

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Pinang (*Arecha catechu* L.)



Gambar 1. Tanaman pinang

1. Klasifikasi Tumbuhan

Menurut (Hapsoh dan Rahmawati 2008), kedudukan tanaman pinang dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub-divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Arecales
Keluarga	: Arecaceae (Palmae)
Genus	: <i>Areca</i>
Spesies	: <i>Areca catechu</i>
Nama Binomial	: <i>Areca catechu</i> Linn.

2. Nama Daerah

Pinang memiliki nama daerah seperti pineng, pineung (Aceh), pinang (Gayo), batang mayang (Karo), pining (Toba), batang pinang (Minangkabau), dan jambe (Sunda, Jawa) (Depkes RI 1989).

3. Morfologi Pinang

Areca catechu L. (pinang) merupakan tanaman famili Arecaceae yang dapat mencapai tinggi 15-20 m dengan batang tegak lurus bergaris tengah 15 cm.

Buahnya berkecambah setelah 1,5 bulan dan 4 bulan kemudian mempunyai jambul daun-daun kecil yang belum terbuka. Pembentukan batang baru terjadi setelah 2 tahun dan berbuah pada umur 5-8 tahun tergantung keadaan tanah. Tanaman ini berbunga pada awal dan akhir musim hujan dan memiliki masa hidup 25-30 tahun. Biji buah berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk dengan warna yang lebih muda. Pada bidang irisan biji tampak perisperm berwarna coklat tua dengan lipatan tidak beraturan menembus endosperm yang berwarna agak keputihan (Depkes RI 1989). Daun memiliki panjang sekitar 1,5 hingga 2 m, daunnya tunggal menyirip bertoreh sangat dalam tumbuh berkumpul di ujung batang membentuk roset batang (Jaiswal *et al.* 2011).

4. Kandungan Kimia Biji Buah Pinang

Komponen utama pada biji buah pinang yaitu karbohidrat, lemak, serat, polifenol (flavonoid dan tanin) serta alkaloid dan mineral (IARC 2004). Biji buah pinang mengandung alkaloid, seperti arekolin ($C_8 H_{13} NO_2$), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine, tanin terkondensasi, tannin terhidrolisis, flavan, senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin, minyak menguap dan tidak menguap, serta garam (Wang dan Lee 1996). Tanaman pinang juga mengandung *red* tanin 15%, lemak 14% (palmitat, oleat, stearat, caproat, caprilat, laurat, sam miristat), kanji dan resin (BPOM RI 2010).

5. Kegunaan Tanaman

Biji buah pinang memiliki efek antelmintik (obat cacing), peluruh kentut (*antiflatulent*), peluruh haid, peluruh kencing (diuretik), peluruh dahak, memperbaiki pencernaan, pengelat (adstringen), pencahar (laksan). Daun sebagai penambah nafsu makan. Sabut melancarkan sirkulasi tenaga, peluruh kencing, dan pencahar. Ekstrak pinang menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap esterase kolesterol pankreas (pCEase) secara *in vitro* (BPOM RI 2010). Buah pinang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan tanin yang memiliki efek sebagai antikanker, antitumor, antibakteri, dan antifertilisasi (Filbert *et al.* 2014). Senyawa flavonoid pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis (Meiyanto *et al.* 2008). Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik ampuh

menghambat pertumbuhan sel kanker (Agoes 2010). Biji buah pinang mengandung proantosianidin sebagai antiproliferatif pada sel kanker, yaitu suatu tanin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid (Nonaka 1989).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C (BPOM 2014). Simplisia dapat berupa simplisia nabati, hewani, dan pelikan atau mineral. Simplisia nabati dapat berupa tanaman utuh, bagian dari tanaman (akar, batang, daun, dan sebagainya), atau eksudat tanaman, yaitu isi sel yang secara spontan dikeluarkan dari tanaman atau dari sel atau zat-zat lain dengan cara tertentu dipisahkan dari tanaman. Simplisia hewani, yaitu simplisia yang dapat berupa hewan utuh, bagian dari hewan atau zat berguna yang dihasilkan hewan, tetapi bukan berupa zat kimia murni. Sementara itu, simplisia pelikan atau mineral yaitu simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral belum diolah atau telah diolah secara sederhana, akan tetapi belum/bukan berupa zat kimia murni. Beberapa faktor akan mempengaruhi kualitas atau spesifikasi simplisia, seperti bahan dasar simplisia, cara penanganan atau penyimpanannya, proses pembuatan atau pengolahan, dan cara pengemasan dan penyimpanan simplisia (Agoes 2009).

2. Tahapan pembuatan simplisia

Umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan berikut (Agoes 2009):

2.1 Pengumpulan bahan baku. Simplisia yang digunakan adalah simplisia nabati dimana bagian yang digunakan adalah bagian biji buah dari tanaman pinang (*Areca catechu* L.). Biji buah yang diambil adalah buah yang telah tua. Pemanenan dilakukan sebelum buah pecah secara alami dan biji terlempar jauh.

