

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Tanaman Simpurn Air

1. Morfologi dan Taksonomi Tanaman Simpurn Air



Gambar 2.1 Tanaman simpurn air (a) daun dan batang simpurn air; (b) bunga simpurn air; (c) buah simpurn air; (d) akar simpurn air.

(Sumber: Dokumentasi pribadi)

Simpurn air (*Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli) merupakan salah satu spesies tanaman dari genus *Dillenia*. Genus *Dillenia* terdiri dari sekitar 100 spesies dan tumbuh di daerah yang beriklim tropis dan subtropis di Asia Selatan, Australasia, dan Kepulauan Samudra Hindia. Hingga saat ini, baru delapan spesies *Dillenia* yang telah dilaporkan dapat digunakan secara tradisional untuk berbagai keperluan medis di beberapa negara, salah

satunya yaitu *Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli (Yazan & Armania, 2014). Tanaman dari genus *Dillenia* sudah banyak digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk pengobatan penyakit seperti kanker, diabetes mellitus, sakit kuning, luka, demam, batuk, dan diare serta *hair tonic*. Bagian tanaman yang dimanfaatkan yaitu daun, kulit batang, akar, bunga, buah, dan juga getahnya (Sabandar *et al.*, 2017).

Dillenia suffruticosa (Griff.) Martelli memiliki beberapa nama lokal. Di Indonesia disebut “Sempur” (Syafriana *et al.*, 2021), di Malaysia disebut “Simpoh air” (Yazan & Armania, 2014), dan di Brunei Darussalam disebut “Simpur bini” (Yakop *et al.*, 2020). Sempur air adalah tanaman asli Asia yang tumbuh di hutan tropis dari Malaysia, Indonesia, Filipina, dan Brunei Darussalam. Di Indonesia, tanaman simpur air banyak ditemukan di wilayah Sumatra dan Kalimantan (Syafriana *et al.*, 2021). Sempur air biasanya tumbuh di tanah liar, rawa-rawa, tanah berpasir putih, hutan sekunder, dan di sepanjang tepi jalan atau tepi hutan. Pohon simpur air berukuran sedang, memiliki bunga besar yang cerah dengan lima kelopak kuning tipis di sekitar benang sari berwarna putih, buah berbentuk bintang merah muda gelap, dan daun berbentuk oval besar (Goh *et al.*, 2017).

Klasifikasi tanaman simpur air adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Dilleniidae
Ordo : Dilleniales
Famili : Dilleniaceae
Genus : Dillenia
Spesies : *Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli

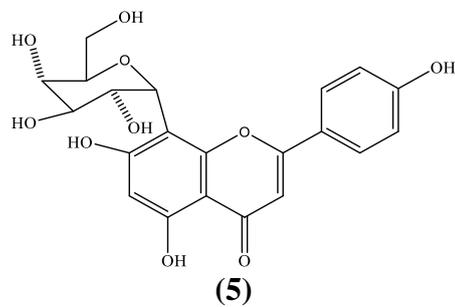
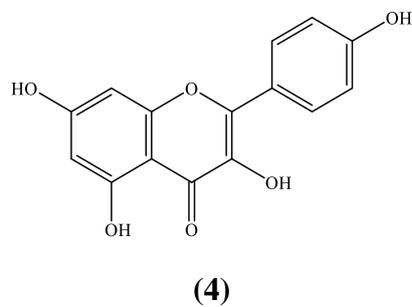
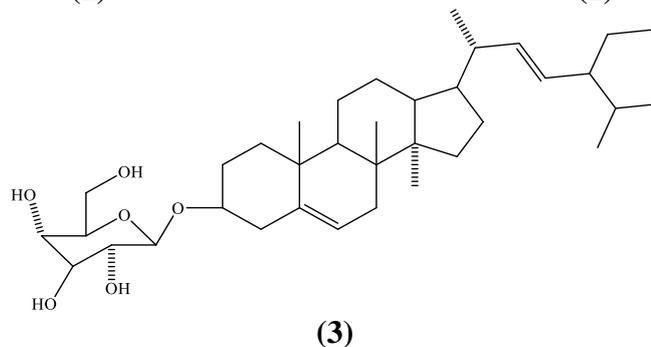
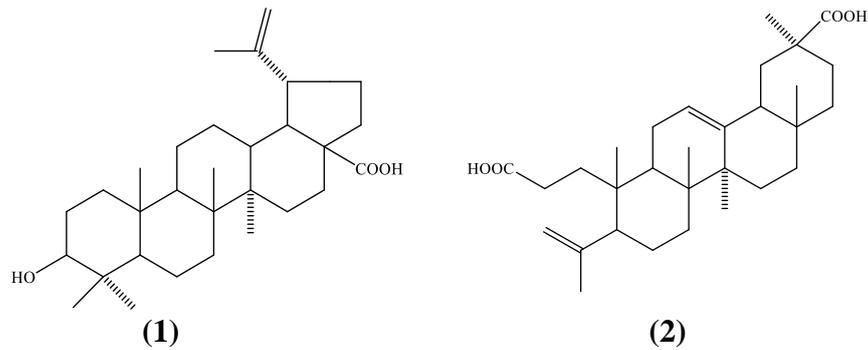
(Sumber: Plantamor, 2022)

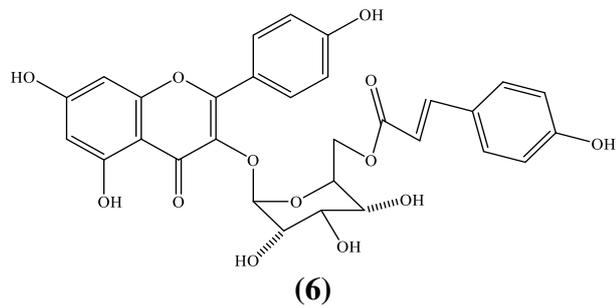
2. Kandungan Kimia Dalam Simpurn Air

Tanaman dari genus *Dillenia* pada umumnya mengandung triterpenoid, flavonoid dan glikosida, glikosida antrakuinon, turunan fenolik, dan tanin (Abubakar *et al.*, 2021). Spesies *Dillenia* menghasilkan isolasi dua golongan senyawa utama yaitu flavonoid dan triterpenoid. Selain itu, senyawa lain seperti fitosteroid, diterpene, norisoprena, ionon, fenolat, antrakuinon, alkohol, dan keton juga memperkaya keragaman fitokimia pada tanaman *Dillenia* (Sabandar *et al.*, 2017).

Penelitian ilmiah terkait kandungan kimia dari beberapa bagian tanaman simpurn air sendiri telah banyak dilaporkan. Hasil skrining fitokimia pada penelitian Putra *et al.* (2019), menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun simpurn air segar dan kukus mengandung senyawa golongan tanin, polifenol, dan triterpenoid. Penelitian Yuningtyas *et al.* (2018), menunjukkan bahwa ekstrak air dan etanol daun simpurn air mengandung flavonoid, saponin dan tanin. Kemudian penelitian Yakop *et al.* (2020), menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi daun simpurn air mengandung

alkaloid, steroid, fenolat, flavonoid dan saponin. Penelitian Shah, Seelan, *et al.* (2020) juga melaporkan adanya kandungan alkaloid, flavonoid, antrakuinon, fitosterol, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid dalam ekstrak metanol dan fraksi dari simpur air (Shah, Seelan, *et al.*, 2020). Penelitian lebih lanjut pada ekstrak metanol daun simpur air melaporkan isolasi tiga senyawa triterpenoid yaitu asam betulinat (1), asam koetjapic (2), dan stigmasterol 3-glikosida (3), serta tiga senyawa flavonoid yaitu kaempferol (4), vitexin (5), dan tiliroside (6) (Abubakar *et al.*, 2021).

