

**TESIS**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK ETANOL  
DAUN KELOR (*Moringa oleifera* L.) dan EKSTRAK ETANOL  
DAUN PEPAYA (*Carica papaya* L.) terhadap  
SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

Cytotoxicity Activity of Ethanolic Extract of Moringa Leave (*Moringa oleifera*)  
and Papaya Leave (*Carica papaya*) Combination on MCF-7 Breast Cancer Cells

**NUNI RISMAYANTI NURKALBI  
P062181031**



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
2022**

**Aktivitas Sitotoksik Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kelor  
(*Moringa oleifera* L.) dan Ekstrak Etanol Daun Pepaya  
(*Carica papaya* L.) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

**NUNI RISMAYANTI NURKALBI**

Kepada

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
2022**

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR  
(*Moringa oleifera* L.) DAN EKSTRAK ETANOL DAUN PEPAYA  
(*Carica papaya* L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

Disusun dan diajukan oleh:

**NUNI RISMAYANTI NURKALBI  
Nomor Pokok: P062181031**

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik  
**Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin**  
pada tanggal 4 Februari 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



**dr. Muh. Aryadi Arsyad, M.Biom.Sc.Ph.D**  
NIP. 197608022002121003

Pembimbing Pendamping



**Dr.dr.Ika Yustisia, M.Sc**  
NIP.197701212003122003

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik



**Dr.dr.Ika Yustisia, M.Sc**  
NIP.197701212003122003

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin



**Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc**  
NIP. 1967 0308 1990 03 1001

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Nuni Rismayanti Nurkalbi

NIM : P062181031

Program Studi : Ilmu Biomedik

Konsentrasi : Fisiologi

menyatakan bahwa, tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Makassar, Januari 2022

Nuni Rismayanti Nurkalbi

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya aktivitas sitotoksik dari pemberian ekstrak kombinasi dari ekstrak etanol daun kelor (EEDK) dan ekstrak etanol daun pepaya (EEDP) terhadap kultursel kanker payudara MCF-7 dan kultur sel non kanker Vero. Ekstraksi daun kelor dan daun pepaya dilakukan dengan maserasimenggunakan etanol 96%. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan reagents *WST assay* yang kemudian nilai absorbansi diukur menggunakan *ELISA reader*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya dengan konsentrasi 0, 20, 40, 80 dan 160  $\mu\text{g/mL}$  selama 48 jam dengan kepadatan sel  $5 \times 10^3$  dapat menghambat pertumbuhan sel. Ekstrak kombinasi EEDK dan EEDP dengan perbandingan 3:1 menunjukkan nilai  $IC_{50}$  untuk Sel MCF-7 sebesar 8.09  $\mu\text{g/mL}$  (sangat kuat) dan untuk Sel Vero sebesar 173.40  $\mu\text{g/mL}$  (lemah), nilai indeks selektivitas sebesar 21.43 (selektivitas tinggi) dan nilai indeks kombinasi 0.00549 (sinergisme sangat kuat).

Kata Kunci: Daun Kelor, Daun Pepaya, Kombinasi Ekstrak, Kanker payudara, MCF-7



## ABSTRACT

This study aims to determine the cytotoxic activity of giving a combination extract of ethanol extract Moringa leave (EEMo) and ethanol extract papaya leave (EECP) on MCF-7 breast cancer cell culture and Vero non-cancer cell culture. The extraction of Moringa and Papaya leaves was carried out by maceration using 96% ethanol. The cytotoxic test was performed using the WST reagents assay, and then the absorbance value was measured using an ELISA reader. The results showed that the combined extract of EEMo and EECP with concentrations of 0, 20, 40, 80 and 160  $\mu\text{g/mL}$  for 48 hours with a cell density of  $5 \times 10^3$  could inhibit cell growth. The combination extract of EEMo and EECP with a ratio of 3: 1 shows the  $\text{IC}_{50}$  value for MCF-7 cells of 8.09  $\mu\text{g/mL}$  (very strong) and for Vero cells of 173.40  $\mu\text{g/mL}$  (weak), the selectivity index value of 21.43 (high selectivity) and combination index value of 0.00549 (very strong synergy).

Keywords: Moringa Leaves, Papaya Leaves, Extract Combination, Breast Cancer, MCF-7



## **KATA PENGANTAR**

Assalamualaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat. Taufik dan hidayahnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan hasil penelitian ini. Penulisan ini merupakan salah satu persyaratan dalam rangka penyelesaian program magister S2 pada sekolah Pascasarjana Program studi Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi Universitas Hasanuddin Makassar. Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada berbagai pihak yang telah memberikan bantuan baik moril maupun materil langsung atau tidak langsung. Oleh karena itu, dengan rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Rektor dan Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta pendidikan program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
2. Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Hasanuddin senantiasa memantau kelancaran pendidikan penulis.
3. dr. Muh. Aryadi Arsyad, M.Biom.Sc., Ph.D selaku ketua konsentrasi fisiologi sekaligus Pembimbing Utama dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc. selaku Pembimbing Pendamping yang sangat sabar dan telah meluangkan waktu, pikiran serta ilmunya untuk memberi bimbingan, arahan dan nasehat kepada penulis.

4. Yulia Yusrini Djabir, M.Si.,MBM.Sc., Ph.D., Apt sebagai penguji yang telah memberikan banyak saran dan masukan dalam pembuatan tesis ini.
5. Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt sebagai penguji yang telah banyak yang telah memberikan banyak saran dan masukan dalam pembuatan tesis ini.
6. Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt sebagai penguji yang telah memberikan banyak saran dan masukan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan tesis ini.
7. Dosen-dosen kami selama menimba ilmu di Program studi Ilmu Biomedik konsentrasi Fisiologi yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah memberikan banyak pembelajaran serta ilmu dan bimbingan agar menjadikan penulis mempunyai ilmu pengetahuan mengenai biomedik khususnya pada bidang fisiologi menjadi lebih terarah dan dapat berguna bagi bangsa dan tanah air umumnya dan diri sendiri khususnya.
8. Kak Hijral Aswad selaku Laboran Hasanuddin *University Medical Research Centre* (HUMRC) atas bimbingannya selama melakukan penelitian di laboratorium claster Kultur sel.
9. Haryanto selaku ketua kelas dan semua rekan sejawat Magister S2 pada Sekolah Pascasarjana Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi (Kak Upik, Kak Yanti, Kak Ermida, Diah, Reski, Angria, Mindy, Farah) atas bantuan, kebersamaan, kejasama, canda dan tawa selama penulis menjalani pendidikan.

Ucapan terimakasih yang tulus dan penuh rasa hormat penulis sampaikan kepada kedua orang tua tersayang Ayah Ir. Nurdin Manan (Alm.), Ibu Andi

Sardia Kasude serta yang penulis sayangi Nurkhalizah Putri Ayu Pratiwi dan Radium Ramadhani yang senantiasa mendukung dalam tiap doa, memberikan dorongan dan semangat yang sangat berarti bagi penulis selama mengikuti pendidikan.

Wassalamualaikum warrahmatullahi wabarakatuh.

Makassar, Januari 2022

Nuni Rismayanti Nurkalbi

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	17
A. Latar Belakang .....	17
B. Rumusan Masalah.....	21
C. Tujuan Penelitian .....	21
1. Tujuan Umum .....	21
2. Tujuan Khusus .....	22
D. Manfaat Penelitian .....	22
1. Manfaat Pengembangan Ilmu .....	22
2. Manfaat Aplikasi.....	23
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	24
A. Tinjauan Umum Anatomi dan Fisiologi Payudara .....	24

B.	Tinjauan Umum Kanker .....	26
1.	Karsinogenesis .....	31
2.	Kanker payudara .....	33
3.	MCF-7.....	35
4.	Sel Vero .....	36
5.	Penanganan Kanker .....	36
6.	Terapi Kanker Payudara .....	38
7.	Terapi Kombinasi.....	39
C.	Tinjauan Umum Tanaman .....	39
D.	Kerangka Teori .....	44
E.	Kerangka Konsep.....	47
F.	Hipotesis .....	48
1.	Hipotesis (H <sub>0</sub> ).....	48
2.	Hipotesis Alternatif (H <sub>A</sub> ) .....	48
G.	Definisi Operasional .....	48
BAB III METODE PENELITIAN.....		49
A.	Rancangan Penelitian.....	49
B.	Waktu dan Tempat Penelitian.....	49
C.	Populasi dan Sampel.....	49
1.	Populasi.....	49

