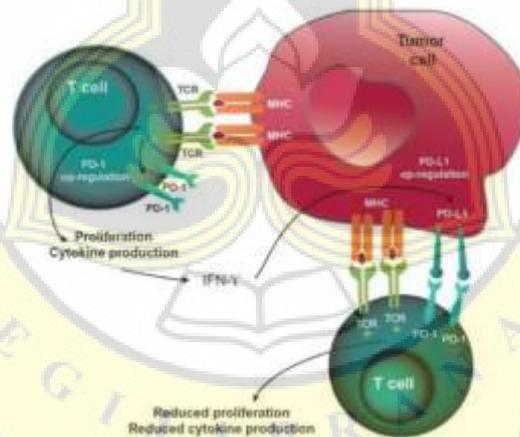


BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Mekanisme Imunoterapi *Immune Checkpoint Inhibitor* (ICI)

Sistem kekebalan tubuh biasanya menghentikan sel T agar tidak menyerang sel normal dalam tubuh dengan menggunakan protein yang disebut dengan *immune checkpoint*. *Immune checkpoint* merupakan senyawa yang dapat merangsang, memperlambat atau menghambat respon dari sel T. *Immune checkpoint* adalah bagian normal dari sistem kekebalan tubuh yang berperan untuk mencegah respon imun agar tidak menjadi terlalu kuat, karena dapat menghancurkan sel-sel dalam tubuh yang masih sehat. *Immune checkpoint* berikatan ketika protein di permukaan sel imun, yang disebut dengan sel T, mendeteksi dan mengikat protein sel lain seperti sel tumor. Protein-protein ini disebut sebagai *immune checkpoint proteins*.



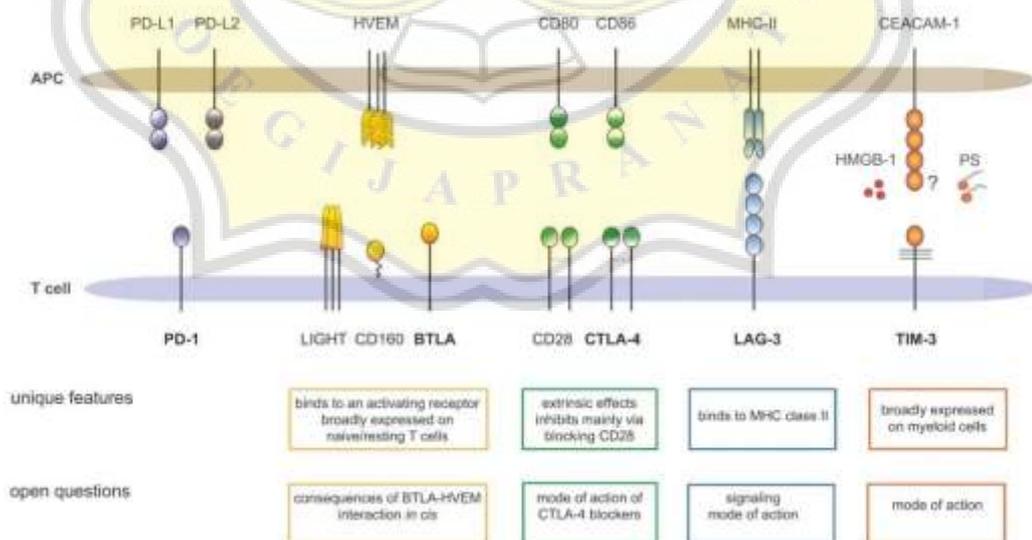
Gambar 5. Mekanisme sistem imun tubuh
Sumber: (Buchbinder and Desai 2016)

Dapat dilihat pada Gambar 5., membrane sel T memiliki reseptor disebut dengan *T Cells Receptor* (TCR) yang ketika bertemu dengan sel tumor, dia akan berikatan dengan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) atau pada manusia lebih dikenal sebagai kompleks *Human Leukocyte Antigen* (HLA). Kedua molekul ini adalah protein yang dapat ditemukan di hampir semua permukaan sel tubuh suatu organisme, yaitu di *Antigen Presenting Cell* (APC) (Utami, 1997) dan dengan keberadaan kedua molekul ini, respon imun dapat terjadi karena mereka memiliki

kemampuan polimorfisme, yaitu perubahan struktur genetik pada sel untuk beradaptasi dengan lingkungannya, sehingga sel protein MHC sehingga dapat mengikat serta mempresentasikan antigen peptide ke sel T (Wilkes & Burlingham, 2012).

Ketika senyawa IC dan pasangan proteinnya berikatan, mereka akan mengirimkan sinyal “mati” kepada sel T sehingga dapat mencegah sistem kekebalan tubuh agar tidak menghancurkan kanker. Beberapa sel kanker dapat mengirim sinyal yang membingungkan sel T dengan mengaktifkan jalur *checkpoint* sehingga sel T berhenti menyerang sel kanker. Jika dibiarkan, sel kanker akan terus berkembang dan bertumbuh (Buchbinder and Desai 2016).

CTLA-4 dan PD-1 adalah dua protein dari membrane sel limfosit T yang merupakan bagian dari sistem *immune checkpoint* dengan fungsi menghambat reaksi imun sehingga sistem imun tidak menyerang tubuh. Selain CTLA-4 dan PD-1, terdapat pula LAG-3, BTLA, dan TIM-3 yang berperan mengontrol sistem imun tubuh, masing-masing berikatan dengan bagian spesifik sel pasangannya seperti yang dapat dilihat pada Gambar 6. di bawah ini.

