

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kanker paru-paru merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia yang disebabkan karena kanker. Menurut data *World Health Organization* (WHO), pada tahun 2018 kematian akibat kanker paru-paru menduduki urutan pertama (14,5% pada laki-laki dan 8,4% pada perempuan), diikuti oleh kanker prostat, kolorektal, hati, dan abdomen (WHO, 2018). Di Indonesia, kanker paru-paru juga menempati urutan pertama pada laki-laki (21,8%), diikuti oleh kanker kolorektal, hati, dan nasofaring, dan menempati urutan ke-5 (9,1%) kasus kanker pada perempuan, setelah kanker payudara (21,4%), serviks-uteri, kolorektal, dan ovarium (Kemenkes RI, 2019).

Kanker paru-paru adalah tumor ganas yang tumbuh secara tidak terkontrol di salah satu atau kedua paru-paru. Kanker yang dimulai di paru-paru dikenal sebagai kanker paru-paru primer, yang dapat menyebar ke bagian lain dari tubuh seperti kelenjar getah bening, otak kelenjar adrenal, hati, dan tulang. Kanker yang dimulai di bagian tubuh lain dan menyebar ke paru-paru disebut kanker paru-paru sekunder (American Cancer Society, 2019). Lebih dari 80% penyebab utama kanker paru-paru adalah merokok (Romaszko dan Doboszynska, 2018).

Terapi yang umum dilakukan untuk penyakit kanker adalah kemoterapi, radioterapi, dan pembedahan. Pemilihan terapi dilakukan berdasarkan kondisi penyakit kankernya, yaitu kanker non metastasis dan kanker metastasis. Untuk kanker non metastasis lebih efektif menggunakan radioaktif dan pembedahan. Kemoterapi lebih efektif dilakukan terhadap kanker metastasis (Chabner dan Roberts Jr., 2006).

Kemoterapi mempunyai efek samping sangat kuat karena selain menyerang sel kanker juga sel normal, seperti sumsum tulang belakang, rambut, folikel rambut, dan sel saluran pencernaan. Efek samping yang tidak diinginkan inilah yang memicu penelitian pencarian obat antikanker berbasis sumber daya hayati (Nursafitri, et al., 2013).

Terapi kanker dapat dilakukan dengan menghambat atau membunuh sel kanker dan perkembangannya melalui apoptosis (program kematian sel) yang dapat diamati secara *in vitro*. Mekanisme apoptosis dapat dilakukan melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik sel dengan mengaktivasi caspase (*cysteine-aspartic protease*), yaitu kelompok enzim protein sistein yang berperan dan mengeksekusi kematian sel secara apoptosis (Cavalcante, et al., 2019). Caspase yang berperan pada jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik masing-masing adalah caspase-9 dan caspase-8, sedangkan yang berperan pada jalur eksekusi adalah caspase-3. Pengaktivasian caspase dilakukan oleh substrat yang spesifik (Thornberry et al., 2000). Caspase-9 akan mengenali peptida substratnya, yaitu Ac-LEHD-AFC (Jullien dan Wells,

2017), sementara peptida substrat caspase-3 adalah Ac-DEVD-AFC (Megantara et al., 2020).

Selain apoptosis, faktor lain yang berperan penting dalam jalur katabolik untuk homeostasis sel adalah autofagi. Autofagi merupakan suatu proses degradasi komponen sel yang rusak. Autofagi merupakan jalur untuk menjaga kelangsungan hidup dari sel (*pro-survival*) yang melibatkan degradasi dan daur ulang makromolekul yang tidak terpakai. Sementara apoptosis mencegah kelangsungan hidup bagi sel kanker (*pro-death*). Autofagi dan apoptosis memiliki kesamaan dalam jalur penginduksi supresi tumor. Akibatnya, ketidakmampuan sel dalam melaksanakan autofagi atau apoptosis dapat menyebabkan kanker (Su et al., 2013).

Senyawa-senyawa antikanker dapat menyerang dan menghancurkan sel kanker dengan memacu apoptosis sel, sehingga terjadi kematian sel yang lebih banyak serta menyebabkan penghambatan proliferasi yang mengakibatkan pertumbuhan sel kanker tidak dilakukan dan bisa berhenti. Obat antikanker yang saat ini banyak digunakan secara klinis dalam terapi kanker telah terbukti memiliki sitotoksitas dan dapat menyebabkan kematian secara apoptosis, seperti cisplatin dan karboplastin (Aldossary, 2019). Selain itu, tidak sedikit hasil penelitian yang menunjukkan bahwa bahan alam dan metabolit sekundernya memiliki aktivitas antikanker, yang dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada berbagai jenis sel kanker (Sakarkar and Deshmukh, 2011).

