

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Tanaman



Gambar 1. Buah Mengkudu
(*Morinda citrifolia* L.)

Klasifikasi :

Filum : Angiospermae

Sub filum : Dicotyledoneae

Divisio : Lignosae

Family : Rubiaceae

Genus : *Morinda*

Spesies : *M. citrifolia* L.

(Djauhariya, 2003)

Morinda citrifolia L. berupa pohon kecil atau semak yang ketinggiannya 3-8 m (Sutarno, 1993). Daun mengkudu berupa daun tunggal, berbentuk bulat telur, tepinya rata dengan ujung dan pangkal yang runcing. Tulang daun menyirip dengan tangkai yang pendek (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI, 1991). Panjang daun 10-15 cm dengan lebar 5-17 cm (Sutarno, 1993). Buah masak berwarna kuning kotor atau putih kekuning-kuningan dengan panjang 5-10 cm, lebar 3-6 cm (Suryowinoto, 1997). Jika telah masak, buahnya akan mengeluarkan bau yang tidak sedap (Sutarno, 1993). Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mengandung skopoletin sebagai analgesik, antiradang dan antibakteri. Glikosida sebagai antibakteri, antikanker dan

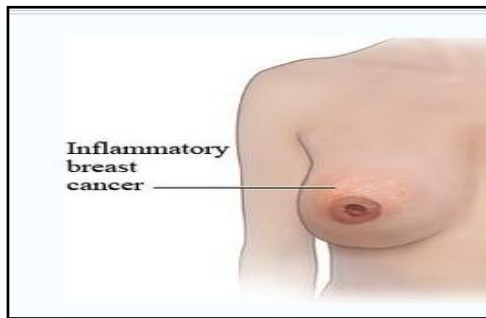
imunostimulan. Alizarin, Acubin, L. Asperuloside dan flavonoid sebagai antibakteri. Vitamin C sebagai antioksidan (Peter, 2005; Waha, 2000; Winarti, 2005).

B. Kanker dan Kanker Payudara

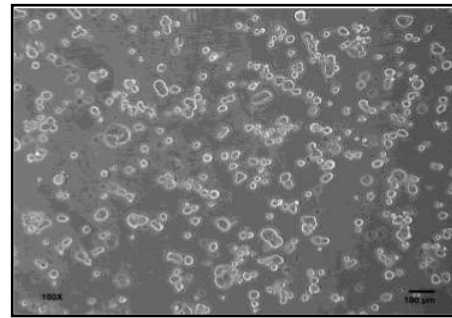
Kanker berasal dari bahasa Yunani *Cancra* yang berarti kepiting. Hal ini dikarenakan bentuk pembuluh darah yang mengelilingi tumor dianggap berbentuk seperti capit serta kaki-kaki kepiting bagi orang-orang jaman dahulu. Kanker adalah tumor ganas sedangkan tumor jinak tidak bisa dikatakan kanker (Virshup, 2010). Kanker merupakan penyakit klonal yang disebabkan oleh peringkat multi genetik atau epigenetik dengan perubahan gen *supressor* tumor dan onkogen (Khan, *et al.*, 2006). Kanker ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali. Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan oleh kerusakan DNA akibat mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel (Murray, *et al.*, 2003). Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut: mandiri dalam signal pertumbuhan, tidak peka terhadap signal antipertumbuhan, menghindari apoptosis, memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, angiogenesis, invasi dan metastase ke jaringan lain (Manahan dan Wierberg, 2002).

Kanker payudara adalah tumor yang berasal dari kelenjar payudara. Termasuk saluran kelenjar air susu dan jaringan penunjangnya. Keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi dan kematian sel-sel kelenjar payudara berperan penting dalam proses perkembangan sel payudara. Gangguan dalam

keseimbangan ini akan dapat mengakibatkan terjadinya kanker (Kumar, *et al.*, 2000). Kanker payudara dapat terjadi karena adanya beberapa faktor genetik yang diturunkan dari orang tua kepada anaknya.



Gambar 3. Kanker payudara ditandai inflamasi payudara (webmd.com)



Gambar 2. Sel MCF-7 (physics.cancer.gov)

Terdapat dua model sel kanker payudara yang digunakan untuk penelitian diantaranya sel MCF-7 (**gambar 3**) dan sel T47D. Sel MCF-7 diambil dari jaringan payudara wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) atau *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan antibiotik Penisilin-Streptomisin 1% (Anonim, 2007). Sel MCF-7 berbeda dengan sel yang lain karena memiliki karakteristik mengekspresikan *estrogen receptor* (ER+) (Butt, *et al.*, 2000). *Estrogen receptor* memainkan peran penting pada pertumbuhan sel. Dalam tubuh manusia terdapat dua jenis reseptor estrogen yaitu ER α dan ER β , yang berbeda letaknya dalam tubuh. Salah satu titik tangkap pengobatan kanker khususnya kanker payudara adalah dengan menghambat aktivitas estrogen pada *Estrogen Receptor alpha* (ER α). Hal menarik dari sel

MCF-7 adalah sifatnya yang resisten terhadap *doxorubicin* (Zampieri, *et al.*, 2002) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki, *et al.*, 2003).