2.	Sampel.....	50
D.	Alat dan Bahan Penelitian.....	50
1.	Alat Penelitian.....	50
2.	Bahan Penelitian .....	50
E.	Izin Penelitian dan Kelayakan Etik.....	50
F.	Prosedur Penelitian .....	51
1.	Ekstraksi Daun Kelor dan Daun Pepaya.....	51
2.	Media biakan dan penumbuh sel kultur.....	51
3.	Preparasi Sel.....	51
4.	Panen Sel.....	52
5.	Pembuatan Larutan Uji .....	53
6.	Uji Sitotoksik .....	53
G.	Analisis Data.....	54
1.	Uji Sitotoksik .....	54
2.	Viabilitas Sel.....	54
3.	Indeks Selektivitas .....	54
4.	Indeks Kombinasi .....	55
H.	Alur Penelitian .....	56
	<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>58</b>
A.	Hasil Penelitian .....	58

B.	Pembahasan.....	75
BAB V PENUTUP.....		81
A.	Kesimpulan .....	81
B.	Saran .....	82
DAFTAR PUSTAKA .....		83
LAMPIRAN.....		90
A.	Dokumentasi Penelitian .....	90
B.	LoA Accepted dari Jurnal Nasional.....	92
C.	Perhitungan Pembuatan Medium, Konsentrasi dan Jumlah Sel .....	93
1.	Perhitungan Medium.....	93
2.	Perhitungan pembuatan konsentrasi .....	93
3.	Perhitungan Jumlah Sel yang digunakan .....	93
D.	Indeks Kombinasi (IK) EEDK – EEDP pada kultur sel MCF-7 dengan <i>Compusyn system</i> .....	94
E.	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor dan Ekstrak Etanol Daun Pepaya.....	95
F.	Viabilitas Sel MCF-7 dan Sel Vero .....	96
1.	Absorbansi MCF-7 dan Nilai Viabilitas Sel pada 48 jam setelah pemberian ekstrak .....	96

2.	Absorbansi Vero dan Nilai Viabilitas Sel pada 48 jam setelah pemberian ekstrak.....	98
G.	<i>Microplate-96</i> sumuran.....	100
H.	Hasil IC <sub>50</sub> menggunakan Software Graphpad Prism .....	101
1.	Nilai IC <sub>50</sub> Kultur Sel MCF-7.....	101
2.	Nilai IC <sub>50</sub> Kultur Sel Vero .....	102

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Anatomi Payudara .....	24
Gambar 4. 1 Grafik perbandingan uji kinetika proliferasi antara kultur sel MCF-7 dan kultur sel Vero dengan perlakuan pemberian ekstrak tunggal kelor .....	63
Gambar 4. 2 Grafik perbandingan uji kinetika proliferasi antara kultur sel MCF-7 dan kultur sel Vero dengan perlakuan pemberian ekstrak tunggal pepaya .....	64
Gambar 4. 3 Grafik perbandingan uji kinetika proliferasi antara kultur sel MCF-7 dan kultur sel Vero dengan perlakuan pemberian ekstrak kombinasi 1:3 .....	66
Gambar 4. 4 Grafik perbandingan uji kinetika proliferasi antara kultur sel MCF-7 dan kultur sel Vero dengan perlakuan pemberian ekstrak kombinasi 1:1 .....	67
Gambar 4. 5 Grafik perbandingan uji kinetika proliferasi antara kultur sel MCF-7 dan kultur sel Vero dengan perlakuan pemberian ekstrak kombinasi 3:1 .....	69
Gambar 4. 6 Grafik perbandingan log konsentrasi dengan normalitas absorban (%) terhadap kultur sel MCF-7 (A) dan sel Vero (B) untuk ekstrak pepaya, kultur sel MCF-7 (C) dan sel Vero (D) untuk ekstrak kelor, kultur sel MCF-7 (E) dan sel Vero (F) untuk perbandingan 1:3, kultur sel MCF-7 (G) dan sel Vero (H) untuk perbandingan 1:1, kultur sel MCF-7 (I) dan sel Vero (J) untuk perbandingan 3:1	71
Gambar 4. 7 Gambaran morfologi kultur sel MCF-7 pada konsentrasi 40 µg/mL (A) tanpa ekstrak, (B) EEDK, (C) EEDP, (D) Kombinasi 1:3 (E) Kombinasi 1:1, (F) Kombinasi 3:1 .....	72
Gambar 4. 8 Gambaran morfologi kultur sel Vero pada konsentrasi 40 µg/mL (A) tanpa ekstrak, (B) EEDK, (C) EEDP, (D) Kombinasi 1:3 (E) Kombinasi 1:1, (F) Kombinasi 3:1 .....	73

## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Klasifikasi Tanaman Kelor dan Pepaya .....	42
Tabel 2. 2 Hasil Uji Fitokimia pada Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> L.) (Putra et al, 2016).....	42
Tabel 2. 3 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pepaya ( <i>Carica papaya</i> L.) (Mahatrinny et al, 2013).....	43
Tabel 3. 1 Intrepretasi Nilai Indeks Kombinasi.....	55
Tabel 4. 1 Hasil Skrining Fitokimia EEDK dan EEDP.....	58
Tabel 4. 2 Nilai IC <sub>50</sub> Ekstrak Tunggal dan Kombinasi EEDK dan EEDP.....	59
Tabel 4. 3 Nilai Viabilitas Sel Uji Ekstrak Tunggal EEDK dan EEDP.....	60
Tabel 4. 4 Nilai Viabilitas Sel Uji Ekstrak Kombinasi EEDK dan EEDP Pada Sel MCF-7 dan Sel Vero .....	60
Tabel 4. 5 Nilai Indeks selektivitas .....	74
Tabel 4. 6 Nilai Indeks Kombinasi .....	75

# **BAB I PENDAHULUAN**

## **A. Latar Belakang**

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) dalam Laporan Status Global mengenai penyakit tidak menular kronis (*Noncommunicable Diseases*) 2014, tercatat bahwa ada empat penyakit penyebab kematian tertinggi dan tak bisa ditangani oleh banyak negara di dunia. Empat penyakit itu adalah kanker, gangguan kardiovaskular, gangguan pernapasan kronis, dan diabetes. Kanker adalah penyebab kematian nomor dua di dunia, dan bertanggung jawab atas 9,6 juta kematian pada tahun 2018. Secara global, sekitar 1 dari 6 kematian disebabkan oleh kanker dan masih berdasarkan WHO dalam Laporan Kanker Dunia 2014, tercatat bahwa kanker payudara merupakan kanker dengan angka kasus terbanyak dan kematian tertinggi yang ditemukan di Indonesia yaitu sebanyak 48.998 kasus dengan angka kematian sebesar 21.4% dibandingkan jenis kanker lainnya yaitu kanker leher rahim, kanker kolorektum, kanker ovarium dan kanker paru-paru (WHO, 2014).

Kanker payudara dimulai ketika sel-sel di payudara mulai tumbuh di luar kendali. Sel-sel ini biasanya membentuk tumor yang sering terlihat pada rontgen atau dirasakan sebagai benjolan. Tumor ini ganas (kanker) jika sel-sel dapat tumbuh menjadi (menyerang) jaringan di sekitarnya atau menyebar (bermetastasis) ke area yang jauh dari tubuh. Kanker payudara terjadi hampir seluruhnya pada wanita, tetapi pria juga bisa terkena kanker payudara. Kanker payudara dapat dimulai dari berbagai

bagian payudara. Sebagian besar kanker payudara dimulai pada saluran yang membawa susu ke puting (kanker saluran). Beberapa mulai di kelenjar yang membuat ASI (kanker lobular). Jenis kanker payudara yang paling umum adalah karsinoma duktal invasive, sel-sel kanker tumbuh di luar saluran ke bagian lain dari jaringan payudara dan karsinoma lobular invasive, sel-sel kanker menyebar dari lobulus ke jaringan payudara yang dekat (ACS, 2019).

