

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirih Merah

1. Klasifikasi tanaman



Gambar 1. Tanaman daun sirih merah.

Klasifikasi sirih merah menurut Backer (1963) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Family	: Piperaceae
Genus	: Piper
Species	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav

(Juliantina *et al.* 2010)

2. Nama daerah

Nama daerahnya diantaranya yaitu sirih talan (Maluku), seureuh (Sunda), jahe sunti (Jawa), cambai (Lampung), sereh, sireh, canbei, ganjang, bolu, ani-ani, amu atau reman (Sudewo 2010).

3. Morfologi tanaman

Tumbuhan merambat atau menjalar, panjangnya dapat mencapai sekitar 5-10m, batang bulat, hijau merah keunguan, beruas dengan panjang 3-8 cm. Daun tunggal, kaku, memiliki bentuk daun melonjong – membulat telur, permukaan

helai daun bagian atas rata – agak cembung dan mengkilat, sedangkan helai daun bagian bawah mencekung dengan pertulangan daun yang menonjol. Panjang daun 6,1 – 14,6 cm, lebar daun 4 – 9,4 cm, memiliki warna dasar daun untuk bagian permukaan atau bagian atas daun hijau dengan garis-garis merah jambu kemerahan, dan permukaan bagian bawah merah tua keunguan (Astuti 2011).

Tanaman sirih merah menyukai tempat teduh, berhawa sejuk dengan adanya sinar matahari 60-75% sehingga akan tumbuh secara subur dan bagus pada daerah pegunungan. Apabila tanaman sirih merah ini dibudidayakan pada daerah panas dan terpapar sinar matahari secara langsung pada tanamannya maka batang sirih merah akan lebih cepat mengering, dan selain itu warna merah pada daunnya akan lebih cepat memudar (Juliantina *et al.* 2010).

4. Kandungan kimia tanaman daun sirih merah

Berdasarkan penelitian yang dilakukan secara kromatografi, daun sirih merah mengandung senyawa flavanoid, alkaloid senyawa polifenolat, tanin, dan minyak atsiri (Juliantina *et al.* 2010).

Kandungan kimia lainnya yang terdapat dalam daun sirih merah adalah minyak atsiri, hidroksikavicol, kavicol, kavibetol, allylprokatekol, karvakrol, eugenol, p-cymene, cineole, caryofelen, estragol, terpenena, dan fenil propada. Salah satu kandungan sirih merah yang berkhasiat sebagai sitotoksik, gangguan fungsi hati, menghambat pendarahan, antioksidan, antihipertensi, dan antiinflamasi adalah senyawa flavanoid. Dan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wina *et al* (2015) menyebutkan bahwa daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid golongan flavonol.

5. Khasiat tanaman daun sirih merah

Secara empiris ekstrak daun sirih merah dalam pemakaian tunggal atau diformulasikan dengan tanaman obat yang lainnya mampu membasmi berbagai penyakit, seperti peradangan atau inflamasi pada organ tertentu, pendarahan, kanker payudara, kanker rahim, leukimia, peradangan atau pembengkakan pada liver (Wina *et al.* 2015).

Penelitian yang menyebutkan bahwa daun sirih merah mempunyai efek sebagai sitotoksik adalah penelitian dari Fransisca (2008) yang menyebutkan ekstrak daun sirih merah pada konsentrasi 2000 ($\mu\text{g/ml}$) dapat menimbulkan rata-rata kematian sel Hela 88,61 %, dan penelitian dari Ermin (2013) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan potensi sebagai antikanker dibuktikan dari hasil penelitiannya nilai IC_{50} dari ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan angka 13,12 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker leukemia (L1210). Penelitian terhadap ekstrak daun sirih merah juga pernah dilakukan oleh Triputra (2016) terhadap sel kanker kolon (WiDr) tetapi tidak menunjukkan hasil yang poten terhadap sel kanker tersebut.

B. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, umumnya dalam keadaan kering. Simplisia terdiri dari tiga macam, yaitu simplisia nabati, hewani, dan pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia yang merupakan hewan utuh, sebagian hewan atau zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia mineral adalah simplisia yang berupa bahan mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Depkes 1985).

1. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan asing lainnya dari tumbuhan sebelum pencucian dengan cara membuang bagian-bagian yang tidak perlu sebelum pengeringan, sehingga didapatkan herba yang layak untuk digunakan (Depkes 1985).

2. Pencucian simplisia

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang melekat pada bahan simplisia. Proses ini dilakukan dengan menggunakan air bersih dan dilakukan secara cermat (Depkes 1985).

3. Pengeringan simplisia

Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang bermutu, tidak mudah terjadi perubahan bahan aktif yang dikandungnya, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Pengeringan simplisia untuk mengurangi kadar air dan menghentikan kerja enzimatis. Cara pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering, hal yang diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu, pengeringan, kelembaban udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan (Depkes 1985).

4. Sortasi kering

Sortasi kering dilakukan untuk memisahkan bahan-bahan asing dan simplisia yang belum terlalu kering, kegiatan ini bertujuan untuk menjamin simplisia benar-benar bebas dari bahan asing (Depkes 1985). Tahap akhir dilakukan penyerbukan simplisia dengan menggunakan mesin penggiling atau penghancur dan kemudian diayak menggunakan mesh 40,60, atau 80 yang bertujuan untuk mendapatkan serbuk simplisia yang halus agar mempermudah saat dilakukannya ekstraksi karena dengan memperbesar luas permukaan akan memperbesar kontak antara serbuk dan pelarut (Sa'adah & Nurhasnawati 2015).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai, proses ini dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhriani 2014).

2. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana dan paling banyak digunakan, metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar. Kerugian dari metode ini adalah memakan banyak waktu, menggunakan pelarut yang banyak, dan adanya beberapa senyawa yang sulit diekstraksi pada suhu kamar. Kelebihan

dari metode maserasi adalah dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil, dan prosedurnya lebih mudah dibandingkan metode lain dan alat yang digunakan lebih sederhana dan ekonomis (Mukhriani 2014).

3. Pelarut Penyari

3.1 Pelarut. Pelarut adalah suatu zat untuk melarutkan zat lain dalam preparat larutan. Pada penelitian pemilihan larutan penyari harus memperhatikan banyak faktor. Larutan penyari harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan. Farmakope Indonesia III menetapkan sebagai cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air dan eter (Triputra 2016).

3.2 Air. Air dipertimbangkan sebagai penyari karena murah, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan mampu mengekstraksi banyak bahan kandungan simplisia. Kerugian air sebagai penyari adalah tidak selektif, diperlukan waktu yang lama dalam pemekatan ekstrak, sari dapat ditumbuhi kapang atau bakteri serta cepat rusak (Endah 2010).

3.3 Etanol. Etanol merupakan pelarut yang bersifat volatil, tidak berwarna, dan merupakan pelarut organik yang tidak bersifat racun bagi tubuh. Pelarut ini sering digunakan untuk mengekstraksi berbagai senyawa dalam tanaman karena lebih ramah lingkungan dibandingkan metanol (Basito 2011). Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif dari pada air, diabsorpsi dengan baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, memperbaiki stabilitas bahan aktif, dan tidak memerlukan suhu tinggi untuk pemekatan (Pratiwi 2014).

3.4 Etanol-Air. Penyari campuran etanol dan air dapat dibuat dalam segala perbandingan tergantung pada bahan yang akan diekstrak dan bertujuan untuk meningkatkan penyarian (Endah 2010).

D. Penyakit Kanker

1. Definisi kanker

Kanker merupakan suatu penyakit sel yang ditandai dengan hilangnya fungsi kontrol sel terhadap regulasi daur sel maupun fungsi homeostatis sel pada organisme multiseluler, sehingga sel tidak dapat berpoliferasi secara normal. Akibatnya sel akan berpoliferasi terus-menerus sehingga menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal (Ismail *et al.* 2015).

