

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling sering dialami wanita di seluruh dunia. Kasus kanker payudara menempati urutan teratas diantara jenis kanker lain dengan jumlah kasus 11,7% dari total kejadian kanker di dunia. Kematian yang diakibatkan kanker payudara juga masih cukup tinggi, berkisar 6,9% dari total kematian karena kanker. Kasus kanker payudara pada wanita di Indonesia masih menduduki peringkat pertama dengan jumlah kasus 30,8% dari total kasus kanker pada wanita kemudian diikuti kanker serviks uteri dan ovarium (1). Insidensi dan mortalitas akibat kanker payudara yang masih cukup tinggi menjadikan dasar untuk terus dilakukan penelitian tentang pengembangan terapi yang telah ada sebelumnya.

Kemoterapi merupakan salah satu strategi terapi kanker payudara selain pembedahan, radioterapi, ataupun terapi target seperti terapi endokrin atau antibodi monoklonal HER-2. Kemoterapi tergolong sebagai terapi sistemik. Kemoterapi berbasis antrasiklin merupakan salah satu pilihan terapi yang masih direkomendasikan, baik sebagai *neoadjuvant* ataupun *adjuvant* (2–4). Kemoterapi *neoadjuvant* (NAC) diberikan sebelum tindakan operasi pada pasien dengan kanker payudara dini atau stadium lanjut lokal dengan tujuan untuk memperkecil ukuran tumor sehingga memungkinkan dilakukan operasi. Saat ini terdapat bukti yang cukup jika NAC mengarah pada respon patologis yang lengkap maka akan menghasilkan *outcome* terapi yang baik (5). Salah satu standar terapi kanker payudara yang berbasis

antrasiklin adalah regimen adriamisin siklofosfamid (AC). Penggunaan regimen AC sebagai *neoadjuvant* menghasilkan respon klinis dan patologis sebesar 40.1% dan 13.7% dan meningkat menjadi 63,6 dan 26,1% setelah ditambah docetaxel (6). Penambahan bevacizumab untuk *neoadjuvant* nab-paclitaxel dengan AC memperbaiki *pathologic complete response* (pCR) pada kanker payudara dengan inflamasi atau tahap lanjut (*locally advanced breast cancer*) (7). Hasil penelitian meta-analisis pada pasien yang menerima NAC berbasis antrasiklin secara keseluruhan menunjukkan hasil pCR dan operasi konservasi payudara masing-masing sebesar 26,5% dan 70,6% (8).

Kemoterapi regimen AC terdiri dari doksorubisin dan siklofosfamid. Penggunaan kedua senyawa ini secara berurutan pada hari yang sama dan diberikan 4 atau 6 siklus (9). Mekanisme sitotoksik doksorubisin melalui penghambatan enzim topoisomerase II dalam kompleks DNA dan pembentukan radikal bebas sehingga memicu apoptosis sel kanker (10). Siklofosfamid termasuk golongan senyawa pengalkil mempunyai efek sitotoksik dengan cara merusak DNA karena adanya metilasi sehingga menghambat proliferasi sel kanker (11). Kombinasi dua senyawa ini saling sinergis dalam memberikan efek antitumor. *Hallmark* kanker yang kompleks menyebabkan efikasi antitumor dari kombinasi senyawa sitostatik masih kurang optimal (12). Selain itu salah satu penyebab kurang optimalnya *outcome* terapi adalah adanya kemoresistensi (13).

Kemoresistensi digambarkan sebagai rendahnya efikasi kemoterapi untuk menghasilkan respon terapi yang diharapkan. Kemoresistensi merupakan salah satu tantangan utama dalam pengobatan kanker payudara. Mekanisme kemoresistensi pada kanker payudara melibatkan absorpsi obat pada membran sel, protein transporter, onkogen dan gen penekan

tumor, *DNA repair*, *stem cells*, *Tumor Microenvironment* (TME) dan *Epithelial-Mesenchymal-Transition* (EMT). Pengawasan kemoresistensi dapat dilakukan melalui pendekatan terapi gen atau terapi imun (14,15).