2.2 Sortasi basah. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikrobiologi.

2.3 Pencucian. Pencucian dilakukan dengan air bersih (sumur, PAM, atau air). Simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air mengalir, dicuci dalam waktu sesingkat mungkin. Dalam satu kali pencucian sayur mayur, akan dapat menghilangkan lebih kurang 25% jumlah mikroba awal, 3 kali pencucian, jumlah mikroba tertinggal 47% dari jumlah mikroba awal. Jadi, penting sekali diperhatikan kualitas air pencucian yang digunakan. Bakteri yang umum terdapat dalam air adalah *Pseudomonas*, *Proteus*, *Mikrococcus*, *Basillus*, *Streptococcus*, *Entero bacter*, dan *Escherichia* pada simplisia akar, batang atau buah. Untuk mengurangi jumlah mikroba awal dapat dilakukan pengupasan kulit luar.

2.4 Perajangan. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Tanaman yang baru dipanen, sebelum dirajang, terlebih dahulu dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau atau mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran tertentu.

2.5 Pengeringan. Pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan untuk jangka waktu lebih lama. Dengan penurunan kadar air, dapat menghentikan reaksi enzimatik sehingga dapat dicegah terjadinya penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Suhu pengeringan bergantung pada simplisia dan cara pengeringan. Pengeringan dapat dilakukan antara suhu 30°C-90°C (terbaik 60°C). Jika simplisia mengandung bahan aktif tidak tahan panas atau mudah menguap, pengeringan dilakukan pada suhu serendah mungkin, misalnya 30°C-45°C atau pengeringan vakum.

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (BPOM 2014). Ada beberapa jenis ekstrak yakni ekstrak cair, kental, dan kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5-30%. Ekstrak kering jika mengandung kadar air kurang dari 5% (Voigt 1994).

2. Metode ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang terdapat dalam suatu bahan yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Putri 2014). Prinsip ekstraksi yaitu perendaman simplisia dengan pelarut yang sesuai sehingga pelarut kontak dengan sel, pelarut berdifusi ke dalam sel melarutkan metabolit dan membawa metabolit keluar sampai diperoleh kesetimbangan metabolit di luar dan dalam sel.

Metode ekstraksi ada beberapa macam, antara lain maserasi, remaserasi, perkolasi, soxhletasi, refluks dan digesti.

2.1. Remaserasi. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode remaserasi yang disesuaikan dengan sifat fisika dan kimia dari senyawa yang akan di ekstraksi yaitu flavonoid. Senyawa Flavonoid adalah golongan senyawa yang tidak tahan panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi (Rompas 2012). Metode remaserasi dapat menghasilkan ekstrak dengan flavor yang baik karena dilakukan tanpa pemanasan sehingga mengurangi kerusakan komponen aromatik (Lulail 2009).

Remaserasi berarti dilakukan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Putri 2014). Prosedur ekstraksi dengan remaserasi diawali dengan proses maserasi terlebih dahulu. Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam bahan dalam pelarut selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Keuntungan dari metode ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana (Irawan 2010). Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel maka larutan terpekat didesak keluar. Proses ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan diluar sel. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, metanol, etanol-air atau pelarut lainnya. Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang, upaya pengocokan ini dapat menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi

yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Voight 1994).

D. Kanker

1. Definisi kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel-sel menjadi tidak normal sehingga sel menjadi kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya secara cepat dan tidak terkendali (Mangan 2009). Pembelahan sel yang berlebih pada penyakit kanker terjadi akibat kegagalan pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler (Hanahan dan Weinberg 2010). Kegagalan pengaturan multiplikasi muncul karena adanya mutasi DNA pada sel akibat paparan karsinogen, yaitu senyawa atau radiasi yang mampu menginisiasi timbulnya kanker (Ruddon 2007).

Abnormalitas sel terutama terjadi pada 2 kelas gen pengatur, yakni gen penekan tumor yang menjadi tidak aktif dan onkogen yang menjadi aktif (Hanahan dan Weinberg 2010). Ada tiga kelompok utama gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel, yaitu proto-onkogen yang menstimulasi dan meregulasi pertumbuhan dan pembelahan sel, gen penekan tumor (*tumor suppressor gene* = *TSG*) yang disebut antionkogen karena menghambat pertumbuhan sel dengan menginduksi apoptosis, dan gen gatekeeper yang mempertahankan integritas gen dengan mendeteksi lalu memperbaiki kesalahan pada gen (Silalahi 2006). Mutasi DNA di dalam gen pengatur siklus sel akan menyebabkan penyimpangan siklus sel yang mengakibatkan pembentukan kanker atau karsinogenesis. Akumulasi DNA termutasi dalam gen terutama yang mengatur siklus dan pertumbuhan sel mengakibatkan terjadinya kanker (Silalahi 2006).

2. Sifat sel kanker

2.1. Mampu mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri. Sel normal untuk terstimulasi aktif memerlukan sinyal mitogenik dari luar sebelum mereka berubah dari fase istirahat menuju fase proliferasi yang aktif. Sedangkan sel kanker mampu menghasilkan beberapa sinyal pertumbuhan sendiri sehingga mengurangi ketergantungan pada stimulasi jaringan normal sekitarnya. Kemampuan ini

diperoleh dengan memodulasi sinyal pertumbuhan ekstraseluler, proses sinyal transduksi atau pada proses penerjemahan sinyal menjadi aksi dari sirkuit intraseluler. Sel kanker mempunyai kemampuan untuk mensintesis faktor pertumbuhan dan mempunyai kemampuan pada pembalikan sinyal yang dinamakan *autocrime*. Hilangnya ketergantungan sinyal secara eksogen ini merusak mekanisme homeostasis, yang secara normal berfungsi menjaga keseimbangan bermacam-macam sel dalam jaringan (Hanahan dan Weinberg 2010).

