

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Kanker Payudara**

Kanker adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali (Hawari, 2004). Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh ketidakaturan kerja hormon sehingga mengakibatkan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (Tjay dan Rahardja, 2002). Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan oleh kerusakan DNA akibat mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Beberapa mutasi mungkin dibutuhkan untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker. Mutasi-mutasi tersebut sering diakibatkan agen kimia maupun fisik yang disebut senyawa karsinogen (Murray *et al*, 2003). Masalah utama dalam kanker adalah metastasis, yaitu kemampuan sel dalam bermigrasi ke jaringan yang lebih jauh dan tumbuh di jaringan tersebut (Murray *et al*, 2003).

Kanker terdiri melalui beberapa fase, yaitu :

##### **a. Fase Inisiasi**

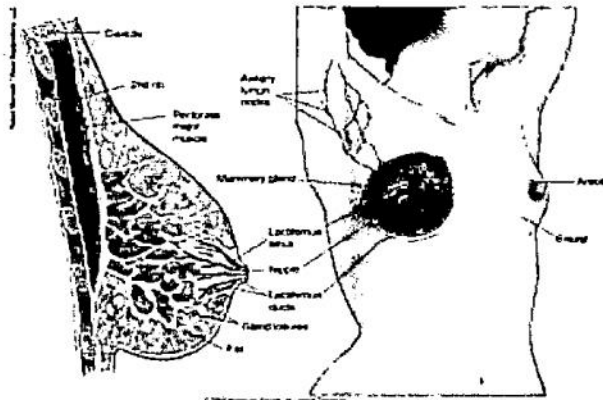
Pada fase inisiasi, kerusakan DNA dikarenakan paparan radiasi atau zat karsinogenik. Zat inisiator tersebut akan mengakibatkan terganggunya proses reparasi normal sehingga terjadi mutasi DNA dimana mutasi DNA ini akan diturunkan kepada anak-anak sel dan seterusnya.

b. Fase Promosi

Pada fase promosi zat karsinogenik akan bertindak sebagai promotor untuk mencetuskan proliferasi sel sehingga sel akan rusak dan menjadi ganas.

c. Fase progresi

Pada fase progresi, gen pertumbuhan yang telah diaktivasi oleh kerusakan DNA akan mengalami percepatan mitosis dan pertumbuhan liar (Tjay dan Rahardja, 2002).



Gambar 1. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam jaringan payudara. Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) adalah suatu penyakit neoplasma yang ganas yang berasal dari *parenchyma*. Penyakit ini oleh *World Health Organization* (WHO) dimasukkan ke dalam *International Classification of Diseases* (ICD) dengan kode nomor 174. Kanker payudara dapat terjadi karena adanya beberapa faktor genetik yang diturunkan dari orang tua kepada anaknya. Gen pensupresi tumor yang berperan penting

dalam pembentukan kanker payudara diantaranya adalah gen BRCA1 dan BRCA2 (Moningkey dan Shirley, 2000).

Pada kanker juga terdapat protein *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2). HER-2 adalah suatu protein yang diproduksi oleh gen yang potensial menyebabkan kanker. Protein ini berperan sebagai antena yang menerima sinyal untuk berbiaknya sel kanker dengan cepat dan mematikan. Kurang lebih 20-30% dari wanita dengan kanker payudara terdapat HER-2. Keberadaan HER-2 dihubungkan dengan perjalanan penyakit yang makin memburuk serta waktu kekambuhan yang lebih cepat pada semua tahap dari perkembangan kanker payudara, sehingga yang terdiagnosis kanker payudara wajib memeriksakan status HER-2.

#### **B. Buah *M. citrifolia* L.**

Mengkudu termasuk tumbuhan keluarga kopi-kopian (Rubiaceae), yang pada mulanya berasal dari wilayah daratan Asia Tenggara dan kemudian menyebar sampai ke Cina, India, Filipina, Hawaii, Tahiti, Afrika, Australia, Karibia, Haiti, Fiji, Florida dan Kuba. Terdapat sekitar 80 spesies tanaman yang termasuk dalam *genus Morinda*. Menurut H.B. Guppy, ilmuwan Inggris yang mempelajari Mengkudu sekitar tahun 1900, kira-kira 60 persen dari 80 spesies *Morinda* tumbuh di pulau-pulau besar maupun kecil, di antaranya Indonesia, Malaysia dan pulau-pulau yang terletak di Lautan India dan Lautan Pasifik. Hanya sekitar 20 spesies *Morinda* yang mempunyai nilai ekonomis, antara lain: *Morinda bracteata*, *Morinda officinalis*, *Morinda fructus*, *Morinda tinctoria* dan *Morinda citrifolia*. *Morinda citrifolia* adalah jenis

yang paling populer, sehingga sering disebut sebagai "*Queen of The Morinda*". Spesies ini mempunyai nama tersendiri di setiap negara, antara lain *Noni* di Hawaii, *Nonu* atau *Nono* di Tahiti, *Cheese Fruit* di Australia, *Mengkudu*, *Pace* di Indonesia dan Malaysia (ying *et al*, 2002).

