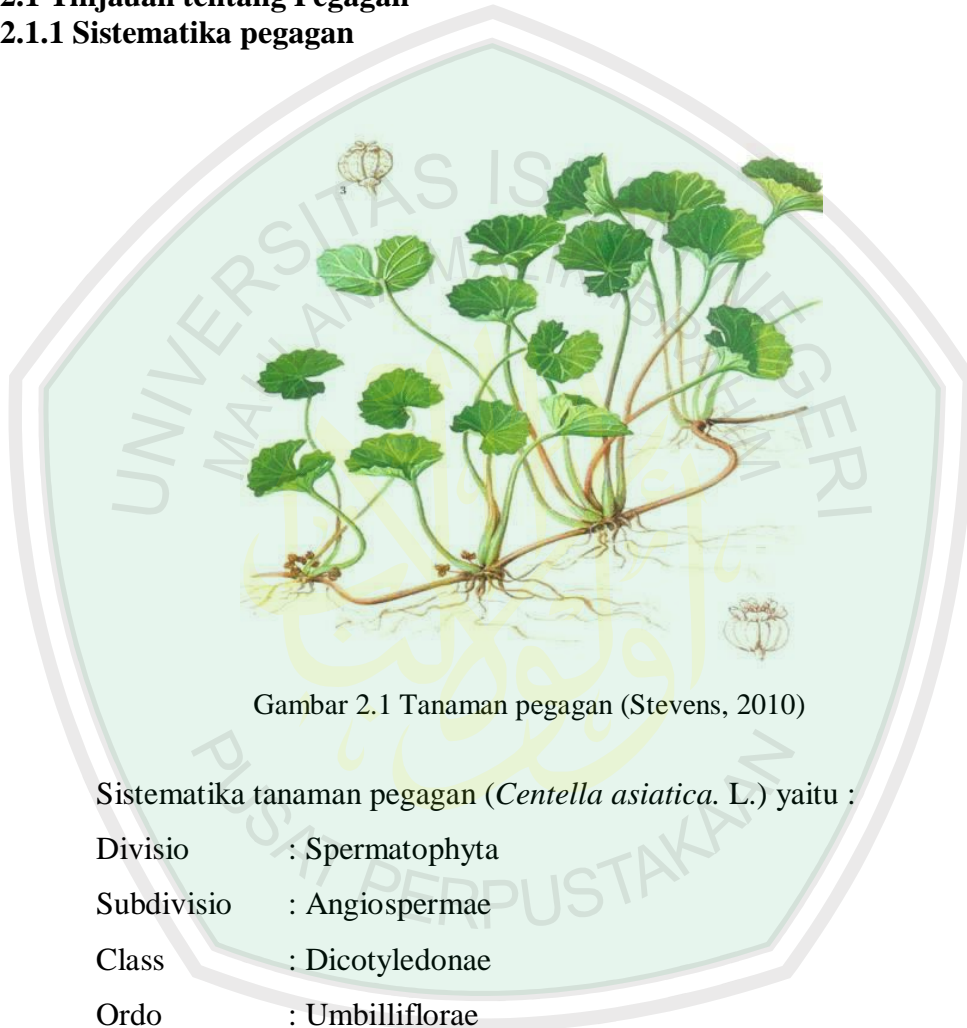


BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Pegagan

2.1.1 Sistematika pegagan



Gambar 2.1 Tanaman pegagan (Stevens, 2010)

Sistematika tanaman pegagan (*Centella asiatica*. L.) yaitu :

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Class : Dicotyledonae

Ordo : Umbelliflorae

Family : Umbelliferae

Genus : *Centella*

Spesies : *Centella asiatica* (L) Urban

(Reddy *et al.*, 2004)

Centella asiatica (L.) Urb. merupakan terna liar yang terdapat diseluruh Indonesia, berasal dari Asia tropik. Menyukai tanah yang agak lembab dan cukup

mendapat sinar matahari atau teduh, seperti di padang rumput, pinggir sungai, sawah, dan sebagainya. Kadang-kadang di tanam sebagai penutup tanah di perkebunan atau sebagai tanaman sayuran (sebagai lalap), terdapat sampai ketinggian 2.500 m di atas permukaan laut (Haryanto, 2009).

Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon- stolon yang merayap dengan panjang 10-80 cm, akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5-15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1-7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 helai daun, kadang-kadang agak berambut (Haryanto, 2009).

Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5-50 mm. Buah kecil bergantung yang berbentuk elips atau pipih panjang 2-2.5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit (Haryanto, 2009).

2.1.3 Kandungan Kimia dan Manfaat pegagan sebagai Antikanker

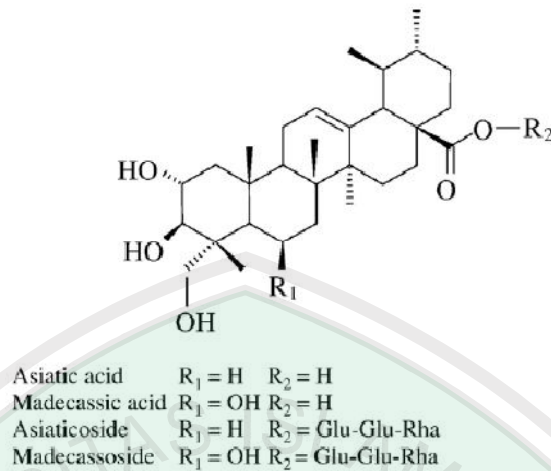
Bahan-bahan alam telah banyak dimanfaatkan sebagai pengobatan etnomedis. Akan tetapi perlu adanya upaya untuk mencari sumber dari bahan-bahan alam tersebut yang dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan. Umumnya bahan alam yang digunakan untuk pengobatan berasal dari tumbuhan karena penggunaan bahan tersebut memiliki sedikit efek samping. Sebagaimana tercantum dalam surah Asy-Syua'raa ayat 7 bahwasannya Allah SWT menciptakan tumbuh-tumbuhan yang baik yaitu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan manusia, termasuk untuk pengobatan.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: *dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu perbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? (Q.S.Asy-Syua'raa':7).*

