



Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Sel Hepar *Baby Tikus* (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi (7,12-Dimethylbenz(α)antrasena) (DMBA) secara *in vitro*

Lil Hanifah*, Khalimatus Sa'diyah

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Indonesia
*e-mail korespondensi: lil.hanifah5@gmail.com

Abstract. Cancer occurs because of an error or failure in the condition of the cells resulting in uncontrolled growth factors. The process of cancer is called carcinogenesis, which begins with an increase in the proliferation of cells with genetic mutations resulting in excessive cell reproduction. Cancer cells are initiated by a DNA mutation process, the control of normal cell growth regulation is disrupted resulting in uncontrolled cell proliferation, and finally apoptosis decreases significantly. Several attempts to treat liver cancer have been carried out intensively, namely chemotherapy and radiotherapy. However, these treatments have not been able to effectively combat cancer. This resistance phenomenon has consequences for increasing therapeutic doses. The right therapy strategy is needed to overcome these problems. The use of plants as medicine has now become important for society and has been passed down from generation to generation. One of the plants that has very important benefits for traditional medicine or healing for the community is kesambi (*Schleichera oleosa*). Kesambi (*Schleichera oleosa*) has very important phytochemical elements, including terpenoids, flavonoids, phenolic acid, betulin, betulin acid and others, so that it has enormous benefits in the process of antimicrobial, antioxidant, anticancer. This research is an experimental study using a completely randomized design (CRD) consisting of 6 treatments and 4 replications. K: 50 μ l liver cells + 2650 μ l DMEM media + 300 μ l FBS; P0: 50 μ l liver cells + 2550 μ l DMEM media + 300 μ l FBS + 100 μ l DMBA; P1: 50 μ l liver cells + 2520 μ l DMEM media + 300 μ l FBS + 100 μ l DMBA + 30 μ l of kesambi leaf extract; P2: 50 μ l liver cells + 2505 μ l DMEM media + 300 μ l FBS + 100 μ l DMBA + 45 μ l of kesambi leaf extract; P3: 50 μ l liver cells + 2490 μ l DMEM media + 300 μ l FBS + 100 μ l DMBA + 60 μ l kesambi leaf extract and P4: 50 μ l hepatic cells + 2475 μ l DMEM media + 300 μ l FBS + 100 μ l DMBA + Kesambi 75 leaf extract μ l. The results of this study indicate that kesambi leaf extract (*Schleichea oleosa*) against liver cells of baby rats (*Rattus norvegicus*) induced by 7,12 DMBA has anticancer activity which is shown in hepatic cell confluence in the penis P2, P3 and P4. The anticancer activity on viability was shown in the P3 treatment, while for the cytotoxicity test of the kesambi leaf extract, the LC50 value was 6.76 <1000, so the kesambi leaf extract was toxic and had potential as an anticancer.

Keyword: Anticancer, Kesambi Leaf Extract, Liver Cells, DMBA

Abstrak. Kanker terjadi karena adanya kesalahan atau kegagalan dalam kondisi sel-sel yang mengakibatkan tidak ter kendalinya faktor pertumbuhan. Proses terjadinya kanker disebut karsinogenesis, yang diawali peningkatan proliferasi sel yang mengalami mutasi genetik sehingga terjadi reproduksi sel secara berlebihan. Sel kanker diawali dari proses



mutasi DNA, kendali regulasi pertumbuhan sel normal yang terganggu sehingga terjadi proliferasi sel yang tak terkontrol, dan akhirnya apoptosis menurun secara signifikan. Beberapa usaha pengobatan kanker hati telah dilakukan secara intensif yaitu dengan kemoterapi dan radioterapi. Namun pengobatan tersebut masih belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi. Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penggunaan tanaman sebagai obat saat ini sudah menjadi hal yang penting bagi masyarakat dan sudah diwariskan secara turun temurun. Salah satu tanaman yang mempunyai manfaat yang sangat penting untuk pengobatan atau penyembuhan secara tradisional bagi masyarakat adalah kesambi (*Schleichera oleosa*). Kesambi (*Schleichera oleosa*) mempunyai unsur fitokimia yang sangat penting diantaranya adalah terpenoid, flavonoid, fenolic acid, betulin, betulin acid dan lain-lain, sehingga mempunyai manfaat yang sangat besar dalam proses antimikroba, antioksidan, antikanker. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan. K: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2650 µl + FBS 300 µl; P0: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2550 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl; P1: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2520 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + ekstrak daun kesambi 30 µl; P2: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2505 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 45 µl; P3: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2490 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 60 µl dan P4: Sel hepar 50 µl + media DMEM 2475 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 75 µl. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kesambi (*Schleichera oleosa*) terhadap sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12 DMBA mempunyai aktivitas antikanker yang ditunjukkan pada konfluenitas sel hepar pada perlakuan P2, P3 dan P4. Aktivitas antikanker pada viabilitas ditunjukkan pada perlakuan P3, sedangkan untuk uji sitotoksitas ekstrak daun kesambi diperoleh nilai LC_{50} sebesar $6,76 < 1000$, sehingga ekstrak daun kesambi bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci: Antikanker, Ekstrak Daun Kesambi, Sel Hepar, DMBA

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan diferensiasi sel [1]. Menurut [2], kanker atau dikenal sebagai neoplasma ganas adalah penyakit yang ditandai dengan kelainan siklus sel yang menyebabkan kemampuan sel untuk tumbuh tidak terkontrol, menyerang jaringan biologis di dekatnya dan bermigrasi ke jaringan tubuh yang lain (metastase).

