

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sistematika Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*)

1. Nama Tanaman

Tumbuhan tapak dara (*Catharanthus roseus*) merupakan tumbuhan yang berasal dari Amerika tengah, umumnya ditanam sebagai tanaman hias (Dalimartha, 2008). Tumbuhan ini memiliki nama yang beraneka ragam dari berbagai daerah seperti : Tapak dara (Indonesia), Perwinkle (Inggris), Chang Chun Hua (Cina), Keminting Cina dan Rumput Jalang (Malaysia) (Pandiangan, 2006). Tapak dara dapat tumbuh di tempat terbuka dengan berbagai macam iklim, serta ditemukan mulai dataran rendah hingga ketinggian 800 m dpl (Dalimartha, 2008).



Gambar 1. Daun Tapak Dara bunga ungu (*Catharanthus roseus*) (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan : Daun berbentuk bulat telur berwarna hijau, memiliki tangkai daun yang pendek (sekitar 1-2 cm), panjang daun sekitar 2-6 cm, lebar daun sekitar 1-3 cm, dan diklasifikasikan sebagai daun tunggal (Dalimartha, 2008)

2. Klasifikasi dan Deskripsi

Menurut Badan POM RI (2008), berikut merupakan klasifikasi tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) adalah sebagai berikut:

Divisi : Plantae
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Gentianales
Suku : Apocynaceae
Marga : *Catharanthus*
Spesies : *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Habitus tapak dara berupa tumbuhan semak, termasuk tumbuhan tahunan, tingginya sekitar 1-2 m, memiliki batang berkayu, bulat, bercabang, beruas-ruas dan berwarna hijau. Daun tapak dara tergolong daun tunggal dengan letaknya silang berhadapan, mempunyai morfologi bulat telur dengan ujungnya terdapat getah dan pangkal tumpul, tepi rata, mengkilat, memiliki tangkai dengan panjang 2-6 cm, lebar daun 1-3 cm, pertulangan menyirip, serta berwarna hijau. Bunga tapak dara ialah jenis bunga tunggal, terletak di ketiak daun, memiliki mahkota berbentuk terompet, panjang tangkai 2,5-3 cm, memiliki kelopak bertajuk lima, berbentuk runcing, benang sari berjumlah lima, kepala sari berwarna kuning, dan tangkai putik putih. Buahnya kotak dengan bentuk pipih, ketika masih muda berwarna hijau setelah tua maka akan berwarna coklat.

Biji kecil, keras dan berwarna coklat. Akar berupa akar tunggang dan berwarna putih (Badan POM Republik Indonesia, 2008).

3. Senyawa Aktif dan Manfaat Tapak Dara

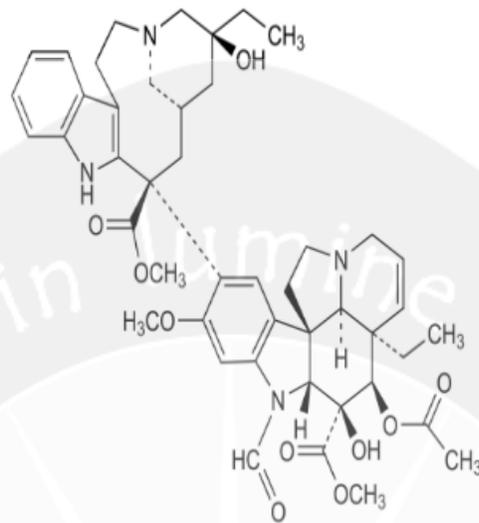
Menurut Mangan (2003), suatu senyawa yang diduga dapat mengobati kanker (antikanker) idealnya dapat segera membunuh sel kanker tanpa efek samping seperti merusak jaringan normal, namun hingga kini belum ada obat kanker dengan kriteria tersebut. Selain efek tersebut, justru terdapat efek samping yang dirasakan seperti harga obat-obatan tersebut juga mahal sehingga bagi sebagian masyarakat sulit dijangkau. Upaya untuk mengatasi penyakit kanker dengan obat-obatan tradisional semakin marak dilakukan karena biaya yang ekonomis, mudah didapat dan memiliki efek samping yang relatif kecil (Dessisa, 2001).

Sebelumnya, pemanfaatan tapak dara digunakan untuk meredakan nyeri otot, obat depresi, obat sistem pusat, menghilangkan bengkak akibat sengatan tawon, obat mimisan, gusi berdarah, bisul, dan sakit tenggorokan. Berbagai macam pemanfaatan tersebut disebabkan oleh metabolit sekunder yang dihasilkan tapak dara yaitu alkaloid (Dessisa, 2001), selain itu tapak dara digunakan untuk menghilangkan panas, bahan racun, menghentikan pendarahan, penenang dan menurunkan tekanan darah manusia. Daun tapak dara mengandung lebih dari 70 jenis alkaloid, diantaranya ialah vinkristin dan vinblastin. Alkaloid memiliki rasa yang pahit dan dingin

(Wijayakusuma, 2005). Saat ini penggunaan tapak dara mengalami kemajuan, salah satunya ialah penemuan obat antikanker (Friis dan Gilbert, 2000). Komponen aktif antikanker yang dihasilkan ialah vinkristin dan vinblastin.

Kedua senyawa tersebut dapat menghambat sel kanker pada tahap metafase atau mitosis kemudian dapat menghambat sintesis purin, DNA, RNA yang terdapat pada sel kanker, sehingga proliferasinya dapat dihambat. Proses molekuler penghambatan kanker dilakukan dengan cara menghambat sintesis DNA. Replikasi DNA terjadi apabila adanya sintesis rantai nukleotida yang baru. Proses ini berlangsung apabila tersedianya komplementasi pasangan basa (purin dan pirimidin) untuk menghasilkan cetakan baru. Oleh karena itu dengan terhambatnya sintesis purin maka proses replikasi DNA sel kanker tidak terjadi, sehingga dapat menghambat proliferasi sel kanker (Fowler, 1983).

Meskipun kedua senyawa tersebut dapat menghambat kanker, namun vinkristin mempunyai efek antikanker yang lebih tinggi daripada vinblastin, dan senyawa ini dapat menghambat *ridgeway osteosarcoma*, *mecca lymphosarcoma*, dan x5563 myeloma. Ekstrak tapak dara menggunakan air dan alkohol dapat menghambat pertumbuhan sarcoma 180 dengan tingkat keberhasilan 95,7% (Wijayakusuma, 2005).

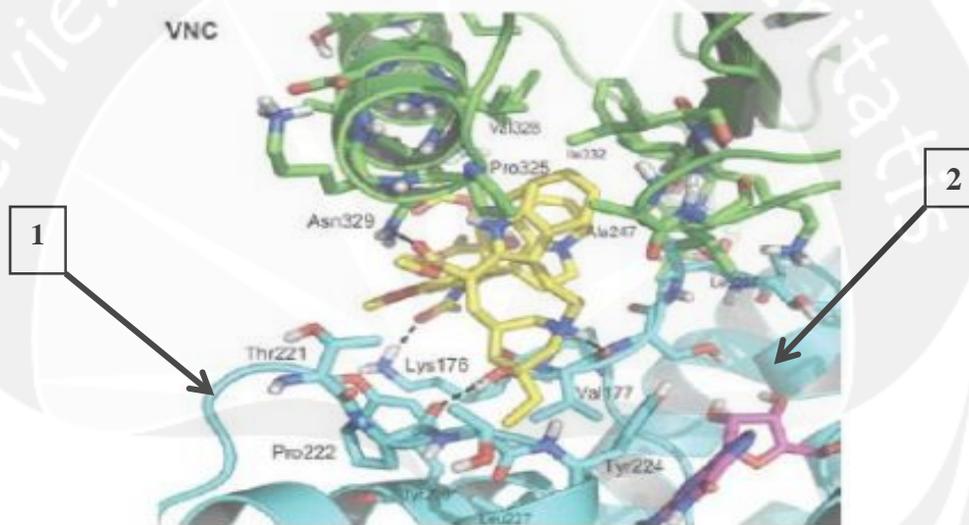


Gambar 2. Struktur Kimia Vinkristin (Sumber:Moffat dkk., 2005).