Pengobatan kanker payudara dengan agen kemoterapi masih terbatas karena masalah resistensi obat dan efek toksik pada jaringan normal yang mengarah ke immunosupresi dan kardiotoxicitas. Oleh karena itu perlu dikembangkan alternatif lain untuk meningkatkan efisiensi terapi sekaligus mengurangi toksisitas terhadap sel-sel bukan kanker. Penggunaan tumbuhan alami untuk keperluan pengobatan, hingga saat ini masih diminati sebagian besar penduduk di Indonesia sebagai pilihan pengobatan alternatif. Tumbuhan memiliki peran penting sebagai sumber senyawa antikanker yang efektif, seperti daun kelor dan daun pepaya. Produk tumbuhan dan tumbuhan digunakan sebagai sumber obat sejak lama. Sifat obat tanaman telah diteliti dalam perkembangan ilmiah terkini di seluruh dunia, karena aktivitas antioksidannya yang kuat, tidak ada efek samping, dan kelangsungan ekonomi. Flavonoid dan senyawa fenolik yang tersebar luas pada tumbuhan telah dilaporkan memiliki berbagai efek biologis, termasuk antioksidan, kemampuan membersihkan radikal bebas, anti inflamasi, dan anti karsinogenik. Antioksidan alami baru dari beberapa

tanaman telah dipelajari secara ekstensif dalam beberapa tahun terakhir karena sifat antioksidan dan pembasmi radikal bebas (A.E. Irondi, 2012).

Berbagai penelitian tentang daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) secara masing-masing sebagai senyawa yang memberikan efek antikanker (Nisa et al, 2017; Hutagaol, 2018; Kumala et al, 2018; Putra et al, 2016). Daun kelor sebagai antikanker mengandung senyawa flavonoid, glikosida, tannin, steroid/triterpenoid dan daun Pepaya sebagai antikanker mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, glikosida, dan tannin (Mahatrinny et al, 2013). Kombinasi dari kedua ekstrak tersebut untuk pengobatan kanker merupakan hal yang menarik untuk dipahami.

Ekstrak kelor telah digunakan sebagai bahan obat tradisional, tanaman ini memiliki efek menguntungkan sebagai antiinflamasi, antifibrotik, antimikroba, antioksidan, antihiperlikemia, antitumor dan antikanker (Abdull, et al., 2014). Ekstrak kelor dapat digunakan untuk pengobatan demensia sebagai promotor memori spasial dimana ekstrak daun dapat menurunkan aktivitas asetilkolinesterase sehingga meningkatkan fungsi kolinergik dan memori (Sutalangka, et al., 2013). Tanaman ini juga kaya akan fitosterol seperti stigmasterol, sitosterol dan kampesterol yang merupakan prekursor hormon (Mutiara, et al., 2013).

Ekstrak air daun pepaya mampu bermediasi dengan Th-1 yang berperan pada sistem imun manusia dan secara signifikan mampu menghambat pertumbuhan

sel kanker MCF-7 dan menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-2 dan IL-4 (Otsuki et al., 2010). Kemampuan tanaman pepaya terhadap sitotoksik sel kanker karena adanya senyawa metabolit sekunder berupa enzim papain. Sel kanker sulit terdeteksi selama berbulan-bulan hingga tahunan karena adanya fibrin yang menyaluti sel tersebut. Enzim papain mampu memecahkan dinding sel kanker fibrin dan proteinnya menjadi asam amino (Fauziya et al., 2013). Flavonoid yang terkandung pada daun pepaya yaitu kuersetin, kaempferol, L-penisilamin, dan mirisetin (Nugroho et al., 2017). Kuersetin mampu menghambat apoptosis sel kanker payudara MCF-7 dengan mekanisme meningkatkan Bcl-2, menurunkan ekspresi Bax, menurunkan Her-2, dan menghambat jalur PI3K-Akt (Duo et al., 2012). Pada siklus sel MCF-7, kuersetin memblokir transisi dari fase S ke G2/ fase M (Choi et al., 2001).

Salah satu model sel kanker yang dapat digunakan dalam pengujian obat terapi kanker payudara yaitu sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*). Sel MCF-7 tergolong *cell line adherent* (ATCC, 2019) memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner et al., 1998; Aouali et al., 2003), mengekspresikan estrogen alfa (ER- $\alpha$ ), overekspresi Bcl-2 (Butt et al., 2000; Amundson et al., 2000), tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki et al., 2003; Prunet et al., 2005), resisten terhadap doxorubicin (Zampieri dkk., 2002). Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk mengetahui sitotoksitas kombinasi ekstrak daun kelor dan daun pepaya pada sel MCF-7 (kultur sel kanker payudara) dan sel Vero (kultur sel non kanker).

## **B. Rumusan Masalah**

Penelitian bahan tanaman alami yang digunakan sebagai agen antikanker secara *in vitro*, khususnya yang mengandung flavonoid dan antioksidan terhadap kultur sel kanker terus dilakukan untuk mencari alternatif pilihan pengobatan lain sehingga rumusan masalah yang akan diteliti pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimanakah efek sitotoksisitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai  $IC_{50}$ ?
2. Bagaimanakah efek sitotoksisitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai viabilitas sel?
3. Bagaimanakah efek sitotoksisitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai indeks selektivitas?
4. Bagaimanakah efek sitotoksisitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai indeks kombinasi?

## **C. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksisitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.

## **2. Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui efek sitotoksitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh.
- b. Mengetahui efek sitotoksitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai viabilitas sel yang diperoleh.
- c. Mengetahui efek sitotoksitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai indeks selektivitas yang diperoleh.
- d. Mengetahui efek sitotoksitas dari pemberian ekstrak etanol daun kelor dan ekstrak etanol daun pepaya sebagai ekstrak kombinasi terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 berdasarkan nilai indeks kombinasi yang diperoleh.

### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

#### **1. Manfaat Pengembangan Ilmu**

Pada bidang akademik dan pengembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan dapat menambah keragaman keilmuan tentang efek antikanker dari

kombinasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun pepaya, khususnya untuk kanker payudara dengan menggunakan kultur sel kanker MCF-7.

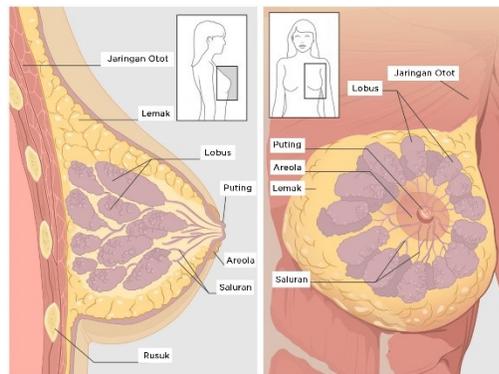
## **2. Manfaat Aplikasi**

Pada bidang aplikasi, penelitian ini dapat memberikan informasi pilihan jenis herbal tradisional sebagai terapi antikanker dan kewaspadaan kepada masyarakat dalam pemanfaatan daun kelor dan daun pepaya.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tinjauan Umum Anatomi dan Fisiologi Payudara

Payudara terletak di fascia superficialis yang meliputi dinding anterior thorax, tepat diatas costa II sampai VI dan terbentang dari pinggir lateral sternum sampai linea axillaris media. Pinggir lateral atas payudara meluas sampai sekitar pinggir bawah musculus pectoralis major dan masuk ke axilla. Payudara terdiri atas sepasang yang beratnya kurang lebih 200 gram dengan bentuk dan ukuran bervariasi bergantung pada aktivitas fungsionalnya. Payudara akan membesar saat hamil dan menyusui sekitar 600 gram hingga 800 gram, lalu biasanya mengecil setelah terjadi menopause. Pembesaran ini utamanya disebabkan oleh pertumbuhan stroma jaringan penyangga dan penimbunan jaringan lemak (Junquiera, 2003).



Gambar 2.1 Anatomi Payudara

Setiap payudara terdiri atas 1525 lobes tipe tubulo alveolar yang berfungsi untuk menghasilkan ASI. Tiap lobus terpisah oleh jaringan pengikat interlobular dan

jaringan adipose, setiap lobus terdiri dari lobulus lobulus yang dipisahkan oleh jaringan pengikat intralobular. Lactiferous duct berdiameter 24.5 cm bermuara secara terpisah pada nipple yang memiliki 1525 openings berdiameter 0.5 mm. Struktur histologis mammary glands dipengaruhi oleh jenis kelamin, usia, status, fisiologis (Eroschenko, 2005).

