

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan di sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta saraf tulang belakang (Mangan, 2003).

Berdasarkan daftar badan kesehatan dunia (WHO) penyakit kanker masih dalam urutan teratas dari kelompok penyakit yang paling mematikan di dunia, setiap tahun jumlah penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang. Dalam 10 tahun mendatang diperkirakan 9 juta orang akan meninggal setiap tahun akibat kanker. Dua pertiga dari penderita kanker di dunia akan berada di negara-negara yang sedang berkembang (Anonim, 2006). Di dunia penyakit ini menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian, sedangkan di Indonesia menempati urutan keenam (Dalimartha, 2004). Insidensi kanker di Indonesia diperkirakan 100 orang per 10.000 penduduk setiap tahun (Anonim, 2006). Di Indonesia, sekitar 80 % penderita penyakit kanker ditemukan pada stadium lanjut sehingga pengobatan menjadi lebih sulit, mahal dan hasil pengobatan tidak memuaskan, bahkan cenderung mempercepat kematian (Dalimartha, 2004).

Beberapa usaha pengobatan kanker telah dilakukan dengan cara seperti pembedahan, radiasi dan pemberian obat antikanker (Sukardja, 2000). Namun

usaha-usaha ini belum memperoleh hasil yang memuaskan (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995). Kegagalan ini antara lain karena rendahnya selektifitas obat antikanker yang digunakan ataupun patogenesis kanker yang belum jelas benar (Tjay dan Rahardja, 1978).

Terapi pengobatan kanker yang utama seperti pembedahan dan radiasi hanya dilakukan pada kanker lokal stadium awal. Pengobatan ini gagal digunakan untuk kanker yang telah berkembang pada stadium lanjut dan sudah mengalami metastatis (Sukardja, 2000). Karena itulah pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif pada penyakit ini sangat penting (Handayani *et al.*, 2001).

Penelitian ilmiah yang berhasil mengungkapkan khasiat, manfaat pengobatan, dan terapi kanker mendorong munculnya paradigma baru dalam dunia pengobatan modern, yaitu *back to nature* atau kembali ke alam (Mangan, 2003). Keanekaragaman hayati Indonesia sangat berpotensi dalam penentuan senyawa baru yang berkhasiat sebagai antikanker, salah satunya adalah tanaman Ceplukan (*Physalis angulata* L.). Ekstrak ceplukan mempunyai aktivitas yang kuat secara *in vivo* dan *in vitro* melawan beberapa tipe sel kanker pada manusia dan hewan. *Physalis angulata* L. mengandung flavonoid dan alkaloid (Anonim<sup>a</sup>, 2002). Alkaloid diduga bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker (Evans, 2002). *Physalis angulata* L. juga mengandung saponin yang dapat berkhasiat sebagai antitumor dan menghambat pertumbuhan kanker (Mangan, 2003). Berdasar uji praklinis, ternyata kandungan physalin F pada tanaman ceplukan mempunyai efek antitumor (Anonim, 2003).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa tanaman Ceplukan (genus *Physalis*) memiliki efek sitotoksik terhadap beberapa sel line kanker manusia yaitu: HA22T (hepatoma), Hela (kanker serviks), KB (nasopharing) dan beberapa sel leukemia manusia antara lain HL-60 (leukemia promielositik akut) dan sel B (leukemia limfoid B akut). Pada binatang, tanaman tersebut menghambat pertumbuhan sel H1477 (melanoma) dan 8401 (glioma). Efek tersebut diperoleh dari ekstrak etanol tanaman utuh (*whole plant*) *Physalis angulata* L. (Chiang *et al.*, 1992).

Sel Myeloma dipilih sebagai objek uji karena berdasarkan beberapa penelitian yang sudah ada, hingga saat ini belum pernah dilakukan uji sitotoksik dan kinetika proliferasi tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap sel Myeloma, selain itu Myeloma dapat menyebabkan penyakit *Multiple Myeloma* dan kanker sumsum tulang, dimana sistem pengobatannya masih tergolong mahal dan kurang memuaskan. Penelitian Sutrisna (2006) menunjukkan bahwa ekstrak etanol Ceplukan (*Physalis angulata* L.) mempunyai efek sitotoksik dengan  $IC_{50}$  sebesar 36,674  $\mu\text{g/ml}$  terhadap sel kanker payudara MCF-7. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk menguji efek sitotoksik dan kinetika proliferasi dari ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap sel Myeloma.