Ayat di atas, makna kalimat "*tumbuh-tumbuhan yang baik*" (زوج كريم) menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuhan sebagai bukti atas kuasa-Nya. Masing-masing tumbuhan tumbuh dengan subur dan memiliki banyak manfaat (Shihab, 2002), yaitu termasuk tumbuh-tumbuhan yang digunakan untuk pengobatan baik pada bagian akar, batang, daun, maupun bunga. Namun setiap tumbuhan memiliki potensi yang berbeda. Dalam bidang pengobatan untuk mengenali potensi masing-masing tumbuhan dengan mengetahui senyawa yang terkandung dalam tumbuhan tersebut.

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan herba liar yang mengandung senyawa aktif paling penting yaitu triterpenoid saponin, meliputi asiaticoside, centelloside, madecassoside dan Asiatic acid. Selain itu, *Centella* mengandung senyawa lain yaitu flavonoid, tannin, phytosterol, asam amino dan gula (Leung, 1998). Asiaticoside adalah senyawa mayor (84%) dalam ekstrak air. Asiaticoside dapat berubah menjadi *asiatic acid* secara *in vivo* dengan hidrolisis (Barbosa *et al.*, 2008).



Gambar 2.2 Struktur Senyawa *Centella asiatica* (Randriamampionona *et al.*, 2010).

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang terjadi karena berbagai rangsang, termasuk obat kanker sitotoksik untuk kanker yang menyebabkan kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, sehingga memicu jalur lintas bunuh diri sel, misalnya melalui protein supresor tumor TP53. Menurut Kumar *et al.* (2007) mekanisme jalur apoptosis melalui dua tahapan yaitu transmisi langsung sinyal kematian dengan protein pencocok (adapter protein) terhadap mekanisme eksekusi, dan pengaturan (permeabilitas mitokondrial) oleh anggota famili protein BCL-2. BCL-2 yang ditemukan di membran mitokondria menekan apoptosis dengan mencegah peningkatan permeabilitas mitokondria dan menstabilkan protein, seperti Apaf-1, sehingga tidak terjadi kaspase (protein pemecah golongan protease).

Penelitian Lee *et al.* (2002) menyatakan bahwa *asiatic acid* yang merupakan derivat triterpen pentasiklik dari tumbuhan Brahmi, *Centella asiatica*, yang telah berhasil diuji dapat menginduksi apoptosis pada sel HepG2. Triterpen ini menurunkan viabilitas sel HepG2 dengan meningkatkan pelepasan kalsium

(Ca²⁺) intraseluler yang mendorong peningkatan ekspresi gen tumor supresor p53. Kumar *et al.* (2007) menyatakan peningkatan kalsium sitosol mengaktifkan berbagai fosfolipase (mencetuskan kerusakan membran), protease (mengatabolisasi protein membran dan struktural), ATPase (mempercepat deplesi membran).

Kebanyakan sel tumor meregulasi overekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan Bcl-x. Protein antiapoptosis juga mencegah aktivasi sinyal protease apoptotik, seperti caspase-3. *Asiatic acid* dilaporkan menginduksi apoptosis pada sel HT-29 melalui aktivasi caspase-3, menurunkan protein Bcl-2 dan Bcl-x (Bunpo *et al.*, 2005).

Selain itu, *asiatic acid* efektif menghambat pertumbuhan sel dengan menginduksi apoptosis melalui mediator *extracellular signal-regulated kinase* dan jalur *p38 mitogen-activated protein kinase*, keduanya merupakan protein sinyal transduksi yang diaktivasi dengan fosforilasi oleh protein kinase. Selain itu, *Asiatic acid* juga menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menahan fase S-G atau M pada kanker sel payudara manusia (Hsu *et al.*, 2005).

2.2 Sinyal Transduksi, Siklus Sel dan Pertumbuhan Sel Kanker

2.2.1 Sinyal Transduksi

Mekanisme sinyal transduksi diawali oleh adanya rangsang yang ditimbulkan oleh sinyal. Seperti faktor pertumbuhan yang berikatan dengan reseptornya akan mengakibatkan aktivasi enzim tirosin kinase. Maka terjadi autofosforilasi pada gugus tirosin, sehingga gugus tirosin aktif pada gilirannya akan mengaktifkan faktor transduksi Src atau protein Ras melalui aktifitas dua

protein yaitu Gbr-2 suatu protein terkait reseptor faktor pertumbuhan, dan Sos (*Son of sevenless*) yang akan menukar gugus GDP di protein Ras menjadi gugus GTP. Adanya gugus GTP yang berikatan dengan protein Ras akan menaktifasi protein tersebut untuk melakukan fosforilasi kaskade MAPKKK-MAPKK-MAPK dan Rsk. MAPK distimulasi oleh proses fosforilasi beberapa jenis protein seperti protein Rsk kinase (Azhar, 2008).