- *Lactiferous sinuses* tersusun atas epitel pipih berlapis banyak. Epitel ini segera berganti menjadi epitel kubus atau silindris berlapis banyak. Lining dari lactiferous dan kelenjar terminal disusun oleh epitel kubus sederhana yang dilapisi sel miopitelial.
- Jaringan ikat yang mengelilingi alveoli mengandung banyak limfosit dan sel plasma. Sel Plasma meningkat pesat pada akhir kehamilan, berperan dalam sekresi Immunoglobulin A.
- Struktur histologis mengalami perubahan pada siklus menstruasi, dimana terjadi proliferasi sel-sel duktus disekitar waktu ovulasi saat esterogen mencapai puncak akumulasi pada jaringan ikat saat fase pramenstrausi menimbulkan pembesaran pada payudara.
- *Nipple* berbentuk kerucut, berwarna merah muda/coklat muda/coklat tua. Bagian luarnya dilapisi epitel pipih berlapis banyak yang mengalami keratinisasi dan langsung berhubungan dengan kulit disekitarnya banyak terdapat ujung saraf sensori.

- Areola merupakan area kulit berpigmen di sekitar *nipple*. Warnanya semakin gelap saat kehamilan karena akumulasi melanin, warnanya lebih cerah setelah melahirkan tapi jarang dapat kembali ke warna semula.

Payudara wanita mengalami tiga jenis perubahan yang dipengaruhi oleh hormon. Perubahan pertama terjadi sejak masa hidup anak melalui masa pubertas hingga menopause. Estrogen dan progesteron menyebabkan berkembangnya duktus dan timbulnya sinus sejak masa pubertas. Perubahan berikutnya sesuai dengan daur haid, dimasa pramenstruasi, payudara akan mengalami pembesaran maksimal, tegang, dan nyeri. Perubahan terakhir terjadi dimasa kehamilan dan menyusui, akibat proliferasi dari epitel duktus lobul dan duktus alveolus tumbuh duktus baru sehingga payudara akan membesar. Sekresi hormon prolaktin memicu laktasi, dimana alveolus akan menghasilkan ASI, disalurkan ke sinus yang keluar melalui duktus ke puting susu (Sjamsuhidajat, R., dan De Jong, W., 2005).

## **B. Tinjauan Umum Kanker**

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel menyerang jaringan biologis lainnya, baik pertumbuhan langsung di jaringan tetangganya (invasif) maupun migrasi sel ke tempat yang lebih jauh (metastasis). Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Sel kanker kehilangan fungsi kontrolnya terhadap regulasi daur sel maupun fungsi homeostasis sel pada organisme multiseluler sehingga sel tidak dapat

berproliferasi secara normal. Akibatnya, sel akan berproliferasi terus-menerus sehingga menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal (Diananda, 2009).

Sel kanker berasal dari sel normal tubuh yang mengalami transformasi menjadi ganas oleh karsinogen atau mutasi spontan. Transformasi sejumlah gen hingga bermutasi disebut neoplasma atau tumor. Neoplasma adalah jaringan abnormal, terbentuk akibat aktivitas proliferasi yang tidak terkontrol (neoplasia). Di tahap awal, neoplasma berkembang menjadi karsinoma in situ, dimana sel pada jaringan tersebut masih terlokalisasi dan mungkin memiliki kesamaan fungsional dengan sel normal (King, 2000). Sel neoplasma berikutnya akan mengalami perubahan morfologi, fungsi, dan siklus pertumbuhan yang mengakibatkan disintegrasi dan hilangnya komunikasi antarsel. Tumor diklasifikasikan sebagai benigna, yakni kejadian neoplasma bersifat jinak dan tidak menyebar ke jaringan disekitarnya. Sementara, maligna disinonimkan sebagai tumor yang melakukan metastasis, yakni menyebar dan menyerang jaringan lain sehingga sering disebut sebagai kanker. Kanker sering dikenal sebagai tumor, tetapi tidak semua tumor disebut kanker (Diananda, 2009).

Sel kanker memiliki perbedaan yang sangat signifikan dengan sel normal. Beberapa sifat-sifat umum sel kanker adalah:

1. Sel kanker menunjukkan instabilitas genetik, sifat ini memudahkan terjadinya mutasi gen-gen yang lain dan terjadinya akumulasi kelainan genetik. Sumber

utama instabilitas genetik adalah kehilangan “*telomeric DNA*” berakibat instabilitas kariotip dan amplifikasi maupun delesi segmen-segmen kromosom.

2. Sel kanker seringkali ditemukan dalam lingkungan mikro inflamatorik, paradigma baru menyatakan bahwa lingkungan mikro mempunyai pengaruh yang besar terhadap perkembangan kanker, khususnya lingkungan mikro inflamatorik. Saat ini hampir semua lesi neoplastik mengandung sel-sel imun dengan densitas bervariasi yang sebenarnya dimaksudkan untuk mengeradikasi tumor. Inflamasi berkontribusi pada pertumbuhan sel ganas dengan mensuplai molekul-molekul bioaktif, termasuk diantaranya faktor pertumbuhan yang memberi sinyal pertumbuhan, faktor survival yang membatasi apoptosis, factor proangiogenik, dan juga dapat melepaskan bahan kimia seperti ROS yang bersifat mutagenik.
3. Sel kanker dapat tumbuh tanpa memerlukan rangsangan pertumbuhan eksogen (*sustained growth signaling*). Ketidakbergantungan pertumbuhan sel kanker ini dapat disebabkan 3 hal, yaitu perubahan sinyal pertumbuhan ekstrasel sendiri, perubahan transduser trans-seluler sinyal-sinyal itu, atau perubahan dalam sirkuit intraseluler yang menerjemahkan sinyal menjadi *action*. Perubahan yang paling kompleks terjadi pada komponen sirkuit *downstream* dalam sitoplasma diantaranya yang memegang peran penting adalah kaskade SOS-Ras-Raf-MAKP. Mutasi pada gen-gen ini mengakibatkan berlangsungnya stimulasi pertumbuhan tanpa adanya

rangsangan melalui *upstream*. Selain itu sel kanker dapat memproduksi ligan faktor pertumbuhan sendiri.

4. Sel kanker tidak sensitif terhadap sinyal anti-pertumbuhan (*negative feedback loop*) atau mampu menghindar dari supresor pertumbuhan.
5. Kemampuan apoptosis sel kanker menurun, mesin apoptosis dapat dibagi dalam 2 komponen yaitu sensor dan efektor. Sensor bertanggung jawab atas pemantauan lingkungan ekstrasel maupun intrasel yang normal atau abnormal, yang mempengaruhi apakah sel akan hidup atau mati. Efektor yang paling penting dari apoptosis adalah berbagai jenis protein caspase yang sering disebut eksekutor apoptosis. Gangguan proses apoptosis dapat disebabkan oleh ekspresi berlebihan onkogen dan mutasi p53.
6. Kemampuan proliferasi tidak terbatas (*Immortal*), salah satu diantara faktor yang berperan adalah pemeliharaan telomere, telomere akan memendek setiap kali sel membelah, disisi lain pada sel kanker, enzim telomerase akan mencegah pemendekan telomere dan panjang telomere dipertahankan di atas ambang batas kritis, dan hal inilah yang menyebabkan sel dapat membelah atau berproliferasi tanpa batas.
7. Mesin metabolisme sel kanker tidak berfungsi baik, proliferasi sel secara terus menerus dan tidak terkendali bukan saja berakibat pertumbuhan tidak terkontrol tetapi juga menyebabkan kebutuhan metabolisme energy bertambah untuk menunjang pertumbuhan dan pembelahan sel.

8. Sel kanker memiliki kemampuan menghindar dari sistem imun, berbagai cara oleh sel kanker agar dapat mengelak dari sistem imun sehingga selnya tidak dikenal oleh sel-sel imun, dan berinteraksi dengan sel-sel imun dalam lingkungan mikro tumor yang berakibat progresi yang meningkatkan perkembangan tumor.
9. Kemampuan angiogenesis yang terus menerus, untuk menjamin suplai oksigen dan makanan, sel ganas meningkatkan kemampuan untuk angiogenesis dengan berbagai strategi diantaranya dengan meningkatkan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *acidic/basic fibroblast growth factor* (FGF1/2).
10. Kemampuan invasi dan metastasis, berbagai protein yang terlibat dalam menahan sel agar tidak terlepas ke sekitarnya pada sel kanker mengalami gangguan, salah satu di antaranya adalah *cell adhesion molecule* (CAM) dan integrin yang menghubungkan sel dengan matriks ekstraseluler serta *E-cadherin*. Gangguan atau inaktivasi ini berakibat sel tidak lagi melekat satu sama lain dan memudahkan sel terlepas dari kelompoknya. Selain itu ekspresi berbagai protease juga meningkat sehingga sel mudah menginvasi jaringan sekitarnya.

