

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Andrographis paniculata Nees. adalah herba *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees., anggota suku Acanthaceae. Sinonim *A. subspathulata* (C.B.) Clarke., *Justicia paniculata* Burm.f., *J. stricta* Lamk., *J. latebrosa* Russ. Nama daerah Sumatera: Ampadu tanah (Minang), pepaitan (Melayu); Jawa: Sambiloto, bidara, sadilata, takila (Jawa), ki oray, ki peurat, takilo (Sunda). Nama asing Inggris: King of bitter, creat, green chiretta, halviva, kariyat (Acuan Sediaan Herbal, 2010).

Klasifikasi tanaman sambiloto adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermathophyta
Kelas	: Dycotyledone
Ordo	: Tubiflorae
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Species	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees.

(Anju *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 *Andrographis paniculata* Nees. (Acuan Sediaan Herbal, 2010)

2.1.2 Deskripsi Tanaman

Tumbuhan berhabitus terna semusim, tumbuh tegak, tinggi dapat mencapai 90 cm, batang berbentuk segi empat dengan rusuk yang jelas, menebal di bagian buku-buku batang. Helaian daun merupakan daun tunggal, terletak bersilang berhadapan, helaian daun bentuk lanset, ukuran 3-12 x 1-3 cm, panjang tangkai daun 0,2-0,5 cm, pangkal dan ujung helaian daun runcing, tepi daun rata, permukaan atas hijau tua, bagian bawah hijau muda. Perbungaan berupa bunga majemuk malai rata, di bagian ujung batang atau di bagian ketiak daun di bagian atas. Kelopak bunga berlekatan terbagi menjadi 5 helai. Daun mahkota 5, berlekatan membentuk tabung mahkota bunga, panjang tabung 6 mm, panjang helaian daun mahkota lebih dari panjang tabung mahkota, 2 helai daun mahkota di bagian atas (bibir atas) berwarna putih dengan garis kuning di bagian ujungnya, panjang helaian 7-8 mm, bibir bawah terdiri atas 3 helaian daun mahkota, putih atau putih disertai warna ungu. Tangkai sari 5, ukuran tangkai sari sepanjang mahkota bunga, tangkai sari melebar di bagian pangkal. Tangkai putik panjang, melebihi panjang mahkota bunga. Buah berbentuk kapsul, berkatup dan berisi 3-7 biji berwarna cokelat tua. Berbunga sepanjang

tahun, semua bagian tanaman terutama daun sangat pahit (Acuan Sediaan Herbal, 2010).

2.1.3 Habitat

Sambiloto tumbuh liar di tempat terbuka, seperti di kebun, tepi sungai, tanah kosong yang agak lembab, atau di pekarangan. Tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 700 m dpl. sering kali tumbuh berkelompok. Tanaman ini tumbuh di daerah panas di wilayah Asia dengan iklim tropik dan sub tropik seperti di India, semenanjung Malaya, dan hampir pulau di seluruh Indonesia. Syarat Tumbuh: Ketinggian tempat 1-700 m di atas permukaan laut; rata-rata curah hujan tahunan 2.000-3.000 mm/tahun, bulan basah (di atas 100 mm/bulan), bulan kering (di bawah 60 mm/bulan); suhu udara 25-32°C; kelembaban sedang; intensitas cahaya sedang; tekstur tanah berpasir; drainase baik; kedalaman air tanah 200-300 cm dari permukaan tanah; kedalaman perakaran lebih dari 25 cm dari permukaan tanah; keasaman (pH) 5,5 - 6,5; kesuburan sedang – tinggi (Acuan Sediaan Herbal, 2010).

2.1.4 Kandungan Kimia

Seluruh bagian tanaman mengandung andrografolida, 2-cis-6-trans farnesol, 14-deoksiandrografolida, 11,12 – didehidro – 14 – deoksiandrografolida, neoandrografolida, 2 – trans – 6-trans farnesol, deoksiandrografolida-19 α – D-glukosida, 14 – deoksi – 11-dehidroandrografolida, 14 – deoksi – 11 – oksoandrografolida, 5 – hidroksi-7,8,2',3' – tetra-metoksiflavon, panikulida-A, panikulida-B, panikulida-C. Daun mengandung andrografolida, asam kafeat, asam klorogenat, dehidroandrografolida, deoksiandrografolida, deoksiandrografolida – 19 – α – D-glukopiranosida, 14 – deoksi-11,12- didehidroandrografolida, 3,5 –

dekafeoil – d-asam kuinat, neoandrografolida, ninandrografolida, panikulida A, B, C (Acuan Sediaan Herbal, 2010).

