

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1. Rumput Gong (*Eriocaulon cinereum* R.Br)

Rumput Gong (*Eriocaulon cinereum* R.Br) merupakan tanaman herba berukuran 2-4 cm, tanaman ini tumbuh di permukaan kolam dangkal atau daerah persawahan. Bentuk daun lurus tipis dengan panjang hingga 10 cm dengan ujung yang meruncing. Berikut ini merupakan gambar dari tanaman Rumput Gong (**Gambar 2.1**) beserta klasifikasinya (Wolfe, P., 1999):

Kingdom : Plantae

Filum : Tracheophyta

Kelas : Liliopsida

Ordo : Poales

Famili : Eriocaulaceae

Genus : Eriocaulon

Spesies : *Eriocaulon cinereum* R. Br. Atau *Eriocaulon sieboldianum*



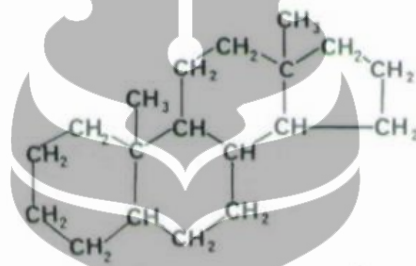
Gambar 2.1 Rumput Gong (*Eriocaulon cinereum*) (Nurmasari, 2017)

Di Cina, kombinasi antara *E.buergianum* dengan tanaman herbal lain menjadi salah satu obat tradisional yang digunakan sebagai adjuvant atau terapi pendamping dalam terapi kanker (Fan *et al.*, 2016). Kandungan senyawa yang berhasil diidentifikasi dari fraksi etil asetat *E.buergianum* yaitu stigmasterol dan β -sitosterol yang terbukti memiliki aktivitas dalam menghambat aurora kinase dan menimbulkan apoptosis sel K564. Penelitian lain menunjukkan bahwa kandungan

lain ekstrak Rumput Gong mampu menginduksi *cell cycle arrest* pada sel HepG2, menekan fosforilasi histon H3 dan menginduksi apoptosis melalui p53, MAPKs dan jalur apoptosis mitokondria (Glover *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2015).

2.1.2. Senyawa Steroid

Steroid adalah molekul bioaktif penting dengan kerangka dasar 17 atom C yang tersusun dari 4 buah gabungan cincin, 3 diantaranya yaitu sikloheksana dan siklopentana (**Gambar 2.2**) (Dang *et al.*, 2018). Senyawa steroid berupa kristal berbentuk jarum dengan karakteristik mengandung gugus OH, gugus metil, dan memiliki ikatan rangkap yang tidak terkonjugasi (Suryelita *et al.*, 2017).



Gambar 2.2. Struktur dasar senyawa steroid (Elks, 1976)

Steroid memiliki peran penting dalam dunia medis, salah satunya yaitu androgen yang merupakan hormon steroid yang berfungsi sebagai agen yang menstimulasi organ seksual pada wanita (Nogrady, 1992). Tugas utama steroid endogen atau yang secara alami terdapat dalam tubuh yaitu berperan dalam proses regulasi metabolisme seperti metabolisme energi, air dan keseimbangan natrium, fungsi reproduksi dan fungsi perilaku dan kognitif. Selain itu, senyawa steroid sintesis dalam jumlah besar secara struktural yang memiliki target spesifik telah menunjukkan aktifitasnya terhadap beberapa penyakit seperti kanker, gangguan hati, kardiovaskular, inflamasi, dan penyakit lainnya yang berhubungan dengan hormon steroid (Bhawani *et al.*, 2011).

Salah satu kandungan steroid yang ada pada tanaman adalah campesterol. Sama seperti β -sitosterol yang sering ditemukan di tanaman, campesterol memiliki efektifitas sebagai antikanker. β -sitosterol berguna untuk mencegah berbagai macam kanker seperti kanker rahim, payudara, prostat dan usus (Awad *et al.*, 2000).

2.1.3. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling umum yang dialami oleh wanita dan sebagai peringkat ke-2 penyebab kematian yang disebabkan oleh kanker (Bai *et al.*, 2018). Menurut data *International Agency For Research On Cancer* (IARC) kanker payudara paling sering terjadi pada wanita, jumlah kasus yang sering menyebabkan kematian terdapat di daera-daerah yang kurang berkembang dengan jumlah 324.000 kasus dan juga negara yang lebih berkembang dengan jumlah 198.000 kasus (Ferlay *et al.*, 2012). Pada tahun 2017, tercatat bahwa prevalensi kejadian kanker payudara di Indonesia khususnya di Daerah Istimewa Yogyakarta menduduki peringkat pertama dengan kasus rawat jalan sebanyak 1.564 kasus dan kasus rawat inap sebanyak 823 kasus (Dinkes, 2017).