Kanker terjadi karena adanya kesalahan atau kegagalan dalam kondisi sel-sel yang mengakibatkan tidak terkontrolnya faktor pertumbuhan. Proses terjadinya kanker disebut karsinogenesis, yang diawali peningkatan proliferasi sel yang mengalami mutasi genetik sehingga terjadi reproduksi sel secara berlebihan. Sel kanker diawali dari proses mutasi DNA, kendali regulasi pertumbuhan sel normal yang terganggu sehingga terjadi proliferasi sel yang tak terkontrol, dan akhirnya apoptosis menurun secara signifikan [1].

Angka kejadian penyakit kanker di Indonesia (136.2/100.000 penduduk) berada pada urutan 8 di Asia Tenggara, sedangkan di Asia urutan ke 23. Angka kejadian tertinggi di Indonesia untuk laki laki adalah kanker paru yaitu sebesar 19,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 10,9 per 100.000 penduduk, yang diikuti dengan kanker hati sebesar 12,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 7,6 per 100.000 penduduk. Sedangkan angka kejadian untuk perempuan yang tertinggi adalah kanker payudara yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk yang diikuti kanker leher rahim sebesar 23,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 13,9 per 100.000 penduduk [3].

Beberapa gejala umum kanker hepar adalah nyeri di sisi kanan perut bagian atas, nyeri pada bahu sebelah kanan (dikarenakan hati yang bengkak bisa merangsang saraf diafragma, dan saraf ini terhubung ke saraf yang terletak di bahu sebelah kanan), kehilangan nafsu makan dan berat badan, merasa mual, kulit dan mata berwarna kuning serta mengalami asites (pengumpulan cairan dalam perut) [4].

Sel-sel hati atau *hepatosit* mempunyai regenerasi yang cepat. Oleh karena itu hati akan dapat mempertahankan fungsinya apabila terjadi kerusakan yang ringan, akan tetapi akan menjadi fatal jika kerusakan menjadi berat dan serius. Penyebab tersering adalah akibat virus, efek toksik obat, racun, jamur dan lain sebagainya [5].

Kemampuan apoptosis sel hepatosit yang mengalami kanker akan berkurang bahkan hilang sama sekali. Salah satu protein yang berperan dalam proses apoptosis adalah *Caspase*. Proses apoptosis dimulai dengan aktivasi caspase yang mengaktifkan endonuklease sitoplasma, lalu mendegradasi badan inti, dan mengaktifasi protease yang mendegradasi protein inti dan sitoskeletal. Caspase adalah kelompok dari *cysteine-aspartic acid protease*. Kaskade caspase berperan penting pada fase apoptosis sel. Caspase disintesis sebagai rantai tunggal zymogen tidak aktif yang terdiri dari N-terminal prodomain diikuti oleh subunit besar berukuran 20 kDa dan subunit kecil berukuran 10 kDa. Aktivasi dari zymogen didapatkan lewat pemecahan proteolitik pada tempat yang identik

dengan motif caspase yang dikenal. Mekanisme ini memungkinkan caspase dan memproses dirinya sendiri atau caspase zymogen lain [6].

Caspase-3 yang diaktifkan selama proses apoptosis merupakan caspase yang bertanggung jawab terhadap terjadinya cleavage PARP. *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP), telah diteliti sebelumnya sebagai penanda terjadinya proses apoptosis dengan terjadinya cleavage dengan berat molekul 89 kDa dan 24 kDa dari semula 116. Terjadinya cleavage PARP dan cleavage caspase-3 merupakan penanda terhadap terjadinya apoptosis pada sel yang diinduksi dengan senyawa uji [7].

Beberapa usaha pengobatan kanker hati telah dilakukan secara intensif yaitu dengan kemoterapi dan radioterapi. Namun pengobatan tersebut masih belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi [2].

Fenomena resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi. Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penemuan obat baru yang memiliki target molekuler yang spesifik dan mempunyai selektifitas tinggi sangat diperlukan untuk menjawab permasalahan tersebut [2].

Penggunaan tanaman sebagai obat saat ini sudah menjadi hal yang penting bagi masyarakat dan sudah diwariskan secara turun temurun [8]. Salah satu tanaman yang mempunyai manfaat yang sangat penting untuk pengobatan atau penyembuhan secara tradisional bagi masyarakat adalah kesambi (*Schleichera oleosa*) [9].

Kesambi (*Schleichera oleosa*) tergolong dalam Famili Sapindaceae yang mempunyai kandungan tanin rendah. Akan tetapi mempunyai unsur fitokimia yang sangat penting diantaranya adalah terpenoid, flavonoid, fenolic acid, betulin, betulin acid dan lain-lain, sehingga mempunyai manfaat sangat besar dalam



proses antimikroba, antioksidan, antikanker dan dapat digunakan untuk produksi biodiesel [10].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi Kesambi menghasilkan tujuh sterols Scheicherastins (1-7). Scheicherastins yang diisolasi ini mampu menjadi penghalang bagi pertumbuhan sel kanker [11]. Pada hasil ekstraksi menggunakan metanol juga dinilai mampu melawan sel P-388 yang merupakan cell line *lympocitic* leukemia. Isolat Scheicherastins juga dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan CNS SF-295, colon KM 20L2, lung NCI-H460, ovary OVCAR-3, pancreas BXPC-3, dan *cell line* kanker prostat [11].