Senyawa ini bersifat sebagai antineoplasma. Cara kerjanya ialah vinkristin berikatan dengan tubulin kemudian menghambat formasi mikrotubula. Oleh karena itu, proses metafase sel dapat terhenti dengan cara mengganggu formasi *mitotic spindle*, spesifiknya terdapat pada fase S (Sintesis) dan M (Mitosis) (Pertiwi dkk., 2013).

Cara lain yang dilakukan vinkristin untuk menghambat kanker ialah menghalangi sintesis asam nukleat dan protein dengan pemblokkan pada penggunaan asam glutamat. Vinkristin dimetabolisme di hati oleh enzim CYP3A4 (Pertiwi dkk., 2013). Interaksi antara vinkristin dan mikrotubula terletak pada permukaan longitudinal dua tubulin yang heterodimer lalu tergantikan dengan *GTP binding site* (E-site). Interaksi ini menjelaskan tentang bagaimana vinkristin menghambat hidrolisis GTP. Sisa α tubulin digunakan sebagai katalisator untuk pembelahan β -fosfodiester yang

terhubung dengan molekul GTP dan terikat oleh subunit β tubulin yang lokasinya bersebelahan. Struktur yang melengkung dapat menginduksi tubulin menjadi agregat yang berbentuk spiral sehingga merusak polimerasi mikrotubula (Coderech dkk.,2012). Berikut Gambar 3 merupakan ikatan vinkristin dengan asam amino penyusun mikrotubula



Gambar 3. Ikatan vinkristin dengan asam amino penyusun mikrotubula
(Sumber: Coderech dkk .,2012)

Keterangan: Vinkristin memblok asam amino penyusun mikrotubula sehingga sel pembelahan sel kanker dapat terhambat (1) : Asam amino ; (2) : Mikrotubula

B. Ekstraksi

Ekstrak merupakan suatu sediaan yang didapat dengan cara mengambil senyawa aktif dari bagian simplisia (baik nabati maupun hewani) menggunakan pelarut yang sesuai kemudian pelarut diuapkan (Sudjadi, 2008). Sedangkan ekstraksi ialah suatu rangkaian pemisahan senyawa suatu bahan menggunakan pelarut yang tidak saling bercampur sehingga zat aktif dapat larut dan terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Proses ekstraksi diawali dengan pengeringan bahan yang dihaluskan, kemudian dilakukan pemrosesan dengan suatu pelarut atau senyawa pengekstrak.

Menurut Mukhriani (2014), proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Umumnya, ekstraksi menggunakan berbagai jenis pelarut yang berbeda-beda. Jenis ekstraksi dan pelarut yang digunakan berdasarkan kemampuan dari kelarutan bahan yang terkandung dalam tanaman serta stabilitasnya (Voigt, 1995).

Ekstraksi bertujuan untuk menarik komponen senyawa kimia yang diinginkan dan bermanfaat dari suatu bahan alam (Sudjadi, 2008). Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga komponen dari zat aktif bahan alam tersebut dapat terambil. Penarikan zat aktif berlangsung terus

– menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Meloan, 1999).

Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu seperti senyawa bioaktif yang tidak diketahui pada suatu organisme dan sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural (Sarker dkk., 2006). Metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus. Perbedaan kedua metode ekstraksi ini terletak pada ada atau tidaknya penambahan perlakuan diantaranya perlakuan panas setelah suatu bahan dilarutkan dalam pelarut (Moelyono, 2006).

Ekstraksi sederhana merupakan ekstraksi menggunakan pelarut tanpa menggunakan tambahan perlakuan lain seperti panas, contohnya ialah maserasi atau sering disebut dengan ekstraksi dingin, sedangkan ekstraksi khusus ialah ekstraksi menggunakan perlakuan tambahan seperti pemanasan atau pemecahan sel menggunakan ultrasonik dalam mendapatkan senyawa yang diinginkan. Contoh ekstraksi sederhana ialah maserasi, reperfusi, perkolasi, evakuasi, dan dialokasi. Ekstraksi khusus terdiri dari sokletasi, arus balik, dan ultrasonik (Moelyono, 1996).

Salah satu metode ekstraksi sederhana yang sering digunakan yaitu maserasi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007).

Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah *inert* yang tertutup rapat pada suhu kamar (25°C). Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan (Mukhriani, 2014).

Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak (dapat mencapai 1 Liter) dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar (25°C). Namun di sisi lain, metode maserasi mudah dilakukan (Mukhriani, 2014).

C. Pelarut

Pelarut atau pengekstrak organik digolongkan menjadi dua jenis berdasarkan konstanta dielektrik yaitu pelarut polar dan non-polar. Konstanta dielektrik dapat diartikan sebagai gaya tolak menolak antara dua partikel dengan muatan listrik yang terdapat dalam suatu molekul. Kecenderungan semakin tingginya konstanta dielektrik pelarut, maka pelarut tersebut memiliki nilai polaritas yang semakin tinggi juga (Sudarmadji dkk., 1989). Kriteria pemilihan pelarut meliputi stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, serta dalam kriteria batas aman yang telah ditetapkan oleh pemerintah (Harborne, 1987).

Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH dengan titik didihnya $78,4^\circ C$. Etanol memiliki sifat tidak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air (Kartika dkk., 1987). Etanol merupakan pelarut volatil universal yang memiliki polaritas relatif tinggi yaitu 65,4 dengan konstanta dielektrik 22,4 dan titik didih $78^\circ C$ (Voigt, 1995 dan Smallwood, 1996). Etanol memiliki kemampuan untuk melarutkan senyawa alkaloid, diglikosida, fenolik, flavonoid, dan sedikit minyak atsiri (Mardiyaningsih dan Aini, 2014).

D. Kanker

Saat ini kanker merupakan salah satu permasalahan kesehatan utama yang disoroti dunia. Data yang didapat melalui *World Health Organization* (WHO) bahwa setiap tahunnya terdapat ada sekitar 6,25 juta jiwa terkena kanker dan 9 juta jiwa diantaranya meninggal dunia dalam dekade 80 tahun terakhir. Dua jenis kanker yang paling dominan pada wanita yaitu kanker payudara serta kanker serviks (Syahputra, 2016).

