

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Oksidasi merupakan suatu proses penting yang terjadi pada tubuh makhluk hidup (Rosidah, 2008). Proses ini menyediakan energi yang dibutuhkan untuk fungsi seluler. Sebagian besar energi kimia dalam tubuh ada dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) dan diproduksi selama pernapasan aerobik. Oksidasi nutrisi dilakukan oleh enzim pengoksidasi yang tereduksi selama rantai respirasi di organel mitokondria. Saat transmisi elektron menuju oksigen, gradien proton terbentuk dan memungkinkan pembentukan ATP (Vašková, 2012). Pada kondisi tertentu misalnya reaksi inflamasi atau paparan polusi udara yang berlebih, transmisi satu elektron berpeluang besar mengarah ke pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang mana ROS ini cenderung mendonasikan oksigen pada zat lain akibat adanya elektron yang tidak berpasangan (Vašková, 2012; Lobo, 2010). Senyawa dengan elektron yang tidak berpasangan ini dikenal sebagai radikal bebas dan bersifat tidak stabil serta sangat reaktif. Radikal bebas dapat menyerang makromolekul penting sehingga menyebabkan kerusakan sel dan gangguan homeostasis. Target dari radikal bebas ini meliputi segala jenis molekul dalam tubuh diantaranya lipid, asam nukleat, dan protein (Lobo, 2010). Produksi radikal bebas ROS yang berlebihan serta tidak diimbangi dengan pertahanan antioksidan yang cukup dapat mengakibatkan suatu kondisi yang disebut sebagai stres oksidatif (McCord, 2000). Stres oksidatif dikaitkan dengan penyebab dari berbagai penyakit termasuk kanker, diabetes, Alzheimer, jantung coroner dan penuaan (Rosidah, 2008). Oksigen memang suatu elemen yang sangat diperlukan bagi tubuh tetapi dalam situasi tertentu memiliki efek merusak pada tubuh manusia (Lobo, 2010).

Spesies oksigen reaktif (ROS) misalnya anion superoksida, hidrogen peroksida, hidroksil radikal dan keseluruhan metabolit biologis ROS yang lain, berperan penting dalam proses karsinogenesis. ROS menginisiasi kerusakan DNA dengan merusak untai, memodifikasi basa nitrogen dan membentuk *DNA protein cross-links* (Lobo, 2010). Banyak penelitian menjelaskan bahwa radikal bebas

terlibat pada proses karsinogenesis, mutasi, dan transformasi. Nukleotida oksidatif seperti glikol, dTG, dan 8-hidroksi 2-deoksiganosin juga ditemukan meningkat selama proses oksidatif yang menginduksi kerusakan DNA akibat paparan radikal bebas (Lobo, 2010). Pernyataan ini jelas membuktikan keberadaan radikal bebas dapat menyebabkan mutasi, transformasi dan akhirnya kanker.

Antioksidan adalah molekul yang mampu mendonorkan elektron pada radikal bebas ROS untuk menetralkannya sehingga dapat mengurangi aktivitas radikal bebas yang merusak tubuh (Halliwell, 1995 dalam Lobo, 2010). Antioksidan dapat mengurangi stres oksidatif penginduksi karsinogenesis dengan menetralkan ROS dan/atau menghambat proliferasi sel sekunder akibat fosforilasi protein (Lobo, 2010). Antioksidan biasanya ditemukan pada tanaman yang mengalami stres lingkungan dalam bentuk senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk melawan kerusakan oksidatif (Krishnan, 2015). Di alam, antioksidan meliputi dua jenis yakni antioksidan enzimatis dan antioksidan nonenzimatis. Antioksidan enzimatis meliputi *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *peroxidase* (POX), dan *ascorbate peroxidase* (APX) sementara antioksidan nonenzimatis meliputi antosianin, asam askorbat, *α -tocopherol*, *β -carotene*, *catechin*, *coumarin*, flavonoid, lignan, dan senyawa- senyawa polifenolik (Jaleel, 2009; Khalaf, 2008). Senyawa- senyawa fenolik yang merupakan contoh dari antioksidan diketahui memiliki kemampuan sebagai agen antikanker karena kemampuannya untuk (a) menginisiasi *cell cycle arrest*; (b) menghambat kaskade pensinyalan onkogenik yang mengendalikan proliferasi sel, angiogenesis dan apoptosis; (c) menurunkan level ROS; (d) meningkatkan produksi lebih banyak protein penekan tumor seperti p53; dan (e) meningkatkan kemampuan sel kanker untuk berdiferensiasi dan berubah menjadi sel normal (Anantharaju *et al.*, 2016).