Fitokimia pada kesambi mampu menginduksi toksik pada sel tumor sebagai agen yang berpasangan dengan *reactive oxygen species* yang diakibatkan oleh radikal bebas [12]. Pada hasil penelitian baru-baru ini mengungkapkan bahwa ekstrak kulit kesambi yang diuji karena potensi mempunyai potensi sitotoksik yang berbeda pada *cell line* seperti pada 502713 (colon), SW-520 (colon), A-549 (lungs), HEP-2 9 liver), SK-NS-H (central nervous system) dan IMR-32 (neuroblastoma) [13]. Pada metode ekstraksi menggunakan etyl asetat, metanol dan air menunjukkan signifikan melawan sitotoksis pada semua *cell line* kecuali IMR-32 [8].

Menurut penelitian yang dilakukan oleh [14], pada uji fitokimia yang dilakukan baik secara kualitatif maupun kuantitatif bahwa ekstrak daun kesambi mempunyai aktivitas antioksidan pada beberapa pelarut yang digunakan. Adapun senyawa metabolit sekunder dari hasil skrining fitokimia yang dihasilkan adalah: alkaloid, flavonoid, steroid, fenolik dan tanin. Hal ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh [15] bahwa pada uji antioksidan dengan DPPH ekstrak daun kesambi menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder diantaranya berupa flavonoid. Senyawa flavonoid salah satunya berperan sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas.

Menurut [16] bahwa flavonoid dianggap sebagai metabolit sekunder yang banyak mempunyai fungsi di bidang farmakologi diantaranya adalah antioksidan, antimutagen, antibakteri, antiangiogenik, antiinflamasi, antialergi, modulasi enzim dan antikanker.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka penelitian ini akan mengkaji aktivitas antikanker ekstrak daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Laminar Air Flow (LAF) (LABTECH), Mikroskop Inverted (Nikon TI-u), Sentrifus (Thermo Scientific), *Automatic Cell Counter* (Invitrogen Thermo Fisher), Inkubator CO² (Thermo Scientific), Elisa Reader, Flowcytometri, Elektroforesis, timbangan analitik, micropipet, *Tissue Culture Disk* (TCD), *plate well* 98, tabung sentrifus 15 ml, tabung endorf 2 ml, filter 0,2 µm, spuit 20 cc, tabung duran 100 ml, beaker glass 100 ml dan enlemeyer 100 ml.

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: simplisia daun kesambi (*Scheichera oleosa*) (Materia Medica), media DMEM (Gibco), Trypsin (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Biowest), PBS (Gibco), DMSO, DMBA, MTT assay, NaHCO₃, penicilin, streptomycin, hepes dan air steril.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi Daun Kesambi

Tahap ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam simplisia kesambi (*Schleichera oleosa*) sebanyak 100 gr dengan metanol 96% 500 ml (1:5) selama 2 x 24 Jam. Setelah 2 x 24 jam rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring kemudian dilakukan penguapan dengan menggunakan *Rorary Evaporator*. Jika sudah dihasilkan hasil ekstrak berbentuk pasta, maka ekstrak siap untuk digunakan.

Pembuatan Media Stock DMEM

Ditimbang 1,35 gr DMEM, 0,37 gr NaHCO₃, 0,006 gr penicilin, 0,01gr streptomycin dan 0,23 gr hepes. Semua bahan tersebut dilarutkan dengan 100 ml *deionized water* (DI) steril, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan

magnetic stirrer dan difilter dengan membran millipore 0,22 μ m. Selanjutnya dimasukkan dalam botol tutup ulir dan disimpan pada suhu 4⁰ C. Media stock siap untuk digunakan.

Isolasi Sel Hepar *Baby Tikus (Rattus norvegicus)*

Bayi tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan berumur 2 hari, bayi tikus didislokasi, dibedah dan diambil organ heparnya, kemudian dicuci dengan 2 ml PBS, 3 ml fungizone dan 1 ml penisilin streptomycin. organ dipindah dan dicacah pada 500 μ l tripsin sampai halus, dihomogenasi dengan spuit. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung sentrifus. Sisa homogenasi ditambah 500 μ l PBS (1:1) kemudian diinkubasi selama 20 menit.

Tabung sentrifus diambil dari inkubator dan di sentrifus 2500 rpm selama 5 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet ditambahkan dengan 3 ml media DMEM, 3 ml fungizone dan 1 ml penisilin streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan 3 ml DMEM 10% FBS dan 3 ml fungizone kemudian disentrifus kembali. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 1 ml kemudian dipipeting. Hasil pelet diambil 50 μ l kemudian dimasukkan ke dalam Multiwell 24 yang telah berisi DMEM 10% FBS dan fungizone. Untuk perlakuan induksi DMBA0,1 μ g/ ml dan diinkubasi 2 hari kemudian diberi perlakuan ekstrak daun kesambi.

Jumlah sel yang ditanam adalah sebanyak 7000 sel pada masing-masing well. Menurut [17] **Freshney (2000)**, jumlah sel yang ditanam dalam multiwell 24 adalah berkisar antara 2x10² sel/ ml sampai dengan 2 x 10⁵ sel/ml. Jumlah sel tersebut setara dengan 2000 sampai dengan 200000 sel/ml.

Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok pada rancangan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kelompok K : Sel hepar 50 μ l + media DMEM 2650 μ l + FBS 300 μ l
2. Kelompok P0 : Sel hepar 50 μ l + media DMEM 2550 μ l + FBS 300 μ l + DMBA 100 μ l

3. Kelompok P1 (1 %) : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2520 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + ekstrak daun kesambi 30 µl
4. Kelompok P2 (1,5 %) : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2505 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 45 µl
5. Kelompok P3 (2%) : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2490 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 60 µl
6. Kelompok P4 (2,5 %) : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2475 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 75 µl

Semua media tanam tersebut dimasukkan ke dalam multiwell dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 ° C.