Kesepuluh kemampuan sel kanker di atas diperoleh sel kanker baik langsung maupun tidak langsung selama perkembangan kanker melalui perubahan pada berbagai gen (Kresno, 2014).

## 1. Karsinogenesis

Kanker yang terbentuk disebabkan karena akibat akumulasi kerusakan sel tertentu dalam tubuh. Serangkaian proses berkembangnya kanker disebut karsinogenesis yang menunjukkan perubahan genetik dan menyebabkan transformasi progresif sel normal menjadi sel malignan (ganas). Perubahan berawal dari mutasi somatik satu sel tunggal yang mengakibatkan perubahan dari normal menjadi hiperplastik, displastik, dan pada akhirnya menjadi suatu keganasan atau malignansi (memiliki kemampuan metastasis atau menginvasi jaringan di sekitarnya). Perubahan genetik dipengaruhi oleh beberapa gen seperti tumor suppressor genes (pRb, p53, PTEN, E-cadherin) dan proto-oncogenes (ras, c-myc, Bcl-2). Karsinogenesis dapat dibagi menjadi empat tahap utama, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis (Tsao, et al., 2004).

Tahap pertama pada karsinogenesis adalah tahap inisiasi, merupakan hasil perubahan genetik yang mengarah pada proliferasi tidak terkontrol (abnormal) sel. Tahap inisiasi dapat terjadi melalui jalur germinal dan somatic, namun pada banyak kasus diperoleh secara somatik akibat terjadi kesalahan saat pembelahan sel atau paparan karsinogen spesifik seperti tobako dan radiasi. Pada tahap ini, senyawa yang berpotensi sebagai senyawa karsinogen diaktivasi terlebih dahulu di dalam tubuh terutama di hepar menjadi senyawa metabolitnya. Senyawa metabolit ini ada yang bersifat reaktif, mutagenik, dan mampu berikatan dengan makromolekul di dalam tubuh seperti DNA dengan ikatan *irreversible*. Sel yang mengalami inisiasi atau

prakanker dapat kembali ke tingkat normal secara spontan, tetapi pada tingkat lebih lanjut dapat menjadi ganas (malignan) (King, 2000).

Selanjutnya tahap promosi yang merupakan tingkat lanjutan dari tahap inisiasi. Pada tahap ini, sel mulai mengalami hiperplastik pada inti sel. Berbeda dengan tahap inisiasi yang dapat melewati jalur germinal dan somatik, tahap promosi hanya diketahui terjadi melalui jalur somatik. Pada tahap promosi, sel akan memperoleh beberapa keuntungan selektif untuk tumbuh sehingga pertumbuhannya menjadi cepat dan berubah menjadi tumor jinak. Tahap promosi tidak melibatkan perubahan struktural dari genom secara langsung, tetapi biasanya terjadi perubahan ekspresi gen yang terinisiasi (Tsao, et al., 2004; King, 2000). Pada tahap progresi, kemampuan pembelahan yang tinggi menuntun terbentuknya koloni sel yang lebih besar melalui perubahan genetik lebih lanjut dan munculnya keistimewaan lain seperti peningkatan mobilitas dan angiogenesis. Pada tahap ini, sel tumor dikatakan sebagai sel malignan. Pada fase ini juga akan terjadi karsinoma dan metastasis melalui aktivasi onkogen dan malfungsi dari enzim topoisomerase (King, 2000).

Tahap metastasis merupakan tahap akhir dalam karsinogenesis. Pada tahap ini, sel kanker melakukan invasi ke jaringan lain di dalam tubuh melalui pembuluh darah, pembuluh limpa, atau rongga tubuh. Sel malignan yang bermetastasis ini masuk melalui basement membran menuju saluran limfoid. Sel tersebut akan berinteraksi dengan sel limfoid yang digunakan sebagai inangnya. Selanjutnya, sel kanker akan masuk ke jaringan lainnya membentuk tumor sekunder dengan didukung

kemampuan neoangiogenesis yang dimilikinya. Tahap metastasis dapat berlangsung karena melemahnya ikatan antarsel yang disebabkan oleh terdegradasinya CAMs (*Cell-cell Adhesion Molecules*) dan *E-cadherin* sebagai molekul yang menjaga pertautan antarsel. Molekul tersebut diketahui sudah sangat sedikit bahkan tidak ditemukan lagi pada sel kanker, sehingga proses metastasis dapat terus terjadi (King, 2000).

## **2. Kanker Payudara**

Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epithelial payudara, yaitu membran mukosa dan kelenjar sehingga kanker payudara tergolong pada karsinoma. Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum diderita oleh wanita selain kanker serviks. Penyebab kanker payudara sangat beragam, antara lain kerusakan pada DNA yang menyebabkan mutasi genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh radiasi yang berlebihan. Selanjutnya karena kegagalan *immune surveillance* dalam pencegahan proses malignan pada fase awal, faktor pertumbuhan yang abnormal, dan malfungsi DNA *repairs* seperti BRCA1, BRCA2, dan p53 (Torosian, 2002).

Kanker payudara terjadi ketika sel pada payudara tumbuh tidak terkendali dan dapat menginvasi jaringan tubuh yang lain baik yang dekat dengan organ tersebut maupun bermetastasis ke jaringan tubuh yang letaknya berjauhan. Semua tipe jaringan pada payudara dapat berkembang menjadi kanker, namun pada umumnya kanker muncul baik dari saluran (*ducts*) maupun kelenjar (*glands*). Perkembangannya

memerlukan waktu berbulan-bulan atau bertahun-tahun sampai tumor tersebut cukup besar untuk dirasakan pada payudara. Deteksi dapat dilakukan dengan mammogram yang kadang-kadang dapat mendeteksi tumor sejak dini (Elwood, et al., 1993).

Peningkatan insidensi kanker payudara disebabkan oleh kegagalan terapi terhadap kanker itu sendiri. Kegagalan ini diakibatkan oleh adanya *multidrug resistance* (MDR) dan terjadi hingga 71% dibandingkan dengan faktor penyebab lainnya (Mechetner, et al., 1998). *Multidrug resistance* atau resistensi obat ini diakibatkan oleh adanya *breast cancer resistance protein* (BCRP) yang salah satunya adalah *P-glycoprotein* (Pgp) (Imai, et al., 2005). Aktivasi Pgp dan peningkatan ekspresinya dapat menurunkan efikasi dari beberapa agen kemoterapi, seperti Taxol dan Doksorubisin (Mechetner, et al., 1998). Penekanan aktivitas Pgp dan ekspresinya mampu meningkatkan efektivitas agen kemoterapi (Zhou, et al., 2006).

Selain itu, paparan estrogen endogen yang berlebihan juga dapat berkontribusi sebagai penyebab kanker payudara. Sekitar 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang bergantung pada estrogen dan sekitar 30% kasus merupakan kanker yang positif mengekspresi *HER-2* berlebihan. Kedua protein tersebut selain berperan dalam metastasis, juga berperan dalam perkembangan kanker payudara (*early cancer development*) (Gibbs, 2000). Proses metastasis kanker payudara diinisiasi oleh adanya aktivasi/ekspresi berlebih beberapa protein, seperti *Estrogen Receptor* (ER) dan *c-erbB-2* (HER-2) yang merupakan protein predisposisi kanker payudara. Aktivasi reseptor estrogen melalui ikatan kompleks dengan estrogen akan

memacu transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Estrogen dapat memacu ekspresi protein yang berperan dalam siklus sel seperti *cyclin D1*, *CDK4*, *cyclin E*, dan *CDK2*. Selain itu, aktivasi reseptor estrogen mampu mengaktifasi beberapa onkoprotein yang berperan dalam sinyal pertumbuhan, misalnya *Ras*, *Myc*, dan *cycD1* (King, 2000). Aktivasi protein ini mengakibatkan adanya pertumbuhan yang berlebihan melalui aktivasi onkoprotein yang lain seperti *P13K*, *AKT*, *Raf*, *ERK*, dan *MAP kinase* (Hahn, et al., 2002). Di lain pihak, kompleks estrogen dengan reseptornya juga akan memacu transkripsi beberapa gen *tumor suppressor*, seperti *BRCA1*, *BRCA2*, dan *p53*. Namun, pada penderita kanker payudara (yang umumnya telah lewat masa menopause), gen tersebut telah mengalami perubahan (*transformed*) akibat dari hiperproliferasi sel payudara selama perkembangannya sehingga tidak berperan sebagaimana mestinya (Clarke, 2001; Ingvarsson, et al., 2002).