Klasifikas	:
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Anak Kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Rubiales
Suku	: Rubiaceae
Marga / genus	: <i>Morinda</i>
Jenis / spesies	: <i>Morinda citrifolia</i> L. (Bangun <i>et al</i> , 2002).



**Gambar 2.** Buah Mengkudu (*M. citrifolia* L.)

#### Morfologi tanaman :

Tinggi antara 4-6 m, batang bengkok-bengkok, kasar, memiliki akar tunggang menancap ke dalam. Bunga tumbuh di ketiak daun, berkelamin ganda. Bunga putih harum. Permukaan buah seperti terbagi dalam sel-sel poligonal (segi banyak) yang berbintik-bintik dan berkulit, banyak mengandung air dan berbau busuk. Habitat hidup di dataran rendah sampai pada ketinggian tanah 1500 m di atas permukaan laut.

Buah *M. citrifolia* L memiliki kandungan polisakarida, glikosida asam lemak, iridoid, antrakuinon, kumarin, flavonoid, lignan, fitosterol, karotinoid, dan sejumlah konstituen volatil meliputi monoterpen dan asam lemak rantai

pendek serta ester asam lemak (Rahmawati, 2009). Kandungan kimia lain yang terdapat di dalam buah *M. citrifolia* L berupa skopoletin, rutin, asam askorbat,  $\beta$ -karoten, l-arginin, proxironin, *proxeroninase*, iridoid, asperolusid, iridoid antrakuinon, kalsium, alizarin, vitamin B, asam amino dan juga glukosa (Wijayakusuma dan Dalimartha, 1996; Sjabana dan Bahalwan, 2002). Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan sifat ini flavonoid memiliki potensi untuk menghambat proses inisiasi karsinogenesis dengan cara menghambat aktivasi karsinogen (Meiyanto *et al*, 2007). Rutin termasuk dalam golongan senyawa flavonoid yang memiliki gugus fenol. Senyawa fenolik alam telah banyak diketahui, salah satunya adalah flavonoid yang merupakan golongan terbesar dibandingkan dengan senyawa golongan lignin, melanin, dan tanin (Harborne, 1987). Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai reduktor radikal bebas sehingga flavonoid dapat digunakan sebagai antioksidan. Khasiat dan kegunaan untuk meningkatkan daya tahan tubuh, menormalkan tekanan darah, melawan tumor dan kanker, menghilangkan rasa sakit, anti-peradangan dan anti-alergi. Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang paling banyak diteliti aktivitas kemoprevensinya (Chang *et al*, 2001).

### C. Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-

lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Depkes RI, 2000).

Maserasi adalah salah satu metode dari ekstraksi dimana terjadi proses penetrasi pelarut ke dalam sel melalui dinding sel. Pelarut akan melarutkan zat aktif, kemudian membawanya keluar sel berdasarkan perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan diluar sel. Pelarut yang keluar membawa zat aktif, akan digantikan oleh pelarut baru. Hal tersebut terjadi berulang-ulang hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Untuk mengekstraksi senyawa yang terkandung dalam tanaman diperlukan pelarut yang sesuai. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

#### **D. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi atau gabungannya. KLT merupakan salah satu teknik kromatografi yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif dan isolasi skala preparatif. Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium

karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat, dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (Stahl, 1969; Harmita, 2006).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada KLT, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium atau plat plastik (Rohman, 2007).

Metode KLT dilakukan dengan elusi pada plat KLT yang sudah dialiri dengan fase gerak tertentu yang sesuai dengan senyawa kimia yang akan diamati. Hasil elusi dari KLT dapat diamati dengan pereaksi uap amoniak atau di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Rohman, 2007). Teknik KLT menggunakan suatu adsorben yang disalutkan pada suatu lempeng kaca sebagai fase stasionernya dan pengembangan kromatogram terjadi ketika fase mobil tertapis melewati adsorben itu. Seperti dikenal baik, kromatografi kertas karena nyaman dan cepatnya, ketajaman pemisahan yang lebih besar dan kepekaannya tinggi (Pudjaatmaka, 1994). Prinsip kromatografi menggunakan kaidah dasar kromatografi jerap yaitu

Hidrokarbon jenuh terjerap sedikit atau tidak sama sekali, karena itu ia bergerak paling cepat (Stahl, 1985).

#### E. Uji Antioksidan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses reaksi oksidasi radikal bebas. Terdapat dua kategori antioksidan yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami dapat berupa senyawa fenolik (tokoferol dan flavonoid), senyawa nitrogen (Alkaloid, turunan klorofil, asam amino, dan amina), atau karotenoid seperti asam askorbat (Apak *et al*, 2007). Ada lima antioksidan sintesis yang penggunaannya menyebar luas di seluruh dunia, yaitu *butylated hydroxyanisole (BHA)*, *butylated hydroxytoluene (BHT)*, *tert-butyl hydroquinone (TBHQ)*, *propyl gallate*, dan tokoferol. Antioksidan tersebut telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Trilaksani, 2003).