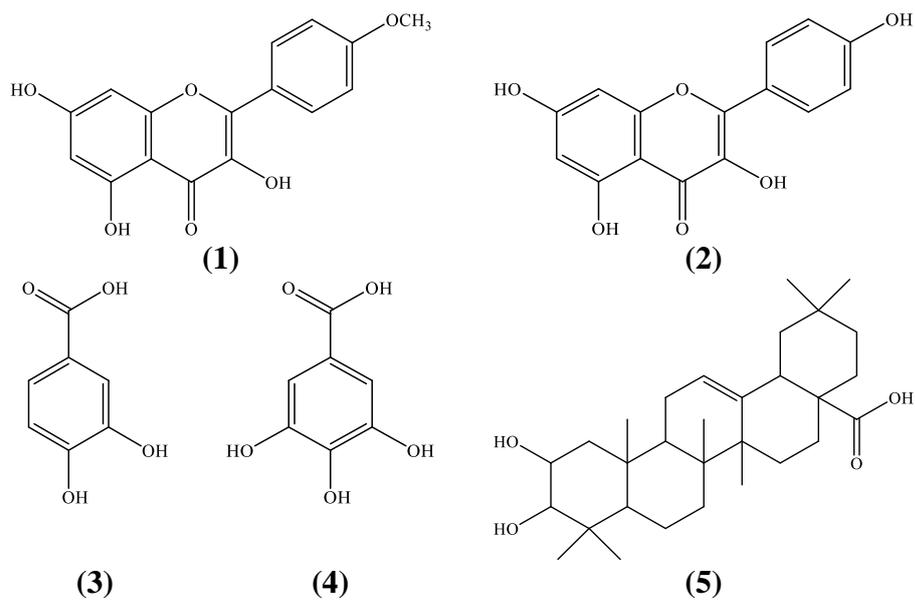


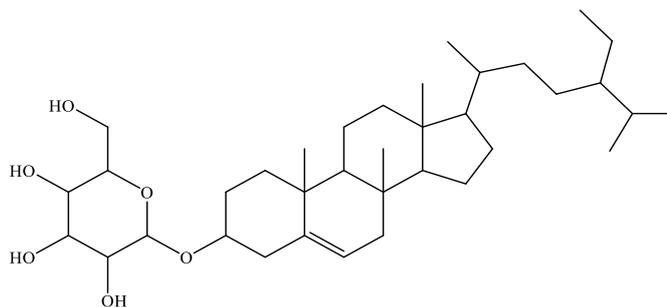


Gambar 2.2 Struktur senyawa yang diisolasi dari ekstrak metanol daun simpur air.

(Abubakar *et al.*, 2021)

Selanjutnya skrining fitokimia kualitatif ekstrak akar simpur air menunjukkan adanya saponin, triterpen, sterol, tanin dan polifenol (Armania *et al.*, 2013a). Penelitian lebih lanjut pada ekstrak etil asetat akar simpur air telah berhasil mengisolasi dua flavonoid yaitu kaempferide (1) dan kaempferol (2), dua fenolat yaitu asam protocatechuic (3) dan asam galat (4), serta dua triterpenoid yaitu asam 3-epimaslinic (5) dan β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (6) (Tor *et al.*, 2015).





(6)

Gambar 2.3 Struktur senyawa yang diisolasi dari ekstrak etil asetat akar simpur air.

(Tor *et al.*, 2015)

Penelitian lain terhadap bagian kayu batang simpur air berasal dari Kalimantan Barat, Indonesia yang menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, steroid dan terpenoid (Muharini *et al.*, 2021). Kandungan total fenolik (TPC) tertinggi ditunjukkan oleh fraksi metanolnya sebesar $254,34 \pm 16,86$ mg GAE/g ekstrak. Sedangkan kandungan flavonoid total (TFC) tertinggi ditunjukkan oleh fraksi kloroformnya sebesar $15,33 \pm 0,26$ mg RE/g ekstrak. Ekstrak kasar dan fraksi metanol kulit batang simpur air menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dengan masing-masing nilai IC_{50} yaitu kurang dari 15,63 ppm dan sebesar 8,83 ppm. Oleh karena itu, kulit batang simpur dapat dianggap sebagai sumber antioksidan alami yang potensial (Muharini *et al.*, 2021).

3. Efek Farmakologi Tanaman Simpur Air

Daun simpur air biasanya digunakan oleh masyarakat sebagai pembungkus lontong, pepes, tempe atau produk pangan fermentasi kacang-kacangan. Simpur air secara ilmiah telah terbukti memiliki potensi

terapeutik (Yazan & Armania, 2014). Kandungan fitokimia dalam simpur air berperan penting dalam meredakan dan meringankan berbagai jenis penyakit (Goh *et al.*, 2017). Di Kabupaten Bengkayang, Kalimantan Barat daun simpur air digunakan oleh Suku Dayak dengan daun mudanya direbus kemudian dimakan untuk mengobati batuk atau berak berdarah (Gunadi *et al.*, 2017). Masyarakat di pulau Bangka Belitung juga sering memanfaatkan air rebusan daun simpur air untuk mengobati diabetes melitus (Yuningtyas *et al.*, 2018) dan sebagai antidiare (Syafriana *et al.*, 2021). Selain itu, daun simpur air secara tradisional juga dapat digunakan untuk mengobati peradangan (F. B. Ahmad & Holdsworth, 1995), meredakan rematik (Hanum, 1999), dan mengobati demam (Yazan & Armania, 2014). Bagian daun simpur air biasa digunakan oleh masyarakat dalam bentuk tapal atau tuam maupun pucuknya dimakan sebagai lalapan (ulam) (Sabandar *et al.*, 2017). Buahnya juga dapat digunakan dengan cara dioleskan untuk mengobati daerah yang sakit akibat dugaan kanker (F. B. Ahmad & Holdsworth, 1995). Aktivitas farmakologi tanaman simpur air berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2.1 dibawah ini.

Tabel 2.1*Efek farmakologi tanaman simpur air*

Bagian Tanaman	Efek Farmakologi	Ekstrak	Terhadap	Sumber
Daun	Anti virus	Air	Infeksi/replikasi virus dengue tipe 2 (DV2)	(Muliawan, 2008)
	Anti inflamasi	Metanol	Edema kaki tikus Sprague Dawley	(Abubakar <i>et al.</i> , 2019)
	Anti mikroba	Etanol Metanol	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Syafriana <i>et al.</i> , 2021) (Wiart <i>et al.</i> , 2004)
	Anti bakteri	Ekstrak metanol, fraksi heksana, kloroform, etil asetat dan dietil eter	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>	(Yakop <i>et al.</i> , 2020)
	Anti parasit	Metanol	Lintah laut <i>Zeylanicobdella arugamensis</i> (Hirudinea)	(Shah, Venmathi Maran, <i>et al.</i> , 2020)
	Anti diabetes	Air dan etanol Etanol	- -	(Yuningtyas <i>et al.</i> , 2018) (Masriani <i>et al.</i> , 2020)
	Anti oksidan	Ekstrak metanol, fraksi heksana, kloroform, etil asetat dan dietil eter Etanol	- -	(Yakop <i>et al.</i> , 2020)
		Ekstrak metanol dan fraksi metanol, etil asetat, heksana dan kloroform, serta minyak esensial	-	(Masriani <i>et al.</i> , 2020) (Shah, Seelan, <i>et al.</i> , 2020)
	Anti kanker	Air dan metanol Metanol	- Sel HeLa	(Armania <i>et al.</i> , 2013a) (Armania <i>et al.</i> , 2013a)

Bagian Tanaman	Efek Farmakologi	Ekstrak	Terhadap	Sumber
Akar	Antioksidan	Air dan metanol	-	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
	Anti kanker	Metanol	Sel MCF-7, HT29, CaOV3, dan HeLa	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
		Heksana	Sel HeLa, CaOV3, dan MCF-7.	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
		Etil asetat	Sel MCF-7	(Tor <i>et al.</i> , 2014; Tor <i>et al.</i> , 2015)
Kayu Batang			Sel HeLa, CaOV3, MCF-7, A549, dan HT29.	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
		Diklorometana	Sel MCF-7	(Foo <i>et al.</i> , 2014)
			Sel MDA-MB 231	(Foo <i>et al.</i> , 2016)
			Sel HeLa, CaOV3, MCF-7, MD-MB-231, A549, dan HT29.	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
		Air	Sel 4T1 disuntikkan pada tikus BALB/c betina	(Yazan <i>et al.</i> , 2015)
Kayu Batang			Sel MCF-7	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
	Anti diabetes	Etanol	Tikus (<i>Rattus novvergicus</i>) Galur Wistar Jantan	(Hediyansah <i>et al.</i> , 2019)
		Etanol	-	(Masriani <i>et al.</i> , 2020)
	Anti oksidan	Ekstrak kasar, fraksi kloroform, dan fraksi metanol.	-	(Masriani <i>et al.</i> , 2020) (Muharini <i>et al.</i> , 2021)
Buah	Anti oksidan	Air dan metanol	-	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
	Anti kanker	Metanol	Sel HeLa	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)
Bunga	Anti oksidan	Air dan metanol	-	(Armania <i>et al.</i> , 2013a)

Beberapa penelitian terdahulu, telah membuktikan bahwa simpur air dapat menjadi agen antikanker yang potensial. Ekstak metanol buah simpur air menunjukkan aktivitas antikanker terhadap sel kanker HeLa dan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HT29. Kemudian ekstrak metanol daun simpur air juga menunjukkan aktivitas antikanker terhadap sel kanker HeLa. Penelitian pada bagian akar, melaporkan bahwa ekstrak metanol akar simpur air menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker MCF-7, HT29, CaOV3, dan HeLa. Ekstrak heksana akar simpur air menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HeLa, CaOV3, dan MCF-7. Ekstrak etil asetat akar simpur air menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HeLa, CaOV3, MCF-7, A549, dan HT29. Ekstrak diklorometana akar simpur air juga menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HeLa, CaOV3, MCF-7, MD-MB-231, A549, dan HT29 (Armania *et al.*, 2013a).

