

POTENSI FLAVONOID KULIT BUAH
RAMBUTAN SEBAGAI ANTIOKSIDAN
ALAMI

BAB
5



Lisdiana

POTENSI FLAVONOID KULIT BUAH RAMBUTAN SEBAGAI ANTIOKSIDAN ALAMI

Penulis Lisdiana

5.1. Pendahuluan

Tanaman rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan alami yang dalam perkembangannya juga digunakan sebagai tanaman obat (Nugraha 2008). Buah rambutan berbentuk bulat sampai lonjong dan seluruh permukaan kulitnya banyak ditumbuhi rambut-rambut (duri-duri lunak), oleh karena itu disebut Rambutan. Rambutan tergolong tanaman buah tropis dari family Sapindaceae, banyak tersebar di wilayah Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Thailand, Kamboja, Karibia, Amerika Latin dan ditemukan pula di daratan yang mempunyai iklim sub-tropis (Jansenss *et al.*, 2013). Di Indonesia banyak ditanam untuk dimanfaatkan buahnya dan kulit buahnya dibuang sebagai limbah yang belum termanfaatkan.

Buah rambutan tersusun atas 3 komponen yakni buah, biji dan kulit. Kulit buah (*perikarp*). Kulit buah rambutan diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang mengandung senyawa fenolik, yakni *ellagic acid*, *geraniin*, *corilagin*. Senyawa-senyawa tersebut telah dilaporkan mampu berperan sebagai antivirus, antiinflamasi, apoptosis, sitotoksik, sitoprotektif, antimikroba dan antioksidan. *N. lappaceum* memiliki antioksidan yang jauh lebih besar daripada antioksidan sintetis. Salah satu antioksidan yang ditemukan dalam kulit buah rambutan adalah flavonoid (Thitilertdecha *et al.*, 2010).

Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yaitu mendonorkan ion hidrogen sehingga menetralkan efek toksik dari radikal bebas serta meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2). Akibat dari proses tersebut akan terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen, misalnya SOD (Sumardika & Jawi, 2012).

Enzim superoxide dismutase (SOD) adalah antioksidan enzimatis yang memegang peranan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif (Fridovich 1991). Superoxide dismutase mengatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 akan diubah menjadi H_2O oleh enzim katalase dan glutathione peroksidase (Lee *et al.*, 2012). Pemakaian enzim SOD yang terlalu besar untuk menetralkan radikal bebas secara terus-menerus akan menurunkan aktivitas enzim tersebut (Muhammad, 2009). SOD merupakan salah satu antioksidan primer yang mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk lebih stabil. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2007).

Flavonoid berperan sebagai antioksidan telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri, anti-inflamasi, antiallergic, antimutagenik,

antiviral, antineoplastik, anti-trombotik, dan vasodilatasi, hepatoprotektif (Kumar & Abhay, 2013). Flavonoid juga merupakan salah satu hal yang harus ada dan penting dalam bahan makanan sebagai sumber antioksidan dan direkomendasikan sebesar 800 mg/hari (Pietta, 2000).

Palanisamy *et al.* (2008) menyatakan bahwa sebagai tanaman yang mengandung antioksidan, kulit buah rambutan diduga dapat menghambat terjadinya kerusakan oksidatif. Stres oksidatif dapat dilihat dari beberapa tanda yang berbeda, yaitu dengan pengukuran langsung agen oksidatif seperti produksi ROS oleh sel darah perifer, efek stres oksidatif pada target molekul (produk lipid peroksidasi dan protein teroksidasi), atau respon kapasitas antioksidan dalam plasma. Paparan bahan kimia oksidan seperti paparan asap rokok dapat dikaitkan dengan penurunan tingkat antioksidan endogen dalam kompartemen sistemik. Merokok mengakibatkan rendahnya konsentrasi antioksidan alami dalam plasma (Yanbaeva *et al.*, 2007). Hal ini dikarenakan keadaan stres oksidatif akibat pemaparan asap rokok dapat meningkatkan jumlah radikal bebas yang menyebabkan penggunaan SOD semakin banyak yang pada akhirnya jumlah antioksidan semakin berkurang. Kulit buah rambutan sebagai sumber senyawa antioksidan secara perlahan mendapatkan perhatian karena aktivitas antioksidannya lebih baik daripada bagian yang lain (Zulkifli *et al.*, 2012).

5.2. Flavonoid pada Kulit Rambutan

Rambutan merupakan tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan sangat digemari masyarakat. Salah satu bagian yang belum dimanfaatkan secara maksimal adalah kulit buahnya. Saat ini kulit buah rambutan cenderung dibuang dan menjadi limbah yang belum dimanfaatkan. Banyak penelitian telah membuktikan berbagai macam senyawa kimia yang terkandung di dalam kulit buah rambutan. Kulit buah rambutan ditemukan memiliki efek biologis seperti aktivitas antioksidan, antibakteri (Palanisamy *et al.*, 2008; Thitilerdecha *et al.*, 2008), antiproliferasi (Khonkarn *et al.*, 2010), anti herpes simplex virus tipe 1 (Nawawi *et al.*, 1999) dan antihiperlipemik (Palanisamy *et al.*, 2011).



Gambar 5.1. *Nephelium lappaceum* L.

Kulit buah rambutan mengandung berbagai macam antioksidan seperti alkaloid, fenolik, steroid, terpenoid (Wardhani & Saptono, 2015), tanin (Thinkratok 2011), saponin (Fila *et al.*, 2012) dan asam

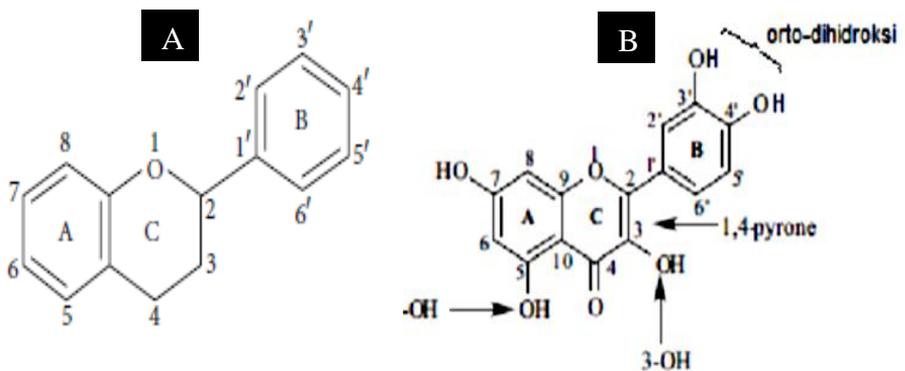
askorbat (Wall, 2006), dengan kandungan tertinggi adalah senyawa fenolik (Fila *et al.*, 2012). Senyawa fenolik bersifat antioksidan kuat, mempunyai cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu dan berperan melindungi sel tubuh dari bahaya radikal bebas dengan cara mengikat radikal bebas. Kulit buah rambutan juga mengandung flavonoid (Lisdiana *et al.*, 2017) serta antosianin (Hutapea *et al.*, 2014). Antosianin merupakan senyawa golongan flavonoid yang memberikan pigmen sehingga berwarna merah tua (Nurdin *et al.*, 2013). Flavonoid merupakan salah satu kelompok fenol yang terbesar di alam.

5.3. Struktur Kimia Flavonoid

Flavonoid adalah metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada banyak tanaman. Sumber utama flavonoid adalah produk buah (misalnya buah jeruk, rosehip, aprikot, cherry, anggur, kismis hitam, bilberry, apel), dan sayuran (misalnya bawang merah, brokoli, tomat, bayam), minuman (anggur merah, kopi, teh), biji kakao, produk kedelai dan herbal (Hodek *et al.*, 2002).

Flavonoid mempunyai struktur kimia C₆-C₃-C₆, dua cincin aromatic diikat melalui penghubung tiga rantai karbon (Santos-Buelga & Arturo, 2017). Berbagai kelas flavonoid berbeda dalam tingkat oksidasi dan pola substitusi pada cincin C, sedangkan perbedaan setiap senyawa dalam kelas adalah berbeda dalam substitusi pada cincin A dan B. Terdapat beberapa kelas flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavon, flavanon, isoflavon, flavanol, flava- nonol, flavan-3ol dan antosianin.

Secara kimia flavonoid terdiri atas 15 rangka karbon yang mengandung dua cincin benzene (A dan B) yang dihubungkan oleh sebuah cincin pyrin heterolik (C). Flavonoid dapat dibedakan menjadi beberapa kelas diantaranya flavones (flavnon, apigenin, dan luteolin), flavonols (quarcetin, kaemperol, myricetin, dan fisetin), flavanon (flavonon, hesperetin, dan naringenin) dan lainnya. Flavonoid dapat berupa aglikon, glikon, dan turunan dari metilat. Pada dasarnya struktur flavonoid adalah aglikon (Kumar & Abhay, 2013). Pembagian kelas dari jenis flavonoid ini berdasarkan tingkat oksidasi dan susunan substituen yang terikat pada cincin C. Masing-masing senyawa dari tiap kelas dibedakan berdasarkan susunan substituen dari cincin A dan B (Pietta, 2000). Analisis flavonoid yang terdapat pada tanaman dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya senyawa kimia alami, struktur yang kompleks, fisikokimia, dan konsentrasi dari flavonoid yang berubah bergantung matriks (Santos-Buelga & Arturo, 2017).



Gambar 5.2. Struktur kimia flavonoid. A struktur dasar flavonoid (Kumar & Abhay, 2013). B struktur flavonoid lengkap (Simanjuntak, 2012)

5.4. Bioavailabilitas Flavonoid

Flavonoid banyak digunakan dalam dunia kesehatan bukan karena tanpa alasan melainkan karena aktivitas biologis yang dimiliki oleh senyawa tersebut. Aktivitas biologis dari flavonoid diantaranya sebagai antioksidan, hepatoprotektif, antibakterial, anti inflamatori, anti kanker, dan aktivitas anti virus. Aktivitas yang dimiliki oleh flavonoid ini berhubungan dengan struktur dari flavonoid (Kumar & Abhay, 2013).

Pemberian ekstrak kulit rambutan secara oral akan masuk dalam system pencernaan dan mengalami biotransformasi di setiap fase dalam zona pencernaan. Kecuali di rongga mulut, belum ada bukti yang menunjukkan bahwa pada zona rongga mulut terjadi biotransformasi flavonoid (Viskupičová *et al.*, 2008). Selanjutnya Flavonoid akan mengalami absorpsi di saluran pencernaan dan dimetabolisme di hati sampai akhirnya di ekskresikan dalam urin atau feses. Flavonoid dalam plasma darah hanya ditemukan dalam jumlah kecil (Thilakarathna & Rupasinghe, 2013).

Absorpsi zat merupakan gerakan zat dari area pemberian ke sirkulasi sistemik (Boyd, 2013). Neal (2006). Proses absorpsi dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya formulasi zat, stabilitas terhadap asam dan enzim, motilitas usus, makanan dalam lambung, derajat metabolisme lintas pertama, serta kelarutan dalam lemak. Zat diabsorpsi terutama di usus halus karena permukaannya luas. Zat yang diabsorpsi dari saluran gastrointestinal memasuki sirkulasi portal, dan dimetabolisme secara luas saat zat melewati hati (metabolisme lintas pertama).

Ada dua tipe flavonoid yang juga berpengaruh pada proses penyerapan, yakni aglikon dan glikosida. Flavonoid dengan tipe aglikon dapat diserap baik pada saluran cerna, sehingga flavonoid tipe glikosida harus diubah terlebih dahulu menjadi aglikon (Hollman, 2004). Flavonoid yang diberikan secara oral akan masuk ke saluran sistemik untuk proses penyerapan. *Glycoside* flavonoid dihidrolisis oleh enzim LPH menjadi aglikon dan akan diangkut menuju hati melalui *hepatic portal vein* dan mengalami proses metabolisme tahap I dan II lanjut yang menghasilkan metabolit berupa turunan glukoronida dan sulfat yang akan memudahkan ekskresi melalui urin dan empedu yang sebelumnya melalui darah. Selain itu akan diangkut ke darah dan ke sel target dan jaringan lain. Keberadaan dalam plasma sangat sedikit bahkan tidak ada. Aglikon dalam usus halus yang masih memiliki struktur kompleks akan mengalami fase metabolisme I dan II yang kemudian menjadi sasaran perubahan struktur oleh mikroflora di kolon. Metabolit dalam hati selain diekskresikan dan diangkut ke darah, sel dan jaringan yang ditargetkan juga akan mengalami sirkulasi enterohepatik balik melalui ekskresi empedu akan dihidrolisis di kolon oleh mikroba pendegradasi dan diubah menjadi senyawa aglikon dan asam fenolik yang akan diangkut kembali ke hati dan di ekskresi melalui feses (Landete, 2012). Aglikon yang terbentuk memiliki berat molekul yang rendah sehingga mudah diserap (Thailakaatha & Rupasinghe, 2013).

Flavonoid yang terkonjugasi dengan glikosida (flavonoid glikosida) dihidrolisis dalam lumen usus halus oleh enzim *Lactase Phloridzin Hydrolase* (LPH, EC 3.2.1.23 dan 62), suatu β -glucosidase yang memiliki kemampuan menghidrolisis flavonoid glukosida dan

menghasilkan aglikon yang kemudian menembus sel epitel dengan mekanisme difusi pasif sebagai hasil dari peningkatan lipofilisitas. Hidrolisis alternatif, flavonoid glikosida dihidrolisis oleh *cytosolic β glucosidase* (CBG) yang terdapat di sel mukosa usus halus. Selanjutnya, *sodium-dependent glucose transporter* (SGLT₁) membawa aglikon ke sel epitel usus halus (Wiczkoski & Piskula, 2004; Kumar & Pandey, 2013; Noor, 2012)

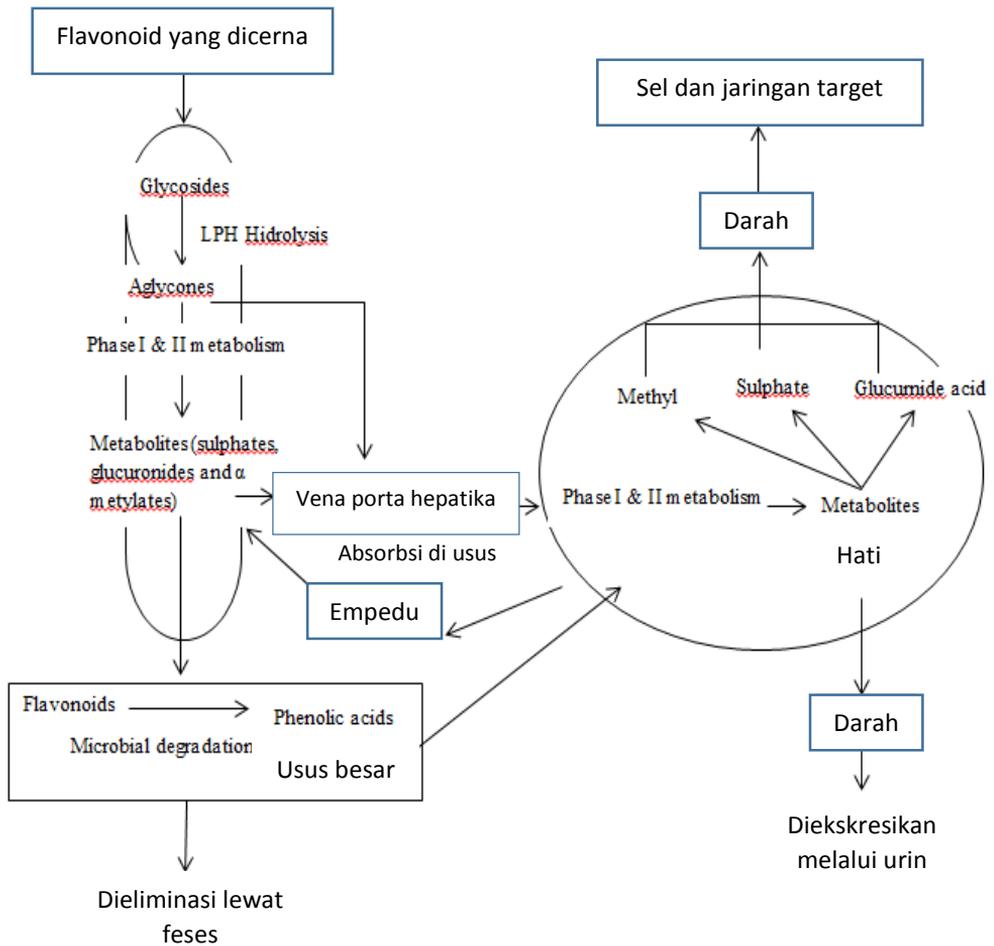
Sebelum mencapai perjalanan lebih lanjut dalam sel epitel usus halus aglikon mengalami metabolisme membentuk sulfat, glukoronat, dan atau metilasi metabolit dengan masing-masing aksi dari enzim *sulfotransferases* (SULT), *uridine-5'-diphosphataseglucoronosyl-transferase* (UGT), dan *catechol-O-methyltransferases* (COMT). Di sel epitel usus halus, quercetin salah satu jenis flavonoid berkonjugasi dengan asam glukoronik diperantarai oleh *uridine-5'-diphosphataseglucoronosyl-transferases* (UGT, EC. 2.4.1.17) menghasilkan *quercetin-3-glucoronide* dan *quercetin-7-glucoronide*. Lebih lanjut, *catechol-O-methyltransferases* (COMT, EC 2.4.1.17) memetilasi kelompok hidroksil dari cincin C quersetin bagian *catechol* (Wiczkoski & Piskula, 2004; Noor, 2012).

