

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Kanker adalah penyakit yang muncul akibat sel-sel abnormal, ditandai oleh proliferasi sel yang terus-menerus, kerusakan gen penekan pertumbuhan, dan terhentinya mekanisme kematian sel terprogram. Kondisi ini juga disertai dengan replikasi sel yang tidak terkendali, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), serta kemampuan sel untuk bermetastasis dan menginvasi jaringan sekitarnya (Safitri *et al.*, 2020). Kanker payudara merupakan jenis kanker dengan jumlah kasus tertinggi di Indonesia dan menjadi penyebab utama kematian akibat kanker. Berdasarkan data Globocan 2020, tercatat 68.858 kasus baru kanker payudara, yang mewakili 16,6% dari total 396.914 kasus kanker baru di Indonesia, dengan angka kematian mencapai sekitar 22.000 jiwa (Kemenkes RI, 2022).

A. Daun Sirih Hijau

1. Deskripsi



Gambar 1. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) (Yuliana L, 2023).

Klasifikasi tanaman daun sirih hijau adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: Sirih
Nama binomial	: <i>Piper betle</i>

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) banyak tumbuh di wilayah tropis Asia hingga Afrika Timur, termasuk hampir seluruh wilayah Indonesia, Thailand, Malaysia, India, Sri Lanka, dan Madagaskar

(Saidah et al., 2020). Tanaman ini merupakan jenis merambat dengan ciri khas daun berbentuk hati yang ujungnya meruncing, panjang daun dapat mencapai sekitar 18 cm dan lebar 12 cm, serta memiliki aroma yang kuat dan khas. Batangnya halus dan memanjang, dan umumnya tanaman ini dibudidayakan dengan tinggi sekitar 150–180 cm di perkebunan. Namun, jika dibiarkan tumbuh liar tanpa pemangkasan, sirih bisa mencapai ketinggian hingga 20 meter. Untuk pertumbuhan yang optimal, sirih lebih menyukai tanah yang netral hingga sedikit basa, dengan pH sekitar 7 hingga 7,5 (Azahar *et al.*, 2020).

2. Aktivitas Farmakologi

Dalam kehidupan sehari-hari, masyarakat Indonesia sering memanfaatkan air rebusan daun sirih hijau untuk berbagai keperluan, seperti meredakan asma, radang tenggorokan, iritasi dan sakit pada mata, memperlancar menstruasi, menghilangkan bau mulut, hingga mengobati sariawan dan gangguan pada gusi. Daun sirih hijau memiliki beberapa efek, yaitu antifungi, anti-inflamasi, antikanker, antibakteri, antioksidan (Malik, A. 2023).

3. Senyawa Aktif

Tanaman ini dikenal sebagai salah satu tanaman obat potensial yang secara tradisional digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit. Khasiat medis daun sirih hijau telah dikenal sejak lama. Daun sirih hijau mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, dan alkaloid yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Salah satu senyawa fenolik yang terkandung di dalamnya, eugenol, terbukti mampu menimbulkan efek sitotoksik pada sel kanker payudara dengan cara menginduksi apoptosis dan menghambat pertumbuhan sel kanker tersebut (Pratiwi *et al.*, 2020).

Daun sirih hijau yang dihancurkan dan dioleskan sebagai pasta sering digunakan untuk mengobati luka. Kemampuan penyembuhan ini disebabkan oleh banyaknya biokonstituen atau senyawa bioaktif yang terkandung di seluruh bagian tanaman sirih. Beberapa senyawa aktif utama dalam sirih antara lain tanin, flavonoid (seperti kuersetin), eugenol, hidroksikavikol, dan chavibetol. Berbagai penelitian modern telah mengkonfirmasi banyak sifat farmakologis dari *Piper betle*, meliputi aktivitas antimikroba (melawan bakteri dan jamur), antijamur, antioksidan (melindungi sel dari kerusakan), antidiabetes, dan bahkan antikanker. Untuk mendapatkan senyawa- senyawa berharga ini, berbagai bagian tanaman sirih dapat diproses melalui serangkaian

prosedur, mulai dari ekstraksi hingga isolasi senyawa. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti ekstraksi soxhlet, ekstraksi sonikasi, ekstraksi maserasi, ekstraksi berbantuan ultrasonik (UAE), ekstraksi fluida superkritis (SFE), dan ekstraksi berbantuan gelombang mikro (MAE) (Azahar *et al.*, 2020).

B. Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode untuk memisahkan komponen tertentu dari suatu campuran berdasarkan perbedaan kelarutan dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Prinsip dasarnya adalah senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa nonpolar larut dalam pelarut nonpolar. Maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi yang sering digunakan dalam penelitian. Teknik ini melibatkan perendaman bahan dalam pelarut organik pada suhu tertentu untuk memisahkan senyawa aktif. Kelebihan metode ini terletak pada kesederhanaan dan efisiensinya, baik dari segi biaya maupun pelaksanaan. Selama perendaman, perbedaan tekanan antara bagian dalam dan luar sel menyebabkan kerusakan pada dinding dan membran sel, sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada di sitoplasma dapat larut ke dalam pelarut (Fakhruzy *et al.*, 2020).

C. Fraksinasi

Tahapan fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran menggunakan dua jenis pelarut yang memiliki kepolaran berbeda. Proses fraksinasi umumnya dilakukan melalui metode ekstraksi cair-cair dengan teknik pengocokan. Prinsip utama fraksinasi adalah memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran serta perbedaan massa jenis antara kedua lapisan pelarut yang digunakan. (Pratiwi *et al.*, 2016).

Fraksi air tergolong sebagai fraksi polar yang diduga mengandung berbagai senyawa seperti flavonoid, glikosida, tanin, polifenol, saponin, serta sejumlah senyawa dari golongan alkaloid. Sementara itu, fraksi heksana bersifat nonpolar dan diperkirakan mengandung senyawa seperti asam lemak, steroid, serta terpenoid. Adapun fraksi etanol dan etil asetat diklasifikasikan sebagai fraksi semipolar, yang kemungkinan besar mengandung senyawa dari kelompok alkaloid dan flavonoid. Etanol semipolar yang cenderung polar, namun untuk etil asetat semi polar yang cenderung nonpolar

(Kherid *et al.*,2020).

D. Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan langkah awal untuk mengidentifikasi jenis-jenis senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan. Tahap ini penting untuk mendapatkan gambaran awal mengenai metabolit sekunder dalam bahan tumbuhan, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, terpenoid, fenol, dan glikosida. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sebagai antioksidan, antibakteri, dan antikanker. (Hasan *et al.*, 2023)

E. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan senyawa dengan cara mengaplikasikan larutan sampel pada pelat silika sebagai fase diam, kemudian pelat dikembangkan dalam bejana tertutup yang berisi fase gerak (eluen) berupa campuran pelarut tertentu. Selama proses pengembangan, eluen bergerak naik membawa komponen sampel dan menghasilkan pemisahan berdasarkan perbedaan kepolaran serta afinitas senyawa terhadap fase diam dan fase gerak. Setelah pengembangan selesai, pelat dikeluarkan dan jarak perpindahan bercak serta eluen diukur untuk menentukan nilai R_f (retardation factor), yang digunakan sebagai parameter identifikasi senyawa. Efisiensi pemisahan dipengaruhi oleh kelarutan senyawa dalam eluen, kekuatan interaksi antarmolekul senyawa dengan pelarut, serta daya adsorpsi senyawa pada fase diam. Proses penjemuran bejana dengan eluen bertujuan mencegah penguapan pelarut agar pemisahan berlangsung optimal. Melalui optimasi sistem eluen, KLT banyak digunakan untuk pemisahan dan identifikasi senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, dalam ekstrak tanaman di laboratorium fitokimia (Ahsan, I 2022).

