluler yang berperan dalam regulasi proliferasi dan apoptosis. Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan memengaruhi aktivitas jalur MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, dan Wnt/ β -catenin, sehingga berpotensi memengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam transisi siklus sel fase G1–S, termasuk *CCND1*, serta mekanisme apoptosis melalui regulasi *CASP3*. Senyawa-senyawa ini juga diketahui dapat menyebabkan induksi apoptosis melalui mekanisme apoptosis yang tidak tergantung kepada caspase-3 (caspase-3 independent).

2.12. Kerangka Konsep



2.13 Hipotesis dan Premis Penelitian

Berdasarkan landasan teori dan tinjauan pustaka yang telah dijelaskan sebelumnya, maka hipotesis dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* terhadap ekspresi *CCND1*.

- Hipotesis nol (H_0) :

Ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana tidak menyebabkan perubahan bermakna terhadap ekspresi gen *CCND1* pada sel kanker payudara MCF-7.

- Hipotesis alternatif (H_1) :

Ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana menyebabkan penurunan bermakna terhadap ekspresi gen *CCND1* pada sel kanker payudara MCF-7.

2. Pengaruh ekstrak daun *Bauhinia purpurea* terhadap ekspresi *CASP3*

- Hipotesis nol (H_0) : Ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana tidak menyebabkan perubahan bermakna terhadap ekspresi gen *CASP3* pada sel kanker payudara MCF-7.

- Hipotesis alternatif (H_1) : Ekstrak daun *Bauhinia purpurea* yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana memodulasi ekspresi gen *CASP3* pada sel kanker payudara MCF-7.

Premis-premis penelitian

1. Gen *CCND1* merupakan regulator penting dalam transisi siklus sel dari fase G1 ke fase S yang berperan dalam mengontrol proliferasi sel. Pada kanker payudara, gen ini sering mengalami amplifikasi dan overekspresi terutama pada subtype luminal B dan HER2-positif yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel tumor dan berhubungan dengan prognosis pasien yang lebih buruk (Sadeghi et al., 2023; Jeffreys et al., 2022).
2. Sel kanker payudara MCF-7 (tipe luminal) diketahui mengalami gangguan ekspresi gen *CASP3* akibat adanya deleksi fragmen genetik sepanjang 47 pasangan basa (bp) yang menyebabkan terbentuknya transkrip mRNA tidak

lengkap dan menghambat produksi protein caspase-3 yang fungsional (Wang, 2016; Tian, 2023). Kelainan genetik ini berkontribusi terhadap hilangnya aktivitas eksekutor apoptosis caspase-3, sehingga mendukung kelangsungan hidup sel kanker.

3. Ekstrak daun *Bauhinia purpurea* diketahui mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, saponin dan polifenol yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker melalui berbagai mekanisme molekuler termasuk penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis (Pahwa, 2010 ; Zakaria, 2011)
4. Senyawa flavonoid dalam daun *Bauhinia purpurea* seperti : Apigenin dan quercetin dilaporkan mampu memodulasi jalur pensinyalan seluler seperti MAPK/ERK, PI3K/Akt dan Wnt/ β -catenin. Jalur-jalur ini berperan penting dalam regulasi proliferasi sel termasuk ekspresi gen *CCND1* (Kopustinskiene, 2020 ; Turktekin, 2011 ; Jiang, 2024 ; Asgharian, 2022)
5. Penghambatan jalur pensinyalan pro-survival seperti PI3K/Akt dan MAPK/ERK oleh senyawa flavonoid dapat meningkatkan sensitivitas sel terhadap apoptosis, antara lain melalui aktivasi caspase-3. (Zughaibi, 2021 ; Zhang, 2018).
6. Perbedaan polaritas pelarut menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi, sehingga berpengaruh pada komposisi kimia ekstrak yang akan menentukan potensi aktivitas biologis, termasuk efek antiproliferatif dan proapoptotik. (Lee, 2024)