Penyelidikan mekanisme antikanker menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan diklorometana akar simpur air menghambat proliferasi sel kanker serviks HeLa melalui induksi apoptosis dan penghentian siklus sel G2/M (Armania *et al.*, 2013a). Ekstrak etil asetat dan diklorometana akar simpur air juga menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF7 dan MDA-MD-231 melalui induksi apoptosis dan penghentian siklus sel G2/M (Armania *et al.*, 2013b). Lebih lanjut dilaporkan ekstrak etil asetat akar simpur air bertindak sebagai agen anti kanker pada sel kanker MCF-7

dengan cara menginduksi stres oksidatif yang telah menyebabkan apoptosis melalui jalur yang bergantung pada mitokondria dengan hilangnya permeabilitas membran mitokondria, serta menginduksi apoptosis independen kaspase dan penghentian siklus sel yang difasilitasi oleh p21 dan p53 (Tor *et al.*, 2014; Tor *et al.*, 2015). Kemudian aktivitas antikanker dari ekstrak diklorometana akar simpur air terhadap sel kanker MCF-7 dengan cara menginduksi penghentian siklus sel dan apoptosis yang kekurangan kaspase-3 melalui beberapa jalur pensinyalan (Foo *et al.*, 2014), serta menginduksi apoptosis terhadap sel kanker MDA-MB 231 (Foo *et al.*, 2016). Selanjutnya ekstrak air juga dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker MCF-7 (Armania *et al.*, 2013a), dan studi *in vivo* pada penelitian Yazan *et al.* (2015) melaporkan bahwa asupan oral ekstrak air akar tanaman simpur air telah berhasil mengurangi kanker payudara yang diinduksi pada tikus dan juga menghambat metastasis kanker ke hati. Namun, hingga saat ini efek farmakologis antikanker dari kayu batang simpur air masih belum ada dilaporkan.

B. Kanker dan Karsinogenesis

1. Kanker

Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang abnormal karena kesalahan sistem pembelahan ditingkat sel, dimana pertumbuhan sel berlangsung secara terus-menerus, tidak terkendali, mampu menginvasi jaringan di dekatnya, dan bermetastasi ke jaringan atau organ yang lebih jauh (Otto, 2015; Aisy *et al.*, 2022). Sel kanker memiliki

ciri-ciri yang berbeda dari sel normal pada umumnya yaitu: (1) mempunyai kemampuan mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri yang dapat memacu siklus sel; (2) insensivitas terhadap anti faktor pertumbuhan yang menyebabkan daur sel tidak terhenti; (3) kehilangan kemampuan melakukan program bunuh diri atau yang disebut dengan apoptosis, sehingga sel tersebut terus bertambah; (4) invasi ke jaringan lain dan masuk ke peredaran darah, sehingga dapat mengalami metastasis; (5) potensi replikasi yang tidak terbatas (immortal), dengan kemampuan untuk memenuhi kebutuhan sinyal membentuk pertumbuhan dan kemampuan menghindari dari mekanisme apoptosis, sel kanker memiliki kemampuan untuk bereplikasi tak terbatas; (6) kemampuan untuk membentuk saluran darah ke sel kanker (angiogenesis) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Kanker adalah penyakit abnormabilitas genetik kompleks yang melibatkan berbagai macam jalur sinyaling molekuler maupun seluler. Salah satu penyebab paling utama dari terjadinya kanker yaitu adanya mutasi pada gen-gen tertentu. Mutasi tersebut dapat menyebabkan perubahan fungsi protein yang di ekspresikan sehingga mengakibatkan transformasi sel normal menjadi sel kanker. Mutasi gen pada sel kanker yang ditemukan sangat bervariasi. Dalam satu massa tumor sejenis bisa mempunyai berbagai macam mutasi gen yang berbeda (heterogenik). Pada umumnya, mutasi-mutasi gen tersebut terjadi pada gen yang berperan dalam jalur sinyaling terkait proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi sel (S. Rahmawati, 2021).

Terjadinya kanker disebabkan oleh mutasi atau kerusakan gen yaitu proto-onkogen dan gen supresor tumor (Liu *et al.*, 2018). Onkogen yang merupakan bentuk mutasi dari proto-onkogen, dan gen supresor tumor (TSG) adalah dua kelompok utama gen yang berhubungan dengan proses pembentukan kanker atau karsinogenesis (Zacharias *et al.*, 2020). Kedua kelompok gen ini memegang peranan penting dalam perkembangan kanker karena mempengaruhi berbagai jalur sinyaling seluler dan molekuler, termasuk induksi terjadinya ketidakstabilan genomik, induksi proliferasi, inhibisi apoptosis dan diferensiasi sel (S. Rahmawati, 2021). Proto-onkogen merupakan gen yang dalam kondisi normal bertanggung jawab untuk proliferasi sel atau yang berfungsi untuk mendorong pertumbuhan sel. Proto-onkogen dapat mengalami mutasi menjadi onkogen. Mutasi dari proto-onkogen menjadi onkogen menyebabkan terganggunya fungsi gen sehingga mengakibatkan proliferasi sel menjadi tidak terkontrol (Vicente-Deñás *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Ketika proto-onkogen mencapai mutasi spesifik, maka gen tersebut dapat menjadi onkogenik dan mengubah peran normalnya dari mempertahankan homeostasis menjadi mempromosikan sinyal tumorigenik (Patterson *et al.*, 2018). Gen supresor tumor (TSG) merupakan gen yang dalam kondisi normal berperan untuk menghambat pertumbuhan sel atau menahan pembelahan sel agar terjadi perbaikan kerusakan DNA. Apabila perbaikan DNA gagal, maka gen supresor tumor akan mendorong sel melakukan apoptosis, sehingga pada

akhirnya dapat menekan metastasis (Hanahan & Weinberg, 2011; Liu *et al.*, 2018).

Pada kanker, proliferasi sel normal yang tidak terkontrol menghasilkan ketidakstabilan dan perubahan genetik terakumulasi di dalam sel dan jaringan yang selanjutnya mengubah sel normal menjadi sel ganas. Ketidakstabilan genetik ini termasuk mutasi pada onkogen (MYC, RAF, Bcl-2, RAS (akselerator biologis)), gen supresor tumor (p53, NF1, NF2, RB dan pemutusan biologis), gen perbaikan DNA (p21, p22, p27, p51, p53 dan *tool box* untuk DNA), dan gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan metabolisme sel (Mazumder *et al.*, 2020). Kanker bisa disebabkan oleh faktor internal ataupun eksternal. Faktor internal yakni faktor genetik atau bawaan, faktor kejiwaan, faktor hormonal, dan kekebalan tubuh, sedangkan faktor eksternal dapat berupa radikal bebas, radiasi, sinar ultra violet, infeksi, virus, rokok, dan bahan kimia dari makanan (Utari *et al.*, 2013).