Sel-sel stromal seperti fibroblast, sel imun, sel *endothelial vascular*, serta komponen lain seperti matriks ekstraselular yang berada di TME memiliki peran dalam respon tumor terhadap kemoterapi. *Tumor Associated Macrophage* (TAM) dan *Tumor Infiltrating Lymphocyte* (TIL) merupakan sel imun dalam TME yang berkaitan dengan kemoresistensi. TAM diturunkan atau berkaitan dengan sel myeloid yang immature, *Myeloid Derivative Suppressive Cells* (MDSC) (13). Over ekspresi dari M2, suatu makrofag pro-tumorigenik dalam lingkungan mikro tumor, berkaitan dengan tidak adanya respon klinik pada pasien dengan NAC berbasis antrasiklin (16). Terapi dengan target TAM yang dikombinasikan dengan kemoterapi terbukti dapat memperbaiki efikasi terapi (15). TIL, utamanya sel T CD8, dan sel MDSC merupakan sel imun yang bekerja berlawanan dalam TME. Aktivitas sel T sitotoksik CD8 menghasilkan respon imun antitumor, sedangkan sel MDSC memiliki peran immunosupresi (17). MDSC yang terinfiltrasi dalam tumor terbukti berkorelasi dengan gambaran patologi klinik, respon kemoterapi dan prognosis pasien kanker payudara (18). MDSC dalam hewan coba seperti tikus dapat diidentifikasi lewat ekspresi biomarker CD11b (19). Tumor Infiltrasi Limfosit (TIL) CD8 dapat dijadikan sebagai faktor prediktif terhadap pCR dari pasien kanker payudara primer yang mendapat terapi sistemik berbasis antrasiklin (20).

p53 adalah protein penekan tumor, merupakan faktor transkripsi yang merespon berbagai macam stress dari luar, berperan dalam menjaga kerusakan DNA, menghambat

pembelahan sel melalui penundaan siklus sel dan apoptosis. Penelitian *in vitro* membuktikan bahwa hilangnya p53 dapat meningkatkan resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapi. Inaktivasi fungsi p53 karena terbentuknya mutan p53 berhubungan dengan perkembangan kanker, progressi, metastasis, dan resistensi terhadap kemoterapi atau radioterapi. Bentuk mutan p53 juga menyebabkan resistensi terhadap apoptosis (21,22). Ekspresi p53 terkait secara bermakna dengan pCR setelah pemberian NAC pada pasien kanker payudara tipe TNBC (23). Ekspresi p53 juga merupakan faktor prediktor yang efektif dan handal dari respon pengobatan NAC (24).

Ki-67 yang merupakan biomarker proliferasi sel kanker memberikan informasi prediksi independen untuk respon kemoterapi *neoadjuvant* dan pencapaian respon patologis yang lengkap (25). Caspase-3, suatu protease asam sistein-aspartat memiliki peran penting dalam jalur signaling apoptosis. Ekspresi *cleaved caspase-3* merupakan faktor prediksi respons kemoterapi yang baik tetapi jadi faktor prognosis yang buruk untuk pasien dengan kanker payudara triple-negatif primer lanjut (26).

Dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan produk fitoterapi dan suplemen nutrisi sebagai komplemen pengobatan oleh wanita dengan riwayat kanker payudara telah meningkat secara signifikan. Dalam sebuah studi menyebutkan bahwa 74,1% dari 448 responden menggunakan terapi komplemen berbasis biologi ini bersama terapi kanker sistemik. Suplementasi vitamin dan mineral paling sering digunakan sebesar 72,3% sedangkan produk herbal atau fitoterapi hanya berkisar 30,1%. Kekurangan bukti ilmiah yang berkualitas dan bukti klinik tentang keamanan dan efikasi dari produk fitoterapi atau suplemen nutrisi masih menjadi masalah (27,28).