2.2. Tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferatif. Sinyal antiproliferasi sel normal, bekerja untuk menjaga keteraturan sel dan homeostatis jaringan. Sinyal antiproliferasi dapat memblokir proliferasi melalui dua mekanisme yang berbeda, yaitu sel dipaksa keluar dari fase proliferasi yang aktif menuju fase istirahat G0 atau sel diinduksi untuk melepaskan potensi proliferasi secara permanen melalui induksi untuk memasuki fase postmitotik. Sel kanker mampu menghindari dari sinyal antiproliferasi yang berhubungan dengan daur sel secara spesifik dengan kemampuannya mengatur fase G1 misalnya melalui rusaknya gen Rb (Hanahan dan Weinberg 2010).

2.3. Kehilangan kemampuan apoptosis. Apoptosis memiliki peranan penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel. Peran penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya dapat menyebabkan kanker. Bila program apoptosis telah selesai, maka sel akan menjadi kepingan sel mati yang disebut benda-benda apoptosis, dan selanjutnya dimakan oleh makrofag. Sel yang mengalami apoptosis dimulai dari adanya kerusakan DNA, sehingga P53 (tumor supresor protein) akan mengupregulasi ekspresi dari protein proapoptosis (Bax dan NOXCA) yang akan memerintahkan mitokondria untuk mengeluarkan cytochrom c, kemudian akan mengkatalisis terjadinya apoptosis. Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang karena mutasi pada gen p53 (Hanahan dan Weinberg 2010).

2.4. Kemampuan replikasi yang tidak terbatas (*immortal*). Tiga kemampuan sel tersebut di atas menyebabkan hilangnya hubungan dengan sinyal pertumbuhan sel dalam lingkungan, sehingga sel kanker mampu tumbuh terus menerus tidak terbatas. Kemampuan ini berkaitan dengan upregulasi telomerase

yaitu enzim yang berperan dalam perpanjangan telomer (Hanahan dan Weinberg 2010) untuk menjaga integritas telomer pada kromosom. Telomer pada sel normal akan mengalami degradasi (pemotongan) pada saat sel mengalami replikasi, sehingga sebagian besar sel kanker yang ditumbuhkan dalam kultur tampak kehilangan hambatan kontak dan sel menjadi immortal.

2.5. Kemampuan membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis).

Sel selalu membutuhkan nutrisi dan oksigen yang berguna untuk perkembangannya. Nutrisi dan oksigen ini disuplai oleh pembuluh darah yang berguna untuk menjaga fungsi pertumbuhan sel. Sel kanker memiliki kemampuan angiogenesis yaitu proses pembentukan pembuluh darah baru. Sinyal inisiasi pada proses angiogenesis antara lain adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *Fibroblast growth factor* (FGF/2) (Hanahan dan Weinberg 2010).

2.6. Invasif dan metastasis. Selama masa perkembangannya, kebanyakan sel kanker mampu menghasilkan dan melepas sel kanker yang dapat berpindah, menginvasi jaringan di dekatnya, kompetitif membentuk klon dan tumbuh ditempat itu. Proses ini dinamakan metastasis. Metastasis merupakan penyebab 90% kematian karena kanker. Beberapa protein yang terlibat pada proses perlekatan sel dalam jaringan adalah *cell adhesion molecules* (CAM), diantaranya E-cadherin dan integrin yang menghubungkan sel dengan matriks ekstraseluler. Pada kanker kebanyakan CAM telah hilang, sehingga terjadi proses invasi dan metastasis (Hanahan dan Weinberg 2010).

3. Siklus sel kanker

Siklus sel adalah serangkaian proses atau fase hidup sel. Mulai dari membelah, tumbuh dan berkembang (membangkitkan). Siklus sel memiliki dua fase utama, yakni fase S (sintesis) dan fase M (mitosis). Fase S merupakan fase terjadinya duplikasi akurat sejumlah besar DNA di dalam kromosom, sedangkan pada fase M terjadi pemisahan 2 sel DNA kromosom tersebut menjadi 2 sel baru yang identik (Nurse 2000).

Sel kanker dapat berada dalam tiga keadaan yaitu sedang membelah (siklus proliferasi), dalam keadaan istirahat (tidak membelah), dan secara

permanen tidak membelah (Nafriadi dan Gan 2007). Regulasi sel kanker yang sedang membelah sama dengan siklus sel normal, terdapat dalam 4 fase yaitu:

3.1 Fase G₁ (*Growth phase-1/ Pasca Mitosis*). Fase ini dipersiapkan suatu interval dalam proses pembelahan sel dan dimulai dengan sintesis asam deoksiribonukleat (DNA) (Mulyadi 1997). Pada fase G₁, sel anak baru berupa untai tunggal DNA yang terbentuk setelah mitosis akan tumbuh menjadi sel dewasa membentuk protein, enzim, dan sebagainya. Sel yang berhenti tumbuh akan masuk ke fase G₀ (Sukardja 2000).