Gen-gen yang mengalami mutasi akan menghasilkan suatu sinyal yang meningkatkan proliferasi dan menurunkan apoptosis secara terus menerus dan tidak terkontrol pada suatu jaringan, sehingga lambat laun akan mengakibatkan terbentuknya tumor. Ketika tumor ini terus berkembang, terjadi perubahan metabolisme sel, yang mencakup peningkatan aktivitas metabolisme dari energi untuk menutrisi atau “memberi makan” sel-sel tumor. Hal ini mengakibatkan sel-sel normal yang berada di sekitarnya menjadi kekurangan nutrisi penting. Selanjutnya, adanya kondisi anoksik atau kurangnya suplai oksigen (karena aktivitas metabolisme yang tinggi)

akan menginduksi terbentuknya proses angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru pada massa tumor. Tujuan dari angiogenesis adalah untuk mencukupi kebutuhan oksigen yang dikirim ke tumor. Hal ini dimediasi oleh reseptor faktor-faktor pertumbuhan seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF). Ketika tumor semakin berkembang dan mendapatkan mutasi yang berbeda (mutasi sekunder), maka sel-sel tumor memerlukan nutrisi yang semakin banyak. Kondisi tersebut mengakibatkan sel tumor menjadi agresif dan mulai bermigrasi dan menyerang membran sel, yang pada akhirnya menyebabkan metastasis ke jaringan lain. Sel tumor yang mengalami metastasis disebut sebagai sel kanker ganas. Sel kanker yang bermetastasis akan mengalami proses yang berkelanjutan dan dapat menyebabkan kematian (Patterson *et al.*, 2018).

2. Kanker Payudara

Kanker merupakan penyakit yang menjadi ancaman bagi semua negara di dunia. Salah satu ancaman kanker pada wanita adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyakit yang menakutkan bagi wanita, karena kanker payudara sering ditemukan pada stadium lanjut (Nurrohmah *et al.*, 2022). Kanker payudara disebut juga dengan *Carcinoma Mammae* adalah sebuah tumor (benjolan abnormal) ganas yang tumbuh dalam jaringan payudara. Tumor ini dapat tumbuh dalam kelenjar susu, saluran kelenjar, dan jaringan penunjang payudara (jaringan lemak, maupun jaringan ikat payudara). Tumor ini dapat pula menyebar ke bagian lain di seluruh tubuh (Iqmy *et al.*, 2021).

Secara konseptual penyebab pasti dari kanker payudara masih belum di ketahui sampai saat ini (Nurrohmah *et al.*, 2022). Meskipun demikian, kanker payudara adalah penyakit multifaktorial, dimana terdapat berbagai faktor yang berkontribusi terhadap kejadiannya (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). Faktor risiko kanker payudara meliputi: usia, genetik dan riwayat keluarga, riwayat reproduksi dan hormonal, serta gaya hidup (Iqmy *et al.*, 2021).

Bertambahnya usia merupakan salah satu faktor risiko paling kuat untuk kanker payudara. semakin bertambahnya usia seseorang, maka kemungkinannya untuk mengalami kanker payudara akan meningkat. Sebagian besar kanker payudara yang didiagnosis adalah setelah menopause (usia 40–50 tahun) (Iqmy *et al.*, 2021). Genetik dan riwayat keluarga merupakan faktor risiko utama kejadian kanker payudara. Hal ini berkaitan dengan perubahan genetik yaitu mutasi gen proto-onkogen (HER2) dan gen supresor tumor (BRAC1 dan BRAC2) pada epitel payudara. Mutasi ini menyebabkan sel dapat berkembang biak secara terus menerus tanpa terkendali, sehingga timbullah kanker (Cardoso *et al.*, 2019); Hero, 2021; Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Nurrohmah *et al.*, 2022). Riwayat reproduksi dan hormonal juga merupakan faktor risiko penting karena berkaitan dengan paparan hormon estrogen yang memiliki fungsi proliferasi sel-sel payudara. Adapun riwayat reproduksi dan hormonal yang berisiko meliputi: usia menarche di bawah 12 tahun, usia menopause di atas 55 tahun, kehamilan pertama pada usia diatas 35 tahun, tidak menyusui, serta

penggunaan kontrasepsi hormonal lebih dari 5 tahun (Hero, 2021; Iqmy *et al.*, 2021; Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Purwanti *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2017). Gaya hidup merupakan faktor yang tidak dapat dilepaskan dari berbagai penyakit. *Sedentary life style* atau gaya hidup menetap berkaitan dengan kanker payudara karena dapat menyebabkan penumpukan adiposa yang merupakan jaringan tempat produksi sekunder dari hormone estrogen. Selain *sedentary life style*, konsumsi alkohol dan merokok juga dapat meningkatkan risiko kanker payudara. Alkohol dapat mengganggu metabolisme estrogen di hati, sedangkan asap rokok memiliki kandungan karsinogenik yang berujung pada peningkatan proliferasi sel payudara (Cardoso *et al.*, 2019; Godinho-Mota *et al.*, 2019; Hero, 2021; Iqmy *et al.*, 2021; Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Nurrohmah *et al.*, 2022).

3. Karsinogenesis

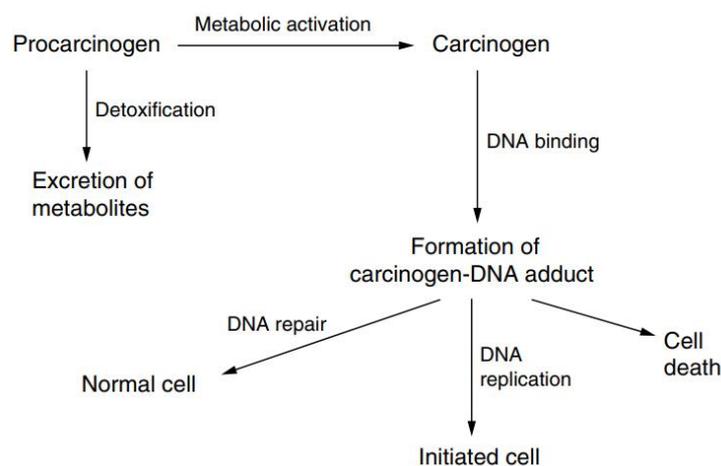
Karsinogenesis atau proses terjadinya tumor merupakan proses pertumbuhan kanker secara mikroevolusioner dari suatu sel normal akibat akumulasi kesalahan genetik yang berlangsung lama dan melalui berbagai tahapan menuju bentuk progresif dan akhirnya menjadi ganas (Hanahan & Weinberg, 2011). Menurut Patterson *et al.* (2018), karsinogenesis adalah proses perubahan sel normal menjadi sel kanker yang terjadi karena adanya abnormalitas genetik.

Kanker merupakan perubahan sel normal menjadi sel tumor dalam proses bertingkat dan umumnya berkembang dari sel-sel prakanker menjadi tumor yang ganas. Perubahan tersebut merupakan akibat dari interaksi

antara faktor genetik seseorang (DNA) dengan tiga jenis agen eksternal yang disebut karsinogen yaitu karsinogen fisik, kimia dan biologis (Bradley *et al.*, 2019). Karsinogen fisik seperti radiasi pengion dan ultraviolet, karsinogen kimia seperti asbes, komponen asap tembakau, aflatoksin (pencemar makanan) dan arsenik (pencemar dalam air minum), dan karsinogen biologis, seperti bakteri atau parasit, dan infeksi dari virus tertentu (Aljamali *et al.*, 2022).

Karsinogenesis merupakan proses yang multistap, terdiri dari tiga tahapan yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Fuchs-Tarlovsky, 2013). Inisiasi adalah proses irreversibel dan terjadi saat DNA berinteraksi dengan karsinogen atau bahan penginisiasi. Pada karsinogenesis oleh bahan kimia, proses metabolisme yang terjadi pada tahap inisiasi memegang peran penting. Beberapa karsinogen kimia dapat bereaksi langsung sebagai karsinogen tanpa membutuhkan aktivasi, sedangkan beberapa yang lain harus diaktifkan secara metabolik sebelum menjadi karsinogen. Pada tahap inisiasi, enzim fase I (misalnya sitokrom P450) bereaksi dengan karsinogen atau xenobiotik untuk membentuk senyawa elektrofil kuat dan mutagenik yang bertanggung jawab atas kerusakan DNA dan mutasi yang berperan pada awal inisiasi perkembangan kanker. Sebenarnya enzim fase II (misalnya glutathione transferase) bisa mendetoksifikasi senyawa tersebut dengan membentuk glutathione yang larut dalam air atau konjugasi sulfat yang mudah dihilangkan oleh tubuh, akan tetapi mekanisme pertahanan ini tidak kuat (Giovannini *et al.*, 2007). Selanjutnya karsinogen atau metabolit aktif

yang bersifat elektrofil kuat akan berikatan dengan DNA untuk membentuk *adduct*. *Adduct* DNA karsinogen tersebut dapat dihilangkan melalui mekanisme perbaikan DNA. Jika perbaikan DNA gagal, maka sel akan mengalami apoptosis atau DNA akan direplikasi menghasilkan sel terinisiasi (Martinez *et al.*, 2003). Pembentukan *adduct* DNA merupakan inti dari proses karsinogenik, karena jika *adduct* tersebut lolos dari mekanisme perbaikan seluler dan bertahan, mereka dapat menyebabkan *miscording* dan akhirnya mutasi (Wogan *et al.*, 2004).