Setelah dari usus halus, flavonoid akan masuk ke dalam lambung yang di dalamnya terkandung getah lambung. Getah lambung memiliki konsentrasi ion H⁺ tinggi dan PH asam 1.0. Flavonoid resisten terhadap aktivitas getah lambung dan enzim. Flavonoid diabsorpsi di usus halus dan usus besar bergantung pada struktur flavonoid, dalam bentuk glikosida atau aglikon. Aglikon flavonoid memiliki ciri hidrofobik dan dapat menembus enterosit melalui membran (transport pasif). Adanya

substitusi glikosida pada molekul flavonoid meningkatkan hidrofilisitas flavonoid, sehingga membatasi kemungkinan absorpsinya (difusi sederhana) (Wiczkoski & Piskula, 2004).

Flavonoid yang tidak dapat diabsorpsi di usus halus, ditransport ke usus besar. Di dalam usus besar, mikroflora kolon menghidrolisis glikosida flavonoid sekaligus aglikon. Selain itu, mikroflora kolon juga mendegradasi struktur flavonoid menjadi asam fenolik, sehingga kadar flavonoid dalam feces sangat sedikit (Wiczkoski & Piskula, 2004; Kumar & Pandey, 2013).

Flavonoid yang dapat diabsorpsi di usus halus selanjutnya berikatan dengan albumin darah dan ditransport ke hati melalui vena portae. Di dalam hati flavonoid berkonjugasi melalui glukoronidasi, sulfasi, dan metilasi menjadi senyawa fenolik yang lebih kecil. Di dalam hati, flavonoid beserta metabolitnya mengalami modifikasi lebih lanjut, utamanya pembentukan *quercetin-3-, 7-, 4'-,3'-glucuronide* dan *3'- dan 4'-O- methylated derivatives*. Di dalam sitosol sel hati terdapat enzim dari kelompok sulfotransferase (PST, EC 2.8.2.1) yang mengkatalisis konjugasi quersetin dan berkonjugasi dengan asam sulfur. Metabolit yang dihasilkan di hati dieksresi ke empedu dan bersama empedu kembali ke usus halus untuk direabsorpsi, sehingga terjadi sirkulasi enterohepatik flavonoid (Wiczkoski & Piskula, 2004). Selain itu, flavonoid hasil metabolisme hati, ditransport ke sel/jaringan target dan ke ginjal melalui darah. Skema mengenai metabolisme flavonoid pada manusia ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Skema metabolisme flavonoid dalam tubuh.

Flavonoid yang terdapat dalam peredaran darah masuk ke dalam ginjal. Di dalam ginjal flavonoid akan masuk ke dalam glomerulus melalui arteriol aferen. Di dalam glomerulus terjadi proses filtrasi. Filtrasi glomerulus umumnya adalah proses yang indiskriminatif. Selanjutnya flavonoid yang terkandung dalam plasma yang terfiltrasi

dialirkan ke tubulus proksimalis untuk direabsorpsi melalui brush border dengan mengambil bahan-bahan yang diperlukan tubuh seperti gula, asam-asam amino, vitamin, beberapa jenis flavonoid, dan sebagainya. Sisa bahan-bahan buangan yang tidak diperlukan disalurkan ke saluran penampung (*collecting tubulus*) dan diekskresikan sebagai urin. Flavonoid yang terkandung dalam urin merupakan metabolit hasil proses farmakokinetika dalam tubuh yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi.

5.5. Flavonoid kulit rambutan sebagai antioksidan

Kulit buah rambutan mengandung beberapa macam metabolit sekunder, yaitu senyawa fenolik, alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu dari kelompok senyawa polifenol yang dapat ditemukan di kulit buah rambutan yang berperan sebagai antioksidan (Lisdiana, *et al.*, 2016). Flavonoid inilah yang dapat mencegah terjadinya stress oksidatif. Flavonoid yang terdapat pada ekstrak kulit buah rambutan diduga dapat menghambat proses terjadinya peroksidasi lipid pada tahap inisiasi, sehingga radikal bebas tidak dapat berkembang menjadi radikal bebas yang baru (Murray, 2009).

Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam memberikan atom hydrogen atau kemampuan mengkelat logam (Redha, 2010). Flavonoid yang berasal dari ekstrak kulit rambutan ketika masuk secara oral akan mengalami proses absorpsi. Proses absorpsi dipengaruhi oleh faktor fisiologis tubuh seperti waktu tinggal dalam saluran cerna (*transit time*), kecepatan pengosongan lambung,

tempat absorpsi (lambung, usus), keefektifan luas permukaan pada tiap tempat absorpsi, pH, aliran darah, dan ada tidaknya makanan dalam saluran cerna (Wagner 1975 dalam Mirakel, 2007).

Flavonoid yang masuk secara oral akan masuk ke dalam saluran pencernaan dan diabsorpsi masuk ke dalam system peredaran darah, melalui peredaran darah dan dimetabolisme di hati sampai akhirnya di ekskresikan dalam urin atau feses. Flavonoid dalam plasma darah hanya ditemukan sedikit (Thilakarathna & Rupasinghe, 2013). Flavonoid tipe quarcetin diserap cukup baik di usus dan mencapai kadar puncak dalam plasma dalam 6 jam setelah konsumsi per oral dengan konsentrasi $10,26 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$, waktu maksimal dalam plasma 6 jam dan waktu paruh sekitar $6,02 \pm 0,36$ dan kalkulasi AUC $18 \pm 0,84$. Flavonoid yang digunakan adalah quarcetin murni dengan dosis 50 mg/kg tikus jantan putih (Kanimozhi, 2016).

Sebagai antioksidan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kulit rambutan terbukti mampu menurunkan jumlah leukosit total dan dapat melindungi kerusakan sel alveolus paru yang dipapar asap rokok, dengan dosis efektif 45 mg/kgBB (Lisdiana *et al.*, 2017). Hal ini karena flavonoid yang terdapat pada ekstrak kulit buah rambutan dapat menghambat proses terjadinya peroksidasi lipid pada tahap inisiasi, sehingga radikal bebas tidak dapat berkembang menjadi radikal bebas yang baru (Murray, 2009).

Flavonoid dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Turunan radikal antioksidan tersebut memiliki keadaan lebih

stabil dibanding radikal lipida. Radikal-radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Gordon, 1990).

Hasil penelitian Lisdiana *et al.* (2017) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit rambutan berpengaruh terhadap jumlah eritrosit, kadar hemoglobin dan nilai hematokrit darah pada tikus putih yang dipapar asap rokok. Hal ini dapat dijelaskan bahwa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan, yang di dalam sel darah dapat bertindak sebagai penampung radikal hidroksil sehingga melindungi lipid membran. Efek proteksi dari ekstrak kulit buah rambutan dikarenakan flavonoid bersifat lipofilik sehingga mampu berikatan dengan membran sel eritrosit dan berfungsi sebagai pelindung terhadap radikal bebas.

Terjadinya penurunan jumlah eritrosit dan haemoglobin pada tikus yang terpapar asap rokok dikarenakan salah satu kandungan dari asap rokok yang dominan adalah karbonmonoksida (Inayatillah, 2014). Karbonmonoksida dapat menyebabkan berkurangnya pengiriman dan pemanfaatan oksigen pada jaringan tubuh (Batubara, 2013). Karbon monoksida dalam asap rokok mampu menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Terjadinya stress oksidatif yang berkepanjangan di dalam tubuh, akan membentuk radikal bebas berikutnya. Apabila radikal bebas yang bersifat reaktif tidak dihentikan maka akan merusak membran sel eritrosit dan terjadi peroksidasi lipid. Adanya peroksidasi lipid membran sel memudahkan sel eritrosit mengalami hemolisis yang menyebabkan hemoglobin terbebas, sehingga jumlah eritrosit, kadar

hemoglobin darah semakin berkurang. Hal ini sesuai dengan pendapat Muhammad (2009) yang mengatakan bahwa peroksida lipid pada membran eritrosit dapat mengakibatkan hilangnya fluiditas membran dan meningkatkan fragilitas atau kerapuhan membran eritrosit yang selanjutnya mengakibatkan eritrosit akan mudah pecah atau hemolisis sehingga menyebabkan anemia.

Hematokrit (PCV) adalah perbandingan antara eritrosit dan plasma darah yang dinyatakan dalam persen volume. Nilai hematokrit berkaitan erat dengan jumlah eritrosit/sel darah merah dalam tubuh. Nilai hematokrit merupakan persentase dari sel-sel darah terhadap seluruh volume darah, termasuk eritrosit (Soeharsono *et al.*, 2010). Penurunan nilai hematokrit dapat dijumpai pada kondisi anemia atau akibat kekurangan sel darah (Wientarsih *et al.*, 2013). Kadar hematokrit akan menurun ketika terjadi penurunan hemokonsentrasi, karena penurunan kadar seluler darah atau peningkatan kadar plasma darah. Penurunan nilai hematokrit di bawah normal dapat disebabkan oleh kerusakan eritrosit, penurunan produksi eritrosit atau dipengaruhi oleh jumlah, ukuran (Wardhana *et al.*, 2011). Apabila nilai persentase hematokrit semakin besar diatas kisaran normal maka akan menyebabkan makin banyak pergeseran diantara lapisan-lapisan darah dan pergeseran inilah yang menentukan viskositas. Viskositas dalam darah akan meningkat ketika hemotokrit meningkat yang mengakibatkan aliran darah melalui pembuluh sangat lambat (Guyton, 1996) sehingga menyebabkan suplai oksigen dan nutrisi ke organ terhambat. Kondisi ini menyebabkan berkurangnya fungsi organ. Flavonoid dalam kulit rambutan berpotensi mengendalikan dan

mengurangi peroksidase lipid melalui mekanisme antioksidan pemutus rantai dengan menangkap radikal ROO⁻. Flavonoid dapat memberikan donor H⁺ dan berikatan dengan radikal ROO⁻ sehingga radikal ini dapat bersifat stabil. Kestabilan ini menyebabkan terhentinya reaksi berantai peroksidase lipid.

5.6. Simpulan

Tanaman rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat herbal. Tidak hanya buahnya yang mengandung berbagai macam antioksidan, tetapi juga kulit buahnya diketahui mengandung berbagai macam antioksidan seperti alkaloid, fenolik, steroid, terpenoid, tanin, saponin dan asam askorbat dengan kandungan tertinggi adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik bersifat antioksidan kuat, berperan melindungi sel tubuh dari bahaya radikal bebas dengan cara mengikat radikal bebas.

Pemberian ekstrak kulit rambutan secara oral berimplikasi pada masuknya senyawa flavonoid ke dalam tubuh melalui system pencernaan dan mengalami biotransformasi di setiap fase dalam zona pencernaan. Selanjutnya Flavonoid akan mengalami absorpsi di saluran pencernaan dan dimetabolisme di hati sampai akhirnya di ekskresikan dalam urin atau feses.

Sebagai antioksidan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kulit rambutan terbukti mampu menurunkan jumlah leukosit total dan dapat melindungi kerusakan sel alveolus paru akibat paparan asap rokok dan mampu meningkatkan jumlah eritrosit, kadar hemoglobin

dan nilai hematokrit pada tikus yang dipapar asap rokok dengan dosis efektif sebesar 45 mg/kgBB.

Daftar Pustaka

- Fila WO, Johnson JT, Edem PN, Odey MO, Ekam VS, Ujong UP & Eteng OE. 2012. Comparative anti-nutrients assessment of Pulp, seed and rind of rambutan (*Nephelium Lappaceum*). *Annals of Biological Research* 3(11): 5151-5156.
- Fridovich I. 1991. *Oxygen & living processes: Superoxides radical and superoxide dismutase*. New York: Springer New York.
- Gordon MH. 1990. *Food Antioxidants: The mechanism of antioxidants action in vitro*. Editors BJB Hudson. Netherlands: Springer Netherlands. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity.
- Hernández C, Ascacio-Valdés J, Garza HDL, Wong-Paz J, Aguilar CN, Martínez-Ávila GC, Castro-López C & Aguilera-Carbó A. 2017. Polyphenolic content, *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican rambutan) husk. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10: 1201-1205.
- Hollman & Peter CH. 2004. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42: 74-83.
- Hutapea ERF, Laura OS & Rondang T. 2014. Ekstraksi pigmen antosianin dari kulit rambutan (*nephelium lappaceum*) dengan pelarut metanol. *Jurnal Teknik Kimia USU* 3(2).
- Inayatillah IR. 2014. Kadar karbon monoksida udara ekspirasi pada perokok dan bukan perokok serta faktor-faktor yang mempengaruhi. *Jurnal Respirasi Indonesia* 34(4).
- Khonkarn R, Okonogi S, Ampasavate C & Anuchapreeda S. 2010. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Journal Food and Chemical Toxicology* 48(8-9): 2122-2129
- Kumar S & Abhay KP. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoid: an review. *The Scientific World Journal*: 1-16.

- Lee J & Alyson EM. 2012. Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3874-3881.
- Lisdiana, Nugrahaning WH & Priyantini W. 2017. The effect of rambutan peel extract (*Nephelium lappaceum* L.) to total leukocytes and histopathological of rat lungs exposed by cigarette smoke. *Jurnal Sain dan Teknologi* 15: 181-192.
- Lisdiana & Dewi FK. 2017. Effects of rambutan peel extract to the number of erythrocytes and haemoglobin in rats exposed to cigarette smoke. *Journal of Physics* 824: 1-6
- Muhammad I. 2009. Efek antioksidan vitamin C terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) jantan akibat pemaparan asap rokok. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Murray RK, Granner DK & Rodwell VW. 2009. *Biokimia Harper*, Edisi 27. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Nawawi ANN, Hattori M, Kurokawa M & Shiraki K. 1999. Inhibitory effects of Indonesian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus type 1. *Journal Phytotherapy Research* 13(1): 37-41.
- Nugraha A. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Terhadap Kadar Kolesterol Total Serum pada Tikus Wistar. *Artikel Ilmiah*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Nurdin BN, Yeni S & Emriadi. 2013. Inhibisi Korosi Baja Oleh Ekstrak Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dalam Medium Asam Sulfat. *Jurnal Kimia Unand* 2(2): 133-143.
- Palanisamy U, Cheng HM, Masilamani T, Subramaniam T, Ling LT & Radhakrishnan AK. 2008. Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum* a potential source of natural antioxidants. *Journal Food Chemistry* 109(1): 54-63.
- Palanisamy U, Manaharan T, Teng LL, Radhakrishnan AKC, Subramaniam T & Masilamani T. 2011. Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Journal Food Research International* 44(7): 2278-2282.
- Pietta GP. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products* 63: 1035-1042.
- Santos-Buelga C & Arturo SF. 2017. Flavonoids: from structure to health issues. *Molecules* 22: 1-6.

