

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker adalah masalah besar dalam dunia kesehatan. Prevalensi kanker di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter meningkat dari 1,4 per 1000 orang di tahun 2013 menjadi 1,8 per 1000 orang pada tahun 2018 (Riskesdas, 2018). Data Globocan 2018 menunjukkan bahwa kanker hati menyumbang sebanyak 8,2% angka kematian dari keseluruhan kematian akibat kanker. Penyakit ini muncul di hepatosit, sel-sel yang membentuk sebagian besar hati. Etiologi *Hepatocellular carcinoma* (HCC) berkaitan dengan kerusakan hati dan sirosis yang disebabkan oleh empat faktor risiko utama, yaitu infeksi virus hepatitis B (HBV), infeksi virus hepatitis C (HCV), konsumsi alkohol kronis, dan paparan aflatoksin B1 (Thorgeirsson and Grisham, 2002)

Kanker hati memiliki prognosis yang buruk. Hanya 5% hingga 15% pasien yang memenuhi syarat untuk dilakukan tindakan operasi, dimana merupakan terapi yang hanya cocok untuk pasien kanker tahap awal. Pemberian oral multi-kinase inhibitor, sorafenib, direkomendasikan sebagai terapi lini pertama untuk stadium lanjut HCC (Serag and Rudolph, 2007; Jelic and Sotiropoulos, 2010). Sebagai oral multi-kinase inhibitor, sorafenib berfungsi sebagai antikanker terutama melalui mekanisme anti-proliferasi sel tumor dan anti-angiogenesis. Penggunaan jangka panjang obat kemoterapi sorafenib menimbulkan masalah terapi seperti toksisitas dan inektifitas obat (Anwanwan *et al.*, 2020). Efek samping yang paling umum terkait dengan sorafenib adalah reaksi pada kulit kaki dan tangan, diare, serta kelelahan. Efek samping lainnya termasuk hipofosfatemia asimtomatik atau hiperamilasemia. Pasien juga mungkin mengalami efek samping yang sering

dikaitkan dengan penyakit hati, seperti peningkatan enzim hati (Gish and Gholam, 2015).

Asam ursolat adalah triterpen pentasiklik yang ditemukan secara alami di berbagai tanaman dan memiliki aktivitas anti kanker pada manusia (Ali *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian Ali (2019), asam ursolat bersifat sitotoksik pada sel HepG2 hepatoblastoma dengan  $IC_{50}$  14.5 $\mu$ g/mL. Asam ursolat mampu menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan mengaktifkan caspase-3 pada sel melanoma M4Beu serta menghambat proliferasi sel (Harmand *et al.*, 2005). Penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asam ursolat yang tidak toksik untuk sel normal dapat menginduksi apoptosis di sel melanoma pada tikus B16F-10 dengan menghambat faktor transkripsi NF- $\kappa$ B (Manu and Kuttan, 2008; Zhang, Men and Lei, 2014). Asam ursolat menginduksi apoptosis pada HepG2 hepatoblastoma sel secara *dose dependent* (Yan *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian Yan (2010) asam ursolat dengan konsentrasi 2 hingga 8  $\mu$ mol/L menurunkan viabilitas sel serta peningkatan fragmentasi DNA di nukleus, menurunkan *mitochondrial membrane potential* (MMP) serta meningkatkan aktivitas *caspase-3* dan *caspase-8* di sitoplasma pada sel HepG2 hepatoblastoma. Hal-hal tersebut dapat menginduksi apoptosis pada sel tumor (Harmand *et al.*, 2005). Asam ursolat juga menghambat proliferasi dan pembentukan koloni tumor dan membatasi kemampuan tumor untuk menyerang dan bermetastasis (Neto, 2007). Selain itu, Ali (2019) mengungkapkan peran asam ursolat dalam mempercepat proliferasi hati, memulihkan fungsi biokimia dan histologi sel hati dari kerusakan akibat HCC, serta melindungi integritas hepatosit terhadap kerusakan hati. Selain itu, asam ursolat juga memiliki aktivitas antiinflamasi (Cerga *et al.*, 2011). Dengan demikian, asam ursolat dapat menjadi alternatif terapi HCC dengan target kerja obat di sitoplasma dan inti sel kanker.