Diantara banyaknya bahan alam yang tersedia di Indonesia, bit adalah salah satu herbal yang secara empiris digunakan bersama terapi sistemik kanker payudara. Hasil penelitian observasional terhadap pasien kanker di Trinidad menyebut 19,3% dari responden menggunakan bit untuk tujuan penyembuhan kanker atau mengurangi efek samping kemoterapi (29). Hasil penelitian *in vivo* pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian ekstrak bit menurunkan kerusakan DNA secara signifikan dan meningkatkan proliferasi sel sel progenitor hematopoietik pada mencit C57BL/6 yang dipapar radiasi sinar  $\gamma$  selama 10 hari (30). Penelitian terhadap aktivitas inflamasi yang berkaitan dengan respon imun dari ekstrak bit juga telah dilakukan. Efek antiinflamasi dari betalain bit telah diketahui baik secara *in vitro* (31,32) ataupun *in vivo* (33–36). Betalain mampu mengurangi level protein sitokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, dan IL-1 $\beta$ , oksigen reaktif, juga aktivitas enzim COX-2 dan lypoksigenase (LOX) sehingga menyebabkan pengurangan PGE2 dan LOX-5. Bahkan betasianin dan betasantin dapat menurunkan aktivitas protein activator faktor transkripsi dan NF-kB (37). Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka herbal ekstrak bit diduga mampu mengatasi kemoresistensi dengan target sel imun dalam TME seperti TAM dan TIL, dalam hal ini digambarkan sebagai kadar mRNA MDSC (CD11b) dan sel T CD8.

Meskipun secara klinik belum ada data keamanan dan efikasi dari bit namun terdapat beberapa bukti ilmiah tentang aktivitas sitotoksik dari bit melalui penelitian eksperimental secara *in vitro*. Kandungan pigmen dalam bit yaitu betasantin dan betasianin merupakan senyawa aktif yang bertanggungjawab terhadap aktivitas sitotoksiknya. Ekstrak bit menunjukkan aktivitas sitotoksik pada sel kanker prostat dan payudara tipe reseptor estrogen positif secara *in vitro* (38). Penelitian lain menyatakan bahwa kombinasi ekstrak bit dan

doksorubisin memberikan efek sitotoksik yang sinergis pada sel kanker manusia PaCa (sel kanker pancreas), MCF-7 (sel kanker payudara) dan PC-3 (sel kanker prostat) (39). Mekanisme sitotoksik bit diketahui melalui induksi apoptosis dengan cara aktivasi p53, peningkatan level protein Bad suatu protein pro apoptosis, TRAILR4 suatu reseptor apoptosis jalur ekstrinsik, Fas serta dapat menyebabkan autophagi kematian sel. Ekstrak bit juga mampu merubah potensial membrane mitokondria sel kanker payudara MCF-7 sehingga memacu apoptosis (40). Bukti-bukti penelitian ini mendukung pemakaian ekstrak bit untuk meningkatkan respon sel kanker terhadap regimen AC sebagai *neoadjuvant* melalui peningkatan apoptosis dengan pengamatan biomarker kadar mRNA p53 dan caspase 3.

*Pathologic complete response* (pCR) digunakan sebagai *end point* pada sebagian besar studi yang mengamati respon NAC (41). Secara klinik, penilaian pCR dapat menggunakan berbagai macam standar yang berbeda. pCR juga dapat diperoleh dari penilaian proporsi fibrosis terhadap sel tumor yang digambarkan dengan tidak adanya sel tumor dan sebagian besar fibrosis, atau sel tumor jarang dan tersebar di seluruh fibrosis (42). Respon obyektif terhadap kemoterapi dapat dinilai dari pertumbuhan tumor dengan mengamati perkembangan ukuran tumor yang terdeteksi. Secara klinis, evaluasi terhadap respon ini dapat digunakan kriteria RECIST (43).

Pada penelitian pra klinik model kanker payudara dapat digunakan hewan coba tikus betina strain *Sprague Dawley* (SD) yang diinduksi 7,12-dimetil benz-( $\alpha$ ) antrasena (DMBA). DMBA adalah senyawa *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang merupakan senyawa karsinogen yang poten (44,45). Karakteristik kanker mamma yang terbentuk akibat induksi

DMBA mirip dengan subtipe luminal A pada kanker payudara manusia, yaitu adanya ekspresi ER/PR positif dan Ki-67 yang rendah (46).