3.2 Fase S (*Synthetic phase/ Sintesis*). Pada fase ini dibentuk untai DNA yang baru melalui proses replikasi. Replikasi DNA terjadi dengan bantuan enzim DNA-polimerase, dengan dibentuknya DNA baru maka rantai tunggal DNA menjadi rantai ganda. Selama fase S juga berlangsung perbaikan DNA yang dapat mencegah berkembangnya generasi kanker. Fase ini kira-kira berlangsung selama 6-8 jam (Mulyadi 1997).

3.3 Fase G₂ (*Growth phase-2/ Pra Mitosis*). Fase G₂ terjadi proses pembentukan RNA, protein, enzim, dan sebagainya untuk persiapan fase M. Sel yang telah masuk dalam fase pra mitosis ini memiliki ciri sel berbentuk tetraploid, mengandung dua kali lebih banyak DNA (Nafriadi dan Gan 2007).

3.4 Fase M (*Mitotic phase/ Mitosis*). Proses mitosis ini terjadi pengurangan sintesis protein dan RNA secara tiba-tiba, berlangsung pemisahan sel menjadi dua sel anakan dengan sifat dan karakteristik yang sama dengan induknya (Nafriadi dan Gan 2007). Proses ini dapat dibagi menjadi 4 subfase, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Fase ini berlangsung sekitar 30-60 menit (Mulyadi 1997).

4. Pengobatan kanker

4.1. Kemoterapi. Kemoterapi merupakan salah satu pengobatan yang bertujuan mematikan ataupun memperlambat pertumbuhan sel kanker. Kemoterapi menimbulkan efek samping umum seperti anemia, anoreksia, ansietas, perdarahan, demam, infeksi, insomnia, nyeri, alopesia (rambut rontok) dan *herpez zoster*. Obat kemoterapi seringkali dikombinasi dengan obat-obat lain dengan maksud untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan (Indrawati

2009). Beberapa pengobatan kemoterapi yang paling umum digunakan yaitu senyawa golongan antimetabolit seperti metotreksat yang bekerja dengan menghambat reduksi dari asam folat menjadi THFA (*Tetrahydro Folic Acid*) dengan efek samping utama penekanan sumsum tulang belakang. Golongan lain seperti antibiotika (sitotoksik) seperti doksorubisin bekerja dengan menghambat sintesis DNA dan RNA ini memiliki efek samping dapat merusak otot jantung dengan gagal jantung (Tjay & Rahardja 2006).

4.2. Radioterapi. Efek samping radioterapi berkaitan dengan beberapa hal: dosis total (*centingray*), lama pemberian fraksi dari dosis tersebut yaitu dosis harian, luas atau volume bagian tubuh yang diterai dan bagian tubuh yang diradiasi. Sel-sel yang lewat pada daerah yang diradiasi mungkin dapat mengalami perubahan dan mempengaruhi fungsi di tempat lain, misalnya efek samping umum anoreksia, sariawan atau faringitis, nyeri, dan kulit menjadi terbakar. Efek samping merupakan hal paling umum yang terjadi pada pemberian radioterapi dan akan mereda dalam waktu 2 minggu penobatan (Indrawati 2009).

4.3. Pembendahan. Tindakan pembedahan dimaksudkan untuk mengurangi ukuran tumor, meredakan nyeri, dan mencegah metastasis jika dilakukan sejak dini (Indrawati 2009). Pembedahan juga digunakan untuk mengeksis bagian mayor dari tumor, yang mengurangi beban tumor dan meningkatkan respon terhadap kemoterapi atau radiasi (Corwin 2009).

4.4. Imunoterapi/bioterapi. Bekerja dengan mengaktifkan sistem imun untuk mengenali dan menghancurkan sel tumor secara spesifik, memblok enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk metastasis (Corwin 2009). Imunoterapi yang saat ini sedang dikembangkan meliputi: stimulan imun, antibodi berlabel fluoresen, antibodi penyerang dan terapi gen (Corwin 2009).

E. Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi melalui mekanisme genetik dengan kerusakan/fragmentasi kromosom atau DNA. Apoptosis dibedakan menjadi dua kelompok yaitu apoptosis fisiologis dan apoptosis patologis (Sudiana 2011).

Apoptosis fisiologis adalah kematian sel yang diprogram (programmed cell death). Proses kematian sel erat kaitannya dengan enzim telomerase. Pada sel embrional, enzim ini mengalami aktivasi sedangkan pada sel somatik enzim ini tidak mengalami aktivasi, kecuali sel bersangkutan mengalami transformasi menjadi ganas. Telomer yang terletak pada ujung kromosom merupakan faktor yang sangat penting dalam melindungi kromosom. Pada sel normal, telomer akan memendek pada saat pembelahan diri. Apabila ukuran telomer mencapai ukuran tertentu (level kritis) akibat pembelahan berulang, maka sel tersebut tidak dapat melakukan pembelahan diri lagi. Selanjutnya sel akan mengalami apoptosis secara fisiologis. Pada sel ganas, pemendekan telomerase sampai pada level kritis tidak terjadi karena pada sel ganas terjadi aktivasi dari enzim ribonukleotida (telomerase) secara terus menerus. Enzim ini berperan pada sintesis telomer DNA, sehingga berbagai elemen yang dibutuhkan pada pembentukan telomer dapat dibentuk secara terus menerus dan ukuran telomer pada ujung kromosom dapat dipertahankan. Oleh karena itu, sel ganas dapat bersifat *immortal* (Sudiana 2011).

