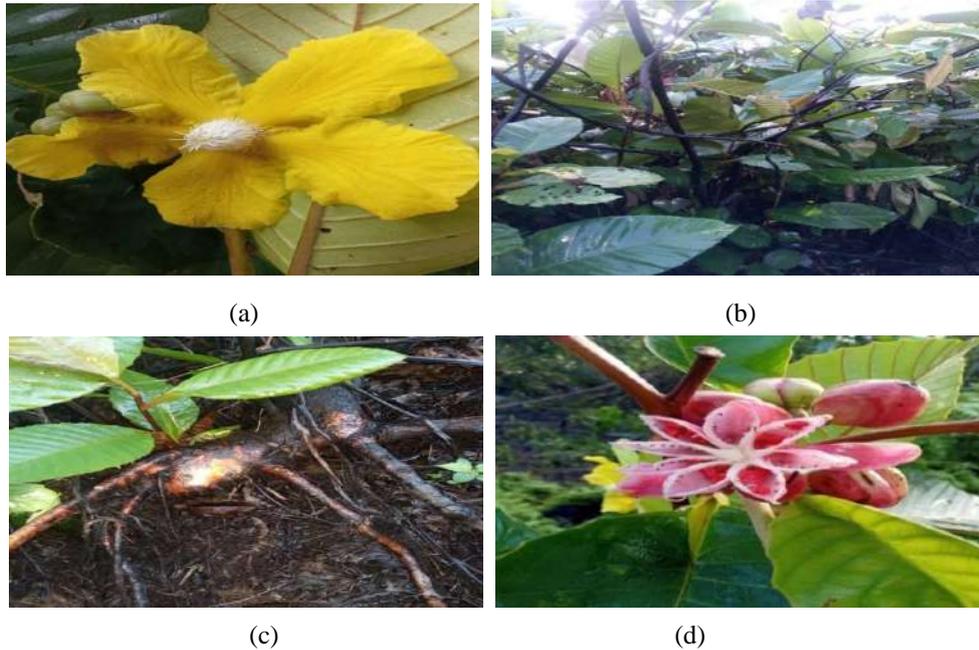


BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Tanaman Simpurn Air (*Dillenia suffruticosa*(Griff.) Martelli)

1. Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Simpurn Air



Gambar 2.1 Tanaman simpurn air yakni (a) Bunga simpurn air; (b) Kayu batang dan daun simpurn air; (c) Akar simpurn air; (d) Buah simpurn air

(Dokumentasi Pribadi)

Dillenia merupakan nama genus yang diciptakan oleh ahli botani dari Jerman bernama Johann Jacob Dillenius. Terdapat sekitar 100 spesies tanaman *Dillenia* pada daerah tropis dan subtropis di Asia Selatan, Australasia, dan pulau Samudra Hindia. Namun, hingga saat ini, hanya delapan spesies *Dillenia* yang telah dilaporkan dapat digunakan secara tradisional di berbagai untuk tujuan medis yang berbeda yaitu *Dillenia*

pentagyna, *Dillenia indica*, *Dillenia andamanica*, *Dillenia meliosmifolia*, *Dillenia parviflora*, *Dillenia suffruticosa* (Yazan & Armania, 2014). Pengobatan pertumbuhan kanker salah satunya dapat menggunakan tanaman *Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli (Armania *et al.*, 2013a,b).

Simpur air (*Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli) secara lokal di Indonesia disebut “Sempur” (Syafriana *et al.*, 2021), di Malaysia disebut "Simpoh air" (Yazan & Armania, 2014), di Brunei disebut “Simpur bini” (Yakop *et al.*, 2020). Tumbuh secara alami di hutan yang lembab dan hijau dari Malaysia Barat hingga Filipina, Indonesia, dan Brunei Darussalam (Jalaluddin, 2009). Simpur air di Indonesia dapat ditemukan di pulau Sumatera dan Kalimantan (Borneo) (Syafriana *et al.*, 2021). Simpur air adalah pohon berukuran sedang (tinggi 6 meter), memiliki bunga dengan lima kelopak berwarna kuning tipis di sekitar benang sari berwarna putih, dan buah berbentuk bintang merah muda gelap yang semuanya dikelilingi oleh daun oval besar (Goh *et al.*, 2017).

Secara ilmiah, tumbuhan simpur air dapat diklasifikasikan sebagai berikut.

Kerajaan : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Famili : Dilleniaceae

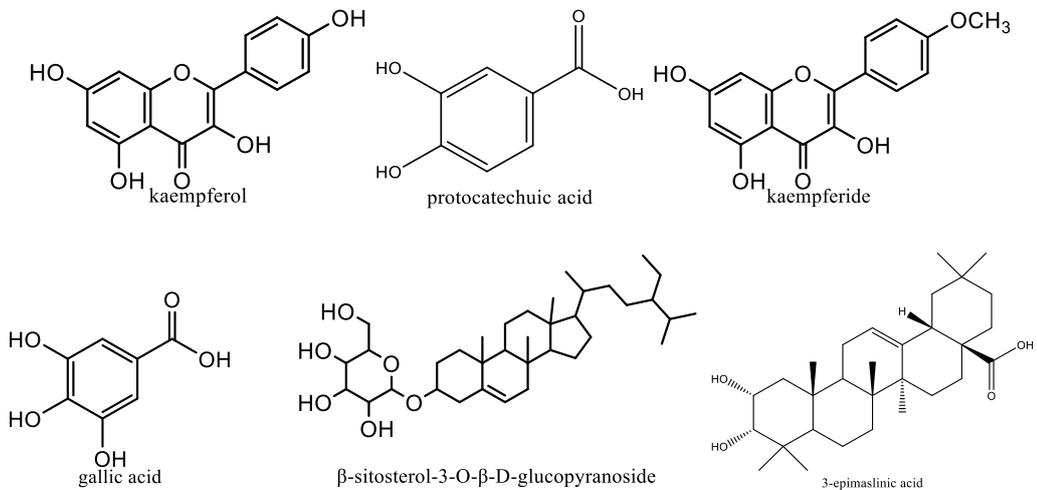
Genus : *Dillenia*

Spesies : *Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli (Plantamor, 2022).

2. Kandungan Kimia dalam Tanaman Simpurn Air

Pada umumnya tanaman dengan genus *Dillenia* mengandung triterpenoid, flavonoid, dan glikosida antrakuinon, turunan fenolik, dan tanin (Macahig *et al.*, 2011). Berbagai penelitian ilmiah diketahui kandungan metabolit sekunder dari beberapa bagian tanaman simpurn air telah banyak dilaporkan. Skrining fitokimia pada daun, akar, buah, dan bunga tanaman simpurn air terdapat saponin, triterpen, sterol, dan polifenol yang diyakini memiliki kontribusi terhadap aktivitas sitotoksik (Armania *et al.*, 2013a). Kandungan fitokimia dalam simpurn air tersebut berperan penting untuk meredakan dan meringankan berbagai penyakit (Goh *et al.*, 2017).

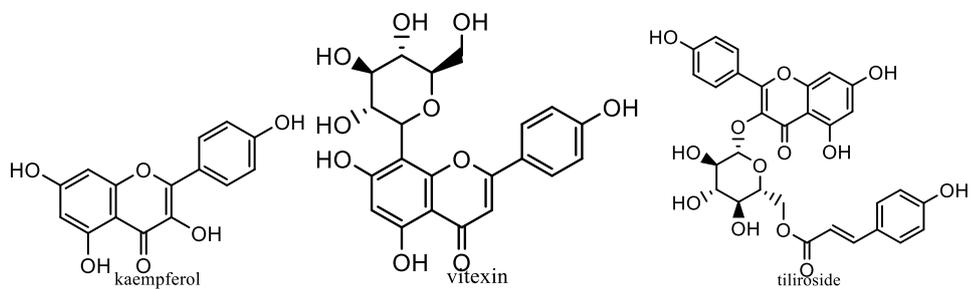
Isolasi akar tanaman *Dillenia suffruticosa* terdapat dua flavonoid (kaempferide dan kaempferol), dua fenolat (asam protokatekuat dan asam galat), dan dua triterpenoid (asam 3-epimaslinat dan β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranosida) (Tor *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil penelitian Armania *et al.* (2013a) bahwa kandungan fenolik dan flavonoid total dari ekstrak metanol akar simpurn air diketahui masing-masing sebesar $432,02 \pm 13,79$ mg GAE/g ekstrak dan $6,05 \pm 0,20$ mg RE/g ekstrak. Ekstrak metanol akarnya memberikan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} sebesar $31,33 \pm 1,15$ μ g/mL.

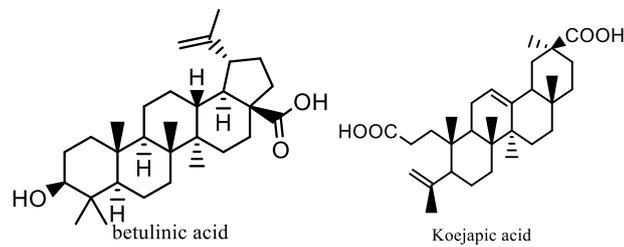


Gambar 2.2 Struktur senyawa isolasi akar simpur air

(Tor *et al.*, 2015)

Skrining fitokimia ekstrak etil asetat daun simpur air kukus dan segar terdapat senyawa golongan tanin, polifenol, dan triterpenoid. Perlakuan pengukusan tidak mempengaruhi kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun simpur air (Putra *et al.*, 2019). Penelitian lebih lanjut mengenai kandungan kimia daun simpur air bahwa hasil isolasinya terdapat senyawa metabolit sekunder yaitu triterpenoid berupa asam betulinat dan asam koetjapat dan flavonoid berupa vitexin, tilirosida, dan kaempferol (Abubakar *et al.*, 2019).