Gabriel (2007), menyatakan bahwa kanker secara umum dapat diartikan bahwa suatu gambaran sel yang berproliferasi secara tidak terkontrol atau dapat dijabarkan secara luas sebagai sel yang tumbuh namun tidak teratur dan berpotensi untuk menyebar ke bagian tubuh lain. Sel juga memiliki potensi untuk berubah menjadi karsinoma. Oleh karena dapat berpotensi menyebar ke bagian tubuh lain peristiwa ini disebut metastasis dengan perantara sistem limfatik serta

Kanker memiliki berbagai macam jenis, antara lain: limfoma, sarkoma, *karsioma*, *glioma*, dan *karsinoma in situ*. Jenis *karsinoma* ialah jenis kanker yang berasal dari sel yang melapisi permukaan tubuh atau permukaan saluran tubuh, misalnya seperti jaringan seperti sel kulit, testis, ovarium, kelenjar mukus, sel melanin, payudara, leher rahim, kolon, rektum, lambung, dan pankreas (Akmal, 2010). Menurut Franks dan Teich (1998), sifat sel kanker ialah :

1. Bentuk dan struktur sel bermacam-macam (*polymorph*)
2. Tumbuh autonom
3. Mendesak dan merusak sel-sel normal di sekitarnya
4. Dapat bergerak sendiri (amoeboid)
5. Tidak mengenal koordinasi dan batas-batas kewajaran
6. Kurang daya adhesi dan kohesi
7. Tidak mengenal kontak inhibisi
8. Tidak mengenal tanda posisi
9. Tidak menjalankan fungsinya yang normal dan tidak mengenal batas kepadatan.

Terdapat beberapa kelompok orang yang memiliki resiko tinggi terhadap kanker antara lain:

1. Usia

Umumnya kanker banyak ditemukan pada usia di atas 35 – 40 tahun (Sukardja, 2000).

2. Kelainan genetik

Menurut (Sukardja, 2000), beberapa penyakit herediter (keturunan) mudah mendapat kanker seperti:

- a. Penderita *Xeroderma pigmentosum*, lebih berisiko terkena kanker kulit dan kanker payudara.
- b. Penderita Sindroma Klinefelter lebih berisiko tinggi terkena kanker payudara 66 kali lebih besar dari orang normal.
- c. *Polyposis coli* berisiko terjadinya kanker kolon.

3. Kontak dengan karsinogen

Menurut (Sukardja, 2000), orang yang sering mendapat kontak dengan karsinogen, lebih mudah mendapat kanker. Misalnya kontak karena :

- a. Pekerjaan, misalnya pekerja laboratorium radiologi, tambang batubara, dan industri kimia.
- b. Gaya hidup : merokok, minuman keras, kebiasaan menginang, terpapar terik sinar matahari, dan kawin muda.
- c. Makanan dan minuman, misalkan minuman keras atau beralkohol, makanan : tinggi lemak, mengandung pengawet, pewarna, pengasapan, berkalori tinggi, dan kurang serat.
- d. Lingkungan hidup, misalnya hidup di daerah yang banyak mengandung radium, arsen, nikel, chrom, dan asbestos.

4. Orang yang mempunyai penyakit tertentu (Sukardja, 2000) :

- a. Penyakit infeksi, misalnya infeksi karena virus, jamur *Aspergillus flavus*, dan parasit schistomiasis
- b. Cirrhosis hepatis, memudahkan terjadinya kanker hati.
- c. Kelainan kongenital : *Xeroderma pigmentosum* dan *Polyposis coli*.
- d. Lesi pra-ganas : *Keratosis senilis*, *Nevus junctional*, dan *Dysplasia mammae*
- e. Immunodefisiensi : penurunan kekebalan tubuh
- f. Mendapat transplantasi organ

5. Kanker dalam keluarga

Menurut Sukardja (2000), orang-orang yang mempunyai keluarga yang menderita kanker ialah keluarga garis pertama vertikal seperti orang tua, nenek, anak, dan cucu atau horizontal (saudara) memiliki risiko terkena kanker yang lebih tinggi. Namun, hal ini tidak berarti bahwa kanker merupakan suatu penyakit keturunan atau menular. Kanker bukanlah penyakit keturunan, namun hanya bakat untuk mendapat kanker saja yang diturunkan (terdapat gen pembawa kanker).

Suatu keadaan dari hasil penelitian dokter saat mendiagnosis suatu penyakit kanker yang diderita pasiennya, sudah sejauh manakah tingkat penyebaran kanker tersebut baik ke organ atau jaringan sekitar maupun penyebaran ketempat lain ini disebut dengan istilah stadium. Stadium hanya dikenal pada tumor ganas atau kanker dan tidak ada pada tumor jinak (*American JointCommittee on Cancer*

(AJCC), 2002).

Untuk menentukan suatu stadium, harus dilakukan pemeriksaan klinis dan pemeriksaan penunjang lainnya yaitu histopatologi, *rontgen*, USG, CT scan, scintigrafi, dan lain-lain. Cara yang digunakan untuk menentukan stadium kanker cukup banyak, namun saat ini yang paling banyak digunakan ialah stadium kanker berdasarkan klasifikasi sistem TNM yaitu T (Tumor primer) N (Nodul regional) dan M (Metastase jauh) yang direkomendasikan oleh UICC (*International Union Against Cancer* dari *World Helath Organization*) / AJCC (*American Joint Committee On Cancer* yang disponsori oleh *American Cancer Society* dan *American College of Surgeons*) (*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), 2002).

Sistem TNM adalah salah satu sistem paling umum yang digunakan untuk merepresentasikan tingkat keparahan kanker. Sistem ini telah diterima oleh *International Union Against Cancer* (UICC) dan *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Kebanyakan fasilitas medis menggunakan sistem TNM sebagai metode utama untuk pelaporan kanker termasuk *National Cancer Institute* (NCI). Sistem TNM ini berdasarkan pada besarnya tumor (T), tingkat penyebaran ke kelenjar getah bening (N), dan adanya metastasis (M). Nomor ditambahkan untuk setiap huruf untuk menunjukkan ukuran tumor dan luasnya penyebaran (*American JointCommittee on Cancer* (AJCC), 2002).

Tabel 1. Stadium Kanker berdasarkan Tumor primer

Tumor Primer (T)	Keterangan
TX	Tumor primer tidak dapat dievaluasi
T0	Tidak ada bukti tumor primer
Tis	Karsinoma in situ (kanker dini yang belum menyebar)
T1, T2, T3, T4	Ukuran dan atau luas primer

(Sumber : *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 2002)

Tabel 2. Stadium Kanker berdasarkan kondisi kelenjar getah bening

Kelenjar getah bening regional (N)	Keterangan
NX	Kelenjar getah bening regional tidak dapat dievaluasi
N0	Tidak ada keterlibatan kelenjar getah bening regional (kanker tidak ditemukan pada kelenjar getah bening)
NI, N2, N3	Keterlibatan kelenjar getah bening regional (jumlah dan atau luas menyebar)

(Sumber : *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 2002)

Tabel 3. Stadium Kanker berdasarkan Metastasis

Metastasis	Jarak
MX	Metastasis jauh tidak dapat dievaluasi
M0	Metastasis tidak jauh (kanker belum menyebar ke bagian lain dari tubuh)
M1	Metastasis jauh (kanker telah menyebar ke bagian tubuh yang jauh)

(Sumber : *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 2002)

Tabel 4. Stadium Kanker berdasarkan Tahapan penyebaran kanker

Tahap	Definisi
Tahap 0	Karsinoma <i>in situ</i> (kanker dini yang hadir hanya di lapisan sel yang mulai)
Tahap I, II	Angka yang lebih besar menunjukkan penyakit serius
Tahap III	Ukuran tumor yang lebih besar, dan atau penyebaran kanker ke kelenjar getah bening terdekat atau organ yang berdekatan dengan tumor primer
Tahap IV	Kanker telah menyebar ke organ lain

(Sumber : *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 2002)

Deteksi dini kanker dapat meningkatkan pengobatan yang berhasil dan prognosis baik. Dokter menggunakan informasi dari gejala dan beberapa prosedur lain untuk mendiagnosis kanker. Teknik pencitraan seperti *X-ray*, *CTscan*, *MRI scan*, *PET scan*, dan *ultrasound* digunakan secara teratur untuk mendeteksi lokasi tumor. Dokter juga dapat melakukan endoskopi. Pengekstrakan sel-sel kanker dan melihat di bawah mikroskop adalah satu-satunya cara mutlak untuk mendiagnosis kanker, prosedur ini disebut biopsi (Crosta, 2010).

