

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Landasan Teori

2.1.1. Kanker

Kanker merupakan penyakit multifaktorial yang ditandai dengan gangguan pada regulasi seluler normal. Etiologi kanker merupakan hasil dari interaksi kompleks dari berbagai faktor risiko, faktor-faktor tersebut mencakup paparan lingkungan baik eksogen maupun endogen, dan predisposisi genetik individu. Kombinasi faktor-faktor ini secara sinergis berkontribusi pada pertumbuhan dan perkembangan sel kanker. (Lewandowska *et al.*, 2019).

Salah satu ciri utama sel kanker adalah kemampuannya untuk terus-menerus melakukan proliferasi (pembelahan diri) tanpa henti dan tidak terkendali. Sel kanker akan mengabaikan sinyal yang biasanya diterima oleh sel melalui reseptor permukaannya, sinyal ini berfungsi meregulasi pertumbuhan dan perkembangan sel. Hal ini sangat berbeda dengan sel normal yang pertumbuhannya terkendali, dengan mengatur produksi dan pelepasan sinyal yang memicu siklus pertumbuhan dan pembelahan sel, sehingga jumlah sel tetap seimbang dan jaringan tubuh berfungsi dengan baik (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Sel kanker juga memiliki kemampuan untuk bermigrasi dengan menginvasi jaringan disekitarnya dan bermetastasis ke organ yang lebih jauh. Salah satu mekanisme penting yang menyebabkan migrasi sel kanker adalah hilangnya ekspresi *e-cadherin*. Pada sel normal *e-cadherin* berfungsi untuk menjaga adhesi antar sel epitel, sehingga hilangnya molekul ini menyebabkan gangguan pada struktur jaringan dan memungkinkan sel kanker untuk bermigrasi ke jaringan disekitarnya atau organ lain yang lebih jauh. Mekanisme invasi jaringan lokal dan metastasis organ jauh merupakan satu tahapan yang kompleks, penyebaran dimulai dari invasi lokal sel kanker pada jaringan sekitarnya, kemudian diikuti

masuknya sel kanker ke dalam sistem vaskular atau limfatik hingga masuk ke dalam sistem sirkulasi menuju organ yang lebih jauh, kemudian sel kanker akan keluar dari pembuluh darah untuk mulai membentuk koloni kanker yang baru pada organ tersebut (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Sel kanker merupakan sel yang mampu melawan dan menghindari kematian, mekanisme kematian sel secara alamiah dikenal dengan apoptosis. Apoptosis merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang efektif dalam mencegah terjadinya kanker. Pemicu apoptosis yang menyampaikan sinyal antara regulator dan efektor dikendalikan oleh keseimbangan antara protein menghambat apoptosis dan protein pemicu apoptosis, keluarga protein *Bcl-2* (*Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *A1*) adalah penghambat apoptosis, sedangkan protein pemicu apoptosis adalah (*Bax* dan *Bak*). Pada kondisi kanker, regulasi apoptosis terganggu karena aktivasi protein antiapoptosis (*Bcl-2*) yang berlebihan. Studi yang membahas sinyal apoptosis, mengungkapkan bahwa berbagai stres seluler yang terjadi selama pertumbuhan sel kanker atau respons terhadap terapi kanker dapat memicu terjadinya apoptosis pada sel kanker. Mekanisme stres seluler pemicu apoptosis diantaranya ketidakseimbangan sinyal yang diakibatkan oleh peningkatan kadar sinyal onkogen dan kerusakan DNA akibat hiperproliferasi. Namun penelitian lain menunjukkan bahwa tumor ganas yang resisten terhadap pengobatan seringkali memiliki mekanisme yang menghambat terjadinya apoptosis (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011)

Heterogenitas kanker tercermin dalam perbedaan profil kanker berdasarkan gender dan kelompok usia. Pada pria, persentase tertinggi jenis kanker terjadi adalah pada prostat, paru-paru, bronkus, usus besar, rektum, dan kandung kemih, pada wanita prevalensi kanker tertinggi pada payudara, paru-paru, bronkus, usus besar, rektum, korpus uterus dan tiroid, sedangkan pada anak-anak persentase tertinggi jenis penyakit

kanker adalah kanker darah, dan kanker yang terkait dengan otak dan kelenjar getah bening (Hassanpour & Dehghani, 2017).

2.1.2. Kanker Payudara

Kanker payudara dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok utama yaitu kanker payudara yang mengekspresikan reseptor hormon estrogen atau ER+, reseptor hormon progesteron atau PR+, dan kanker payudara yang mengekspresikan reseptor *Human Epidermal Growth Factor 2* atau HER2+, serta tipe kanker payudara yang tidak mengekspresikan reseptor hormon maupun reseptor HER2 disebut juga sub tipe kanker KPTN atau ER-, PR-, dan HER2-. Obat yang digunakan pada masing-masing jenis kanker payudara juga berbeda-beda. (Nagarajan & McArdle, 2018; Makhoul *et al.*, 2018).

Kanker payudara yang positif reseptor hormon (HR+) merupakan sub tipe histopatologis kanker payudara yang paling sering ditemukan, persentase sub tipe kanker ini mencapai 60-70% dari seluruh kasus kanker payudara, sub tipe ini lebih sering terjadi pada wanita sebelum menopause. Terapi yang menargetkan reseptor hormon, merupakan pendekatan terapeutik utama yang telah terbukti efektif dalam mengobati kanker payudara sub tipe ini (Chen *et al.*, 2019). Contoh agen terapi hormonal meliputi tamoxifen, yang bertindak sebagai modulator reseptor estrogen, serta inhibitor aromatase seperti letrozole, anastrozole, dan exemestane, yang berfungsi menghambat sintesis estrogen ovarium (Reinert & Barrios, 2015).

Terapi antibodi monoklonal saat ini menjadi pengobatan utama kanker payudara HER2-positif. Golongan obat ini mencakup trastuzumab dan pertuzumab, yang bekerja melalui mekanisme penghambatan reseptor HER2. Selain itu, konjugat antibodi-obat seperti ado-trastuzumab-emtansine memberikan pendekatan terapi yang lebih tertarget dengan menggabungkan kombinasi terapi antibodi monoklonal antiHER2 dan kemoterapi (Wuerstlein & Harbeck, 2017).