- Simanjuntak K. 2012. Peran Antioksidan Flavonoid dalam Meningkatkan Kesehatan. *Jurnal Bina Widya* 23(3): 135-140.
- Sumardika IW & Jawi IM. 2012. Ekstrak air daun ubijalar ungu memperbaiki profil lipid dan meningkatkan kadar SOD darah tikus yang diberi makanan tinggi kolesterol. *Medicina* 43(2): 67-71.
- Thailakaratha HS & Rupasinghe HP. 2013. Flavonoid bioavaibility and attempts of bioavaibiity enhancement. *Nutrients* 5: 3367-3387.
- Thinkratok A. 2011. Effects of the crude extract from the fruit rind of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) on obesity in male wistar rats. *Thesis*. Thailand: Suranaree University of Technology.
- Thitilerdecha N, Teerawutgulrag A & Rakariyatham N. 2008. antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *Journal Food Science and Technology* 41: 2029-2035.
- Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Kilburn JD & Rakariyatham N. 2010. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L and their antioxidant activities. *Journal Molecules* 15: 1453-1465.
- Viskupičová J, Miroslav O & Ernest Š. 2008. Bioavailability and Metabolism of Flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 47: 151-162.
- Wall MM. 2006. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 655-663.
- Wardhani RAP & Supartono. 2015. Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) pada Bakteri. *Journal Chemical Sciences* 4(1): 46-51.
- Wientarsih I, Widhyari SD & Aryanti T. 2013. Kombinasi imbuhan herbal kunyit dan zink dalam pakan sebagai alternatif pengobatan kolibasiolosis pada ayam pedaging. *Jurnal Veteriner* 14(3): 327-334.
- Winarsi HMS. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Cetakan 5. Yogyakarta: Kanisius.
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G & Wouters EF. 2007. Systemic effect of smoking. *Chest* 131(5): 1557-1566.

Zulkifli KS, Abdullah N, Abdullah A, Aziman N & Kamarudin SSW. 2012. Bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of selected fruits peels. *International Conference on Environment, Chemistry and Biology* 49: 66-70.

POTENSI ANDROGRAFOLID DARI
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*)
SEBAGAI ANTIKANKER

BAB
6



Nugrahaningsih V/H

POTENSI ANDROGRAFOLID DARI SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) SEBAGAI ANTIKANKER

Penulis Nugrahaningsih WH

6.1. Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit dengan prevalensi yang cukup tinggi di dunia. Tahun 2016 sebanyak 1.685.210 kasus baru ditemukan di Amerika Serikat. Jenis kanker yang sering ditemukan adalah kanker mamma, kanker paru dan bronkus, kanker prostat, kanker colon dan rectum, kanker kandung kemih, melanoma kulit, non-Hodgkin lymphoma, kanker thyroid, kanker ginjal dan pelvis renalis, leukemia, kanker endometrial, dan kanker pancreas. Dari kasus tersebut diperkirakan 595.690 akan meninggal. Angka kematian kanker pada laki-laki lebih tinggi dibanding wanita, yaitu 207,9 per 100.000 pada laki-laki dan 145,4 per 100.000 pada wanita. Resiko kematian akibat kanker pada Afrika Amerika lebih tinggi dibandingkan pada Asia. Kanker tidak hanya terjadi pada lanjut usia, tetapi dapat juga terjadi pada anak. (www.cancer.gov, diakses 27 Februari 2018)

Sambitoto (*Andrographis paniculata*) adalah tanaman perdu yang banyak tumbuh di Indonesia. Memiliki rasa yang sangat pahit sehingga dijuluki *King of bitter*. Sambiloto merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan secara luas di negara-negara Asia. Secara tradisional sambiloto telah banyak digunakan sebagai obat termasuk untuk infeksi HIV dan antikanker. Beberapa penelitian menunjukkan sambiloto dapat berfungsi sebagai antipiretik, analgesik, imunostimulan, antihepatotoksik, anti mikrobia, anti-HIV, dan anti

kanker. Andrografolid dan 14-deoxy-11, 12-dehydroandrografolid adalah zat aktif dalam sambiloto yang berefek sebagai antiviral, antipiretik, imunostimulan dan antikanker (Suebasana, 2009; Chao, 2010). Neoandrografolid bersifat anti-inflamasi, anti-infeksi dan anti-hepatotoksik. 14-deoksiandrografolid dapat meningkatkan sistem imun dan bersifat anti-aterosklerotik. Kandungan andrograponin dalam sambiloto dapat berefek antiinflamasi dan anti infeksi. Isoandrographolide 3,19-isopropylideneandrographolide DAN 14-acetylan-drographolide merupakan kandungan lain dari sambiloto yang merupakan *tumor suppressor*. Sambiloto juga mengandung empat flavonoid yaitu 7-O-methylwogonin, apigenin, onysilin dan 3,4-dicaffeoylquinic acid yang berfungsi sebagai anti aterosklerotik.

Sambiloto dapat diekstrak dengan berbagai ekstraktor. Ekstrak methanol menarik zat aktif paling banyak. Ekstrak methanol mengandung alkaloid, asam amino, flavonoid, glikosida, saponin, tanin, steroid dan teroenoid. Ekstrak air mengandung alkaloid, asam amino, flavonoid, glikosida, saponin dan tanin. Steroid dan terpenoid tidak didapatkan pada ekstrak air. Ekstrak dengan dichloromethane hanya dapat menarik alkaloid, flavonoid, steroid dan terpenoid (Pandey, 2011).

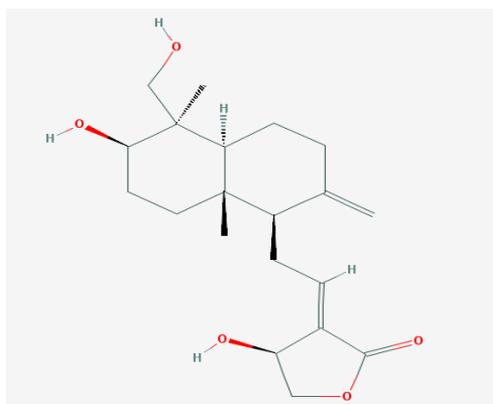
Komponen aktif sambiloto dapat diekstrak dari daun, batang atau keseluruhan bagian tanaman. Lebih dari 20 diterpenoid dan 10 flavonoid telah diekstrak dari tanaman sambiloto. Andrografolid ($C_{20}H_{30}O_5$) merupakan diterpenoid terbanyak yang ditemukan yaitu 4% dari tanaman kering, 0,8-1,2% dari batang, dan 0,5-6% dari daun. Selain andrografolid, diterpenoid lain adalah deoksiandrografolid,

neoandrografolid, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographide, dan isoandrografolid (Chao, 2010). Isolasi dengan fraksi terlarut etil asetat dari ekstrak etanol atau metanol didapatkan beberapa flavonoid yaitu 5-hydroxy - 7, 8 - dimethoxyflavone, 5 - hydroxy - 7, 8, 2', 5' - tetramethoxyflavone, 5 - hydroxy - 7,8,2',3'- tetramethoxyflavone, 5-hydroxy - 7,8,2' - trimethoxyflavone, 7-O-methylogonin dan 2' - methyl ether (Chao, 2010).

6.2. Struktur dan Keamanan Andrografolid

6.2.1. Struktur Andrografolid

Andrografolid merupakan metabolit sekunder utama dari tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata*). Andrografolid adalah labdane diterpenoid dengan rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$ mempunyai berat molekul 350.455 g/mol. Nama sesuai nomenklatur IUPAC adalah 3-[2 - [Decahydro - 6 - hydroxyl - 5 - (hydroxymethyl) - 5,8a -dimethyl - 2 - methylene - 1 - naphthaleny] ethylidene]dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone. Struktur andrografolid secara 2D tampak pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1. Struktur andrografolid

6.2.2. Keamanan Andrografolid

Daun sambiloto memiliki rasa yang sangat pahit sehingga sering disebut sebagai *king of bitter*. Masyarakat Indonesia biasa mengkonsumsinya sebagai seduhan dari daun kering. Pemakaian sambiloto pada masyarakat tergolong aman. Penelitian menggunakan tikus yang diberikan sambiloto selama 60 hari, tidak didapatkan adanya toksisitas pada organ testis, baik pada berat testis, struktur histologis, struktur sel Leydig maupun pada kadar testosteronnya. Toksisitas akut sambiloto diteliti pada berbagai sediaan menunjukkan dosis aman yang cukup tinggi. LD50 infusa sambiloto pada mencit dengan pemberian secara oral adalah 71,08 mg/10 gBB atau 177,6 mg/ekor (diasumsikan berat rata-rata mencit 25 g). Penelitian toksisitas ekstrak etanol melalui pemberian intraperitoneal pada mencit menunjukkan hasil LD50 sebesar 11.46 g/kgBB atau 286,5 mg/ekor (Akbar, 2011). Pemberian ekstrak aquades secara oral pada dosis 25 mg/ekor per hari selama 14 hari tidak menyebabkan perubahan struktur mikroanatomi pada ginjal dan hepar mencit (Nugrahaningsih, 2009).

6.3. Bioavailabilitas Andrografolid

Andrografolid yang terkandung dalam sambiloto sebagian besar terikat pada protein plasma dan sebagian masuk ke dalam sel. Kadar maksimum dalam plasma dicapai dalam waktu yang relatif cepat yaitu 1,5 – 2 jam pada pemberian oral, sedangkan waktu paruh berkisar antara 6,6 – 10 jam (Panossian, 2000). Andrografolid yang dikonsumsi secara oral diakumulasi dalam organ visera termasuk jaringan otak, ginjal, jantung dan paru. Andrografolid diabsorpsi dan diekskresi dari tubuh

secara cepat kurang lebih 80% dalam 8 jam dan 90% dalam 48 jam (Jarukamjorn & Nemoto, 2008).

6.4. Andrografolid sebagai antikanker

Sel kanker merupakan sel yang telah mengalami perubahan perantai sehingga terjadi proliferasi yang tidak terkontrol serta apoptosis yang menurun. Sel kanker memproduksi berbagai mediator kimia yang bertanggungjawab terhadap terjadinya invasi ke jaringan lain, timbulnya rasa sakit. Andrografolid yang terkandung dalam tumbuhan sambiloto memiliki potensi sebagai antikanker. Penelitian dengan menggunakan ekstrak sambiloto dan andrografolid yang dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* telah memberikan hasil yang menunjukkan perannya terhadap sel kanker (Tabel 6.1). Berbagai jenis sel kanker dapat dihambat pertumbuhannya melalui jalur proliferasi sel, apoptosis, angiogenesis dan imunitas terhadap kanker.

Tabel 6.1. Penelitian andrografolid dan ekstrak sambiloto terhadap sel kanker

No	Obyek penelitian	Metode penelitian	Sediaan sambiloto	Hasil penelitian	Referensi
1	sel adenokarsin oma mamma	In vitro	Ekstrak air	Meningkatkan apoptosis sel mulai 1 mg/ml	Nugrahaningsih dkk <i>Media Medika Indonesiana</i> vol.38 (3) , th 2003
2	Sel HeLa	In vitro	Ekstrak metanol	Induksi apoptosis sel HeLa	Sukardiman dkk <i>Media Kedokteran Hewan</i> vol.21 no.3 th 2005
3	Sel TD-47	In vitro	Ekstrak metanol	Peningkatan ekspresi p53,bax,	Sukardiman dkk. <i>African Journal</i>

No	Obyek penelitian	Metode penelitian	Sediaan sambilan	Hasil penelitian	Referensi
				caspase 3 dan penurunan ekspresi bcl-2	<i>Traditional</i> , Vol 4 No.3 th 2007
4	Sel line HUVECs, SGC 7901, GES-1, MGC 803, BGC-823	In vitro	Andrografolid	Menekan NF- κ B, menekan adhesi GES-1	Jiang CG, dkk <i>Anticancer Research</i> Vol 27 th 2007
5	Sel line B16-F-10 Mencit C57BL diinjeksi B16-F-10 intradermal	In vitro in vivo intraperitoneal	APE ANDLE	Menghambat angiogenesis tumor spesifik dengan down-regulasi proangiogenesis dan up-regulasi antiangiogenesis	Sheeja K, dkk <i>International Immunopharmacology</i> vol.7 th 2007
6	Sel HepG2 dan Hep3B, HeLa, HCT116	In vitro	DAPI (andro, 4-6-diamino-2-phenylindole)	Aktivasi p53 melalui ROS-dependent JNK menyebabkan up-regulasi DR4 dan sensitisasi TRAIL untuk induksi apoptosis	Zhou J, dkk <i>Molecular Cancer Therapy</i> vol.7 no.7 th 2008
7	Thymoma EL4	In vitro dan in vivo	Andrografolid dan ekstrak	Meningkatkan produksi CTL, IL-2 dan IFN γ	Sheeja dan Kuttan, <i>Journal Immunopharmacology and Immunotoxicity</i> 29(1): 81-93, 2008
8	Sel line PC-3, MDA-MB-435s, MDA-MB-231, SMMC 7721, K562, A549, SGC 7901	In vitro	Kristal andrografolid	Menghambat pertumbuhan PC-3: aktivasi caspase-3, up-regulasi bax, down-regulasi bcl-2 dan menghambat VEGF	Manikam ST dan Stanslas J. <i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i> vol.91.th 2009
9	Adenokarsinoma mammae pada mencit C3H	In vivo	Ekstrak air sambilan	Menghambat pertumbuhan transplant kanker, tidak ada kerusakan struktur ginjal	Nugrahaningsih, dkk. <i>Biosaintifika</i> 1(2), 2009
10	Sel PC-3, DU-145, LNCap	In vitro	Andrografolide	Meningkatkan Bax, Bid, caspase 8, menginduksi cell cycle arrest pada fase	Wong HC et al. <i>African Journal of Pharmacy and Pharmacology</i> 5(2), 2011

No	Obyek penelitian	Metode penelitian	Sediaan sambiloto	Hasil penelitian	Referensi
				G2/M (pada sel line PC-3)	
11	Adenokarsi noma mammae pada mencit C3H	In vivo	Ekstrak air sambiloto	Menginduksi Apoptosis adenokarsinoma mamma	Nugrahaningsih dkk, <i>Universa Medicina</i> 32(2): 99-107, 2013
12	Adenokarsi noma mammae pada mencit C3H	In vivo	Ekstrak air sambiloto	Menurunkan ekspresi VEGF adenokarsinoma mamma	Nugrahaningsih dkk, <i>Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia</i> 13(1):29-34, 2015

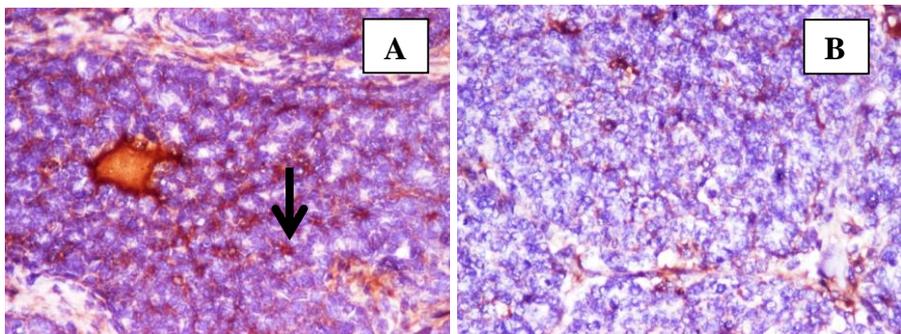
6.4.1. Penghambatan Proliferasi Sel Kanker

Sel-sel yang sedang dalam fase proliferasi mengekspresikan beberapa protein spesifik yang dapat dideteksi dengan antibodi monoklonal tertentu. Ki-67 merupakan suatu antigen inti sel yang sedang dalam fase G1, S, G2 dan M dari siklus sel, sehingga dapat digunakan sebagai penanda proliferasi sel.