Jaringan lemak dapat menjadi penyebab terjadinya kanker payudara salah satunya adalah kolesterol. Se-sel kanker akan membutuhkan lebih banyak kolesterol untuk pertahanan hidup dan dalam proses proliferasi sel (Munir *et al.*, 2018). Faktor etiologi yang menyebabkan terjadinya kanker payudara antara lain yaitu usia, jenis kelamin, faktor diet, merokok, konsumsi alkohol, radiasi dosis rendah, obesitas, aktivitas fisik, laktasi, faktor hormonal, terapi penggantian hormon, reseptor hormon steroid, penyakit payudara jinak dan faktor genetik (Almutlaq *et al.*, 2017).

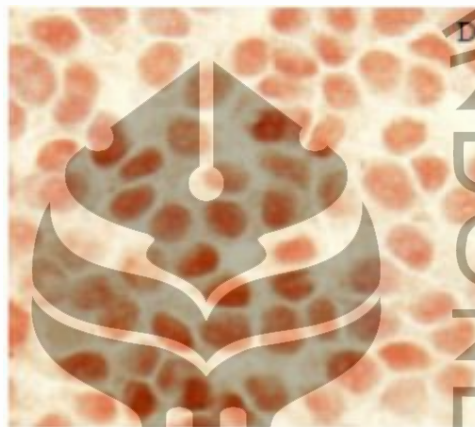
Kanker payudara dapat disebabkan karena adanya faktor genetik yang termutasi seperti BRCA1 dan BRCA2. Kedua gen tersebut memiliki fungsi sebagai agen penekan tumor, sehingga adanya mutasi pada gen tersebut akan berpengaruh pada siklus sel, antara lain merespon adanya kerusakan DNA dan perbaikan DNA (Roy *et al.*, 2011). Kanker payudara bisa ditandai dengan tingginya ekspresi dari Ki-67 oleh imunohistokimia (IHC) (Andre *et al.*, 2015).

Proses metastase kanker payudara banyak kaitannya dengan mutase beberapa protein, salah satunya yaitu mutasi pada protein p53 yang dikode oleh gen *TP53/p53*. Fungsi p53 dalam mengatur siklus sel atau dikenal dengan gen penekan tumor (*Tumor Suppressor Gene*). Mutasi yang terjadi pada gen p53 menyebabkan hilangnya fungsi dan peran gen dalam menekan tumor dengan

mekanisme alternatif sebagai agen induksi apoptosis dan sebagai agen transkripsi (Lacroix *et al.*, 2006).

2.1.4. Sel Kanker Payudara T47D

Sel T47D merupakan salah satu *continuous cell line* yang diperoleh dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel T47D adalah sel yang sensitif terhadap agen kemoterapi dan memiliki kecepatan replikasi yang sangat cocok untuk pengujian sitotoksik (Burdall *et al.*, 2003).



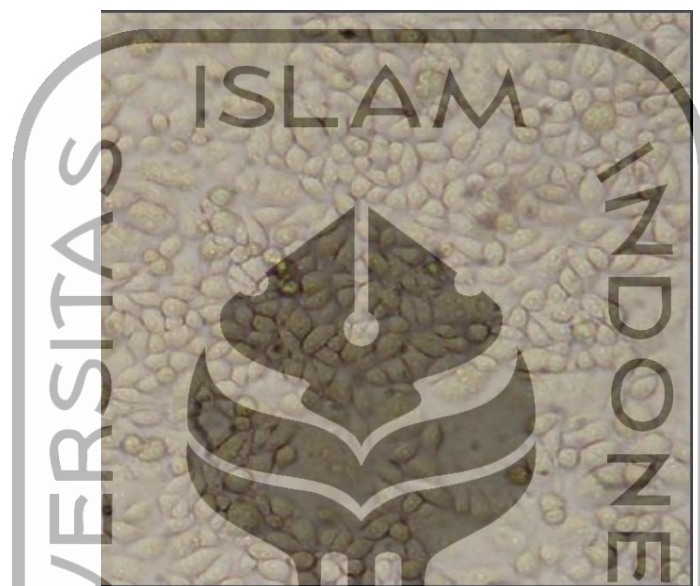
Gambar 2.3. Morfologi Sel T47D (Kaabinejadian *et al.*, 2008)