Tes diagnostik molekul juga sering digunakan seperti menganalisis lemak, protein, dan DNA pada tingkat molekul. Sebagai contoh, sel-sel kanker prostat mensekresi zat kimia yang disebut PSA (*prostate-specific antigen*) ke dalam aliran darah yang dapat dideteksi oleh tes darah. Molekuler diagnostik, biopsi, dan teknik pencitraan digunakan secara bersama-sama untuk mendiagnosis kanker (Crosta, 2010).

E. Kanker Serviks

Kanker leher rahim (serviks) merupakan jenis penyakit kanker yang banyak (528.000 kasus baru serta angka kematian mencapai 266.000 jiwa.) dan umum diderita oleh wanita (Alison, 2002). Kanker serviks menempati urutan ke-2 setelah kanker payudara. Pada tahun 2014, WHO menyatakan bahwa kanker serviks menempati urutan ke-4 penyebab kanker bagi usia antara 15-44 tahun. Namun, secara umum kanker serviks masih menempati urutan ke- 2 dengan angka kejadian 528.000 kasus baru serta angka kematian mencapai 266.000 jiwa.

Kejadian kanker serviks di Indonesia menempati urutan ke-2 setelah kanker payudara yaitu sebesar 20.928 kasus dan 9.928 angka kematian. Insiden kejadian kanker serviks di Indonesia adalah kurang dari 19,92 % per 100.000 wanita per tahun (Syahputra dkk., 2016).

Kanker leher rahim adalah tumor ganas yang tumbuh di daerah leher rahim (serviks), yaitu suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara rahim (uterus) dan liang senggama (vagina) (Departemen kesehatan Republik Indonesia, 2008). Kanker leher rahim terjadi jika sel-sel yang ada di daerah tersebut membelah secara tak terkendali dan menjadi abnormal. Jika sel-sel tersebut terus membelah, maka akan terbentuk suatu massa jaringan yang disebut tumor. Tumor dapat bersifat jinak atau ganas, jika tumor tersebut menjadi ganas, maka keadaanya disebut sebagai kanker leher Rahim (Manuaba, 2008).

Kanker serviks atau kanker leher rahim atau disebut juga kanker mulut rahim merupakan salah satu penyakit keganasan di bidang kebidanan dan penyakit kandungan yang masih menempati posisi tertinggi sebagai penyakit kanker yang menyerang kaum perempuan (Manuaba, 2008). Kanker serviks adalah kanker leher rahim atau kanker mulut rahim yang di sebabkan oleh virus *Human Papiloma Virus* (HPV). Hanya beberapa saja dari ratusan varian HPV yang dapat menyebabkan kanker. Belakangan diketahui sekitar 30 jenis virus HPV yang dapat menginfeksi saluran kelamin wanita. Penularan virus HPV yang dapat menyebabkan kanker leher rahim ini melalui seorang penderita kepada

orang lain dan menginfeksi orang tersebut. Beberapa contoh jenis HPV seperti HPV-6 serta 11. Adanya HPV mengakibatkan adanya tumor kecil seperti menyerupai kutil (Alison, 2002).

Penularannya dapat melalui kontak langsung dan karena hubungan seks. Gejala yang mungkin timbul (umumnya pada stadium lanjut) adalah perdarahan di luar masa haid, jumlah darah haid tidak normal, perdarahan pada masa menopause (setelah berhenti haid), keputihan yang bercampur darah atau nanah serta berbau, perdarahan sesudah senggama, rasa nyeri dan sakit di panggul, gangguan buang air kecil sampai tidak bisa buang air kecil (Prawirohardjo, 2005).

Deteksi kanker leher rahim (serviks) dapat dilakukan dengan metode *Pap Smear* atau dengan cara melihat *neoplasia intra epitel* (NIS). NIS adalah epitel skuamosa yang mengalami gangguan maturasi. Jika dibandingkan sel ini tampak berbeda dari sel normal namun belum dapat dikatakan sebagai karsinoma. Kriteria diagnosis NIS ialah disorganisasi seluler, peningkatan aktivitas mitosis, imaturitas seluler, dan abnormalitas inti sel. Derajat keparahan NIS hingga dapat menyebabkan kanker dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Derajat Keparahan *Neoplasia Intra Epitel* (NIS)

Tipe <i>Neoplasia Intra Epitel</i> (NIS)	Keterangan
NIS I	Displasia ringan (mitosis dan sel-sel imatur hanya terdapat pada 1/3 bawah lapisan epitel)
NIS II	Displasia sedang (mitosis dan sel-sel imatur meliputi lapisan tengah dan bawah)
NIS III	Displasia berat (mitosis dan sel-sel imatur meliputi seluruh lapisan sel namun belum menembus membran basal dan setara dengan karsinoma in situ)

(Sumber : Agus dan Alfian, 2004)

Penyebab utama kanker serviks ialah infeksi oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) dengan angka kejadian sebanyak 95% lalu faktor lain yang dapat mengakibatkan kanker serviks ialah telah melakukan hubungan seks pada usia yang relatif muda (Alison, 2002).

F. Kanker Payudara

Kanker payudara atau yang biasa disingkat dengan istilah KPD ialah suatu penyakit yang bersifat ganas terhadap jaringan payudara yang berasal dari epitel duktus atau lobus-lobusnya seperti kelenjar susu, saluran susu, atau jaringan penunjang seperti lemak dan saraf (Sjamsuhidajat dan De Jong, 2004). *Pathological Based Registration* Indonesia mengungkapkan bahwa kanker payudara menempati urutan teratas dengan total frekuensi relatif sebesar 18,6%. Angka kejadian penderita kanker payudara di Indonesia mencapai 12 dari 100.000 wanita (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2015)

Menurut Syahputra dkk. (2016), kanker payudara menempati urutan pertama penyebab kematian pada wanita. Menurut Forounzanfar dkk. (2011), Indonesia dan negara lain jumlah penderita kanker payudara mengalami peningkatan dari tahun 1980 hingga tahun 2010 sebesar 3,1%. Berdasarkan data dari IARC (*International Agency for Research on Cancer*) tahun 2002 kanker payudara menempati urutan pertama dari seluruh kanker pada perempuan (38 per 100.000 perempuan) dengan kasus baru sebesar 22,7% dan jumlah kematian 14% per tahun dari seluruh kanker pada perempuan di dunia (Jemal dkk., 2011).

Menurut *American Cancer Society* terdapat sekitar 465.000 wanita di dunia meninggal tiap tahunnya disebabkan karena kanker payudara (Rasjidi, 2009). Hormon, seperti kadar estrogen dan hormon eksogen (hormon post menopausal), kontrasepsi oral, faktor gizi dan aktivitas fisik, faktor antropometri, faktor genetik dan keluarga yang menyebabkan terjadinya resiko kanker payudara umumnya di negara maju seperti Amerika Serikat dan Jepang (Saika dan Sobue, 2009)

Heinrich dkk. (2009), menuturkan bahwa pengobatan dalam hal kanker dibutuhkan adanya kombinasi cara pengobatan misalnya dengan obat herbal, hal ini dikarenakan agar dapat mengurangi efek samping dari pengobatan modern serta aman dan banyak perusahaan fitomedis yang keefektifannya telah teruji secara klinis (Heinrich dkk., 2009). Kanker payudara dapat disebabkan salah satunya karena adanya mutasi yang disebabkan enzim p53 (Brown dan Attardi, 2005).