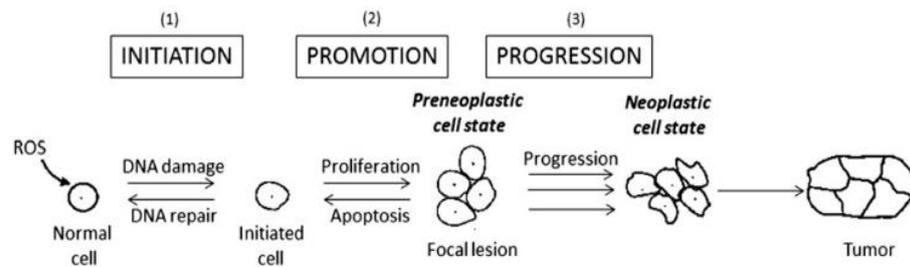


Gambar 2.4 Mekanisme pembentukan sel terinisiasi oleh karsinogen.

(Martinez *et al.*, 2003).

Tahap promosi tumor ditandai dengan ekspansi klonal sel yang diinisiasi oleh induksi proliferasi sel dan/atau penghambatan kematian sel terprogram (apoptosis). Tahap progresi atau tahap akhir karsinogenesis melibatkan perubahan seluler dan molekuler yang terjadi dari praneoplastik ke keadaan neoplastik, bersifat ireversibel dan ditandai oleh akumulasi kerusakan genetik yang berperan pada transisi sel dari jinak ke ganas,

ketidakstabilan genetik dan gangguan integritas kromosom (Fuchs-Tarlovsky, 2013).



Gambar 2.5 Tahap karsinogenesis meliputi inisiasi, promosi, dan progresi. 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 atau tahap akhir, melibatkan perubahan seluler dan molekuler dari preneoplastik menjadi neoplastik yang bersifat irreversibel.

(Fuchs-Tarlovsky, 2013)

C. Efek Samping dan Resistensi Kemoterapi

Strategi penanganan kanker secara medis biasanya ditangani dengan metode kemoterapi, operasi, terapi radiasi, terapi gen, terapi endokrin, dan imunoterapi. Kemoterapi menjadi metode penyembuhan kanker yang paling umum digunakan (Bukowski *et al.*, 2020). Kemoterapi merupakan salah satu metode penanganan kanker menggunakan obat-obatan khusus untuk mematikan sel-sel kanker baik secara langsung atau dengan cara menghentikan pembelahan selnya yang tidak terkendali. Obat-obatan tersebut dapat diberikan dapat melalui krim yang dioleskan pada kulit, pil atau sirup yang diminum, atau melalui injeksi (Yudissanta & Ratna, 2012; Yanti *et al.*, 2021). Kemoterapi dianggap pengobatan sistematis karena obat langsung diberikan melalui

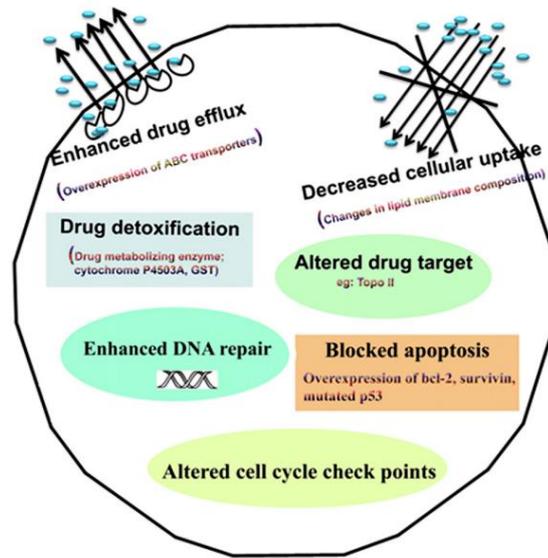
pembuluh darah sehingga dapat membunuh sel kanker yang telah menyebar atau bermetastase ke jaringan lainnya (Conti *et al.*, 2013; Pinsolle *et al.*, 2019).

Namun permasalahan utama dalam penanganan kanker dengan kemoterapi adalah timbulnya efek samping yang serius terhadap psikologis dan fisik pasien. Berdasarkan penelitian terdahulu, diketahui bahwa kemoterapi memberikan efek psikologis bagi pasien berupa stres, cemas, depresi, kesedihan, keputusasaan, dan harga diri (*self esteem*) negatif, sedangkan efek fisik yang dialami yaitu mual, muntah, konstipasi, *alopecia*, neuropati perifer, *fatigue* (kelelahan), penurunan nafsu makan, penurunan berat badan, toksisitas kulit (perubahan warna vena), perubahan rasa dan nyeri (Wardani & Ambarwati, 2017). Efek samping dari kemoterapi tersebut dapat mengganggu aktivitas dan menurunkan kualitas hidup pasien. Berbagai efek samping yang muncul dikarenakan rendahnya selektivitas dari agen kemoterapi tersebut (Haruna *et al.*, 2018). Menurut Moningka (2019) efek samping yang muncul dikarenakan obat antikanker tersebut bersifat antiproliferatif tidak hanya terhadap sel kanker namun juga terhadap sel-sel normal yang sedang aktif membelah. Sifat tersebut menyebabkan obat antikanker memiliki indeks terapi dan selektivitas yang rendah.

Selain memberikan efek samping yang tidak diinginkan pada sel-sel normal, kemoterapi juga menimbulkan masalah resistensi obat (Khorsandi *et al.*, 2017). Resistensi multidrug (MDR) merupakan fenomena resistensi sel kanker terhadap satu obat kemoterapi disertai resistensi terhadap obat kemoterapi lain yang mungkin memiliki struktur dan mekanisme kerja yang

berbeda. Sel kanker dikatakan memiliki fenotipe MDR jika sel kanker mendapatkan resistensi terhadap obat yang secara struktural dan fungsional tidak terkait, bahkan terhadap obat yang belum pernah terpapar sebelumnya (Wu *et al.*, 2014). MDR adalah proses multifaktorial dimana sel kanker menjadi semakin tidak responsif terhadap agen antikanker dan menjadi penyebab utama kegagalan kemoterapi (Dallavalle *et al.*, 2020). Munculnya sel kanker yang resisten terhadap obat antikanker selama kemoterapi sering menyebabkan kekambuhan pertumbuhan kanker yang cepat, kegagalan terapi berikutnya bahkan kematian pasien (Sun, 2015).

Berdasarkan data statistik, diketahui bahwa lebih dari 90% kematian pasien kanker disebabkan oleh resistensi obat. MDR sel kanker selama kemoterapi dapat dikaitkan dengan berbagai mekanisme, termasuk peningkatan efluks obat, peningkatan metabolisme xenobiotik, peningkatan kapasitas perbaikan DNA, faktor pertumbuhan, serta faktor genetik (mutasi gen, amplifikasi, dan perubahan epigenetik). Mekanisme-mekanisme tersebut mengarah pada berkurangnya kemanjuran terapi obat yang diberikan (Wu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019; Dallavalle *et al.*, 2020). Selama kemoterapi, sel kanker dapat menunjukkan MDR intrinsik yaitu resistensi terhadap kemoterapi pada paparan awal obat antikanker, ataupun *acquired* MDR yaitu resistensi terhadap kemoterapi setelah penggunaan obat antikanker dalam jangka waktu yang lama (Shaffer *et al.*, 2012).