Sel T47D memiliki morfologi seperti jaringan epitel (**Gambar 2.3**). Beberapa karakteristik khusus dari sel T47D yaitu sensitifitasnya terhadap estrogen melalui estrogen reseptor alpha ($ER\alpha$) pada membrane sitosol, sehingga dapat disebut dengan ER-positif luminal A (Aka & Lin, 2012). Gen p53 yang termutasi akan menyebabkan berkurangnya kemampuan untuk mengikat respon elemen pada DNA atau berkurangnya kemampuan dalam regulasi siklus sel dan memacu apoptosis (Ammerman *et al.*, 2008).

2.1.5. Sel Normal Vero

Sel Vero merupakan sel epitel non-kanker atau biasa dikenal dengan sel normal. Sel ini diperoleh dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Sel Vero merupakan monolayer dan termasuk dalam jenis *epithelial-like* (**Gambar 2.4**) (Ammerman *et al.*, 2008). Sel Vero memiliki bentuk seperti polygon dan pipih, dapat bereplikasi tidak terbatas atau diperbanyak (*Continuous*

cell line) dari sel yang ada pada media kultur secara *in vitro*, *non tumorigenic fibroblastic cell* atau sel non kanker. Sel ini dapat melekat erat pada substrat yang memiliki bahan dasar polistiren dan 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).



Gambar 2.4. Morfologi Sel Vero (Mishra *et al.*, 2010)

2.1.6. Kromatografi Lapis Tipis

Dalam penelitian ini, kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi senyawa atau golongan senyawa dalam tanaman. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu metode yang menggunakan prinsip adsorpsi padat-cair. Pemisahan yang terjadi ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Pada saat proses elusi berlangsung, komponen kimia akan bergerak naik mengikuti fase gerak akibat dari daya adsorben terhadap komponen-komponen kimia akan berbeda-beda sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat polaritasnya. Perbedaan daya ikat adsorben akan menyebabkan terjadinya pemisahan spot antar komponen. Fase diam yang biasa digunakan antara lain aluminium silika gel, selulosa. Penggunaan KLT identik dengan proses identifikasi yang bertujuan untuk mengetahui posisi suatu senyawa dan mengetahui jenis senyawa yang terkandung dalam sampel. Posisi

masing-masing senyawa dalam campuran bisa diukur dengan menghitung rasio antara jarak yang ditempuh oleh molekul dan pelarutnya (R_f) (Perez, *et al.*, 1994).

2.1.7. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

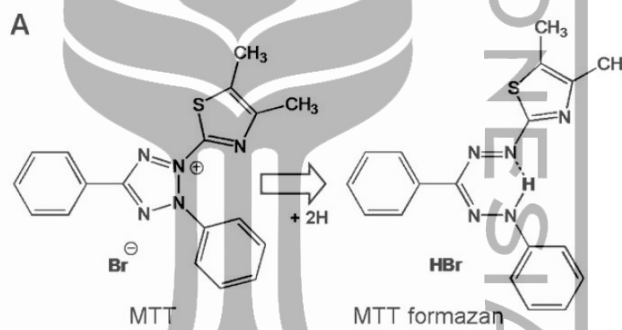
Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) merupakan suatu metode kromatografi planar yang digunakan untuk melakukan isolasi suatu senyawa dari bahan alam. Silika gel adalah fase diam yang biasa digunakan dalam pemisahan senyawa yang bersifat polar ataupun nonpolar. Plat yang digunakan merupakan plat kaca dengan ukuran 20x20 cm atau 20x40 cm dengan ketebalan silika gel 0,5-2 mm. Sampel yang ingin diisolasi biasanya ditotolkan pada silika membentuk pita memanjang. Pilihan eluen ditentukan dari tahap sebelumnya. Beberapa eluen yang sering digunakan dalam pemisahan menggunakan KLTP yaitu *n*-heksan-etil asetat, *n*-heksan-aseton, dan kloroform-metanol. Setelah selesai dielusi, akan terbentuk pita-pita yang kemudian dikeruk untuk mengumpulkan senyawa target isolasi (Sticher., 2008).