### **3. MCF-7**

Sel MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotic Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner, et al., 1998), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi *Bcl-2* (Butt, et al., 2000; Amundson, et al., 2000) dan

tidak mengekspresikan *caspase-3* (Onuki, et al., 2003). Sel MCF-7 tergolong cell line adherent (ATCC, 2008) yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ), resisten terhadap doksorubisin (Zampieri, et al., 2002).

#### **4. Sel Vero**

Sel Vero ATCC CCL-81 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, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia (Goncalves, et al., 2006).

#### **5. Penanganan Kanker**

Penanganan kanker ada dua macam, yaitu pencegahan dan penghambatan kanker. Upaya pencegahan kanker disebut kemopreventif. Senyawa kemopreventif dibagi menjadi dua kategori, yaitu *blocking agent* dan *suppressing agent*. *Blocking agent* mencegah karsinogen mencapai target aksinya, baik melalui penghambatan aktivasi metabolisme maupun menghambat interaksi dengan target makromolekul seperti DNA, RNA, atau protein. Sedangkan *suppressing agent* menghambat pembentukan malignan dari sel yang telah terinisiasi pada tahap promosi atau progresi (Surh, 1999).

Kemopreventif dibagi menjadi tiga golongan, yaitu primer, sekunder, dan tersier. Kemopreventif primer adalah mencegah terjadinya sel kanker sejak tahap premalignan. Usaha pencegahan saat karsinogenesis pada tahap awal malignan adalah kemopreventif sekunder. Sedangkan kemopreventif tersier adalah usaha untuk meminimalkan resiko yang mungkin terjadi setelah terapi untuk malignan primer. Upaya penyembuhan (kuratif) kanker, antara lain kemoterapi menggunakan obat-obatan, seperti golongan siklofosamid, methotreksat, dan 5-fluorourasil. Pada dasarnya kinerja obat-obatan tersebut sama, yaitu menghambat proliferasi sel sehingga sel tidak jadi memperbanyak diri. Kemoterapi bisa diberikan secara tunggal ataupun kombinasi dengan harapan bahwa sel-sel yang resisten terhadap obat tertentu juga bisa merespon obat yang lain sehingga bisa diperoleh hasil yang lebih baik. Dampaknya pada pasien biasanya rambut rontok, selera makan menurun, serta rasa lemah dan letih (Sharma, 2000).

Terapi hormon digunakan untuk jenis kanker yang berkaitan dengan hormon, misalnya kanker payudara (berkaitan dengan hormon estrogen) pada wanita dan kanker prostat (berkaitan dengan hormon androgen) pada pria. Terapi hormon pada dasarnya berusaha menghambat sintesis steroid sehingga sel tidak dapat membelah. Terapi ini membawa dampak negatif bila diaplikasikan pada wanita yang masih dalam usia subur karena dapat menghambat siklus menstruasi. Radioterapi menggunakan sinar-X dengan dosis tertentu dapat merusak DNA dan memaksa sel

untuk berapoptosis. Efek negatif yang ditimbulkan hampir sama dengan kemoterapi (Sharma, 2000; Wargasetia, 2005).

## **6. Terapi Kanker Payudara**

Upaya penyembuhan kanker payudara dapat digolongkan secara pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, radioterapi, dan terapi gen (Sharma, 2000; Wargasetia, 2005). Pada pertengahan abad-20 para klinisi menyadari bahwa tidak semua kanker payudara memiliki prognosis dan membutuhkan tindakan pengobatan yang sama. Penentuan stadium kanker payudara sangat penting sebagai panduan pengobatan dan menentukan prognosinya. Ada hubungan antara stadium kanker dengan angka *10-year relative survival* pada pasien kanker payudara. Terdapat perbedaan yang signifikan diantara stadium kanker payudara. Sebanyak 5-12% dari pasien stadium I/II meninggal dalam 10 tahun pertama setelah diagnosis ditegakkan, dibandingkan pada pasien stadium III yang lebih dari 60%, dan lebih dari 90% pada pasien stadium IV. Sistem staging kanker payudara juga memberikan informasi tentang pilihan terapi yang sesuai berdasarkan stadiumnya. (Rasjidi, 2010).

Klasifikasi tahapan kanker payudara pertama kali dikembangkan oleh Pierre Denoix pada tahun 1942 dengan sistem Tumor-Nodus-Metastasis (TNM). Pembagiannya berdasarkan morfologi tumor yang akan menentukan prognosinya; ukuran dari tumor (T), ada atau tidaknya keterlibatan kelenjar limfe (N), dan adanya metastasis (M) (Rasjidi, 2010).

## 7. Terapi Kombinasi

Terapi pengobatan kanker payudara pada umumnya menggunakan terapi kombinasi (ko-kemoterapi) dengan obat/senyawa yang memiliki efek sinergis terhadap sel kanker, bersifat spesifik, dan memiliki efek toksik seminimal mungkin. Terapi kombinasi hingga saat ini dikembangkan secara empiris. Namun sampai saat ini belum ada terapi pengobatan untuk kanker payudara yang telah metastasis. Hal tersebut menuntut pengembangan cara pengobatan baru bagi kanker payudara. Pemanfaatan senyawa alam yang non-toksik dengan efektivitas tinggi melawan kanker dapat menjadi pilihan pengembangan terapi kombinasi dengan agen kemoterapi (Tyagi, et al., 2004). Oleh karena itu, berbagai metode dapat dilakukan untuk mengembangkan dan mengevaluasi kombinasi terapi yang tepat.

### C. Tinjauan Umum Tanaman

Kelor (*Moringa oleifera* L.) tumbuh dalam bentuk pohon, berumur panjang (*perennial*) dengan tinggi 7 - 12 m. Batang berkayu (*lignosus*), tegak, berwarna putih kotor, kulit tipis, permukaan kasar. Percabangan *simpodial*, arah cabang tegak atau miring, cenderung tumbuh lurus dan memanjang. Perbanyakannya bisa secara generatif (biji) maupun vegetatif (stek batang). Tumbuh di dataran rendah maupun dataran tinggi sampai di ketinggian  $\pm 1000$  mdpl, banyak ditanam sebagai pagar di halaman rumah atau ladang. Susunan tulang daunnya menyirip (*pinninervis*), dimana daun Kelor mempunyai satu ibu tulang yang berjalan dari pangkal ke ujung, dan merupakan terusan tangkai daun. Selain itu, dari ibu tulang itu ke arah samping keluar

tulangtulang cabang, sehingga susunannya seperti sirip–sirip pada ikan. Kelor mempunyai tepi daun yang rata (integer) dan helaian daunnya tipis dan lunak. Berwarna hijau tua atau hijau kecoklatan, permukaannya licin (laevis) dan berselaput lilin (pruinosis). Merupakan daun majemuk menyirip gasal rangkap tiga tidak sempurna (Krisnadi, 2015).

Kelor diakui sebagai tanaman bergizi yang bisa dikonsumsi untuk mengatasi kelaparan karena memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Telah dilaporkan bahwa dalam 100 gram daun kelor mengandung 12 kali vitamin C dibanding jeruk, Vitamin A 10 kali dibanding wortel, protein 9 kali dibanding yogurt, kalium 15 kali dari pada pisang, kalsium 17 kali daripada susu dan besi 25 kali daripada bayam (Karim, et al., 2016). Kandungan gizi ini sangat penting peranannya dalam proses biokimia manusia dan hewan. *Moringaceae* kaya kandungan gula sederhana, rhamnosa, dan senyawa unik yaitu glukosinolat dan isotiosianat (Bennet et al., 2003). Beberapa kandungan bahan aktif daun kelor adalah vitamin, carotenoid, polifenol, phenolic acid, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isotiosianat, tannin, saponin, oksalat dan phytates.