G. Cell Line

Cell line atau sel lestari merupakan kultur sel kanker yang umumnya digunakan untuk penelitian yang dilakukan secara *in vitro*, sebagai contoh penelitian kanker yang membutuhkan skrining hasil dalam waktu yang singkat (Alison, 2002). Sel kultur dapat diambil dari jaringan asal ataupun memperbanyak sel yang sudah ada. Pengerjaan kultur sel harus selalu terkontrol dan terjaga keaseptikannya.

Pada penelitian *in vitro*, sel kultur banyak digunakan seperti penelitian obat baru. Sel kultur juga disebut *continous cell line*. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall dkk., 2003). Menurut Echalier (1997), suatu medium kultur buatan yang digunakan untuk menumbuhkan sel diluar asalnya (secara *in vitro*) sehingga kondisi dibuat semirip mungkin.

Tabel 6. Komposisi Medium RPMI

Komponen	g/L
Kalsium nitrat	0,1
Mafnesium sulfat	0,04884
Potassium klorida	0,4
sodium klorida	6
Sodium fosfat Dibasic	0,8
L-Arginin	0,2
L-Asparagin	0,05
L-Asam aspartat	0,02
L-Sistin	0,0652
L-Asam glutamat	0,02
Glisin	0,01
L-Histidin	0,015
Hidrofil Prolin	0,02
L-Isoleusin	0,05
L-Fenilalanin	0,015
L-Prolin	0,02
L-Serin	0,03
L-Threonin	0,02
L-Triptofan	0,005
L-Tirosin	0,02883
L-Valin	0,02
D-Biotin	0,0002
Kolin klorida	0,003
Asam Folat	0,001
Myo- Inositol	0,035
Niasinamid	0,001
P- Asam benzoat	0,001
d- asam pantotenat	0,00025
Pyridoxin.HCl	0,001
Riboflavin	0,0002
Thiamin HCl	0,001
Vitamin B-12	5E-06
D-Glukosa	2
Gglutationin	0,001
Fenol red (sodium)	0,0053

(Sumber : Moore dan Woods, 1976)

Tabel 7. Komposisi Medium DMEM

Komponen	g/L
CaCl ₂	0,2
Fe(NO ₃) ₃	0,0001
MgSO ₄	0,0977
KCl	0,4
NaHCO ₃	1,5
NaCl	6,4
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,125
L-Arginin.HCl	0,084
L-Sistin.2HCl	0,062
L-Glutamin	0,584
Glisin	0,03
L-Histidin.HCl. H ₂ O	0,04
L-Isoleusin	0,105
L-Leusin	0,105
L-Lysin.HCl	0,146
L-Metionin	0,03
L-Fenilalanin	0,066
L-Serin	0,042
L-Threonin	0,095
L-Triptofan	0,016
L-Tirosin	0,10379
L-Valin	0,094
Kolin klorida	0,004
Asam folat	0,004
Myo-Inositol	0,0072
Nikotinamid	0,004
D-Asam pantotenat	0,004
Piroksidin HCl	0,004
Riboflavin	0,004
Tiamin HCl	0,004
D-Glukosa	4,5
Fenol red	0,015

Sodium piruvat	0,11
Niasinamid	0,004

Lanjutan Tabel 7. Komposisi Medium DMEM

d-asampantotenat.1/2 ca	0,004
pyridoxal. HCl	0,004
HEPES	5,958
Natrium Karbonat	3,7

(Sumber: Smith dkk., 1960)

Jenis kultur sel dapat dibedakan menjadi 2 yaitu kultur sel primer dan kultur sel sekunder (*cell line*). Kultur sel primer ialah kultur yang berasal dari sel, jaringan, maupun organ yang diperoleh langsung dari organisme asalnya (Ma'at, 2011), sedangkan *cell line* merupakan sel kultur yang diperoleh dari subkultur pertama dari kultur primer (Ma'at, 2011). Terdapat kelemahan kultur sel primer di antaranya besarnya kebutuhan hewan percobaan sebagai bahan baku kultur serta dimungkinkan terdapatnya kontaminasi virus ataupun mikrobia yang dapat menginfeksi hewan coba yang akan dijadikan sebagai stok kultur (Ma'at, 2011).

Terdapat 2 metode dalam kultur sel yakni kultur suspensi dan kultur monolayer. Metode kultur suspensi digunakan bagi sel yang tidak melekat sedangkan metode kultur monolayer digunakan apabila sel yang akan dikultur merupakan sel yang melekat (Ma'at, 2011). Zarisman (2006), menuturkan jika kultur sel memiliki peran penting dalam hal pengujian sitotoksitas. Kultur sel dapat diartikan sebagai teknik penumbuhan sel diluar kondisi asalnya secara aseptis. Terdapatnya kelebihan dari teknik ini diantaranya ialah dapat dikondisikan secara bebas kondisi sel dalam keadaan konstan, mudah

penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Menurut Gusmita (2010), kondisi sel kultur dipengaruhi oleh dua hal yaitu medium sel kultur itu sendiri dan lingkungan kultur. Medium kultur yang digunakan dalam penelitian ini ialah RPMI dan DMEM. Keduanya ialah medium yang baik untuk menumbuhkan sel dalam kurun waktu yang singkat. Medium RPMI digunakan untuk sel HeLa sedangkan medium DMEM digunakan untuk MCF-7.

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan sel disebut juga medium komplit, karena didalamnya mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, penisilin streptomisin 2% serta *fungizone* (Amphotericin) 0,5%. Penggunaan FBS pada campuran medium berfungsi sebagai hormon penumbuh bagi sel, karena FBS sendiri merupakan suplemen mempercepat pertumbuhan yang kerap digunakan sebab kandungannya yang kompleks dan mengandung senyawa-senyawa yang mendukung faktor pertumbuhan. Senyawa itu adalah jenis polipeptida spesifik yang memacu pertumbuhan dari sel, sebagai agen pelindung, faktor pelekatan, protein transport serta nutrisi (Zarisman, 2006).

Tujuan penambahan antibiotik penisilin streptomisin (penstrep) dan fungizone pada medium RPMI maupun DMEM ialah agar menghindari adanya kontaminasi mikrobial baik bakteri maupun jamur. Jenis Penisilin-Streptomisin digunakan dalam penambahan medium karena antibiotik ini tidak beracun bagi

sel dan memiliki spektrum anti mikrobia yang luas serta terbilang cukup murah (Zarisman 2006).

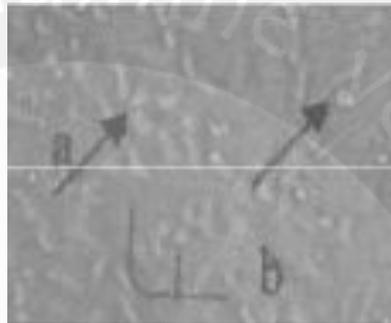
Dalam pengujian sitotoksisitas, kepadatan dan jumlah sel yang digunakan ialah sebanyak 10^4 sel per sumuran yang diharapkan akan tetap hidup sepanjang waktu perlakuan ketika masa inkubasi 24 jam. Waktu 24 jam ditentukan guna untuk mencegah terjadinya kekurangan nutrisi pada sel yang disebabkan oleh jumlah sel yang terus menerus bertambah banyak. Maksimal fungsi pada medium RPMI dan DMEM dalam kultur sel ialah selama 2 hari (Zarisman, 2006).