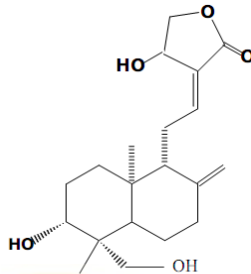


Figure 1: Structure of andrographolide

Gambar 2.2 Struktur Andrografolida (Sukardiman *et al.*, 2007)

2.1.4 Sifat Fisika Kimia

Andrografolid berupa Kristal berwarna putih, mempunyai rasa sangat pahit dengan rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$, dan berat molekul 350,46. Senyawa ini larut dalam methanol, etanol, aseton, piridin, klorofom, asam asetat, sukar larut dalam air dan tidak larut dalam etil eter. Kelarutan andrografolid dalam air pada suhu $25^{\circ}C$ adalah 60 mg/L. Andrografolid mempunyai titik leleh $218-221^{\circ}C$ dan memiliki panjang gelombang maksimal 223 nm (Rosidah, 2010).

2.1.5 Manfaat

Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) adalah bagian penting dari faktor nekrosis tumor yang memiliki potensi besar dalam terapi kanker. Andrografolid (Andro), merupakan lakton diterpenoid yang diisolasi dari sambiloto, diketahui memiliki aktivitas anti-inflamasi dan antikanker. Andro dapat meningkatkan secara signifikan TRAIL-induced apoptosis dalam berbagai kultur sel kanker manusia,

termasuk sel yang resisten TRAIL. Sensitisasi tersebut dicapai melalui transkripsi reseptor kematian 4/death reseptor 4 (DR4), suatu reseptor kematian TRAIL. Mekanisme molekuler yang bertanggung jawab terhadap regulasi DR4, adalah suppresor tumor p53 yang memiliki peran penting dalam aktivasi transkripsi DR4. Andro mampu mengaktivasi p53 melalui fosforilasi p53 dan stabilisasi protein. Pra perlakuan dengan antioksidan (N-asetil sistein) atau c-Jun NH₂-terminal kinase inhibitor (SP600125) efektif mencegah aktivasi Andro- induced p53 dan regulasi DR4 dan bahkan memblokir sensitisasi Andro-induced pada TRAIL-induced apoptosis. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan efek antikanker dari Andro (Acuan Sediaan Herbal, 2010).

2.2 Tinjauan Tentang Kanker

2.2.1 Pengertian Kanker

Kanker atau karsinoma merupakan penyakit yang disebabkan oleh rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan perubahan sel yang diatur oleh gen. Sel-sel jaringan tubuh baru tumbuh abnormal akibat mutasi genetik sel, menginvasi jaringan sekitar, dan metastasis (menyebarkan) ke tempat yang jauh. Menurut Pratiwi (2004), kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah gangguan kardiovaskular (Zebua, 2011).

2.2.1.1 Kanker Serviks

Leher rahim atau serviks merupakan bagian dari sistem reproduksi wanita. Serviks adalah organ yang menghubungkan rahim dengan vagina. Peristiwa kanker serviks diawali dari sel serviks normal yang terinfeksi oleh Human Papillomavirus (HPV). Infeksi HPV umumnya terjadi setelah wanita melakukan hubungan seksual. HPV memiliki lebih dari 100 tipe,

dimana sebagian besar diantaranya tidak berbahaya dan akan lenyap dengan sendirinya. Jenis HPV yang agresif adalah HPV 16 dan 18 yang dapat menyebabkan transformasi sel-sel menjadi ganas di serviks sehingga merupakan penyebab tersering kanker serviks yang terjadi di seluruh dunia (Wijaya, 2010).

2.2.1.2 Kanker Payudara

Kanker payudara adalah kanker yang berasal dari kelenjar, saluran, dan jaringan penunjang payudara tetapi tidak termasuk kulit payudara. Kanker payudara merupakan kanker nomor dua terbanyak yang menyerang wanita Indonesia dan menjadi pembunuh nomor satu wanita di dunia (Mangan, 2003). Sebagian besar kanker payudara mulai tumbuh di dalam garis duktus susu (saluran kelenjar susu). Adanya peningkatan sel dalam duktus disebut hiperplasia. Sel-sel tersebut kemudian menjadi “terlihat aneh” dan disebut hiperplasia atipikal. Sel-sel tersebut lama kelamaan akan menyerupai sel-sel kanker payudara, namun hanya terbatas di dalam duktus. Ini disebut karsinoma duktus in situ (kanker yang terbatas di dalam duktus), atau DCIS (ductal carcinoma in situ). Sel-sel kanker tersebut kemudian akan berinvasi keluar dari duktus dan masuk ke jaringan lemak di sekitarnya dan menjadi kanker duktus yang invasif (Ornish et al., 2007). Pertumbuhan karsinoma payudara juga dirangsang oleh hormon pertumbuhan dan prolaktin (Ganong, 2003).