Mitogen-activated protein kinase (MAPKs) adalah protein fosforilasi famili serin atau treonin kinase sebagai mediator yang mengaktifasi sinyal intraselular dalam merespon berbagai rangsangan, seperti anggota *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK), p38 dan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2. Ketiga anggota tersebut berbeda jalur MAPK yang dapat diaktifkan oleh faktor pertumbuhan, kerusakan DNA, sitokin, stress oksidatif, sinar UV, obat antikanker dan *shock osmotic*, sehingga aktivasi jalur MAPK tersebut menyebabkan apoptosis (Hsu *et al.*, 2005).

2.2.2 Siklus Sel

Pembelahan sel melalui serangkaian tempat dan fase yang telah ditentukan yang disebut siklus sel. Siklus sel tersebut terdiri atas (secara berurutan) fase pertumbuhan prasintesis 1, atau G₁; fase sintesis DNA, atau S; fase pertumbuhan pramitosis 2, atau G₂; dan fase mitosis, atau M. Sel istirahat berada dalam keadaan fisiologis yang disebut G₀ (Kumar *et al.*, 2007), sebagaimana terlihat pada gambar 2.3. Dalam surah An-Nuh ayat 14 menyebutkan penciptaan dengan beberapa fase kejadian, Allah SWT berfirman:

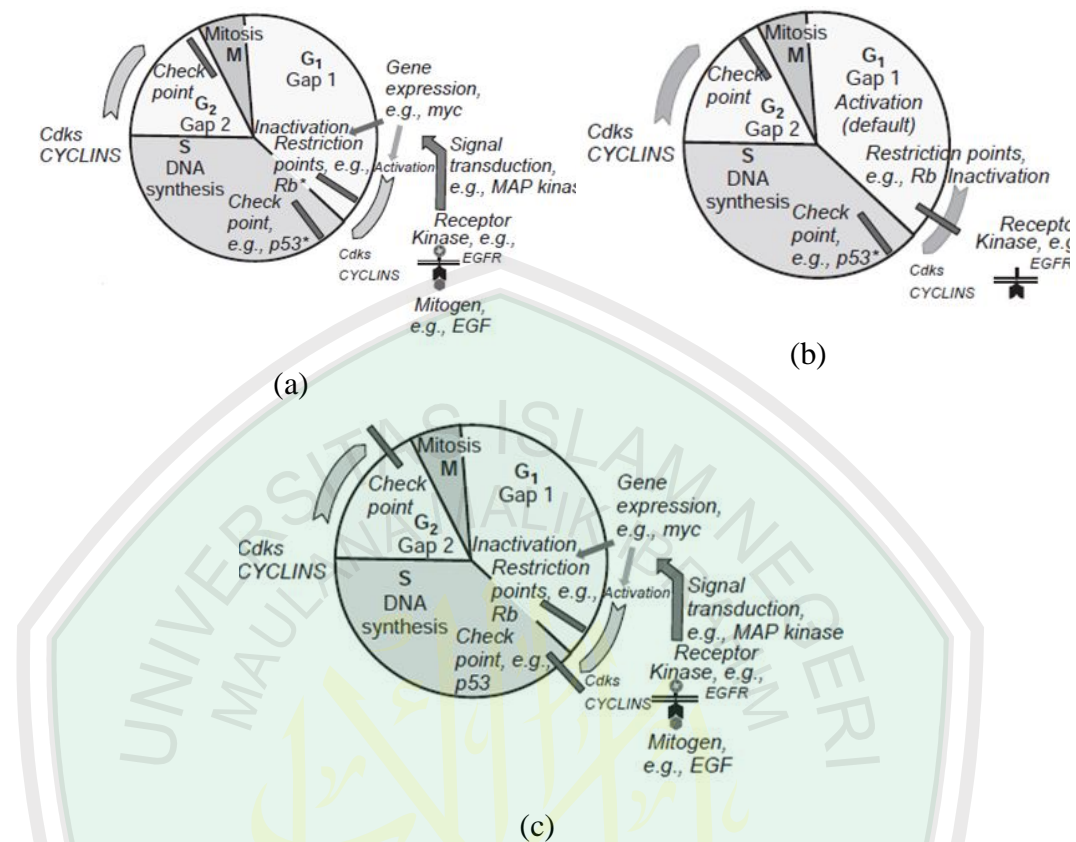
وَقَدْ خَلَقَكُمْ أَطْوَارًا ﴿١٤﴾

Artinya: *Padahal Dia Sesungguhnya telah menciptakan kamu dalam beberapa fase kejadian (Q.S. An-Nuh: 14)*

Makna ayat berdasarkan tafsir Al-Mishbah, kata *fase* atau masa (أطوارا) digunakan dalam arti kondisi yang dialami sesuatu (Shihab, 2002). Dalam ilmu sains, fase merupakan tahap, tingkatan, masa perubahan yang terjadi berturut-turut yang dialami sesuatu dengan proses. Sebagaimana dalam tingkatan seluler, fase tersebut sel melibatkan siklus sel yang bertahap dan prosesnya bersifat irreversibel, hingga pembelahan sel yang menghasilkan anakan. Kemampuan sel tersebut disebabkan sel merupakan unit terkecil penyusun makhluk hidup yang dapat melakukan aktivitas metabolisme dan berkembang melakukan fungsinya.

Proliferasi dan pembelahan sel membutuhkan perkembangan melalui siklus sel dikendalikan melalui perubahan pada kadar dan aktivitas suatu kelompok protein yang disebut siklin. Pada tahapan tertentu siklus sel, kadar berbagai siklin meningkat setelah didegradasi dengan cepat saat sel bergerak melalui siklus tersebut (Kumar *et al.*, 2007).