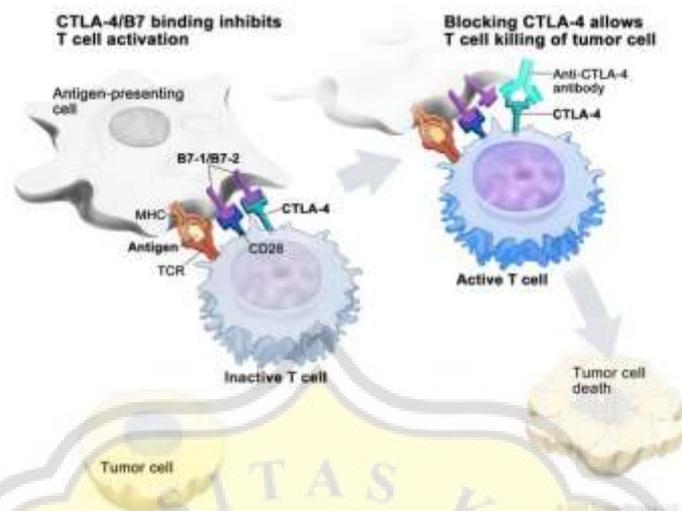


Gambar 6. Pasangan sel imun tubuh dengan APC
Sumber: (De Sousa Linhares et al., 2018)

Menurut *American Cancer Society*, PD-1 adalah protein *checkpoint* pada sel imun yang disebut sel T. PD-1 biasanya berperan sebagai sejenis “*off switch*” yang membantu menjaga sel T agar tidak menyerang sel lain dalam tubuh. Hal ini biasanya terjadi dengan cara PD-1 menempel pada PD-L1, sejenis protein yang ditemukan pada beberapa sel normal dan sel kanker. Ketika PD-1 berikatan dengan PD-L1, ia akan memberitahu sel T untuk meninggalkan sel yang lain. Beberapa sel kanker memiliki sejumlah PD-L1 yang besar untuk membantu mereka bersembunyi dari serangan imun tubuh sel T.

Sebagai ilustrasi, dapat dilihat pada Gambar 6. Membran sel T memiliki reseptor (TCR) yang menjadi tempat interaksi antara PD-L1 di sel tumor dengan PD-1 di sel T menyebabkan penurunan fungsi sinyal dari sel T sehingga sistem imun tidak menyerang sel tumor. Oleh sebab itu, untuk memblokir interaksi antara PD-1 dengan PD-L1, diperlukan inhibitor untuk membiarkan sel T melanjutkan aktivasi dan menghancurkan sel tumor. PD-1 *inhibitor* atau PD-L1 *inhibitor* adalah protein dari sel T yang menghambat senyawa PD-1 agar tidak berikatan dengan sel PD-L1 (De Sousa Linhares et al. 2018).

Pada Gambar 7., dapat dilihat anti CTLA-4 adalah protein yang ditemukan pada sel T (sejenis sel kekebalan) yang membantu menjaga respons kekebalan tubuh tetap terkendali. Ketika CTLA-4 terikat pada protein lain yang disebut B7, terjadi hambatan pembunuhan sel kanker oleh sel T. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*, atau yang dikenal dengan CTLA-4, bersama dengan CD28 adalah reseptor homolog yang diekspresikan oleh kedua sel T, CD4+ dan CD8+ (Wilkes, D. S., & Burlingham 2012). Kedua sel ini memediasi fungsi yang berlawanan dalam aktivasi sel T. Kedua reseptor ini berbagi sepasang ligan yang diekspresikan pada permukaan *antigen presenting cells* (APCs).



Gambar 7. Mekanisme Senyawa Inhibitor CTLA-4
Sumber: (National Cancer Institute 2019)

Beberapa obat antikanker, yang disebut *immune checkpoint inhibitor* (ICI), digunakan untuk memblokir CTLA-4. Ketika protein ini diblokir, "rem" pada sistem kekebalan dilepaskan dan kemampuan sel T untuk membunuh sel kanker meningkat (CTCA, 2020)

Meskipun ada harapan besar dari terapi ICI, hanya sebagian kecil pasien yang mencapai respons yang tahan lama terhadap monoterapi (Twomey and Zhang 2021). Sel tumor terdiri dari beberapa jenis sel, dan selama proses pengobatan imunoterapi, hanya sebagian kecil tumor imunogenik yang dapat merespon imunoterapi. Hal ini dapat terjadi karena berbagai factor yang hingga kini belum diketahui pasti penyebabnya. Sebagian besar usaha peneliti dalam memahami respon imun terkait perubahan somatik sel kanker dan efeknya terhadap sel inang dalam sirkulasi dan *tumor microenvironment* (TME). Ada beberapa factor eksternal yang dikaitkan dengan fungsi system imun yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel kanker baik secara sistemik maupun local pada *tumor microenvironment* (TME)(Anderson and Simon 2020).