Gambar 2.6 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, dan 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)

Mengidentifikasi obat baru yang dapat membalikkan MDR dalam sel kanker akan meningkatkan efisiensi agen kemoterapi yang umum digunakan, terutama pada tahap terakhir perkembangan kanker dan akan memberikan kesempatan untuk mengobati kanker yang saat ini tidak dapat disembuhkan (Bukowski *et al.*, 2020). Dalam beberapa tahun terakhir, ditemukan bahwa beberapa bahan aktif alami dapat membalikkan MDR dan mengatur kekebalan tubuh untuk meningkatkan kemanjuran dan mengurangi toksisitas obat kemoterapi (Qiao *et al.*, 2021). Oleh sebab itu, para ilmuwan mulai mencari obat antikanker alternatif baru yang lebih efektif yang berasal dari bahan alam termasuk tanaman (Yazan *et al.*, 2015).

D. Produk Bahan Alam Sebagai Obat Antikanker

Obat antikanker merupakan senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk mengobati kanker dan biasa disebut juga sebagai senyawa antineoplasma, obat sitostatik atau obat sitotoksik. Kemoterapi kanker bertujuan untuk merusak sel kanker secara selektif tanpa mengganggu sel normal. Namun tujuan ini sering mengalami kegagalan disebabkan oleh beberapa hal diantaranya yaitu: (1) perbedaan biokimia dan morfologi antara sel kanker dan sel normal sangat kecil sehingga obat antikanker tidak ada yang selektif terhadap sel kanker tertentu; (2) sel kanker yang dapat cepat menjadi kebal terhadap obat antikanker; (3) banyak obat antikanker bersifat karsinogenik, teratogenik dan mutagenik (Widana, 2014). Obat antikanker yang ideal seharusnya dapat mematikan sel kanker tanpa membahayakan sel normal. Usaha untuk menemukan obat antikanker yang ideal terus dilakukan salah satunya dengan pengobatan dari bahan alam (Susanty *et al.*, 2018).

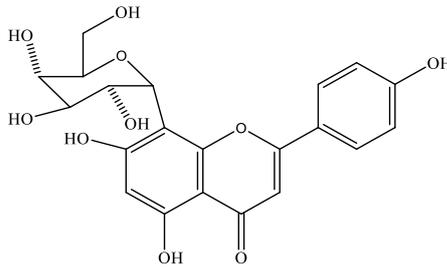
Salah satu produk bahan alam adalah tanaman. Bahan aktif alami dari tanaman sangat potensial untuk dijadikan sebagai obat antikanker karena lebih sederhana, lebih aman, ramah lingkungan, berbiaya rendah, cepat, dan kurang toksik dibandingkan dengan metode pengobatan konvensional seperti kemoterapi (Iqbal *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian terdahulu, diketahui bahwa ekstrak tumbuhan dapat menampilkan efek antikanker yang menarik pada garis sel dan model murine (Carocho & Ferreira, 2013). Fitokimia bersifat selektif dalam fungsinya dan bekerja secara spesifik pada sel tumor tanpa mempengaruhi sel normal. Karsinogenesis adalah fenomena kompleks yang

melibatkan banyak sinyal kaskade. Fitokimia dianggap kandidat yang cocok untuk pengembangan obat antikanker karena tindakan pleiotropiknya pada peristiwa target dengan berbagai cara (Iqbal *et al.*, 2017). Beberapa bahan aktif alami juga telah terbukti dapat membalikkan resistensi obat tumor (MDR) dan mengatur kekebalan tubuh untuk meningkatkan kemanjuran dan mengurangi toksisitas obat kemoterapi (Qiao *et al.*, 2021). Penelitian lain menunjukkan bahwa banyak metabolit sekunder dari tanaman memiliki sifat proapoptosis sehingga sangat berpotensi digunakan untuk mencegah dan mengobati kanker (Jin *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil uji fitokimia kayu batang simpur air menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, fenolat, saponin, steroid dan terpenoid. Setelah dilakukan analisis korelasi, diketahui bahwa aktivitas antioksidan yang kuat dari ekstrak kayu batang simpur air disebabkan oleh kandungan fenoliknya (Muharini *et al.*, 2021). Penelitian lain juga menyatakan bahwa sifat antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak simpur air disebabkan oleh kandungan fenoliknya (Armania *et al.*, 2013a). Banyak penelitian telah mengungkapkan bahwa agen antioksidan ditemukan untuk menampilkan sifat farmakologis lain, seperti antiinflamasi (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). Antioksidan diduga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, karena kesamaan mekanisme hambatan dalam tingkat seluler (Anam *et al.*, 2014).

Oleh karena itu, senyawa metabolit sekunder pada kayu batang simpur air yang diyakini memberikan efek farmakologi sebagai antikanker salah satunya adalah senyawa golongan fenolik atau polifenol.

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder yang tersebar luas di seluruh kerajaan tanaman dengan sekitar 8000 struktur fenolik yang berbeda (Carocho & Ferreira, 2013). Fenolik didistribusikan di sebagian besar jaringan tanaman, termasuk bagian yang dapat dimakan seperti buah, biji, daun, batang, dan lain-lain (De la Rosa, 2019). Senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik (Peñarrieta *et al.*, 2014). Senyawa golongan fenolik memiliki cincin fenol sehingga terdapat substituen hidroksil yang mampu menghambat efek buruk radikal bebas atau ROS (Klungsupya *et al.*, 2015). Senyawa fenolik mampu menetralkan radikal di dalam struktur kimia dan banyaknya gugus hidroksil serta ikatan rangkap pada molekul berpotensi besar menangkap radikal (Shoeb *et al.*, 2014). Berdasarkan jumlah cincin fenol dan elemen struktural yang menghubungkan cincin tersebut, senyawa fenolik diklasifikasikan menjadi flavonoid dan non-flavonoid (Caleja *et al.*, 2017). Salah satu contoh senyawa golongan fenolik yang berhasil diisolasi dari ekstrak metanol daun simpur air yaitu senyawa vitexin yang merupakan kelompok flavonoid (Abubakar *et al.*, 2021).



Gambar 2.7 Struktur senyawa vitexin yang berhasil diisolasi dari ekstrak metanol daun simpur air.

(Abubakar *et al.*, 2021)

Beberapa efek senyawa fenolik diantaranya adalah sebagai antioksidan dan antikanker (Burhan *et al.*, 2019). Banyak penelitian terdahulu yang mendukung aktivitas antikanker dari senyawa fenolik. Penelitian Anam *et al.* (2014) menunjukkan bahwa senyawa kimia dalam ekstrak metanol benalu batu yang dinilai mempunyai aktivitas antikanker adalah senyawa golongan polifenol dan flavonoid. Selanjutnya senyawa flavonoid yang termasuk golongan fenolik diduga memiliki aktivitas antikanker bekerja dengan cara menghambat karsinogenesis, angiogenesis, siklus sel, dan proliferasi sel serta menginduksi apoptosis (Ahmad *et al.*, 2014). Kemudian senyawa golongan fenolik atau polifenol, termasuk flavonoid, asam hidroksibenzoat, asam hidroksisinamat, kumarin, xanton, kalkon, stilben, lignan, dan lignin telah terbukti memiliki aktivitas antikanker (Carocho & Ferreira, 2013). Berdasarkan mekanisme aksi berbagai senyawa antioksidan terhadap penyakit dalam juga telah diketahui bahwa senyawa golongan fenolik bertindak sebagai antioksidan dalam penyakit kanker (Ali *et al.*, 2008).