Siklin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan protein yang disebut kinase (CDK, *cyclin-dependent kinases*). Kombinasi yang berbeda dari siklin dan CDK berkaitan dengan setiap transisi penting dalam siklus sel, dan kombinasi ini menggunakan efeknya dengan memfosforilasi sekelompok substrat protein yang terpilih (protein fosforilate kinase; protein kontraregulasi yang disebut defosforilat fosfatase) (Pommier *et al.*, 2002).



Gambar 2.3 Siklus sel. (a). Siklus sel ditahan pada *restriction point* di G₁ oleh aktivasi Rb, (b). Ketika *restriction point* tidak aktif, biasanya dengan fosforilasi (Rb) sel melanjutkan putaran siklus (a). Siklus sel juga ditahan pada check point oleh inhibitor siklus sel seperti p53 jika kerusakan DNA terdeteksi, (c). Fosforilasi p53 memungkinkan untuk melanjutkan siklus berikutnya (a) (Freshney, 2010)

Selain dari sintesis dan pemecahan siklin, kompleks siklin-CDK juga diatur melalui pengikatan inhibitor CDK. Kompleks ini sangat penting dalam mengatur tahapan siklus sel (transisi fase G₁ ke fase S dan transisi fase G₂ ke fase M), yaitu tahapan saat sel memeriksa bahwa DNA-nya telah direplikasi dengan cukup atau semua kesalahan telah diperbaiki sebelum bergerak lebih lanjut (Kumar *et al.*, 2007).

Kegagalan pemantauan terhadap replikasi DNA akan menyebabkan akumulasi mutasi dan transformasi ganas yang mungkin terjadi. Oleh karena itu

saat DNA dirusak, protein supresor tumor TP53 atau p53 menginduksi transkripsi CDKN1A (atau p21), suatu inhibitor CDK. Inhibitor ini menahan sel dalam fase G₁ atau G₂ sampai DNA dapat diperbaiki, pada tahapan tersebut kadar TP53 menurun, CDKN1A berkurang, dan sel dapat melanjutkan tahapan. Jika kerusakan DNA terlalu luas, TP53 akan memulai suatu kaskade peristiwa untuk meyakinkan sel apoptosis (Kumar *et al.*, 2007).

Menurut William (1976) pada siklus sel peka terhadap bahan yang bersifat prokarsinogen seperti 7.12-dimetilbenz(α)antrasen. Pada pembelahan sel hepar terdapat fase yang peka adanya senyawa toksik yang reaktif. Fase sintesis DNA (fase S) adalah paling peka bagi senyawa toksik karsinogen dan rentan terhadap efek mutagenik.

2.2.2 Pertumbuhan Sel Kanker

Aspek filosofi kehidupan baik pada tingkat molekuler, seluler maupun pada tingkat individu, dalam menghadapi suatu jejas (adaptasi dengan perubahan lingkungan) memiliki mekanisme yang dikenal dengan hukum keseimbangan atau homeostatis. Oleh karena itu, bila suatu sel yang DNA-nya mengalami mutasi, maka DNA di dalam sel tersebut harus diperbaiki, yaitu melalui mekanisme yang dikenal dengan DNA *repair*. Apabila proses *repair* DNA yang cacat pada sel yang bersangkutan tidak berhasil, maka sel tersebut akan melakukan eksekusi diri sehingga sel mengalami kematian atau apoptosis (Sudiana, 2008). Sehingga, keseimbangan merupakan tindakan yang dilakukan sel untuk menghadapi berbagai perubahan lingkungan sebagaimana terdapat dalam al-Qur'an surah Infithaar ayat 7, Allah SWT berfirman:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾

Artinya: yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang (Q.S. Infithaar: 7).

Makna kata "menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang" (فَعَدَلَكَ) yaitu ciptaan yang lurus, sepadan dan seimbang (Al-Qurthubi, 2009). Ayat di atas menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan manusia dengan bentuk kesempurnaan dan susunan tubuh seimbang, walaupun dalam tingkatan selular. Masing-masing sel normal memiliki potensi berproliferasi dan apoptosis (program kematian sel) karena sel memiliki molekul protein yang bekerja secara terorganisir yaitu protein yang proapoptosis (protein yang diaktivasi untuk melakukan ekskusi kematian sel) dan protein antiapoptosis (mempertahankan kelangsungan hidup sel). Sehingga jika sel mengalami kondisi yang terpapar dengan bahan kimia yang bersifat mutan yang mengakibatkan kerusakan DNA, maka sel berusaha untuk melakukan perbaikan (DNA *repair*). Jika perbaikan DNA gagal dilakukan, sel akan mengarahkan jalur apoptosis (program kematian sel) dengan meningkatkan kadar protein proapoptosis. Apabila bahan kimia yang masuk kedalam sel kapasitasnya lebih banyak dan tidak sebanding dengan kemampuan untuk beradaptasi, maka sel akan berproliferasi abnormal karena memiliki DNA yang cacat (mutasi).

Pada sel normal keadaan fisiologis pertumbuhan (pembelahan=proliferasi) sel dan diferensiasi sel diatur oleh gen yang disebut *proto-onkogen*, melalui protein (polipeptida) Proto-onkogen dapat berubah menjadi *onkogen* melalui salah satu mekanisme mutasi titik, translokasi, amplifikasi, insersi dan delesi. Seperti

gen yang lain, proto-onkogen terdiri atas daerah regulator dan daerah struktur. Perubahan bagian-bagian ini akan mengakibatkan onkogen menjadi aktif. Mutasi pada bagian struktur akan mengakibatkan sintesis protein yang struktur dan fungsinya menyimpang, sementara perubahan regulator mengakibatkan produksi protein yang jumlahnya berkurang atau berlebihan (Pringgoutomo, 2002).