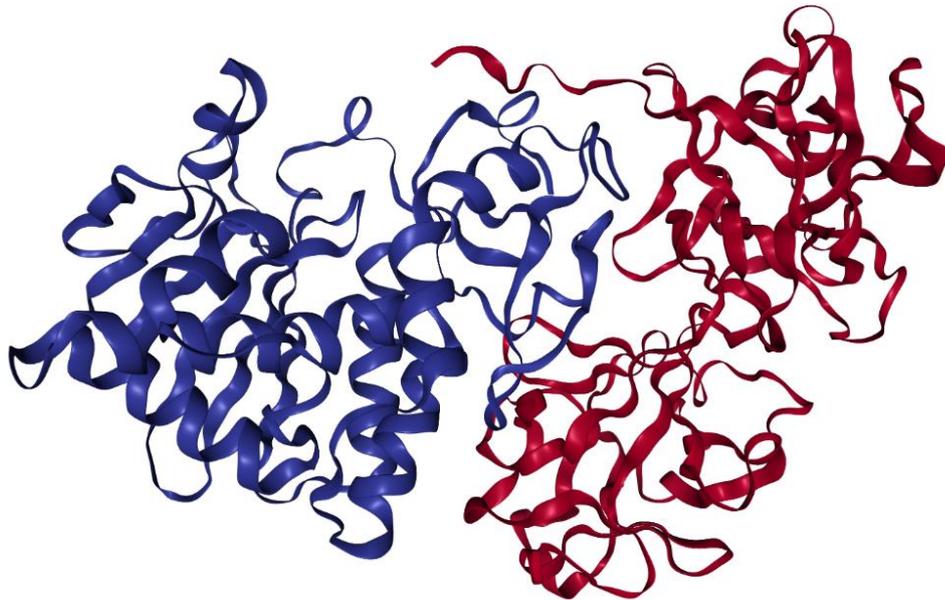
Di antara senyawa kimia tersebut, banyak senyawa yang berasal dari tanaman toksik, salah satu tanaman yang dimaksud adalah jarak (*Ricinus communis* L.). Tanaman jarak mengandung metabolit sekunder, seperti steroid, saponin, alkaloid, flavonoid, dan glikosida (Jena dan Grupta, 2012), dan metabolit primer, yaitu minyak (54%), karbohidrat (13%), serat (12,5%), abu (2,5%), dan protein (18%) (Departemen Teknologi Pertanian, 2005). Senyawa toksik yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari biji jarak adalah ricin (Stillmark, 1994).

Ricin adalah senyawa toksik yang diperoleh dari biji jarak (*Ricinus communis* L.) (Nemudzivhadi dan Peter, 2014), dan merupakan glikoprotein yang terdiri atas dua rantai polipeptida, yaitu ricin rantai A (bersifat toksik) dan ricin rantai B (lektin yang kurang toksik) (Rana et al., 2012). Ricin merupakan famili *ribosome-inactivating* protein (RIP) tipe II (Worbs et al., 2015). Ricin sangat beracun pada manusia dan hewan (Lord et al., 1994), yang dapat menghambat sintesis protein melalui inaktivasi ribosom dan bekerja pada beberapa target molekuler di dalam sel, yang mengakibatkan kematian sel (Polito et al., 2019). Ricin juga terbukti bersifat sitotoksik terhadap beberapa sel kanker, menginduksi apoptosis, dan menghambat sintesis protein (Sowa-Rogozinska et al., 2019).