5.2. Potensi Senyawa Alami Sebagai Alternatif Imunoterapi *Immune Checkpoint Inhibitor* (ICI)

Kemajuan pengobatan kanker dengan metode tradisional, seperti terapi radiasi dan kemoterapi, seringkali dibatasi dengan adanya efek samping toksisitas yang menyebabkan banyak pasien mengalami efek samping (Pabla and Dong 2012). Metode imunoterapi dengan menggunakan *immune checkpoint inhibitor* (ICI) bekerja dengan menghambat jalur persinyalan sel untuk menjaga system imun agar tetap terkendali dan kebal sehingga dapat mencegah autoimunitas (Pardoll 2012). Namun, tetap ada efek samping yang muncul dari pengobatan imunoterapi Oleh karena itu, sejumlah besar penelitian telah berfokus pada studi potensi penggunaan senyawa alami, yang memiliki sifat anti-inflamasi dan imunomodulator, untuk menjadi pilihan alternatif atau mendukung pengobatan kemoterapi/radiasi (Moody et al. 2020). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa fitokimia alami memiliki kemampuan atau potensi sebagai ICI dan bekerja secara *multi-target* sehingga bisa menjadi alternatif komplemen pengobatan terapi yang sudah ada.

Seiring berkembangnya penelitian senyawa alami sebagai *immune checkpoint inhibitor*, telah ditemukan senyawa-senyawa yang dapat membantu proses imunoterapi dan hingga kini masih terus diteliti hingga pengujian klinis. Pada Tabel 4., dapat dilihat nama-nama senyawa fitokimia bioaktif yang telah terbukti, melalui uji secara *in vivo* dan *in vitro*, mempengaruhi kerja imun tubuh dalam melawan sel kanker secara *multi-targeted*. Ada senyawa *andrographolide*, antosianin, *asiaticoside*, *curcumin*, *epigallocatechin gallate*, *gingerol*, *kaempferol*, *gallic acid*, *luteolin* dan *quercetin* yang masing-masing memiliki target sel yang berbeda dan dosis telah dikonversi untuk manusia berdasarkan metode perhitungan *Allometric Scaling* dengan rumus perhitungan *Human Equivalent Dose* (HED) dari dosis mencit (A. B. Nair and Jacob 2016):

$$\text{Human Equivalent Dose (HED)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Dosis yang dikonversi} \times \frac{\text{Mouse } K_m}{\text{Human } K_m}$$

Keterangan:

Mouse $K_m = 3.0$; *Human* $K_m = 37.0$

Allometric scaling adalah pendekatan empiris dimana pertukaran dosis obat didasarkan pada normalisasi dosis terhadap luas permukaan tubuh. Pendekatan ini mengasumsikan bahwa ada beberapa karakteristik unik pada proses anatomi, fisiologis, dan biokimia di antara spesies, dan kemungkinan perbedaan dalam farmakokinetik/waktu fisiologis diperhitungkan dengan *allometric scaling*. Metode ini sering digunakan dalam penelitian untuk tujuan eksperimental untuk memprediksi perkiraan dosis berdasarkan data yang ada pada spesies lain (A. B. Nair and Jacob 2016).

Andrographolide adalah senyawa *bicyclic diterpenoid lactone* alami yang terkandung di dalam *Andrographis paniculata* dan telah digunakan sejak lama sebagai pengobatan herbal karena *andrographolide* mampu mengurangi pembentukan *nitric oxide* (NO) oleh makrofag sehingga dapat berperan sebagai anti-inflamasi. *Andrographolide* juga mampu menyebabkan penghentian siklus sel pada fase G0/G1 serta merangsang aktivasi dan proliferasi limfosit untuk menjalankan fungsi anti-kanker. Proses ini dapat menurunkan pertumbuhan sel tumor dan meningkatkan imunotoksitas (NCBI 2022b).

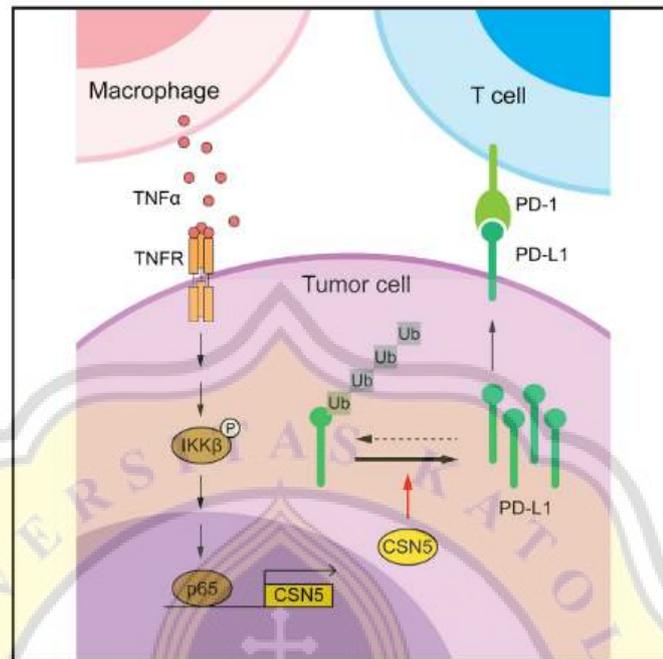
Berdasarkan penelitian yang dilakukan, telah ditemukan bukti bahwa senyawa *andrographolide* mampu menurunkan ekspresi antibodi PD-1, PD-L1, meningkatkan aktivitas anti-PD-1 karena senyawa ini dapat mendorong fungsi sel T CD4⁺ dan CD8⁺ sehingga ketika penggunaannya dikombinasikan dengan antibodi anti-PD-1 dapat menghambat pertumbuhan tumor dan menekan aktivitas dari *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) yang menyebabkan peningkatan efek antimetastatik dan sel tumor tidak dapat berkembang (W. Liu et al. 2020; Khan et al. 2018; Yu et al. 2018). Berdasarkan data dari *clinicaltrials.gov* (ID: NCT04196075), pada senyawa *andrographolide* ini telah dilakukan studi secara uji klinis fase ketiga terkait peran *andrographolide* pada kanker esofagus tetapi belum ada publikasi resmi mengenai penelitian ini. Saat ini belum ada publikasi penelitian hingga tahap uji klinis/*human study* untuk penggunaan senyawa *andrographolide* sebagai pengobatan kanker imunoterapi.