Induksi Perlakuan DMBA pada Sel Hepar *Baby Tikus (Rattus norvegicus)*

Induksi DMBA terhadap sel hepar yang dikultur dengan konsentrasi 0,1 µg/ml sebanyak 100 µl selama 48 jam. Setelah masing-masing hasil kultur sel konfluen kemudian dicuci dengan 1 ml media DMEM, fungizone dan penicilin streptomycin, setelah itu media diganti dengan media DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak daun kesambi dengan konsentrasi yang berbeda kemudian diamati pada hari ke-1, ke-3 dan ke-5.

Pengamatan Konfluenitas Sel Hepar *Baby Tikus (Rattus norvegicus)*

Pengamatan konfluenitas sel dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan sel hepar pada perlakuan yang berbeda. Konfluenitas sel hepar diamati berdasarkan tingkat perlekatan sel dengan substrat dan ekspansi sel dengan menggunakan *Mikroskop Inverted*.

Apabila sel telah konfluen maka dapat dilakukan pasase dengan cara media dibuang, kemudian dicuci dengan 1ml PBS, fungizone dan penicilin streptomycin. Kemudian dicuci dengan media DMEM, fungizone, penicilin streptomycin kemudian diberi tripsin EDTA 200 µl. Setelah itu dikocok pelan dan dibagi tripsinasi menjadi 2 dan dimasukkan dalam multiwell 24 baru yang telah berisi media DMEM dengan 10% FBS, fungizone, kemudian diinduksi DMBA dengan konsentrasi 0,1 µg/ ml untuk perlakuan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C



dengan 5% CO₂. Setelah 2x24 jam media diganti dengan DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak daun kesambi sesuai dengan perlakuan.

Pengamatan Viabilitas Sel Hepar *Baby Tikus (Rattus norvegicus)*

Perhitungan viabilitas sel hepar dilakukan untuk mengetahui persentase perbandingan antara sel hidup dan sel yang mati. Perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan *Countess Cell*.

Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kesambi Terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA

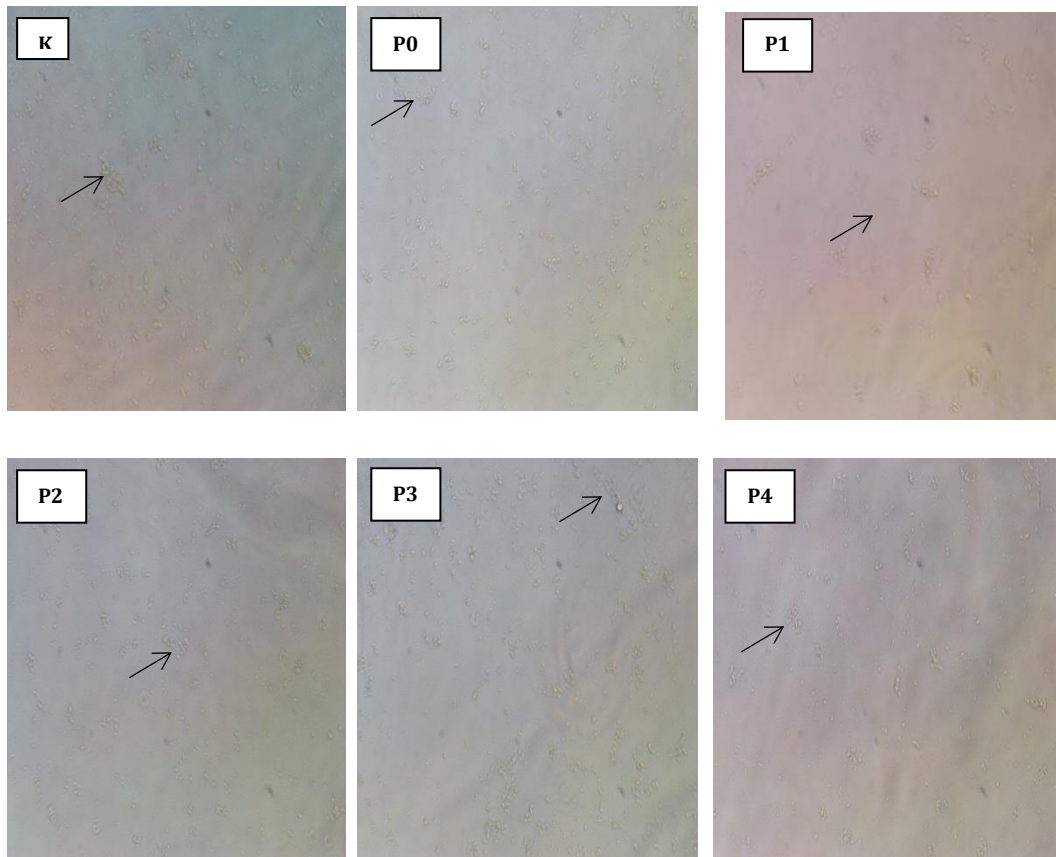
Uji Nilai sitotoksitas ekstrak daun kesambi dilakukan melalui pengolahan data analisis probit dengan menggunakan program SPSS. Kemudian untuk mengetahui nilai LC₅₀ kemudian dibuat grafik regresi linear. Dari grafik linear akan didapat persamaan kemudian akan didapat nilai LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konfluenitas Sel Hepar *Baby Tikus (Rattus norvegicus)* yang Diinduksi DMBA Secara *In Vitro*