## B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini diarahkan untuk menjawab permasalahan sebagai berikut :

- a. apakah ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel Myeloma dan berapa  $IC_{50}$ -nya?
- b. apakah ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) mampu memperpanjang kinetika proliferasi sel Myeloma?

## C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik dan kinetika proliferasi ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap sel Myeloma.

## D. Tinjauan Pustaka

### 1. Tanaman Ceplukan

#### a. Sistematika tanaman

Divisio : Spermatophyta

Sub divisio : Angiospermae

Classis : Dicotyledoneae

Sub classis : Sympetalae

Famili : Tubiflorae (solannaces, personatae)

Ordo : Solanaceae

Genus : *Physalis*

Spesies : *Physalis angulata* L. (Tjitrosoepomo, 1994)

b. Nama Lain

Daun boba (Ambon): leletoken (Minahasa): Damameme (Ternate): Cecendet, Cecendetan, Cecendet kunir, Cecenet, Cecenetan, Cicindet, Cicinet, Creandit (Sunda): Yoryoran, Yuryuran (Madura): Angket, Keceplokan, Ciciplukan (Bali): Ceplukan (Melayu): Ceplukan sapi, Ceplokan, Ciplukan, Ceplukan cesia, Ciciplukan (Jawa) (Pitojo, 2002).

c. Morfologi Tanaman

Herba 1 tahun, tegak, tinggi 0,1-1 m, bagian yang hijau berambut pendek atau boleh dikatakan gundul. Batang berusuk bersegi tajam, berongga. Helai daun bulat telur memanjang bentuk lanset, dengan ujung runcing, bertepi rata atau tidak, 5-15 kali 2,5-10,5 cm. Tangkai bunga tegak dengan ujung yang mengangguk, langsing. Lembayung 8-23 mm, kemudian tumbuh sampai 3 cm. Kelopak bercelah 5, berbagi kurang dari separo, dengan taju-taju bersudut 3, runcing, hijau, dengan rusuk yang lembayung. Mahkota bentuk lonceng lebar, tinggi 7-9 mm, kuning muda dengan pangkal hijau, tepian berlekuk 5 tidak dalam, dalam leher dengan nodanoda coklat atau kuning coklat, di bawah tiap noda terdapat kelompokan rambut-rambut pendek, rapat yang berbentuk V. Tangkai sari kuning pucat, kepala sari seluruhnya biru muda, putik gundul, kepala sari bentuk Bonggol, kelopak buah yang dewasa menggantung bentuk bulat telur, panjang 2-4 cm, kuning hijau, berurat lembayung. Buah buni bulat memanjang, pada waktu masak kuning, panjang 14-18 mm, dapat di makan (Steenis, 1997).

d. Habitat dan penyebaran

Tanaman ceplukan ini tumbuh di tepi hutan, tegalan kering, tepi jalan, sawah, kebun dan cocok hidup di tanah yang subur, gembur, tidak tergenang air, dapat hidup di dataran rendah hingga dataran dengan ketinggian sekitar 1500 m dari permukaan laut, dengan variasi suhu udara berkisar antara 18<sup>0</sup>C-35<sup>0</sup>C, tetapi tanaman ini juga mampu hidup pada tanah yang agak padat dan kurang terawat, bersama tanaman liar yang lain. Tanaman ceplukan mudah dan banyak ditemukan pada musim hujan, oleh karena itu, tanaman ceplukan cocok dibudidayakan di daerah yang agak basah dan di tempat yang terbuka (Pitojo, 2002).

e. Kandungan kimia

Buah ceplukan mengandung vitamin C, akar dan batang tanaman ceplukan mengandung saponin dan flavonoid. Daun ceplukan mengandung senyawa polifenol dan asam klorogenat. Kulit buah mengandung senyawa C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O-H<sub>2</sub>O. Adapun cairan buah ceplukan mengandung zat gula, dan biji ceplukan mengandung elaidie acid (Pitojo, 2002). Selain itu pada akar dan daun ceplukan juga mengandung asam sitrat, fisalin sterol atau terpen dan alkaloid (Anonim<sup>b</sup>, 1995).