Banyaknya penelitian tentang radikal bebas dan potensi aktivitas antioksidan dalam melawan radikal bebas telah membuka era baru dalam hal manajemen kesehatan dan penyakit (Aruma, 2003), khususnya manajemen pengobatan melawan kanker. Tumbuhan merupakan bagian penting dari cadangan bahan obat di alam dan dengan kemampuannya yang luar biasa yakni dapat dikatakan hampir tidak memiliki efek samping yang umumnya disebabkan oleh obat sintetis dan bahan kimia (Fennell, 2004). Fitomedis dan etnofarmakologi telah terbukti sangat

efektif dalam pencegahan dan penyembuhan penyakit manusia termasuk kanker yakni sebagai agen kemopreventif karena aktivitas pembersihan oleh antioksidan terhadap radikal bebas (Mohan, 2020). Selain dapat diaplikasikan sebagai agen kemopreventif, pengobatan berbasis tanaman herbal juga dapat digunakan sebagai pendamping dari kemoterapi kanker yang berbasis pengobatan sintetis. Interaksi sinergis keduanya sangat bermanfaat untuk menurunkan dosis agen kemoterapi kimia yang selama ini menjadi permasalahan kemoterapi kanker yakni resistensi terhadap agen sitotoksik (Mohan, 2020).

Sambung nyawa (*Gynura procumbens*) merupakan tumbuhan *evergreen* tahunan dari kelompok Asteraceae yang telah dimanfaatkan secara empiris oleh masyarakat di daerah tropis, sebagai obat anti-inflamasi, antikanker, anti-diabetes, anti-virus herpes simpleks, dan anti-ulcerogenik (Mou, 2016; Rosidah, 2008). Manfaat kesehatan dari mengonsumsi *Gynura procumbens* ini terkait dengan sejumlah senyawa bioaktif yang ditemukan di dalamnya, seperti saponin, flavonoid, terpenoid dan fenolik (Akowuah, 2002). Senyawa fenolik kaya akan gugus hidroksil dan dipercaya sebagai agen penetral radikal bebas serta perannya sebagai antioksidan. Polifenol merupakan senyawa multifungsi yang berperan sebagai agen pereduksi karena kemampuannya mendonorkan atom hidrogen, sebagai agen pengkelat ion-ion logam, dan penetral oksigen singlet (Rosidah, 2008). Pada identifikasi senyawa fenolik menggunakan metode analisis *reverse phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC), asam-asam fenolik seperti *gallic*, *protocatechuic*, *p-hydroxybenzoic*, *chorogenic*, *vanillic*, *caffeic*, *syringic*, *p-coumaric*, *ferulic* dan asam-asam *sinapic* diketahui terdapat dalam ekstrak daun *Gynura procumbens* (Kaewseejan, 2015). Untuk mengetahui potensi antioksidan *Gynura procumbens*, salah satu uji yang dapat dilakukan adalah menentukan kandungan total fenolik (*Total Phenolic Content*, TPC). Hal ini dikarenakan aktivitas antioksidan dikaitkan dengan kadar TPC yang tinggi (Bakar, 2009). Penentuan TPC biasanya dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Metode Folin-Ciocalteu adalah uji berbasis transfer elektron yang memberikan kapasitas reduksi pada suatu bahan yang kemudian hasilnya dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE) per g berat kering (mg GAE / g DW) yang merupakan kandungan total senyawa fenolik dari bahan yang bersangkutan (Kaewseejan *et al.*, 2015).

Banyaknya total senyawa fenolik dari ekstrak tumbuhan yang dapat dideteksi bergantung pada pelarut yang dipilih untuk ekstraksi (Noreen, 2017). Ekstraksi dengan pelarut metanol 80% pada suhu di bawah 60°C akan memberikan retensi yang lebih besar dari total kandungan fenolik (Akowuah, 2009). Berdasarkan tingginya perolehan TPC, metanol juga diidentifikasi sebagai pelarut ekstraksi *Gynura procumbens* yang lebih efektif dibandingkan dengan ekstrak etanol 95% dan air (Akowuah, 2012).