Tumor tidak hanya terbentuk oleh aktivasi onkogen yang bekerja dominan tetapi dapat juga sebagai akibat hilangnya atau tidak aktifnya gen yang bekerja menghambat pertumbuhan sel yang disebut *anti-onkogen*. Pada pertumbuhan dan diferensiasi sel normal *anti-onkogen* bekerja menghambat pertumbuhan dan merangsang diferensiasi sel, misalnya gen p53 dan gen Rb (Pringgoutomo, 2002).

Menurut Kumar *et al.* (2008) pada keadaan aktif Rb berfungsi sebagai rem untuk menghambat melajunya sel dari fase G₁ ke S pada siklus sel. Sedangkan gen p53 mendeteksi kerusakan DNA dan membantu perbaikan DNA dengan menyebabkan penghentian siklus sel G₁. Sel yang mengalami kerusakan DNA dan tidak dapat diperbaiki diarahkan untuk mengalami apoptosis, namun kegagalan perbaikan DNA dapat mengakibatkan transformasi keganasan.

Apoptosis dirangsang oleh gen penghambat dan gen perangsang pertumbuhan sel. Gen penghambat apoptosis ialah Bcl-2. Peningkatan ekspresi Bcl-2 mengakibatkan perpanjangan hidup sel dan jika sel mengalami kerusakan genetik, maka terus terjadi mutasi tambahan pada onkogen dan anti-onkogen. Yang meningkatkan apoptosis ialah gen Bax. Hubungan tingkat kapasitas kedua gen Bcl-2 dan Bax menentukan jumlah sel (Pringgoutomo, 2002).

Proliferasi atau kelangsungan hidup sel secara tidak langsung dengan mempengaruhi kemampuan organisme memperbaiki kerusakan nonlethal di gen lain, termasuk proto-onkogen, gen penekan tumor, dan gen yang mengendalikan apoptosis. Kerusakan pada gen yang memperbaiki DNA dapat memudahkan terjadinya mutasi luas di genom dan transformasi neoplastik (Kumar *et al.*, 2007).

Penyakit keganasan dikelompokkan menjadi dua fase, yaitu *initiation phase* dan *promotion phase*. *Initiation phase* terjadi apabila bahan yang bersifat karsinogenik masuk dalam tubuh, maka di dalam tubuh bahan ini mengalami detoksifikasi untuk kemudian diekskresikan. Selain itu, bahan karsinogenik tersebut terlebih dahulu dimetabolisme dalam tubuh. Kemudian hasil metabolismenya didetoksifikasi dan berikutnya diekskresi. Apabila proses ini tidak dapat dilakukan oleh tubuh, maka hasil metabolit dari bahan karsinogenik ini akan mengadakan ikatan dengan DNA. Sehingga DNA menjadi cacat, sebagai akibat dari adanya kecacatan, sel berusaha untuk melakukan perbaikan DNA yang dikenal dengan DNA repair. Bila perbaikan DNA ini tidak berhasil, sel yang bersangkutan (sel yang memiliki DNA abnormal) tersebut akan dieksekusi atau dimusnahkan. Apabila proses ekskusi tersebut memiliki DNA cacat yang bersifat permanen. Sedangkan *promotion phase* terjadi pada sel yang memiliki DNA cacat tersebut akan mengalami proliferasi dan diferensiasi, serta berkembang menjadi *malignan* (ganas) (Sudiana, 2008).

2.3 Perkembangan Kultur Sel Hepar

2.3.1 Fase Pertumbuhan Sel Kultur dalam Medium

Fase pertumbuhan dibagi menjadi tiga tahap (Freshney, 2010), yaitu:

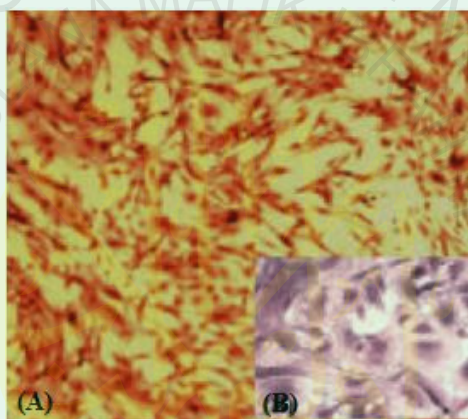
Lag phase. Fase ini adalah waktu setelah subkultur atau penanaman, selama fase ini sedikit sekali kenaikan jumlah sel. *Lag phase* merupakan periode adaptasi yang lambat, sel perlu penggantian unsur-unsur yang hilang seperti misalnya unsur glikokaliks yang hilang sewaktu tripsinasi. Di samping itu sel harus melekatkan diri terlebih dahulu pada substrat dan melakukan penyebaran diri, dan pada waktu menyebar tersebut, sitoskeleton baru terlihat lagi. Setelah sel menyebar terjadi kenaikan enzim, seperti DNA polymerase, diikuti dengan sintesis DNA baru dan protein struktural yang lain (Freshney, 2010).

Log phase. Fase ini terjadi peningkatan eksponensial jumlah sel setelah *lag phase* dan berakhir dengan satu atau dua kali penggandaan populasi sel setelah sel mencapai konfluen. Panjang fase logaritmik tergantung pada kepadatan penanaman, kecepatan tumbuh sel, dan kepadatan sel yang menghambat proliferasi sel. Dalam fase logaritmik ini bagian populasi sel yang tumbuh cepat, biasanya mencapai sampai 90-100% (Freshney, 2010).