DMSO (Sulfoxide Dimetil) merupakan senyawa organosulfur yang memiliki rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Senyawa yang memiliki karakteristik cairan tak berwarna ini merupakan pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan senyawa baik polar maupun non polar dalam aneka pelarut organik maupun air. Dalam Penelitian kultur sel terdapat banyak sel sel kultur yang digunakan seperti MCF7 T47D, HeLa, WiDr, HCT-116, dan sel Vero. Pada penelitian ini yang digunakan adalah sel HeLa dan sel MCF-7.

1. HeLa Cell Line

Kultur sel HeLa atau HeLa *cell line* merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan

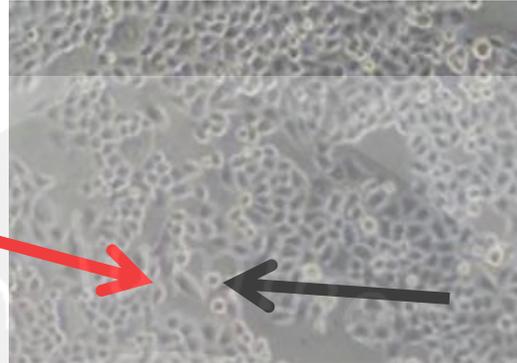
digunakan sebagai model sel kanker untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (LabWork, 2000). Morfologi sel HeLa dapat dilihat pada Gambar 5 berikut:



Gambar 5. Morfologi sel HeLa (Sumber: Djajanegara dan Prio, 2009)
Keterangan: (a) menunjukkan sel HeLa mati yaitu berbentuk pipih, berwarna gelap dan melayang pada petri ; (b) menunjukkan sel HeLa hidup yaitu berbentuk bulat, berwarna terang, tampak jernih dan melekat di dasar petri (Djajanegara dan Prio, 2009)

2. MCF-7 Cell Line

Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten terhadap senyawa kemoterapi (Mechetner dkk., 1998; Aouali dkk., 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt dkk., 2000) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki dkk., 2003; Prunet dkk., 2005). Sel MCF-7 tergolong *cell line* adheren yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α), resisten terhadap doxorubicin (Zampieri dkk., 2002), dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki dkk., 2003; Prunet dkk., 2005).



Gambar 6. Morfologi sel MCF-7 (Dokumentasi Pribadi, 2016).
 Keterangan: Panah hitam menunjukkan sel hidup (memiliki bentuk yang panjang dan juga melekat didasar petri), dan panah merah menunjukkan sel mati (berbentuk bulat, kecil dan melayang pada petri) (Sumber: Utami dkk., 2015).

H. Pengobatan Kanker

Umumnya, pengobatan kanker dilakukan dengan cara radiasi, pembedahan, dan yang paling populer ialah kemoterapi. Radiasi merupakan pengobatan kanker menggunakan prinsip penyinaran yang menyebabkan kematian pada sel kanker. Namun, terdapat efek samping yang dihasilkan seperti neuro toksisitas pada anak, tetapi dampak positif yang dihasilkan ialah pasien segera pulih daripada tindakan pembedahan. Sedangkan pembedahan berfungsi untuk mengangkat sel tumor, namun terdapat kerugian dari pengobatan ini seperti rusaknya jaringan pada suatu organ tertentu yang kondisinya ialah jaringan sehat (Kintizios dan Barberaki, 2003).

Kemoterapi merupakan cara pengobatan tumor dengan memberikan obat pembasmi sel kanker, dengan cara diminum maupun diinfuskan ke pembuluh darah juga dapat dilakukan radiasi. Mekanismenya ialah obat kemoterapi

menyebar ke seluruh jaringan tubuh dan membasmi sel-sel kanker yang ada. Karena penyebaran obat kemoterapi luas, maka daya bunuhnya luas, efek sampingnya pun biasanya lebih berat karena sel normal pun dapat terbunuh (Henry, 2007).

Jenis-jenis obat yang umum dipakai untuk kemoterapi antara lain inhibitor enzim topoisomerase yang dapat menghambat replikasi DNA dalam pembelahan sel. Anti metabolit yang berfungsi sebagai analog non-fungsional metabolit penting dalam sel. Alkaloid tanaman dengan menghalangi depolimerisasi mikrotubulus. Antibiotik yang dapat memblok replikasi DNA serta sintesis anthracyclin yang merupakan bagian dari antibiotik yang memiliki efek samping terhadap jantung dan sumsum tulang yang besar. Ikatan alkilasi senyawa kimia dengan DNA melalui gugus alkil yang dapat mengganggu struktur serta fungsi gen. Enzim proteolitik dan fibrinolitik, misalnya inhibitor enzim tirosinase. Immunomodulator yang berfungsi sebagai penghambat proliferasi tumor melalui stimulasi sistem imun. Hormon yang merupakan zat campuran dengan senyawa kemoterapi lain yang digunakan untuk mengatur regulasi sistem endokrin (Kintziot dan Barberaki, 2003)

Senyawa kemoterapi yang telah dikomersialkan untuk pengobatan kanker serviks yaitu cisplatin (Jamieson dan Lippard, 1999). Cisplatin menjadi *first line drug* untuk kemoterapi kanker. Senyawa ini pertama kali ditemukan oleh M. Peyrone yang berasal dari garam Peyrone dan strukturnya ditentukan kemudian oleh Alfred Werner (Ishida dkk., 2002). Penggunaan cisplatin sebagai

senyawa antikanker dianggap efektif, namun menimbulkan beberapa efek samping seperti mual, muntah, bahkan hingga anemia (Wiltshaw, 1979) serta efek serius seperti myelotoxicity (Rabik dan Dolan, 2007), kerusakan sistem saraf tepi, nefrotoksisitas (Safirstein dkk., 1987), kerusakan saraf pada pendengaran (Ravi dkk., 1995), menimbulkan resisten selular (Albert, 1991), kerontokan rambut (alopecia), dan penurunan kekebalan tubuh.

Doxorubisin merupakan obat dari golongan anthracycline dan telah digunakan selama 2 dekade untuk kemoterapi kuratif (Carlson, 2008). Doxorubisin adalah antibiotik anthracycline yang mempunyai cincin tetrasiklin yang berikatan dengan daunorubicin melalui ikatan glikosidik (Kwan, 2008). Doxorubisin merupakan suatu golongan antibiotik antrasiklin yang banyak digunakan sebagai senyawa kemoterapi beberapa jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs dkk., 2002).

Sekitar tahun 1960, obat ini diisolasi dari *Streptomyces peucetius* var *caesius* (Minotti dkk., 2004). Doxorubisin dapat menyebabkan kardiotoxicitas pada penggunaan jangka panjang, hal itu menyebabkan penggunaannya secara klinis dibatasi. Efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya cardiomyopathy dan *congestive heart failure* (Han dkk., 2008). Pada umumnya konsumsi doxorubisin dikombinasikan dengan senyawa antikanker lainnya seperti siklofosamid, cisplatin dan 5-FU karena dapat mengurangi efek samping (Bruton dkk., 2005)

I. Apoptosis pada sel HeLa dan MCF-7

Pembahasan mengenai antikanker erat hubungannya dengan homeostasis pembelahan sel dan apoptosis kematian sel. Kanker terbentuk jika sel terus-menerus membelah namun tidak diimbangi dengan mekanisme apoptosis (Li dkk., 2007). Apoptosis ialah program bunuh diri sel. Sel-sel yang mengalami apoptosis akan mengalami pengerutan, rusaknya membran plasma, hingga terjadi proses kondensasi kromatin. Jika program apoptosis suatu sel telah selesai, maka yang tertinggal hanyalah kepingan sel yang mati yang kemudian akan dikenali oleh sel-sel makrofag lalu di fagositosis (*engul-fed*) (Ricci dan Zong, 2006).