Pembelahan sel pada kanker mengarah pada invasi jaringan di sekitarnya serta menyebar ke bagian lain dalam tubuh, proses tersebut disebut metastasis. Akitivitas proliferasi (pembelahan) yang tidak terkontrol akan membentuk jaringan abnormal yang disebut neoplasma. Sel normal akan berjalan sesuai siklusnya dengan pertumbuhan terkendali sedangkan sel kanker akan mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali pada mekanisme kontrol atau pengaturan pertumbuhan (Triputra 2016).

2. Sifat Kanker

Sel kanker memiliki perbedaan yang sangat signifikan dengan sel normal dalam tubuh. Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut : Sel kanker tidak mengenal program kematian sel yang dikenal dengan nama apoptosis. Protein *p53* mampu mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri dari sel yang mengandung DNA yang tidak normal. Peristiwa ini disebut apoptosis. Apoptosis sangat dibutuhkan untuk mengatur berapa jumlah sel yang dibutuhkan dalam tubuh, secara fungsional dan menempati tempat yang tepat dengan umur tertentu. Apabila telah melewati masa hidupnya, sel-sel normal akan mati dengan sendirinya tanpa ada efek inflamasi, namun sel kanker berbeda karakteristik tersebut. Sel kanker akan terus hidup meski seharusnya mati. Mutasi dari gen *p53* menyebabkan proliferasi dan transformasi sel menjadi kehilangan kendali.

Sel kanker tidak mengenal komunikasi ekstraseluler atau asosial. Komunikasi ekstraseluler diperlukan untuk menjalin koordinasi sel sehingga mereka dapat saling menunjang fungsi masing-masing. Berdasarkan sifatnya yang asosial, sel kanker bertindak semaunya sendiri tanpa mempedulikan kebutuhan

lingkungannya. Sel kanker dapat memproduksi *growth factor* sendiri sehingga tidak bergantung pada rangsangan sinyal pertumbuhan dari luar untuk melakukan proliferasi. Sel kanker dapat tumbuh menjadi tidak terkendali.

Sel kanker mampu menyerang jaringan lain (invasif), merusak jaringan tersebut dan tumbuh subur di atas jaringan lain membentuk anak sebar (metastasis). Semakin besar jangkauan metastasis tumor, kanker semakin sulit untuk disembuhkan. Kanker pada stadium metastasis merupakan penyebab 90% kematian penderita kanker (Triputra 2016).

E. Kanker Hati

Kanker hati hepatoselular yang berasal dari sel hati merupakan kanker nomor lima tersering di Indonesia. Dalam kelompok penyakit hati, kanker ini menduduki tempat terbanyak ketiga setelah sirosis hati dan hepatitis virus. Di Indonesia, kanker ini mematikan lebih dari satu juta orang pertahunnya. Penyebab pasti dari penyakit ini belum diketahui, namun kanker hati sering ditemukan pada penderita sirosis hati (*pengerasan hati*), hepatitis B, dan pada penderita hepatitis C. Sehingga penderita tersebut dapat digolongkan dalam kelompok yang memiliki resiko tertinggi mendapatkan kanker hati ini (Rasyid 2006).

Sebanyak 52,3 % penderita kanker hati berasal dari infeksi hepatitis B virus kronis, dan 20 % berasal dari infeksi hepatitis C virus. Penyebab lain dari penyakit ini adalah *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), aflatoksin, dan penyakit hepar alcoholic. Sedangkan resiko kanker hati pada sirosis hanya berkisar sekitar 1-6 % pertahun (Ricky 2015).