Penggunaan asam ursolat untuk terapi anti kanker memiliki kelemahan terkait sifat biofarmasetikanya yang termasuk BCS kelas IV (Eloy *et al.*, 2015) dimana memiliki permeabilitas dan kelarutan yang buruk. Dengan demikian perlu bantuan sistem penghantaran *nanocarrier* yang mampu meningkatkan kelarutan dan permeabilitas asam ursolat.

Niosom adalah vesikel bilayer yang berasal dari hidrasi surfaktan non-ionik (Kshitij B. Makeswar\*, 2013). Struktur bilayer niosom memiliki permukaan bagian dalam dan luar yang bersifat hidrofilik, dengan daerah lipofilik berada di antara membran bilayernya (Gandhi, Sen and Paul, 2012). Niosom termasuk golongan *nanocarriers* yang dapat meningkatkan bioavailabilitas dari obat yang enkapsulasi (Bruschi, 2015).

Penelitian sistem penghantaran niosom untuk obat norfloxacin yang merupakan BSC kelas IV (Varshney *et al.*, 2012) terbukti dapat meningkatkan bioavailabilitas norfloxacin serta memperlambat pelepasan obat secara konsisten (Xia *et al.*, 2012). Hal tersebut mungkin dikarenakan kemampuan niosom dalam mengenkapsulasi obat, sehingga sirkulasi obat menjadi lebih panjang dan metabolisme obat berubah (Gandhi *et al.*, 2012). Niosom tidak hanya dapat digunakan untuk memperlambat pelepasan obat tetapi juga memodifikasi pola pelepasan melalui penyesuaian komposisi bilayer dan kadar kolesterol. Selain efisiensi enkapsulasi tinggi untuk obat hidrofilik (inti berair) atau lipofilik (membran bilayer), niosom dapat meningkatkan lokalisasi obat ke situs target dengan meningkatkan ambilan sel secara pasif atau aktif dengan efek samping minimal (Bendas *et al.*, 2013) (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014). Lawsonsone, obat anti kanker yang memiliki kelarutan dan permeabilitas yang buruk, dilaporkan memiliki efek sitotoksitas yang lebih besar dalam bentuk niosom dibandingkan dalam bentuk obat bebas (Barani *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian tersebut, peningkatan efek sitotoksik ini dikarenakan efek internalisasi ke sel kanker

payudara MCF-7 bentuk niosom yang lebih baik dibandingkan bentuk bebas serta efek *sustain release* yang ditimbulkan.

Penelitian (Song, 2014) menunjukkan bahwa mekanisme pengangkutan niosom ke dalam sel adalah melalui transport aktif yang berkaitan dengan jalur endositosis. Dalam penelitian tersebut dijelaskan bahwa terjadi peningkatan ambilan sel dari senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG) yang memiliki permeabilitas buruk, berkaitan dengan struktur vesikel dimana terdapat surfaktan nonionik sebagai komponen yang dapat meningkatkan penetrasi. Pada penelitian (Shaker *et al.*, 2015) mengenai ambilan sel dari niosom Tamoksifen sitrat yang memiliki kelarutan yang buruk pada sel kanker payudara MCF-7, dinyatakan bahwa konsentrasi kumulatif intraseluler tamoksifen dalam niosom jauh lebih besar dibanding tamoksifen bebas (Shaker *et al.*, 2015). Pemilihan niosom sebagai pembawa asam ursolat diharapkan dapat meningkatkan bioavailabilitas serta ambilan sel sehingga efek sitotoksitasnya meningkat.

Salah satu mekanisme transport aktif, endositosis yang dimediasi reseptor clathrin dan caveolae, adalah mekanisme paling penting dari internalisasi benda-benda berukuran nano, termasuk virus dan nanopartikel (Tomatis *et al.*, 2010). Penelitian (Sun *et al.*, 2017) menunjukkan bahwa ambilan sel vesikular nano carier merupakan endositosis yang dimediasi caveole dan clathrin. Untuk melakukan uji mekanisme ambilan sel dilakukan dengan pemberian inhibitor pada masing-masing jalur, genistein sebagai inhibitor endositosis dengan mediator caveolae (Vercauteren *et al.*, 2010) dan sukrosa sebagai inhibitor endositosis dengan mediator clathrin (Dutta and Donaldson, 2012).