Selain sebagai antioksidan, senyawa fenolik juga penting untuk kesehatan manusia karena memiliki manfaat sebagai agen antikarsinogenik dengan memodulasi proliferasi sel-sel imun yang mentarget sel-sel kanker. Penelitian yang dilakukan oleh Gao *et al.* (2003) dalam Wahle *et al.* (2010) menyebutkan bahwa *resveratrol*, salah satu senyawa fenolik, pada konsentrasi rendah (<12.5 μM) meningkatkan produksi *concanavalin* yang merupakan sinyal untuk proliferasi sel T. Sejalan dengan penelitian Gao *et al.* (2003) terkait aktivitas antikarsinogenik pada senyawa fenolik, ekstrak etanolik akar *Gynura procumbens* (GPE) yang kaya akan senyawa fenolik menunjukkan efek penghambatan terhadap karsinogenisitas tumor paru-paru pada tikus yang diinduksi oleh *benzo (a) pyrene* (BAP) (Sugiyanto, 2003). Tidak terbatas pada organ akar saja, GPE yang didapat dari organ daun juga menunjukkan aktivitas sitotoksik dan antikanker pada hewan kanker model yang diinduksi 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). Kelompok perlakuan DMBA + 300 mg/kg berat kering GPE menunjukkan efek antiproliferatif yang signifikan daripada kelompok kontrol DMBA (Nisa, 2012). Pada uji *in vitro*, fraksi xix-xx ekstrak etanol akar *Gynura procumbens* memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa dengan nilai IC_{50} 119 $\mu\text{g} / \text{ml}$ dan juga menginduksi apoptosis sel (Meiyanto, 2005). Sejalan dengan penelitian Meiyanto (2005), ekstrak etanol *Gynura procumbens* dari organ daun juga menunjukkan aktivitas sitotoksik, menginduksi apoptosis dan mencegah metastasis sel pada osteosarcoma (U2-OS) *cell line* dibuktikan berturut-turut dengan uji 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (MTT), *flow cytometry* dan penyembuhan luka (*wound healing assay*) (Wang, 2013). Fraksi etil asetat dari ekstrak daun *Gynura procumbens* dilaporkan mampu meningkatkan kerja *doxorubicin* pada sel kanker payudara tipe *cell line* MCF-7 dan T47D (Meiyanto, 2007). Hal ini membuktikan potensi interaksi sinergis antara

pengobatan berbasis tanaman herbal dengan agen sitotoksik kimia. Aktivitas toksisitas atau antikanker pada suatu bahan terhadap sel dapat dilakukan dengan uji *in vitro* menggunakan uji MTT. Aktivitas mitokondria pada sel hidup mampu mengkonversi reagen MTT menjadi kristal formazan. Kemudian kristal formazan dilarutkan dan diukur *optical density* (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 dan 720 nm. Nilai OD dikonversi sebagai persentase viabilitas sel (Van Merloo, 2011). Dari penelusuran pustaka, ekstrak *Gynura procumbens* telah banyak dibuktikan dapat menghambat proliferasi sel kanker akan tetapi belum ada penelitian yang membuktikan ekstrak *Gynura procumbens* dapat menghambat proliferasi sel kanker hepatoma Huh7it. Oleh sebab itu, penulis tertarik untuk meneliti potensi aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* dengan menentukan kandungan total fenolik (TPC) dan kaitannya dalam menghambat proliferasi kultur *in vitro* sel hepatoma Huh7it dibuktikan dengan uji MTT.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah yang dapat disusun adalah sebagai berikut,

1. Berapakah kadar total fenolik ekstrak metanol daun *Gynura procumbens*?
2. Apakah pemberian ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* dapat menghambat proliferasi kultur sel hepatoma Huh7it pada uji MTT?

1.3 Tujuan

Adapun penelitian ini memiliki dua tujuan yakni sebagai berikut,

1. Untuk mengetahui kadar total fenolik ekstrak metanol daun *Gynura procumbens*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* dalam menghambat proliferasi kultur sel hepatoma Huh7it pada uji MTT.

1.4 Asumsi Penelitian

Pada penelitian ini, penulis berasumsi bahwa kultur *in vitro* sel hepatoma Huh7it merupakan model sel-sel hepatoma yang berada di tubuh manusia (*in vivo*) sedangkan ekstrak metanol *Gynura procumbens* diasumsikan sebagai pemberian ko-kemoterapi herbal pada pasien penderita kanker hepatoma. Ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* yang mengandung senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai antioksidan sehingga mampu menghambat proliferasi sel-sel hepatoma melalui penghambatan kaskade pensinyalan onkogenik. Kaskade persinyalan onkogenik yang terhambat mengakibatkan terhentinya siklus sel sehingga proliferasi sel dapat dikendalikan. Selain itu, gugus- gugus hidroksil pada senyawa fenolik ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* dapat berikatan dengan radikal bebas dalam sel kanker sehingga menurunkan level ROS yang merupakan agen penginduksi mitogenesis dan proliferasi sel pada kebanyakan sel mamalia. Reduksi kadar oksidan sel melalui suplementasi antioksidan diharapkan dapat menghambat proliferasi sel *in vitro*.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah apabila ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* memiliki potensi antioksidan yang dibuktikan pada uji total fenolik maka pemberian ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* pada kultur sel hepatoma Huh7it dapat menghambat proliferasi sel yang dibuktikan pada uji toksisitas MTT.

1.6 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai hasil uji kandungan total fenolik ekstrak metanol daun *Gynura procumbens* dan mengetahui perannya sebagai antioksidan dalam menghambat aktivitas proliferasi sel kanker hepatoma Huh7it. Besar harapan penulis, penelitian ini dapat menjadi salah satu usaha preventif untuk mencegah kontribusi stres oksidatif dalam menginduksi kanker sehingga dapat mengurangi potensi timbulnya penyakit kanker.