2.2.1.3 Kanker Kolon

Kanker usus besar (KUB) ditujukan pada tumor ganas yang ditemukan di kolon dan rectum. Kolon dan rectum adalah bagian dari usus besar pada sistem pencernaan yang disebut juga traktus gastrointestinal. Lebih jelasnya kolon berada di bagian proksimal usus besar dan rectum

bagian distal sekitar 5-7 cm di atas anus. Kolon dan rectum merupakan bagian dari saluran pencernaan atau saluran gastrointestinal dimana fungsinya adalah untuk menghasilkan energy bagi tubuh dan membuang zat-zat yang tidak berguna (Zebua, 2011).

2.2.2 Sifat-sifat Kanker

Karakteristik atau sifat-sifat kanker Jinak dan Kanker Ganas dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut ini :

Tabel 2.1 Menunjukkan Karakteristik Kanker Jinak dan Kanker Ganas
(Kumar *et al.*, 2007)

Karakteristik	Kanker Jinak	Kanker Ganas
Diferensiasi / anaplasia	Berdiferensiasi baik; struktur mungkin khas jaringan asal	Sebagian tidak memperlihatkan diferensiasi disertai anaplasia; struktur sering tidak khas
Laju pertumbuhan	Biasanya progresif dan lambat; mungkin berhenti tumbuh atau menciut; gambaran mitotik jarang dan normal	Tidak terduga dan mungkin cepat atau lambat; gambaran mitotik mungkin banyak dan abnormal
Invasi lokal	Biasanya kohesif dan ekspansil, massa berbatas tegas yang tidak menginvasi atau menginfiltrasi jaringan	Invasif lokal, menginfiltrasi jaringan normal di sekitarnya; kadang-kadang mungkin tampak kohesif dan

	normal di sekitarnya	ekspansil tetapi dengan invasi mikroskopik
Metastasis	Tidak ada	Sering ditemukan; semakin besar dan semakin kurang berdiferensiasi tumor primer, semakin besar kemungkinan metastasis

2.2.3 Faktor Risiko dan Predisposisi Terjadinya Kanker

Faktor Risiko dan predisposisi terjadinya kanker dapat terdiri dari beberapa faktor berikut :

a. Faktor geografik dan lingkungan

Karsinogen lingkungan banyak ditemukan di lingkungan sekitar. Contohnya seperti sinar matahari, dapat ditemukan terutama di perkotaan, atau terbatas pada pekerjaan tertentu. Hal tertentu dalam makanan dilaporkan mungkin merupakan faktor predisposisi. Termasuk diantaranya merokok dan konsumsi alkohol kronik.

b. Usia

Secara umum, frekuensi kanker meningkat seiring pertambahan usia. Hal ini terjadi akibat akumulasi mutasi somatik yang disebabkan oleh berkembangnya neoplasma ganas. Menurunnya kompetensi imunitas yang menyertai penuaan juga mungkin berperan.

c. Hereditas

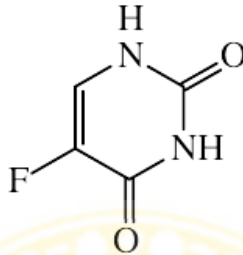
Saat ini terbukti bahwa pada banyak jenis kanker, terdapat tidak saja pengaruh lingkungan, tetapi juga predisposisi herediter. Bentuk herediter kanker dapat dibagi menjadi tiga kategori.

1. Sindrom kanker herediter, pewarisan satu gen mutannya akan sangat meningkatkan risiko terjangkitnya kanker yang bersangkutan. Predisposisinya memperlihatkan pola pewarisan dominan autosomal.
2. Kanker familial, kanker ini tidak disertai fenotipe penanda tertentu. Contohnya mencakup karsinoma kolon, payudara, ovarium, dan otak. Kanker familial tertentu dapat dikaitkan dengan pewarisan gen mutan. Contohnya keterkaitan gen BRCA1 dan BRCA2 dengan kanker payudara dan ovarium familial.
3. Sindrom resesif autosomal gangguan perbaikan DNA. Selain kelainan prakanker yang diwariskan secara dominan, sekelompok kecil gangguan resesif autosomal secara kolektif memperlihatkan ciri instabilitas kromosom atau DNA (Kumar *et al.*, 2007).