Dibandingkan dengan subtype kanker payudara lainnya, pengobatan KPTN memberikan tantangan klinis yang lebih kompleks. Regimen terapi lini pertama untuk pasien KPTN umumnya didominasi oleh kemoterapi. Sebagai alternatif, pendekatan kombinasi kemoterapi dengan bevacizumab yang merupakan antibodi monoklonal dengan mekanisme kerja menghambat *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Barzaman *et al.*, 2020)

2.1.3. KPTN

KPTN adalah subtype kanker payudara yang negatif terhadap ekspresi reseptor hormon estrogen, progesteron, dan faktor pertumbuhan epidermal manusia, sehingga pilihan terapi untuk obat-obat yang menargetkan reseptor ER, PR dan HER2 tidak dapat direspon oleh kanker jenis ini (L. Zhang *et al.*, 2021). Beberapa obat yang disetujui oleh FDA pada tahun 2024 sebagai terapi untuk menangani KPTN terdiri dari golongan obat kemoterapi yaitu carboplatin, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, ixabepilone, paclitaxel, vinorelbine dan cisplatin, selain obat kemoterapi FDA juga menyetujui penggunaan golongan obat lain seperti golongan imunoterapi (atezolizumab, pembrolizumab), golongan konjugat antibodi-obat untuk KPTN yang ekspresi HER2 rendah atau sangat rendah (sacituzumab govitecan, trastuzumab deruxtecan), dan golongan PARP inhibitor (olaparib, talazoparib) (Sriramulu *et al.*, 2024)

KPTN merupakan jenis subtype kanker payudara yang sangat agresif, kemampuan invasi yang tinggi membuat sel-selnya bermetastasis ke organ lain, seperti otak, paru-paru, dan hati (Yin *et al.*, 2020). Karena keagresifannya itu KPTN dilaporkan sebagai penyebab kematian terbesar pada Wanita, KPTN mencakup 15–20% dari semua subtype kanker payudara (Cheng *et al.*, 2021). KPTN seringkali terdiagnosis pada stadium lanjut sehingga menyulitkan deteksi dini, KPTN memiliki predisposisi genetik yang lebih tinggi dibandingkan subtype kanker payudara lainnya. Jika dilihat dari profil imunologisnya, KPTN memiliki profil imunogenik yang lebih rendah dibandingkan subtype kanker payudara lainnya,

sehingga membatasi pilihan terapi yang tersedia (Heimes & Schmidt, 2019). Studi berbasis populasi yang telah dilakukan mengonfirmasi bahwa KPTN kebanyakan terjadi pada wanita muda produktif (premenopause) dengan rentang usia dibawah 40 tahun (Yin *et al.*, 2020). KPTN merupakan topik yang sangat menarik dan menantang untuk penelitian kanker payudara karena KPTN tidak hanya mencakup berbagai jenis kanker payudara yang tidak memiliki reseptor ER, PR dan HER2. Namun KPTN menunjukkan heterogenitas yang signifikan dalam profil genetik, ekspresi gen, tampilan histopatologis, dan perilaku klinis (Borri & Granaglia, 2021).

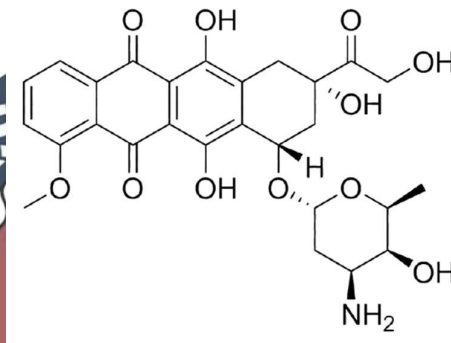
2.1.4. Galur Sel KPTN MDA-MB-231

Sel KPTN MDA-MB-231 merupakan sel kanker payudara manusia yang diklasifikasikan sebagai salah satu jenis sel KPTN. Sel ini banyak digunakan pada penelitian untuk membuktikan daya hambat suatu ekstrak terhadap metastasis sel, menetapkan sensitivitas, linearitas, dan spesifisitas dari sebuah penelitian tentang KPTN. Sel ini berasal dari kelenjar susu wanita kulit putih berusia 40 tahun yang menderita adenokarsinoma. Sel KPTN MDA-MB-231 merupakan salah satu jenis sel kanker payudara yang sangat agresif dan invasif, memiliki tingkatan tumor yang diklasifikasikan dalam tumor berdiferensiasi buruk karena tidak mengekspresikan ER, PR, dan HER2 (Huang *et al.*, 2024).

Sel KPTN - MDA-MB-231 bersifat tumorigenik, memiliki kemampuan *self-renewal*, menunjukkan heterogenitas seluler, dan mengaktifkan mekanisme antiapoptosis. Selain itu sel ini juga mampu untuk memperbarui diri tanpa batas, dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, dan memiliki kapasitas proliferasi yang tinggi sehingga sel ini cukup sesuai jika digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan potensi penghambatan suatu zat terhadap proliferasi dan perkembangan sel kanker payudara (C.-L. Zhang *et al.*, 2017).

2.1.5. Doxorubicin

Doxorubicin merupakan golongan obat kemoterapi yang menjadi regimen pengobatan lini pertama dalam menangani berbagai jenis kanker hingga saat ini, salah satunya adalah kanker payudara. Doxorubicin merupakan golongan obat kemoterapi antrasiklin, dengan struktur yang ditunjukkan pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1 Struktur Obat Doxorubicin

Sumber: (Alghorabi *et al.*, 2019)

doxorubicin merupakan obat kemoterapi berbentuk cair dan berwarna merah, biasa diberikan secara intravena atau infus. Injeksi doxorubicin terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan berbagai jenis keganasan, termasuk tumor solid, leukemia yang dapat ditransplantasikan, dan limfoma (Rivankar, 2014).

Mekanisme kerja doxorubicin masih belum diketahui secara pasti, namun beberapa pendapat menyatakan bahwa mekanisme kerja doxorubicin melibatkan interkalasi dengan molekul DNA yang pada akhirnya menghambat biosintesis makromolekul sel tumor. Hal ini dapat terjadi dengan penghambatan enzim topoisomerase II, enzim topoisomerase II berperan penting dalam melepaskan tegangan pada untai DNA yang melilit rapat (*supercoil*) yang memungkinkan proses transkripsi berlangsung. Penghambatan enzim topoisomerase II menyebabkan proses transkripsi tidak dapat berlangsung. Doxorubicin juga dapat mencegah heliks ganda DNA tertutup kembali sehingga proses

replikasi tidak dapat berlangsung. Mekanisme lain dari doxorubicin adalah kemampuannya untuk menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan DNA dan membran sel (Rivankar, 2014).