Plateau phase. Menjelang fase logaritmik, kultur menjadi konfluen, seluruh permukaan sudah ditempati oleh sel dan semua berkontak satu sama lainnya. Setelah konfluen kecepatan tumbuh kultur menurun kemudian proliferasi sel hampir berhenti sama sekali setelah populasinya berlipat ganda. Fase plateau ini populasi sel yang tumbuh turun menjadi 0-10% (Trenggono, 2009).

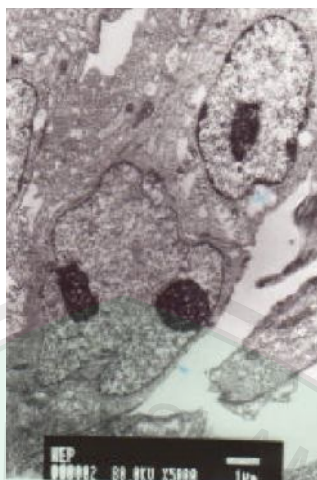
2.3.2 Karakteristik Sel Hepar dalam Kultur In Vitro

Dalam penelitian Hristova *et al.* (2009) telah menganalisa morfologi sel hepar fetus dengan pewarnaan HE dan MGG (Gambar 2.4) memperlihatkan bentuk sel-sel memanjang (elongasi) terlihat jelas persinggungan sel satu dengan yang lain. Karakteristik utama yaitu inti relatif besar dan sitoplasma tampak kompak. Inti (nuklei) oval dengan satu sampai tiga anak inti (nukleoli) dan juga sel-sel poligonal dengan inti relatif besar.



Gambar 2.4 Monolayer sel hepar fetus: (A) pewarnaan HE, 4X; (B) pewarnaan MGG, 40X (Hristova *et al.*, 2009)

Pemeriksaan mikroskop elektron (Gambar 2.5) menampakkan bahwa sel-sel bipolar, dengan bentuk sangat memanjang. Sitoplasma cukup padat, penuh dengan butiran-butiran glikogen dan berlimpah dengan ribosom dan fagosom. Kedua retikulum endoplasma halus dan kasar dapat dibedakan, di bagian tertentu terdapat seperti tandon yang membesar dan mitokondria yang padat serta Krista. Inti sel-sel kaya dengan eukromatin, dengan nukleulus menonjol biasanya lebih dari satu, di beberapa tempat terletak dekat dengan membran nukleus. Pada beberapa preparat dapat terlihat adanya konsentrasi heterokromatin sekitar membran nukleus (Hristova *et al.*, 2009)



Gambar 2.5 Mikrograf dari sel-sel hepar fetus (Hristova *et al.*, 2009)

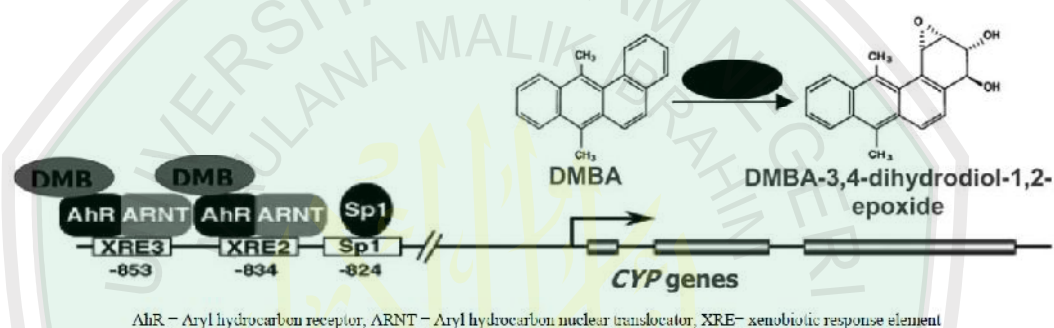
2.4 Senyawa Penginduksi 7,12-dimetilbenz(α)-antrasen (DMBA) pada Sel Hepar

Metabolisme obat di hepar terjadi pada membran retikulum endoplasma sel. Pada retikulum endoplasma halus terdapat enzim yang terikat untuk metabolisme obat. Enzim tersebut berperan dalam berbagai reaksi oksidasi berlangsung yang disebut dengan enzim sitokrom P450 (CYP).

DMBA adalah karsinogen kimiawi yang bekerja secara tidak langsung dan aktif setelah terjadi metabolik. Zat tersebut bersifat prokarsinogen, dan setelah terjadi metaboli menjadi produk aktifnya disebut *ultimate carcinogen* (bekerja secara langsung). Ultimate carcinogen merupakan elektrofil (memiliki atom yang kekurangan elektron) yang sangat reaktif dan bereaksi dengan atom kaya elektron terutama DNA.