Sel MCF-7 juga overekspresi Bcl-2 (Amundson, *et al.*, 2000). Ekspresi berlebihan (overekspresi) sel disebut juga proliferasi sel yang mempengaruhi status perkembangan sel. Beberapa protein Bcl merupakan pro-apoptosis yang memicu apoptosis dengan meningkatkan pelepasan sitokrom c ke sitosol, sedangkan protein Bcl lainnya merupakan antiapoptosis yang menghambat apoptosis dengan menghambat pelepasan sitokrom c ke sitosol. Protein Bcl yang termasuk protein antiapoptosis antara lain Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w dan Mcl-1 (Alberts, *et al.*, 2008). *B cell lymphoma-2* (Bcl-2) telah menjadi regulator pertama kematian sel (Heiser, *et al.*, 2004). Bcl-2 adalah *oncoproteins* sitoplasma (Sato, *et al.*, 1997; Sierra, *et al.*, 1996) yang juga diekspresikan tinggi di tumor padat manusia (Arun, *et al.*, 2003.). Pada kanker payudara, Bcl-2 dan Bcl-xl memiliki korelasi yang signifikan dengan indeks apoptosis dan tidak adanya mutan p53 (Villar, *et al.*, 2001), ukuran tumor kecil, morfologi non-duktal, dan rendah grade tumor (Barbareschi, *et al.*, 1996) akan berkorelasi negatif dengan meningkatnya derajat keganasan dan berkorelasi positif dengan meningkatnya pewarnaan ER immuno (Yang, *et al.*, 1999; Aribas, *et al.*, 2007).

C. *Doxorubicin*

Doxorubicin (*adriamycin 14-hydroxy-daunorubicin*) merupakan obat dari golongan *anthracycline* yang telah digunakan selama 2 dekade untuk kemoterapi kuratif (Carlson, 2008). Dox adalah antikanker yang lebih efektif dibandingkan *daunorubicin* yang dapat digunakan untuk mengobati leukemia, limfoma dan

tumor padat (Robert, *et al.*, 2005; Wallace, 2001). Walaupun Dox merupakan penemuan baru dari obat golongan *anthracycline* namun Dox sering diresepkan pada pasien kanker karena aktivitas antikanker yang luas terutamanya terhadap kanker hematologi. Dox digunakan sebagai obat tunggal atau dikombinasi dengan obat kemoterapi yang lain seperti *vinblastine*, *cyclophosphamide* dan *paclitaxel* (Swisher, *et al.*, 2009). Dox harus diadministrasi melalui intravena karena obat ini menjadi tidak aktif jika diserap melalui saluran cerna (Doroshov, 2010). Dox menunjukkan efek sebagai antiproliferasi dengan berikatan enzim topoisomerase II dan membentuk kompleks yang mengganggu abilitas enzim untuk mengurangi torsi untas DNA sewaktu mitosis (Mross, 2006). Selain itu, Dox menginisiasi radikal oksigen dan hidrosil yang merusakkan rantai transportasi elektron mitokondria dan menghalangi produksi oksidasi DNA. Disamping itu, apabila terjadi aktivasi sinyal pada jalur transduksi maka akan menyebabkan apoptosis (Synold, *et al.*, 2004; Doroshov, 2010; Gianni, *et al.*, 2003; Robert, 2005). Dox dapat menyebabkan kardiotoxicitas (Distefano, 2009; Benjamin, *et al.*, 2006) yang disebabkan pembebasan radikal bebas sewaktu metabolisme Dox (Bugger, *et al.*, 2010).

D. Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi adalah kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut yang dilakukan dengan pelarut cair (Depkes RI, 2000). Pemisahan tersebut didasarkan pada kemampuan larutan yang berbeda tiap komponennya sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Ekstraksi didasarkan pada prinsip

perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986). Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruang (Depkes RI, 2000). Maserasi menggunakan alat sederhana dan tanpa pemanasan namun membutuhkan waktu lama dan penyari yang relatif banyak.