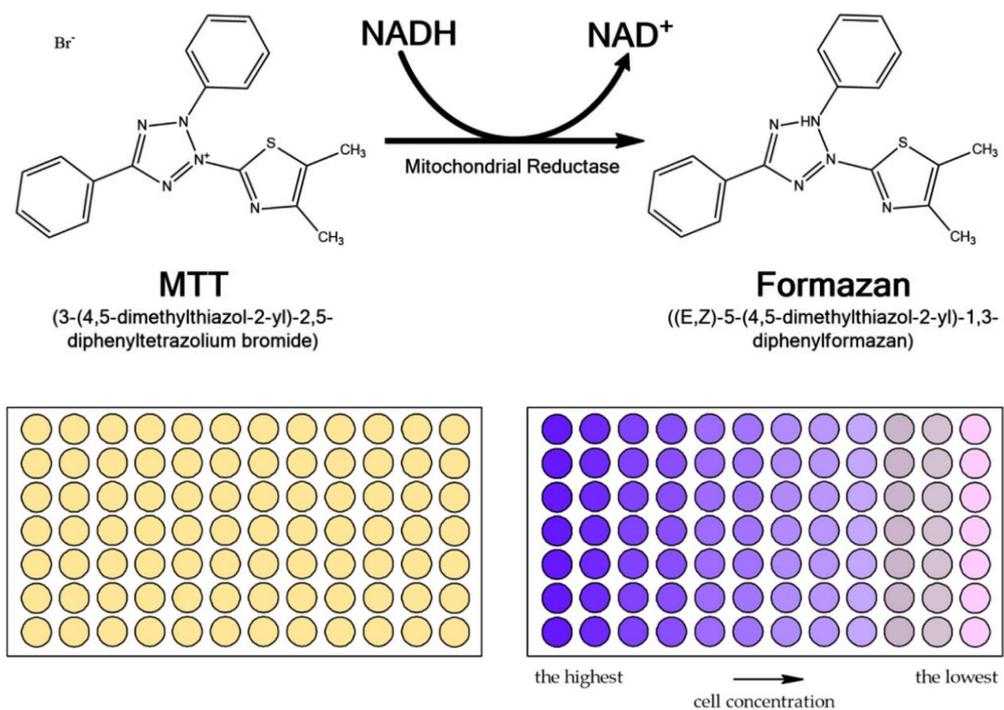
Selain fenolik, senyawa golongan alkaloid, terpenoid, steroid, dan saponin yang terdapat pada kayu batang simpur air juga diyakini memberikan

kontribusi terhadap aktivitas antikanker. Berbagai penelitian telah membuktikan adanya aktivitas antikanker dari senyawa-senyawa tersebut. Hasil skrining fitokimia pada ekstrak akar simpur air menunjukkan adanya saponin, triterpen, sterol, tanin dan senyawa polifenol yang diyakini bertanggung jawab terhadap aktivitas sitotoksik atau antikanker dari tanaman simpur air (Armania *et al.*, 2013a). Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, tanin, dan triterpenoid adalah senyawa yang memiliki aktivitas antikanker darah pada sel leukemia (Pahlani *et al.*, 2021).

E. Uji Sitotoksisitas

Uji sitotoksik merupakan uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel untuk menemukan adanya aktivitas sitotoksik dari suatu senyawa yang akan dikembangkan sebagai obat antikanker (Haryoto *et al.*, 2013). Dasar dari uji sitotoksik yaitu kemampuan sel untuk bertahan hidup saat diberikan senyawa yang bersifat toksik. Terdapat beberapa metode yang sering digunakan untuk mengukur kelangsungan hidup (*viabilitas sel*) atau efek sitotoksik suatu senyawa, salah satunya adalah metode [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (MTT) *assay*. Metode MTT merupakan sistem pengujian secara kolorimetri yang berdasarkan pada reduksi garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna biru keunguan oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase yang berada dalam mitokondria sel hidup (Arifah *et al.*, 2015). Intensitas warna ungu tersebut menyatakan banyaknya sel aktif yang hidup, sebab enzim mitokondria

pada sel aktif memetabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang mengakibatkan tetrazolium tersebut berubah menjadi formazan (Suhendi *et al.*, 2013). Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup, dimana semakin besar intensitas warna ungu, maka artinya semakin banyak jumlah sel hidup (Arifah *et al.*, 2015). Reaksi reduksi yang terjadi pada proses MTT menjadi formazan yaitu sebagai berikut.



Gambar 2.8 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.

(Kamiloglu *et al.*, 2020; Ligasová & Koberna, 2021)

Dasar pengukuran metode MTT adalah pengukuran kristal formazan yang terbentuk. Kristal formazan merupakan kristal ungu yang tidak larut dalam air (Arifianti *et al.*, 2014). Formazan yang terbentuk dapat dilarutkan dengan natrium dodesil sulfat (SDS) 10% (Nugroho *et al.*, 2013; Haryoto *et*

al., 2013), isopropanol asam (Mahdavi *et al.*, 2011), atau dengan dimetilsulfoksida (DMSO) (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Absorbansi formazan yang dihasilkan dapat diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm (Haryoto *et al.*, 2013; Arifah *et al.*, 2015), 570 nm (Widyanto *et al.*, 2020) ; dan 595 nm (Arifianti *et al.*, 2014). Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh, persen sel yang hidup dapat ditentukan dengan rumus persen viabilitas sel yaitu:

$$\text{Persen (\%)} \text{ viabilitas sel} = \frac{A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{kontrol media}}}{A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{kontrol media}}}$$

Selanjutnya bersama dengan data konsentrasi sampel yang digunakan dilakukan penentuan nilai IC_{50} (Arifianti *et al.*, 2014). Aktivitas sitotoksitas dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh melalui analisis regresi linear antara logaritma konsentrasi bahan uji dengan persentase viabilitas sel (Susanto *et al.*, 2017).

Tingkatan sitotoksitas dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu sitotoksitas potensial bila $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, sitotoksitas moderat bila IC_{50} 100-1000 $\mu\text{g/ml}$, dan tidak toksik bila $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$. Senyawa dengan sitotoksitas potensial bisa dimanfaatkan sebagai agen antikanker, sedangkan senyawa dengan sitotoksitas moderat bisa berfungsi sebagai agen kemoprevensi yang hanya bisa mencegah dan menghambat perkembangan sel kanker (Widyanto *et al.*, 2020). Kemudian U.S *National Cancer Institute* juga mengelompokkan menjadi 4 kategori senyawa sitotoksik yaitu kategori sangat toksik jika nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, kategori sitotoksik cukup aktif atau moderat

jika nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/mL}$, kategori sitotoksik lemah jika nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/mL}$ dan kategori tidak toksik jika nilai $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ (Abdel-Hameed *et al.*, 2012). Jadi, semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan suatu senyawa maka semakin besar aktivitas sitotoksiknya.

Pada penelitian ini sel target yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah sel kanker payudara T47D, MCF-7 dan 4T1, serta sel normal Vero.

1. Sel T47D

Sel T47D merupakan sel kanker payudara manusia dengan *estrogen receptor* (ER)/ *progesteron receptor* (PR) positif (Mahardika *et al.*, 2016). Sel T47D adalah jenis sel kanker yang mengalami mutasi pada gen p53 sehingga tidak mampu melakukan pengendalian siklus sel dan terjadi hambatan dalam apoptosis sel (Tusanti *et al.*, 2014). Sel T47D adalah garis sel kontinu yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun yang terkena ductal carcinoma. Sel ini memiliki morfologi sama seperti sel epitel. Sel T47D telah banyak digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas. Sel ini dapat ditumbuhkan menggunakan media penumbuh RPMI + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C (Muti'ah, 2014).

2. Sel MCF-7

Sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) adalah salah satu model sel kanker payudara yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro*.

Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan payudara wanita etnis kaukasian berumur 69 tahun bergolongan darah O dengan Rh⁺, yang berupa sel yang melekat (adherent). Sel MCF-7 menyerupai sel epitel yang tumbuh secara monolayer dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk dome. Dalam pertumbuhannya sel ini akan membentuk kultur selapis pada labu kultur dan ditumbuhkan dalam medium DMEM (Widowati & Mudahar, 2009).

MCF-7 merupakan model sel kanker payudara yang lebih resisten terhadap agen kemoterapi dibandingkan T47D. Sel MCF-7 adalah jenis sel yang mengekspresikan ER terutama ER alfa (ER- α) dan resisten terhadap doxorubicin (Zampieri *et al.*, 2002). Sel kanker MCF-7 memiliki karakteristik overekspresi PgP, overekspresi Bcl-2 dan tidak mengekspresikan kaspase-3 sehingga mampu menghindari apoptosis (Simstein *et al.*, 2003).

3. Sel 4T1

Sel 4T1 (*Mus musculus mammary carcinoma cell line*) adalah salah satu sel kanker payudara yang sering digunakan dalam penelitian (Nordin *et al.*, 2017). Sel 4T1 merupakan model kanker payudara triple negatif, yaitu kanker payudara yang tidak mengekspresikan *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR) dan *human epidermal growth factor receptor 2*

(HER2) (Eun *et al.*, 2015). Kanker payudara triple negatif adalah kanker payudara yang paling ganas dengan resiko kambuh serta metastasis yang tinggi (Mukhlisa *et al.*, 2021). Sel 4T1 merupakan garis sel kontinu yang diisolasi dari jaringan tumor payudara mencit (*Mus musculus*) oleh Fred Miller dan rekan kerjanya di *Karmanos Cancer Institute*. Sel 4T1 telah digunakan untuk menguji efikasi terapi dan mekanisme molekuler agen kemoterapi yang relevan terhadap manusia. Sel 4T1 memiliki karakteristik tertentu yaitu kemampuan proliferasi yang cepat serta mampu bermetastasis (Tao *et al.*, 2008).