2.3 Tinjauan 5 Fluoro Uracil sebagai Kemoterapi Kanker

5 Fluorouracil telah menjadi agen penting dalam pengobatan keganasan gastrointestinal tetapi menghasilkan tingkat respons yang terbatas dari 10-20% pada kanker kolorektal dengan durasi rata-rata 6 -8 bulan. Dalam beberapa tahun terakhir, kemajuan dalam memahami biokimia farmakologi 5 Fluoro Uracil telah menyebabkan lebih rasional Pendekatan dalam merancang kombinasi obat baru yang melibatkan fluoropyrimidine (1, 2). Beberapa kombinasi ini, atau biokimia modulasi, telah terbukti efektif tidak hanya dalam studi praklinis tetapi juga di arena klinis. Leucovorin (3, 4), metotreksat (5-8), levamisol (9, 10), dan

interferon-(11) dengan penjadwalan yang tepat telah meningkatkan terapi kemanjuran 5 Fluoro Uracil dalam penyakit manusia. (Cancer Research, 2013).



FLUOROURACIL

Gambar 2.3 Struktur 5-Fluorouracil (<http://home.caregroup.org>)

Berikut adalah beberapa macam obat anti-kanker :

- a. Kombinasi obat kemoterapi yang telah menjadi standar :
 - CMF : Cyclophosphamide – Methotrexate – 5 Fluoro Uracil
 - AC : Adriamycin (doxorubicin) – Cyclophosphamide
 - CAF : Cyclophosphamide – Adriamycin – 5 Fluoro Uracil
 - CEF : Cyclophosphamide – Epirubicin – 5 Fluoro Uracil
 - T-A : Taxanes - Doxorubicin
- b. Obat kemoterapi second-line antara lain Gemcitabine dan Gapecitabine.
- c. Obat kemoterapi third-line antara lain Vinorelbine, Carboplatin, Cisplatinum (Wulandari, 2012).

2.4 Uji *In Vitro* pada Sel Kanker

2.4.1 Uji Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida Secara *In Vitro* pada sel HeLa

Sel HeLa diresuspensikan dalam media RPMI sehingga diperoleh 5×10^5 sel / ml yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum (FBS), 25 mM

HEPES, 100 unit/ml penisilin, 100 μ g/ml dan 50 μ g/ml gentamisin dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Senyawa andrografolida dilarutkan dalam DMSO dan dibuat dengan konsentrasi: 0; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ;50 ; 100 ; 250 μ g/ml kemudian ditambahkan ke dalam biakan kultur sel HeLa dan diinkubasi selama 24 jam. Efek induksi apoptosis digunakan sel kanker hasil perlakuan dan kemudian sel ditambah RPMI 1640 disentrifugasi pada suhu 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, sebagian sel selanjutnya dipindahkan ke dalam gelas objek dan kemudian ditambah dengan metanol 4% dalam PBS pH7,4 dan dibiarkan selama 25 menit pada suhu 4°C. Campuran ini kemudian dicuci dan ditambahkan pereaksi etidium bromide–akridin orange (1:1),dan biarkan selama 1 menit dalam suhu kamar dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya yang terwarnai diamati pada mikroskop flouresens. Sel yang mengalami apoptosis akan terlihat berwarna orange flouresens hal ini disebabkan adanya ikatan antara etidium-bromida dengan DNA terfragmentasi dari sel kanker yang mengalami apoptosis, sedangkan untuk sel yang hidup akan menunjukkan warna hijau. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung untuk tiap lapang pandang dengan jumlah minimal 100 sel. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian (anava) satu arah ($\alpha=0,05$) dimana hasil uji bermakna jika diperoleh harga $p \leq 0,05$ dan jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Least Significant Difference (LSD). Nilai IC₅₀ apoptosis ditentukan dengan menggunakan persen probit (Sukardiman dkk, 2005).