Andrografolid yang diekstrak dari tumbuhan sambiloto menunjukkan pengaruhnya terhadap penghambatan proliferasi sel (Manikam, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2011). Penelitian *in vitro* yang dilakukan dengan memberikan andrografolid konsentrasi 1 μM , 3 μM , 10 μM dan 30 μM pada sel line PC-3 kanker prostat menunjukkan adanya induksi *cell cycle arrest* pada fase G2/M. Sel yang diberi andrografolid menunjukkan down-regulasi dari ekspresi CDK1, tetapi tidak ada penurunan ekspresi CDK4 dan cyclin D1. (Wong *et al.*, 2011)

Pemberian ekstrak sambiloto dapat menurunkan indeks proliferasi sel adenokarsinoma mamma. Ekspresi Ki-67 sebagai

indikator sel yang aktif membelah menurun secara signifikan pada jaringan kanker mammae mencit yang mendapatkan ekstrak sambiloto secara oral selama 14 hari. Indeks proliferasi menjadi lebih rendah pada pemberian ekstrak dengan dosis yang lebih tinggi. Fraksi pertumbuhan Ki-67 berhubungan dengan grade pada sebagian besar tumor. Tumor yang tidak memiliki reseptor estrogen dan progesteron memiliki kecenderungan fraksi Ki-67 positif yang tinggi.



Gambar 6.2. Ekspresi Ki67 nampak sebagai sel dengan sitoplasma berwarna coklat (tanda panah) pada jaringan kanker adenokarsinoma mamma. Tampak perbedaan antara yang tidak diberi ekstrak sambiloto (A) dan yang diberi ekstrak sambiloto (B)

6.4.2. Penghambatan Angiogenesis

Pertumbuhan jaringan neoplastik yang cepat serta invasinya memerlukan nutrisi yang lebih banyak dibandingkan jaringan normal. Nutrisi tersebut diperoleh melalui pembentukan jaringan vaskuler baru dari pembuluh darah yang telah ada yang disebut angiogenesis. Angiogenesis terjadi karena kondisi kekurangan oksigen atau hipoksia akibat melonjaknya kebutuhan oksigen oleh jaringan neoplastik. Hipoksia memicu pelepasan faktor pro-angiogenesis yang akan

merangsang pembentukan pembuluh darah baru. Angiogenesis dipengaruhi oleh faktor-faktor proangiogenesis dan antiangiogenesis. Beberapa proangiogenesis yang sudah dikenal antara lain *fibroblast growth factor*, *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *platelet-derived endothelial cell growth factor*, *angiopoetin-1*, *angiopoetin-2*, *transforming growth factor beta-1* (TGF- β 1), *transforming growth factor alpha* (TGF- α) dan *epidermal growth factor* (EGF).

Faktor proangiogenik yang paling banyak diketahui dan berperan dalam pertumbuhan kanker adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF disekresi sebagai glikoprotein dimer, dimana semuanya mengandung residu delapan sistein yang khas yang disebut motif “cysteine knot”. VEGF merupakan protein angiogenik yang bekerja langsung dan paling potensial. Merupakan suatu mitogen spesifik sel endotel yang mampu berdifusi dan juga mampu meningkatkan permeabilitas vaskuler. Penghambatan VEGF dan reseptornya menunjukkan pengaruhnya pada angiogenesis beberapa tumor padat termasuk kanker mamma, kanker kolon, kanker kandung kemih, kanker lambung, dan kanker prostat. Beberapa strategi dikembangkan dengan target jalur VEGF sebagai bagian dari terapi antikanker.

VEGF diproduksi terutama oleh sel-sel tumor dan jaringan penyokong yang berhubungan dengan tumor juga dapat memproduksi. Sinyal kemotaktik yang berasal dari sel tumor dapat mempengaruhi sel-sel penyokong untuk menghasilkan VEGF dan faktor angiogenik lain. Sinyal dari sel kanker yang dilepaskan ke dalam ruang jaringan

penyokong akan mendukung pertumbuhan kanker dan sifat invasifnya. Kontribusi sel-sel penyokong dalam memproduksi VEGF dan faktor angiogenik lain memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan tumor secara *in vivo*. Sinyal yang berasal dari jaringan penyokong mempunyai peran yang sangat penting dalam terapi dengan target pada penghambatan angiogenesis. Sel myeloid merupakan salah satu bagian dari jaringan penyokong yang mempunyai peran penting dalam mekanisme pembiasan terapi anti angiogenesis.

Penelitian Zhao dkk, dilakukan secara *in vitro* untuk melihat pengaruh andrografolid yang diisolasi dari tanaman *Andrographis paniculata* terhadap kadar VEGF serum pada kultur sel line kanker prostat (PC-3). Andrografolid diberikan dengan konsentrasi 0; 1,25; 2,5, 5, 10 dan 20 $\mu\text{mol/L}$. Pemeriksaan kadar VEGF pada supernatan dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam. Andrografolid yang diberikan pada kultur sel PC-3 dapat menurunkan pelepasan VEGF oleh sel kanker tersebut. Efek penghambatan mulai terlihat pada konsentrasi 1,25 $\mu\text{mol/l}$ dan semakin kuat dengan bertambahnya konsentrasi andrografolid.

Penelitian secara *in vivo* pada mencit C3H yang diberi ekstrak sambiloto per oral dilakukan untuk melihat pengaruhnya terhadap angiogenesis jaringan adenokarsinoma mamma. Pemberian ekstrak selama 14 hari menunjukkan berkurangnya angiogenesis. Dengan pengecatan imunohistokimia didapatkan ekspresi VEGF yang lebih rendah pada jaringan adenokarsinoma mamma yang mendapat ekstrak sambiloto dibandingkan dengan yang tidak mendapat ekstrak sambiloto (Nugrahaningsih *et al.*, 2015). Penurunan kadar VEGF dimungkinkan

karena terhambatnya pertumbuhan sel kanker sehingga kebutuhan oksigen dan nutrisi juga berkurang.

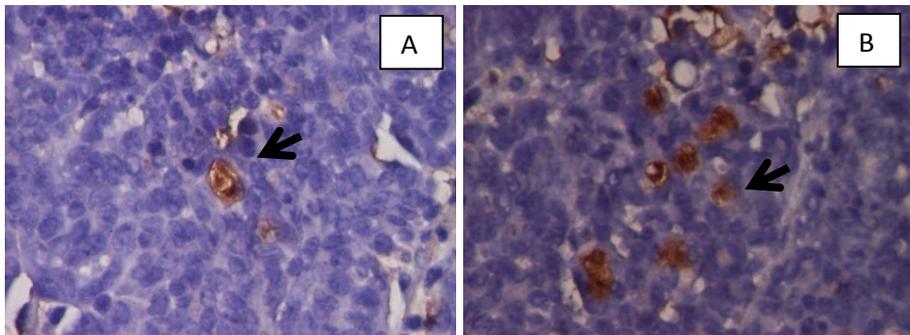
Penelitian lain dilakukan secara *in vivo* oleh Sheeja et.al. Penelitian dilakukan untuk mengeksplorasi efek anti angiogenesis dari ekstrak *Andrographis paniculata* dan andrografolid terhadap angiogenesis mencit C57BL/6. Dalam penelitian tersebut digunakan ekstrak etanol *Andrographis paniculata* dan andrografolid yang disuntikkan secara intraperitoneal pada mencit C57BL/6 yang telah diinduksi dengan sel line tumor melanoma B16F-10 secara intradermal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dan andrografolid secara intraperitoneal selama 4 hari dapat menurunkan kadar VEGF serum.

6.4.3. Peningkatan Apoptosis

Apoptosis atau kematian sel terprogram adalah proses yang mempunyai peran penting pada regulasi jaringan dan organ. Kegagalan fungsi apoptosis menyebabkan sel menjadi immortal. Apoptosis adalah proses kompleks yang melibatkan sejumlah komponen. Apoptosis dikendalikan oleh banyak protein. Protein – protein tersebut dapat bersifat pro apoptosis seperti *Bax*, maupun anti apoptosis seperti *Bcl-2* dan *Bcl-xl*. Selain itu masih ada serangkaian kelompok protein caspase dimana caspase yang satu akan mengaktifkan caspase yang lain membentuk cascade caspase. Reseptor permukaan seperti *Fas* dan reseptor *TNF* serta sitokrom-C juga berperan dalam proses apoptosis.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat pengaruh andrografolid terhadap apoptosis sel kanker antara lain human sel

kanker servik HeLa (Sukardiman, 2005; Zhou *et al.*, 2008), human sel kanker mamma T47-D (Sukardiman, 2007), human sel kanker gaster SGC-7901(Jiang *et al.*, 2007), sel leukemia promielositik akut: HL-60, NB4, NB4-R2 (Manikam, 2008), human sel kanker hati HepG2, Hep38 (Zhou *et al.*, 2008), human sel kanker kolorektal (Zhou *et al.*, 2008), human sel kanker prostat PC-3 (Zhao *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2011). Andrografolid terbukti dapat meningkatkan apoptosis pada sel-sel kanker tersebut. Andrografolid pada ekstrak sambiloto juga meningkatkan apoptosis sel adenokarsinoma mammae baik secara in vitro (Nugrahaningsih *et al.*, 2003) maupun in vivo (Nugrahaningsih *et al.*, 2013).



Gambar 6.3. Dengan metode TUNEL sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis tampak berwarna coklat (tanda panah). . Tampak perbedaan jumlah sel yang apoptosis antara yang tidak diberi ekstrak sambiloto (A) dan yang diberi ekstrak sambiloto (B)

Andrografolid berpengaruh terhadap apoptosis dengan mekanisme regulasi terhadap p53 (Zhou *et al.*, 2008; Sukardiman, 2007) sehingga menyebabkan sel menuju apoptosis. Andrografolid juga

menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase 8 pada jalur *extrinsic death receptor* dan sesudah itu akan mengaktifkan caspase 9 (Wong *et al.*, 2011) dan caspase 3 (Sukardiman, 2007; Zhao, 2008) sebagai eksekutor. Caspase 8 juga dapat mengaktifkan Bax dan menurunkan ekspresi bcl-2 (Sukardiman *et al.*, 2007; Zhao, 2008; Wong, 2011).

TRAIL (*TNF related apoptosis-inducing ligand*) merupakan salah satu jenis TNF penting yang berpotensi besar dalam terapi kanker. Diterpenoid dari sambiloto meningkatkan TRAIL-induced apoptosis berbagai sel line tumor. Ekstrak sambiloto mensensitisasi sel kanker terhadap TRAIL-induced apoptosis. Sambiloto meningkatkan TRAIL-induced apoptosis terutama melalui promosi aktivasi caspase 8. Sebagai hasil dari peningkatan aktivasi caspase tersebut, sambiloto mempromosi FLIP-L cleavage dan *down regulation* IAP (*inhibitor of apoptosis*) (Zhou, 2008) Sambiloto mensensitisasi TRAIL-induced apoptosis dengan *up-regulation* DR4 melalui *p53-dependent transcriptional regulation*. Sambiloto menstabilkan p53 melalui aktivasi ROS-dependent JNK (*cJun N-terminal kinase*). Sambiloto juga mengaktifkan fungsi p53 melalui aktivasi ROS-dependent JNK, menyebabkan *up-regulation* DR4 dan sensitisasi TRAIL-induced apoptosis (Zhou, 2008).

6.4.4. imunosurveilens terhadap kanker

Imunosurveilens adalah mekanisme penjagaan atau pengawasan terhadap sel-sel yang berubah perilaku atau proses tumorogenesis. Sistem immune *innate* dan *adaptive* memegang peran penting dalam inisiasi tumbuhnya sel kanker dan progresifitas keganasan sel kanker.

Imunosurveilans terhadap sel kanker diperankan terutama oleh sel B, sel T, natural killer (NK), natural killer T (NKT), interferon (IFN) dan perforin (Kim *et al.*, 2007). Sel *innate* seperti NK, sel NKT, sel $\gamma\delta$ T, eosinofil dan neutrofil merupakan proteksi terhadap tumor yang diperantarai oleh sistem imun, Ketiadaan imun adaptive dapat menyebabkan berkembangnya sel-sel kanker. Interferon γ (IFN γ), CD4 dan CD8 sel T memberikan respon yang kuat terhadap sel-sel kanker.

Andrografolid dan ekstrak sambiloto dapat meningkatkan produksi *cytotoxic T lymphocyte* (CTL) mencit BALB/c yang diinduksi dengan sel thymoma EL4. Peningkatan produksi CTL dipicu oleh meningkatnya produksi interleukin 2(IL-2) dan interferon γ (IFN- γ) (Sheeja dan Kuttan, 2008). Pemberian ekstrak juga memperpanjang umur sel EL4 dari 27,1 hari menjadi 51,1 hari (ekstrak) dan 44,5 hari (andrografolid).

6.5. Simpulan

Angka kesakitan dan kematian kanker yang tinggi merupakan masalah kesehatan yang memerlukan upaya pencegahan dan penanganan yang serius. Berbagai penelitian dikembangkan untuk mencari obat anti kanker. Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*) dikenal masyarakat Indonesia sebagai tanaman obat yang memiliki banyak manfaat. Andrografolid yang merupakan metabolit sekunder utama dari tumbuhan sambiloto mempunyai potensi sebagai antikanker. Hasil penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan potensi yang dimiliki oleh andrografolid dalam menghambat pertumbuhan sel kanker Potensi andrografolid sebagai antikanker dapat

melalui beberapa mekanisme yaitu: 1) Penghambatan proliferasi, 2) Penghambatan angiogenesis, 3) Induksi atau peningkatan apoptosis, 4) Aktivasi sistem imun terhadap sel kanker.

Daftar Pustaka

- Akbar S. 2011. *Andrographis paniculata*: a review of pharmacological activities and clinical effect. *Alternative Medicine Review* 16(1): 66-77.
- Burgos RA, Caballero EE, Sfinchez NS, Schroeder RA, Wilkman GK, & Hancke JL. 1997. Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rats. *Journal Ethnopharmacol* 58: 219-224.
- Chao WW & Lin BF. 2010. Isolation and identification of bioactive compound in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chinese Medicine* 5: 17.
- Jarukamjorn K & Nemoto N. 2008. Pharmacological aspect of *andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide. *Journal of Health Science* 54(4): 370-381.
- Jiang CG, Li JB, Liu FR, Wu T, Yu M & Xu HM. 2007. Andrographolide inhibits the adhesion of gastric cancer cells to endothelial cell by blocking E-selectin expression. *Anticancer Research* 27: 2439-2448.
- Kim R, Emi M & Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121: 1-14.
- Manikam ST & Stanslas J. 2009. Andrographolide inhibits growth of acute promyelocytic leukemia cells by inducing retinoic acid receptor-independent cell differentiation and apoptosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61: 69-78.
- Nugrahaningsih, Tjahjono & Dharmana E. 2003. Apoptosis sel adenokarsinoma mamma mencit C3H setelah pemberian ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) (penelitian in vitro). *Media Medika Indonesiana* 38(3): 121-124.
- Nugrahaningsih, Utami NR & Sugiarti E. 2009. Pengaruh ekstrak sambiloto terhadap pertumbuhan kanker mamma dan mikroanatomi ginjal mencit C3H. *Biosaintifika* 1(2).