*Carica papaya* Linn. adalah tanaman yang termasuk dalam keluarga *Caricaceae*. Pepaya adalah tanaman besar seperti pohon, dengan batang tunggal yang tumbuh dari 5 hingga 10 m (16 hingga 33 kaki), dengan daun yang tersusun spiral terbatas pada batangnya. Daunnya besar, diameter 50-70 cm, lobus sangat dalam, dengan tujuh lobus. Pohon itu tidak bercabang, kecuali dipotong. Bunganya muncul di

axils pada daun, tumbuh menjadi buah besar. Buahnya matang jika terasa lembut dan kulitnya berwarna kuning ke jingga. Pepaya matang dan hijau memiliki perbedaan nilai gizinya. Bentuk dan susunan tubuh bagian luar tanaman pepaya termasuk tumbuhan yang umur sampai berbunganya dikelompokkan sebagai tanaman buah-buahan semusim, namun dapat tumbuh setahun lebih. Sistem perakarannya memiliki akar tunggang dan akar-akar cabang yang tumbuh mendatar ke semua arah pada kedalaman 1 meter atau lebih menyebar sekitar 60-150 cm atau lebih dari pusat batang tanaman. Batang tanaman berbentuk bulat lurus, di bagian tengahnya berongga, dan tidak berkayu. Ruas-ruas batang merupakan tempat melekatnya tangkai daun yang panjang, berbentuk bulat, dan berlubang. Daun pepaya bertulang menjari dengan warna permukaan atas hijau-tua, sedangkan warna permukaan bagian bawah hijau-muda (Mahendra C & Nikhil D, 2016).

Daun pepaya telah terbukti mengandung banyak komponen aktif yang dapat meningkatkan daya antioksidan total dalam darah dan menurunkan tingkat peroksidasi lipid, seperti papain, chymopapain, cystatin,  $\alpha$ - tokoferol, asam askorbat, flavonoid, glukosisi sianogenik dan glukosinolat. Selain itu, jus daun pepaya *Carica* dikonsumsi untuk aktivitas anti-kanker yang diklaim oleh orang-orang yang tinggal di Gold Coast Australia, dengan beberapa anekdot kasus yang berhasil dilaporkan dalam berbagai publikasi. Ekstrak daun *Carica papaya* juga telah lama digunakan sebagai obat aborigin untuk berbagai gangguan, termasuk kanker dan penyakit menular (Otsuki et al., 2010).

**Tabel 2.1 Klasifikasi Tanaman Kelor dan Pepaya**

Taksonomi	Kelor	Pepaya
<b>Kingdom</b>	Plantae	Plantae
<b>Divisi</b>	Magnoliophyta	Magnoliophyta
<b>Class</b>	Magnoliopsida	Magnoliopsida
<b>Ordo</b>	Capparales	Violales
<b>Familia</b>	Moringaceae	Caricaceae
<b>Genus</b>	Moringa	Carica
<b>Species</b>	<i>Moringa oleifera</i> L.	<i>Carica papaya</i> L.

**Tabel 2.2 Hasil Uji Fitokimia pada Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)  
(Putra et al, 2016)**

No.	Uji Fitokomia	Pereaksi	Perubahan Warna	Keterangan
1	Alkaloid	HCl 2N + pereaksi Wagner Wilstater	Terbentuk endapan coklat Hijau kecoklatan menjadi hijau kekuningan	Alkaloid (+)
2	Flavonoid	Bate Smith-Metcalfe NaOH 10% Akuades,	Hijau kecoklatan menjadi hijau kekuningan Hijau kecoklatan menjadi hijau kekuningan	Flavonoid (+)
3	Saponin	dipanaskan, kocok + HCl 2N	Tidak terbentuk busa yang stabil	Saponin (-)
4	Fenolat	FeCl <sub>3</sub>	Hijau kecoklatan menjadi biru kehitaman	Fenolat (+)
5	Triterpenoida/ Steroida	Lieberman-Burchard H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Hijau kecoklatan menjadi hijau keunguan Hijau kecoklatan menjadi hijau keunguan	Triterpenoid/ steroid (+)
6	Tannin	FeCl <sub>3</sub> Gelatin	Hijau kecoklatan menjadi biru kehitaman Terbentuk endapan	<i>Tannin</i> (+)

Keterangan : (+) = terdapat kandungan kimia, (-) = tidak terdapat kandungan kimia

**Tabel 2.3 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pepaya (Carica papaya L.) (Mahatriny et al, 2013)**

No.	Skrining Fitokimia	Hasil Positif menurut Pustaka	Hasil yang diperoleh	Kesimpulan
1.	Minyak Atsiri	Berbau khas dan tidak terdapat noda pada kertas saring <sup>1</sup>	Tidak berbau khas dan terdapat noda pada kertas saring	Negatif
2.	Alkaloid	<sup>2</sup> Terbentuk endapan jingga (Pereaksi Dragendorff) <sup>2</sup> Terbentuk endapan putih (Pereaksi Mayer) <sup>2</sup> Terbentuk endapan kuning (Pereaksi Hager) <sup>2</sup> Terbentuk endapan merah kecoklatan (Pereaksi Wagner)	Terbentuk endapan jingga Terbentuk endapan putih Terbentuk endapan kuning	Positif
3.	Triterpen	<sup>3</sup> Cincin kecoklatan atau violet	Tidak terbentuk cincin kecoklatan atau violet	Negatif
	Steroid	<sup>3</sup> Cincin biru kehijauan	Tidak terbentuk cincin biru kehijauan	Negatif
4.	Flavonoid	<sup>4</sup> Fluoresensi kuning intensif	Terdapat fluoresensi kuning intensif	Positif
5.	Saponin	<sup>4</sup> Ada busa yang bertahan ± 10 menit setinggi 1-10 cm.	Tidak terbentuk busa stabil yang bertahan selama 10 menit	Negatif
6.	Tanin	<sup>3</sup> Terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan	Terbentuk warna hitam kehijauan	Positif
7.	Glikosida	<sup>4</sup> Terbentuk warna biru atau hijau	Terbentuk warna hijau	Positif

Keterangan : <sup>1</sup>Gunawan dan Mulyani, 2004; <sup>2</sup>Farnsworth, 1966; <sup>3</sup>Ciulei, 1984; <sup>4</sup>Depkes RI, 1995; <sup>5</sup>Robinson, 1991)

#### **D. Uji Sitotoksik**

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel untuk mendeteksi aktivitas antineoplastik suatu senyawa melalui uji kuantitatif dengan mengamati kematian sel. Nilai  $IC_{50}$  merupakan parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik. Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai  $IC_{50}$  yang semakin besar menunjukkan bahwa senyawa tersebut semakin tidak toksik. Melalui uji sitotoksitas, organ target dapat memberikan informasi langsung perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk uji sitotoksik, seperti metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) serta metode reduksi garam tetrazolium seperti MTT, XTT, WST-1, dan WST-8 menjadi senyawa formazan berwarna atau bioeduksi resazurin hanya terjadi pada sel yang aktif secara metabolik. Sel-sel yang berproliferasi secara aktif meningkatkan aktivitas metabolismenya, sementara sel-sel yang terpapar racun akan mengalami penurunan aktivitas (Slater T, Sawyer B, Sträuli U., 1963)(Junedy, 2005)

##### **1. Tes Proliferasi Sel MTT**

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) adalah garam tetrazolium yang larut dalam air yang menghasilkan larutan kekuningan bila dibuat dalam media atau larutan garam yang kekurangan fenol

merah. MTT terlarut diubah menjadi formazan ungu yang tidak larut oleh pembelahan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase. Formazan yang tidak larut dalam air ini dapat dilarutkan menggunakan isopropanol atau pelarut lain, dan bahan terlarut diukur secara spektrofotometri menggunakan absorbansi sebagai fungsi konsentrasi pewarna yang dikonversi.