Ekstrak buah jarak menunjukkan sitotoksitas terhadap dua sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 (Majumder et al., 2019). Ekstrak ini secara signifikan dapat menghambat migrasi, adhesi, dan invasi sel, disamping menginduksi apoptosis seperti yang ditunjukkan oleh pengurangan Bcl-2 anti-apoptosis, induksi

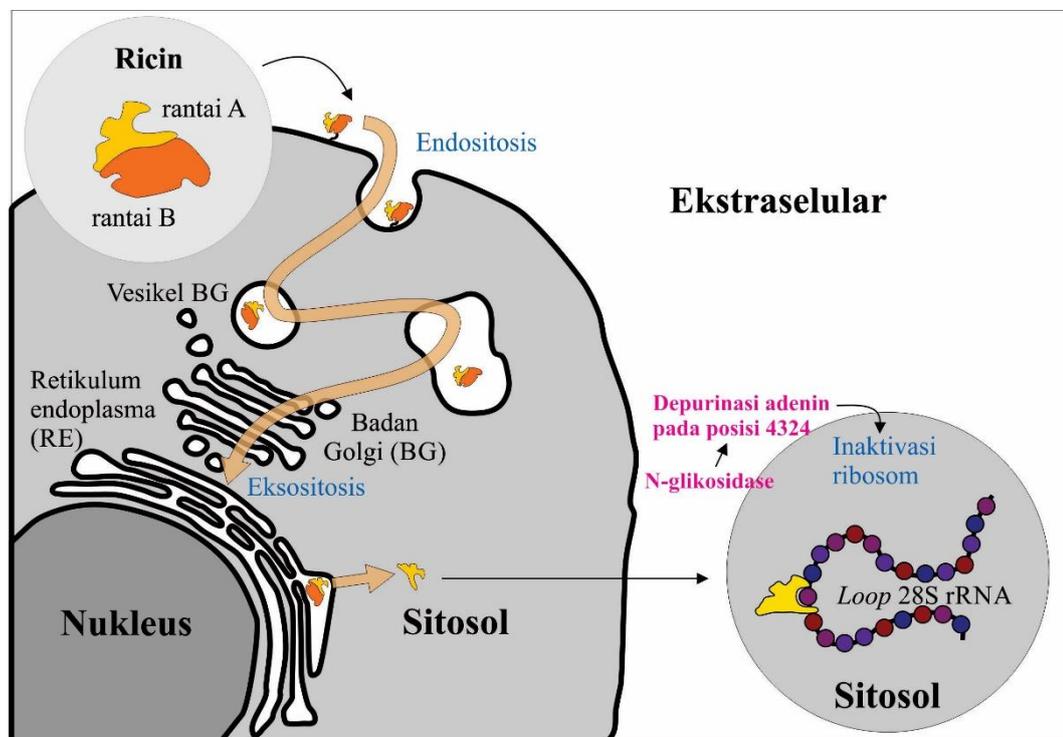
ekspresi Bax pro-apoptosis, dan fragmentasi DNA (Majumder et al., 2019). Selain itu, ricin memiliki sitotoksitas kuat terhadap sel melanoma, dengan IC_{50} 34,1 ng/mL untuk sel SKMEL28 dan 5,2 ng/mL untuk sel HaCaT dalam perlakuan 48 jam, dan menghambat tumorigenesis pada sel SKMEL28 secara *in vitro* (Ngo et al., 2016).

Protein ricin dapat diisolasi berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan kromatografi kolom (Oskon, 2016). Sementara hasil isolasi dari protein ricin dapat diukur kemurniannya menggunakan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Bollag et al., 1996).

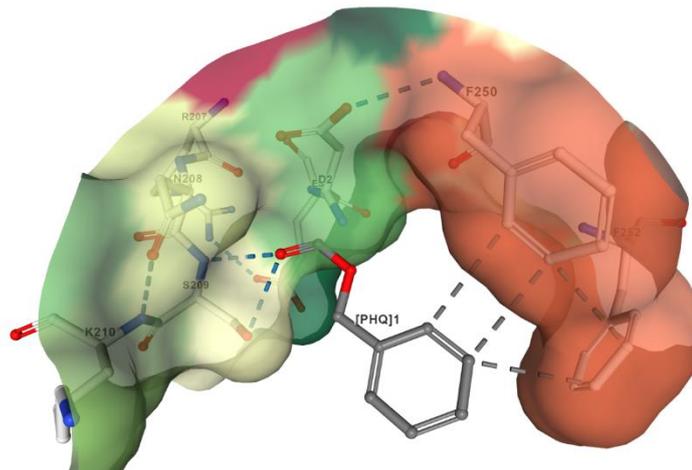


Gambar I.1. Struktur 3D ricin (kode PDB: 2AAI DOI: 10.2210/pdb2AAI/pdb dikristalkan oleh Rutenber et al., 1994 dengan resolusi 2,5 Å). Ricin rantai A ditunjukkan dengan warna biru dan ricin rantai B ditunjukkan dengan warna merah. Diunduh dari <https://www.rcsb.org/structure/2AAI>.