Gambar 2.3 Senyawa triterpenoid dan flavonoid daun simpur air
(Abubakar *et al.*, 2019)

Berdasarkan penelitian Muharini *et al.* (2021) diketahui kandungan metabolit sekunder pada kayu batang simpur air yang diperoleh dari Kalimantan Barat berupa alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, steroid, dan saponin dalam ekstrak kasar metanol. Kandungan total fenolik tertinggi pada fraksi metanol dengan $254,34 \pm 16,86$ mg GAE/g ekstrak. Sedangkan, kandungan flavonoid total tertinggi pada fraksi kloroform dengan $15,33 \pm 0,26$ mg RE/g ekstrak. Ekstrak kasar dan fraksi metanol memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dengan nilai IC_{50} masing-masing yaitu kurang dari 15,63 ppm dan 8,83 ppm. Korelasi yang kuat ditunjukkan antara aktivitas antioksidan dan kandungan total fenol melalui analisis korelasi. Dengan demikian, kayu batang simpur air dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan alami yang potensial.

Banyak penelitian telah mengungkapkan bahwa agen antioksidan ditemukan untuk menampilkan sifat farmakologis lain, seperti anti-inflamasi (Chen *et al.*, 2019), sitotoksitas (Gacche & Jadhav, 2012), atau antikanker (Grigalius & Petrikaite, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme antioksidan dapat menghambat kerusakan sel oleh radikal bebas (Chen *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian Muharini *et al.* (2021),

kandungan total fenolik yang lebih tinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan Kainama *et al.* (2020), menyatakan bahwa sifat antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak kasar dan semua fraksi tanaman disebabkan oleh kandungan fenoliknya. Ketika antioksidan bereaksi dengan radikal bebas, delokalisasi elektron akan terjadi pada senyawa fenolik, dan stabilisasi oleh efek resonansi dari inti aromatik, yang mencegah kelanjutan dari reaksi berantai radikal bebas (Zeb, 2020). Oleh sebab itu, senyawa yang diyakini memberikan efek farmakologi sebagai antikanker pada tanaman simpur air salah satunya adalah senyawa golongan fenolik.

3. Penggunaan Tradisional dan Efek Farmakologi Tanaman Simpur Air

Secara tradisional, tanaman simpur air digunakan untuk tujuan pengobatan medis. Selain dapat digunakan sebagai pembungkus tempe, produk pangan fermentasi kacang-kacangan, daun simpur air dipercaya dapat mengobati peradangan (Ahmad & Holdsworth, 1995), rematik (Hanum & Hamzah, 1999), demam (Yazan & Armania, 2014), dan pengobatan pasca persalinan (Wiart *et al.*, 2004). Masyarakat Kalimantan Barat menggunakan daun simpur air sebagai pengobatan batuk berdarah dengan cara direbus lalu dimakan (Gunadi *et al.*, 2017). Sementara, masyarakat di Bangka Belitung dan Sumatera menggunakan air rebusan daun simpur air untuk mengobati penyakit diabetes melitus (Yuningtyas *et al.*, 2018) dan diare (Syafriana *et al.*, 2021). Masyarakat Brunei dan Malaysia menggunakan daun muda simpur air dengan cara ditumbuk

kemudian digunakan sebagai tapal untuk menghentikan pendarahan (Department Agriculture, 2000), dan buahnya dioleskan untuk mengobati daerah yang sakit akibat dugaan kanker (Ahmad & Holdsworth, 1995).

Aktivitas farmakologi pada beberapa bagian tanaman simpur air berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1

Efek farmakologi tanaman simpur air

Sampel	Efek Farmakologi	Sumber
	Antimikroba	(Wuart <i>et al.</i> , 2004; Johnny <i>et al.</i> , 2010; Syafriana <i>et al.</i> , 2021)
	Antivirus Dengue Tipe 2	(Muliawan, 2008)
Ekstrak Metanol Daun	Antikanker terhadap sel kanker payudara MDA-MB-231, sel kanker usus besar HT29, dan sel kanker serviks Hela	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
	Antiinflamasi	(Abubakar <i>et al.</i> , 2019)
Ekstrak Etanol Kayu Batang	Antidiabetes	(Hediyansah <i>et al.</i> , 2019; Masriani <i>et al.</i> , 2020)
Ekstrak Metanol Buah	Antikanker terhadap sel kanker usus besar HT29 dan serviks Hela	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
Ekstrak Metanol Akar	Antikanker terhadap sel kanker serviks HeLa	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
Ekstrak Diklorometana dan Etil Asetat Akar	Antikanker terhadap sel kanker paru-paru A549, sel kanker ovarium CaOV3, sel kanker payudara, MCF7 dan MDA-MB-231, dan sel kanker usus besar HT29	(Armania <i>et al.</i> , 2013a,b; Tor <i>et al.</i> , 2014; Foo <i>et al.</i> , 2016; Foo <i>et al.</i> , 2014).
Ekstrak Air Akar	Antikanker terhadap sel kanker kolon, serviks, dan payudara	(Husain, 2010; Said, 2010; Yazan <i>et al.</i> , 2015)
Ekstrak Metanol Akar, Daun, Bunga, Buah;	Antioksidan	(Armania <i>et al.</i> , 2013a,b; Tor <i>et al.</i> , 2014; Foo <i>et al.</i> , 2014; Foo <i>et al.</i> ,

Ekstrak Diklorometana dan Etil Asetat Akar; Ekstrak Metanol, Kloroform, dan Etanol Kayu Batang	2016; Muharini <i>et al.</i> , 2021; Masriani <i>et al.</i> , 2020).
---	--

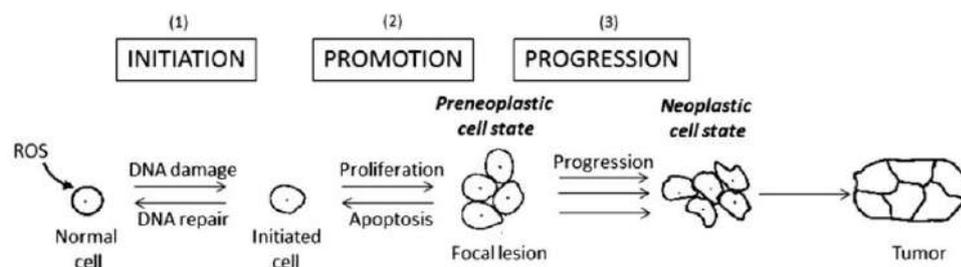
B. Kanker dan Karsinogenesis

Kanker merupakan penyakit pembelahan sel yang abnormal, tidak terkontrol, dan bisa menginvasi jaringan yang ada di sekitarnya (Jiang *et al.*, 2015). Sel kanker telah kehilangan sistem kontrol normal yang bisa mencegah tumbuhnya sel secara berlebihan dan menginvasi ke jaringan yang lainnya (Anandani *et al.*, 2018). Penyebab utama terjadinya kanker yakni mutasi pada gen proto-onkogen dan gen supresor tumor. Mutasi tersebut menyebabkan berubahnya fungsi protein yang diekspresikan sehingga dapat membentuk sel kanker (Lewandowska *et al.*, 2019).

Secara umum, karakteristik sel kanker yakni (1) mampu mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri, sehingga dapat memacu siklus sel; (2) tidak peka terhadap anti faktor pertumbuhan, sehingga mengakibatkan daur sel tidak terhenti; (3) kemampuan untuk melakukan apoptosis yang hilang, sehingga sel dapat terus bertambah; (4) menyerang jaringan lain dan masuk ke peredaran darah, sehingga bermetastasis; (5) replikasi yang tidak terbatas, dengan mampu memenuhi kebutuhan sinyal pertumbuhan dan menghindari mekanisme apoptosis; (6) membentuk saluran darah ke sel kanker (angiogenesis) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Kanker diakibatkan kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel yaitu proto-onkogen dan gen supresor tumor. Proto-onkogen merupakan gen yang bertanggung jawab untuk proliferasi sel, sedangkan gen supresor tumor berfungsi untuk menekan pertumbuhan sel atau menahan pembelahan sel supaya terjadi perbaikan DNA. Jika perbaikan DNA gagal, gen supresor tumor mendorong sel melakukan apoptosis. Mutasi pada proto-onkogen dapat mengubah ekspresi dan fungsi gen yang mengakibatkan peningkatan aktivitas ekspresi protein sehingga menjadi onkogen dan memiliki kesempatan untuk berkembang terus-menerus (Hanahan & Weinberg, 2011).