2.1.8. *Vacuum Liquid Chromatography*

Vacuum Liquid Chromatography (VLC) digunakan sebagai metode fraksinasi dengan prinsip pemisahan kromatografi menggunakan vakum untuk membantu mempercepat aliran dari fase gerak melalui fase diam. Keunggulan dari VLC antara lain peralatan yang digunakan sederhana, waktu pemisahan relatif lebih cepat, resolusi yang lebih baik dan kapasitas pemisahan yang besar. Metode VLC menggunakan kolom berukuran pendek yang dikemas dengan *dry* adsorben. Fase diam yang digunakan pada umumnya dikemas menggunakan teknik *dry packing* yaitu suatu metode efektif yang digunakan untuk mengemas fase diam dalam sistem kromatografi dan umumnya fase diam yang digunakan yaitu silika gel. Fase gerak yang dianjurkan adalah pelarut kombinasi dengan indeks polaritas yang berbeda satu dengan yang lainnya dengan tujuan untuk mendapatkan fraksinasi yang lebih baik (Sticher., 2008).

2.1.9. MTT Assay

Uji MTT atau dikenal juga dengan (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) merupakan metode yang paling sering digunakan untuk melakukan penilaian poliferasi sel secara kuantitatif, viabilitas dan sitotoksisitas. Indikator yang digunakan untuk metode MTT yaitu tetrazolium yang dapat memberikan informasi keadaan sel keseluruhan dan kelangsungan hidup sel. Prinsip dari metode MTT Assay yaitu reaksi reduksi enzimatik tetrazolium oleh enzim *cytosolic dehydrogenase* dan agen pereduksi akan menghasilkan warna violet-biru dari pembentukan garam formazan (**Gambar 2.5**) yang menunjukkan jumlah sel yang masih hidup (Pascua-Maestro *et al.*, 2018). Nilai absorbansi (OD) dari violet formazan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (*microtiter plate reader*) dengan panjang gelombang 595 nm (Amir *et al.*, 2017).



Gambar 2.5. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan (Stockert *et al.*, 2012)

2.2. Landasan Teori

Kanker payudara adalah kanker yang paling banyak terjadi pada kaum wanita yang disebabkan dari lingkungan, genetik, dan faktor resiko epigenetik (Cheuk *et al.*, 2017). *Eriocaulon cinereum* atau dikenal dengan sebutan Rumput Gong, secara empiris sering digunakan oleh masyarakat Bangka Belitung untuk pengobatan penyakit kanker. Sudah banyak penelitian yang dilakukan terhadap tanaman dengan genus *Eriocaulon* yang menunjukkan aktivitas antikanker, salah satunya *E. Sieboldianum* yang telah diteliti mengandung senyawa yang mampu menghambat aktivitas aurora kinase yang berperan dalam mengatur pembelahan

sel, menginduksi *cell cycle arrest*, menekan fosforilasi histon H3 dan menginduksi apoptosis melalui gen p53, *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan jalur apoptosis mitokondria pada sel kanker hepar (Fan *et al.*, 2015). Penelitian lain menunjukkan bahwa fraksi diklorometana *E.cinereum* memiliki kandungan senyawa terpenoid, flavonoid, steroid, dan fenolik (Diahandari, 2018). Senyawa-senyawa tersebut telah banyak diteliti dan menunjukkan aktivitas sitotoksik, khususnya senyawa steroid yang memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ yang sangat aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker (Gupta *et al.*, 2013).

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa fraksi diklorometana dari ekstrak etil asetat *E.cinereum* memiliki nilai IC₅₀ sebesar 131,921 µg/ml terhadap sel kanker payudara T47D. Hasil dari evaluasi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D menyatakan bahwa fraksi diklorometana dari ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang lebih sitotoksik terhadap sel kanker payudara dibandingkan dengan ekstrak etil asetat (Salsabila *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menjadi dasar penelitian lebih lanjut dengan memisahkan golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana dari ekstrak etil asetat menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Senyawa steroid dipilih karena beberapa penelitian telah menunjukkan aktivitas senyawa steroid sebagai agen sitotoksik. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas sitotoksik golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana ekstrak etil asetat Rumput Gong pada sel kanker payudara (T47D) dan sel normal (Vero) untuk mengetahui potensi dari aktivitas sitotoksik golongan senyawa steroid dari tanaman *E.cinereum*.

2.3. Hipotesis

Isolat golongan senyawa steroid fraksi diklorometana ekstrak etil asetat *E.cinereum* yang memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara (T47D) dan tidak memiliki aktivitas pada sel normal (Vero).