F. Kanker Payudara

1. Definisi

Kanker payudara merupakan penyakit genetik yang muncul akibat akumulasi kelainan genetik pada jaringan. Mutasi genetik sering ditemukan pada pasien yang baru didiagnosis dengan kanker payudara. Sel T47D (human ductal breast epithelial tumor cell line) adalah salah satu tipe sel kanker payudara yang umum digunakan dalam penelitian

(Safitri *et al.*, 2020). Kanker payudara termasuk jenis kanker yang paling sering dialami oleh perempuan dan berdampak signifikan karena penderita berpotensi harus menjalani operasi pengangkatan payudara. (Anggarani, A. P. M., & Rassa, A. N. F, 2025).

2. Faktor

Kanker payudara adalah salah satu jenis kanker yang paling sering terjadi pada perempuan, ditandai oleh pertumbuhan tumor ganas pada jaringan payudara, termasuk kelenjar susu, saluran susu, jaringan ikat, dan jaringan lemak (adiposa) (Alimun *et al.*, 2024). Hingga saat ini, penyebab pasti kanker payudara masih belum diketahui, namun penyakit ini dipengaruhi oleh berbagai faktor yang berperan secara bersamaan dalam proses terjadinya (Ketut & Kartika, 2022). Kanker payudara dapat berkembang akibat berbagai faktor, di antaranya adalah:

2.1 Usia. Bertambahnya usia menjadi salah satu faktor risiko utama terjadinya kanker payudara. Semakin bertambah usia seseorang, semakin tinggi pula kemungkinan berkembangnya kanker payudara. Sebagian besar kasus biasanya terdiagnosis setelah menopause, yaitu pada rentang usia 40 hingga 50 tahun ke atas. (Ketut & Kartika, 2022).

2.2 Genetik dan riwayat keluarga. Faktor genetik dan riwayat keluarga merupakan penyebab utama meningkatnya risiko kanker payudara. Kedua hal ini berhubungan dengan adanya mutasi genetik, terutama pada gen proto-onkogen HER2 serta gen penekan tumor BRCA1 dan BRCA2 di jaringan epitel payudara. Mutasi tersebut menyebabkan sel-sel berkembang biak secara abnormal dan tak terkendali, yang pada akhirnya dapat memicu terjadinya kanker (Ketut & Kartika, 2022).

2.3 Riwayat reproduksi dan hormonal. Riwayat reproduksi dan hormonal menjadi salah satu faktor risiko karena terkait dengan paparan hormon estrogen, yang berperan dalam merangsang pertumbuhan sel payudara. Beberapa kondisi yang termasuk dalam faktor risiko ini meliputi menarche sebelum usia 12 tahun, menopause setelah usia 55 tahun, kehamilan pertama pada usia di atas 35 tahun, tidak pernah menyusui, serta penggunaan kontrasepsi hormonal selama lebih dari lima tahun (Ketut & Kartika, 2022).

2.4 Gaya hidup. Gaya hidup memiliki peran penting dalam perkembangan berbagai jenis penyakit. Pola hidup yang tidak aktif berhubungan dengan peningkatan risiko kanker payudara karena dapat

menyebabkan akumulasi lemak tubuh (jaringan adiposa), yang menjadi tempat produksi sekunder hormon estrogen. Selain itu, kebiasaan mengonsumsi alkohol dan merokok juga meningkatkan risiko terkena kanker payudara. Alkohol dapat mengganggu metabolisme estrogen di hati, sedangkan kandungan zat karsinogenik dalam asap rokok dapat merangsang peningkatan pertumbuhan sel-sel di jaringan payudara (Ketut & Kartika, 2022).