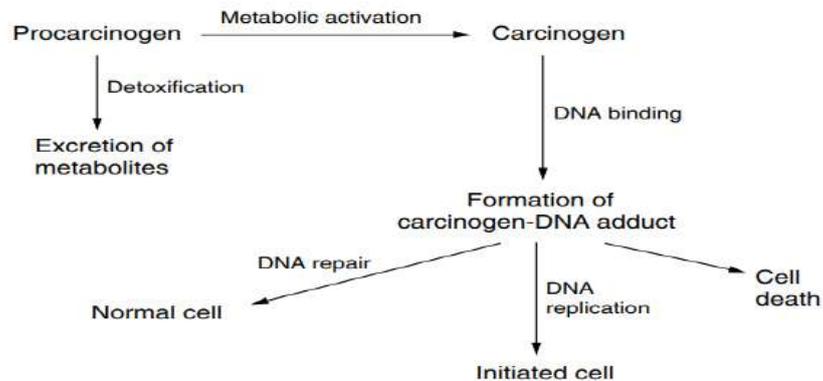
Proses pembentukan kanker, yang disebut karsinogenesis merupakan proses perubahan sel-sel normal menjadi sel kanker yang terjadi karena adanya akumulasi kesalahan genetik yang berlangsung lama. Akumulasi kesalahan genetik tersebut dapat mengakibatkan pertumbuhan sel normal menjadi tidak terkontrol sehingga akan menjadi ganas (Patterson *et al.*, 2018). Proses karsinogenesis terdiri dari atas tiga tahap yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Henry *et al.*, 2013). Berikut adalah tahap dari proses karsinogenesis.



Gambar 2.4 Tahap karsinogenesis (inisiasi, promosi, dan progresi)
(Fuchs-Tarlovsky, 2013)

Pada tahap inisiasi ketidakseimbangan tingkat kerusakan DNA dengan perbaikan DNA menyebabkan pembentukan sel terinisiasi. Pada tahap promosi proliferasi sel terinisiasi akan berkembang menjadi preneoplastik. Pada tahap progresi yang merupakan tahap akhir karsinogenesis melibatkan perubahan seluler dan molekuler dari preneoplastik menjadi neoplastik yang bersifat irreversibel (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Inisiasi adalah proses yang tidak dapat balik dan terjadi saat DNA berinteraksi dengan karsinogen. Bahan penginisiasi atau yang disebut karsinogen contohnya virus, radiasi pengion, dan bahan kimia, adalah bahan-bahan atau agen yang bisa mengakibatkan terjadinya tumor. Proses metabolisme yang terjadi pada tahap inisiasi memegang peran penting pada karsinogenesis oleh bahan kimia. Beberapa karsinogen kimia harus diaktifkan secara metabolik sebelum menjadi karsinogen, sedangkan beberapa yang lain dapat bereaksi langsung sebagai karsinogen tanpa membutuhkan aktivasi. Enzim fase I seperti sitokrom P-450 bereaksi dengan karsinogen atau xenobiotik untuk membentuk senyawa elektrofil kuat dan mutagenik yang bertanggung jawab terhadap kerusakan DNA dan mutasi yang berperan pada awal inisiasi pengembangan kanker. Meskipun enzim fase II seperti glutathion transferase dapat mendetoksifikasi senyawa tersebut dengan membentuk glutathion yang larut air atau konjugasi sulfat yang mudah dieliminasi oleh tubuh, mekanisme perlindungan ini tidak kuat (Giovannini *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 Mekanisme pembentukan sel terinisiasi oleh karsinogen. Karsinogen atau metabolit aktif yang bersifat elektrofil kuat akan berikatan dengan DNA untuk membentuk *adduct* karsinogen-DNA. *Adduct* DNA yang bersifat karsinogen dapat dihilangkan melalui mekanisme perbaikan DNA. Jika perbaikan DNA gagal, maka sel akan mengalami apoptosis atau direplikasi menjadi sel terinisiasi

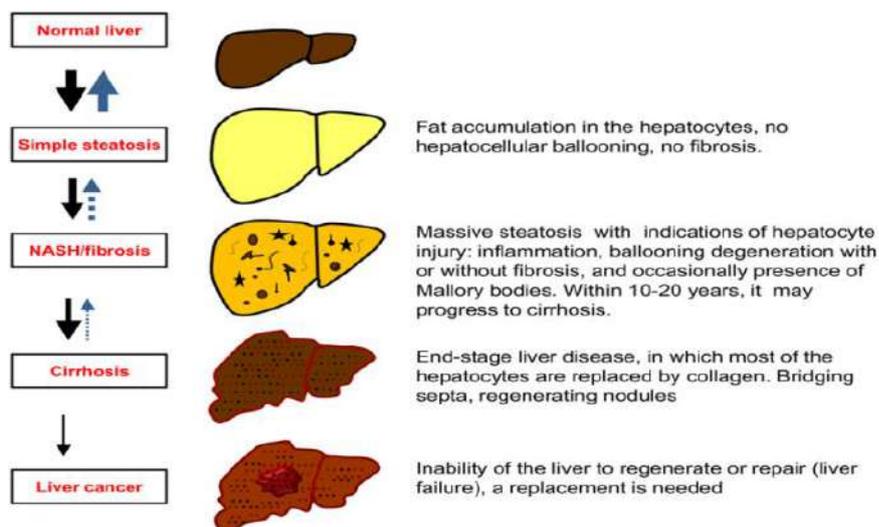
(Martinez *et al.*, 2003)

Tahap promosi tumor ditandai oleh proliferasi sel yang diinduksi oleh aktivasi dan/atau overekspresi enzim yang terlibat dalam sintesis nukleotida dan DNA (ornitin dekarboksilase), dan regulasi proses diferensiasi (DNA polimerase atau topoisomerase II). Overproduksi ROS juga terjadi pada tahap ini yang disebabkan oleh ekspresi berlebihan enzim prooksidan contohnya siklooksigenase dan lipooksigenase, yang menyebabkan kerusakan dan mutasi lanjut dari DNA. Pada dasarnya, promoter adalah non genotoksik, yang tidak dapat membentuk DNA *adduct* atau menyebabkan kerusakan DNA, tetapi dapat mengubah ekspresi gen yang menghasilkan peningkatan jumlah sel melalui pembelahan sel atau menurunkan kematian sel secara apoptosis (Klaunig & Kamendulis, 2004). Oleh sebab itu, paparan promoter tumor dapat menghasilkan percepatan pertumbuhan sel terinisiasi dan akhirnya membentuk tumor ganas.

Tahap progresi yang merupakan tahap akhir dari karsinogenesis, bersifat ireversibel dan ditandai oleh adanya akumulasi kerusakan genetik yang berperan pada transisi dari jinak menjadi ganas, instabilitas genomik, dan gangguan sifat kromosom. Tahap ini melibatkan perubahan seluler dan molekuler dari keadaan preneoplastik menjadi neoplastik (Fuchs-Tarlovsky, 2013). Pada tahap progresi, tumor menginvasi jaringan lain dan bermetastasis untuk melanjutkan proses proliferasi sel (Farombi, 2004; Okey *et al.*, 2005).

C. Kanker Hati

Kanker hati yang umumnya dinamakan karsinoma hepatoseluler terjadi sebab tumbuhnya sel hepatosit secara tidak normal yang bersifat progresif (Putra *et al.*, 2022). Penyebab terjadinya kanker hati yaitu hepatitis B, hepatitis C, pola hidup, jenis kelamin, kondisi geografis, riwayat keluarga, dan tingkat keparahan kerusakan hati (Villanueva, 2019). Berikut proses terbentuknya sel kanker hati.



Gambar 2.6 Proses terbentuknya sel kanker hati

(Alwahsh & Gebhardt, 2017)

Berdasarkan *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) pengelompokan stadium kanker hati sebagaimana disajikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2
Stadium kanker hati

Stadium	Deskripsi
Sangat awal (0)	Kanker hati belum menyebar ke luar hati yang berukuran kurang dari 2 cm.
Awal (a)	Kanker hati belum menyebar ke luar hati yang berukuran kurang dari 3 cm.
Menengah (b)	Kanker hati belum menyebar ke luar hati yang berukuran lebih dari 3 cm.
Lanjutan (c)	Kanker telah tersebar ke organ yang dekat dengan hati.
Terminal (d)	Kanker telah tersebar ke organ lebih jauh dari hati.

(Chedid *et al.*, 2017)

D. Kanker Kolon

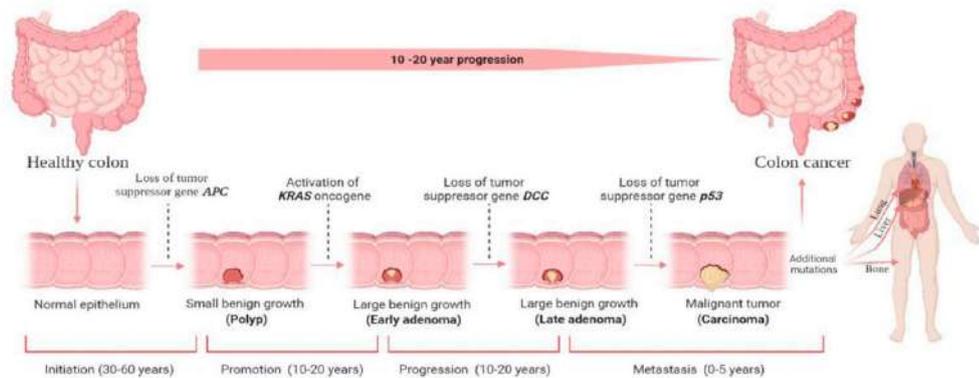
Kanker kolon adalah jenis kanker yang terjadi di bagian usus besar atau bagian rektum usus besar dari saluran gastrointestinal (Bardhan & Liu, 2013). Adenoma tahap awal adalah tahapan karsinogenesis yang disebabkan perubahan genetik pada kanker kolon. Kejadian kanker kolon bisa terjadi pada usia dini yang mana adanya mutasi gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) pada *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP), serta mutasi *human Mut L Homolog 1* (hMLH1) dan *human Mut S Homolog 2* (hMSH2) dalam kasus *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) (McPhee & Hammer 2010).