Doxorubicin paling sering digunakan untuk mengobati kanker kandung kemih, payudara, lambung, paru-paru, ovarium, tiroid, sarkoma jaringan lunak, mieloma multipel, dan limfoma hodgkin. Meskipun banyak digunakan dalam pilihan terapi kanker, obat ini memiliki efek samping jangka panjang yang signifikan, terutama toksisitas pada jantung (kardiotoksik). Mekanisme kardiotoksitas doxorubicin sangat beragam, beberapa diantaranya yang paling sering dilaporkan adalah induksi stres oksidatif dan apoptosis. Induksi stres oksidatif berlangsung ketika terjadi peningkatan produksi ROS dan peroksida lipid pada mitokondria sel jantung yang dipicu oleh metabolisme doxorubicin (pembentukan aglikon dan kompleks besi). Apoptosis yang terjadi juga dipicu oleh peningkatan stres oksidatif, peningkatan itu akan mengaktifkan HSF-1 sehingga menginduksi HSP-25 yang menstabilkan protein p53 sehingga memicu pembentukan faktor pro-apoptosis seperti FasL, Fas, c-Myc, dan p53 yang tidak selektif dan memicu kematian sel jantung. Toksisitas tersebut dapat menyebabkan kematian, oleh karena itu penggunaan doxorubicin harus dilakukan dengan hati-hati dan seringkali memerlukan penyesuaian dosis atau penghentian pengobatan (Carvalho *et al.*, 2009, Rawat *et al.*, 2021).

Dosis doxorubicin 550 mg/m² merupakan batas aman pemberian, karena peningkatan dosis diatas dosis tersebut menyebabkan insiden kardiotoksik yang meningkat sebanyak 7%, dan dapat mencapai 30-40% pada dosis 770 mg/m² (Sebayang, 2021). Oleh karena itu, berbagai upaya telah dilakukan untuk mengurangi dampak toksisitas yang disebabkan oleh doxorubicin, seperti pemberian dosis rendah, penemuan dan sintesis analog antrasiklin baru, pemberian bersamaan dengan agen kardioprotektif dan berbagai upaya pencegahan lainnya (Carvalho *et al.*, 2009). Doxorubicin juga bersifat vesikan yang mampu memicu kerusakan

jaringan seperti kulit menjadi rusak atau melepuh apabila zat tersebut keluar dari pembuluh darah vena (D'Angelo *et al.*, 2022).

2.1.6. Obat Kombinasi Kemoterapi Doxorubicin

Kombinasi kemoterapi adalah pendekatan pengobatan kanker yang bertujuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan, mengurangi efek samping dan efek toksik, serta meningkatkan harapan hidup pasien dengan menggabungkan beberapa jenis terapi atau obat secara bersamaan (Sodergren *et al.*, 2020).

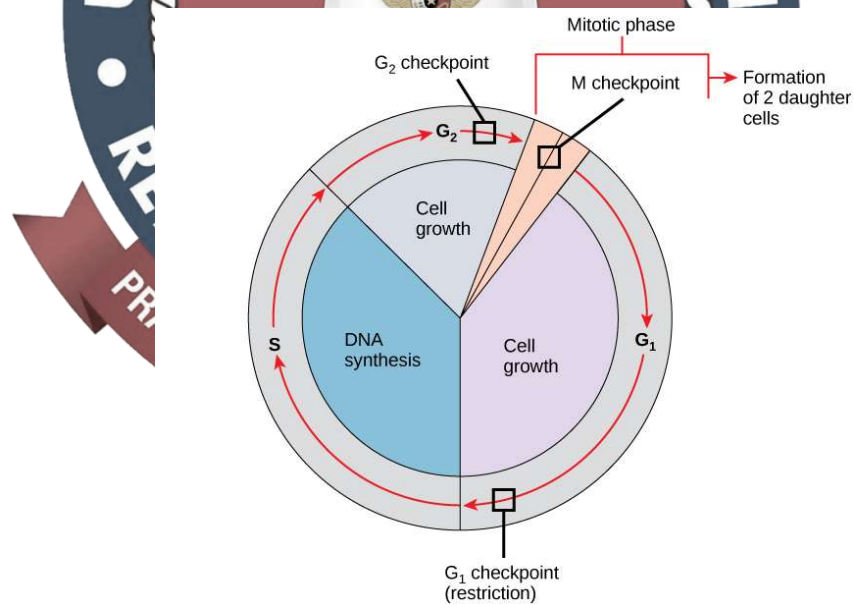
Efek pemberian obat yang diberikan secara kombinasi dapat digolongkan menjadi tiga yaitu efek sinergi, aditif dan antagonisme. Efek sinergi dapat dicapai apabila efek kombinasi dari dua obat jauh lebih kuat dibandingkan penjumlahan efek masing-masing obat jika diberikan tunggal, atau dalam model matematika ($1+1=3$). Efek aditif adalah efek jika kombinasi dari dua obat sama dengan penjumlahan efek masing-masing obat jika diberikan tunggal, sehingga jika dituliskan dalam model matematika ($1+1=2$). Efek antagonis merupakan efek kombinasi obat yang tidak diharapkan untuk pengujian kombinasi obat, yaitu terjadi ketika efek kombinasi obat lebih lemah atau bahkan saling menghilangkan efek satu sama lain atau dapat dimodelkan dengan ($1+1=0$) (Yuan *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian tentang efek kombinasi obat doxorubicin dengan obat bahan alam pada sel KPTN MDA-MB-231 telah dilakukan. Salah satunya adalah penelitian tentang potensi efek sitotoksik pemberian *Methanol Extract of Aerial Parts* (MEPI) dari *Pavetta indica L.* yang dikombinasikan dengan doxorubicin pada sel KPTN MDA-MB-231, menunjukkan bahwa MEPI memberikan efek sinergis dengan doxorubicin pada sel KPTN MDA-MB-231 dengan mengurangi pembentukan koloni sel kanker dan menginduksi penghentian siklus sel pada fase G1 melalui uji viabilitas sel dan *flow cytometry* (Nguyen *et al.*, 2019).