Pemeriksaan Alfa Feto Protein (AFP), penggunaan Ultrasonografi (USG), *Computed Tomographic Scanning* (CT Scan), dan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) penting untuk menegakkan diagnosis dan mengetahui seberapa besar ukuran tumor. Dengan kemajuan teknologi dan keakuratan dalam bidang radiologi dengan dan pendekatan laboratorium *alphafetoprotein* (AFP), kanker hati yang sekecil apapun sudah dapat dideteksi sejak dini. Kriteria diagnosa kanker hati menurut PPHI (Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia), yaitu : hati membesar berbenjol-benjol, AFP yang meningkat lebih dari 500 mg/ml, adanya hasil yang

menunjukkan karsinoma hepatoselular pada USG, CT Scan, dan MRI, serta hasil biopsi menunjukkan adanya karsinoma hepatoselular (Sunanda *et al.* 2010).

Sebuah laporan dari Hongkong menunjukkan bahwa 76 % pasien kanker hati datang dengan keluhan rasa tidak nyaman pada bagian abdomen, ditandai dengan adanya penurunan berat badan (4,4%), pendarahan gastrointestinal (4,4%), dan jaundice (2,6%) (Ricky 2015).

F. Terapi Kanker Hati

1. Penatalaksanaan secara bedah

Secara umum tatalaksana bedah seperti reseksi dan transplantasi dianggap pengobatan yang ideal untuk karsinoma hepatocellular, kemajuan teknik bedah dan perawatan perioperatif telah mampu untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas akibat operasi, bahkan pada penderita sirosis. Meskipun penanganan terhadap karsinoma hepatoselular secara operatif dianggap ideal, tetapi banyak kesulitan dijumpai karena penderita umumnya datang pada stadium yang sudah lanjut sehingga tidak dapat dilakukan reseksi dan transplantasi, biaya yang mahal, dan sulitnya mendapatkan donor transplantasi merupakan kendala yang besar dalam penatalaksanaan ini (Hilferia dkk 2015)

2. Penatalaksanaan secara non bedah

2.1 Percutaneous ethanol injection (PEI). Pertama kali diperkenalkan pada tahun 1986, dilakukan dengan cara menyuntikkan etanol murni secara perkutan ke dalam tumor dengan panduan radiologis untuk mendapatkan efek nekrosis dari tumor. Tindakan ini efektif untuk tumor berukuran kecil (< 3 cm), dan efek samping dari terapi ini adalah demam, sakit pada daerah suntikan, dan perdarahan intrahepatik (Sirregar 2011).

2.2 Transarterial Chemoembolism (TACE). TACE adalah cara baru pemberian kemoterapi dan embolus yang dicampur secara homogen, kemudian dihantarkan ke tumor melalui kateterisasi pada arteria yang memberikan darah langsung pada massa tumor, sehingga lebih efisien dan efektif dengan efek samping relatif minimal. TACE merupakan sebuah prosedur yang dapat memperlihatkan efektivitasnya pada perusakan sel-sel ganas, tidak hanya terfokus

pada induk tumornya tetapi juga pada tumor anaknya. Keuntungan pada pasien adalah tidak adanya keluhan yang berhubungan dengan toksisitas sistemik, rambut tidak rontok, dan relatif tidak ada efek mual dan muntah akibat efek samping prosedur ini (Bagaswoto 2009).

2.3 Kemoterapi sistemik. Pemberian terapi dengan anti tumor ternyata dapat memperpanjang hidup penderita, sitostatika yang sering digunakan sampai saat ini adalah 5-fluoro uracil (5-FU). Zat ini dapat diberikan secara sistemik atau secara lokal, sitostatika lain yang juga sering digunakan adalah adriamisin (doxorubicin HCl) dimana kombinasi antara 5-FU dan adriamisin memberikan respon yang sangat baik untuk tumor hati (Sirregar 2011). Zat sitotoksik lain yang juga memiliki potensial tinggi dalam terapi tumor hati adalah cisplatin, dimana dalam dosis tunggal mampu secara efektif memberikan respon terhadap tumor hati (Handayani 2008).