Perubahan fenotip mukosa kolon disebabkan kelainan genetik yang terjadi secara bertahap. Perubahan yang sangat awal dalam pembentukan kanker kolon yakni peningkatan jumlah sel di permukaan epitel. Terjadinya

penebalan dinding kolon yang diakibatkan hiperproliferasi sel epitel usus pada tahap promosi kanker kolon (McPhee & Hammer 2010).

Hiperproliferasi sel terjadi sebab adanya abnormalitas pada metilasi DNA, inaktivasi APC, hMLH1, hMSH2, dan ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) berlebihan. Mutasi sel akan semakin banyak sejalan dengan laju proliferasi sel sehingga sel epitel kolon tidak dapat mengatasi rusaknya DNA. Sel epitel kemudian menghasilkan adenoma yang ditandai adanya peningkatan jumlah dan ukuran sel-sel pembentuk kelenjar namun belum menginvasi struktur yang ada di sekitarnya (DeVita *et al.*, 2015).

Akumulasi rusaknya DNA semakin meningkat terjadi di tahap progresi. Secara anatomis, teramati adanya adenoma di kolon. Adenoma yang terbentuk akan tumbuh secara progresif sehingga terbentuk suatu displasia (pertumbuhan sel abnormal). Tahap selanjutnya mengakibatkan invasi sel kanker di sekitar kolon. Sel kanker yang masuk ke pembuluh darah bisa mengakibatkan penyebaran ke tempat yang jauh dan terbentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) sehingga dapat membentuk kanker di jaringan lain (metastasis) (Hanahan dan Weinberg, 2011). Berikut adalah proses terbentuknya kanker kolon sebagaimana disajikan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Proses terbentuknya sel kanker kolon. Ada empat tahap dalam perkembangan karsinogenesis kanker kolon: inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis. Hati adalah area metastasis yang paling umum, diikuti oleh paru-paru, dan tulang

(Hossain *et al.*, 2022)

Berdasarkan *National Cancer Institute* (2022), pengelompokan stadium kanker kolon sebagaimana disajikan pada Tabel 2.3.

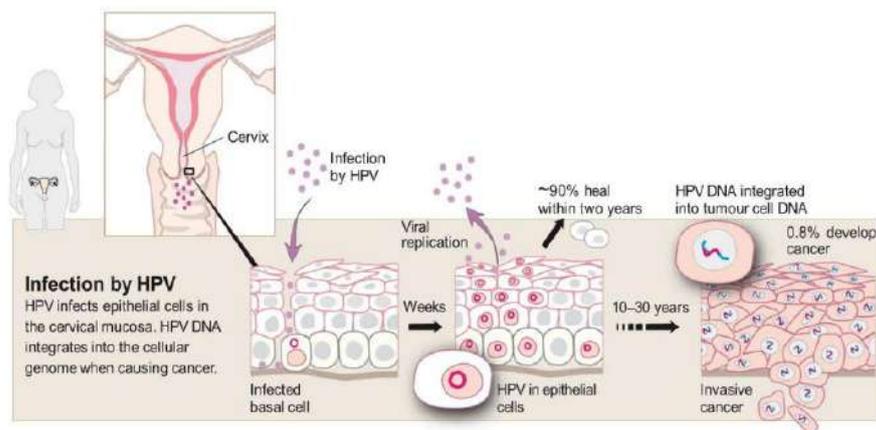
Tabel 2.3
Stadium kanker kolon

Stadium	Deskripsi
0	Ditemukan sel abnormal di lapisan terdalam dinding usus besar (kolon)
I	Kanker terbentuk di lapisan terdalam dinding usus besar dan sudah menyebar ke lapisan otot dinding usus besar.
IIA	Kanker telah tersebar hingga dinding usus besar.
IIB	Kanker telah tersebar ke jaringan yang melapisi organ di perut.
IIC	Kanker telah tersebar ke organ terdekat kolon.
IIIA	Kanker telah tersebar ke satu hingga tiga organ terdekat kolon.
IIIB	Kanker telah tersebar ke empat hingga enam organ terdekat kolon.
IIIC	Kanker telah tersebar ke tujuh atau lebih organ terdekat kolon.
IVA	Kanker telah tersebar ke satu organ yang tidak berada di dekat kolon seperti hati, paru-paru, dan ovarium.
IVB	Kanker telah tersebar lebih dari satu organ yang tidak berada di dekat kolon seperti hati, paru-paru, dan ovarium.
IVC	Kanker telah tersebar ke jaringan yang melapisi dinding perut dan ke organ lainnya.

(NCI, 2022)

E. Kanker Serviks

Kanker serviks merupakan suatu keganasan yang diakibatkan oleh bertumbuhnya sel-sel epitel serviks secara abnormal (Mirayashi, 2013). Kanker serviks sebanyak 99,7% diakibatkan oleh *Human Papilloma Virus* (HPV) onkogenik yang menginvasi rahim (Setiawati, 2014). HPV adalah penyebab utama adanya kanker serviks pada wanita yang dapat ditularkan dengan kontak seksual. Penyebab paling umum terjadinya kanker serviks yaitu HPV tipe 16 dan 18 (Kessler, 2017). Proses terbentuknya sel kanker serviks dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Proses terbentuknya kanker serviks

(Stark & Zivković, 2018)

Stadium kanker serviks yang digunakan adalah berdasarkan *The International Federation Of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) ditampilkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4

Stadium kanker serviks

Stadium	Deskripsi
I	Pertumbuhan kanker (karsinoma) terbatas pada serviks.
IA	Karsinoma teridentifikasi secara mikroskopis dengan

	kedalaman invasi maksimal 5 mm dan tidak lebih lebar dari 7 mm.
IA1	Invasi stroma seluas ≤ 7 mm dan sedalam ≤ 3 mm.
IA2	Invasi stroma seluas > 7 mm dan sedalam > 3 mm namun < 5 mm.
IB	Lesi klinis terbatas hanya pada serviks, atau lesi pra klinis lebih besar daripada stadium IA.
IB1	Lesi klinis dengan ukuran ≤ 4 cm.
IB2	Lesi klinis dengan ukuran > 4 cm.
II	Karsinoma tersebar di luar Rahim, tetapi tidak tersebar ke dinding panggul atau sepertiga bagian bawah pada vagina.
IIA	Keterlibatan sampai $2/3$ bagian atas vagina. Tidak terdapat keterlibatan parametrium.
IIA1	Lesi yang dapat dilihat secara klinis ≤ 4 cm.
IIA2	Lesi klinis dapat terlihat > 4 cm.
IIB	Terlihat invasi ke parametrium.
III	Tumor tersebar ke dinding samping pelvis. Saat pemeriksaan dubur, tidak terdapat ruang bebas antara dinding samping pelvis dan tumor.
IIIA	Tumor terdapat di sepertiga bawah vagina, tanpa adanya ekstensi ke dinding samping pelvis.
IIIB	Perluasan ke dinding samping pelvis atau ginjal yang tidak berfungsi
IV	Karsinoma telah tersebar ke pelvis yang sebenarnya atau secara klinis melibatkan rektum dan mukosa kandung kemih.
IVA	Tersebar ke area organ panggul yang berdekatan.
IVB	Tersebar ke area organ yang lebih jauh.

(Jhingran & Rodriguez, 2019)

F. Efek Samping dan Resistensi Kemoterapi

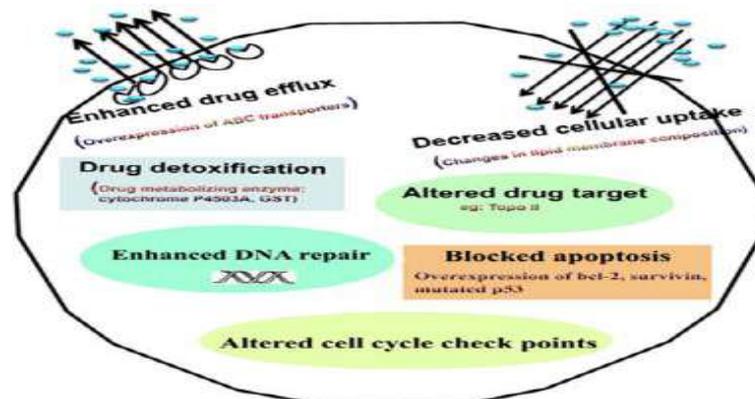
Kemoterapi merupakan metode yang banyak digunakan dalam mengobati berbagai kanker, disamping berbagai terapi lain yang telah ada saat ini seperti operasi, imunoterapi, terapi endokrin, terapi radiasi, dan terapi gen (Bukowski *et al.*, 2020). Kemoterapi termasuk dalam pengobatan sistemik sebab obat dapat menyebar ke seluruh tubuh, dan dapat membunuh sel kanker yang sudah bermetastasis ke area tubuh yang jauh dari tumor asal (Pinsolle *et al.*, 2019). Sebagai terapi kanker, kemoterapi mempunyai banyak

efek samping yakni rambut rontok, mual, muntah, dan penurunan kadar hemoglobin maupun trombosit yang menyebabkan menurunnya kualitas hidup pasien (Chui, 2019).