- Nugrahaningsih, Sarjadi, Dharmana E & Subagio HW. 2013. *Andrographis paniculata* extract induced apoptosis of adenocarcinoma mammae in C3H mice. *Universa Medicina* 32(2): 99-107.
- Nugrahaningsih, Sarjadi, Dharmana E & Subagio HW. 2015. VEGF Expression of adenocarcinoma mammae after oral administration of *Andrographis paniculata* extract. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesi* 13(1): 29-34.
- Sheeja K, Guruvayoorappan C & Kuttan G. 2007. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *International Immunopharmacology* 7: 211-21.
- Sheeja K dan Kuttan G. 2008. Activation of cytotoxic t lymphocyte responses and attenuation of tumor growth in vivo by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Journal Immunopharmacology and Immunotoxicology* 29(1).
- Suebsana S, Pongnaratorn P, Sattayasai J, Arkaravichien T, Tiamkao S & Aromdee C. 2009. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, and toxic effect of andrographolide derivatives in experimental animal. *Archives of Pharmacal Research* 32(9): 1191-1200.
- Sukardiman, Rahman A, Ekasari W & Sismindari. 2005. Induksi apoptosis senyawa andrographolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) terhadap kultur sel kanker. *Media Kedokteran Hewan* 21(3): 105-110.
- Sukardiman, Harjotaruno, Widyawariyanti A, Sismindari & Zaini NC. 2007. Apoptosis inducing effect of andrographolide on TD-47 Human breast cancer cell line. *African Journal Traditional, CAM* 4 (3): 345-351.
- Wong HC, Sagineedu SR, Lajis NH, Loke SC & Stanslas J. 2011. Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in PC-3 prostate cancer cell. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(2): 225-233.
- Zhao F, He EQ, Wang L & Liu K. 2008. Anti-tumor activities of andrographolide, a diterpene from *Andrographis paniculata*, by inducing apoptosis and inhibiting VEGF level. *Journal of Asian Natural Products Research* 10(5): 473-479.
- Zhou J, Lu GD, Ong CS, Ong CN & Shen HM. 2008. Andrographolide sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53-mediated death receptor 4 up-regulation. *Molecular Cancer Therapy* 7(7): 2170-2180.

PRODUKSI ANTIOKSIDAN MELALUI
KULTUR KALUS
Stelechocarpus burahol

BAB
7



Noor Aini Habibah, Amelia Fransiska, Abdul Rosyid,
Enny Suwarsi Rahayu, Y. Ulung Anggraito

PRODUKSI ANTIOKSIDAN MELALUI KULTUR KALUS

Stelechocarpus burahol

Penulis Noor Aini Habibah, Amelia Fransiska, Abdul Rosyid, Enny Suwarsi Rahayu , Y. Ulung Anggraito,

7.1. Pendahuluan

Kultur jaringan tumbuhan merupakan teknik kultivasi *in vitro* dari jaringan tumbuhan secara aseptik. Teknik ini berkembang karena adanya teori totipotensi sel yang menyatakan bahwa setiap sel tumbuhan mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan berkembang membentuk tumbuhan baru yang utuh serta mampu membentuk senyawa metabolit primer dan sekunder seperti tanaman induknya bila dipelihara pada kondisi yang tepat. Pada setiap sel tumbuhan terkandung sifat genetik dan fisiologi yang penting untuk pembentukan senyawa kimia tertentu yang sama dengan yang dibentuk tanaman induknya (Bhojwani & Razdan, 1983).

Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. f. & Thomson) termasuk tanaman pangan jenis buah-buahan. Kepel mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, cyclooxygenase-2 inhibitor, anti-hyperuricemic, zat sitotoksik, anti kanker, deodoran oral, dan senyawa fitoestrogen yang terdapat pada daun, bunga, dan daging buah, biji buah, kulit buah, dan kulit batang buah kepel (Hatmi *et al.*, 2014). Senyawa aktif kepel berpotensi sebagai antioksidan (Tisnadjaja *et al.*, 2006), obat asam urat (Purwantiningsih *et al.*, 2010), kontrasepsi oral (Sunardi, 2010) dan deodoran alami (Darusman *et al.*, 2012). Kepel memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi, aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak buah kepel ini kemungkinan berasal dari

kandungan flavonoid dan vitamin C (Tisnadjaja *et al.*, 2006). Secara tradisional kepel telah digunakan sebagai bahan parfum, khususnya di kalangan keraton. Buah kepel dapat membuat keringat menjadi wangi, nafas menjadi harum, bahkan dapat mengharumkan air seni dan feces (Darsuman *et al.*, 2012). Hasil penelitian Purwantiningsih *et al.* (2010) menunjukkan bahwa daun kepel mempunyai kandungan senyawa flavonoid yang mempunyai kemampuan *antihyperuricemic* sehingga berpotensi dikembangkan sebagai obat asam urat. Hasil uji secara *in vivo* baik ekstrak etanol daun kepel maupun ekstrak heksan memiliki potensi sebagai penurun kadar asam urat darah.

7.2. Induksi Kultur Kalus

Kalus kepel dapat dihasilkan dari eksplan mesokarp, biji muda, daun (Habibah *et al.*, 2016) dan tangkai daun. Tiga sumber eksplan yaitu mesokarp, biji muda, daun dapat menghasilkan kalus remah yang baik digunakan untuk pembuatan kultur suspensi sel. Kalus dari ketiga eksplan yang ditanam pada medium dengan penambahan pikloram menghasilkan kalus yang lebih remah bila dibandingkan kalus yang ditanam pada medium dengan penambahan 2,4-D. Hal ini ditunjukkan dari anatomi kalus pada medium pikloram mempunyai ruang antar sel yang lebih banyak dan lebih lebar bila dibandingkan kalus pada medium 2,4-D. Masing-masing eksplan menghasilkan pertumbuhan yang bervariasi pada berbagai perlakuan ZPT dan pencahayaan. Laju pertumbuhan tertinggi didapatkan dari eksplan biji muda yang ditanam pada medium dengan penambahan pikloram 7,5 mg/L yang dipelihara dalam kondisi gelap (Habibah *et al.*, 2016). Kondisi gelap mengurangi

terjadinya *browning* yang akan mengganggu pertumbuhan kalus. *Browning* pada kalus akibat oksidasi fenolik mengurangi pertumbuhan kalus (Tang & Newton, 2004). Biosintesis asam fenolik dikatalisis oleh enzim *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL), dan aktivitas enzim ini meningkat jika enzim terinduksi oleh intensitas cahaya yang tinggi (Kumari *et al.*, 2009). Chaa^hbani *et al.* (2015) melaporkan bahwa penggunaan 2,4-D konsentrasi tinggi yang dikombinasikan dengan BAP meningkatkan produksi fenolik.

Induksi kalus dari eksplan tangkai daun pada berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh menunjukkan bahwa hampir semua perlakuan berhasil membentuk kalus 100%, kecuali untuk perlakuan 2,4-D 5 mg/L dan kinetin 10 mg/L hanya 94,44% eksplan yang membentuk kalus. Kemampuan eksplan membentuk kalus sangat dipengaruhi oleh umur eksplan. Semakin muda usia eksplan semakin tinggi kemampuannya dalam membentuk kalus, begitu juga sebaliknya semakin tua usia eksplan maka semakin berkurang kemampuannya dalam membentuk kalus (Prakash & Gurumurthi, 2010). Eksplan yang berasal dari jaringan muda memiliki kemampuan dediferensiasi yang lebih baik sehingga lebih mudah terbentuk kalus dibandingkan dengan eksplan dari jaringan tua. Pada penelitian ini eksplan yang digunakan berasal dari jaringan muda dan dari tanaman yang masih muda juga, sehingga persentase eksplan yang berkalus cukup tinggi. Penggunaan 2,4-D dalam induksi kalus juga telah digunakan dalam induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas*) dengan persentase paling tinggi terjadi pada kombinasi perlakuan 2,4-D 2,5 ppm + TDZ 10 ppm dan 2,4-D 7,5 ppm + 1,5 ppm. Pembentukan kalus dengan konsentrasi 2,4-D yang

berbeda-beda juga berhasil menginduksi kalus *Eucalyptus camaldulensis* (Prakash & Gurumurthi, 2010).

Proses induksi kalus tangkai daun kepel dimulai dengan pembengkakan pada bagian ujung tangkai daun dan pada daerah yang dilukai. Bagian eksplan yang kontak langsung dengan media memungkinkan penyerapan nutrisi yang lebih cepat sehingga pada bagian tersebut mengalami pembengkakan dan akhirnya tumbuh massa sel baru. Pembentukan kalus pada bagian yang dilukai juga ditunjukkan pada induksi kalus daun ramin, bagian eksplan yang sengaja dilukai menunjukkan adanya penebalan hingga akhirnya terbentuk kalus (Yelnitis & Komar, 2010). Pembentukan kalus *Arabidopsis* juga dimulai pada daerah yang dilukai (Iwase *et al.*, 2011b). Proses pembentukan kalus pada bagian luka dipengaruhi oleh gen *Wound Induced Dedifferentiation* (WIND). Gen WIND memiliki peran sebagai kunci molekuler dalam merespon luka untuk mengontrol dediferensiasi sel *Arabidopsis* sehingga pada daerah yang dilukai akan membentuk kalus (Iwase *et al.*, 2011a). Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa gen WIND bekerja dengan cepat beberapa jam setelah ekplan dilukai (Iwase *et al.*, 2011b).

Penambahan 2,4-D berpengaruh terhadap waktu terbentuknya kalus kepel, namun tidak ada pengaruh yang nyata pada kinetin, dan interaksi antara keduanya terhadap waktu pembentukan kalus kepel. Berdasarkan hasil uji DMRT, konsentrasi 2,4-D 5 mg/L dan 7,5 mg/L mempercepat pertumbuhan kalus secara signifikan dibandingkan pada 2,4-D 10 mg/L (Tabel 7.1)

Tabel 7.1. Hasil perhitungan DMRT pada perlakuan 2,4-D untuk waktu terbentuknya kalus

Perlakuan	Rerata waktu berkalus
2,4-D 5 mg/L	17.67 ^a
2,4-D 7,5 mg/L	17.44 ^a
2,4-D 10 mg/L	21.67 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak memiliki perbedaan nyata

Penambahan 2,4-D eksogen pada media kultur jaringan meningkatkan akumulasi IAA dalam sel (Pasternak *et al.*, 2002). Ketika konsentrasi auksin meningkat, protein *Aux/IAA* mengalami degradasi oleh 26S proteasome, sehingga penekanan gen pada awal aktivasi auksin berhenti, kondisi ini menyebabkan auksin berekspresi (Hagen *et al.*, 2004). Mekanisme auksin dalam mempengaruhi pembentukan kalus telah dipelajari pada tanaman *Arabidopsis*. Sinyal auksin diteruskan melalui faktor transkripsi *Auxin Response Factor* (ARF) khususnya ARF7 dan ARF19 untuk mengaktifkan faktor transkripsi dari gen *Lateral Organ Boundaries Domain* (LBD) yaitu LBD16, LBD17, LBD18, dan LBD29. Kemudian LBD tersebut menginduksi *E2 Promotor Binding Factor a* (E2Fa) yang memiliki peran utama dalam memasuki siklus sel sehingga kalus dapat terbentuk (Ikeuchi *et al.*, 2013).

Secara umum waktu terbentuknya kalus kepel dari eksplan daun lebih cepat pada konsentrasi 2,4-D yang rendah. Uji DMRT menunjukkan konsentrasi 2,4-D yang paling optimal dalam mempercepat terbentuknya kalus adalah 2,4-D 7,5 mg/L. Konsentrasi 2,4-D tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan induksi kalus manggis

yang merupakan tanaman satu famili dengan kepel yaitu pada konsentrasi 2,4-D 0,5 mg/L (Rohani *et al.*, 2012). Penggunaan 2,4-D 5 mg/L juga telah berhasil menginduksi kalus dari daun ramin (Yelnitis & Komar, 2010). Hal ini sesuai dengan penelitian Habibah *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa induksi kalus kepel memerlukan konsentrasi auksin lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman lain. Perbedaan kemampuan eksplan dalam membentuk kalus tergantung pada tingkat hormon endogen dan eksogen, tipe eksplan *juvenil* atau dewasa, dan posisi eksplan (Pierik, 1997).

Berat basah kalus dari tangkai daun cenderung meningkat pada saat konsentrasi 2,4-D tinggi dan konsentrasi kinetin yang rendah. Hasil analisis varian dua jalan menunjukkan tidak ada pengaruh yang nyata pada perlakuan 2,4-D, kinetin, dan interaksi 2,4-D dan kinetin pada berat basah kalus. Berat basah kalus dari tangkai daun paling tinggi pada konsentrasi 2,4-D 7,5 mg/L dan kinetin 5 mg/l, sejalan dengan Sakpere *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa kombinasi kinetin konsentrasi rendah dan 2,4-D berhasil menginduksi kalus dan proliferasi.

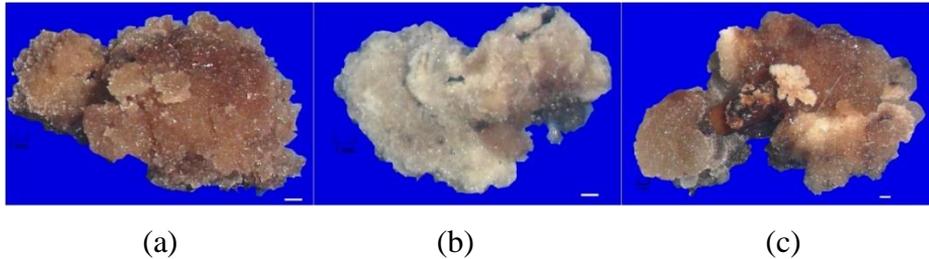
Secara umum cara auksin dalam mempengaruhi perkembangan sel tanaman dijelaskan melalui mekanisme transport polar yang berkaitan dengan *auxin influx* dan *auxin efflux*. Auksin masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui membran plasma menuju sitosol. Auksin mendominasi dalam bentuk anion dalam sitosol kemudian keluar melalui *auxin anion efflux carrier* (Taiz & Zeiger, 2010). Pompa proton pada membran plasma menggunakan energi ATP dan mentransfer H^+ pada dinding sel membentuk H^+ -ATPase menyebabkan

pH dinding sel menjadi asam (pH 5). Perbedaan pH bagian dalam dan luar sel akibat adanya ion H^+ menyebabkan aktifnya enzim tertentu sehingga memutuskan beberapa ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Air menjadi mudah masuk melalui membran sel secara osmosis sehingga ukuran sel bertambah (Taiz & Zeiger, 2010).

Penggunaan sitokinin eksogen dapat meningkatkan transkrip *cdc2* dan *CycD3*. Peningkatan ekspresi *CycD3* inilah yang menjadi penyebab meningkatnya proliferasi sel (D'agostino & Kieber, 1999). Pada pembelahan sel *Nicotiana plumbaginifolia* kinetin hanya dibutuhkan pada akhir fase G2, sel yang kekurangan kinetin berhenti membelah dengan *p34cdc2-like histon kinase* yang inaktif. Kontrol *cdc2* kinase dengan menghambat fosforilasi tirosin ditandai dengan jumlah fosfotirosin yang tinggi pada enzim yang inaktif. Kinetin menstimulasi pengurangan fosfat, dan mengaktivasi enzim dan proses mitosis lebih cepat (Zhang *et al.*, 1996). Kinetin juga menunjukkan aktivitasnya dalam mengaktivasi pembelahan sel *Arabidopsis* melalui induksi *CycD3* (Khamlichi *et al.*, 1999).

Kalus yang terbentuk dari eksplan tangkai daun secara umum berwarna kecoklatan dan bertekstur remah. Beberapa kalus memiliki tekstur yang kompak, hal ini dapat diamati pada saat melakukan subkultur. Kalus kepel yang bertekstur kompak sulit dipisahkan sedangkan yang memiliki tekstur remah mudah dipisahkan. Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini terdiri atas 55,55% kalus remah kecoklatan, 11,11% kalus putih kompak, dan 33,33% kalus kompak

kecoklatan. Kalus kepel berwarna putih pada 4 minggu pertama setelah penanaman dan mulai mengalami pencoklatan pada minggu ke-5.