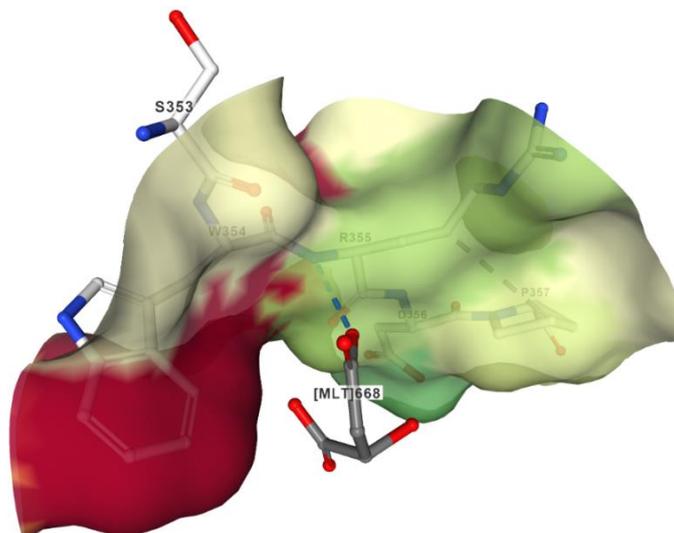
Aktivitas katalitik ricin secara eksklusif terletak pada ricin rantai A, yang merupakan rantai aktif dan sitotoksik. Ricin rantai A mengandung beberapa asam amino, diantaranya residu Tyr80, Tyr123, Glu177, dan Arg180, yang semuanya terletak dalam sisi aktif (Lord, et al., 2003). Mekanisme katalitik diusulkan oleh Monzingo dan Roberts berdasarkan pada struktur kristal ricin rantai A dalam senyawa kompleks dengan molekul kecil dan penelitian mutagenesis langsung ke sisi aktif (Lord, et al., 2003).



Gambar I.2. Ilustrasi skematis mekanisme kerja ricin di dalam sel. Ricin masuk ke dalam sel melalui proses *clathrin-dependent* dan *clathrin-independent* endositosis bagian ricin rantai B, di dalam vesikel badan Golgi. Selanjutnya ricin dieksositosis dari badan Golgi dengan mekanisme transpor mundur ke retikulum endoplasma (RE). Di dalam RE terjadi pemotongan ricin rantai A dan B, sehingga ricin rantai A dapat masuk ke dalam sitosol, menginaktivasi ribosom *via* depurinasi pada 28S rRNA (adenin posisi 4324 dari *loop* sarcin-ricin) (diadopsi dari Franke et al., 2019).



Gambar I.3. Ligan PHQ (inhibitor aza-peptida) dalam kantung ikatan caspase-3 membentuk dua ikatan hidrogen (digambarkan dengan garis putus-putus berwarna biru) dengan Ser209 dan tiga interaksi hidrofobik *pi-pi stacking* dengan Phe250 dan Phe252 (digambarkan dengan garis putus-putus berwarna abu-abu). Residu asam amino yang teramati di dalam kantung ikatan caspase-3 adalah Asp2, Glu3, Arg207, Asn208, Ser209, Lys210, Phe250, Phe252. Gambar diunduh dari <http://www.rcsb.org/3d-view/2C1E> dan divisualisasi menggunakan NGL (WebGL).



Gambar I.4. Ligan asam malat dalam kantung ikatan caspase-9 membentuk satu ikatan hidrogen (digambarkan dengan garis putus-putus berwarna biru) dengan Arg355. Residu asam amino yang teramati di dalam kantung ikatan caspase-9 adalah Ser353, Trp354, Arg355, Asp356, Pro357. Gambar diunduh dari <http://www.rcsb.org/3d-view/2AR9/1> dan divisualisasi menggunakan NGL (WebGL).