Sel 4T1 telah digunakan secara luas untuk mempelajari terapi anti-metastasis dan anti-angiogenik (Medeiros *et al.*, 2012). Sel ini sering digunakan dalam penelitian karena memiliki kemiripan sifat dengan kanker payudara manusia stadium lanjut atau metastasis (Tao *et al.*, 2008). Sel 4T1 bersifat agresif, metastatik kuat, imunogenik rendah dan mewakili karakteristik yang menyerupai kanker payudara stadium IV pada manusia (Eun *et al.*, 2015). Sel 4T1 mudah ditransplantasikan pada mencit dan mampu bermetastasis ke berbagai jaringan antara lain tulang, otak, paru-paru, limfa, dan hati (Tao *et al.*, 2008).

4. Sel Vero

Sel Vero pertama kali digunakan sebagai bahan percobaan untuk studi virologi hingga toksikologi dimulai pada tahun 1962 yang diambil dari ginjal monyet hijau Afrika dewasa yang sehat (*Cercopithecus aethiops*) oleh Yasumura dan Kawakita. Ditemukan bahwa sel Vero adalah garis sel

kontinu, artinya dapat dilalui selama periode waktu yang signifikan tanpa kehilangan karakteristik pertumbuhannya (Sène *et al.*, 2022; Okemoto-Nakamura *et al.*, 2021).

Sel Vero merupakan sel epitel non kanker (sel normal). Dalam kultur, sel Vero mempunyai pola pertumbuhan yang khas. Sel Vero adalah sel monolayer, berbentuk memanjang, dan mirip dengan sel-sel fibroblas dengan sedikit granulasi sitoplasma (Adams *et al.*, 2015). Fungsi sel Vero yaitu sebagai kontrol positif yang mewakili sel normal dalam tubuh manusia. Pengujian sel Vero dilakukan untuk mempelajari diferensiasi sel, pertumbuhan sel, transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia dan sitotoksitas. Sel Vero memiliki kelebihan yaitu mudah ditumbuhkan dalam media kultur (Triatmoko *et al.*, 2016).

F. Uji Selektivitas

Selektivitas agen kemopreventif artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini sangat berbeda dengan cara kerja obat kemoterapi yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai macam efek samping (Rahmawati, 2021).

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

2016). Semakin besar indeks selektivitas obat antikanker yang digunakan, artinya semakin banyak efek berbahaya yang ditimbulkan sehingga mengakibatkan penderita kanker banyak yang menghentikan kemoterapi (Saraswati *et al.*, 2020).

Indeks selektivitas diperoleh dari nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi terhadap sel normal dibagi dengan nilai IC_{50} terhadap sel kanker. Suatu sampel dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila nilai $IS \geq 2$, dan dikatakan kurang selektif apabila nilai $IS \leq 2$ (Demirgan *et al.*, 2016). Indeks selektivitas dihitung menggunakan rumus:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ sel normal}}{IC_{50} \text{ sel kanker}}$$

G. Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi merupakan langkah awal untuk memisahkan produk alam yang diinginkan dari bahan bakunya dan menjadi metode yang sering dipakai dalam penemuan obat tradisional. Pemilihan metode ini bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Zhang *et al.*, 2018). Menurut Mukhriani (2014) ekstraksi merupakan proses pemisahan substansi dari campurannya dengan memilih pelarut yang sesuai. Tahapan ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tanaman yaitu (1) pengelompokan bagian tanaman (daun, batang, dan lain-lain); (2) pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan; (3) pemilihan pelarut (polar, semipolar, atau nonpolar). Target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu sebelum memilih suatu metode. Beberapa target ekstraksi tersebut yaitu sekelompok senyawa

yang berhubungan secara struktural dalam suatu organisme, senyawa yang diketahui terdapat pada suatu organisme, dan senyawa bioaktif yang tidak diketahui. Terdapat beberapa metode ekstraksi, salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana dan sering digunakan adalah maserasi (Mukhriani, 2014).

Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi yang sangat sederhana dan dapat digunakan untuk ekstraksi bahan yang bersifat termolabil (Zhang *et al.*, 2018). Menurut Istiqomah (2013), maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan atau pengocokan menggunakan suhu kamar. Tujuannya yaitu untuk menarik atau mengambil senyawa penting yang diinginkan yang tahan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Bahan yang akan diekstraksi dihaluskan kemudian direndam dalam suatu pelarut organik dalam selang waktu tertentu (Ibrahim & Sitorus, 2013). Maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Istiqomah, 2013).

Metode maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam. Pada proses perendaman sampel tanaman akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel akibat adanya perbedaan tekanan antara di luar dan di dalam sel (Novitasari & Putri, 2016). Ketika pelarut masuk ke dalam sel maka senyawa aktif akan terlarut dan menyebabkan terjadinya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam sel dan pelarut di luar sel sehingga terjadi proses difusi (Najib, 2018). Proses ekstraksi dihentikan ketika telah mencapai kesetimbangan antara konsentrasi dalam sel tanaman dan

konsentrasi senyawa didalam pelarut Mukhriani (2014). Pelarut yang dipilih dalam proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan dari senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Koirewoa *et al.*, 2012). Maserasi menggunakan pelarut organik ini menghasilkan filtrat yang langsung dikumpulkan, kemudian selanjutnya dapat dilakukan proses pemisahan dengan kromatografi atau rekristalisasi langsung (Ibrahim & Sitorus, 2013).

Pemilihan pelarut sangat penting untuk ekstraksi pelarut. Beberapa hal yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut diantaranya yaitu selektivitas, kelarutan, biaya dan keamanan. Berdasarkan hukum kesamaan dan *intermiscibility*, pelarut dengan nilai polaritas dekat dengan polaritas zat terlarut cenderung bekerja lebih baik, begitupun sebaliknya. Alkohol seperti metanol dan etanol adalah pelarut universal dalam ekstraksi pelarut untuk penyelidikan fitokimia (Zhang *et al.*, 2018). Pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat universal yang mampu mengikat semua komponen kimia yang terdapat pada tumbuhan bahan alam, baik yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Metanol merupakan cairan penyari yang mudah masuk kedalam sel melewati dinding sel bahan, sehingga metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut dan senyawa akan terekstraksi sempurna (Lenny, 2006).

H. Fraksinasi

Pengertian fraksinasi secara umum yaitu proses di mana suatu campuran dipisahkan menjadi komponen atau fraksi yang berbeda. Fraksinasi juga

disebut sebagai pemisahan termal, dapat didefinisikan sebagai setiap fraksional fisik atau proses pemisahan yang melibatkan transisi fase di mana campuran dipisahkan dalam satu putaran menjadi dua atau lebih fraksi dengan komposisi variabel. Campuran yang akan dipisahkan dapat berupa campuran homogen seperti larutan atau campuran heterogen seperti campuran padat dan cair. Campuran yang akan dipisahkan juga dapat berupa gas, cair atau padat. Fraksi dipisahkan berdasarkan perbedaan sifat spesifik dari masing-masing komponen seperti titik didih, titik beku, atau titik leleh. Perubahan fasa yang terlibat dapat berupa kondensasi untuk uap dan gas (*dephlegmation*), mendidih dan penguapan (*distillation*) atau pembekuan dan kristalisasi (*freeze distillation and solution crystallisation*) untuk cairan, dan pelelehan atau sublimasi untuk padatan (Ibrahim, 2019).

Fraksinasi dapat dilakukan menggunakan pelarut yang memiliki kepolaran berbeda seperti metanol, *n*-heksana dan etil asetat. Pelarut *n*-heksana adalah pelarut nonpolar yang bersifat stabil dan mudah menguap (Munawaroh & Handayani, 2010). Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Menggunakan pelarut ini sangat menguntungkan, karena bersifat selektif dalam melarutkan zat, proses ini menghasilkan sejumlah kecil lilin, albumin, dan zat warna, namun dapat mengekstraksi zat pewangi dalam jumlah besar (Hadi, 2012). Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar, memiliki toksisitas rendah, dan mudah diuapkan (Putri *et al.*, 2013).