Gambar 7.1. Perbandingan warna dan tekstur kepel pada perlakuan yang berbeda. (a) kalus kecoklatan dan remah pada perlakuan 2,4-D 7,5 mg/L dan kinetin 5 mg/L; (b) kalus putih kompak pada perlakuan 2,4-D 5 mg/L dan kinetin 10 mg/L; (c) kalus kecoklatan dan kompak pada perlakuan 2,4-D 10 mg/L dan kinetin 10 mg/L. *Scale bar*: 1 mm

Pencoklatan atau *browning* pada kalus biasa terjadi pada kultur jaringan tanaman berkayu. Proses pencoklatan pada kalus disebabkan adanya aktivitas senyawa fenolik yang tinggi. Pada penelitian ini kalus mulai mengalami pencoklatan pada saat usia kultur memasuki minggu ke-5. Hal ini dimungkinkan karena senyawa fenolik pada kalus kepel terakumulasi secara perlahan dan terus-menerus sehingga kalus mengalami pencoklatan pada minggu ke-5. Usaha untuk mengurangi pencoklatan pada kalus dilakukan dengan dilakukannya subkultur setiap 4 minggu sekali, namun tidak memberikan perbedaan pada visual kalus.

Dilaporkan oleh Laukkanen *et al.* (2000) bahwa pada kultur kalus pinus tanda-tanda pencoklatan kalus mulai terjadi pada minggu ke-2 setelah tanam, pada saat itu aktivitas peroksidase mencapai tingkat maksimum dan laju pertumbuhan mulai mengalami penurunan. Pada

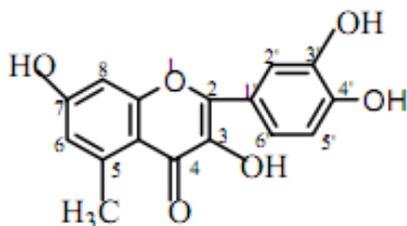
studi tersebut menunjukkan kalus yang mengalami *browning* terjadi akumulasi senyawa tannin. Selain itu *browning* pada kalus adalah sebagai akibat dari stress oksidatif tinggi dan dapat menyebabkan disorganisasi pada sitoplasma dan bahkan kematian sel, serta mengurangi kemampuan regenerasi kalus. Aktivitas peroksidase yang tinggi menstimulasi jaringan untuk mengalami pencoklatan (Laukkanen *et al.*, 2000). Hasil studi tersebut sesuai dengan George & Sherrington (1984) yang menyatakan bahwa perubahan eksplan menjadi kecoklatan disebabkan adanya senyawa fenol pada eksplan yang bereaksi dengan udara membentuk quinon dan menyebabkan perubahan warna kalus.

7.3. Jenis Flavonoid pada Kultur Kalus *S. burahol* yang Berpotensi sebagai Antioksidan

Tanaman kepel dengan nama sinonim *Uvaria burahol* Blume secara alami dapat ditemui di Indonesia terutama di Jawa, dan juga tersebar di Asia Tenggara dan kepulauan Salomon. Kepel dilaporkan mengandung antioksidan pada daun, kulit batang, bunga dan buahnya (Tisnadjaja *et al.*, 2006). Salah satu senyawa flavonoid yang terdapat pada kepel yaitu *3,7,3',4'-tetrahidroxy-5-methyl-flavone* (Gambar 8.2) mempunyai aktivitas antioksidan paling aktif dibanding flavonoid lain (Sunarni *et al.*, 2007).

Pada kultur kalus kepel, flavonoid yang terdeteksi adalah naringenin. Naringenin merupakan flavonoid awal yang terbentuk pada jalur biosintesis flavonoid. Naringenin menjadi substrat untuk produk flavonoid yang lain. Pada jalur selanjutnya terbentuk

dihidrokaempferol yang kemudian dengan bantuan enzim *flavonol synthase* diubah menjadi quercetin (Liu *et al.*, 2013). Flavonoid rutin (*quercetin 3-O rutinoside*), merupakan flavonol glikosida yang terdiri dari flavonol quercetin dan disakarida rutinose. Rutin merupakan produk lanjut dari quercetin (Gupta *et al.*, 2014). Naringen, quercetin dan rutin merupakan flavonoid yang berpotensi sebagai obat. Naringenin mempunyai aktivitas antioksidan, berpotensi sebagai obat *Alzheimer's disease* (Ferreira *et al.*, 2012, Ghofrani *et al.*, 2015). Quercetin mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, anti kanker, aktivitas hepatoprotektif, anti inflamasi, dan juga anti virus (Kumar & Pandey, 2013). Rutin merupakan flavonoid yang berpotensi sebagai obat karena memiliki kemampuan sebagai antioksidan, aktivitas hepatoprotektif, anti jamur, anti inflamasi, mempunyai efek anti kanker, menghambat leukimia dan menguatkan pembuluh darah (Gupta *et al.*, 2014, Kumar & Pandey, 2013).



Gambar 7.2. Struktur kimia 3, 7, 3',4'-tetrahydroxy-5-methyl-flavone (Sunarni *et al.*, 2007)

7.4. Produksi Antioksidan

Beberapa bagian tumbuhan kepel mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Tisnadjaja *et al.* (2006) menyatakan

bahwa kandungan antioksidan pada kepel antara lain terdapat pada daun dan buahnya. Kalus kepel dari mesokarp, daun, biji muda, dan tangkai daun mempunyai aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada beberapa bagian tumbuhan kepel ataupun kalus kepel bervariasi. Perbedaan aktivitas antioksidan disebabkan tiap bagian tumbuhan atau kalus mengandung flavonoid yang jumlah dan lokasi gugus hidroksinya pada kerangka flavonoid yang berbeda. Aktivitas antioksidan dari senyawa yang berasal dari tanaman seperti flavonoid disebabkan adanya gugus hidroksi pada struktur molekulnya. Flavonoid dengan gugus hidroksi bebas mempunyai aktivitas penangkap radikal dan adanya gugus hidroksi lebih dari satu terutama pada cincin B akan meningkatkan aktivitas antioksidannya (Gulcin *et al.*, 2004; Pokorni *et al.*, 2001; Sunarni *et al.*, 2007). Perbedaan aktivitas antioksidan pada kalus juga dipengaruhi jenis eksplan yang digunakan. Kalus dari eksplan mesokarp memiliki aktivitas antioksidan tertinggi bila dibanding dengan kalus dari eksplan biji dan daun. Mesokarp memiliki aktivitas antioksidan tinggi sehingga kalus yang dihasilkan juga memiliki aktivitas antioksidan tinggi.

Konsentrasi sukrosa yang ditambahkan ke dalam medium juga berpengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antioksidan. Tabel 8.2 menunjukkan beda nyata aktivitas antioksidan pada perlakuan penambahan sukrosa konsentrasi 35 g/L. Konsentrasi sukrosa 25 g/L dan 30 g/L mengakibatkan aktivitas antioksidan yang tidak berbeda nyata satu dengan yang lain dan juga dengan kontrol (konsentrasi sukrosa normal yaitu 30 g/L).

Tabel 7.2. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap peningkatan aktivitas antioksidan

Konsentrasi sukrosa tambahan (g/L)	Rerata aktivitas antioksidan (%)
0	63 a
25	66 a
30	61 a
35	44 b

Huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata

Kandungan flavonoid tertinggi terjadi pada penambahan sukrosa konsentrasi 25 g/L kemudian cenderung menurun pada konsentrasi 30 g/L walaupun tidak signifikan dan 35 g/L menurun signifikan. Pada kontrol produksi flavonoid lebih sedikit dibandingkan dengan penambahan sukrosa sebanyak 25 g/L. Flavonoid merupakan salah satu jenis metabolit sekunder (MS). Fungsi sukrosa sebagai salah sumber karbon pembentuk MS dan berperan dalam jalur metabolisme (Taiz & Ziger, 2010).

Sukrosa mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis. Sukrosa akan terhidrolisis membentuk dua gula monosakarida berupa glukosa dan fruktosa. Sukrosa mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis. Monosakarida hasil hidrolisis sukrosa diubah menjadi gula terfosforilasi dan selanjutnya memperoleh senyawa gliseraldehid-3-fosfat menjadi 1,3-bifosfoglisarat, 3-fosfoglisarat, 2 fosfoglisarat, fosfoenolpiruvat dan hasil akhir glikolisis berupa asam piruvat (Taiz & Ziger, 2010). Fosfoenolpiruvat merupakan salah satu hasil glikolisis sebagai bagian dari pembentukan flavonoid melalui jalur asam

shikimat. Diperlukan aritrosa-4-fosfat yang merupakan hasil dari jalur pentosa fosfat untuk membentuk penilalanin sebagai salah satu jalur pembentuk flavonoid. Jalur pentosa fosfat mengambil gula terfosforilasi dari glikolisis berupa glukosa-6-fosfat untuk dibentuk beberapa senyawa salah satunya pembentuk eritrosa-4-fosfat. fosfoenolpiruvat dan eritrosa-4-fosfat masuk dalam jalur asam shikimat. Keduanya terkondensasi menjadi tujuh karbon dengan enam komponen heterosiklik berupa 3-deoksi-D-arabino-heptulusonat-7-fosfat (DAHP) dikatalis 3-deoksi-D-arabino-heptulusonat-7-fosfat (DAHP) sintase. Hasil akhir berupa *chorismate* sebagai bahan pembentuk asam amino esensial yaitu fenilalanin, tirosin, dan triptofan (Herrman, 1995).

Sebagian besar metabolit sekunder jenis fenolat terbentuk dari turunan fenilalanin dengan menghilangkan gugus amin. Akan tetapi dalam pembentukannya, metabolit sekunder jenis fenolat juga membutuhkan senyawa dari reaksi jalur asam malonat. Fenilalanin sebagai asam amino pembentuk struktur metabolit sekunder mengalami penghilangan molekul amin dengan dikatalis oleh enzim *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) (Taiz & Ziger, 2010). Reaksi tersebut memicu terbentuknya kelompok hidroksil lainnya yaitu asam trans-sinamik, asam p-kumaril yang merupakan turunan dari komponen fenolat sederhana yang biasa disebut fenilpropanoid karena mengandung cincin benzen dan tiga rantai karbon. Reaksi selanjutnya dengan penambahan Ko-A-SH menjadi p-kumaril-Ko-A dan selanjutnya menjadi *chalcones* dengan penambahan stuktur dari jalur asam malonat dan pembentukan flavonoid (Held & Piechulla, 2011).

Pada konsentrasi lebih dari 25 g/L jumlah flavonoid cenderung menurun karena terjadi penghambatan pembentukan metabolit sekunder. Penghambatan ini terjadi karena sukrosa yang tersisa terkonversi menjadi hasil samping berupa senyawa-senyawa lain misalnya asam-asam organik dan CO₂. Ada mekanisme penghambatan balik atau *feedback inhibition* yaitu dihambatnya produksi MS karena dianggap cukup, sehingga proses metabolisme termasuk pembentukan MS khususnya flavonoid berkurang. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Irmawati (2007), bahwa peningkatan kadar reserpin pada kultur kalus tanaman *Rauvolfia feticillata* (Lour.) terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa sampai pada konsentrasi 30 g/L lalu menurun pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Sama halnya dengan pengaruh kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Chatarantus roseus* (L.) G. Don bahwa kadar alkaloid vinkristin tertinggi pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Kalus pada media dengan tambahan sukrosa 50 g/L, mengandung alkaloid vinkristin lebih sedikit, hal ini karena sukrosa sebagai sumber karbon, hidrogen dan oksigen dalam jumlah kurang dari 30 g/L tidak digunakan untuk pembentukan alkaloid vinkristin, tetapi hanya digunakan untuk pertumbuhan kalus. Penambahan 50 g/L sukrosa dapat menghambat pembentukan alkaloid vinkristin (Manuhara, 1995).

Kandungan flavonoid tertinggi akibat penambahan sukrosa konsentrasi 25 g/L dengan kandungan flavonoid 48% tidak hanya disebabkan sukrosa sebagai senyawa yang dilibatkan dalam metabolisme tetapi ada pengaruh potensial osmotik. Sinyal tekanan abiotik terdiri dari beberapa sebab, yaitu: suhu, salinitas, air, radiasi,

tekanan kimiawi, dan mekanis. Penambahan sukrosa merupakan salah satu modifikasi pada medium kultur jaringan. Perlakuan ini dapat menyebabkan kekurangan air pada sel atau sel menjadi dehidrasi. Hal ini karena *osmotic stress* yaitu tertarik keluarnya air sitoplasma yang menyebabkan penurunan kadar air dalam sel. Tekanan kimiawi akan timbul dalam sel tanaman (Akula & Ravishankan, 2011).

Tekanan kimiawi yang timbul, merupakan hal yang serupa dengan sinyal pembentukan enzim PAL yang berfungsi sebagai percabangan antara metabolit primer dengan metabolit sekunder. Artinya bahwa ketika enzim PAL sudah diaktifkan maka pembentukan metabolit sekunder akan berlanjut ke tahap selanjutnya menuju lebih spesifik. Aktivitas PAL meningkat dipicu dengan adanya faktor alam, cahaya, dan infeksi mikrobial. Titik ini sebagai awal mula stimulasi adanya inisiasi transkripsi pada gen pengkode enzim PAL. Contoh kasus yaitu terjadi infeksi mikrobial, maka secara langsung adanya mikrobial dapat menstimulasi transkripsi pada pembawa pesan RNA yang mengkode PAL. Kemudian meningkatkan pembentukan PAL pada tanaman yang merupakan salah satu stimulan terbentuknya metabolit sekunder komponen fenolat (Taiz & Ziger, 2010). Begitu pula dengan stimulasi lain seperti faktor fisik/alam khususnya pada *osmotic stress* yang disebabkan penambahan sukrosa pada media tanam menyebabkan peningkatan kandungan flavonoid.

Sukrosa dapat menginduksi tekanan osmotik pada tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.), dan mempengaruhi pertumbuhan kalus serta beberapa parameter biokimia salah satunya terdapat penurunan pertumbuhan dan akumulasi prolin serta karbohidrat terlarut dalam

jaringan kalus. Peningkatan tekanan osmotik dan potensial air yang berakibat pada penurunan potensial turgor yang terlihat pada berat kalus kering. Terlihat pada produksi prolin dan total karbohidrat terlarut (Javed & Ikram, 2008). Al-Khayri (2002) menyebutkan bahwa, pertambahan masa kalus teramati pada konsentrasi sukrosa pada 87 mM. Pertumbuhan kalus teramati pula pada konsentrasi sorbitol 54,9 mM sedangkan pada konsentrasi tinggi terjadi penghambatan. Pertumbuhan kalus terbaik terjadi pada medium yang mengandung 54,9 mM sorbitol dengan kombinasi 87,6 mM sukrosa. Peningkatan *osmotic stress* merupakan akibat penambahan konsentrasi sukrosa dan sorbitol. Penelitian tentang sukrosa sebagai penginduksi *osmotic stress* dan efeknya pada biomasa, hasil metabolisme, dan antioksidan kultur akar pada tanaman *Hipericum perforatum* L. menunjukkan bahwa total fenol, flavonoid mengalami penambahan pada perlakuan dengan konsentrasi sukrosa yang tinggi (Cui *et al.*, 2010).

Tekanan osmotik secara umum dapat dikatakan mempengaruhi produksi MS berdasarkan keterangan di atas. Semakin besar tekanan osmotik dapat memicu bertambahnya produksi metabolit sekunder (Akula dan Ravishankar, 2011). Hal ini tidak berlaku apabila konsentrasi sukrosa berlebih. Tekanan osmotik yang besar dan potensial osmotik yang rendah menyebabkan sel dehidrasi. Imbasnya produksi flavonoid menurun bahkan pada batas tertentu akan menyebabkan sel mati (Taiz dan Ziger, 2010). Hal ini dibuktikan dengan menurunnya produksi flavonoid pada penambahan sukrosa 30 g/L dan 35 g/L.