G. Uji Sitotoksitas

Sitotoksitas adalah sejauh mana agen memiliki tindakan destruktif spesifik pada sel-sel tertentu. Senyawa sitotoksik adalah suatu senyawa atau zat yang dapat merusak sel normal dan sel kanker, serta digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari sel tumor. Istilah toksisitas juga dapat digunakan untuk zat-zat yang bersifat genotoksik, mutagenik, onkogenik, teratogenik, dan zat yang berbahaya lainnya (Naton *et al.* 2015).

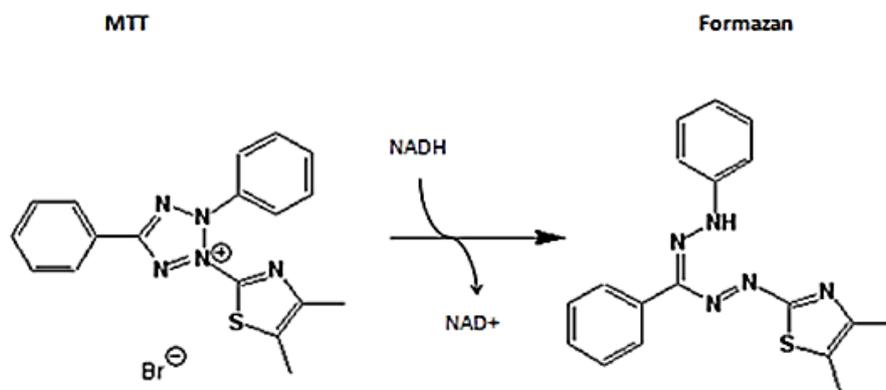
Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar nilai IC_{50} senyawa tersebut semakin tidak toksik (Haryoto *et al.* 2013).

Menurut penelitian dari Rollando (2016) suatu senyawa yang memiliki nilai IC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek sitotoksik yang poten dan menurut *American National Cancer Institute* kategori senyawa sitotoksik dibagi menjadi 4 kategori, yaitu kategori sangat toksik jika nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$, kategori moderat

atau cukup aktif jika nilai IC_{50} masuk dalam range 21-200 $\mu\text{g/ml}$, kategori lemah jika nilai IC_{50} masuk dalam range 201- 500 $\mu\text{g/ml}$, dan jika nilai $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/ml}$ termasuk kategori tidak toksik (Hameed *et al* 2012). Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi berapa persen sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Haryoto *et al.* 2013).

H. Metode MTT

Menurut Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Universitas Gadjah Mada, prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* SDS akan melarutkan kristal berwarna ungu ini kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak. Pengujian dengan metode MTT ini berdasarkan pada konversi garam tetrazolium yang berwarna kuning oleh enzim suksinat dehydrogenase dengan bantuan NADPH menjadi produk berwarna ungu yang disebut formazan. Formazan larut dalam pelarut organik SDS yang akan melarutkan dan mengekstraksi formazan dari sel (Fazwishni 2000).



Gambar 2. Reaksi Reduksi MTT assay

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 berwarna ungu. Penambahan SDS 10% dalam HCl 0,01 M bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik dan melarutkan formazan sehingga warna ungu formazan dapat dibaca absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA *raeder* dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, absorbansi akan semakin tinggi, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak MTT yang diabsorpsi ke dalam sel hidup sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak (Wijaya 2012).

I. Uji Indeks Selektivitas

Uji indeks selektivitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal, nilai selektivitas akan menandakan bahwa ekstrak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tapi dengan pengaruh minimal pada sel normal (Siswadi & Rollando 2016).

Ekstrak dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila memiliki nilai selektivitas ≥ 3 , dan dikatakan kurang selektif apabila memiliki nilai selektivitas < 3 (Sutedjo 2016).

J. Sel Vero

Sel vero merupakan sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih yang diisolasi dari sel ginjal monyet hijau afrika. Sel ini tidak memiliki kemampuan untuk mensekresikan interferon tipe 1 ketika diinfeksi oleh virus, kekurangan interferon pada sel vero mengakibatkan sel ini sangat sensitif jika terinfeksi oleh berbagai jenis virus (Haryadi 2012).