2.1.7. Siklus sel dan Flow Cytometry

Siklus sel yang terjadi pada organisme eukariotik terdiri dari 4 fase terpisah antara lain gap 1 (G1), sintesis (S), gap 2 (G2) dan mitosis (M),

sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 2.2** Pada awal siklus hidupnya, sel akan melalui fase G₁, pada fase ini sel akan aktif memproduksi berbagai jenis protein yang nantinya akan digunakan dalam pertumbuhan sel dan replikasi DNA. Selanjutnya pada fase S akan terjadi replikasi atau penggandaan DNA sebelum memulai pembelahan. Kemudian sel akan melalui fase G₂, pada fase ini, sel memastikan bahwa salinan DNA yang baru dibuat tidak memiliki kerusakan, diikuti pertumbuhan sel dan bersiap untuk pembelahan. Pembelahan sel terjadi selama fase M, sel akan membelah menjadi dua sel anak, sel-sel anak ini kemudian bisa memulai siklus pertumbuhan baru atau memasuki fase istirahat sementara atau fase G₀. Fase G₀ merupakan keadaan diam yang penting bagi homeostasis sel, sel akan diregulasi untuk berhenti berkembang biak atau kembali memasuki siklus sel dan memperbarui diri ketika dibutuhkan (Mens & Ghanbari, 2018).



Gambar 2.2 Diagram Siklus Sel

Sumber: (Shelli carter, 2024)

Setiap akan melalui tahap-tahap pembelahan sel, sel akan diperiksa pada *check point* (CP) seperti antara G₀ dan G₁ (CP restriksi), terminal antara G₁ dan S (CP G₁), terminal antara G₂ dan M (CP G₂) dan

terminal perakitan spindel terkait mitosis (SAC). *Check point* tersebut berperan dalam memeriksa kesalahan genetik pada sel yang akan berproliferasi. Salah satu mekanisme abnormalitas yang terjadi pada siklus sel kanker, adalah sel kanker mampu mengabaikan *check point* yang terdapat dalam siklus sel, sehingga sel kanker dapat berproliferasi secara tidak terkendali meskipun terjadi akumulasi penyimpangan genetik (Fuentes-Antrás *et al.*, 2024).

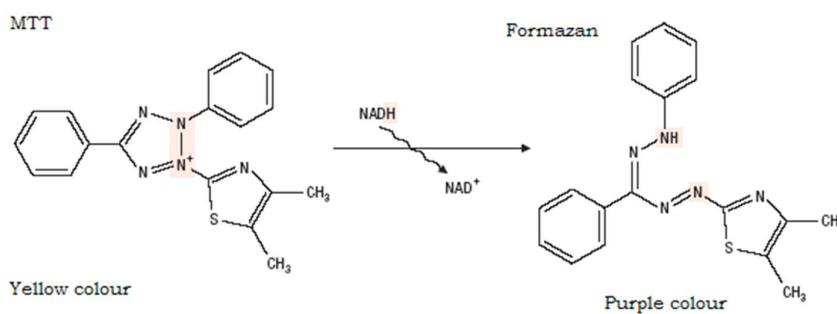
Identifikasi distribusi sel selama berbagai fase siklus sel dapat dilakukan dengan menggunakan pengujian *flow cytometry*, pada dasarnya *flow cytometry* dilakukan untuk mengukur secara kuantitatif dengan cepat kandungan DNA inti sel dalam setiap fase siklus sel yaitu fase G1, S (fase sintesis DNA), fase G2, dan fase M (mitosis). Prinsip dasar metode ini adalah penggunaan pewarna fluoresen yang berikatan dengan DNA, jumlah pewarna yang terikat sebanding dengan jumlah DNA dalam sel. DNA yang telah diwarnai kemudian diukur dalam *flow cytometer* dan sinyal fluoresensi yang dipancarkan diubah menjadi sinyal elektronik dengan tinggi (amplitudo) yang sebanding dengan total emisi fluoresensi dari sel, setelah itu, data fluoresensi tersebut dianggap sebagai pengukuran kandungan DNA sel. Namun fase G2 dan M memiliki kandungan DNA yang mirip tidak dapat dibedakan berdasarkan perbedaan kandungan DNA, sehingga perangkat lunak analisis data *flow cytometry* telah dikembangkan menggunakan model matematika yang cocok dengan pola data histogram DNA untuk menghitung estimasi persentase sel yang berada pada masing-masing fase siklus sel (Kim & Sederstrom, 2015).

2.1.8. Viabilitas sel dan MTT Assay

Viabilitas sel merupakan indikator yang menandakan kemampuan sel untuk bertahan hidup dan menjalankan metabolismenya. Semakin tinggi nilai viabilitas sel, maka jumlah sel yang bertahan hidup semakin banyak pula, sehingga potensi sel untuk bertahan hidup dan berkembang juga semakin tinggi. Viabilitas sel dapat digunakan sebagai indikator dalam menentukan efek dan potensi sitotoksik suatu material, sehingga

sangat sesuai untuk mengukur viabilitas sel kanker terhadap suatu kandidat obat. Uji Viabilitas banyak digunakan untuk mengetahui kemampuan bertahan hidup sel kanker terhadap potensi suatu bahan atau obat, apakah bersifat toksik terhadap sel kanker tersebut atau tidak, untuk keperluan riset kanker, uji viabilitas banyak digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dan juga untuk penentuan indeks kombinasi obat sitotoksik. Apabila suatu bahan bersifat sitotoksik, maka dapat menimbulkan penurunan proliferasi dan viabilitas sel kanker tersebut (Kamiloglu *et al.*, 2020).

Uji reduksi tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) merupakan metode yang dirancang untuk menilai viabilitas sel dalam jumlah besar secara cepat dan efisien. Pengukuran metode ini dapat dilakukan menggunakan alat *ELISA reader* atau spektrofotometer UV-Vis pada 570 nm. Enzim suksinat dehidrogenase yang terletak di mitokondria sel hidup berperan dalam mereduksi MTT yang semula berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu, mekanisme reduksi dipicu oleh NADH atau molekul pereduksi serupa yang dihasilkan sel melalui transfer elektron ke MTT.



Gambar 2.3 Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan

Sumber: (Kamiloglu *et al.*, 2020).

Sel yang mati tidak mampu mengubah reagen MTT menjadi formazan, sehingga pembentukan warna formazan menjadi penanda jumlah sel yang hidup. Oleh karena itu semakin tinggi intensitas warna yang dibaca

absorbansinya, maka menandakan viabilitas sel semakin tinggi, dan menandakan semakin banyak pula sel yang mampu bertahan hidup (Kamiloglu *et al.*, 2020).