Konfluenitas kultur sel hepar *baby* hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA ini ditandai dengan adanya perlekatan sel dengan substrat dan perlekatan sel dengan sel lain yang membentuk agregat (membentuk elongasi atau perpanjangan/ penjururan). Pengamatan konfluenitas dilakukan pada hari ke 6 setelah penanaman dengan perlakuan yang berbeda yaitu: Kelompok K : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2650 µl + FBS 300 µl . Kelompok P0 : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2550 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl. Kelompok P1 (1 %) : Sel hepar 50 µl + media DMEM 2520 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + ekstrak daun kesambi 30 µl. Kelompok P2 (1,5 %): Sel hepar 50 µl + media DMEM 2505 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 45 µl. Kelompok P3 (2%): Sel hepar 50 µl + media DMEM 2490 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 60 µl. Kelompok P4 (2,5 %): Sel hepar 50 µl + media DMEM 2475 µl + FBS 300 µl + DMBA 100 µl + Ekstrak daun kesambi 75 µl. Adapun tingkat konfluenitas kultur sel hepar

baby hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 1. Konfluenitas sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) sesuai dengan perlakuan yang berbeda yang ditandai dengan tanda panah. Pengamatan ini dilakukan dengan Mikroskop Inverted dengan perbesaran 200 x.

Konfluenitas sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang ditandai dengan tanda panah merah menunjukkan bahwa sel hepar telah mengalami perlekatan sel pada substrat dan berproliferasi. Perlekatan sel dengan permukaan substrat membentuk *attachmen site* yang dipengaruhi oleh adanya interaksi molekuler dan adhesi sel. Interaksi molekuler dan adhesi sel melibatkan bentuk interaksi sel dengan sel, sel dengan *extracellular matrix* (ECM), sel dengan faktor pertumbuhan, *extracellular matrix* (ECM) dengan *extracellular matrix* (ECM) dan *extracellular matrix* (ECM) dengan faktor pertumbuhan. Sehingga sel dapat berproliferasi dan mengalami konfluenitas pada substratnya.

Pada dasarnya proliferasi sel menghasilkan dua sel yang berasal dari satu sel. Keadaan ini membutuhkan pertumbuhan sel yang kemudian diikuti oleh

pembelahan (divisi) sel. Pada jaringan normal, proliferasi sel mengarah kepada penambahan jaringan, dimana jumlah sel tidak hanya tergantung kepada proliferasi sel tetapi juga oleh kematian sel. Kematian sel terprogram (apoptosis) adalah proses dikeluarkannya sel – sel yang rusak. Keseimbangan antara produksi sel baru dan kematian sel itulah yang mempertahankan sel yang tepat pada jaringan (homeostasis) [18].

Aktifitas proliferasi dapat dipengaruhi oleh faktor ekstra seluler maupun intraseluler. Faktor eksternal yang berpengaruh terhadap proliferasi sel diantaranya, yaitu faktor pertumbuhan (*Growth Factors = GF*), *cyclin* dan *cyclin dependent kinase (cdks)*, *Rb family*. Molekul faktor pertumbuhan akan dapat berfungsi jika dikenali oleh reseptor yang terdapat pada permukaan sel, yang disebut reseptor faktor pertumbuhan (*Growth Factor receptor = GFR*) [19] **(Rahmawati, Muti'ah, 2014)**.

Ketika *Growth Factor Receptor* (GFR) dapat dikenali oleh reseptor, maka akan mengakibatkan sel menjadi tumbuh dan dapat melekat pada substrat. Menurut [20] Waseh (2016), sel yang tumbuh dan melekat pada substrat merupakan hasil seleksi dari sel – sel yang dapat bertahan hidup setelah dilakukan disagresi. Sedangkan yang tidak bertahan hidup atau mati akan mengapung pada media. Selanjutnya sel – sel yang mati tersebut akan ikut terbuang pada saat pergantian media. Pada penelitian ini pergantian media dilakukan pada hari ke-4 setelah kultur.

Menurut [19] bahwa pada proses proliferasi sel terkait dengan siklus sel dalam mengalami pembelahan. Siklus sel dapat dibedakan secara morfologi dan biokimiawi. Jika dilihat secara biokimiawi maka siklus sel menggambarkan jangka waktu antara dua waktu yang berurutan pada pembelahan sel yang terdiri dari empat fase regulasi yaitu gap 1 (G1) untuk pertumbuhan sel, sintesis DNA (S) untuk duplikasi bahan baku pada proses genetik, gap 2 (G2) untuk perbaikan pada saat pembelahan sel dimana fase G1, S dan G2 secara bersamaan disebut interfase sedangkan fase mitosis (M) untuk pelaksanaan pembelahan sel, yaitu pembelahan inti dan sitoplasma. Sedangkan pada fase gap 0 (G0) disebut fase istirahat dimana sel yang tidak bergerak dan tidak mengalami pertumbuhan.