Mekanisme stimulasi produksi metabolit sekunder karena adanya aktivitas *abscisic acid* (ABA) merupakan sinyal untuk mengatur ekspresi penyetelan gen pengatur pertahanan tanaman. Hormon ABA merupakan hormon yang memicu fase *senescence* pada tanaman, berperan penting dalam kehidupan dan perkembangan tanaman, perkecambahan biji, pertumbuhan tanaman, *senescence* dan respon stres pada tanaman. Khusus untuk stres seperti kondisi cekaman hipotermis atau hiper-osmotik, garam mineral, dingin, dan kekeringan, ABA diketahui sebagai regulasi biosintesis metabolit sekunder pada beberapa kultur sel tanaman. Hormon ABA dapat menstimulasi *indole alkaloids* pada tanaman kultur sel *Catharantus roseus* (Zhao *et al.*, 2000). Produksi *benzophenanthridine alkaloids* pada kultur sel tanaman *Bloodroot* (*Sanguinaria canadensis*) diketahui distimulasi oleh ABA (Mahadyet *et al.*, 1998). Hormon ABA dianggap sebagai sinyal penanda tekanan osmotik yang menginduksi metabolit sekunder karena produksi sebagian besar metabolit sekunder dapat dipicu oleh pemicu stres, seperti sorbitol, manitol, sukrosa, dan tekanan garam mineral pada medium kultur jaringan, menyebabkan terjadi pembentukan ABA. Contohnya ABA dan tekanan osmotik dapat meningkatkan produksi *indole alkaloid* pada kultur sel *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2000) dan ABA dapat menstimulasi *taxol* pada kultur sel *Taxus sp* (Luo *et al.*, 2001) pada konsentrasi tinggi sukrosa dan manitol.

Terjadi tren yang sama antara aktivitas antioksidan dengan kandungan flavonoid. Keduanya mengalami kenaikan pada perlakuan dengan konsentrasi sukrosa 25 g/L dan mengalami penurunan pada perlakuan selanjutnya yaitu penambahan sukrosa 30 g/L dan 35 g/L

walaupun memiliki signifikansi yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya keterkaitan antara senyawa fenolat seperti flavonoid dengan aktivitas antioksidan. Senyawa tersebut mempunyai gugus hidroksil yang tersubstitusi pada posisi *orto* dan *para* terhadap gugus –OH dan –OR. Senyawa fenol dalam tubuh berfungsi melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti inflamasi, mencegah keroposnya tulang, dan sebagai antibiotik (Waji & Sugrani, 2009).

7.5. Simpulan

Kalus pada kepel dapat diperoleh dengan menginduksi eksplan daun, tangkai daun, biji dan mesokarp pada medium dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Kalus kepel dapat menghasilkan senyawa flavonoid yaitu antara lain naringenin. Kalus kepel mempunyai aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan kalus kepel tergantung antara lain pada jenis eksplan.

Daftar Pustaka

- Akula R & Gokare AR. 2011. Influence of biotic stress signal on secondary metabolites in plant. *Plant Signaling & Behavior* 6(11): 1720-1731.
- Al-Khayri JM & Al-Bahrany AM. 2002. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose-induced osmotic stress in rice. *Biologia Plantarum* 45(4): 609-611.
- Bhojwani SS & Razdan MK. 1983. *Plant tissue culture*. Elsevier. Amsterdam. New York. 502 p.
- Chaabani G, Tabart J, Kevers C, Dommes J, Khan MI, Zaoui S, Chebchoub L, Lachaa M & Karray-Bouraoui N. 2015. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue

- cultures of *Crataegus azarolus* L. var. aronia. *Acta Physiol Plant* 37: 16.
- Cui, Xi-Hua, Hoskotte NM, Chun-Hua W & Kee-Yoep P. 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant level in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue Cultures* 10(3): 7-14.
- D'agostino & Kieber J.J. (1999). Molecular mechanism of cytokinin action. *Current Opinion Plant Biology* 2(5): 359-364.
- Darusman HS, Rahminiwati M, Sadiyah S, Batubara I, Darusman LK & Mitsunaga T. 2012. Indonesian kepel fruit (*Stelechocarpus burahol*) as oral deodorant. *Research Journal of Medicinal Plants* 6(2): 180-188.
- Ferreyra MF, Rius SP & Casati P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Plant Science* 3(222): 1-15.
- Ghofrani S, Joghataei M, Mohseni S, Baluchnejadmojarad T, Bagheri M, Khamse S & Roghani M. 2015. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. *European Journal Pharmacology* (764): 195-201.
- Gulcin I, Uguz MT, Oktay M, Beydemir S & Kufrevioglu OI. 2004. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turkish Journal Agriculture Forestry* 28: 25-33.
- Gupta N, Chauhan RS & Pradhan JK. 2014. Rutin: A bioactive flavonoid in *Handbook of Medicinal Plants and their Bioactive Compounds*, Ed: N. Gupta ISBN: 978-81-308-0548-1 51-57.
- George EF & Sherrington PD. 1984. *Propagation by Tissue Culture*. London: Exegetics Ltd.
- Habibah NA, Moeljopawiro S, Dewi K & Indrianto A. 2016. Flavonoid production of callus cultures from mesocarp of *Stelechocarpus burahol*. *Biosaintifika* 8(2): 214-221.
- Hagen G, Guilfoyle TJ & Gray WM. (2004). Auxin signal transduction. In: Davies PJ (Eds.) *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher.
- Hatmi RU, Widyayanti S & Sudarmaji. 2014. Potensi Kepel (*Stelechocarpus burahol* [Blume] Hook.F & Th.) Sebagai Sumber Pangan Fungsional. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian*.

- Held H & Piechulla B. 2011. 18-Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. *Plant Biochemistry* (Fourth Edition). 431-449.
- Herrmann KM. 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 1(7): 907-919.
- Ikeuchi M, Sugimoto K & Iwase A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25: 3159-3173.
- Irmawati. 2007. Pertumbuhan Kadar Reserpin Kultur Kalus *Rauwolfia verticillata* (Lour.) Baillon Pada Variasi Konsentrasi Sukrosa Dalam Medium MS. *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret.
- Iwase A, Ohme-Takagi M, & Sugimoto K. 2011a. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signaling Behav* 6: 1943-1945.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K & Ohme-Takagi M. 2011b. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Current Biology* 21: 508-514.
- Khamlichi CR, Huntley R, Jacqmar A & Murray JA. 1999. Cytokinin activation of arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.
- Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E & Hohtola A. 2000. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20: 467-475.
- Javed F & Ikram S. 2008. Effect Sucrose Induced Osmotik stress On callus growth and biochemical aspect of two wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany* 40(4): 1487-1495.
- Kumari R, Singh S & Agrawal SB. 2009. Effects of supplemental ultraviolet-b radiation on growth and physiology of *Acorus calamus* L. (sweet flag). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 19-27.
- Kumar S & Pandey AK. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Liu N, Zeller FJ & Chen QF. 2013. The flavonoid content in leaves and inflorescences of the wild perennial *Fagopyrum cymosum* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 825-838.

- Luo J, Liu L & Wu CD. 2001. Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* 13(23): 1345-1348.
- Mahady GB, Liu C & Beecher CWW. 1998. Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Pytochemistry* 1(48): 93-102.
- Manuhara YSW. 1995. Pengaruh manipulasi media terhadap kadar alkaloid vinkristin kalus daun *Chataranthus roseus* (L.) G. Don. *Berkala Penelitian Hayati* 1: 1-7.
- Pasternak T, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Onckelen HAV, Dudits D & Feher A. 2002. The role of auxin, ph and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of Alfalfa. *Plant Physiology* 129: 1807-1819.
- Prakash MG & Gurumurthi K. 2010. Effects of type of explant and age, plant growth somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 13-20.
- Pierik RIM. 1987. *In Vitro Culture of Higer Plants*. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, The Netherlands.
- Pokorny J, Yanishlieva N & Gordon M. 2001. *Antioxidants in Food, Practical Applications*, 1-123, Wood Publishing Limited. Cambridge, England.
- Purwantiningsih, Hakim AR & Purwantini I. 2010. Antihyperuricemic activity of the kepel [*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F. & Th.] leaves extract and xanthine oxidase inhibitory study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2(2): 123-127.
- Rohani ER, Ismanizan I, & Noor NM. 2012. Somatic ebyrogenesis of mangosteen. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 110: 251-259.
- Sakpere AMA, Ajayi SA & Adelusi AA. 2014. Effect of growth regulator and explant types on callus induction on *Telfairia occidentalis* Hook F. *African Journal of Biotechnology* 13(20): 2015-2021.
- Sunardi C. 2010. Structure of steroids in *Stelechocarpus burahol* Hook F. & Thomson Stem Bark. *The Journal of Indonesian Medicinal Plant*. 3(2): 115-117

- Sunarni T, Pramono S & Asmah R. 2007. Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.). *Indonesian Journal of Pharmacy* 18(3): 111-116.
- Taiz L & Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. Pp 545-582.
- Tang W & Newton RJ. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167: 621-628.
- Tisnadaja D, Saliman E, Silvia & Simanjuntak P. 2006. Study of kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thomson) as an anti-oxidative compounds containing fruit. *Biodiversitas* 7(2): 199-209.
- Waji RA & Sugrani A. 2009. Flavonoid (Quercentin). *Makalah Kimia Organik Bahan Alam*. Makassar: Program S2 Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin.
- Yelnitis & Komar TE. 2010. *Upaya induksi kalus embriogenik dari potongan daun ramim*. Bogor: Indonesia's Work Programme for 2008 ITTO CITES Project.
- Zhang K, Letham DS & John PC. 1996. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc-2-like h1 histone kinase. *Planta* 200: 2-12.
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q & He XW. 2000. Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by varius chemical. *Biothechnology Letter* 15(22): 1221-1226.

POTENSI ISOFLAVON PADA KEDELAI
SEBAGAI ANTI KANKER

BAB
8



Siti Harnina Bintari

POTENSI ISOFLAVON PADA KEDELAI SEBAGAI ANTI KANKER

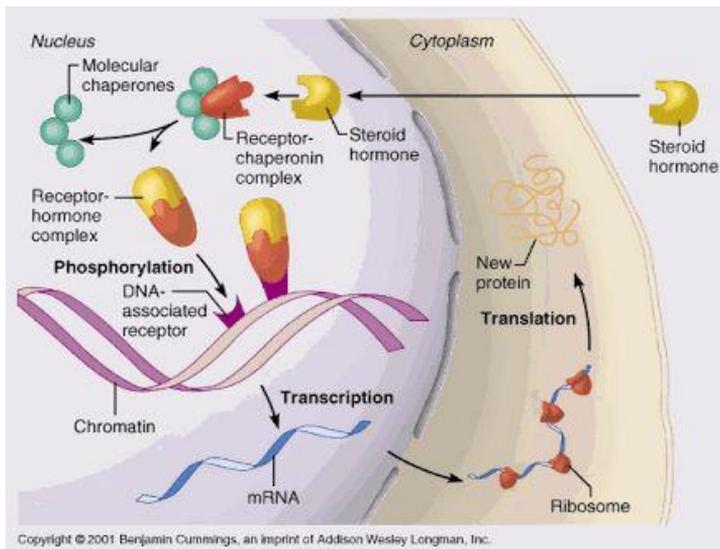
Penulis Siti Harnina Bintari

8.1. Pendahuluan

Isoflavon merupakan fitoestrogen, sifat utama dapat menempati reseptor estrogen hospes sehingga dapat mengurangi terjadinya ikatan antara estrogen dengan reseptor estrogen sehingga dapat mencegah timbulnya kanker payudara (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2002). Isoflavon dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara melalui 3 (tiga) jalur. Jalur pertama, isoflavon dapat menghambat pembentukan enzim tirosin protein kinase yang terdapat pada membran sel dan sitoplasma (Boersma *et al.*, 2001; Toews, 1999). Penghambatan pembentukan enzim tirosin protein kinase selama proses karsinogenesis berpengaruh pada fosforilasi beberapa protein yang akan menjalankan tugasnya sebagai sinyal transduktor sesaat sebelum masuk pada replikasi DNA pada fase sintesis (S), yakni fase sekuens DNA terbagi menjadi dua bagian yang sama. Jalur ke dua, isoflavon dapat menghambat enzim DNA topoisomerase pada proses replikasi DNA. Penghambatan pembentukan enzim DNA topoisomerase pada saat replikasi berpengaruh pada proses membuka rangkaian DNA Jalur ke tiga, isoflavon mempunyai efek antiangiogenik, melalui penghambatan pembentukan enzim kolagenase oleh sel kanker dan pembentukan senyawa inhibitor cox-2 (enzim cyclooxygenase-2) untuk mencegah

produksi *growth factor* yang dibentuk oleh sel kanker selama proses angiogenesis (Surh & Na, 2002).

Struktur genistein yang seperti estradiol (estrogen) menyebabkan isoflavon mempunyai sifat seperti kelompok hormon steroid yakni bersifat tidak larut dalam air (hidrofobik). Sifat sinyal molekul hidrofobik dapat menembus membran plasma dan akan berikatan dengan reseptornya di sitoplasma dan akan berubah bentuk strukturalnya membentuk konformasi kompleks ligan-reseptor sehingga terbentuk area pengikatan DNA (*DNA binding site*) (Rood, 1998; Vile *et al.*, 1993) Selanjutnya kompleks protein reseptor – hormon kemudian memasuki inti sel, di mana ia berikatan dengan genom, yaitu pada tempat kromosom tertentu. (Gambar 8.1).



Gambar 8.1. Lintasan intraseluler hormon steroid (Reisberg, 2001)

Terkait dengan Gambar 8.1, suplementasi isoflavon dalam bentuk kedelai dan atau olahannya sebanyak 40 g/hari atau satu potong tempe selama 24 minggu mampu melindungi wanita pre menopause dari stres oksidatif. Terjadinya peningkatan aktivitas enzim SOD oleh isoflavon, diduga karena ikatan isoflavon dan reseptor estrogen mampu berdifusi ke dalam inti sel dan dapat berikatan dengan DNA. Ikatan ini menginduksi produksi dan ekspresi mRNA, kemudian keluar inti sel dan mensintesis protein baru di sitoplasma. Dengan demikian masyarakat Indonesia dan juga Asia yang banyak mengonsumsi kedelai dan turunannya banyak diuntungkan.

8.2. Tempe sebagai Sumber Isoflavon

Kedelai diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya tanin, steroid/triterpenoid, saponin dan flavonoid berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker (Bintari *et al.*, 2013; Bintari & Nugraha, 2017). Kandungan tertinggi terdapat pada produk kedelai yang difermentasi seperti tempe. Tempe merupakan makanan fungsional, didalamnya terdapat gizi utama yakni karbohidrat, lemak, protein, vitamin B12, serat makanan yakni stakhiosa, verbaskosa dan rafinosa yang dikenal dengan oligosakarida, berperan sebagai prebiotik. Selain itu tempe segar juga mengandung mineral makro dan mikro dalam jumlah yang cukup. Terutama Ca melebihi kalsium telur ayam, Fe dan antioksidan isoflavon meliputi daidzein, glisitein, genistein, dan

senyawa Faktor II (Klus *et al.*, 1991). Rata-rata orang Asia mengkonsumsi genistein \pm 50-75 mg/hari, lebih kurang setara dengan jumlah yang terdapat dalam tempe dengan berat 100 g. Di sisi lain, tempe sarat dengan bakteri asam laktat (BAL) yang potensial sebagai probiotik. BAL yang penting dan ada dalam produk tempe antara lain dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus* dan *Bifidobacterium* (Kasmidjo, 1990). Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium, seng) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh. Jumlah mineral zat besi, tembaga, dan seng berturut-turut adalah 9,39; 2,87; dan 8,05 mg setiap 100 g tempe.