Antosianin adalah senyawa fenolik yang dapat ditemukan dalam tanaman dalam bentuk pigmen dan dapat ditemukan secara alami terutama di bagian bunga, buah dan umbi. Antosianin adalah pigmen alami yang berwarna biru dalam kondisi basa, tetapi dalam kondisi yang asam senyawa antosianin akan berwarna merah. Antosianin telah diteliti memiliki kemampuan sebagai anti-diabetes, anti-inflamasi, antikanker, antimikroba, dan anti-obesitas serta dapat mencegah penyakit kardiovaskuler (Khoo et al. 2017). Antosianin telah diteliti secara *in vivo* menggunakan model hewan uji untuk sel kanker usus dapat memodulasi mikrobiota usus yaitu *Clostridia*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lachnospiraceae* dan *Ruminococcaceae* (L. Wang et al. 2020; X. Liu et al. 2020). Mikrobiota usus memiliki peran yang penting bagi respon terapi *immune checkpoint inhibitor* (ICI) karena antosianin dapat meningkatkan jumlah mikrobiota usus yang memproduksi *short-chain fatty acids* (SCFA) dan butirrat. Butirrat yang dihasilkan mampu meningkatkan fungsi perlindungan mukosa pada usus dan menjadi antikarsinogen serta anti-inflamasi. Sedangkan, SCFA yang diproduksi oleh *Lachnospiraceae* dan *Ruminococcaceae* berperan penting dalam meningkatkan efisiensi antibodi monoklonal PD-L1 (X. Liu et al. 2020). Antosianin dapat mendukung terapi pengobatan *immune cheokpoint inhibitor* (ICI) dengan mendorong aktivitas antibodi anti-PD-L1 dan mengkondisikan mikrobiota usus.

Asiaticoside adalah salah satu senyawa aktif utama yang dapat diekstrak dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dan terkenal akan manfaatnya di bidang pengobatan, terlebih lagi asiaticoside telah diuji secara klinis memiliki kemampuan anti-inflamasi, anti-alergen, hipertensi pulmonari, osteoclastogenesis dan *immunoregulation* (Duggina et al. 2015; L. He et al. 2019; J. Z. Jiang et al. 2017; X. Wang et al. 2018; Ma et al. 2020). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ma *et al.*, *asiaticoside* mampu menghambat aktivitas jalur persinyalan PI3K/Akt dan MAPK/ERK dengan menurunkan ekspresi PD-1 dan PD-L1 sehingga pertumbuhan sel kanker dapat terhambat (Ma et al. 2020). PI3K/Akt dan MAPK/ERK memiliki peran yang penting dalam pertumbuhan sel kanker. Jalur

persinyalan *Phosphoinositide-3-kinase* /Akt (PI3K/Akt) adalah jalur utama persinyalan pada berbagai ragam sel kanker yang berperan penting dalam TME karena berfungsi dalam angiogenesis dan perekrutan faktor inflamasi sehingga jalur persinyalan ini berperan utama dalam mendorong pertumbuhan sel kanker (Y. He et al. 2021). Sedangkan, jalur persinyalan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*Extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK) adalah jalur persinyalan transmisi yang berperan penting dalam mengatur proses secara fisiologis di dalam sel, seperti pertumbuhan, perkembangan, pembagian dan kematian sel (Sun et al. 2015; Guo et al. 2020).

Curcumin adalah polifenol alami yang dapat ditemukan terkandung dalam rimpang *Curcuma longa* atau *Curcuma* spp. (Hewlings and Kalman 2017). Curcumin memiliki sifat sebagai antioksidan dan anti-inflamasi yang telah banyak dibuktikan melalui penelitian. Curcumin mampu menurunkan ekspresi PD-L1 dan bila dikombinasikan dengan anti-PD-L1, curcumin dapat menjadi komplemen bagi anti-PD-L1. Pada penelitian yang dilakukan dalam model kanker kolon pada tikus, curcumin yang dikombinasikan dengan anti-PD-L1 dapat meningkatkan aktivitas stimulasi CD8⁺ sel T dengan menghambat jalur persinyalan NF- κ B dan STAT3 (Hayakawa, Yaguchi, and Kawakami 2020).