Sel vero biasa digunakan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia. Sel ini juga direkomendasikan untuk dijadikan sebagai sel model dalam

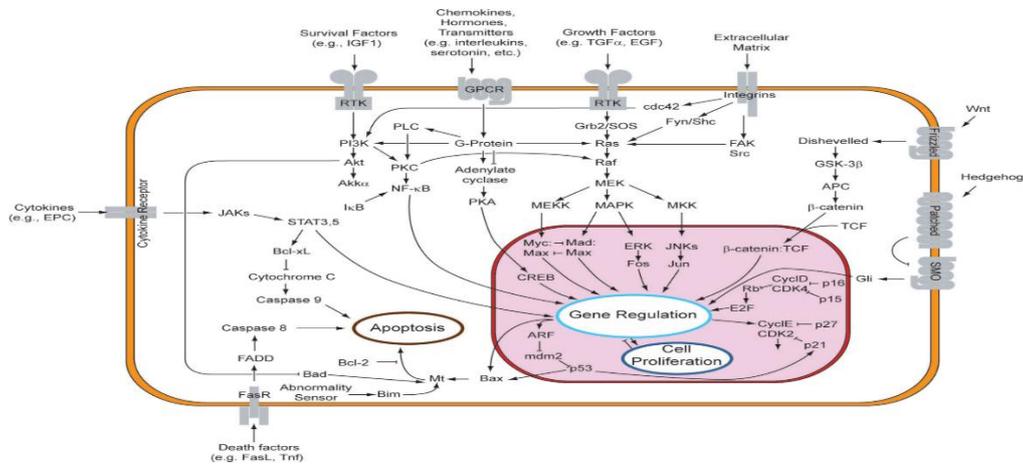
mempelajari karsinogenesis secara *in vitro* dan memudahkan dalam mempelajari perubahan sel yang meliputi pertumbuhan dan morfologinya akibat induksi berbagai senyawa kimia (Triputra 2016).

K. Uji Imunositokimia

Imunositokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen. Metode imunositokimia terdiri dari dua jenis, yaitu metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung, antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel sedangkan pada metode tidak langsung, antigen diikat pada antibodi primer secara langsung kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer, kemudian ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna yang akan mewarnai sel (CCRC 2009).

L. Apoptosis

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel, program ini memiliki peran penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel. Apoptosis merupakan suatu proses aktif yakni kematian sel melalui enzimatik oleh dirinya sendiri dan mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan mungkin berbahaya bagi tubuh, pada sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan berproliferasi secara terus menerus dan mengalami metastasis ke jaringan lain (Triputra 2016).



Gambar 3. Mekanisme apoptosis

Secara umum tahapan apoptosis dibedakan menjadi dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*) dan jalur intrinsik (*mitochondria pathway*). Pada jalur ekstrinsik, signal apoptosis datang dari luar sel dimana biasanya diinisiasi oleh sel lain yang tidak melakukan apoptosis atau dari lingkungan disekitar sel. Signal yang dikirimkan oleh sel lain biasanya berupa ligan protein yang disebut FasL (*Fas ligand*), ligan ini akan berikatan dengan reseptor kematian (*death receptor*) yang terletak dipermukaan sel yaitu FasR (*Fas reseptor*) dan membentuk trimerisasi. Ikatan antara ligan dan reseptor ini akan membentuk suatu protein adaptor yang disebut FADD (*Fas associated death domain*) yang akan mengikat protein inaktif pro-caspase 8, ikatan antara ligan-reseptor dan reseptor FADD ini akan membentuk suatu kompleks yang disebut DISC (*death inducing signal complex*) pada kompleks ini akan terjadi aktivasi pada pro-caspase 8 menjadi caspase 8 yang bersifat inisiator. Protein caspase 8 nantinya akan menginisiasi atau memicu protein caspase 3 yang merupakan protein efektor terhadap sel sehingga menyebabkan sel akan mengalami apoptosis dengan cara merusak membran inti sel dan menghancurkan kromosom pada sel kanker tersebut (Meutia 2018).