Apoptosis patologis adalah kematian sel karena adanya suatu rangsangan. Proses ini dapat melalui beberapa jalur, yaitu aktivasi *p53*, jalur sitotoksik, disfungsi mitokondria, dan kompleks fas dan ligan. Apoptosis dipicu oleh aktivitas *p53* karena sel memiliki gen cacat yang dipicu oleh banyak faktor, antara lain bahan kimia, radikal bebas, maupun virus (*oncovirus*). Gen yang cacat dapat memicu aktivitas beberapa enzim seperti PKC dan CPK-K2 yang dapat memicu aktivitas *p53*. *P53* adalah faktor transkripsi terhadap pembentukan *p21*. Peningkatan *p21* akan menekan semua CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) dengan *cyclin*, dimana siklus pembelahan sel sangat tergantung pada ikatan kompleks antara CDK dengan *cyclin* (Sudiana 2011).

F. Kanker Hati

Kanker merupakan salah satu penyakit yang paling mengancam dalam dunia kesehatan. WHO dalam siaran persnya 3 April 2003 menyatakan bahwa lima besar kanker di dunia adalah kanker paru, kanker payudara, kanker usus besar (colorectal), kanker lambung dan kanker hepar. Pada bulan Nopember 2004

dilaporkan kanker hepar merupakan kanker dengan pertumbuhan tercepat diantara jenis kanker lain di Amerika Serikat (Kerr 2004). Insidensi kanker hepar di Asia Selatan, Asia Tenggara, China, dan daerah Sub Sahara lebih tinggi dibandingkan kasus kanker hepar negara industri seperti Amerika (Anonim, 2004).

Sel-sel pada hati akan memperbanyak diri untuk menggantikan sel-sel yang rusak karena luka atau karena sudah tua. Seperti proses pembentukan sel lain di dalam tubuh, proses ini juga dikontrol oleh gen-gen tertentu dalam sel. Kanker hati berasal dari satu sel yang mengalami perubahan mekanisme kontrol dalam sel yang mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol. Sel abnormal tersebut akan membentuk jutaan kopi, yang disebut klon. Mereka tidak dapat melakukan fungsi normal sel hati dan terus menerus memperbanyak diri. Sel-sel tidak normal ini akan membentuk tumor (Anonim 2004).

Kanker hepar dapat bermula dari organ bagian hepar (hepatocellular cancer) atau juga berasal dari organ lain, misalnya dari kolon, yang menyebar ke hati (metastatic liver cancer). Kanker yang berasal dari organ hepar disebut kanker hepar dan merupakan jenis kanker kelima yang memiliki insidensi terbesar di dunia. Penyakit yang sering berhubungan dengan kanker hepar antara lain virus hepatitis dan sirosis hati (Bruix dan Sherman 2005). Tumor hati jinak (benign) yang sering ditemui adalah hemangiomas (kumpulan dari pembuluh darah abnormal yang membengkak) dan adenomas (kumpulan atau benjolan jaringan hati). Sedangkan kanker hati yang sering terjadi adalah hepatocellular carcinoma (HCC) (80% kasus) yang muncul dari sel hati itu sendiri dan dikenal sebagai hematoma. Cholangiocarcinoma (15% kasus) berasal dari kelenjar empedu di hati. Klatskin tumor merupakan cholangiocarcinoma yang terletak di perbatasan antara empedu dengan hati. Kanker hati yang jarang terjadi yakni angiocarcinoma (berasal dari pembuluh darah di hati), lymphomas (berasal dari sel imun di hati) dan carcinoids (berasal dari hormon yang dibuat oleh sel hati) (Anonim 2004).

Penyebab kanker hepar secara umum adalah infeksi virus hepatitis B dan C, cemaran aflatoxin B1, sirosis hati, infeksi parasit, alkohol serta faktor keturunan (Fong 2002). Infeksi virus hepatitis B dan C merupakan penyebab kanker hepar yang utama didunia, terutama pasien dengan antigenemia dan

mempunyai penyakit kronik hepatitis. Pasien laki-laki dengan umur lebih dari 50 tahun yang menderita penyakit hepatitis B dan C mempunyai kemungkinan besar terkena kanker hepar. Gejala kanker hepar awalnya tanpa keluhan atau hanya sedikit keluhan seperti lesu, nafsu makan berkurang dan penurunan berat badan. Kanker hepar dapat diketahui dengan diagnosa menggunakan radiologi, biopsi hepar, dan serologi (Bruix dan Sherman 2005).

G. Sel Vero

Sel vero merupakan sel epitel non kanker (sel normal). Sel ini berasal dari organ ginjal monyet hijau asal Afrika. Sel vero merupakan sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih, immortal, non tumorigenic fibroblastic cell. Sel ini melekat erat pada substrat yang berbahan polistirena dengan membentuk ikatan kovalen. Pengujian sel vero dilakukan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksisitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia. Sel vero memiliki jumlah interferon yang lebih sedikit dibandingkan dengan sel mamalia normal. Sel ini saat diinfeksi oleh virus, tidak lagi mensekresikan interferon tipe 1. Kekurangan interferon pada sel vero membuat sel ini sangat sensitif jika terinfeksi oleh berbagai jenis virus. Walaupun jumlah interferon sangat sedikit, sel ini masih memiliki reseptor interferon alfa dan beta sehingga masih mampu merespon secara normal ketika interferon dari sumber lain ditambahkan ke dalam kultur sel (Goncalves *et al.* 2006).