2.1.9. Migrasi sel dan *Wound Healing Assay*

Migrasi sel merupakan mekanisme penting yang mendasari banyak proses biologis, termasuk perkembangan embrio, penyembuhan luka, dan pembentukan tumor. Untuk menjaga homeostasis tubuh, dalam lingkungan biologis sel-sel hidup harus mampu mendeteksi dan merespons berbagai sinyal kimia dan fisik untuk bermigrasi secara terarah sehingga dapat menjalankan program morfogenetik selama perkembangan, meningkatkan respons imun, dan memperbaiki jaringan yang rusak. Disfungsi migrasi sel dapat mengakibatkan beberapa gangguan kognitif, luka kronis, dan imunodefisiensi. Selain itu migrasi sel yang berjalan tidak terarah dapat memicu munculnya kanker metastasis invasif, penyakit autoimun, dan fibrosis (SenGupta *et al.*, 2021).

Sel kanker memiliki kemampuan untuk bermigrasi dengan menginvasi jaringan disekitarnya dan bermetastasis ke organ yang lebih jauh dengan baik. Pengaturan metabolisme merupakan karakteristik khas sel kanker saat bermigrasi. Studi terkini mengindikasikan adanya korelasi kuat antara sinyal mekanik dan metabolisme sel selama proses migrasi. Sel yang sedang bermigrasi secara aktif mampu mengadaptasikan profil metabolisme mereka sebagai respons terhadap perubahan lingkungan mikro, termasuk sinyal mekanik dan struktural. Mekanisme invasi-metastasis adalah salah satu contoh migrasi pada sel kanker yang terdiri dari berbagai proses biologis kompleks, terdiri dari beberapa peristiwa utama sebagai berikut: (1) invasi lokal membran dasar dan migrasi sel, (2) intravasasi ke dalam sistem pembuluh darah dan/atau limfatik, (3) bertahan hidup dalam sirkulasi, (4) penghentian di lokasi organ yang jauh dan ekstrasvasasi, dan (5) kolonisasi di lokasi metastasis (Zanotelli *et al.*, 2021).

Metode yang sering digunakan dalam mengetahui migrasi sel adalah *wound healing assay*, kemampuan migrasi sel diamati dengan melihat kemampuan sel dalam menutup luka yang telah dibuat. Metode ini diawali dengan membuat luka kecil pada lapisan sel monolayer, kemudian mengamati bagaimana pergerakan sel secara mendetail menggunakan mikroskop khusus yang merekam gambar secara terus-menerus, untuk memastikan bahwa yang diamati adalah pergerakan sel bukan pertumbuhan sel baru. Penentuan migrasi sel juga dapat dilakukan dengan mengkuantifikasi lebar goresan yang terbentuk pada jam ke-0 diikuti pengamatan pada interval waktu yang ditentukan (jam ke-6, 12, 18, 24) hingga sel bermigrasi untuk menutup goresan (Grada *et al.*, 2017).

2.1.10. Apoptosis sel dan *Dual Stain Assay*

Apoptosis didefinisikan sebagai kematian sel yang diinisiasi oleh mekanisme genetik seperti kerusakan atau fragmentasi DNA. Apoptosis berjalan melalui mekanisme biologis yang diatur oleh gen, gen akan mengidentifikasi sel-sel yang sudah tua, rusak, atau berpotensi berbahaya kemudian akan dihancurkan secara terkontrol. Proses ini berperan krusial dalam mencegah proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA, yang seringkali menjadi cikal bakal sel kanker (Yuliasih *et al.*, 2017).

Kemampuan perubahan genetik dalam sel kanker yang membuat sel kanker dapat tumbuh dengan cepat adalah mekanisme penghindaran apoptosis. Sel kanker menghindari apoptosis dengan cara mengacaukan sistem protein yang mengatur kematian sel, mengurangi jumlah enzim kaspase yang penting dalam proses apoptosis, dan mengganggu jalur sinyal yang seharusnya memicu apoptosis sel ketika ada kerusakan (Wong, 2011).

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi apoptosis yang terjadi pada sel, salah satunya adalah metode *dual stain assay* menggunakan *acridine orange* (AO) dan *ethidium bromide* (EB), pewarnaan didasarkan pada perbedaan permeabilitas membrane sel yang hidup dengan yang mati, AO dapat menembus

membran sel hidup maupun mati, sedangkan EB hanya dapat menembus membran sel yang rusak atau mati. Sel hidup yang diwarnai AO akan memancarkan fluoresensi hijau, sedangkan sel mati yang diwarnai EB akan memancarkan fluoresensi merah. Metode ini dapat secara akurat membedakan berbagai tahap dalam apoptosis, dengan mengamati fluoresen yang terbentuk pada mikroskop fluorosen. Semakin banyak sel yang mati karena nekrosis dan fragmentasi, menandakan semakin banyak pula sel yang mengalami apoptosis melalui terbentuknya badan-badan apoptosis (*early apoptosis*). Analisis kuantitatif lanjutan dapat dilakukan dengan *flow cytometry* untuk mendapatkan data kuantitatif mengenai persentase sel hidup, apoptosis, dan nekrosis dalam populasi sel. (K. Liu *et al.*, 2015).

2.1.11. Mikroalga *C. pyrenoidosa*

Mikroalga merupakan golongan organisme tumbuhan yang berukuran mikroskopik, hidup di perairan tawar maupun di perairan asin. Secara morfologi, mikroalga merupakan organisme yang memiliki sel satu (uniseluler), dapat hidup dalam bentuk koloni atau individual, seperti kebanyakan tumbuhan. Sebagian besar mikroalga bersifat fotosintetik untuk menghasilkan makanannya sendiri. Mikroalga sendiri saat ini banyak dikembangkan karena terbukti kaya akan nutrisi yang dapat dikembangkan sebagai bahan baku industri farmasi, kosmetika, makanan dan *biofuel* (Gilmour, 2019).

Chlorella merupakan organisme mikroskopis bersel tunggal dari kelompok alga hijau, telah populer digunakan sebagai suplemen makanan di kawasan Asia Timur. Berbagai penelitian telah mengindikasikan potensi spesies *chlorella* atau ekstraknya dalam memodulasi respons imun, menurunkan beban virus hepatitis C, dan menghambat proliferasi sel kanker pada berbagai jenis kanker, termasuk kanker prostat, paru-paru, hati, dan kolorektal dalam model *in vitro* (Lin *et al.*, 2017a).