Gambar 8. Proses *deubiquitination* dan stabilisasi PD-L1 oleh CSN5
Sumber: (Lim et al. 2016)

NF- κ B mengontrol ekspresi gen berkaitan dengan proliferasi, invasi, angiogenesis, dan metastasis kanker. Sedangkan, STAT3 berperan dalam mempertahankan *procarcinogenic inflammatory microenvironment* yang mendukung pertumbuhan sel kanker (Fan, Mao, and Yang 2013). Selain itu, telah dilakukan pula penelitian pada model kanker payudara dengan model tikus oleh Lim *et al.*, dan menunjukkan bahwa *curcumin* mampu mengurangi aktivitas CSN5 untuk melemahkan stabilisasi PD-L1 yang dimediasi oleh TNF- α dan meningkatkan kekebalan anti-tumor (Lim et al. 2016). COP9 *signalosome complex subunit 5* (CSN5) adalah *deubiquitinase* yang memodulasi ubiquitinasi PD-L1. Dilaporkan bahwa TNF- α dapat mempromosikan transkripsi CSN5 melalui aktivasi jalur pensinyalan NF- κ B. CSN5 kemudian mengikat dan men-*deubiquitinasi* PD-L1, sehingga meningkatkan ekspresi PD-L1 seperti yang dapat dilihat pada Gambar 8. Hal ini menunjukkan bahwa *curcumin* memiliki potensi sebagai pendukung atau komplementer terapi ICI.

Epigallocatechin gallate (EGCG) merupakan senyawa polifenol yang diisolasi dari teh dan sudah dikenal akan sifat antioksidannya yang tinggi. EGCG dapat menargetkan beberapa jalur persinyalan seperti NF- κ B, Akt, IFN- α , EGFR, COX-2, HER-2, m-TOR, dll. (H. H. Nair, Alex, and Anto 2021). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rawangkan *et al.*, teh hijau dan EGCG menekan ekspresi PD-L1 pada sel NSCLC yang diinduksi oleh IFN- γ and EGF. EGCG bekerja dengan menghambat jalur persinyalan JAK2/STAT1 untuk mengurangi ekspresi PD-L1 yang diinduksi IFN- γ . Sedangkan, untuk menurunkan ekspresi dari PD-L1, EGCG bekerja dengan menghambat jalur persinyalan EGFR/Akt. Selain itu, EGCG juga mampu mengembalikan ekspresi IL-2 mRNA dalam T cell co-cultured melanoma cell yang mengalami penurunan dan ada indikasi peningkatan jumlah sel T, yang menunjukkan bahwa adanya pemulihan aktivitas sel T dengan dihambatnya PD-L1 oleh senyawa EGCG (Rawangkan et al. 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Rawangkan *et al.*, menunjukkan bahwa EGCG memiliki potensi yang kuat untuk menjadi *inhibitor* bagi PD-L1 dan memiliki ICI *therapeutic effect*.

Gallic acid atau asam galat (GA) adalah asam fenolik yang dapat diperoleh dari tumbuhan, buah, dan teh. Asam galat memiliki kemampuan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker serta telah menunjukkan efek sebagai imunomodulator pada sel kanker. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kang *et al.*, GA dapat menekan pengikatan EGF pada EGFR yang menyebabkan terjadinya penghambatan pada jalur persinyalan PI3K/Akt sehingga ekspresi PD-L1 dapat menurun dan hal ini dapat memperlambat pertumbuhan sel kanker (Kang et al. 2020).

Gingerol adalah senyawa fenolik yang dapat ditemukan di dalam jahe-jahean dan berpotensi memiliki fungsi antioksidan, antitumor, antipiretik, cardi tonic, antikanker, anti-angiogenik, *gastro protective* dan anti-inflamasi (Kumara *et al.*, 2017; Zivarpour *et al.*, 2021). Gingerol yang diuji secara pada model kanker serviks tikus, menunjukkan bahwa gingerol menghambat pertumbuhan dari sel kanker serviks serta dapat membantu mengontrol mengendalikan pertumbuhan sel kanker

dengan reaktivasi p53 melalui penghambatan proteasome sehingga terjadi peningkatan stress oksidatif (Rastogi et al. 2015). Selain itu, penelitian yang dilakukan secara *in vitro* oleh Sp et al., gingerol menginduksi PTEN dan ekspresi p53 sehingga dapat mengurangi ekspresi PD-L1 (Sp et al. 2021).

Kaempferol adalah tetrahydroxyflavone yang berperan sebagai antioksidan dengan cara menurunkan stress oksidatif. Saat ini kaempferol masih terus diteliti sebagai alternatif pengobatan kanker karena dapat memblokir interaksi antara PD-1/PD-L1 melalui aktivitas NFAT *transcriptional* (Kim et al. 2020). Penelitian terbaru dari Qiang et al., menunjukkan kemampuan kaempferol dapat menghambat proliferasi, apoptosis, penghentian siklus sel sehingga pertumbuhan sel melanoma pada tikus xenograft dapat terhambat (Qiang et al. 2021). Kaempferol berpotensi untuk menjadi alternatif komplementer pengobatan imunoterapi ICI.

Luteolin adalah senyawa flavonoid yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan, anti inflamasi, penginduksi apoptosis, dan kemopreventif. Luteolin mampu menghambat terjadinya proliferasi pada sel tumor dengan mengikat radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan akibat meningkatnya spesies oksigen reaktif (ROS) (NCBI 2022a). Penelitian secara *in vivo* yang telah dilakukan oleh Jiang et al., menunjukkan bahwa luteolin mampu menghambat upregulasi PD-L1 yang bergantung pada IFN- γ sehingga ekspresi dari PD-L1 mengalami penurunan dan pertumbuhan dari sel kanker dapat dikurangi (Jiang et al., 2021).