G. Sel Kanker Payudara T47D

Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel kanker payudara T47D yang kerap digunakan dalam berbagai studi kanker secara *in vitro*. Sel ini banyak dipilih oleh peneliti karena memiliki sejumlah keunggulan, seperti kemudahan dalam pemeliharaan, kemampuan untuk bereplikasi tanpa batas, tingkat homogenitas yang tinggi, serta kemudahan dalam penggantian stok dari simpanan beku jika terjadi kontaminasi. Selain itu, sel T47D diketahui mengekspresikan protein p53 yang telah mengalami mutasi, sehingga elemen respons p53 tidak mampu lagi berikatan dengan DNA. Hal ini menyebabkan fungsi p53 dalam mengatur siklus sel dan mendorong terjadinya apoptosis menjadi terganggu atau hilang (Gaffar *et al.*, 2018).

H. Sel Normal Vero

Sel normal vero merupakan jenis sel epitel normal yang sering dimanfaatkan dalam penelitian untuk mengkaji berbagai proses biologis seperti pertumbuhan, diferensiasi, toksisitas, serta transformasi sel akibat paparan senyawa kimia tertentu. Karena karakteristiknya, sel ini juga sering direkomendasikan sebagai model sel untuk studi karsinogenesis secara *in vitro*. Penggunaan sel vero mempermudah analisis perubahan seluler, baik dari segi pertumbuhan maupun morfologi, yang terjadi akibat pengaruh senyawa kimia (Nurani & Laela, 2016).

I. Cisplatin

Cisplatin merupakan agen kemoterapi yang banyak digunakan dan memiliki potensi tinggi dalam pengobatan kanker. Secara klinis, cisplatin menunjukkan aktivitas antikanker terhadap berbagai jenis kanker, seperti kanker paru-paru, ovarium, karsinoma, payudara, dan

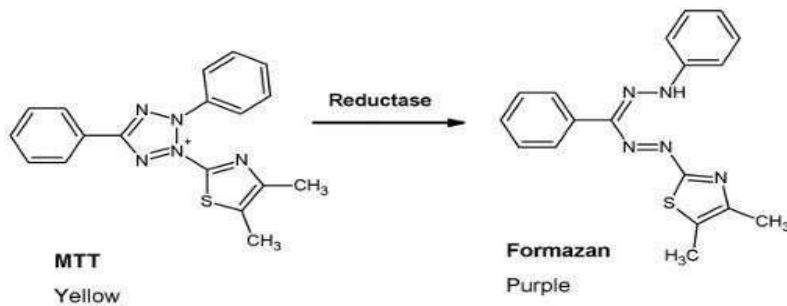
otak. Dalam praktik terapi, cisplatin sering digunakan dalam kombinasi dengan kemoterapi lain, radioterapi, maupun imunoterapi untuk meningkatkan efektivitas pengobatan. Mekanisme kerja cisplatin dalam menimbulkan efek antikanker melibatkan berbagai jalur molekuler, antara lain induksi stres oksidatif, modulasi sinyal kalsium, aktivasi apoptosis sel, serta pengaruh terhadap jalur pensinyalan intraseluler seperti protein kinase C, mitogen-activated protein kinase (MAPK), Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK, dan AKT (serin/treonin kinase), serta melalui gangguan dan kerusakan sinyal serta struktur DNA yang dimediasi oleh p53 (Oktaviyana, E. T & Utami, W., 2021).

Dalam penelitian sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D sebelumnya cisplatin digunakan sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} 8,64 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} yang rendah tersebut menunjukkan bahwa cisplatin memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat. (Widyanto *et al.*, 2020).

J. Uji Sitotoksik dan Metode MTT Assay

Uji sitotoksik adalah metode penilaian toksisitas secara *in vitro* yang memanfaatkan kultur sel untuk mengevaluasi potensi aktivitas antikanker suatu senyawa. Metode ini merupakan salah satu pendekatan penting dalam penelitian laboratorium untuk menentukan potensi dan efektivitas senyawa sebagai kandidat obat sitotoksik. (Haryoto *et al.*, 2013).