Genus *Chlorella* sp. terdiri dari 26 spesies *chlorella* namun hanya beberapa spesies saja yang banyak dibudidaya seperti *C. vulgaris* dan *C.*

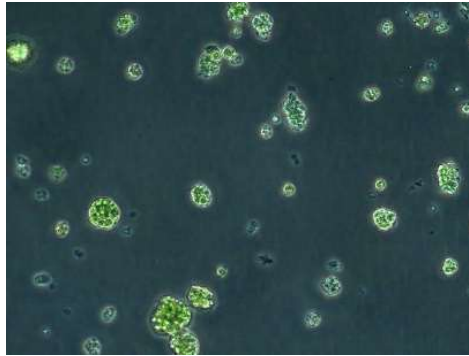
pyrenoidosa (Azam *et al.*, 2022). Genus *Chlorella sp.* pertama kali ditemukan oleh Beijerinck yaitu spesies *C. vulgaris* pada tahun 1890, kemudian dikembangkan oleh ahli biokimia Jerman Otto Warburg pada tahun 1920 dengan memperkenalkan sistem eksperimen baru kultur cair alga hijau dari genus *Chlorella sp.*, sejak saat itu, ditemukan sebagian besar spesies *Chlorella* yang digolongkan dalam satu genus *Chlorella* berdasarkan persamaan morfologinya. *Chlorella* memiliki potensi yang sangat besar karena banyak digunakan sebagai sumber makanan serta pengobatan tradisional berbagai penyakit (Vaupel *et al.*, 2019; Champenois *et al.*, 2015). Beberapa peranan genus *Chlorella sp.* dalam bidang kesehatan dan pengobatan adalah memodulasi sistem imun, mengurangi beban virus hepatitis C, dan menghambat pertumbuhan berbagai jenis sel kanker, termasuk kanker prostat, paru-paru, payudara, hati, dan usus besar pada model *in vitro* (Lin *et al.*, 2017).

Salah satu spesies *Chlorella* yang telah terbukti mampu memberikan efek antikanker adalah *C. pyrenoidosa*.

Klasifikasi mikroalga *C. pyrenoidosa*:

Kingdom : Plantae
 Filum : Chlorophyta
 Ordo : Chlorococcales
 Famili : Chlorellaceae
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella pyrenoidosa*

(Schoch *et al.*, 2020)



Gambar 2.4 Foto Mikroskopis *C. Pyrenoidosa* yang Telah Dipecah Dinding Selnya

Sumber: Dokumentasi penelitian

Penelitian tentang potensi antikanker *C. pyrenoidosa* telah banyak dilakukan, seperti penelitian yang telah dilakukan oleh tim kami yang menunjukkan bahwa EME *C. pyrenoidosa* memiliki potensi sebagai antikanker. EME *C. pyrenoidosa* didapatkan dengan melakukan ekstraksi metode maserasi dari simplisia *C. pyrenoidosa* (Earth Circle Organics®) *food grade* yang telah dipecah dinding selnya dalam etanol p.a selama 3 kali 24 jam. Perbandingan simplisia dan pelarut etanol yang digunakan adalah 1:10 (b/v) pada hari pertama dan kedua, serta 1:5 (b/v) pada hari ketiga, kemudian dikeringkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Sebelum dilakukan pengujian, EME *C. pyrenoidosa* didilusi terlebih dahulu Mili-Q® dan disesuaikan pHnya dengan penambahan NaOH, kemudian dikeringkan hingga menjadi serbuk dengan *freeze dryer*. Identifikasi awal EME *C. pyrenoidosa* menggunakan KLT dan HPLC menunjukkan bahwa EME *C. pyrenoidosa* mengandung metabolit lutein yang mampu bertindak sebagai antikanker. EME *C. pyrenoidosa* yang diuji pada sel kanker payudara MDA-MB-231 menunjukkan efek sitotoksik sedang, ditunjukkan dengan penurunan persentase viabilitas sel dengan nilai IC₅₀ 479,04 µg/mL. Selain itu pengujian EME *C. pyrenoidosa* terhadap migrasi sel dengan metode *wound healing* juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding dengan kontrol, memiliki presentase penghambatan sebesar 78,47% dibandingkan dengan kontrol media 90,18%, maupun

kontrol DMSO 89,00%. Hasil pengujian apoptosis *dual stain* dan siklus sel menggunakan *flow cytometry* juga menunjukkan bahwa EME *C. pyrenoidosa* memiliki kemampuan induksi terjadinya apoptosis yang signifikan dibanding kontrol, dan penghambatan pada fase G1 dan G2/M arrest (Aprianto, 2024).



2.2. Hasil Penelitian Terdahulu

Keaslian penelitian dapat diperoleh dari batasan-batasan artikel ilmiah berikut:

Tabel 2.1 Hasil Penelitian Terdahulu

Judul Artikel	Perlakuan	Hasil Penelitian	Kesimpulan Penelitian	Persamaan dan Perbedaan Penelitian	Referensi
Methanol Extract of Aerial Parts of <i>Pavetta indica</i> L. Enhances the Cytotoxic Effect of doxorubicin and Induces Radiation Sensitization in MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cells.	Pemberian tunggal ekstrak metanol daun dan cabang <i>Pavetta indica</i> L. (MEPI) dan kombinasi dengan doxorubicin dengan konsentrasi ekstrak (0, 5, 10, 20, 40, 80 µg/mL) dan konsentrasi doxorubicin sebesar (0; 0,5; 1; 2 µM) pada sel KPTN MDA-MB-231.	- Uji Viabilitas sel MEPI memberikan nilai IC_{50} sebesar 25.2 dan 21.2 µg/mL pada 24 dan 48 jam. - Analisis <i>flow cytometry</i> MEPI terjadi pada fase sub-G1 pada sel MDA-MB-231 dengan mekanisme fragmentasi inti dan kondensasi kromatin. - MEPI menghambat metastasis sel MDA-MB-231 pada uji migrasi sel. - Uji Viabilitas sel kombinasi MEPI dan doxorubicin memberikan nilai indeks kombinasi yang signifikan dengan nilai CI terbaik pada kombinasi 10 µg/mL MEPI dan 0,5 µM doxorubicin.	MEPI memberikan efek sinergis dengan doxorubicin pada sel-sel MDA-MB-231 dengan mengurangi pembentukan koloni dan menginduksi penghentian siklus sel pada fase sub-G1.	Persamaan: Meneliti potensi sinergitas pemberian kombinasi ekstrak dengan doxorubicin Perbedaan: penelitian tidak menggunakan Ekstrak <i>C. pyrenoidosa</i> .	(Nguyen <i>et al.</i> , 2019)