E. Kromatografi Lapis Tipis

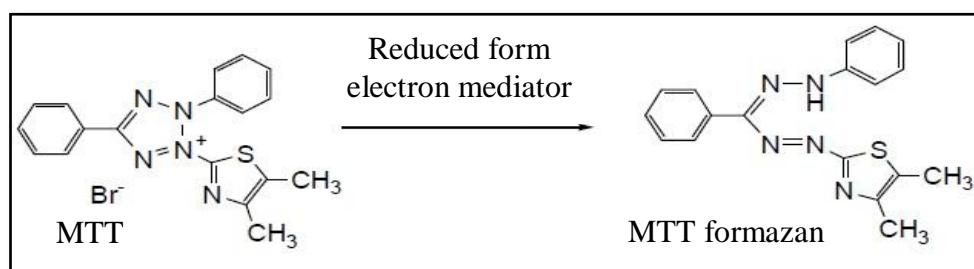
Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik pemisahan yang paling umum dimanfaatkan untuk melakukan analisis kualitatif. KLT dilakukan dengan mempersiapkan fase gerak dan fase diam. KLT dalam pelaksanaannya lebih mudah dan murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat.

Deteksi senyawa dilakukan menggunakan detektor UV di bawah sinar UV 254 nm dengan indikator plat KLT akan memancarkan warna hijau dan pada UV 366 nm akan memancarkan warna biru ungu. Komponen yang menyerap cahaya pada 254 atau 366 nm akan tampak sebagai bercak gelap pada plat yang bercahaya (Gibbons, 2006).

F. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan kultur sel merupakan salah satu pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan senyawa yang bersifat toksik pada sel (Kurnijasanti, *et al.*, 2008), dapat juga digunakan untuk

mendeteksi adanya aktivitas antikanker dari suatu senyawa. Uji sitotoksik yang digunakan untuk uji aktivitas antineoplastik menunjukkan adanya perbedaan respon yang diberikan oleh sel kanker lebih besar dari pada sel normal (Fresney, 1986). Salah satu metode uji sitotoksik adalah MTT yang menggunakan garam kuning tetrazolium seperti MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide]. MTT akan direduksi oleh mitokondria pada sel yang hidup dan tidak larut dalam air oleh sistem *suksinate tetrazolium reduktase*. Sel yang hidup dapat ditunjukkan dengan terjadinya reduksi senyawa MTT menjadi formazan yang menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi ungu. Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader* pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm (Meiyanto, 1999). MTT memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle dan Griffiths, 2000 cit. Padi, 2008).



Gambar 4. Reaksi MTT menjadi formazan

Sumber : <http://itsbio.co.kr>

Parameter yang diperhatikan dalam uji sitotoksik adalah nilai *Inhibitory Concentration (IC₅₀)*. Nilai *IC₅₀* menunjukkan nilai dosis yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu

senyawa terhadap sel dan sebagai patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto, 2003). Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

Sitotoksitas kombinasi ditetapkan dengan menghitung Indeks Kombinasi (IK) atau *Combination Index* (CI). Nilai CI adalah salah satu parameter efek kombinasi yang digunakan untuk menilai tingkat efek kombinasi di setiap dosis kombinasi apakah menunjukkan sinergis, adiktif atau antagonis. Semakin besar nilai CI maka semakin antagonis kombinasi tersebut (Zhao, *et al.*, 2004).

G. Uji Apoptosis

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel sehingga proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA dapat dicegah (Tadjudin, 2006). Pada sel kanker program apoptosis telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter, *et al.*, 1997). Bila apoptosis telah dijalankan pada sebuah sel maka akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan dikenali oleh sel makrofag dan dimakan (Peter, *et al.*, 1997). Salah satu pengamatan apoptosis dengan menggunakan metode *double staining*. Metode *double staining* adalah perlakuan penambahan pereaksi etidium bromida–akridin oranye pada sel. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna merah sedangkan sel hidup berwarna hijau dengan pengamatan mikroskop fluoresen. Akridin oranye akan menembus seluruh bagian sel menyebabkan nukleus akan tampak berwarna hijau. Sedangkan etidium bromida hanya dapat berinteraksi dengan sel yang membrannya sudah rusak menyebabkan nukleus akan berwarna merah. Warna yang ditimbulkan oleh etidium bromida pada sel mati lebih dominan jika

dibandingkan dengan akridin oranye sehingga nukleus pada sel mati akan berwarna merah.