Uji MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi senyawa MTT yang berwarna kuning dan bersifat larut menjadi kristal formazan yang berwarna ungu kebiruan dan tidak larut. Proses reduksi ini terjadi di dalam sel dan umumnya melibatkan enzim suksinat dehidrogenase dari mitokondria. Formazan yang terbentuk kemudian dilarutkan menggunakan pelarut tertentu, dan intensitas warnanyadiukur menggunakan spektrofotometer, biasanya dengan alat pembaca mikrotiter 96 sumur seperti yang dipakai dalam uji ELISA. Banyaknya formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Meski nilai absorbansi absolut dapat berbeda antar garis sel, semakin pekat warna formazan, semakin tinggi nilai absorbansinya, yang menunjukkan jumlah sel hidup juga semakin banyak (Siregar & Hadijono 2000).



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Badr, M., & Trommer, W. E. 2012)

K. ELISA Reader

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu metode laboratorium yang banyak digunakan, khususnya dalam bidang imunologi, untuk mendeteksi ekspresi protein, reaksi imun, dan respons imunitas. Dalam penerapannya, teknik ELISA digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan antigen atau antibodi di dalam suatu sampel atau serum. ELISA termasuk teknik biokimia yang telah berkembang luas dan diaplikasikan pada berbagai jenis bahan, seperti sampel manusia, hewan percobaan (misalnya tikus), tumbuhan, serta bahan lainnya, dan berfungsi sebagai alat diagnostik baik di bidang medis maupun nonmedis, termasuk industri. Spesimen yang digunakan dalam metode ELISA umumnya berupa cairan, seperti serum atau hasil ekstraksi bahan dalam bentuk infusa. Apabila spesimen yang digunakan adalah serum, maka pemeriksaan tersebut termasuk dalam uji serologis yang mempelajari reaksi antigen–antibodi secara *in vitro*. Secara umum, prinsip kerja ELISA terdiri atas empat tahapan utama, yaitu pelapisan, pemblokiran, interaksi antigen dan antibodi, serta pengembangan warna.

Prinsip dasar reaksi ELISA melibatkan interaksi antara antigen dan antibodi yang telah diberi penanda enzim, kemudian ditambahkan substrat yang akan dihidrolisis oleh enzim tersebut sehingga menghasilkan endapan berwarna yang selanjutnya dapat dideteksi dan diukur. Pada tahapan akhir Teknik ELISA selalu ditambah dengan stop solution yang berfungsi untuk menghentikan reaksi. Bahan asam kuat biasanya digunakan sebagai larutan stop solutions. Analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan metode ini menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang diberi penanda enzim, di mana enzim tersebut

akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan perubahan warna. Warna yang terbentuk dapat diamati secara kualitatif dengan penglihatan langsung atau diukur secara kuantitatif melalui pembacaan nilai absorbansi menggunakan ELISA plate reader. (Amini *et al.*, 2023).

L. Viabilitas Sel

Persentase viabilitas sel adalah ukuran berapa banyak sel hidup setelah perlakuan tertentu dibandingkan dengan kontrol sel (tanpa perlakuan). Di berbagai penelitian *in vitro*, angka ini dipakai untuk menilai apakah suatu perlakuan bersifat toksik atau tidak terhadap sel. Potensi munculnya efek toksik dalam penggunaan klinis suatu bahan dapat diukur melalui uji sitotoksitas. Tingkat sitotoksitas ini ditentukan berdasarkan persentase sel yang mampu bertahan hidup, yang dikelompokkan menjadi empat kategori utama.

Tabel 1. Kategori Persentase Viabilitas

Persentase Viabilitas Sel (%)	Aktivitas sitotoksik
>90	Tidak aktif
60-90	Lemah
30-59	Sedang
<30	Kuat

Bahan dianggap tidak sitotoksik jika jumlah sel viabel mencapai lebih dari 90%, dan dikategorikan sitotoksik lemah jika jumlah sel viabilitas pada rentang 60% hingga 90%. Apabila jumlah sel viabilitas berada di angka 30% sampai 59%, maka bahan termasuk dalam kategori sitotoksik sedang, sementara persentase viabilitas di bawah 30% menunjukkan bahwa bahan tersebut memiliki tingkat sitotoksik kuat (Ismiyati *et al.*, 2016)

M. Nilai IC_{50}

Efek sitotoksik suatu senyawa dievaluasi berdasarkan nilai half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). IC_{50} merupakan konsentrasi senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh, semakin tinggi aktivitas sitotoksik senyawa tersebut. Berdasarkan kategori dari U.S. *National Cancer Institute*, toksisitas suatu senyawa terhadap sel diklasifikasikan ke dalam empat kelompok berdasarkan nilai IC_{50} .