Selain itu, kemoterapi belum dapat bekerja dengan optimal sebab adanya efek sitotoksik terhadap sel-sel normal dan resistensi obat baik yang bersifat monoterapi maupun multiterapi (Khorsandi *et al.*, 2017). Efek samping yang ditimbulkan oleh pengobatan kemoterapi dikarenakan tingkat selektivitas yang rendah dari agen kemoterapi tersebut sehingga akan menyerang sel-sel normal (Haruna *et al.*, 2018). Meskipun telah ada kemajuan luar biasa selama beberapa dekade terakhir dalam pencegahan, deteksi, dan pengobatan kanker, resiko tumor memperoleh resistensi terhadap berbagai bahan kemoterapi (*resistensi multidrug*) telah menjadi menjadi masalah utama terhadap keberhasilan pengobatan kanker. MDR adalah sebuah fenomena di mana sel kanker menunjukkan fenotipe resistensi secara simultan terhadap beberapa obat sitotoksik atau sitostatik yang secara struktural dan/atau fungsional berbeda dan sering diamati selama terapi kanker (Rogosnitzky & Danks, 2011). Sel kanker dapat menunjukkan MDR intrinsik atau *acquired* MDR selama kemoterapi. Pada MDR intrinsik, sel kanker tidak merespon obat antikanker pada paparan awal saat proses kemoterapi (Michaelis *et al.*, 2019) Namun, dalam *acquired* MDR, resistensi terhadap kemoterapi terjadi setelah penggunaan obat antikanker dalam jangka waktu lama (Shaffer *et al.*, 2012). Tumor padat yakni *non-small cell lung cancer* (NSCLC), kanker ginjal, dan saluran pencernaan adalah beberapa tipe

kanker dengan MDR intrinsik. Sedangkan *small cell lung cancer* (SCLC), kanker ovarium, payudara, dan leukemia adalah beberapa tipe kanker dengan *acquired MDR* (Suzuki *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019; Bukowski *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

MDR umumnya disebabkan oleh spesifisitas sel berkaitan dengan absorpsi, metabolisme, dan pengiriman obat ke jaringan target spesifik. Hal tersebut tergantung dari pola genetik yang membantu mengatur respons seluler sehingga mencegah obat mencapai tingkat ambang batasnya yang diperlukan untuk berlangsungnya tindakan farmakologis (Rather & Bhagat, 2020) Selain itu, spesifisitas tumor dalam hal asalnya, pembuluh darah, dan fungsi jaringan. Resistensi terhadap kemoterapi diamati saat tumor terletak di bagian tubuh yang tidak dapat diakses oleh obat atau tumor sudah membentuk pembuluh darah yang mengganggu akses obat (Arvanitis *et al.*, 2020).



Gambar 2.9 Faktor yang berkontribusi pada *Multidrug Resistance* (MDR). Peningkatan efluks obat karena ekspresi berlebihan transporter ABC, penurunan ambilan seluler akibat perubahan komposisi lipid pada membran, detoksifikasi obat, gangguan target obat seperti topoisomerase II, peningkatan perbaikan DNA, gangguan *check point* siklus sel, dan penghambatan apoptosis karena ekspresi berlebihan dari protein anti-apoptosis Bcl-2 atau karena terjadinya mutasi pada protein supresor tumor P53 akan berkontribusi terhadap kejadian MDR.

(Saraswathy & Gong, 2013)

Penyebab resistensi obat kanker multifaktorial. Berbagai faktor diperkirakan berkontribusi terhadap mekanisme pengembangan resistensi diantaranya peningkatan efluks obat, mutasi target obat, penurunan ambilan seluler, peningkatan metabolisme obat dan perbaikan DNA yang mempermudah detoksifikasi obat, serta gangguan pada *checkpoint* siklus sel dan jalur apoptosis (To, 2013). Sebuah representasi skematis dari berbagai faktor yang berkontribusi terhadap MDR ditunjukkan pada Gambar 2.9.

Protein transporter memainkan peran penting pada absorpsi, distribusi, dan eliminasi obat, yang disebut "metabolisme fase III" (Xu *et al.*, 2005), Mekanisme efluks obat yang melibatkan transporter membran ATP (*Adenosine Triphosphate*)-*binding cassette* (ABC) adalah mekanisme MDR yang paling banyak dikaji (Schinkel & Jonker, 2012). Transporter ABC merupakan transporter efluks utama dan memiliki pengaruh besar pada efek farmakologi obat dengan mengganggu proses disposisi *in vivo*. Pada manusia, lebih dari 48 gen MDR telah diidentifikasi dari keluarga besar transporter ABC. P-gp (yang dikode oleh gen MDR1), *multidrug resistance-associated protein-1* (MRP1), dan *breast cancer resistance protein* (BCRP) (ABCG2) adalah transporter MDR yang penting dan ekstensif dikarakterisasi (Giacomini *et al.*, 2010).

Permeabilitas glikoprotein (P-gp) merupakan anggota dari keluarga besar transporter ABC dan telah diidentifikasi sebagai transporter ABC pertama yang berkaitan dengan resistensi obat. P-gp adalah suatu protein membran plasma 170 kDa yang dikode oleh gen MDRI dan terdiri dari dua ATP binding cassettes dan dua daerah transmembran. P-gp secara aktif memompa berbagai

obat antikanker dan senyawa hidrofobik lainnya keluar dari sel, sehingga menurunkan akumulasi intraseluler obat dan mempengaruhi efikasi obat. Berbagai bukti menunjukkan bahwa tumor yang dihasilkan dari jaringan yang secara alami memiliki tingkat ekspresi P-gp yang tinggi mengalami resistensi obat secara intrinsik yakni kanker pankreas, hati, dan ginjal (Kirtane *et al.*, 2013).

Studi ekstensif telah dilakukan selama beberapa dekade terakhir untuk meningkatkan efektivitas kemoterapi dengan menekan atau menghindari mekanisme MDR, diantaranya penggunaan obat antikanker baru yang bisa menghindari reaksi efluks, pengembangan modulator MDR atau kemosensitizer, penggunaan pembawa nano yang multifungsi, dan terapi dengan RNAi (Li *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan Chen *et al.* (2018) menyelidiki hubungan antara aktivitas flavonoid dari bahan alam dan aktivitas P-gp manusia bahwa pada konsentrasi tertentu signifikan menurunkan ekspresi ABCB1 dan menghambat fungsi P-gp.

G. Produk Bahan Alam Sebagai Obat Antikanker

Penanganan kanker dapat menggunakan kemoterapi, operasi, dan radiasi. Kemoterapi dilakukan dengan pemberian obat antikanker yang sitotoksik sehingga membunuh sel-sel kanker. Namun, terdapat mekanisme *Multidrug Resistance* (MDR) atau resistensi obat menyebabkan berkurangnya kemanjuran obat kemoterapi. Selain itu, penggunaan obat-obat kemoterapi memberikan efek samping yakni supresi sumsum tulang, lesi gastrointestinal, rambut rontok, resistensi obat, disfungsi neurologi, dan toksisitas jantung

(Hosseini & Ghorbani, 2015). Berbagai penelitian mulai diarahkan untuk menguji bahan alam untuk agen kemopreventif yakni sebagai pendamping kemoterapi agar sensitifitas sel kanker meningkat serta efek yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi berkurang. Agen kemopreventif adalah agen pencegah dan penghambat proses berkembangnya sel kanker serta membantu memulihkan kondisi kesehatan pasien kanker. Umumnya agen kemopreventif punya aktivitas penghambat tumbuhnya tumor melalui mekanisme penghentian siklus sel, pemacuan proses apoptosis ataupun penghambat ekspresi protein yang memiliki peran dalam resistensi obat (Miranti *et al.*, 2014).

Sejak zaman dahulu tanaman dijadikan sumber obat dalam berbagai tujuan pengobatan dan pemeliharaan kesehatan termasuk menangani kanker (Greenwell & Rahman, 2015). Banyak penelitian telah melaporkan mengenai hubungan antara karsinogenitas dan mengkonsumsi tanaman obat. Kandungan berbagai senyawa aktif pada tanaman obat terbukti dapat mengobati kanker di tahap inisiasi, promosi, dan progresi (Shanmugapriya *et al.*, 2016; Gogoi *et al.*, 2017). Dalam 30 tahun terakhir sudah banyak ditemukan 236 kandidat senyawa aktif (*New Chemicals Entities, NCEs*) yang berperan dalam obat kanker dan hampir 80% di antaranya adalah senyawa aktif bahan alam, termasuk tanaman obat. Vinblastine dan vinkristin adalah contoh senyawa aktif dari tanaman obat yang dipakai dalam pengobatan kanker darah. Beberapa senyawa antikanker baru yang dikembangkan juga yakni kamptothekin yang didapat dari tanaman *Phodophyllum peltatum* dan *Camptotheca acuminata*, termasuk sejumlah senyawa semi sintesis dan

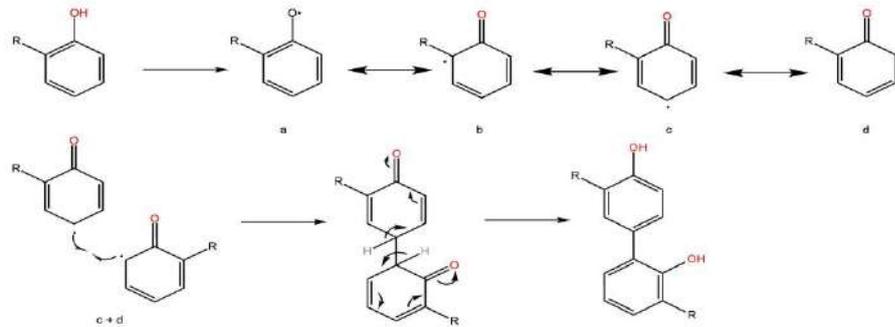
turunannya, yakni docetaxel, cabazitaxel, irridotekan, topotekan, etoposide, teniposide, dan etoposide (Khazir *et al.*, 2014).