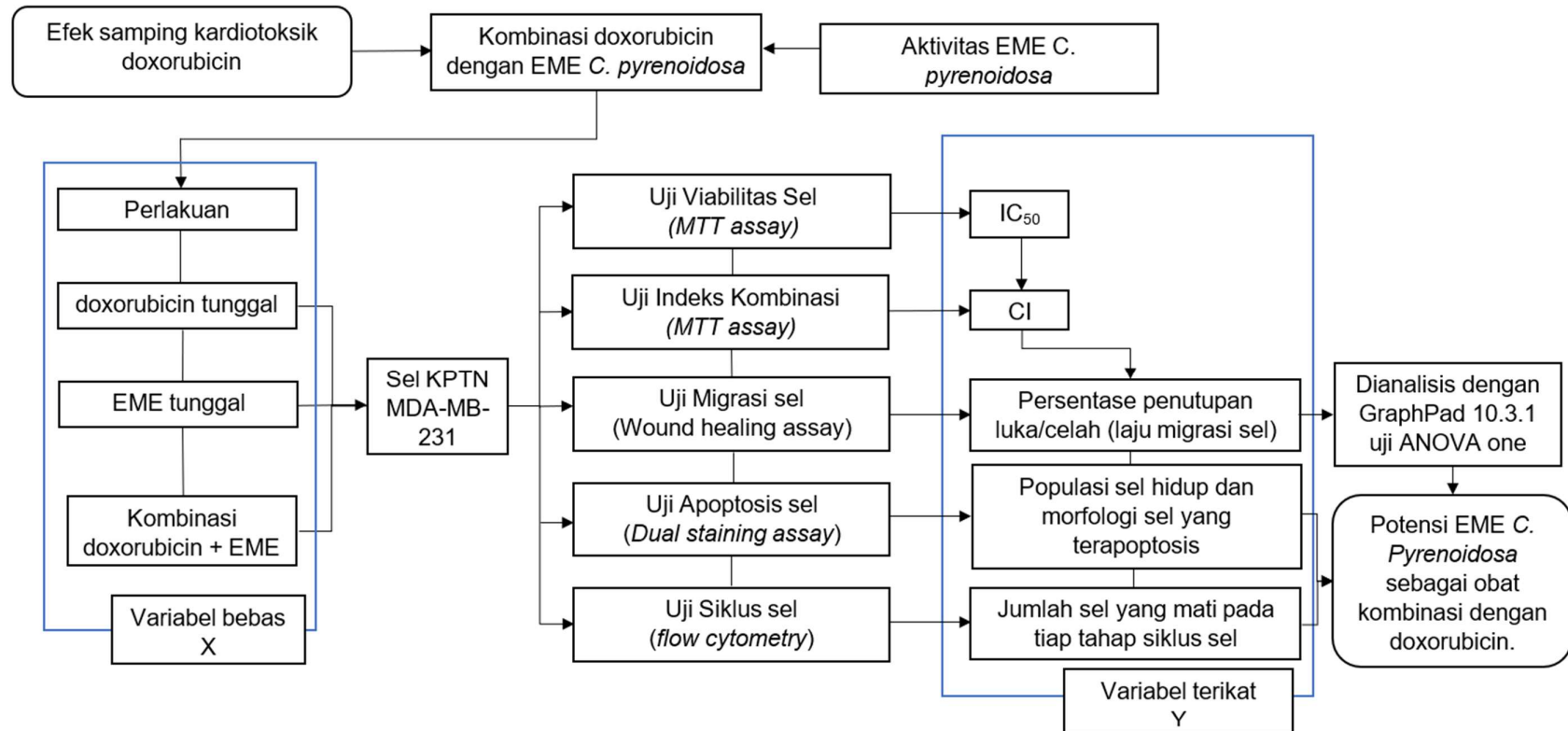
Anti-cancer therapeutic benefit of red guava extracts as a potential therapy in combination with doxorubicin or targeted therapy for triple-negative breast cancer cells.	Pemberian dua jenis ekstrak buah jambu biji merah (ekstrak total dan ekstrak dengan BM lebih kecil <30 kDa / LMW) pada sel payudara normal MCF-10A dan kedua jenis sel KPTN MDA-MB-231, dan MDA-MB-468.	• Uji Viabilitas sel pemberian ekstrak LMW menunjukkan persentase viabilitas sel yang lebih kecil dibanding ekstrak total dan kontrol dalam menurunkan viabilitas sel KPTN MDA-MB-231 dan MDA-MB-468. • Uji mekanisme apoptosis (<i>flowcytometry</i>) ekstrak total dan LMW pada kedua jenis sel KPTN terjadi pada fase sub G1 melalui jalur nekrosis pada sel MDA-MB-231, dan jalur apoptosis pada sel MDA-MB-468. • Uji sitotoksik ekstrak total dan LMW mengaktifkan jalur pensinyalan caspase-3/PARP untuk menginduksi sitotoksitas pada kedua jenis sel KPTN. • Kombinasi doxorubicin dengan ekstrak total dan LMW meningkatkan aktivitas antikanker secara signifikan pada sel KPTN MDA-MB-231 dan MDA-MB-468.	Ekstrak total dan LMW buah jambu biji merah menunjukkan efek antikanker yang signifikan dalam pemberian tunggal ataupun kombinasi dengan doxorubicin pada sel KPTN MDA-MB-231 dan MDA-MB-468.	Persamaan: Meneliti potensi kombinasi ekstrak dengan doxorubicin Perbedaan: penelitian tidak menggunakan Ekstrak <i>C. pyrenoidosa</i>.	(H. C. Liu <i>et al.</i>, 2020)
--	---	--	--	--	--