Sel vero dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 1640-serum. Didalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel dan mineral sebagai kofaktor enzim (Freshney 2000).

Sel vero umum digunakan dalam penelitian virologi, produksi vasin hingga penelitian efek zat kimia terhadap sel mamalia *in vitro*. Sel vero merupakan sel dengan morfologi epitelial dan bersifat *anchorage dependent*. Sifat

tersebut menyebabkan sel membutuhkan tempat pelekatan untuk hidup normal dan tidak tumbuh dalam suspensi sel. Sel vero didapatkan dari jaringan yang bersifat normal, sehingga sel masih memiliki sifat inhibisi kontak atau dapat berkembang secara terus menerus sehingga sel telah membentuk satu lapis (*monolayer*) dan memenuhi area kultur atau konfluen (Ammerman *et al.* 2008).

H. Sel HepG2

HepG2 merupakan *hepatoblastoma derived cell line* yang berasal dari jaringan hati laki-laki putih berusia 15 tahun dengan karsinoma hepatoseluler terdiferensiasi dengan baik. HepG2 banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti metabolisme hati, pengembangan, onkogenesis (chemocarcinogenesis dan mutagenesis) dan hepatotoksisitas. Profil genetik hispatologi menunjukkan beberapa HB yang paling khas adalah kelainan kromosom dan adanya β -catenin aktivasi jalur Wnt terkait mutasi. HepG2 ditunjukan untuk penelitian dalam mempelajari biologi dari neoplasma hepatoseluler, khususnya yang terlibat dalam klasifikasi berbasis biologi baru, stratifikasi klinis, dan intervensi terapeutik untuk pasien pediatrik dan dewasa (Eunsil 2009).

I. Doksorubisin

Doksorubisin diisolasi dari *Streptomyces peucetius* *var. Caesius* dan termasuk golongan antibiotik antrasiklin (Nafrialdi dan Gan 2007). Doksorubisin termasuk dalam kelompok antibiotik yang paling banyak digunakan untuk leukemia akut, limfoma dan beberapa jenis tumor solid. Kelompok obat antibiotik sitotoksik memiliki efek mirip dengan radioterapi sehingga tidak boleh digunakan bersamaan karena dapat meningkatkan toksisitas secara signifikan. Doksorubisin telah digunakan pada beberapa pengobatan jenis tumor seperti kanker payudara, esofagus, osteosarkoma, sarkoma jaringan lunak, limfoma hodgin dan non-hodgin baik dalam aplikasi tunggal maupun kombinasi dengan beberapa agen antitumor lainnya (Chen *et al.* 2006).

Aplikasi doksorubisin yang telah digunakan secara klinis untuk berbagai jenis tumor ini dibatasi oleh timbulnya efek samping. Efek samping yang timbul

segera setelah pengobatan dengan doksorubisin adalah mual, immunosupresi dan aritmia yang sifatnya reversibel serta dapat dikontrol dengan obat-obat lain. Efek samping yang paling serius akibat pengobatan dengan doksorubisin dengan jangka waktu yang lama adalah *cardiomyopathy* yang diikuti dengan gagal jantung (Tyagi *et al.* 2004). Berdasarkan hasil penelitian restrospektif diketahui bahwa toksisitas kardiak akibat pemberian doksorubisin merupakan efek samping yang bergantung pada dosis. Mekanisme yang memperantarai toksisitas kardiak tersebut diduga disebabkan oleh terbentuknya spesies oksigen reaktif, meningkatnya kadar anion superoksida dan pengurasan ATP yang kemudian menyebabkan perlukaan jaringan kardiak (Wattanapitayakul *et al.* 2005). Doksorubisin termasuk obat golongan antrasiklin yang merupakan substrat pgp dan selanjutnya segera dikeluarkan dari dalam sel sehingga menurunkan konsentrasi efek doksorubisin dalam sel kanker. Mekanisme pemompaan oleh pgp sangat tergantung pada aktivasi protein tersebut dan penekanan ekspresi pgp. Oleh karena itu, inaktivasi pgp dan penekanan ekspresinya mampu mengatasi permasalahan resistensi sel kanker terhadap doksorubisin (Zhou *et al.* 2006).

J. Uji Sitotoksik

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksitas adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*) assay. Uji sitotoksitas adalah uji *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida, dan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari senyawa (Burdall *et al.* 2003).

Sitotoksitas adalah sejauh mana agen memiliki tindakan destruktif spesifik pada sel-sel tertentu. Kerusakan sel yang disebabkan oleh xenobiotika pada umumnya mengakibatkan perubahan pada permeabilitas maupun integritas membran sel, akibatnya enzim sitolitik akan keluar ke dalam media. Adanya kebocoran enzim ini merupakan parameter utama dalam penentuan sitotoksitas suatu xenobiotika secara *in vitro*. Enzim ini sangat stabil sehingga dikembangkan metode untuk mengestimasi aktivitas seluler sel yang masih hidup. Sel yang

terkena pengaruh dari xenobiotika meskipun belum mati, akan menunjukkan aktivitas yang lebih rendah. *Biological endpoint parameters* yang dapat dipakai untuk mengetahui efek sitotoksitas selain viabilitas sel adalah dengan menggunakan evaluasi aktivitas sel, morfologi sel, adhesi sel, proliferasi sel, kerusakan membran sel maupun efek metabolik sel. 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 ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar nilai IC_{50} senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi berupa persen sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Meiyanto *et al.* 2003).

Suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas inhibisi apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$ (Mans *et al.* 2000). Rentang nilai IC_{50} bila $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ sangat efektif, $10\text{-}20 \mu\text{g/ml}$ aktif dan $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} $50\text{-}100 \mu\text{g/ml}$ tetap memiliki kompensasi kepada sel kanker (Freshney 2000).

K. Metode Pengujian Sitotoksik (MTT Assay)

MTT Assay adalah teknik yang sering dipakai pada umumnya, teknik ini menggunakan tetrazolium atau MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) yang berwarna kuning dimana akan dimetabolisme oleh enzim *suksinat dihidrogenase* yang terdapat pada mitokondria sel menjadi kristal *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 5 mg/ml dan disaring untuk menghilangkan residu yang tidak larut. MTT ditambahkan secara langsung pada plate yang berisi medium kultur sebanyak 10-100 μl dan diinkubasi selama kurang lebih 4 jam pada 37°C. Kristal fromazon yang berwarna ungu yang terbentuk akan terlarut dengan penambahan 100 μl isopropanolol asam (HCL 0,04 N dalam isopropanolol) atau SDS 10% dalam HCL 0,01 N. Fromazon berbentuk jarum dan

melekat pada sel hidup. Formazan yang terbentuk proposional dengan jumlah sel yang hidup (Mosmann 2000).

Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) berwarna biru (Doyle & Griffiths 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna biru atau ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann 2000).

Keuntungan metode ini yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, dapat digunakan untuk mengukur sample dalam jumlah banyak dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Freshney 2009). Kelemahan metode ini, yaitu tidak dapat menggambarkan morfologi sel, sehingga apabila terdapat kelainan morfologi akan tetap dihitung sebagai sel hidup, walaupun perubahan morfologi dari suatu sel dapat dikategorikan akibat dari toksisitas suatu bahan (Doyle & Griffiths 2000).

L. Uji Indeks Selektivitas

Uji pada penelitian ini digunakan sebagai indikasi selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel normal, yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal (Furqan 2014). Nilai indeks selektivitas diperoleh dengan menggunakan metode MTT dari rasio IC_{50} sel vero dibandingkan dengan IC_{50} sel kanker yang diuji. Apabila nilai indeks selektivitas ($>3,00$) menunjukkan bahwa obat atau ekstrak memiliki selektivitas yang tinggi. Jika nilai indeks selektivitas ($<3,00$) dianggap dapat memberikan toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksitas pada sel normal (Prayong *et al.* 2008).

M. Landasan Teori

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan sebelahnya (*invasi*) atau dengan migrasi sel lainnya (*metastasis*) (Amalia 2008).

Kanker hati adalah pertumbuhan yang tidak terkontrol dari sel-sel ganas di hati yang dihasilkan dari sel-sel abnormal pada hati (primer), atau mungkin akibat dari penyebaran kanker dari bagian tubuh lain (sekunder). Kanker/tumor hati primer dapat diklasifikasikan menjadi 2 jenis berdasarkan sel asalnya, yaitu kanker/tumor hati jinak dan kanker/tumor hati ganas. Kanker/tumor hati jinak contohnya adalah adenoma hepatik dan hiperplasia fokal nodular (focal nodular hyperplasia=FNH). Kanker/tumor hati ganas contohnya karsinoma hepatoseluler (HCC) (Sulaiman *et al.* 2007).

Pengobatan secara modern sekarang ini membutuhkan biaya yang tinggi, namun pengobatannya tidak spesifik dan menimbulkan efek samping yang cukup besar. Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi dan kemoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah dan Sukohardjono 2000).

Komponen utama pada biji buah pinang yaitu karbohidrat, lemak, serat, polifenol (flavonoid dan tanin) serta alkaloid dan mineral (IARC 2004). Biji buah pinang mengandung alkaloid, seperti arekolin ($C_8 H_{13} NO_2$), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine, tanin terkondensasi, tannin terhidrolisis, flavan, senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin, minyak menguap dan tidak menguap, serta garam (Wang dan Lee 1996). Tanaman pinang juga mengandung *red* tanin 15%, lemak 14% (palmitat, oleat, stearat, caproat, caprilat, laurat, sam miristat), kanji dan resin (BPOM RI 2010). Senyawa flavonoid pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis (Meiyanto *et al.* 2008). Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker (Agoes 2010). Biji buah pinang mengandung

proantosianidin sebagai antiproliferatif pada sel kanker, yaitu suatu tanin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid (Nonaka 1989).