Fenolik adalah salah satu senyawa yang umumnya dimiliki tanaman. Beberapa golongan senyawa fenolik yakni flavonoid, kumarin, turunan asam sinamat, dan tokoferol (Gupita & Rahayuni, 2012). Berbagai dampak dari senyawa fenolik yakni sebagai antioksidan alami dan antikanker. Senyawa aktif yang bertanggung jawab sebagai antioksidan yakni flavonoid, tanin, alkaloid, dan fenolik. Efek antioksidan dari vitamin E, vitamin C, karoten, golongan senyawa fenolik (terutama polifenol dan flavonoid) memiliki potensi untuk mengurangi resiko penyakit degeneratif (Kuntorini & Astuti, 2010).

Berdasarkan penelitian Muharini *et al.* (2021), kayu batang simpur air mengandung metabolit sekunder dengan kandungan total fenolik tertinggi pada fraksi metanol dengan $254,34 \pm 16,86$ mg GAE/g ekstrak. Sedangkan, kandungan flavonoid total tertinggi pada fraksi kloroform dengan $15,33 \pm 0,26$ mg RE/g ekstrak. Ekstrak kasar dan fraksi metanol memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dengan nilai IC_{50} masing-masing yaitu kurang dari 15,63 ppm dan 8,83 ppm.

Kandungan total fenolik yang tinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan Kainama *et al.* (2020), yang menyatakan bahwa sifat antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak kasar dan semua fraksi tanaman disebabkan oleh kandungan fenoliknya. Ketika antioksidan bereaksi dengan radikal bebas, delokalisasi elektron akan terjadi

pada senyawa fenolik, dan stabilisasi oleh efek resonansi dari inti aromatik, yang mencegah kelanjutan dari reaksi berantai radikal bebas (Zeb, 2020).



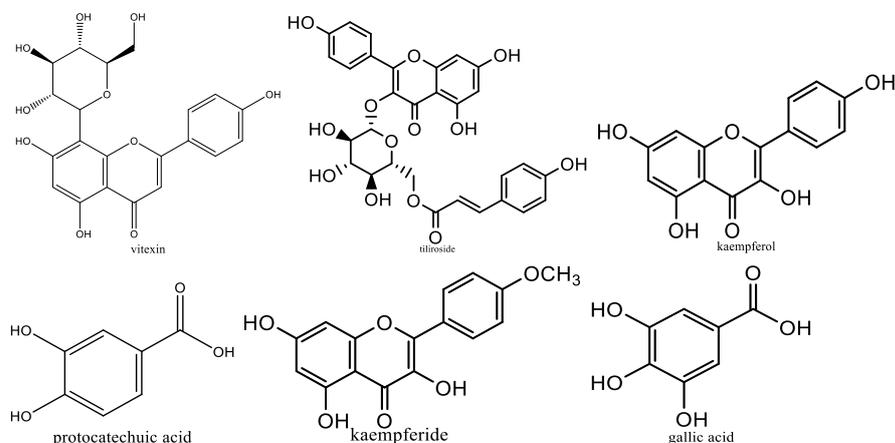
Gambar 2.10 Reaksi penggabungan dan pembentukan radikal fenoksil (Bruneton, 1999)

Kandungan metabolit sekunder yang diduga memiliki aktivitas antikanker yaitu fenolik dapat menghambat angiogenesis, inhibisi siklus sel, proliferasi sel dan mekanisme apoptosis (Achmad *et al.*, 2014; Achmad *et al.*, 2018). Antioksidan yang memiliki aktivitas kuat dapat berpotensi sebagai antikanker alami yang bekerja secara selektif terhadap sel kanker (Burhan *et al.*, 2019). Fenolik punya aktivitas penghambat regulasi siklus sel di fase G_2/M dengan penurunan ekspresi protein cyclin CDK1-cyclin B sehingga mencegah sel memasuki fase mitosis pada sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker paru-paru A549 (Armania *et al.*, 2013b; Nagappan *et al.*, 2016). Selain itu, fenolik menurunkan ekspresi COX-2 sel kanker kolon HT-29 (Suh *et al.*, 2009) dan sel kanker hati (HCC) (Liao *et al.*, 2015). Flavonoid menginduksi Fas-L untuk berikatan dengan Fas (jalur ekstrinsik), sehingga caspase-8 dapat mengaktivasi caspase-3 serta memotong protein Bid menjadi tBid yang mengaktifkan Bax yang mengakibatkan sitokrom c dilepaskan untuk

mengaktifkan caspase-9 dan caspase-3 pada sel kanker lambung AGS (Dong *et al.*, 2014; Abotaleb *et al.*, 2019). Fenolik meningkatkan ekspresi p53 di mitokondria (jalur intrinsik) yang mengakibatkan peningkatan ekspresi protein pro apoptosis yaitu Bax dan penurunan ekspresi protein anti apoptosis yaitu Bcl-2. Hal tersebut menginduksi permeabilitas membran luar mitokondria, sehingga sitokrom c lepas dari mitokondria yang akan mengaktifkan Apaf-1 serta procaspase-9, membentuk kompleks apoptosome yang mengaktifkan caspase eksekutor dan akhirnya menyebabkan apoptosis pada kanker kolon HCT116 (Xie *et al.*, 2014).

Berbagai penelitian terdahulu diketahui bahwa ekstrak metanol buah simpur air menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik yang signifikan terhadap sel kanker serviks Hela dan sel kanker usus besar HT29. Selain itu, ekstrak metanol akar simpur air menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik yang signifikan terhadap sel kanker serviks HeLa (Armania *et al.*, 2013a). Kandungan fenolik merupakan kontributor penting untuk aktivitas antioksidan tinggi yang diamati dalam ekstrak metanol akar simpur air (Armania *et al.*, 2013a,b). Meskipun ekstrak metanol akar simpur air menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik tertinggi dalam sel kanker HeLa, ditemukan bahwa ekstrak diklorometana dan etil asetat akar simpur air juga menunjukkan sitotoksitas yang lebih tinggi pada sel kanker payudara, MCF7 dan MDA-MB-231, sel kanker paru-paru A549, sel kanker ovarium CaOV3, dan sel kanker usus besar HT29 (Armania *et al.*, 2013a,b; Tor *et al.*, 2014; Foo *et al.*, 2016; Foo *et al.*, 2014).

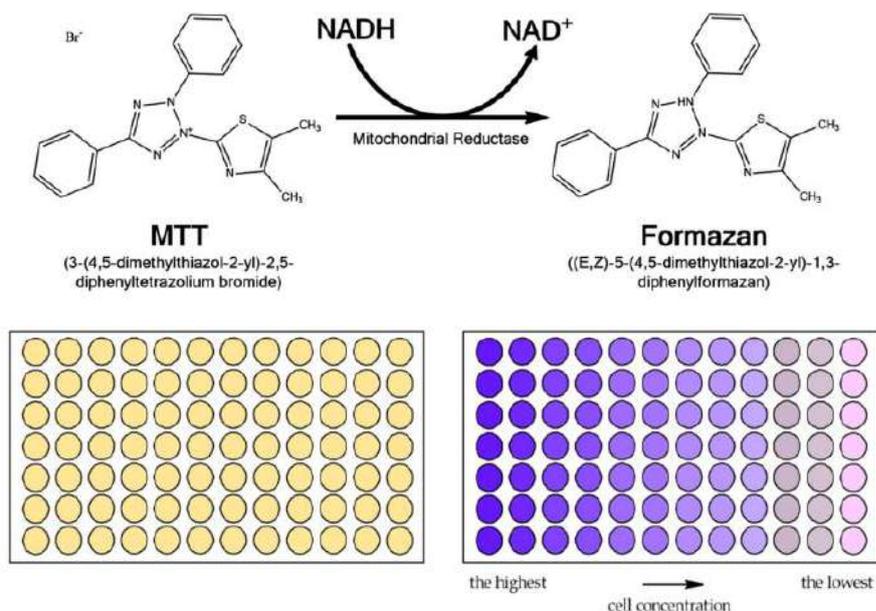
Penelitian lebih lanjut mekanisme anti kanker menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat akar simpur air menghambat proliferasi sel kanker serviks HeLa serta sel kanker payudara MCF7 dan MDA-MD-231 melalui induksi apoptosis dan penghentian siklus sel G₂/M (Armania *et al.*, 2013a,b). Selain itu, ekstrak air akar simpur air menunjukkan sifat antikanker pada kanker kolon yang diinduksi azoxymethane (AOM) pada tikus jantan Sprague Dawley (Husain, 2010). Ekstrak air akar juga menekan perkembangan kanker serviks pada karsinogenesis serviks yang diinduksi dietilstilbestrol (DES) pada model mencit Balb/c betina (Said, 2010). Studi *in vivo* yang dilakukan oleh Yazan *et al.* (2015) menunjukkan bahwa asupan oral ekstrak air akar simpur air telah berhasil mengurangi kanker payudara yang diinduksi pada tikus dan juga menghambat metastasis kanker ke jantung. Dengan demikian, senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam kayu batang simpur air yang diyakini memberikan aktivitas anti kanker salah satunya adalah senyawa golongan fenolik. Berikut adalah senyawa fenolik yang terdapat di tanaman simpur air.