Jalur kedua adalah intrinsik (*mitochondria pathway*), dimana pada jalur ini adanya induksi dari salah satu protein proapoptosis yaitu p53 yang terdapat dalam sitoplasma. Protein ini akan menginduksi 2 protein yaitu Apaf-1 dan Bax, Bax akan memicu mitokondria untuk mengeluarkan sitokrom c yang terdapat dalam mitokondria untuk keluar ke sitoplasma dan berikatan dengan Apaf-1, ikatan

antara keduanya membentuk suatu kompleks yang disebut dengan CARD (Caspase recruitment domain) yang akan membentuk suatu protein yang disebut Pro-Caspase 9 yang masih inaktif, pada kompleks ini terjadi pengaktifan Pro-caspase 9 menjadi Caspase 9 yang sifatnya inisiator, protein caspase-9 akan menginisiasi caspase-3 untuk memprogram apoptosis dengan cara merusak membran inti dan merusak kromosom DNA didalam sel kanker tersebut (Meutia 2018).

M. Landasan Teori

Daun sirih merah sering digunakan oleh masyarakat untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit, dan telah dibuktikan secara ilmiah dalam beberapa penelitian bahwa tanaman sirih merah dapat berfungsi sebagai antikanker seperti kanker serviks, payudara, dan kanker leukimia (Ermin *et al.* 2013).

Salah satu kandungan sirih merah yang berkhasiat sebagai sitotoksik dan gangguan fungsi hati adalah senyawa flavanoid, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wina *et al* (2015) menyebutkan bahwa daun sirih merah mengandung senyawa flavanoid golongan flavonol.

Penelitian dari Ermin (2013) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah memiliki nilai IC_{50} 13,12 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker leukimia (L1210). Penelitian dari Wicaksono (2015) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah memiliki nilai IC_{50} 27,42 $\mu\text{g/ml}$ terhadap kanker serviks. Penelitian dari Emrizal *et al* (2018) menyebutkan bahwa fraksinasi dari daun sirih merah memiliki nilai IC_{50} 1,34 $\mu\text{g/ml}$ pada fraksi etil asetat dan 2,04 $\mu\text{g/ml}$ pada fraksi n-heksan dan penelitian terbaru yang dilakukan oleh Wulandari (2018) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah memiliki nilai IC_{50} 100 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker kolon. Beberapa penelitian sitotoksik lain yang menggunakan daun sirih merah juga menyebutkan bahwa ekstrak dari daun sirih merah tidak menghasilkan efek sitotoksik yang poten terhadap beberapa sel kanker seperti penelitian Ganurmala (2018) yang menyebutkan bahwa pada penelitian yang dilakukannya menghasilkan nilai IC_{50} 544,29 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel HeLa.

Penelitian mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih merah terhadap kultur sel kanker hati HepG2 perlu dilakukan lebih lanjut dengan

penelusuran mekanisme jalur kematian sel HepG2 melalui induksi protein Caspase-3 pada proses apoptosis menggunakan metode imunositokimia.

Hal tersebut yang menjadi landasan dilakukannya penelitian dengan mengekstraksi daun sirih merah menggunakan etanol 70% terhadap kultur sel HepG2 ini, agar melihat seberapa besar sitotoksik yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi dan mengetahui apakah ekstrak etanol daun sirih merah berpotensi menginduksi protein Caspase-3 untuk menstimulasi terjadinya apoptosis pada sel kanker. Sehingga senyawa aktif pada daun sirih merah dapat dikembangkan sebagai senyawa antikanker.

N. Hipotesis

Terdapat 2 hipotesis dalam penelitian ini, yaitu:

1. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ pada sel kanker hati HepG2.
2. Nilai indeks selektivitas ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap sel kanker hati HepG2 lebih besar dari 3,00.
3. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) mampu menginduksi ekspresi protein Caspase-3 pada sel kanker kanker hati HepG2.