Uji aktivitas sitotoksik yang telah dilakukan oleh Xing *et al.* (2010), menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji pinang pada sel *line* SGC-7901 (sel kanker lambung) dan sel *line* SMMC-7721 (sel kanker hati manusia didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 5,1 µg/mL dan 9,3 µg/mL. Senyawa flavonoid yang terdapat pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 77 µg/mL (Meiyanto *et al.* 2008). Fitria (2007) uji aktivitas sitotoksik, bahwa *Areca catechu* L. memiliki efek anti proliferasi dan induksi apoptosis terhadap sel T47D dengan IC₅₀ sebesar 50 µg/mL. Penelitian lain yang dilakukan oleh A'yun (2010) menunjukkan hasil uji sitotoksitas secara *in vitro* terhadap sel leukemia L1210 diperoleh IC₅₀ ekstrak etanol biji buah pinang sebesar 24,7279 µg/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat potensi aktivitas sitotoksik yang besar dari tanaman pinang.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak etanol dari biji buah pinang terhadap sel kanker hati HepG2 dan untuk mengetahui indeks selektivitas aktivitas sitotoksik ekstrak etanol biji buah pinang terhadap sel kanker hati dibandingkan sel vero. Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi adalah etanol 70%, yang diharapkan dapat dengan maksimal menyari kandungan aktif dalam biji buah pinang. Uji MTT dalam penelitian ini dipilih sebagai metode uji sitotoksik dengan parameter yang diukur adalah (%) kehidupan sel dan pembentukan kristal formazan. Rentang nilai IC₅₀ bila ≤ 10 µg/ml sangat efektif, 10-20 µg/ml aktif dan ≥ 20 µg/ml dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC₅₀ 50-100 µg/ml tetap memiliki kompensasi kepada sel kanker (Freshney 2008).

N. Hipotesis

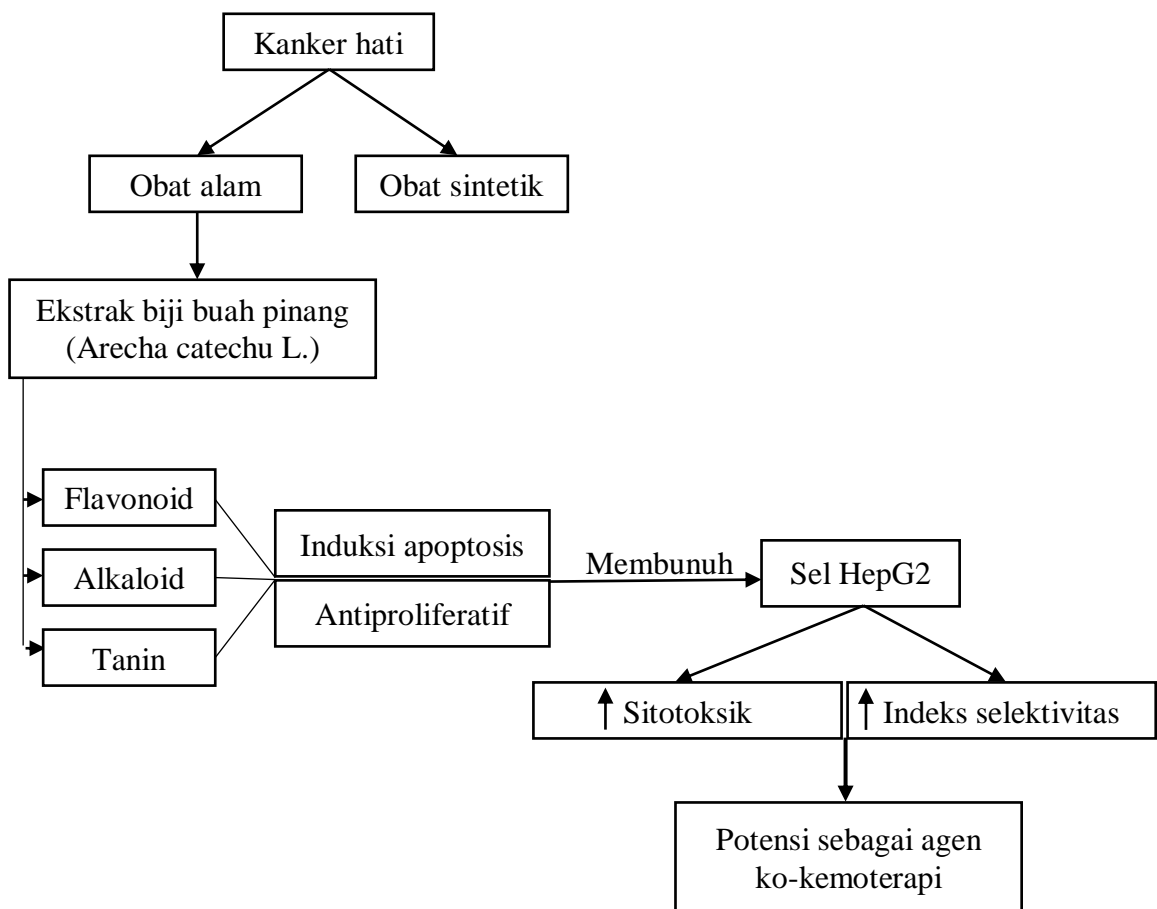
Berdasarkan uraian diatas dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini bahwa:

Pertama, aktivitas sitotoksik ekstrak etanol biji buah pinang (*Areca catechu* L.) pada sel kanker hati HepG2 memiliki nilai IC₅₀ <100 µg/mL.

Kedua, nilai indeks selektivitas ekstrak etanol biji buah pinang (*Arecha catechu L.*) memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker hati HepG2 lebih besar dari 3,00.

Ketiga, ekstrak etanol biji buah pinang (*Arecha catechu L.*) memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker hati HepG2.

O. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2 . Skema Kerangka Pikir