Gambar 2.11 Senyawa golongan fenolik tanaman simpur air
(Tor *et al.*, 2015; Abubakar *et al.*, 2019)

H. Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay

Metode yang sering digunakan untuk mengukur kelangsungan hidup (viabilitas sel) atau efek sitotoksik suatu bahan, salah satunya adalah metode [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (MTT) assay. Metode MTT adalah metode pengujian dengan cara kolorimetri yang berdasarkan pada reduksi garam MTT berwarna kuning menjadi formazan yang berwarna biru keunguan oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Metode perubahan warna tersebut dipakai untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Mitokondria akan menyerap MTT saat sel mengalami proliferasi, sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu karena kristal tetrazolium (formazan) terbentuk (Nurani *et al.*, 2015). Reaksi reduksi yang terjadi pada proses MTT menjadi Formazan sebagaimana disajikan pada Gambar 12.



Gambar 2.12 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan
(Kamiloglu *et al.*, 2020; Ligasová & Koberna, 2021)

Metode MTT memiliki prinsip kerja yakni pengukuran aktivitas selular yang didasarkan atas kemampuan enzim mitokondria reduktase di mitokondria dalam mereduksi garam Metiltiazol Tetrazolium (MTT). Sel-sel hidup akan menghasilkan enzim mitokondria reduktase saat mengalami metabolisme. Enzim tersebut bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan warna ungu. Intensitas warna ungu yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin tinggi, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Arifah *et al.*, 2015). Formazan yang terbentuk dapat dilarutkan dengan natrium dodesil sulfat 10% (Nugroho *et al.*, 2013) atau dengan dimetilsulfoksida (DMSO) (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Absorbansi formazan dapat diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang tertentu (Aslantürk, 2018).

Pada skrining aktivitas sitotoksik, parameter yang paling umum ditentukan adalah nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}), yaitu nilai yang menunjukkan konsentrasi dimana bahan tersebut mampu menghambat pertumbuhan 50% sel hidup. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi persentase sel yang mampu bertahan hidup. Metode MTT dapat memberikan informasi hubungan antara jumlah sel yang aktif dengan adsorban yang diperoleh dari pengukuran yang dilakukan untuk menentukan nilai IC_{50} (Rollando & Prilianti, 2017).

Kuatnya aktivitas sitotoksik senyawa yang berpotensi sebagai antikanker dilihat dari nilai IC_{50} . Berdasarkan penelitian Widyanto *et*

al.(2020) mengenai nilai IC_{50} , bahwa senyawa yang sitotoksik potensial memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, sitotoksitas moderat $IC_{50} 100 - 1000 \mu\text{g/ml}$, dan tidak toksik $> 1000 \mu\text{g/ml}$. Senyawa yang memiliki sitotoksitas potensial dimanfaatkan sebagai agen antikanker dan senyawa yang memiliki sitotoksitas moderat dimanfaatkan sebagai agen kemoprevensi yang hanya bisa menghambat dan mencegah perkembangan sel kanker. Kemudian, *USA National Cancer Institut* juga mengelompokkan nilai IC_{50} yakni nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ sangat toksik, $21-200 \mu\text{g/ml}$ moderat (cukup aktif), $201-500 \mu\text{g/ml}$ lemah (sedang), dan $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ tidak toksik (Hameed-Abdel *et al.*, 2012).

Kultur sel adalah proses yang dilakukan pada sel hidup yang ditempatkan ke dalam suatu media sehingga sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro*. Kultur sel yang dapat dilakukan salah satunya *cell line* yang didapat dari subkultur pertama dari kultur primer (Andiana *et al.*, 2017). Salah satu keuntungan utama yang didapatkan dari kultur sel yakni bisa melakukan manipulasi fisikokimia (pH, suhu, tekanan osmotik, kandungan O_2 dan CO_2), serta manipulasi lingkungan fisiologis (konsentrasi nutrien dan hormon) dimana sel dapat berkembang biak (Nema & Khare, 2012). Pada sebagian sel diperlukan pH rentang 7-8 sebab pH dalam tubuh manusia ada pada rentang tersebut, buffer yang digunakan yaitu PBS (*Phosphat Buffer Saline*) yang berfungsi membantu untuk mempertahankan konstan pH (Rosdiana & Hadisaputri, 2016). Skrining sitotoksitas fraksi kayu batang simpur air dilakukan dengan menggunakan kultur sel berikut.

1. Sel HepG2

Sel HepG2 merupakan kultur sel kanker hati manusia yang diperoleh dari jaringan hati seorang pria Amerika kulit putih usia 15 tahun yang dikenal dengan penyakit karsinoma hepatoseluler. Morfologi sel HepG2 berbentuk epitel yang mengandung 55 pasang kromosom. Sel HepG2 dapat tumbuh cepat dan mengeluarkan banyak protein plasma yakni fibrinogen, transferin, plasminogen, albumin, alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin sehingga akan merespon rangsangan hormon pertumbuhan manusia (Moscato *et al.*, 2015).

Sel HepG2 merupakan sistem model *in vitro* yang cocok dalam penelitian sel hati manusia. Dengan kondisi kultur yang tepat, sel HepG2 menampilkan perbedaan morfologi dan fungsional yang kuat dengan pembentukan domain permukaan sel. Sel HepG2 adalah model yang cocok dalam mempelajari bagian intraseluler dari protein membran dan lipid pada hepatosit manusia secara *in vitro*. Hal ini menjadi penting untuk penelitian penyakit hati manusia yang diakibatkan oleh distribusi subselular salah dari protein permukaan sel, seperti hepato kanalikular yakni Sindrom Dubin-Johnson dan kolestasis intrahepatik (PFIC), dan hiperkolesterolemia (Moscato *et al.*, 2015).

Media kultur yang digunakan untuk menumbuhkan sel HepG2 yaitu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Dalam media DMEM terkandung asam amino dan vitamin dengan konsentrasi tinggi, dan komponen tambahan lainnya (Rohanova *et al.*, 2014). DMEM cocok

untuk menumbuhkan sel tumor dengan pertumbuhan yang sangat cepat salah satunya adalah sel HepG2 yang kemudian ditambahkan dengan 10 % FBS, penstrep, dan fungizone (amfoterisin B) pada suhu 37⁰ C dalam kelembaban 95% dan 5% CO₂ (Gangadhara *et al.*, 2016; Jamalidoust *et al.*, 2016).

Fetal Bovine Serum (FBS) merupakan serum yang diperoleh dari janin sapi yang bermanfaat untuk menyediakan nutrisi esensial, hormon, dan faktor pertumbuhan. Oleh sebab itu, sel yang dikultur menggunakan FBS mengalami proliferasi sel yang sangat cepat sehingga waktu inkubasi menjadi lebih singkat. Penisilin dan streptomisin digunakan sebagai antibiotik dalam mencegah kontaminasi bakteri. Karbon dioksida yang terlarut dalam media mengakibatkan kesetimbangan dengan HCO₃, ion yang menurunkan pH (Rosdiana & Hadisaputri, 2016; Syahidah & Hadisaputri, 2016). Kultur sel diinkubasi pada suhu 37⁰C sebab merupakan suhu normal tubuh manusia dan dengan 5% CO₂ juga sesuai dengan CO₂ yang diperlukan untuk sel supaya dapat mengubah makanan dari media kultur menjadi energi sehingga sel tumbuh dengan banyak (Rosdiana & Hadisaputri, 2016).

2. Sel WiDr

Salah satu sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita dengan usia 78 tahun adalah sel WiDr. Sel ini termasuk salah satu jenis kultur kanker kolon yang sering dipakai dalam berbagai penelitian. WiDr adalah turunan sel kanker kolon yakni sel HT-29 (Chen

et al., 1987). Sel WiDr bisa dipakai untuk berbagai penelitian yakni penelitian agen anti tumor, karsinogenisitas, dan aktivitas antitumor senyawa aktif baru.

Sel WiDr mengekspresikan biomarker CEA (*Carcinoembryonic Antigen*), punya *plating efficiency* tinggi, dan punya *doubling time* (waktu membelah) yang singkat dibandingkan dengan kultur sel kanker kolon yang lain. Salah satu ciri sel WiDr yaitu memiliki ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi sehingga dapat memacu proliferasi sel itu sendiri (Palozza *et al.*, 2005). Mediator inflamasi penting yang paling sering menjadi target pengobatan adalah prostaglandin yang dihasilkan dari asam arakidonat dari jalur siklooksigenase (COX) dengan melibatkan enzim COX (Price & Wilson, 2005).