Pengobatan kanker dengan cara kemoterapi bertujuan untuk menginduksi proses apoptosis terhadap sel kanker, dikarenakan pentingnya keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan yang hidup sangat penting bagi organisme multiseluler (Broker dkk., 2005). Tapi, proses kematian sel yang terjadi terus menerus juga dapat menimbulkan bahaya terhadap kesehatan (Hanahan dan Weinberg, 2011), seperti dapat menimbulkan malfungsi kesehatan, diantaranya penyakit saraf, penyakit degeneratif, gangguan embriogenesis, serta kanker. Oleh sebab itu keseimbangan dari kematian dan pertumbuhan sel secara terprogram sangat diperlukan (Broker dkk., 2005).

Meiyanto dkk. (2005), mengungkapkan proses apoptosis yang terjadi pada sel HeLa terlihat dari adanya fragmentasi pada DNA serta kondensasi kromatin yang kemudian sel-sel tersebut akan terlihat sebagai badan-badan

apoptosis yang berwarna oranye. Sedangkan proses apoptosis pada sel MCF-7 menurut Simstein dkk. (2003), menyatakan bahwa mekanisme apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 ialah melalui penghambatan ekspresi protein Bcl-2 serta peningkatan ekspresi p53. Bcl-2 merupakan salah satu jenis protein antiapoptosis yang jika ekspresi Bcl-2 ini dapat dihambat, maka proses apoptosis dapat terjadi.

Faktor transkripsi yang mempengaruhi Bcl-2 adalah NFkB dari downstream P13K/Akt. Jika ekspresi Bcl-2 telah terhambat maka tahap selanjutnya adalah proses induksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria lalu menginduksi jalur caspase. Menurut Liang dkk. (2001), dikarenakan sel kanker payudara MCF-7 mengalami delesi gen CASP-3, maka dimungkinkan proses apoptosis akan terjadi melalui sekuen caspase 6,7 dan 9.

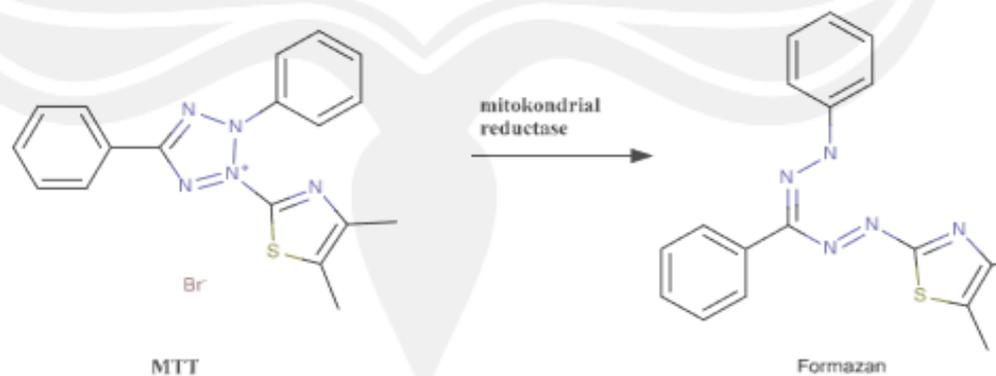
J. Uji Sitotoksitas

Potensi antikanker pada suatu bahan alam dapat diketahui dengan suatu rangkaian uji, diantaranya ialah uji sitotoksik. Uji ini ialah uji pendahuluan untuk mengetahui seberapa besar sifat toksik pada suatu sel. Uji sitotoksitas merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui sifat toksik dari suatu ekstrak pada sel kanker (Setyawati, 2013). Pada penelitian kali ini uji aktivitas antikanker dilakukan pada kultur sel HeLa dan MCF-7.

Penelitian ini dilakukan uji MTT yang bertujuan untuk menguji sifat toksitas senyawa uji dengan cara pemendaran cahaya. MTT (3-(4,5-

dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) merupakan garam tetrazolium yang direduksi menjadi produk formazan dengan mereduksi enzim pada sel yang aktif saja secara metabolik (Jabbar dkk., 1989). Mekanisme kerjanya ialah MTT diabsorpsi oleh sel hidup kemudian direduksi oleh enzim reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang berupa zat berwarna ungu yang tidak larut dalam air tetapi dapat larut dalam SDS 10% (Doyle dan Griffiths, 2000).

Sel yang hidup dapat mereduksi MTT, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT. Reaksi MTT dengan enzim mitokondria reduktase yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) (Maulana dkk., 2010). Kemudian formazan terlarut diukur serapannya dengan alat ELISA *reader*. Serapan yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah sel hidup (Doyle dan Griffiths, 2000).

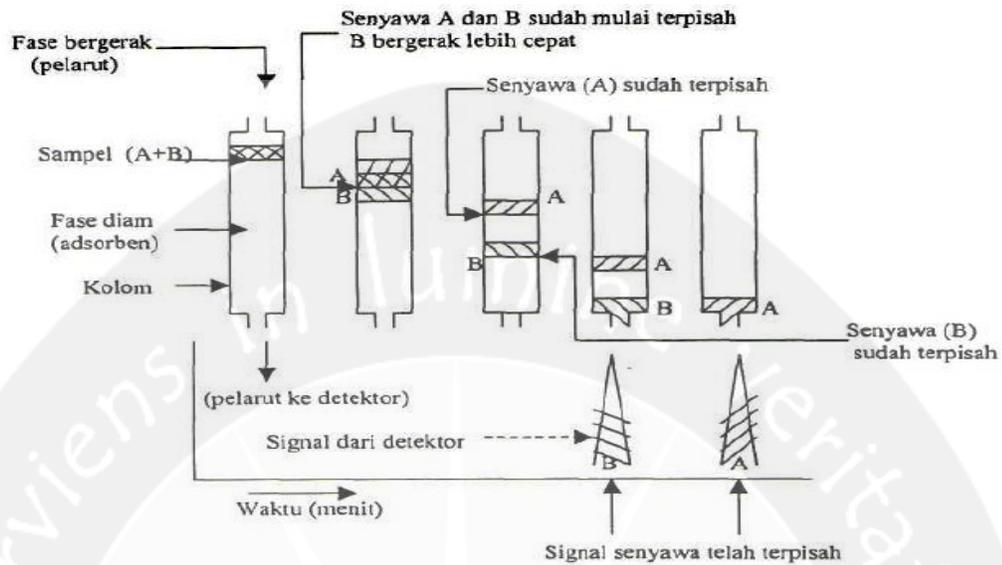


Gambar 7. Pembentukan Kristal Formazan (Sumber: Fajarwati, 2014)
Keterangan: Reaksi MTT menjadi kristal formazan yang diinduksi dengan enzim mitokondrial reduktase oleh sel hidup

K. Uji Kuantitatif Menggunakan Alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Senyawa aktif yang terdapat pada suatu bahan alam dapat diketahui melalui cara kualitatif dengan cara mengetahui jenisnya dan kuantitatif dengan cara mengetahui jumlah kadarnya (Murningsih dan Chairul, 2007). Uji kualitatif bahan alam misalnya dapat diketahui dengan uji fitokimia (Katzung, 2006) sedangkan uji kuantitatif dapat dilakuakn denagn beberapa instrumen diantaranya ialah spektrofotometer, kromatofrafi lapis tipis, kromatografi gel dan HPLC. HPLC dapat digunakan untuk uji kualitatif dan kuantitatif. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau yang diterjemahkan kedalam bahasa Indonesia menjadi kromatografi cair kinerja tinggi ialah teknik pemisahan senyawa dari bahan alam menggunakan teknik kromatografi (Murningsih dan Chairul, 2007).