Tabel 2. Kategori Nilai IC₅₀

IC ₅₀ (µg/mL)	Aktivitas sitotoksik
≤ 20	Kuat
21-200	Sedang
201-500	Lemah
≥ 500	Tidak aktif

Suatu senyawa dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat jika nilai IC₅₀ ≤ 20 µg/mL. Kategori sitotoksik sedang atau cukup aktif memiliki IC₅₀ dengan rentang nilai 21-200 µg/mL, sedangkan kategori sitotoksik lemah memiliki IC₅₀ dengan rentang nilai 201-500 µg/mL. Apabila nilai IC₅₀ mencapai ≥ 500 µg/mL, maka senyawa tersebut dianggap tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fadholly, A 2024).

N. Indeks Selektivitas

Banyak obat antikanker saat ini masih berdampak pada sel normal, memiliki selektivitas rendah, serta berisiko menimbulkan resistensi dan efek samping berat. Oleh karena itu, penelitian diarahkan pada penemuan senyawa antikanker baru, terutama dari bahan alam, yang lebih selektif terhadap sel kanker sehingga dapat mengurangi efek samping dan meningkatkan keberhasilan terapi. Salah satu metode untuk menilai tingkat selektivitas suatu zat uji terhadap sel kanker adalah dengan menghitung Indeks Selektivitas (IS), yaitu perbandingan antara nilai IC₅₀ pada sel Vero dan nilai IC₅₀ pada sel kanker yang diuji.

Tabel 3. Kategori Indeks Selektivitas

Nilai Indeks Selektivitas (IS)	Kategori Selektivitas
<2	Tidak selektif
≥2	Lemah-sedang
≥3	Cukup selektif
≥10	Sangat selektif

Nilai IS <2 dikategorikan tidak selektif. Nilai IS ≥2 menunjukkan selektivitas rendah hingga sedang, sedangkan nilai IS ≥3 dikategorikan cukup selektif. Apabila nilai IS mencapai ≥10, bahan tersebut dinilai sangat selektif dan relatif aman karena memiliki perbedaan efek sitotoksik yang tinggi antara sel kanker dan sel normal. Pengujian IS umumnya melibatkan penggunaan sel Vero untuk menggambarkan respons sel normal terhadap paparan senyawa kimia. Sel Vero merupakan sel epitel non-kanker yang berasal dari ginjal monyet hijau Afrika, tumbuh sebagai sel monolayer dengan morfologi poligonal dan pipih, bersifat immortal, tidak membentuk tumor, serta memiliki

karakteristik menyerupai sel fibroblastik (Lubis, I. A., & Bestari, R., 2023).

O. Landasan Teori

Kanker merupakan penyakit akibat pertumbuhan sel abnormal yang tidak terkendali, ditandai dengan gangguan regulasi siklus sel, hilangnya kemampuan apoptosis, serta potensi metastasis dan angiogenesis (Safitri *et al.*, 2020). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling umum pada wanita dan menjadi penyebab utama kematian akibat kanker di Indonesia. Kanker ini berkembang di jaringan payudara seperti saluran susu dan kelenjar, dan sering terdeteksi setelah menopause (Kemenkes RI, 2022; Alimun *et al.*, 2024). Penyebabnya bersifat multifaktorial, mencakup usia, genetik, hormon, dan gaya hidup (Ketut & Kartika, 2022).