Pada penelitian sebelumnya, dilakukan penelitian mengenai niosom yang terbuat dari span60-kolesterol sebagai pembawa asam ursolat (Safitri, 2018). Sedangkan Aquila (2018) melakukan penelitian mengenai asam

ursolat dalam niosom dengan pelapisan kitosan sebagai pembawa obat. Niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan memiliki stabilitas fisik yang lebih baik serta meningkatkan pelepasan asam ursolat pada pH basa (Aquila, 2018).

Kitosan merupakan suatu polisakarida alami yang terbentuk dari deasetilasi kitin (Szymańska and Winnicka, 2015) dan termasuk polimer kationik. Khitosan terbukti dapat meningkatkan ambilan sel (Li *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Muatan polimer kationik secara signifikan mempengaruhi penyerapan seluler secara *in vitro* (Li and Ju, 2017). Hal ini dikarenakan adanya interaksi elektrostatik antara sel-sel dan polimer kationik bermuatan positif, polimer kationik dengan permukaan bermuatan positif dapat lebih mudah tertarik pada membran sel dan terakumulasi di dalam sel (Li and Ju, 2017).

Penelitian Ahmed (2007) mengenai *ambilan sel* dan sitotoksitas nanopartikel *silver* terlapis polimer kationik *poly L-lysine* menunjukkan penyerapan *poly L-lysine argentum nanoparticles* lebih tinggi dibanding *argentum nanoparticles* dikarenakan oleh interaksi *poly L-lysine* yang bermuatan positif pada permukaan nanopartikel dengan permukaan sel HepG2 hepatoblastoma yang bermuatan negatif. Efek toksisitas yang ditimbulkan nanopartikel bermuatan positif secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan nanopartikel bermuatan negatif (Brkić Ahmed *et al.*, 2017). Hal tersebut diduga karena perbedaan dalam interaksi elektrostatik yang lebih efisien antara nanopartikel bermuatan positif dan membran sel bermuatan negatif (Brkić Ahmed *et al.*, 2017). Secara *in vivo*, penggunaan kitosan menunjukkan efek mukoadesive yang kuat pada pH fisiologis sehingga mampu meningkatkan tempat tinggal waktu formulasi dalam GIT dan meningkatkannya permeabilitas (Khalifa and Rasool, 2017). Kitosan juga mampu membuka *tight junction* epitel usus sehingga mempermudah

transfer niosom ke peredaran darah dan dapat terakumulasi di hati (Rinaldi *et al.*, 2018).

Dari latar belakang di atas, maka akan dilakukan penelitian mengenai ambilan sel dan sitotoksitas *in vitro* niosom asam ursolat dengan pelapisan kitosan pada sel HeLa dan Huh7it. Sel HeLa adalah salah satu jenis sel kanker serviks pada manusia yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap asam ursolat (Guo *et al.*, 2019). Sel Huh7it merupakan salah satu jenis sel kanker hati pada manusia (Purnamasari *et al.*, 2019). Uji ambilan sel dilakukan dengan pelabelan fluoresensi menggunakan coumarin 6 (Sun *et al.*, 2017) sedangkan uji sitotoksitas dilihat berdasarkan  $IC_{50}$  (Ali *et al.*, 2019). Uji ambilan sel dilakukan untuk mengetahui kadar niosom asam ursolat yang masuk ke dalam sel. Niosom asam ursolat berlapis kitosan diharapkan memiliki efek sitotoksitas yang lebih baik dari niosom asam ursolat tanpa kitosan karena akumulasi sel yang lebih banyak akibat efek pelapisan kationik polimer kitosan.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pelapisan kitosan terhadap ambilan sel niosom asam ursolat oleh sel HeLa berdasarkan fotomikroskopi dan kadar coumarin6?
2. Bagaimana pengaruh pelapisan kitosan terhadap sitotoksitas ( $IC_{50}$ ) niosom asam ursolat pada sel HeLa dan Huh7it?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan pengaruh pelapisan kitosan terhadap ambilan sel niosom asam ursolat oleh sel HeLa berdasarkan fotomikroskopi dan kadar coumarin6.

2. Menentukan pengaruh pelapisan kitosan terhadap sitotoksisitas ( $IC_{50}$ ) niosom asam ursolat pada sel HeLa dan Huh7it.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi mengenai pengaruh niosom asam ursolat dengan dan tanpa pelapisan kitosan terhadap mekanisme dan peningkatan ambilan sel serta sitotoksisitas ( $IC_{50}$ ) oleh sel HeLa dan Huh7it.