Selama masa interfase, sel menghasilkan nutrisi dan adanya duplikasi dari kromatid dimana kromatid ini berhubungan langsung dengan sentromer dan mempunyai lengan panjang dan pendek. Fase gap 1 (G₁) merupakan tahap pertama fase interfase yang berlangsung diantara fase mitosis dan sebelum fase sintesis. Pada fase ini sel dipersiapkan untuk sintesis DNA terjadi biosintesis RNA dan protein serta menghasilkan enzim-enzim yang dibutuhkan pada fase S, terutama yang dibutuhkan pada replikasi DNA. Lama fase G₁ sangat bervariasi bahkan untuk spesies yang sama. Fase akhir G₁ siklus sel merupakan fase sel-sel membuat kesepakatan untuk sel yaitu akan terus mengadakan pembelahan sehingga menuju fase berikutnya atau siklus sel berhenti sementara (Growth arrest) yang akan keluar siklus sel dan masuk ke fase G₀ untuk memperbaiki DNA yang mengalami kerusakan DNA (*DNA damage*) [19].

Fase selanjutnya adalah fase S. Selama fase S dimulai kecepatan dari proses transkripsi RNA dan proses sintesis protein sangat rendah tetapi sintesis histon sangat besar pada fase ini. Selain itu juga pada fase S terjadi replikasi DNA, sehingga pada akhir fase ini isi DNA sudah kembar dan kromosom siap mengalami pemisahan. Fase gap 2 (G₂) terjadi setelah fase S dan sebelum fase M. Pada fase G₂ sel siap untuk membelah, proses replikasi DNA dan berbagai protein serta biosintesis disempurnakan. Tahap selanjutnya nukleus dan sitoplasma terpisah sebagai 2 anak sel pada fase M. Fase selanjutnya adalah fase mitosis (M) dimana pertumbuhan dan sintesis protein berhenti selama fase M dan terjadi pembelahan sel genom menjadi dua kromosom yang sama. Lama waktu pada fase M lebih pendek dibanding pada fase interfase, kemungkinan lamanya 7-2 jam [19].

Pemberian induksi DMBA dengan dosis 100 µl dalam waktu 48 jam terhadap sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* pada perlakuan tingkat konfluenitas belum memberikan perbedaan yang nyata (gambar 4.1 perlakuan K dan P0). Hal ini salah satunya dapat disebabkan pada jumlah dan waktu pemberian dosis yang harus ditinjau kembali. Pada dasarnya ketika suatu sel diberikan atau dipapar dengan bahan kimia yang mengandung toksik atau zat karsinogen akan mengalami perubahan perilaku dalam metabolisme sel tersebut.

Hal ini sesuai dengan [21] **Sudiana (2008)** bahwa adanya perubahan perilaku sel yang menjadi abnormal akan cenderung mempunyai kemampuan proliferasi yang tinggi, disebabkan sel mengekspresikan berbagai protein yang abnormal merupakan perilaku transformasi sel (pembentukan sel kanker). Terkespresinya berbagai protein abnormal, karena sel mengalami mutasi (kecacatan gen) yang diinduksi oleh mutagen.

Ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) diduga mempunyai aktivitas antikanker dalam menghambat proliferasi sel yang berlebihan diakibatkan karena induksi mutagen yang berupa DMBA. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.1 pada perlakuan P2, P3 dan P4. Pada perlakuan tersebut terlihat bahwa ekstrak daun kesambi mampu menekan proliferasi sel, sehingga tingkat konfluitas sel juga menurun. Penurunan proliferasi sel ini diduga karena adanya senyawa fitokimia triterpenoid yang terkandung ekstrak daun kesambi.

Triterpen mengakibatkan sitotoksik terhadap sel kanker melalui *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan aktivitas apoptosis melalui jalur caspase oleh aktivasi caspase-3 dengan menekan induksi protein antiapoptosis bcl-2 dan bcl-x. Selain itu adanya interaksi senyawa fitokimia lain seperti saponin dengan kolesterol juga dapat menyebabkan penataan ulang bilayer lipid dan sekuen membran sel mengalami gangguan [22].

Viabilitas Sel Hepar *Baby* Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA Secara *In Vitro*

Pengamatan viabilitas sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro* dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kemampuan hidup dan matinya sel setelah pemberian ekstrak daun kesambi pada media kultur. Hal ini dapat dilihat pada tabel di bawah ini dibawah ini:

Tabel 1. Viabilitas viabilitas sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dmba secara *in vitro*

Perlakuan	Viabilitas ± SD
K	28.24 ± 3.027a
P0	28.61 ± 5.088a
P1 (1 %)	25.82 ± 1.335b
P2 (1,5 %)	26.91 ± 0.917b
P3 (2%)	23.98 ± 3.851c



P4 (2,5 %)

24.56 ± 7.922c

Huruf notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0.05$)

Tabel perhitungan viabilitas hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro* tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan K dan P0 tidak menunjukkan perbedaan secara nyata. Akan tetapi terdapat perbedaan pada perlakuan P1, P2 dan P3, P4. Viabilitas tertinggi yaitu pada perlakuan P0 (kontrol positif), sedangkan viabilitas terendah yaitu pada perlakuan P3 (dosis 60 μ l). Pada perlakuan P0 menunjukkan bahwa viabilitas sel tinggi, hal ini dimungkinkan tidak adanya ekstrak daun kesambi yang diberikan pada perlakuan, mengakibatkan daya hidup (viabel) dari sel tinggi. Sebagaimana disampaikan pada pembahasan sebelumnya bahwa ekstrak daun kesambi diduga mampu menekan proliferasi dan tingkat viabilitas sel dikarenakan senyawa antikanker yang terdapat didalamnya. Sedangkan pada perlakuan P3 menunjukkan viabilitas sel mengalami penurunan yang berarti dibandingkan dengan perlakuan-perlakuan lain, hal ini dimungkinkan bahwa senyawa aktif antikanker yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi mampu menghambat pertumbuhan dari sel tersebut akibat induksi DMBA, sehingga sel banyak mengalami kematian.