Judul Artikel	Perlakuan	Hasil Penelitian	Kesimpulan Penelitian	Persamaan dan Perbedaan Penelitian	Referensi
Uji Aktivitas Antikanker (<i>C. pyrenoidosa</i>) Pada Sel Kanker Payudara Triple Negative MDA-MB-231.	Pemberian Ekstrak Mikroalga Etanol dan Air <i>C. pyrenoidosa</i> (EME <i>C. pyrenoidosa</i> dan EMA <i>C. pyrenoidosa</i>) pada sel KPTN MDA-MB-231.	• Uji Viabilitas sel pemberian EME dan EMA berturut-turut memberikan nilai IC₅₀ sebesar 479,04 µg/mL dan 1815,09 µg/mL selama 48 jam. • Uji Migrasi sel EME dan EMA menghambat laju migrasi sel MDA-MB-231 dengan persentase wound healing 78,47% dibandingkan dengan kontrol media 90,18%, maupun kontrol DMSO 89,00%. • Uji Apoptosis sel menunjukan banyak sel mati pada EME 500 µg/mL dibanding EMA 1000 µg/mL kontrol DMSO 1% dan PBS 20%. • Analisis <i>Flow Cytometry</i> menunjukan perbedaan signifikan pada EME 250 µg/mL dibanding EMA 1000 µg/mL kontrol DMSO 0,5% dan PBS 10% dengan induksi apoptosis pada fase G1 dan G2/M <i>arrest</i>.	EME dan EMA memiliki potensi sebagai antikanker payudara berdasarkan pengujian pada sel KPTN MDA-MB-231, dengan efek sitotoksik EME yang lebih kuat dibanding EMA.	Persamaan: Menggunakan Ekstrak Mikroalga Etanol dan Air <i>C. pyrenoidosa</i> dalam pengujian anti kanker payudara KPTN Perbedaan: penelitian ini tidak membahas Kombinasi EME dengan doxorubicin.	(Aprianto <i>et al</i> , 2024)

Judul Artikel	Perlakuan	Hasil Penelitian	Kesimpulan Penelitian	Persamaan dan Perbedaan Penelitian	Referensi
Synergism of antiproliferative effects of young green barley and chlorella water extracts against human breast cancer cells.	Pemberian ekstrak air <i>C. pyrenoidosa</i> (CH) dan ekstrak barley hijau muda (YGB) dengan konsentrasi 0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000 µg/mL pada sel kanker payudara T47D.	- Uji Sitotoksisitas (LDH) menunjukkan efek sitotoksik dengan merusak dinding sel yang bergantung pada konsentrasi terhadap sel T47D. konsentrasi tertinggi memberi peningkatan aktivitas sitotoksik hingga 43,5% dengan ekstrak CH. - Uji <i>MTT</i> assay dan <i>BrdU</i> menunjukkan penurunan signifikan proses metabolik dan proliferasi sel T47D dengan penurunan aktivitas metabolic sel pada konsentrasi tertinggi hingga 56,0% dengan ekstrak CH dan penurunan proliferasi hingga 47,6% dengan ekstrak CH.	Ekstrak air <i>C. pyrenoidosa</i> dan ekstrak barley hijau muda menunjukkan efek kemopreventif melalui mekanisme penghambatan aktivitas metabolik dan sintesis DNA dalam sel kanker, serta gangguan integritas membran sel sel kanker (efek sitotoksik).	Persamaan: Menggunakan ekstrak <i>C. pyrenoidosa</i> dalam model <i>in vitro</i> sel kanker payudara Perbedaan: tidak dikombinasikan dengan doxorubicin, tidak menggunakan ekstrak etanol <i>C. pyrenoidosa</i> , dan tidak menggunakan sel KPTN MDA-MB-231.	(Lemieszek & Rzeski, 2023)

Judul Artikel	Perlakuan	Hasil Penelitian	Kesimpulan Penelitian	Persamaan dan Perbedaan Penelitian	Referensi
Antineoplastic effects of chlorella pyrenoidosa in the breast cancer model.	Pemberian ekstrak <i>C. pyrenoidosa</i> dengan konsentrasi 0,0012mg/mL hingga 1,25mg/mL pada sel kanker payudara MCF-7.	• Uji Viabilitas <i>MTT</i> assay menunjukkan hasil berbeda signifikan dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi ($p < 0,05$). • Uji proliferasi sel (<i>BrdU</i>) <i>C. pyrenoidosa</i> secara signifikan penurunan proliferasi sel MCF-7 pada konsentrasi 1,25 hingga 0,0049 mg/mL ($P < 0,001$; $P < 0,05$). • Uji Apoptosis menunjukkan tingkat fluoresensi DHR-123 pada sel yang diberi <i>chlorella</i> mengalami peningkatan yang signifikan ($P < 0,05$; $P < 0,01$), terjadi pembentukan ROS untuk memicu apoptosis sel MCF-7. • Uji <i>flow cytometry</i> menunjukkan induksi apoptosis pada fase sub-G0/G1 dan fase G0/G1.	Hasil percobaan ini menunjukkan efek pro-apoptosis dan antiproliferatif <i>C. pyrenoidosa</i> pada sel MCF-7 secara signifikan, dengan induksi apoptosis yang terjadi pada fase sub-G0/G1 dan fase G0/G1.	Persamaan: menggunakan ekstrak <i>C. Pyrenoidosa</i> dalam percobaan <i>in vitro</i> kanker payudara Perbedaan: tidak dikombinasi dengan doxorubicin dan tidak dilakukan pada sel KPTN MDA-MB-231.	(Kubatka <i>et al.</i> , 2015)

2.3. Kerangka Berpikir



Bagan 2.1 Kerangka Berpikir

sumber: diolah oleh peneliti

2.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

- 1) Kombinasi EME *C. pyrenoidosa* dan doxorubicin mampu menurunkan viabilitas sel KPTN MDA-MB-231 lebih efektif dibandingkan perlakuan tunggal.
- 2) Kombinasi EME *C. pyrenoidosa* dan doxorubicin mampu menghambat laju migrasi sel KPTN MDA-MB-231 lebih signifikan dibandingkan perlakuan tunggal.
- 3) Kombinasi EME *C. pyrenoidosa* dan doxorubicin mampu memberikan hambatan apoptosis yang lebih kuat pada sel KPTN MDA-MB-231 dibandingkan perlakuan tunggal.
- 4) Kombinasi EME *C. pyrenoidosa* dan doxorubicin mampu menyebabkan penghambatan siklus sel KPTN MDA-MB-231 pada fase G0, G1, S, G2, atau M, yang lebih kuat dibandingkan perlakuan tunggal.