Oksidasi merupakan suatu reaksi kimia yang mentransfer elektron dari satu zat ke oksidator. Reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas dan memicu reaksi berantai, menyebabkan kerusakan sel dalam tubuh. Radikal bebas sangat berbahaya karena dapat merusak jaringan tubuh yang dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti kanker, tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes melitus, katarak, proses penuaan dini, dan lain-lain (Haila, 1999; Buratti *et al*, 2001; Chang *et al*, 2002; Rahmat *et al*, 2003; Shivashankara *et al*, 2004).

Metode DPPH merupakan metode yang mudah, cepat dan sensitif untuk pengujian aktivitas antioksidan senyawa tertentu atau ekstrak tanaman



(Koleva *et al*, 2002; Prakash *et al*, 2010). Karena adanya elektron yang tidak berpasangan, DPPH memberikan serapan kuat pada 517 nm. Ketika elektronnya menjadi berpasangan oleh keberadaan penangkap radikal bebas, maka absorbansinya menurun secara stokiometri sesuai jumlah elektron yang diambil. Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning (Dehpour *et al*, 2009). Untuk penentuan nilai  $IC_{50}$  suatu sampel untuk mengoptimasi metode yang di gunakan. Optimasi metode berupa penentuan *OT* dan panjang maksimum. Tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji menggunakan metode DPPH dapat digolongkan menurut nilai  $IC_{50}$  (Armala, 2009).

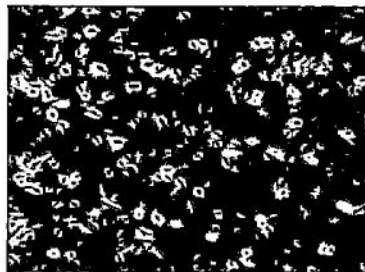
#### F. Uji Sitotoksik (MTT assay)

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT assay (Junedy, 2005). Uji MTT assay merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik (Doyle dan Griffiths, 2000). Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai  $IC_{50}$  merupakan parameter untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto, 2002). Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004). Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi persen sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang

perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dan Griffiths, 2000 *cit* Nurrochmad, 2001).

#### G. Sel MCF-7

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% f dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner *et al*, 1998; Aouali *et al*, 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt *et al*, 2000; Amundson *et al*, 2005). Sel MCF-7 tergolong cell line adherent (ATCC, 2008) yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER-), resisten terhadap herceptin (Zampieri *et al*, 2002) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki *et al*, 2003; Prunet *et al*, 2005).



Gambar 3. Sel MCF-7

## H. *Molecular Docking* Metode Protein-Ligand ANT-System (PLANTS)

*Docking* adalah proses pengembangan obat, untuk memprediksi struktur kompleks ligan kecil dengan protein. Tujuan *docking* adalah untuk menemukan konformasi energi ligan rendah di situs pengikatan protein yang sesuai dengan minimum penilaian fungsi global. *Docking* PLANTS didasarkan pada kelas algoritme optimasi stokastik. Dalam kasus *docking* protein-ligan, sebuah koloni semut buatan digunakan untuk menemukan konformasi energi minimum ligan pada *binding site*. PLANTS adalah program aplikasi *molecular docking* gratis yang diketahui memiliki kualitas seperti GOLD (aplikasi *molecular docking* yang berbayar). Namun, PLANTS tidak menyediakan fungsi preparasi protein, ligan, maupun visualisasi (Purnomo, 2011).

## I. Kerangka Konsep

Buah *M. citrifolia* L mengandung golongan senyawa Flavonoid (Rahmawati, 2009). Rutin merupakan senyawa flavonoid dimana flavonoid merupakan senyawa fenolik. Senyawa fenolik alam telah banyak diketahui, salah satunya adalah flavonoid yang merupakan golongan terbesar dibandingkan yang lain. Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai reduktor radikal bebas sehingga flavonoid dapat digunakan sebagai antioksidan.

Mekanisme Antioksidan dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas, dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi dapat menghambat pada fase inisiasi pada kanker dimana pada fase

inisiasi ini terjadi kerusakan DNA dikarenakan paparan radiasi atau zat karsinogenik.

Setelah diketahui memiliki efek antioksidan dilanjutkan dengan uji sitotoksik dimana ini bermaksud untuk mengetahui berapa konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 50% sel kanker. Selanjutnya dilakukan *Docking* untuk proses pengembangan obat, memprediksi struktur kompleks ligan kecil dengan protein. Tujuannya untuk menemukan konfirmasi energi ligan rendah di situs pengikatan protein HER-2 dengan rutin yang sesuai dengan minimum penilaian fungsi global.

#### **J. HIPOTESIS**

- a. Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. mengandung senyawa golongan flavonoid.
- b. Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L mempunyai efek antioksidan yang potensial.
- c. Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L mempunyai efek sitotoksik yang potensial terhadap sel kanker payudara MCF-7.
- d. Berdasarkan analisis *docking* molekuler, senyawa rutin memiliki afinitas yang tinggi untuk menghambat ekspresi protein HER-2.