Sel WiDr mengalami mutasi p53 di posisi 273 dimana residu arginin berubah menjadi histidin (Noguchi *et al.*, 1979). Saat p53 bermutasi, maka apoptosis di sel WiDr terjadi melalui jalur yang tidak tergantung pada p53, diantaranya melalui pengaktifan p73 (Levrero *et al.*, 2000). Meskipun p53 bermutasi, namun penghentian siklus sel pada sel WiDr masih memungkinkan untuk terjadi, karena protein p21 masih normal (Liu *et al.*, 2006).

Media kultur yang dipakai dalam pertumbuhan sel WiDr yaitu Media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 yang mengandung fosfat dalam jumlah besar dan diformulasi untuk digunakan dalam lingkungan atmosfer dengan 5% CO₂. Supaya mendapatkan pertumbuhan

sel yang optimal, media kultur ditambahkan serum 10% FBS (Propst *et al.*, 2016; Andiana *et al* 2017).

3. Sel HeLa

Sel HeLa adalah turunan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks). Sel HeLa diperoleh dari salah satu pasien penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal dikarenakan kanker pada tahun 1951. Penelitian sel HeLa pertama kali dilakukan di laboratorium kultur jaringan oleh George Gey di Johns Hopkins. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi *Human Papilloma Virus* 18 (HPV 18) sehingga memiliki sifat yang berbeda dengan sel leher rahim yang normal (Lucey *et al.*, 2009).

Sel kanker serviks yang terinfeksi HPV mengekspresikan dua onkogen, yakni E6 dan E7 (Choudhari *et al.*, 2013). Proses terbentuknya sel kanker HeLa dimulai dengan E6 yang akan berikatan dengan E6-Associated Protein (E6-AP) untuk membentuk *ubiquitin ligase* (E3) sehingga bisa mengakibatkan terjadinya degradasi gen p53. Akibat dari terdegradasinya gen p53 mengakibatkan apoptosis tidak dapat terjadi (Ruttkay-nedecky *et al.*, 2013).

Pada sel normal umumnya terjadi pengikatan protein retinoblastoma (pRb) dengan E2F yang berguna untuk menekan transkripsi gen pada siklus sel saat akan memasuki G1 menuju ke fase S. Pengikatan antara E7 dengan pRb mengakibatkan terjadinya inaktivasi pada E7-pRb.

Sedangkan E2F akan mengikat DNA untuk memberikan sinyal untuk melakukan proliferasi secara terus menerus (Choudhari *et al.*, 2013).

Media kultur yang biasa digunakan adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640-serum. Dalam media kultur terkandung nutrisi yang cukup untuk menumbuhkan sel HeLa yakni asam amino, glukosa, vitamin, dan garam-garam anorganik. Serum yang umumnya terkandung dalam media RPMI merupakan hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel. Albumin berguna sebagai protein transport, mineral sebagai kofaktor enzim, dan lipid diperlukan dalam pertumbuhan sel (Mutiah *et al.*, 2017).

4. Sel Vero

Sel Vero merupakan sel yang berasal dari sel ginjal normal kera Afrika Hijau dewasa (*Cercopithecus aethiops*) yang memiliki morfologi seperti fibroblas. Sel Vero banyak dipilih sebagai sel uji pada penelitian yang menggunakan kultur sel, karena dapat mewakili sebagian sel yang terdapat dalam tubuh (Giron *et al.*, 2005). Sel Vero yang berasal dari jaringan ginjal dipilih karena ginjal merupakan organ yang banyak terpapar oleh berbagai senyawa pada proses pembuangan hasil metabolisme tubuh, aliran darah yang menuju ginjal cukup tinggi dan mampu memekatkan senyawa yang akhirnya dikeluarkan bersama urin (Doyle & Griffith, 2000; Giron *et al.*, 2005).

Media kultur yang digunakan yaitu Medium 199 (M-199) dimana sering digunakan dalam produksi vaksin, virologi, dan kultur dari berbagai tipe sel normal (*non transformed*). Dalam pemakaian jangka

panjang harus ditambahkan serum. Dalam formula M-199 terkandung garam Earle's dan L-glutamin namun tidak terkandung natrium bikarbonat (Andiana *et al.*, 2017).

I. Indeks Selektivitas

Indeks selektivitas (IS) merupakan parameter dalam mengukur kemampuan ekstrak untuk membunuh secara selektif pada sel kanker dan bersifat aman pada sel normal. IS dipakai untuk menghindari adanya efek berbahaya dari obat antikanker terhadap sel normal (Sutedjo *et al.*, 2016).

Toksisitas ekstrak yang telah diketahui dapat menentukan indeks selektivitasnya dengan cara menggunakan nilai IC_{50} sel normal dibagi dengan nilai IC_{50} sel kanker dimana nilai $IS \geq 3$ semakin selektif (Masriani *et al.*, 2014). Semakin besar angka IS obat antikanker yang digunakan saat ini, artinya semakin banyak efek berbahaya yang ditimbulkan sehingga mengakibatkan penderita kanker banyak yang menghentikan kemoterapi (Saraswati *et al.*, 2020).

J. Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan kandungan kimia bahan alam yang didasarkan atas perbedaan kelarutan terhadap dua cairan berbeda yang tidak saling larut, umumnya yakni air dan pelarut organik (Mukhriani, 2014). Metode pemisahan berguna untuk menarik zat aktif yang ada di dalam sampel dalam jumlah yang maksimum sehingga menghasilkan ekstrak yang mengandung berbagai senyawa kimia (Susanty & Bachmid, 2016). Metode ekstraksi sering digunakan untuk penemuan obat tradisional. Pemilihan metode

ini tergantung atas sifat senyawa yang akan diisolasi (Zhang *et al.*, 2018). Beberapa target ekstraksi yakni senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme, senyawa bioaktif yang belum diketahui, dan kelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural (Mukhriani, 2014). Salah satu metode ekstraksi yang sederhana yang paling umum digunakan yakni metode maserasi atau perendaman (Saifudin, 2014).

Maserasi merupakan proses mengekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokkan atau pengadukan dalam suhu ruang. Metode maserasi umumnya dipakai untuk mengekstraksi senyawa senyawa yang kurang tahan panas (Chairunnisa *et al.*, 2019). Metode ini mudah dilakukan dan tidak perlu melakukan pemanasan sehingga senyawa aktif di bahan alam tidak mudah rusak. Pelarut yang dipilih didasarkan atas kelarutan dan polaritasnya untuk mempermudah memisahkan senyawa kimia aktif dalam sampel. Pengerjaan metode maserasi yang lama dan dalam keadaan didiamkan memudahkan banyak senyawa yang dapat terekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016).

Proses maserasi sangat menguntungkan saat mengisolasi senyawa aktif di bahan alam sebab pada proses perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel karena perbedaan tekanan antara di dalam dan luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Pelarut yang mengalir ke dalam sel bisa mengakibatkan protoplasma menjadi membengkak dan senyawa aktif di sel akan larut sesuai dengan kelarutannya. Pelarut yang digunakan akan

memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa kimia aktif bahan alam dalam pelarut tersebut (Yulianingtyas & Kusmartono, 2016).

Efektivitas ekstraksi senyawa aktif oleh pelarut sangat bergantung dari kelarutan senyawa tersebut dalam pelarut, sesuai dengan prinsip *like dissolve like* yakni suatu senyawa akan larut pada pelarut dengan sifat yang sama. Maserasi biasanya dilakukan menggunakan pelarut metanol yang bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar sehingga sangat baik untuk mengekstraksi kandungan metabolit sekunder dalam tumbuhan. Gugus hidroksil yang ada pada struktur metanol membuatnya dapat menarik semua komponen kimia polar dan gugus metil membuatnya dapat menarik semua komponen kimia non polar yang terdapat di dalam sampel (Saputra *et al.*, 2018).

K. Fraksinasi

Fraksinasi adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan sifat kepolarannya. Proses fraksinasi memakai dua pelarut yang tidak saling bercampur dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda (Akhsanita, 2012). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran berbeda dalam dua pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran berbeda pula. Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair dilakukan dengan cara pengocokan (Pratiwi *et al.*, 2016).

Prinsip pemisahan dengan metode fraksinasi didasarkan atas perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi, yakni fraksi

yang mempunyai bobot jenis yang lebih kecil akan terdapat di fase atas, sedangkan fraksi yang mempunyai bobot jenis lebih besar akan terdapat di fase bawah (Wahdaningsih *et al.*, 2015). Senyawa harus dipisahkan dengan kedua pelarut yang tidak saling bercampur yang dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian dikocok dan didiamkan. Hasilnya akan terjadi proses distribusi zat terlarut ke dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Distribusi ini terjadi akibat adanya perbedaan tingkat kepolaran dari suatu senyawa, sehingga akan terjadi pemisahan. Proses distribusi akan mudah terjadi akibat adanya pengocokan saat fraksinasi (Utami, 2022).

Ekstrak difraksinasi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti n-heksana, etil asetat, dan metanol. Pemilihan pelarut dalam fraksinasi umumnya tergantung pada sifat analitnya yang mana pelarut dan analit harus memiliki sifat yang sama. Contoh analit yang bersifat nonpolar akan terekstraksi pada pelarut yang relatif nonpolar seperti n-heksana, analit yang semipolar akan terlarut pada pelarut yang semipolar seperti etil asetat, dan analit yang polar akan terlarut pada pelarut yang polar seperti metanol (Utami, 2022).