Sel yang mati menunjukkan pengaruh sitotoksisitas ekstrak daun kesambi terhadap kultur sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA, dikarenakan ekstrak daun kesambi mengandung senyawa aktif salah satunya triterpenoid yang mempunyai target utama dalam fungsinya adalah pada jalur kematian sel (apoptosis).

Triterpen tidak hanya membuat kerusakan membran plasma tetapi juga membran permeabel intraseluler terhadap protein. Hal ini disebabkan interaksinya mampu berikatan dengan kolesterol pada membran, sehingga mengganggu permeabilitas membran sel. Selain itu juga dapat menekan protein antiapoptosis bcl-2 dan bcl-x, serta aktivasi caspase [22].

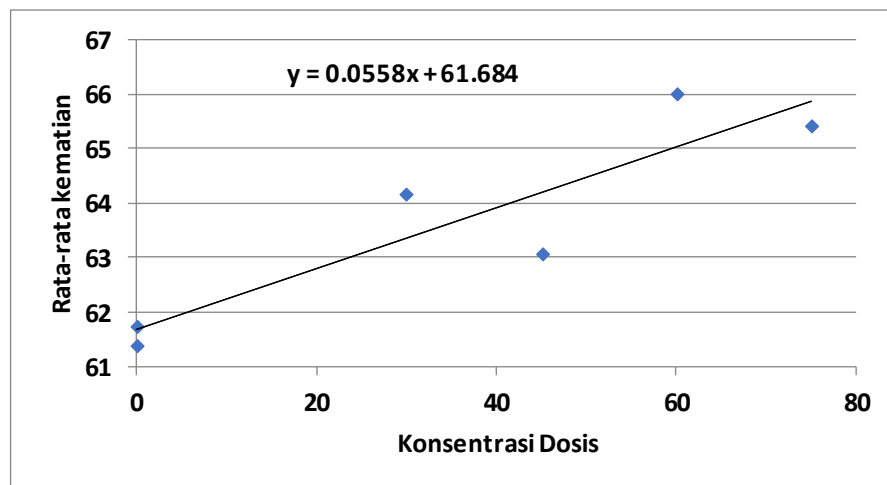
Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kesambi Terhadap Sel Hepar *Baby* Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA

Sitotoksitas ekstrak daun kesambi terhadap sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA ini menggunakan konsentrasi 30 μ l; 40 μ l; 60 μ l dan 75 μ l. Adapun hasil uji toksositas dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2. Uji sitotoksitas ekstrak daun kesambi terhadap sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Konsentrasi (μ l)	Rerata Kematian \pm SD
K	0	61.75 \pm 3.027
P0	0	61.38 \pm 5.08
P1	30	64.17 \pm 1.33
P2	45	63.08 \pm 0.91
P3	60	66.01 \pm 3.85
P4	75	65.43 \pm 7.92

Dari hasil perhitungan uji sitotoksitas dapat diperoleh tingkat kematian sel dengan persentase paling tinggi yaitu pada konsentrasi 60 μ l sebesar 66.01 \pm 3.85, sedangkan tingkat kematian terendah adalah pada konsentrasi 0 (P0) sebesar 61.38 \pm 5.08. Nilai sitotoksitas ekstrak daun kesambi diperoleh melalui pengolahan data analisis probit dengan menggunakan program SPSS. Untuk mengetahui nilai LC₅₀ kemudian dibuat grafik regresi linear seperti yang gambar berikut:



Gambar 2. Grafik regresi linear hubungan konsentrasi dosis ekstrak daun kesambi dengan rata-rata kematian sel

Berdasarkan persamaan linear pada grafik tersebut maka:

$$Y = 0,0558x + 61,684$$

$$64,74 = 0,0558x + 61,684$$

$$X = 54,83$$

$$\text{Antilog } 54,83 = 6,76$$

Dari hasil persamaan tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun kesambi mempunyai nilai LC_{50} sebesar 6,76 dapat dikatakan memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Ekstrak dikatakan bersifat toksik jika nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, sedangkan untuk senyawa murni jika $LC_{50} < 200$ ppm berpotensi sebagai antikanker (Meyer, *et al.*, 1982). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kesambi bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi diduga mampu berikatan dengan sebagian besar molekul yang bersifat nonpolar pada membran plasma maupun membran permeabel intraseluler, dan hanya sebagian kecil berikatan dengan molekul yang bersifat polar sehingga menyebabkan apoptosis pada sel hepar. Hal ini dikarenakan senyawa triterpen bersifat amfifilik. Seperti yang dikemukakan oleh [23] bahwa triterpenoid memiliki satu target yang umum yaitu antiapoptotik protein bcl-2 yang dapat menimbulkan apoptosis dalam sel-sel kanker dan peningkatan permeabilitas membran.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kesambi (*Schleichia oleosa*) terhadap sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12 DMBA mempunyai aktivitas antikanker yang ditunjukkan pada konfluenitas sel hepar pada perkakuan P2, P3 dan P4. Aktivitas antikanker pada viabilitas ditunjukkan pada perlakuan P3, sedangkan untuk uji sitotoksitas ekstrak daun kesambi diperoleh nilai LC_{50} sebesar $6,76 < 1000$, sehingga ekstrak daun kesambi bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.



UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada PMU dan LP2M UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk dapat mengikuti penelitian Kompetitif dan Publikasi Internasional tahun 2020. Selain itu juga kami sampaikan kepada Bapak Prof. Prof. Dr. Achmad Sani Supriyanto, M.Si dan Bapak H. Slamet, SE, MM., Ph.D selaku reviewer dalam penelitian ini. Terima kasih telah memberikan saran dan masukan atas penelitian ini sehingga kegiatan penelitian dan laporan ini bisa terselesaikan. Semoga laporan penelitian ini bisa memberikan kontribusi bagi dunia akademisi, memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan masyarakat luas.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Achmad dkk, 2014. Aktivitas antikanker dan Antiproliferasi Fraksi Etanol Sarang Semut (*Myrmecodya pendans*) pada Sel Kanker Lidah Manusia SP-C1 (anti-cancer and anti-proliferation activity of ethanol fraction of ant nest plants (*myrmecodya pendans*) on human tongue cancer cell sp-c1). *Dentofasial*, vol.13, no.1, februari 2014:1-6
- [2] Muti'ah, Roihatul dkk, 2015. Ekstrak Etanol Akar Dan Daun Dari Tanaman *Calotropis Gigantea* Aktif Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Kolon Widr Secara In Vitro. *Jurnal Farma Sains* Vol. 1 (1) Juli 2015
- [3] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020. Hari Kanker Sedunai 2019. Artikel. www.depkes.go.id. Diakses 13 Juli 2020
- [4] Liver Cancer/ Indonesia, 2017. Kanker Hati. <https://www21.ha.org.hk/smartpatient/EM/MediaLibraries/EM/Diseases/Cancer/Liver%20Cancer/Cancer-Liver-Cancer-Indonesian.pdf?ext=.pdf>. Diakses 13 Juli 2020
- [5] Supratanda dkk, 2015. The Influence of Giving Ethanol Extract of Soursop Leaves (*Annona muricata* Linn) Against 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) Induced Appearance of Hepatic Histopathology. Faculty of Medicine Lampung University
- [6] Lubis, Ichwan, 2018. Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Bawang Sabrang (*Eleutherine bulbosa* (mill.) Urb.) Terhadap Sel Kanker Kolon Widr Secara In Vitro. Thesis. Universitas Sumatera Utara. Medan
- [7] Da'i, Muhammad, 2007. Potensi Antiproliferative Analog Kurkumin Pentagamavunon Terhadap Sel Kanker Payudara T47D*). *Artocarpus* 7(1):14-20
- [8] Bathia, Harsh., Kaur, Jaspreet., Nandi, Shreya., Gurnani, Virnita., Chowdury, Anushua., Hemalatha, P., Vashistha, Amit., Rathi, Brijesh. 2012. A Review on *Schleichera oleosa*: Pharmacological and Environmental Aspects. *Elsevier Journal of Pharmacy Research* 6: 224-229



- [9] Anuraghi, Jay., Mishra, RP. 2017. Ethnomedicinal study of *Schleichera oleosa* among the tribals of Satna (M.P.). *International Journal of Applied Research*, 3(3): 672-67.
- [10] Sakagami H, Jiang Y, Kusama K *et al.* 2000. Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines and a possible mechanism. *Phytomedicine*. 1:39-47.
- [11] Pettit GR, Numata A, Cragg GM, et al, 2000. Isolation and structures of Scheicherastins (1e7) and Schleicheols 1 and 2 from the teak forest medicinal tree *Schleichera oleosa*. *J Nat Prod.*;63:72-78.
- [12] Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BVV, Khar A. 1999 Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett*;456:311-314.
- [13] Thind TS, Rampal G, Agarwal SK, Saxena AK, Arora S. 2010. Diminution of free radical induced DNA damage by extracts/fractions from bark of *Schleichera oleosa* (Lour.) Oken. *Drug Chem Toxicol.*33:329-336.
- [14] Situmeang, Boima dkk, 2016. Analysis of secondary metabolite compounds from leaves extract kesambi (*Schleichera oleosa*) and antioxidant activity test. *Jurnal Pendidikan Kimia*. Vol. 8 No. 3
- [15] Holil dan Griana, 2020. Analisis Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Metode DPPH. *J. Islamic Pharm: Vol (5) 1*
- [16] Hosseinzade, Aysooda dkk, 2019. Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Frontiers in Immunology*
- [17] Freshney RI. 2000. *Culture of Animal Cells*. New Jersey (US): John Wiley and Sons.
- [18] Sitorus, Mega Sari. 2013. Imunoekspresi Ki-67 Pada Tumor Payudara Tikus Wistar Yang Diinokulasi Tumor Terinduksi Benzo(A) Pyrene Dan Diberikan Ekstrak Daun Sirsak. Thesis. Universitas Sumatera Utara. Medan
- [19] Rahmawati, Muti'ah. 2014. Potensi Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) Sebagai Obat Antikanker Fibrosarkoma. UIN-Maliki Press. Malang
- [20] Waseh, Laneng. 2016. Pengaruh Lama Paparan *Murottal* Surat Al-Fatihah Terhadap Proliferasi Sel Granulosa Kambing (*Capra Aegagrus Hircus*) Secara *In Vitro*. Skripsi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang
- [21] Sudiana, I Ketutu. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika
- [22] Haridas, V., M Higuchi, GS Jayatilake, D Bailey, K Mujoo, M Blake, CJArntzen JU Gutterman. 2001. Avicins : Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Medical Sciences*. Vol. 98. no. 10 5821-5826
- [23] Yadav, Vivek R., Sahdeo Prasad, Bokyung Sung, Ramaswamy Kannappan and Bharat B. Aggarwal. 2010. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*. Vol. 2, 2428-2466