2.4.2 Uji Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) pada Ekspresi p53 dari Kanker Payudara Tikus yang Diinduksi DMBA

Telah terdokumentasi dengan baik bahwa karsinogen kimia, 7,12 dimetilbenzena antrasena (DMBA), berperan dalam kejadian dan perkembangan kanker payudara. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Andrographis paniculata* Nees ekspresi p53 dan apoptosis pada kanker payudara tikus strain Sprague Dawley yang diinduksi DMBA. Kanker Payudara yang diinduksi DMBA adalah sebuah model yang berguna untuk mengetahui perubahan sel epitel yang terjadi selama perkembangan kanker payudara. Model Kanker Payudara diinduksi DMBA secara per oral 20 mg / kg 10 kali yaitu dua kali seminggu. Kanker Payudara terjadi pada 75% hewan pada sembilan minggu setelah pemberian oral DMBA, Hal itu diwakili dengan benjolan pada kelenjar susu dan meningkatnya volume kelenjar susu dibandingkan dengan F kontrol (1,8) = 731.711; p <0,001. Penelitian ini juga dirancang untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Andrographis paniculata* Nees. pada kanker payudara yang diinduksi oleh DMBA. Pada pemeriksaan imunohistokimia, hal itu menunjukkan bahwa sambiloto dapat menurunkan enzim telomerase, meningkatkan ekspresi protein p53 dan meningkatkan jumlah apoptosis sel epitel (Yurika, 2011).

2.4.3 Uji Bioaktivitas Antikanker terhadap Sel Kanker Usus Besar HCT (ATCC-CCL 116)

Sel ditumbuhkan dengan konsentrasi 2 000 sel dalam 100 μ L media. Media yang digunakan DMEM, FBS, penisilin, dan streptomisin. Ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol 96%. Stok dengan konsentrasi ekstrak 10 000 ppm (nisbah etanol dan media pertumbuhan 1:10) selanjutnya diencerkan bertingkat dengan konsentrasi 1000, 750, 500,

250, 100, dan 50 ppm. Ekstrak ditambahkan setelah sel mencapai konfluen 50% (24 jam). Uji MTT dilakukan pada hari ke-3, dengan menambahkan MTT (5mg/mL) sebanyak 10 μ L per sumur, lalu diinkubasi 4 jam pada suhu 37 °C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan yang dilarutkan dalam HCl 0.1 N dalam isopropanol yang berwarna biru. Pembacaan nilai absorbans dilakukan pada panjang gelombang 595 nm.

2.5 Media Pertumbuhan

Untuk dapat berkembang, sel memerlukan media yang sesuai. Kebanyakan media pertumbuhan yang digunakan merupakan media kimiawi, tetapi ditambahkan dengan serum 5-20% yang mengandung faktor pertumbuhan (stimulan) yang penting untuk pembelahan sel. Media yang bebas serum dengan tambahan stimulan tertentu digunakan untuk beberapa tujuan. Media mengandung larutan garam isotonis, asam amino, vitamin, dan glukosa.

Media tumbuh juga membutuhkan penyangga (buffer) karena terjadinya dua kondisi, yaitu penggunaan flask terbuka menyebabkan masuknya O₂ dan meningkatnya pH, dan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan diproduksinya CO₂ dan asam laktat menyebabkan turunnya pH. Kedua kondisi ini dihadapi dengan memberikan buffer ke dalam media dan ke dalam incubator dialirkan CO₂.

Media kultur lengkap adalah media yang mengandung faktor pertumbuhan seperti *Fetal Bovine Serume* (FBS) dan juga Penisilin-Streptomisin sebagai antibiotik. Pembuatan media kultur lengkap dilakukan di LAF pada kondisi aseptis, sehingga sebelum dan sesudah mengambil bahan yang sudah steril, harus selalu dilakukan pemanasan peralatan di dekat nyala api bunsen (CCRC, 2009).

2.6 Uji Sitotoksitas

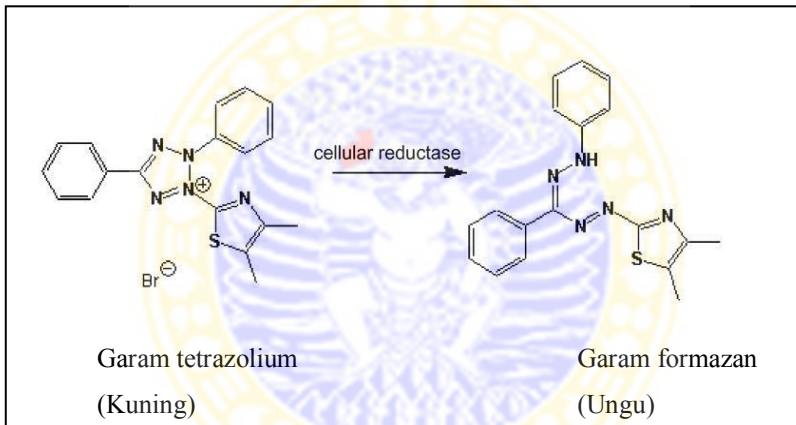
Dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker, evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplastiknya. Evaluasi ini tidak hanya digunakan untuk obat-obat antikanker, tetapi juga untuk obat-obat lainnya, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida dan lainnya. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas.

Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduisibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo* (CCRC, 2009).

2.6.1 Metode MTT

Salah satu metode yang digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT. Prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh system reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Sel dengan konsentrasi 3×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Keesokannya media diambil dan dicuci PBS, selanjutnya ditambahkan 100 μ l media kultur yang mengandung sampel dengan variasi kadar, inkubasi

selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ l media kultur yang mengandung MTT 0,55 mg/ml, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci dengan PBS dan ditambahkan larutan asam isopropanol untuk melarutkan Kristal formazan. Digoyang di atas shaker selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.



Gambar 2.4 Reaksi Reduktase Garam Tetrazolium

Dasar penggunaan ELISA reader dalam imunotoksikologi adalah untuk mendeteksi penyebaran antibody spesifik pada sampel serum yang dihasilkan dari suatu materi yang telah disintesis dalam suatu antigen khusus. Uji ini dapat dibentuk untuk beberapa golongan antibody. Serum antibody spesifik bereaksi dengan antigen tertentu dalam keadaan permukaan yang tidak bergerak untuk membentuk suatu kompleks. Berbagai macam teknik dapat digunakan untuk mengikatkansuatu enzim ke dalam kompleks tersebut. Selanjutnya enzim direaksikan dengan substrat

yang cocok untuk membentuk reaksi warna yang dapat diukur secara spektrofotometri. Intensitas dari reaksi warna tersebut dapat dikorelasikan sebagai jumlah antibody yang dihasilkan (Burlison, 1995).

2.6.2 Metode Biru Tripian (*Direct Counting*)

Uji sitotoksik dilakukan secara manual dengan menghitung jumlah sel hidup dibandingkan dengan kontrol. Perhitungan sel hidup secara manual dilakukan dengan pengecatan menggunakan biru tripan. Sel yang mati akan menyerap warna biru tripan sedangkan sel yang hidup tidak, hal ini disebabkan sel yang mati mengalami kerusakan pada membran selnya, sehingga protein dalam sel keluar dan berikatan dengan biru tripan. Perhitungan jumlah sel yang hidup dilakukan langsung pada *hemocytometer*. Perhitungan sel mati dengan pewarnaan biru tripan ini juga sulit dilakukan karena sukar membedakan sel hidup dengan sel mati. Hal ini kemungkinan disebabkan pemaparan sel dengan biru tripan yang terlalu lama sehingga sel hidup juga akan mulai menyerap warna biru tripan.

2.7 Teori Uji Kombinasi

Saat ini perkembangan terapi kanker modern memberi peluang pemberian kombinasi kemoterapi. Kombinasi kemoterapi (ko-kemoterapi) merupakan strategi terapi dengan mengombinasikan suatu senyawa dengan agen kemoterapi. Kombinasi kemoterapi bertujuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan dan menurunkan efek samping agen kemoterapi. Idealnya obat yang dikombinasi memiliki efek sinergis melawan sel kanker namun toksisitasnya dapat ditoleransi sehingga secara klinik akan lebih efisien dibandingkan dengan agen tunggal. Oleh karenanya desain kombinasi yang tepat diperlukan untuk memperoleh manfaat yang lebih optimal.

Metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah Isobologram dan *Combination Index* (CI). Analisis CI menghasilkan suatu nilai parameter kuantitatif yang menggambarkan efikasi kombinasi menggunakan persamaan :

$$CI = (D)1/(Dx)1+ (D)2/(Dx)2$$

Dengan D_x adalah konsentrasi satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi, yaitu IC₅₀ terhadap pertumbuhan sel kanker payudara, dan $(D)_1$, $(D)_2$ adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama. CI digunakan untuk menentukan efek aditif yang diberikan dua kombinasi senyawa, apakah berupa efek sinergis, aditif atau antagonis (CCRC, 2009).