Quercetin adalah senyawa flavonoid polifenolik yang memiliki potensi aktivitas kemopreventif. Quercetin juga memproduksi anti-inflamasi dan anti alergen yang diproduksi melalui penghambatan pada jalur *lipxygenase* dan *cyclooxygenase*. Aktivitas antikanker dari quercetin bekerja dengan memodulasi jalur persinyalan termasuk PI3K/Akt/mTOR dan MAPK/ERK1/2 sehingga dapat mendorong terjadinya apoptosis dan autofag sel (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019). Penelitian secara *in vitro* yang dilakukan terhadap sel kanker payudara oleh Qiu et al., menunjukkan bahwa quercetin menghambat proliferasi sel dan mengatur fungsi

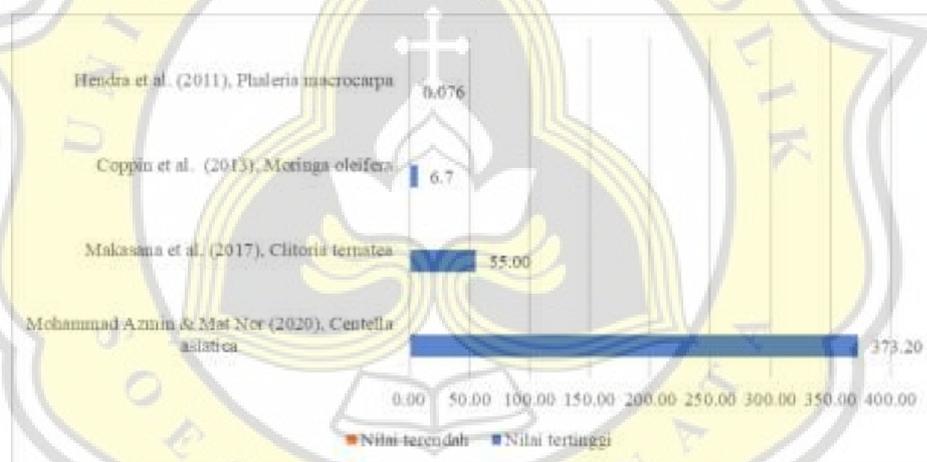
sel T, membunuh sel kanker dan mengatur ekspresi IFN γ -R, p-JAK2, p-STAT1 dan menurunkan ekspresi PD-L1 di jalur sinyal JAK/STAT1 (Qiu et al. 2021).

5.3. Ekstraksi Senyawa Fitokimia Bioaktif pada Tanaman Herbal dan Rempah Indonesia

Senyawa fitokimia bioaktif yang telah menunjukkan potensinya sebagai *immune checkpoint inhibitor* pada Tabel 4. dapat ditemukan di beberapa tanaman herbal dan rempah lokal Indonesia. Pada Tabel 5., dapat dilihat bahwa untuk mengekstraksi senyawa dalam tanaman herbal dan rempah dapat dilakukan dengan cara maserasi pada sampel berbasis kering atau sampel berbasis basah. Ada sebelas tanaman herbal dan rempah lokal Indonesia yang akan diulas pada penelitian review systematic ini, yaitu sambiloto, teh, pegagan, bunga telang, kunyit (*Curcuma domestica* dan *Curcuma longa*), temulawak, kunyit putih, daun kelor, buah mahkota dewa, dan jahe merah.

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah tanaman obat yang telah dinyatakan aman untuk digunakan sebagai bahan obat fitofarmaka di Indonesia sehingga tanaman sambiloto banyak dikembangkan (Royani, Hardianto, and Wahyuni 2014). Ekstrak tanaman ini mengandung senyawa diterpenoid, flavonoid, dan stigmasterols yang tinggi. Senyawa *andrographolide* dapat ditemukan pada tanaman *Andrographis paniculata* dan untuk memperoleh senyawa ini, proses ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan metode maserasi pada kondisi sampel berbasis kering. Senyawa *andrographolide* ini memiliki sifat semi polar sehingga dalam proses ekstraksi, pelarut yang digunakan tidak bisa yang bersifat terlalu polar maupun terlalu non polar agar pelarut dapat menembus dinding sel daun dengan baik sehingga proses ekstraksi senyawa *andrographolide* dari dalam sel dengan pelarut semi polar lebih di rekomendasikan (Rais 2014). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, senyawa *andrographolide* merupakan senyawa yang sensitif sehingga untuk mendeteksi dan menganalisis secara efektif dan konsisten dengan menggunakan metode HPLC karena senyawa fitokimia bioaktif yang sensitif (Pholphana et al. 2004; Royani, Hardianto, and Wahyuni 2014).