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang di atas dapat disusun beberapa pokok perumusan permasalahan sebagai berikut :

1. Respon rate regimen AC yang diberikan sebagai *neoadjuvant* masih belum optimal jika dilihat dari data pCR yang masih rendah.
2. Respon terapi AC yang belum optimal dapat disebabkan oleh adanya kemoresistensi yang melibatkan sel imun dalam TME ataupun hilangnya p53 dalam sel tumor. Regimen AC meningkatkan ekspresi M2 suatu makrofag protumorigenik yang bersifat immunosupresif melalui peningkatan MDSC.
3. Suplementasi fitofarmaka atau herbal bersama kemoterapi merupakan salah satu terapi integrasi yang dapat bermanfaat untuk meningkatkan efikasi kemoterapi, namun bukti klinis tentang keamanan dan efikasinya masih kurang.
4. Ekstrak bit meningkatkan aktivitas proliferasi sel hematopoetik yang terlibat dalam sistem imun dan mampu menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi p53.
5. TIL CD8, Ki-67 dan caspase 3 merupakan biomarker patologi klinik yang berguna sebagai prediktor keberhasilan terapi dan berkaitan dengan pCR.

6. Analisis biomarker respon imun dalam TME, aktivitas proliferasi dan apoptosis dengan metode qRT-PCR dapat dilakukan dengan mengukur kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 dalam jaringan tumor.

Hasil uraian di atas mendorong peneliti untuk mencari penjelasan tentang pengaruh penambahan ekstrak bit terhadap efikasi regimen AC yang diberikan sebagai *neoadjuvant* secara pra klinik melalui pengamatan perkembangan tumor dan respon patologi pada model kanker payudara hewan uji tikus betina SD yang diinduksi DMBA.

Berdasarkan latar belakang masalah di atas dapat disusun rumusan masalah secara umum dan khusus seperti berikut :

### **1. Umum**

Apakah penambahan ekstrak bit berpengaruh terhadap respon terapi regimen AC yang diberikan pada tikus adenokarsinoma mamma melalui petanda seperti volume tumor, respon patologi, respon imun dalam lingkungan mikro tumor, aktivitas proliferasi dan apoptosis?

### **2. Khusus**

- a. Apakah volume tumor pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih kecil dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- b. Apakah respon patologi pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih baik dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?



- c. Apakah kadar mRNA CD8 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- d. Apakah kadar mRNA CD11b pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih rendah dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- e. Apakah kadar mRNA p53 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- f. Apakah kadar mRNA Ki-67 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih rendah dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- g. Apakah kadar mRNA caspase 3 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif?
- h. Apakah perbedaan dosis ekstrak bit mempengaruhi volume tumor, respon patologi, kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3?
- i. Apakah variabel kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 berkorelasi dengan volume tumor?
- j. Apakah variabel kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 berkorelasi dengan respon patologi?

- k. Apakah variabel kelompok perlakuan, kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 merupakan faktor yang mempengaruhi volume tumor dan respon patologi?

### C. Orisinalitas

Telah banyak dilakukan penelitian ekstrak bit terhadap tumor, namun belum pernah ditemukan penelitian tentang pengaruh penambahan ekstrak bit pada kemoterapi regimen AC baik secara pra klinik ataupun klinik (Tabel 1.1).

**Tabel 1.1. Publikasi Ilmiah Hasil Penelitian Umbi Bit**

No	Penulis	Judul/penerbit	Desain	Hasil
1	Cho J, et al. (30)	Beetroot ( <i>Beta vulgaris</i> ) rescues mice from $\gamma$ -ray irradiation by accelerating hematopoiesis and curtailing immunosuppression  <i>Pharm Biol</i> , 2016, <b>55</b> (1): 306-316	Eksperimental pada mencit	Pemberian ekstrak umbi bit menurunkan secara signifikan kerusakan DNA dan meningkatkan proliferasi sel sel progenitor hematopoietic pada mencit C57BL/6 yang dipapar radiasi sinar $\gamma$ selama 10 hari.
2	Nowacki L, et al.(40)	Betanin-Enriched Red Beetroot ( <i>Beta vulgaris</i> L.) Extract Induces Apoptosis and Autophagic Cell Death in MCF-7 Cells  <i>Phytother.Res.</i> , 2015, <b>29</b> : 1964-1973	Eksperimental pada sel line	Ekstrak umbi bit dengan kandungan campuran betanin dan isobetanin memiliki efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan mekanisme antiproliferasi dan induksi apoptosis melalui aktivasi p53, peningkatan level