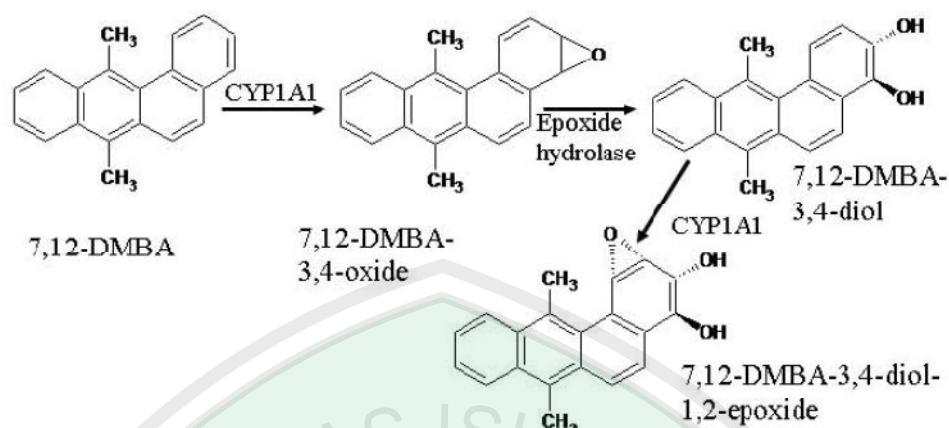
Mekanisme masuknya DMBA ke dalam sel sebagai ligan yang mengaktifkan reseptor *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) atau faktor transkripsi sitosol yang biasanya tidak aktif dengan beberapa faktor protein. Setelah mengikat ligan faktor protein akan memisah akibat perpindahan Ahr ke dalam inti.

Kemudian membentuk heterodimer dengan protein *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT) dan berinteraksi dengan *xenobiotic response element* (XRE) di bagian promoter gen enzim fase I dan fase II inti sel, dalam biotransformasi DMBA menjadi bentuk *elektrofilik diolepoxide* yang tidak stabil (gambar 2.6). Aktivasi dikatalis oleh enzim sitokrom (CYP) yaitu epoxide hidrolase menjadi metabolit yang elektrofilik (Nagini, 2009).



Gambar 2.6 Metabolisme DMBA oleh enzim sitokrom P450 (CYP) (Nagini, 2009)

Metabolit reaktif DMBA dapat berkonjugasi dengan GSh oleh GST. Enzim detoksifikasi fase II mengkatalis pengeluaran reaksi produk CYP fase I. Walaupun enzim fase I dan fase II mendetoksifikasi DMBA, namun beberapa *diolepoxide* lolos dari detoksifikasi yang mampu berikatan dengan residu adenin DNA menyebabkan mutasi onkogen pada sel normal menjadi transformasi sel (Nagini, 2009).



Gambar 2.7 Aktivasi metabolic 7,2-DMBA menjadi metabolit karsinogenik oleh CYP1A dan epoxide hydrolase (Androutsopoulos *et al.*, 2009)

Cytochrome P-450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk *DNA adduct*. *Cytochrome* P-450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-*epoxides* yang diikuti dengan hidrolisis *epoxides* oleh mEH membentuk metabolit DMBA-3,4-diol (gambar 2.7). Metabolit ini nantinya dioksidasi oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit karsinogen aktif (*ultimate carcinogenic*) yaitu 7,12-DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxide* (Nagini, 2009).

Metabolit aktif DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxides* mampu berikatan kovalen dengan DNA membentuk *bulky DNA adduct* dan kerusakan oksidatif pada sisi 8-hidroksi-2'-Deoksiganosin (8-OH-dG). Interaksi *DNA adduct* mampu menginduksi produk mutasi gen supresor p53 (Weimer *et al.*, 2000) dan mutasi Adenin menjadi Timin pada *codon* 61 gen ras (Ewing, 2007).

2.5 Konfluen Sel Hepar *Baby hamster*

Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut sudah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006). Konfluen sel adalah tumbuh homogen atau meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi cover glass (Wulandari, 2003). Menurut Budiono (2002), konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan lingkungan sekitarnya.

Yalcin *et al.*, (2007) menyatakan bahwa sel-sel tumbuh dalam kondisi kultur standar (37⁰C, 5% CO₂, kelembapan 95%) dalam waktu 1 hari untuk mendapatkan lapis subconfluent (~25%) atau selama 4 hari untuk mendapatkan konfluen monolayer (100%).

Konfluen sel dalam pemberian obat kanker digunakan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak dengan menekan pertumbuhan sel yang ditandai kerusakan konfluen sel dan perlekatan sel dengan substrat. Pemberian agen sitotoksik ekstrak mengakibatkan konfluen sel menurun, diduga siklus sel mengalami pemberhentian.

2.6 Viabilitas Sel Hepar *Baby hamster*

Viabilitas didefinisikan sebagai kemungkinan kemampuan hidup atau daya hidup. Viabilitas sel merupakan kemungkinan kemampuan sel atau ketahanan sel dalam menanggapi respon adaptif terhadap perubahan lingkungan (Trenggono, 2009). Viabilitas sel adalah jumlah sel yang sehat dalam suatu sampel, tanpa membedakan apakah sel-sel membelah secara aktif (*quiescent*) (Wyllie *et al.*, 2000).

Viabilitas sel menunjukkan respon jangka pendek sel seperti perubahan (meningkat dan tidak terkontrol) permeabilitas membran atau adanya gangguan metabolisme tertentu dalam sel. Viabilitas sel biasa digunakan untuk mengetahui sifat biologi suatu bahan atau sifat toksik terhadap sel. Salah satu yang mengindikasikan sifat bahan yang toksik yaitu adanya penurunan proliferasi dan penurunan viabilitas sel (Freshney, 2010). Sehingga, metode viabilitas sel didasarkan pada kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik, karena memprediksi sifat sitotoksik bahan merupakan syarat mutlak untuk pengobatan kanker (Kurnijisanti dkk., 2008).