Sampai saat ini, profil sitotoksisitas ricin pada sel kanker paru-paru belum banyak dilaporkan. Pada penelitian ini telah dilakukan identifikasi protein ricin dari biji jarak, pengujian sitotoksisitas, mekanisme kematian sel, penghambatan migrasi sel, dan aktivitas autofagi *crude ricin* (CR) terhadap sel kanker paru-paru A549. Yang dimaksud dengan CR adalah protein ricin yang terdiri dari rantai A (bersifat toksik) dan rantai B (kurang toksik). Pengujian terhadap aktivitas autofagi dilakukan karena, selain apoptosis, autofagi memiliki peran penting dalam kelangsungan hidup dan kematian sel (Levine, 2007). Autofagi dapat menghambat kelangsungan hidup sel dan menginduksi kematian sel, yang mengarah pada supresi pembentukan tumor, tetapi autofagi juga mendorong pembentukan tumor dengan mendorong pertumbuhan sel kanker dan pertumbuhan tumor (Yun dan Lee, 2018). Telah dilaporkan bahwa beberapa obat sitotoksik dapat menginduksi autofagi protektif pada sel kanker, yang mengakibatkan penghambatan aktivitas sitotoksik dan apoptosis (Yun dan Lee, 2018). Berdasarkan uraian di atas, memahami aktivitas ricin dalam induksi autofagi dan efektivitasnya sebagai senyawa antikanker pada sel kanker paru-paru A549 menjadi menarik dan penting untuk dilakukan.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, masalah yang dapat diidentifikasi adalah:

1. Apakah *column liquid chromatography* (CLC) dan *fast protein liquid chromatography* (FPLC) dapat mengidentifikasi puncak doublet protein ricin dan

- bagaimanakah profil elektroferogramnya (BM) menggunakan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)?
2. Bagaimana mode ikatan antara ricin rantai A dengan caspase-3, caspase-8, caspase-9, Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62 pada studi *in silico*?
 3. Bagaimanakah kekuatan penghambatan (IC_{50}) *crude ricin* (CR) terhadap sel kanker paru-paru A549 dan sel paru-paru normal (MRC5) dibandingkan dengan cisplatin?
 4. Bagaimana pengaruh CR terhadap induksi kematian sel kanker paru-paru A549 melalui apoptosis dan nekrosis dengan menggunakan metode *flow cytometry*?
 5. Bagaimana pengaruh CR terhadap mekanisme kematian sel melalui jalur intrinsik caspase-9 dan caspase-3 pada sel kanker paru-paru A549 dengan metode *Western blot*?
 6. Bagaimana pengaruh CR terhadap migrasi sel kanker paru-paru A549 dengan metode *scratch wound healing*?
 7. Bagaimana pengaruh CR dalam proses autofagi pada sel kanker paru-paru A549 melalui pengukuran kadar protein Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62 dengan metode *Western blot*?

I.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi puncak doublet protein ricin menggunakan CLC dan FPLC serta profil elektroferogram SDS-PAGE (BM).

2. Memperoleh data mode ikatan antara senyawa ricin rantai A dengan caspase-3, -8, -9, Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62 untuk mengetahui pengaruhnya pada proses apoptosis dan autofagi.
3. Memperoleh kekuatan penghambatan IC_{50} dari CR terhadap sel kanker paru-paru A549 dan sel paru-paru normal MRC5 dibandingkan dengan cisplatin.
4. Memperoleh mekanisme apoptosis dan nekrosis dari CR terhadap sel kanker paru-paru A549.
5. Memperoleh mekanisme kematian sel kanker paru-paru A549 jalur intrinsik terhadap protein caspase-9 dan caspase-3 oleh CR.
6. Memperoleh mekanisme penghambatan migrasi sel kanker paru-paru A549 oleh CR.
7. Memperoleh mekanisme autofagi CR terhadap sel kanker paru-paru A549 melalui pengukuran kadar protein Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62.

I.4 Kegunaan Penelitian

I.4.1 Kegunaan Teoritis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap upaya pencarian dan pengembangan obat-obat baru, khususnya obat antikanker, yang sampai saat ini masih terdapat permasalahan terkait dengan efektivitas dan keamanannya.
2. Data yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar bagi penelitian lebih lanjut untuk mengungkapkan potensi protein ricin sebagai kandidat obat antikanker baru, khususnya terhadap sel kanker paru-paru.

I.4.2 Kegunaan Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan data penunjang untuk saintifikasi protein ricin sebagai penunjang pengembangan fitofarmaka antikanker paru-paru.