Dibandingkan dengan kedelai, terjadi beberapa hal yang menguntungkan pada tempe, hal ini bisa dilihat dari meningkatnya kadar padatan terlarut, nitrogen terlarut, asam amino bebas, asam lemak bebas, nilai cerna, nilai efisiensi protein, serta skor proteinnya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa zat gizi tempe lebih mudah dicerna, diserap, dan dimanfaatkan tubuh dibandingkan dengan yang ada dalam kedelai. Hal ini dapat dijadikan indikator betapa pentingnya tempe dikonsumsi dengan pengolahan yang benar agar terbentuk pertahanan tubuh dan kecukupan gizi utama. Berapa sebenarnya isoflavon dibutuhkan oleh tubuh ?.

Kedelai mempunyai komposisi yang berbeda dengan tempe, namun ke duanya mempunyai kelebihan yakni sarat zat gizi makro

meliputi protein, karbohidrat dan lemak. Sementara, perbedaan yang mencolok antara tempe dan kedelai terdapat pada senyawa vitamin B12 dan senyawa bioaktif isoflavon aglikon serta keberadaan bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik.

Makanan dan minuman yang terbuat dari kedelai mempunyai isoflavon yang bervariasi tergantung proses pengolahannya. Pengolahan secara higienis ditengarai dapat menjadi salah satu faktor positif pada jumlah isoflavon aglikon pada tempe. Makanan dari kedelai seperti tempe, tahu dan minuman seperti susu kedelai dan tepung kedelai serta kedelai utuh mempunyai kandungan isoflavon berkisar antara 130 – 380 mg/100 gram. Oleh karenanya komoditas kedelai menjadi pilihan utama sebagai sumber isoflavon, di mana semua tanaman kacang–kacangan mempunyai senyawa isoflavon yang terikat dengan gula disebut sebagai senyawa glikosida. Minyak dari kedelai dan kecap tidak mengandung isoflavon. Kemudian, penggunaan alkohol dalam proses ekstraksi dapat mengakibatkan kadar isoflavon menurun. Seratus gram tempe terdapat isoflavon aglikon sebesar 49 mg, namun pada pembuatan tempe pada batch yang lain kandungan senyawa isoflavon aglikon berubah, yakni sebesar 26 mg/100 gram tempe (Bintari, 2013). Hal ini dapat disebabkan oleh banyak faktor yang belum diketahui namun ditengarai keberadaan bakteri *Micrococcus luteus* dan *Brevibacterium epidermidis* selama proses fermentasi tempe dan kompleksitas faktor fermentasi tempe menjadi indikator penting untuk mendorong meningkatnya senyawa isoflavon aglikon (Bintari

et al., 2009). Disisi lain kontribusi dari berlimpahnya kapang *Rhizopus oligosporus* dan enzim yang ada didalamnya ikut berperan penting pada hadirnya senyawa pada tempe.

Potensi kedelai dan olahannya sebagai sumber gizi dan senyawa bioaktif merupakan point penting untuk kesehatan oleh kaenanya makanan/jajanan berbasis tempe menjadi produk *super food, food for the future*". Hal ini dipicu oleh kemampuan isoflavon sebagai penangkap (scavenger) radikal, yaitu dengan cara mengubah O₂. (-) ion superoksida yang merupakan metabolit tereduksi yang dikatalisis oleh reaksi dismutasi. Dari beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, diketahui bahwa kedelai menempati urutan pertama, mengandung daidzein 10,5-85 mg/100g dan genistein 26,8-120,5 mg/100g berat kering.

Studi epidemiologis menunjukkan bahwa perempuan yang mengkonsumsi kedelai atau bentuk olahannya, seperti tahu, taucu, kecap, miso dan tempe berisiko rendah terhadap kanker payudara (Surh, 1999; Berdanier, 1998). Semua produk tersebut mengandung antioksidan, yakni isoflavon yang berperan pada tingkat seluler dan karsinogenesis (Surh & Na, 2002; Toyomura & Kono, 2002; Toews, 1999).

8.3. Bioavalabilitas Isoflavon

Selama fermentasi tempe, maka terjadi kenaikan aktivitas antioksidan yang disebabkan oleh terhidrolisisnya senyawa isoflavon glikosida pada biji kedelai menjadi senyawa isoflavon

bebas yang disebut aglikon oleh enzim β -glukosidase pada saat proses perendaman biji. Enzim ini dihasilkan pula oleh *Rhizopus oligosporus* selama fermentasi. Aktivitas antioksidan dari isoflavon ini akan meningkat seiring dengan lamanya waktu fermentasi. Menurut Barz *et al.* (1993) dan Bintari & Nugraheni (2015) kenaikan aktivitas antioksidan juga dikarenakan terbentuknya Faktor-II selama fermentasi tempe yang aktivitas antioksidannya lebih tinggi dibandingkan isoflavon aglikon yang lain. Kenaikan aktivitas antioksidan yang cukup signifikan saat proses fermentasi tempe mencapai waktu 36 jam (36,37%) dan nilainya berbeda nyata dengan saat fermentasi 30 jam (31,72 %). Pada fase ini terjadi pertumbuhan jamur tempe yang optimal dan hampir tetap atau bertambah sedikit, dilanjutkan oleh aktivitas *Rhizopus sp.* sehingga terjadi proses transformasi dan biosintesis senyawa aktif. Senyawa isoflavon pada kedelai berbentuk konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -o- glikosidik. Selama proses fermentasi ikatan -o- glikosidik terhidrolisa, sehingga terpisahkan senyawa gula dan isoflavon aglikon bebas. Isoflavon aglikon bebas tersebut mengandung senyawa genistein, glisitein dan daidzein. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas biologi lebih tinggi. Terbukti bahwa faktor II (*6,7,4'tri-hidroksi isoflavon*) mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis lebih baik dari daidzein dan genistein. Senyawa isoflavon tempe, lebih aktif 10 kali dari senyawa karboksi kroman dan 3 kali dari senyawa isoflavon

aglikon lainnya yang terdapat pada kedelai (Jha *et al.*, 1997; Klus *et al.*, 1991). Sementara, produk tempe mempunyai keunggulan yakni mempunyai kandungan senyawa aktif, teknologi pembuatannya sederhana, harga terjangkau, mempunyai citarasa yang enak dan mudah dimasak. Senyawa isoflavon merupakan salah satu komponen yang juga mengalami proses metabolisme selama fermentasi berlangsung.

8.4. Isoflavon Tempe sebagai Anti Kanker

Pemanfaatan isoflavon untuk penghambatan sel kanker berkaitan dengan titik tangkapnya pada penghambatan pembentukan enzim tirosin protein kinase yang terdapat pada membran sel dan sitoplasma, menghambat enzim DNA topoisomerase, menginduksi apoptosis dan mempunyai efek antiangiogenik serta mempunyai sifat mutagenik pada gen TGF β (*Transforming Growth Factor*) (Peterson *et al.*, 1997). Tempe berpotensi untuk melawan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif. Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Namun, karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai. Oleh karena itu, tempe sangat baik untuk

diberikan kepada segala kelompok umur (dari bayi hingga lansia), sehingga bisa disebut sebagai makanan semua umur.

Isoflavon sebagai *chemoprevention* telah dipelajari secara *in vitro* dan *in vivo*, yaitu sebagai senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan atau proliferasi sel kanker. Salah satu aktivitas isoflavon adalah dapat menghambat pembentukan *Aberrant Crypt Foci (ACF)*, pada lesi pra neoplasia kanker kolorektal. Dengan penelitian eksperimen yang lain, terbukti bahwa genistein, salah satu komponen isoflavon pada konsentrasi 25-250 mg genistein/kg. Diet yang pada tikus dijejaskan agensia *Dimetil Benz Antrasen (DMBA)* dapat menurunkan tumor payudara sebesar 20% sampai 50%; melalui *biomarker* reseptor *Epidermal Growth Factor (EGF receptor)* (Lamartiniere, 2000). Pemberian isoflavon dari ekstrak tempe yang dikonsumsi lebih awal dapat digunakan sebagai agensia *pencegah* secara luas terhadap pertumbuhan sel kanker. Di sini, memperkuat bahwa penggunaan obat tradisional pada masyarakat secara empiris telah memberikan hasil yang baik, namun secara biomolekuler belum terdapat kejelasan efek patobiologi mengenai manfaat tempe untuk mencegah pertumbuhan sel kanker tersebut.

Dari berbagai studi epidemiologi didapatkan bahwa faktor risiko kanker payudara dapat berupa umur, riwayat kanker pada keluarga, radiasi, pola hidup termasuk diet, kegemukan, kebiasaan minum alkohol dan kebiasaan merokok (McPherson *et al.*, 2000; Vliet, 2000). Diperparah dengan kemajuan teknologi, bahwa zat-zat

pencemar dapat menjadi pemicu munculnya penyakit kanker pada manusia, yang ternyata sulit dihindari. Di sisi lain kondisi sosial ekonomi dan keterbatasan sarana dan prasarana kedokteran di Indonesia, maka kegiatan yang murah dan dapat diterima masyarakat, adalah dengan menghindari faktor risiko melalui perbaikan pola hidup khususnya pola makan, dengan memanfaatkan makanan yang mengandung isoflavon, yang ditengarai dapat menurunkan risiko terkena kanker payudara (Lamartiniere *et al.*, 1998; Gilbert, 2001).

8.5. Simpulan

Isoflavon berfungsi mempunyai aktivitas sebagai alat komunikasi dalam proses interaksi antar sel. Isoflavon sebagai fitoestrogen dapat digunakan sebagai alternatif mengatur keseimbangan hormon estrogen dengan progesteron Isoflavon mempunyai aktivitas seperti hormon estrogen dengan molekul sinyal yang bersifat hidrofobik, memiliki kemampuan untuk menembus membran yang terdiri atas lemak lapis ganda, dengan demikian reseptor bagi molekul sinyalnya berada di dalam sitoplasma sebagai reseptor sitosolik.

Tingkat keseringan dan jumlah tempe yang dikonsumsi perlu diperhatikan dan tetap disarankan makan makanan beragam, terukur dan bervariasi cara pengolahan. Hal ini bermanfaat untuk mengurangi efek isoflavon dari sifat ambivalen.

Daftar Pustaka

- Ballard-Barbash R, Birt DF, Kestin M, King IB. 1997. Perspectives on integrating experimental and epidemiologic research on diet, anthropometry and breast cancer. symposium diet, anthropometry and breast cancer: integration of experimental and epidemiologic approaches. *American Society for Nutritional Sciences*: 936S-939S.
- Barnes S. 2001. Role of phytochemicals in prevention and treatment of prostatic cancer. *Epidemiologic Review* 23(1): 102-106.
- Bintari SH. 2013. Pasteurization for hygienic tempe: study case of krobokan tempe yesterday and today. *GSTF International Journal on Bioformatics & Biotechnology*.
- Bintari SH, Dyah A, Jumesti V E & Citra R. 2009. Efek inokulasi bakteri *micrococcus luteus* terhadap pertumbuhan jamur benang dan kandungan isoflavon pada proses pengolahan tempe. *Biosaintifika-Berkala Ilmiah Biologi* 1(1): 68-75.
- Bintari SH & Nugraheni K. 2015. The effects of isoflavone on antioxidant status in the serum of rats dmba induced breast cancer and treated with tempe. *Artikel Seminar Nasional dengan Prosiding 1st Unnes International Conference on Research Innovation and Commercialization (UICRIC) to Better Life*: 251-254.
- Bintari SH & Nugraheni K. 2017. The potential of tempeh as a chemopreventive and chemotherapeutic agent targeting breast cancer cells. *Pakistan Journal of Nutrition* 16(10): 743-749.
- Bintari SH, Moeis F & Sarjadi. 2013. Perubahan parameter biologik jaringan kanker payudara mencit akibat pemberian isoflavon tempe. *The Indonesian Journal of Clinical Nutrition* 9(4): 197-203
- Boersma BJ, Barnes S, Kirk M & Wang CC. 2001. Soy isoflavonoids and cancer-metabolism at the target site. *Mutation Research* 480-481: 121-127.
- Gilbert MN. 2001. *The Healing Power of Soy's Isoflavones*. <http://www.virtuesofsoy.com>.

- Hilakivi-Clarke L, Wang C, Kalil M, Riggins R & Pestell RG. 2002. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 11(4): 603-625.
- Jha HC, Kiriakidis S, MHoppe & Egge H. 1997. Antioxidative Constituents of Tempe. Reinventing the hidden Miracle of Tempe. *Proceedings International tempe Symposium*. Published by Indonesian tempe foundation Jakarta.
- Klus K, Borge G, Papendorf & Barz W. 1991. Formation of 6,7,4' tri hydroxy isoflavone (factor-2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe. *Journal of Biotechnology* 54(4): 979-999.
- Kasmidjo RB. 1990. *Tempe, Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Lamartiniere CA. 2000. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(6): 1705S-1717S.
- Leong AS-Y & Le AKC. 1995. Biological indices in the assessment of breast cancer. *Journal Clinical Molecular Pathology* 48(5): M221-M238.
- Mc Pherson K, Steel CM & Dixon JM. 2000. ABC of breast diseases breast cancer-epidemiology, risk faktor, and genetics. *BMJ* 321(7261): 624-628.
- Reisberg, P. 2001. Hormones. <http://academics.wellesley.edu>. [31 Maret 2018]
- Rood L. 1998. The possible role of soy in breast cancer prevention and supplement. *Nutrition Bytes* 4(1): 1-5.
- Surh Y-J. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effect of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research* 428(1-2): 305-309
- Surh Y-J & Na H-K., 2002. Cyclooxygenase-2 as a putative target for cancer chemoprevention some anti-inflammatory phytochemicals. *Food and Chemical Toxicology* 40: 146-151.
- Toyomura K & Kono S. 2002. Soybean, soy foods, isoflavones and risk of colorectal cancer: a review of experimental and epidemiological data. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention* 3(2): 125-131.

- Toews VD. 1999. *All About Soy Isoflavones & Women's Health*. Avery Publishing Group 68.
- Vile RG, McClure MO & Weber JN. 1993. *Genes and Cancer Basic Molecular and Cell Biology*. Second edition. London: the BMJ Publishing Group Tavistock Square.
- Vliet Avd, 2000. Cigarettes, cancer and carotenoids: a counting unresolved antioksidan paradox. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72(6): 1-4.
- Wangen KE, Duncan AM, Xu X & Kurzer Ms. 2001. Soy isoflavon and improve plasma lipids in normo cholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 225-231.

TENTANG PENULIS



Retno Sri Iswari

Purwodadi, 7 Februari 1952

Retno Sri Iswari sejak 1979 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Biokimia dan Dasar-Dasar Bioteknologi.



Noor Aini Habibah

Cilacap, 7 November 1971

Noor Aini Habibah sejak 1998 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Kultur Jaringan Tumbuhan, Genetika, Biologi Molekular dan Biologi Umum.



R. Susanti

Sragen, 23 Maret 1969

R. Susanti sejak 1997 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Biokimia, Kimia Organik dan metabolisme sel.



Ari Yuniastuti

Semarang, 2 Juni 1968

Ari Yuniastuti sejak 1998 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Gizi & Kesehatan dan Biokimia. Bidang peminatan Nutrition Health, Molecular Biology dan Imunologi.



Nugrahaningsih WH

Klaten, 9 juli 1969

Nugrahaningsih WH sejak 1998 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Anatomi Fisiologi Manusia, Struktur Jaringan Hewan dan Biopatologi.



Lisdiana

Pekalongan, 19 November 1959

Lisdiana sejak 1986 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, mengajar mata kuliah Struktur Jaringan Hewan, Antomi Fisiologi Manusia dan Struktur Tubuh Hewan.



Siti Harnina Bintari

Madiun, 14 Agustus 1960

Siti Harnina Bintari sejak 1987 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Mikrobiologi, Bioteknologi serta Gizi dan Kesehatan.



Yustinus Ulung A

Brebes, 27 April 1964

Yustinus Ulung Anggraito sejak 1990 sebagai staf pengajar di jurusan biologi FMIPA UNNES, terutama mengajar mata kuliah Genetika Biologi Molekular, Bioteknologi, dan Kultur Jaringan Tumbuhan.

ISBN 978-602-5728-05-1



9 786025 728051