Umumnya untuk mengetahui sel yang mati dan sel yang hidup dengan pewarnaan *trypan blue*. Sel yang mati akan menyerap warna biru yang diduga terjadi kerusakan permeabilitas membran sel, sedangkan sel yang hidup tidak menyerap warna.

2.7 Sitoksisitas Sel Hepar *Baby hamster*

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan keracunan. Sitotoksisitas adalah sejauh mana agen memiliki tindakan destruktif spesifik pada sel-sel tertentu (Siregar, 2000). Uji sitotoksisitas merupakan uji kualitatif dan kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney, 2000).

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksisitas adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan *trypan blue* dan metode MTT *assay* (Padmi, 2008). Menurut Djajanegara (2010) hasil perhitungan sel dengan metode *direct counting* ini dapat digunakan karena memberikan hasil yang lebih baik dari pada metode MTT.

Metode *direct counting* ini dilakukan di bawah mikroskop menggunakan hemositometer. Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui potensi toksisitasnya terhadap sel kanker. Parameter yang digunakan dalam uji sitotoksitas ini adalah LC50 yang merupakan manifestasi toksisitas. LC50 merupakan konsentrasi ekstrak bahan alam yang mampu mematikan sel sebesar 50% populasi.

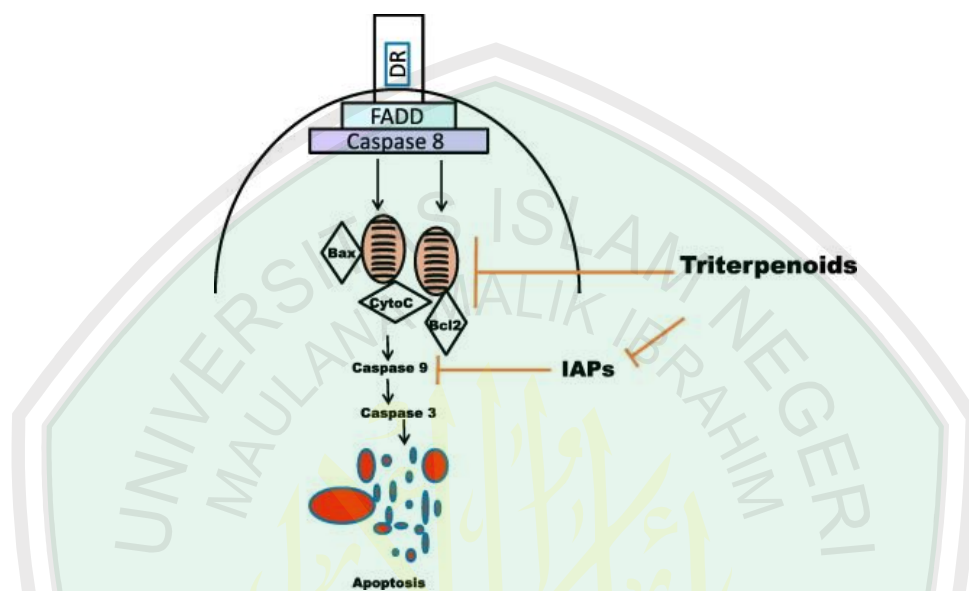
2.8 Target molekular Ekstrak *Centella asiatica* terhadap kanker Sel Hepar

Triterpen memiliki satu target yang umum, antiapoptotik protein Bcl-2, yang dapat menimbulkan apoptosis dalam sel-sel kanker (Yadav *et al.*, 2010), dan peningkatan permeabilitas membran (Tang *et al.*, 2009). Umumnya, senyawa triterpen menginduksi apoptosis pada jalur ekstrinsik (*death receptor*) dirangsang oleh ligan *ligation of death receptor reseptor* (DRs), yang mengarah ke trimerisasi reseptor (Gambar 2.9), merekrut molekul adaptor (FADD) dan mengaktivasi Kaspase-8 (Shanmugam, 2012).

Jalur intrinsik mitokondria dimulai dengan pelepasan protein mitokondria seperti sitokrom c ke sitosol. Triterpen dapat menginduksi apoptosis pada berbagai titik, misalnya pori pada mitokondria dengan menargetkan kompleks transisi permeabilitas, dengan menekan protein IAP (*inhibitor of apoptosis*) atau inhibisi protein anti-apoptotic Bcl-2 (Shanmugam, 2012).

Transisi permeabilitas mitokondria menyebabkan peningkatan kalsium sitosol, stres oksidatif intrasel yang meningkat dalam saluran mitokondria interna dengan kemampuan konduksi yang tinggi. Pori nonselektif memungkinkan gradien proton melintasi membran mitokondria untuk menghilang

sehingga mencegah pembentukan ATP. Sitokrom c (protein mudah larut penting pada rantai transport elektron) juga bocor keluar dalam sitosol yang menyebabkan kerusakan mitokondria (Kumar *et al.*, 2007).



Gambar 2.8 Jalur apoptotik triterpen pada sel tumor (Shanmugam, 2012)

Selanjutnya menginduksi aktivitas *caspase-9*, kemudian aktivitas *caspase-3* dan pembelahan poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) yang mengakibatkan kematian apoptotik irreversibel dalam sel tumor. *Caspase-3* merupakan *caspase* akhir yang bertanggung jawab sebagian besar proses apoptotic, menyebabkan pembelahan atau degradasi dari beberapa substrat penting, termasuk PARP. PARP dapat membantu sel-sel untuk mempertahankan kelangsungan hidup, tetapi pembelahan PARP memfasilitasi pembongkaran selular dan berfungsi sebagai penanda mengalami apoptosis (Tang *et al.*, 2009).