## **2. Uji Proliferasi Sel XTT**

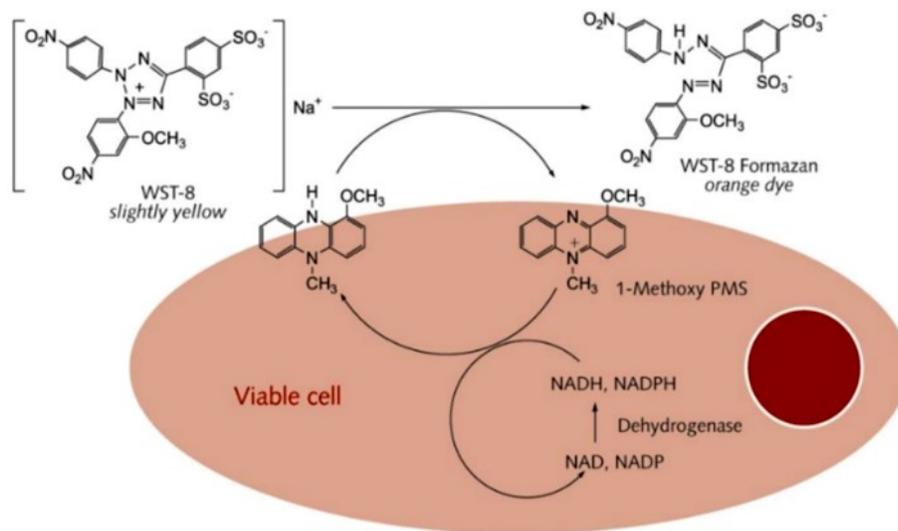
Berbeda dengan MTT, produk pembelahan XTT larut dalam air; Oleh karena itu, langkah pelarutan tidak diperlukan. Garam tetrazolium XTT dipecah menjadi formazan oleh mekanisme seluler yang kompleks. Bioreduksi ini hanya terjadi pada sel yang hidup, dan terkait dengan produksi NAD(P)H melalui glikolisis. Jumlah zat warna formazan yang terbentuk berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang aktif secara metabolik dalam kultur.

## **3. Tes Proliferasi Sel WST-1**

Garam tetrazolium WST-1 yang stabil dipecah menjadi formazan terlarut oleh mekanisme seluler kompleks yang terjadi terutama pada permukaan sel. Bioreduksi ini sebagian besar tergantung pada produksi glikolitik NAD(P)H dalam sel yang hidup. Jumlah zat warna formazan yang terbentuk berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang aktif secara metabolik dalam kultur.

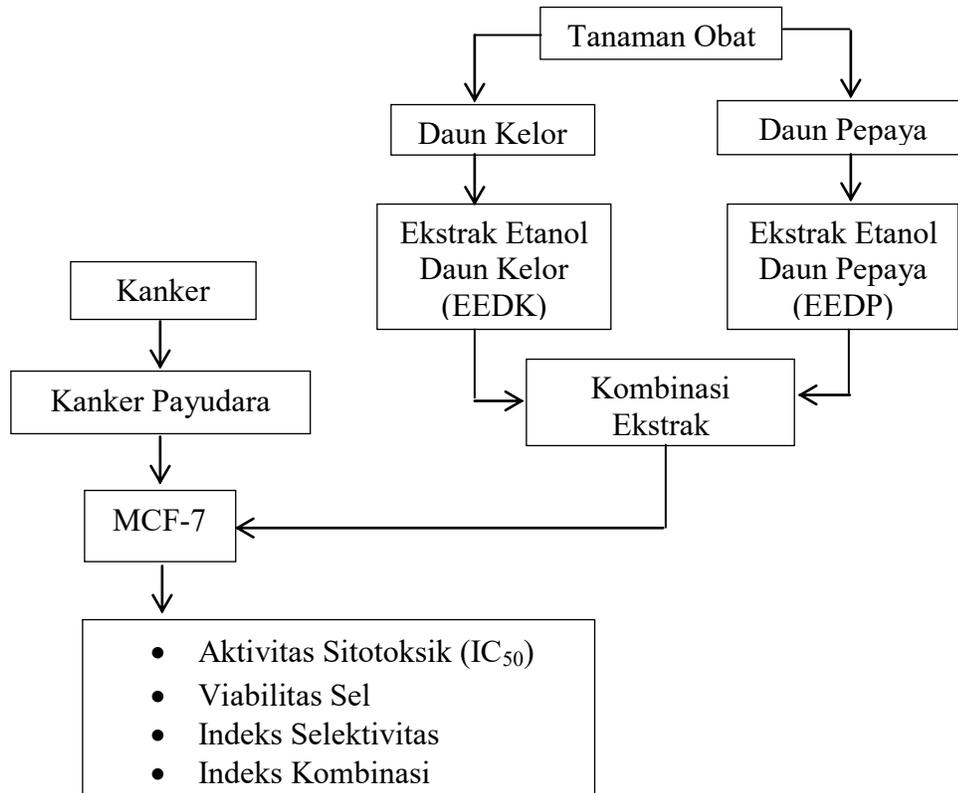
#### 4. Tes Poliferasi WST-8

Pengujian menggunakan WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, garam monosodium), yang menghasilkan pewarna formazan yang larut dalam air pada bioreduksi dengan adanya pembawa elektron, 1-Methoxy PMS. WST-8 direduksi oleh dehidrogenase seluler menjadi produk formazan oranye yang larut dalam media kultur jaringan. Jumlah formazan yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Karena larutan WST-8 sangat stabil dan memiliki sedikit sitotoksitas, inkubasi yang lebih lama hingga 24 sampai 48 jam, memungkinkan uji kolorimetri sensitif untuk penentuan jumlah sel yang layak dalam uji proliferasi dan sitotoksitas. Sensitivitas deteksi lebih tinggi daripada garam tetrazolium lainnya (Hadisaputri & Abdulah, 2020).

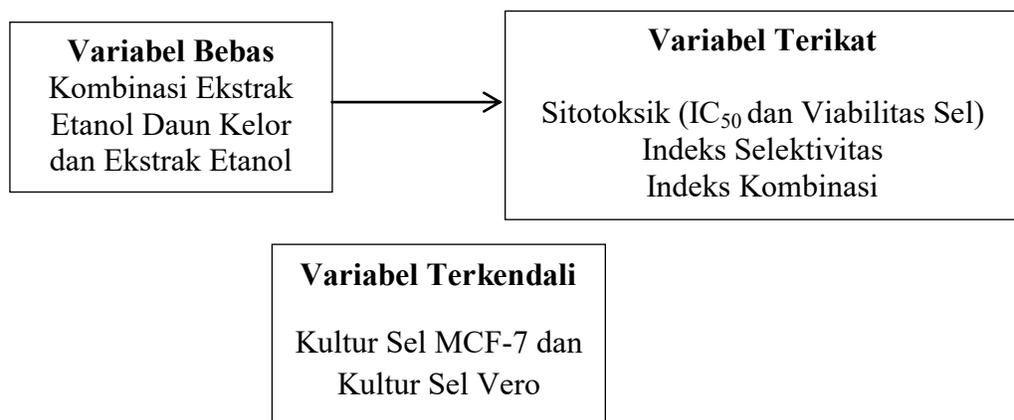


Gambar 2.2. Reaksi perubahan struktur yang terjadi pada pereaksi WST-8 Formazan (Sumber: Hadisaputri & Abdulah, 2020).

### E. Kerangka Teori



### F. Kerangka Konsep



## G. Hipotesis

### 1. Hipotesis (H0)

Tidak ada aktivitas sitotoksik dari kombinasi ekstrak etanol daun kelor dan daun pepaya terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.

### 2. Hipotesis Alternatif (HA)

Ada aktivitas sitotoksik dari kombinasi ekstrak etanol daun kelor dan daun pepaya terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.

## H. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional
1.	Ekstrak	Zat yang diperoleh dari hasil ekstraksi suatu bahan mentah secara kimiawi menggunakan pelarut tertentu serta senyawa kimia yang diekstrak meliputi minyak atsiri, senyawa aromatic, ester dll.
2.	Kultur Sel Vero	Sel non kanker yang dapat di peroleh dari organ dan jaringan melalui proses isolasi (sel epitel ginjal)
3.	Kultur MCF-7	Line sel kanker yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) positif reseptor estrogen dan berlebihan dalam ekspresi Bcl-2. Sel ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10%, antibiotic Penicillin-streptomycin 1%, Fungizone 1% dan gentamycin 1%
4.	Uji Sitotoksik	Konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel MCF-7 dan Vero ( $IC_{50}$ ), diukur dengan menggunakan Graphpad prism <i>software</i> .
5.	Uji Viabilitas Sel	Mengevaluasi presentase sel hidup setelah diberikan ekstrak uji, dihitung dengan menggunakan reagent WST assay dan mengukur absorbansinya dengan ELISA reader.
6.	Indeks Selektivitas	Selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel MCF-7 dibandingkan sel Vero.
7.	Indeks Kombinasi	Parameter interaksi kombinasi antar kedua ekstrak pada rentang sinergis sampai dengan antagonis dengan menggunakan data absorbansi dari pengukuran ELISA reader.