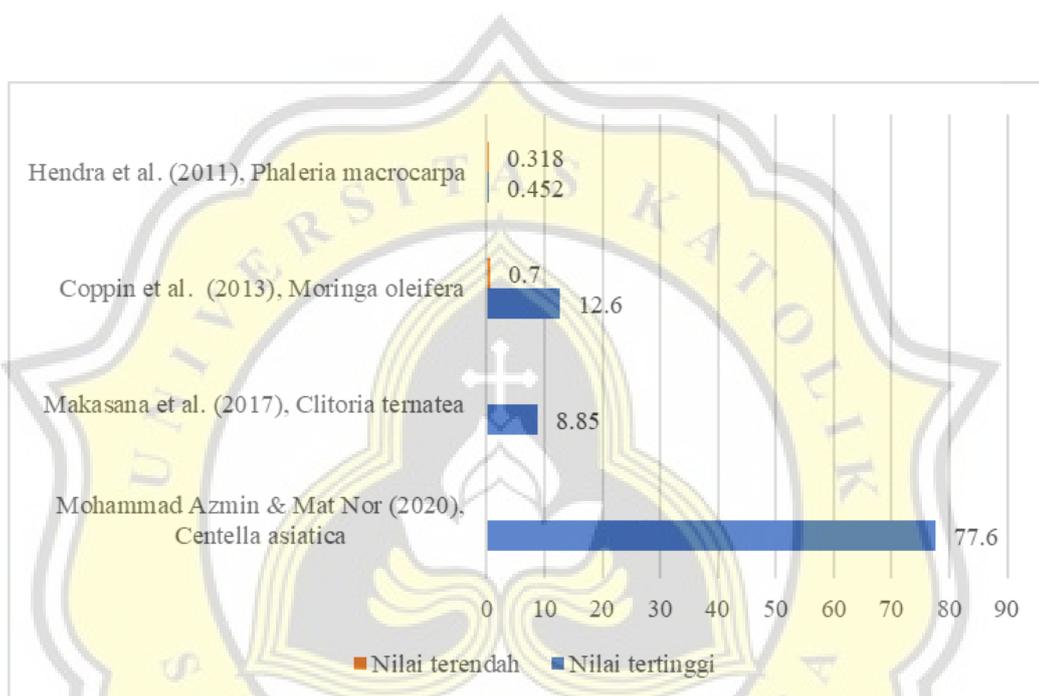
Centella asiatica atau dikenal sebagai pegagan adalah tanaman herbal yang terkenal memiliki manfaat bagi kesehatan tubuh dan pegagan (*Centella asiatica*) dapat dicerna oleh tubuh serta toksisitasnya rendah (Sutardi 2017). Dapat dilihat pada Gambar 9. dan Gambar 10. bahwa kandungan *kaempferol* dan *quercetin* paling banyak dapat ditemukan pada tanaman pegagan (*Centella asiatica*) jika dibandingkan dengan ketiga tanaman herbal lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pegagan mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti *asiaticoside*, *kaempferol*, *luteolin*, *asam galat*, dan *quercetin* sehingga pegagan (*Centella asiatica*) dapat menjadi tanaman herbal yang berfungsi untuk penyembuhan secara *multi-targeted* karena semua kandungan bioaktif dalam pegagan memiliki sifat antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh manusia dalam meningkatkan sistem imun tubuh.



Gambar 9. Perbandingan jumlah kandungan senyawa *kaempferol* pada berbagai tanaman herbal

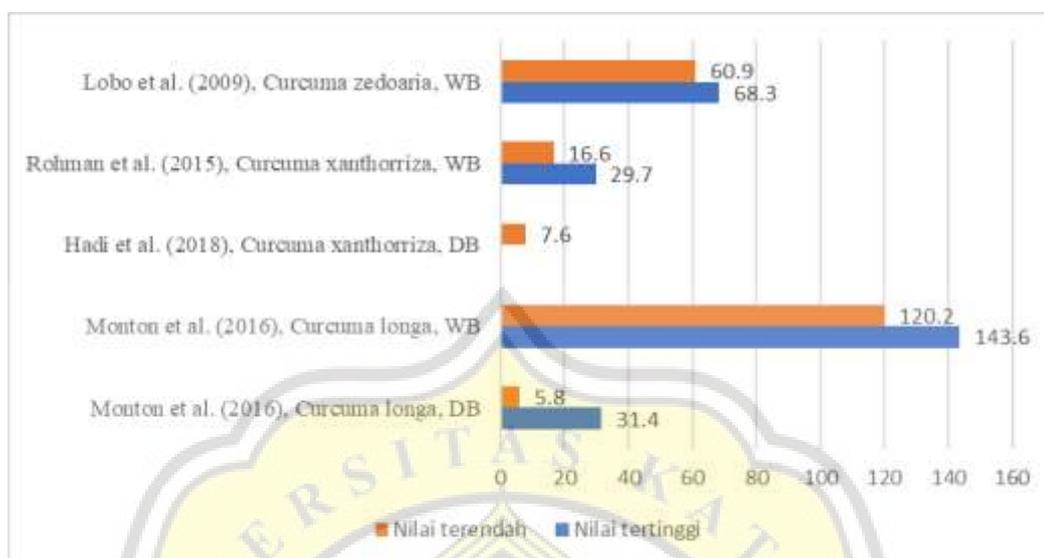
Senyawa *quercetin* dan *kaempferol* dapat ditemukan pada tanaman kelor (*Moringa oleifera*), bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan buah makhota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Berdasarkan Gambar 9. dan Gambar 10., dapat dilihat bahwa berdasarkan penelitian kuantitatif terhadap *quercetin* dan *kaempferol* yang telah dilakukan, ditemukan bahwa bunga telang (*Clitoria ternatea*) mengandung kedua senyawa ini dalam jumlah yang cukup banyak jika dibandingkan dengan kelor dan buah makhota dewa. Ekstraksi yang dilakukan pada bunga telang (*Clitoria ternatea*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi pada sampel kondisi

kering. Meskipun pada buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan kelor (*Moringa oleifera*) tidak banyak kandungan *quercetin* dan *kaempferol* yang dapat diekstraksi, namun keberadaan senyawa ini menunjukkan bahwa tanaman pegagan (*Centella asiatica*), kelor (*Moringa oleifera*), telang (*Clitoria ternatea*), dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat berfungsi untuk penyembuhan secara *multi-targeted*.