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dikenal mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tanin, senyawa fenolik, dan terpenoid, eugenol, dan chavibetol yang memiliki efek antikanker, antibakteri, dan antioksidan (Biswas *et al.*, 2022). Senyawa bioaktif seperti terpenoid, fenol, dan alkaloid yang terdapat dalam daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel-sel kanker. Eugenol yang merupakan golongan fenol, salah satu senyawa yang terdapat dalam daun sirih hijau, telah terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel kanker payudara, memicu apoptosis dalam sel-sel kanker payudara, serta menghambat proliferasi pada sel kanker payudara (Pratiwi *et al.*, 2024). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Aini *et al.*, 2023 ekstrak etanol daun sirih hijau terdapat senyawa alkaloid, sapoin, tanin, flavonoid, dan triterpenoid melalui uji tabung fitokimia.

Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi adalah etil asetat karena bersifat semipolar sehingga efektif dalam menarik senyawa seperti senyawa flavonoid. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa etil asetat sebagai pelarut semipolar mampu menarik senyawa dengan rentang polaritas yang luas, mulai dari polar hingga nonpolar (Putri *et al.*, 2013).

Pada penelitian yang telah dilakukan, ekstrak etanol daun sirih hijau memiliki aktivitas toksisitas yang cukup toksik terhadap sel kanker payudara T47D nilai IC_{50} yang didapatkan yaitu 55,2 $\mu\text{g/mL}$ (Biswas, *et al.*, 2022). Dari ekstrak etanol tersebut dilanjutkan ke fraksi dikarenakan tahapan fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan

perbedaan tingkat kepolaran yang memiliki kepolaran berbeda. Cisplatin digunakan sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} 8,64 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa cisplatin termasuk poten dan menunjukkan toksik yang baik dengan didapatkan nilai IC_{50} yang rendah (Widyanto *et al.*, 2020).

Pengujian aktivitas antikanker dilakukan melalui uji sitotoksik dengan metode MTT assay. Sel T47D digunakan sebagai model kanker payudara karena mudah dikultur dan memiliki mutasi gen p53 (Gaffar *et al.*, 2018), sementara sel Vero digunakan sebagai kontrol sel normal (Nurani & Laela, 2016). MTT assay mengukur viabilitas sel berdasarkan pembentukan formazan oleh sel hidup, menentukan potensi toksisitas senyawa (Haryoto *et al.*, 2013; Siregar & Hadijono, 2000). Sel Vero digunakan sebagai model untuk mengevaluasi respons sel normal terhadap paparan berbagai senyawa kimia. Sel ini merupakan sel epitel nonkanker yang berasal dari ginjal monyet hijau Afrika, dengan karakteristik tumbuh sebagai sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih. Sel Vero bersifat tidak bersifat tumorigenik, serta menunjukkan morfologi menyerupai sel fibroblastik. (Lubis, I. A., & Bestari, R., 2023).

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk hidup setelah mendapatkan perlakuan dan menjadi indikator potensi efek toksik suatu bahan. Viabilitas dihitung melalui absorbansi sel yang mendapatkan perlakuan, kontrol sel yang tidak mendapatkan perlakuan, dan kontrol media yang hanya berisi media. Bahan dikategorikan tidak sitotoksik jika sel hidup di atas 90%, sementara kategori ringan berada pada rentang 60–90%, kategori sedang 30–59%, dan kategori kuat di bawah 30% (Ismiyati *et al.*, 2016).

Suatu senyawa dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat jika nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Kategori sitotoksik sedang atau cukup aktif memiliki IC_{50} dengan rentang nilai 21–200 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan kategori sitotoksik lemah memiliki IC_{50} dengan rentang nilai 201–500 $\mu\text{g/mL}$. Apabila nilai IC_{50} mencapai $\geq 500 \mu\text{g/mL}$, maka senyawa tersebut dianggap tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fadholly, A 2024).