HPLC menggunakan tenik kromatografi sistem cair padat. Terdapat fasa diam (padatan) yakni berupa adsorban pada kolom analitik dan fasa gerak (berupa cairan). Beradsarkan kelengkapan alatanya, HPLC dibagi menjdi dua jenis yaitu sistem gradien (berubah-ubah per satuan waktu) dan isokratik (berkelanjutan) (Murningsih dan Chairul, 2007). Bagian-bagian dari HPLC dapat digambarkan sebagai berikut (Gambar 8) (Willard, 1988) :



Gambar 8. Bagian-bagian HPLC (Murningsih dan Chairul, 2000)

Berikut adalah penjelasan mengenai bagian-bagian HPLC:

1. Pompa

Pompa diperlukan untuk memompakan seluruh pelarut yang berasal dari reservoir ke kolom dengan tekanan kurang lebih 1500 psi untuk yang terendah, dan tertinggi 6000 psi sesuai dengan besar aliran kurang lebih 0,5-2 ml/min. Pompa memiliki cara kerja yang bersifat akan memompakan pelarut hingga terus menerus namun dengan kecepatan aliran yang stabil sembari mentransferkan sampel yang berasal dari injektor kemudian melewati kolom analitik kemudian ke detektor hingga akhirnya ke kolom pembuangan.

Sistem isokratik pada perangkat HPLC membutuhkan pompa sebanyak 1 buah dan 2 pompa jika menggunakan sistem gradien. Sistem

isokratik dapat dioperasikan dengan sistem gradien jika dilengkapi dengan alat "*solvent inject valve*". Alat-alat yang terdapat disini ialah terdiri dari pipa-pipa yang menghubungkan reservoir-reservoir yang telah terisi pelarut berbeda dengan reservoir campuran. Masing-masing pelarut dapat dialirkan melalui pipa-pipa, lalu dilanjutkan dengan satu pompa dan dipompakan kedalam kolom analitik (Willard, 1988).

2. **Microprosesor control**

Microprosesor control ialah salah satu bagian dari mikro komputer yang merupakan bagian yang penting untuk mengatur serta membuat kecepatan aliran pelarut yang telah terprogram sehingga aliran pelarut yang memiliki kecepatan (*flow rate*), tekanan, komposisi perbandingan, suhu injektor dan jumlah sampel dapat diatur sesuai keinginan namun menggunakan "*automatic injection*", apabila menggunakan sistem HPLC yang digunakan ialah sistem gradien (Willard, 1988).

3. **Kolom**

Bahan kolom HPLC ialah kaca, logam stainless dan logam, hal ini yang membuat kolom mampu menahan tekanan tinggi (680 atm) lalu tidak bereaksi dengan fase gerak. Kolom yang didalamnya terdapat fase diam harus selalu memiliki ukuran yang sama pada diameter. Peletakkan kolom yang berbentuk tabung harus lurus diletakkan pada posisi vertikal dan dilengkapi dengan fitting dan konektor yang didesain supaya tidak memberikan ruang hampa yang terdapat pada ujung kolom.

Kolom merupakan komponen penting yang ada pada HPLC, hal ini disebabkan karena berhasilnya analisa baik kualitatif maupun kuantitatif tergantung dari jenis kolom yang tepat, karena pada kolom terjadi proses pemisahan dengan cara sampel ditahan dengan selektif oleh fase diam lalu terlarut oleh fasa gerak yang membawa menuju ke detektor melalui kolom. Jenis kolom ini dibedakan berdasarkan merk dan tipe adsorbannya (Willard, 1988)

4. Injektor

Injektor merupakan bagian alat dari HPLC yang berfungsi untuk memudahkan sampel masuk ke dalam kolom yang dapat dilakukan baik secara otomatis maupun manual. Apabila HPLC memiliki kelengkapan seperti *automatic sample injector* maka sampel yang dimasukkan dapat dilakukan secara otomatis melalui cara memprogram pada bagian *microprosesor control* , dengan hal ini maka dapat dilakukan penjumlahan sampel (μL) dan penjumlahan macam sampel. Kemampuan Injektor harus dapat bekerja dalam tekanan 470 atm dengan error kurang dari 0,2 % lalu dapat ditempatkan dalam suatu oven dengan tujuan agar suhu injektor dapat dikontrol. Suhu yang biasa digunakan pada sistem ini ialah kurang dari 150°C (Willard, 1988).

5. Detektor

Detektor merupakan salah satu komponen yang ada dalam HPLC untuk mendeteksi komponen senyawa kimiaterpisah setelah melewati kolom.

Sulit untuk menentukan detektor yang sensitif untuk HPLC, sehingga perlu dilakukan pemilihan detektor yang sesuai. Dalam melakukan analisis atau pemisahan diperlukan lebih dari satu detektor yang digunakan secara seri (Willard, 1988).

6. Data processor

Data processor pada HPLC merupakan alat yang berfungsi untuk mencatat sinyal yang muncul pada detektor untuk selanjutnya diubah kedalam bentuk kurva (kromatogram). Pulsa listrik yang diterima data processing akan mempengaruhi tinggi rendahnya kurva. Informasi yang ditampilkan dari hasil processing data diantaranya waktu retensi, presentase (%), area puncak hingga jumlah total dari setiap kurva yang dihasilkan (Willard, 1988)

L. Parameter Aktivitas Antikanker

Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dalam menghambat pertumbuhan sel ialah nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} (*inhibitory concentration fifty*), ialah konsentrasi zat uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 50% (Wahyuningsih dkk., 2005). IC_{50} dihitung berdasarkan % sel yang hidup dengan perhitungan regresi linier antara log konsentrasi dengan % sel hidup yang menghasilkan persamaan $y = bX + a$. Nilai IC_{50} didapat dengan mensubstitusi nilai 50 pada variabel y. Sehingga diperoleh hasil pada variabel x, lalu nilai IC_{50} merupakan hasil dari antilog x yang dinyatakan dalam presentase (%) penghambatan berdasarkan rumus (Fajarwati, 2014) :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(\text{rerata sel dalam kontrol} - (\text{rerata sel dalam sampel uji}))}{(\text{rerata sel dalam kontrol})}$$

Nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ dari suatu ekstrak bahan alam dapat dikatakan memiliki potensi antiproliferasi, sedangkan batas ambang yang ditetapkan untuk bahan alam yang dapat dikembangkan sebagai antikanker yaitu $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ (Kamubhawa dkk., 2000). Ekstrak dikatakan tidak aktif sebagai antikanker jika nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$. IC_{50} yang kurang aktif diduga karena ekstrak yang menggunakan pelarut yang mampu menarik zat bersifat polar dan juga nonpolar kemungkinan menghasilkan efek antagonis atau sinergis (Machana dkk, 2011).

M. Hipotesis

1. Pada konsentrasi 90% ekstrak etanol daun tapak dara bersifat sitotoksik kuat terhadap sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker payudara (MCF-7) daripada konsentrasi pelarut etanol yang lain (70 dan 80%).
2. Nilai IC_{50} pada konsentrasi 90% ekstrak etanol daun tapak dara lebih rendah daripada konsentrasi pelarut etanol yang lain (70 dan 80%).