Gambar 10. Perbandingan jumlah kandungan senyawa *quercetin* pada berbagai tanaman herbal

Salah satu komponen utama dalam rimpang *Curcuma longa* dan *Curcuma spp.* adalah curcumin. Senyawa curcumin ini adalah kristal yang berwarna kuning-oranye mencolok, dan senyawa curcumin seringkali digunakan sebagai bahan tambahan makanan dan pewarna makanan. WHO telah menetapkan kisaran 0-3 mg/kg sebagai asupan harian curcumin sebagai bahan pangan yang direkomendasikan. Curcumin memiliki sifat polaritas yang tidak dapat larut dalam air pada pH netral dan asam, tetapi curcumin dapat larut pada pelarut organik polar, nonpolar atau dalam pelarut asam kuat, seperti *glacial acetic acid* (Lestari and Indrayanto 2014).



Gambar 11. Perbandingan kandungan *curcumin* pada *Curcuma* spp.

Dapat dilihat pada Gambar 11., senyawa curcumin dapat ditemukan pada tanaman *Curcuma domestica* Val., *Curcuma longa* L., *Curcuma zedoaria*, dan *Curcuma xanthorriza*. Perbandingan jumlah senyawa curcumin yang diperoleh dari hasil analisis berbasis HPLC (mg/g) dapat dilihat pada Gambar 9. Senyawa curcumin terbanyak dapat ditemukan pada *Curcuma longa* yang diekstraksi dengan metode maserasi pada sampel kondisi berbasis basah dan di analisis dengan menggunakan HPLC (Monton et al. 2016). Kelebihan analisis senyawa curcumin dengan menggunakan metode analisis HPLC pendekatannya lebih mudah, cepat, tepat, sensitif dan spesifik. Meskipun curcumin tahan terhadap oksidasi dan panas, curcumin rentan terhadap asam alkali serta sinar UV (Laxmi et al. 2015).

Metode analisis yang digunakan untuk proses ekstraksi senyawa bioaktif dengan menggunakan perbandingan berbasis HPLC dapat menunjukkan adanya jenis senyawa fitokimia yang berbeda dalam suatu ekstrak herbal (Laxmi et al. 2015). Selain menggunakan metode analisis HPLC, untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman herbal dan rempah, dapat digunakan metode *Reversed-Phase Chromatography* (RPC), *Fourier-transform*

infrared spectroscopy (FTIR), dan pH-Differential - Lambert Beer. Penggunaan jenis analisis dapat disesuaikan dengan jenis senyawa yang ingin di ekstraksi agar proses ekstraksi dapat dilakukan dengan lebih efektif dan optimal karena senyawa bioaktif memiliki sensitivitas dan karakteristik yang berbeda.

5.4. Penerapan Tanaman Herbal dan Rempah sebagai Imunoterapi Kanker

Penerapan tanaman herbal dan rempah untuk pengobatan dapat diimplementasikan dalam bentuk obat tradisional, obat modern, suplemen makanan, dan pengolahan tanaman herbal dan rempah untuk dijadikan pangan fungsional merupakan salah satu cara untuk mengambil manfaat dari berbagai macam senyawa fitokimia bioaktif yang terkandung di dalamnya. Namun, selama proses pengolahannya perlu diperhatikan beberapa faktor yang dapat berpengaruh penting agar senyawa fitokimia bioaktif yang terkandung di dalam tanaman herbal dan rempah tidak rusak selama proses pengolahan. Sebagai contoh pengolahan, misal tanaman herbal sambiloto terkenal memiliki aroma dan rasa pahit yang khas, rasa pahit ini berasal dari senyawa *andrographolide* yang merupakan komponen fitokimia bioaktif utama (Antika and Sasongkowati 2015), sehingga rasa pahit ini tidak dapat dihindari untuk sambiloto umumnya dikonsumsi dalam bentuk serbuk yang di kapsulasi atau *herbal tea*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, selama pengolahan sambiloto menjadi teh herbal, suhu yang diberikan ketika daun sambiloto dikeringkan dapat mempengaruhi kadar air, abu, aktivitas antioksidan dan kadar ekstrak sehingga disarankan ketika membuat herbal drink sambiloto, pengeringan daun sebaiknya dilakukan pada suhu 60°C (Patin, Zaini, and Sulastri 2018). Selain sambiloto, pengolahan daun teh, kelor, pegagan, bunga telang, dll. untuk dikonsumsi dalam bentuk herbal drink juga sebaiknya tidak menggunakan suhu pengeringan yang terlalu tinggi agar kandungan fitokimia di dalamnya tidak mengalami kerusakan.

Pengolahan tanaman herbal dan rempah menjadi pangan fungsional selain dijadikan serbuk yang dikapsulasi dan herbal drink, juga dapat dilakukan dengan menjadikan tambahan bahan pada masakan. Namun, ketika menentukan jenis proses

pengolahan terbaik, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara spesifik karena karakteristik, sifat senyawa, dan sensitivitas untuk masing-masing senyawa fitokimia bioaktif yang terkandung di dalam tanaman herbal dan rempah terhadap berbagai faktor proses pengolahan, seperti panas suhu pengolahan, berbeda-beda dan perlu disesuaikan agar manfaatnya dapat diperoleh dengan optimal untuk mendukung proses imunoterapi kanker.