Salah satu metode untuk menilai selektivitas suatu sampel terhadap sel kanker adalah dengan menghitung Indeks Selektivitas (IS), yaitu perbandingan antara IC_{50} pada sel Vero dan IC_{50} pada sel kanker yang diuji. Nilai $IS < 2$ dikategorikan tidak selektif. Nilai $IS \geq 2$ menunjukkan selektivitas rendah hingga sedang, sedangkan nilai $IS \geq 3$

dikategorikan cukup selektif. Apabila nilai IS mencapai ≥ 10 , bahan tersebut dinilai sangat selektif dan relatif aman karena memiliki perbedaan efek sitotoksik yang tinggi antara sel kanker dan sel normal (Lubis, I. A., & Bestari, R., 2023).

P. Hipotesis

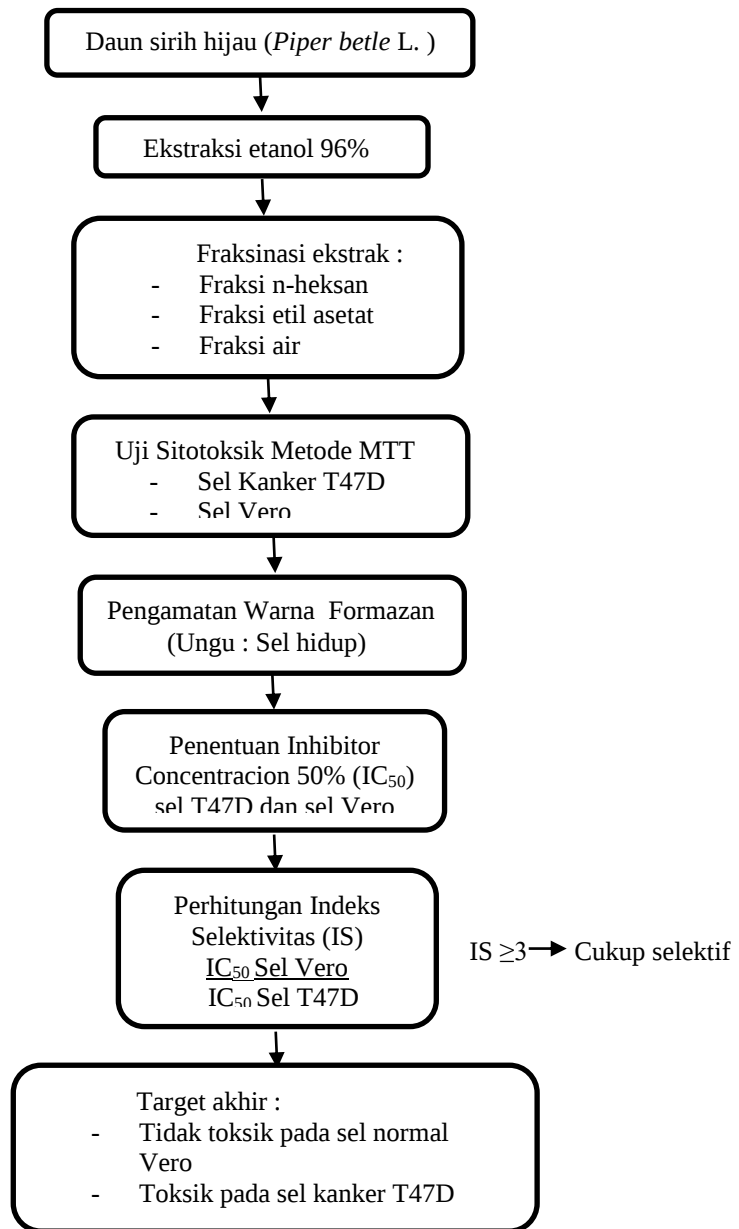
Berdasarkan permasalahan tersebut, hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan menggunakan metode MTT berdasarkan nilai IC_{50} .

Kedua, fraksi yang paling aktif dalam memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D adalah fraksi etil asetat.

Ketiga, fraksi yang terpilih dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) menunjukkan selektivitas terhadap sel kanker payudara T47D dibandingkan dengan sel normal Vero.

Q. Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka konsep