				protein pro apoptosis Bad TRAIL 4, Fas dan induksi autophagi.
3	Kapadia GJ, et al.(39)	Synergistic cytotoxicity of red beetroot ( <i>Beta vulgaris</i> L.) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines  <i>Complement Integr. Med.</i> , 2013; <b>10</b> (1):113-122	Eksperimental pada sel line	Kombinasi ekstrak umbi bit dan doksorubisin memberikan efek sitotoksik yang sinergis pada sel kanker manusia PaCa (sel kanker pancreas), MCF-7 (sel kanker payudara) dan PC-3 (sel kanker prostat)
4	Vidal PJ, et al.(32)	Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi- synthetic analogues  <i>Food Chem</i> , 2014; <b>154</b> :246-254	Eksperimental <i>in vitro</i>	Betainin (100µg/ml) mampu menghambat aktivitas enzim COX- 2 (97%) dibanding COX-1 (33,5%)
5	Lechner JF,et al.(47)	Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N- nitrosomethylbenzylamine- treated rats  <i>J.Med Food</i> , 2010; <b>13</b> : 733-739	Eksperimental pada tikus	Betacyanin dalam umbi bit memiliki efek antiproliferasi, angiogenesis, inflamasi dan mestimulasi apoptosis pada tumor esophagus tikus yang diinduksi NMBA
6	Das S, et al.(48)	Beet root juice protects against doxorubicin toxicity in cardiomyocytes while enhancing apoptosis	Eksperimental pada sel line	Betacyanin dalam jus umbi bit mampu meningkatkan apoptosis doksorubisin

		in breast cancer cells  <i>Mol Cell Biochem</i> , 2016: <b>421</b> : 89-101		pada sel kanker MDA-MB-231 dan mampu menurunkan toksisitas doksorubisin pada kardiomyosites
7	Vulic JL, et al.(49)	Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace  <i>Food Funct</i> , 2013; <b>4</b> : 713-721	Eksperimental pada sel line dan mencit	Ekstrak umbi bit menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel Ehrlich carcinoma (EAC) secara <i>in vivo</i> karena induksi stress oksidatif.

## D. Tujuan Penelitian

### 1. Umum

Membuktikan pengaruh penambahan ekstrak bit terhadap respon terapi regimen AC yang diberikan pada tikus adenokarsinoma mamma melalui petanda seperti volume tumor, respon patologi, respon imun dalam lingkungan mikro tumor, aktivitas proliferasi dan apoptosis.

### 2. Khusus

- a. Membuktikan volume tumor pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih kecil dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.

- b. Membuktikan respon patologi pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih baik dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- c. Membuktikan kadar mRNA CD8 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- d. Membuktikan kadar mRNA CD11b pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih rendah dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- e. Membuktikan kadar mRNA p53 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- f. Membuktikan kadar mRNA Ki-67 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih rendah dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- g. Membuktikan kadar mRNA caspase 3 pada kelompok tikus adenokarsinoma mamma yang diberi regimen AC ditambah ekstrak bit lebih tinggi dibanding kelompok kontrol AC saja dan kontrol negatif.
- h. Membuktikan pengaruh perbedaan dosis ekstrak bit terhadap volume tumor, respon patologi, kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3.

- i. Membuktikan bahwa variabel kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 berkorelasi dengan volume tumor.
- j. Membuktikan bahwa variabel kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 berkorelasi dengan respon patologi.
- k. Membuktikan bahwa variabel kelompok perlakuan dan kadar mRNA CD8, CD11b, p53, Ki-67 dan caspase 3 merupakan faktor yang mempengaruhi volume tumor dan respon patologi.

## **E. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan bukti ilmiah tentang manfaat ekstrak bit jika diberikan bersama regimen AC pada kasus kanker payudara pada tahapan uji pra klinik. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian klinik, sehingga dapat memberikan bukti efektivitas terapi komplementer antara bahan alam yaitu ekstrak bit dan kemoterapi regimen AC pada pasien kanker payudara.
2. Memberikan manfaat akademik melalui peningkatan ilmu pengetahuan terutama tentang peran molekuler ekstrak bit dalam mengatasi masalah kemoresistensi yang ditimbulkan oleh regimen AC sebagai *neoadjuvant*.