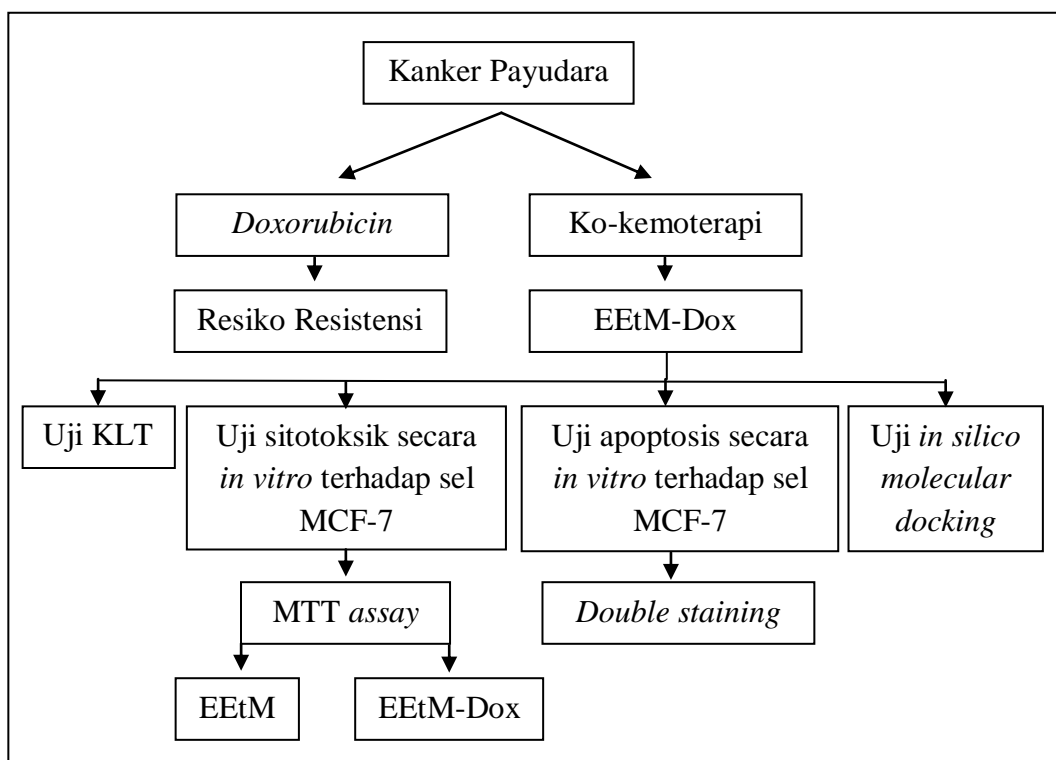
H. Molecular Docking

Penambatan molekul (*molecular docking*) adalah metode komputasi yang bertujuan meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji *in vitro* (Motiejunas dan Wade, 2006). Uji *in silico* dilakukan sebelum melakukan *in vitro* dan *in vivo*. *Docking* menghasilkan skor yang sebanding dengan energi total ikatan protein. Semakin kecil nilai skor tersebut maka kompleks protein-ligan semakin stabil sehingga ligan atau senyawa semakin poten (Purnomo, 2011). Dari hasil tersebut dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas senyawa yang dirancang sebagai antikanker. Salah satu aplikasi kimia komputasi yang cukup memadai dan lengkap adalah *Docking Protein-Ligand ANT-System* (PLANTS) namun PLANTS tidak menyediakan fungsi preparasi protein, ligan maupun visualisasi (Purnomo, 2011).

I. Kerangka konsep

Pengobatan kanker payudara umumnya menggunakan Dox yang memberikan resiko resistensi. Maka dari itu perlu adanya pengembangan obat-obat baru sebagai agen ko-kemoterapi. Bahan dari alam dapat dimanfaatkan sebagai ko-kemoterapi yang murah dan aman. Dalam penelitian ini akan dikembangkan tanaman buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai ko-kemoterapi Dox pada terapi kanker payudara.

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) memiliki kandungan kumarin yang memiliki aktifitas terapeutik terhadap diabetes melitus, diare dan kanker (Wichi, 1988; Sherwin, 1990). Uji yang digunakan ialah *in silico* yaitu dengan *molecular docking* dan *in vitro* meliputi uji kualitatif dengan KLT dan kuantitatif dengan uji sitotoksik tunggal, uji kombinasi ekstrak-Dox dan uji apoptosis.



Gambar 5. Bagan kerangka konsep

J. Hipotesis

1. Golongan senyawa kumarin terkandung dalam EEtM.
2. EEtM berpotensi sebagai agen sitotoksik pada sel MCF-7.
3. Kombinasi EEtM-Dox berpotensi sebagai agen sitotoksik pada sel MCF-7.

4. Kombinasi EEtM-Dox mampu memacu apoptosis pada sel MCF-7.
5. Berdasarkan analisis *molecular docking*, golongan senyawa kumarin pada EEtM seperti skopoletin dan umbeliferon mempunyai afinitas ikatan dengan protein ER α dan Bcl-xl.