f. Manfaat Tanaman

Buah celpukan yang mengandung vitamin C dapat membantu mengobati penyakit gusi berdarah, yaitu dengan cara memakan segar sekitar 80 g (30 butir) buah ceplukan matang tiap harinya (Pitojo, 2002). Daun ceplukan ditambah pulosari, garam dan daun sirih, digosok dengan

minyak sebagai salep, untuk obat tulang patah (Sastroamidjoyo, 2001). Remasan daun ceplukan yang dioleskan pada bisul, akan membantu agar bisul cepat pecah dan mengering. Akar ceplukan dapat digunakan sebagai obat cacing yang berada didalam rongga perut. Seduhan akar tanaman ceplukan dapat digunakan sebagai obat sakit demam (Pitojo, 2002).

Setelah diuji praklinis, ternyata kandungan physalis F pada tanaman ceplukan mempunyai efek antitumor, menghilangkan rasa sakit, peluruh air seni, menetralkan racun, meredakan batuk, serta mengaktifkan fungsi kelenjar-kelenjar tubuh (Anonim, 2003). Saponin yang terkandung pada ceplukan berkhasiat sebagai antitumor dan menghambat pertumbuhan kanker, terutama kanker usus besar. Sementara itu, flavonoid dan polifenol sebagai antioksidan (Mangan, 2003).

## 2. Penelitian tanaman ceplukan kaitannya dengan kanker

Ceplukan (*Physalis angulata* L.) diketahui mempunyai efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach, dengan LC<sub>50</sub> ekstrak metanol fraksi larut wash benzin *Physalis angulata* L. sebesar 164,75 µg/ml (Dewi, 2004).

Ekstrak etanol ceplukan (*Physalis angulata* L.) mempunyai efek sitotoksik dengan IC<sub>50</sub> sebesar 36,674 µg/ml terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Sutrisna, 2006). Selain itu dari beberapa penelitian telah membuktikan bahwa tanaman ceplukan (genus *Physalis*) memiliki efek sitotoksik terhadap beberapa sel line kanker manusia yaitu: HA22T (hepatoma), Hela (kanker serviks), KB (nasopharing), Colo 205 (colon), Calu

(paru) dan beberapa sel leukemia manusia antara lain K562 (eritroleukemia), AMPI 840 (leukemia T-limfosit akut), HL-60 (leukemia promielositik akut) KG-1 (leukemia myeloid akut) (Chiang *et al.*, 1992).

### 3. Kanker

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan proliferasi yang tidak terkontrol dan mengarah pada invasi jaringan di sekitarnya serta menyebar ke bagian lain dalam tubuh. Aktivitas proliferasi yang tidak terkontrol akan membentuk jaringan abnormal yang disebut neoplasma (King, 2000).

Adapun sifat umum dari kanker adalah:

- a. Pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor
- b. Bersifat invasif, mampu tumbuh di jaringan sekitarnya (perbedaan pokok dengan jaringan normal)
- c. Bersifat metastatik, menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru
- d. Memiliki heriditas bawaan (*acquired heredity*) yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker
- e. Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

Jenis-jenis kanker yang dikenal banyak sekali dan hampir semua organ dapat dihinggapi penyakit ganas ini, termasuk limfe, darah, sumsum dan otak.



Bentuk-bentuk tumor dinamakan menurut jaringan tempat neoplasma berasal yaitu:

- 1) Adenoma, yakni benjolan maligna pada kelenjar, misalnya pada prostat dan mamma.
- 2) Limfoma, yakni kanker pada kelenjar limfe, misalnya penyakit Hodgkin (limfegranuloma) dan penyakit Burkitt yang berciri-ciri adanya benjolan-benjolan dari kelenjar limfe.
- 3) Sarkoma, yakni neoplasma ganas yang berasal dari pembuluh darah, jaringan ikat, otot atau tulang, misalnya Sindroma kaposi, suatu tumor pembuluh bawah kulit tungkai bawah dengan bercak-bercak merah.
- 4) Leukemia, yakni kanker darah yang berhubungan dengan produksi leukosit yang abnormal tinggi dan eritrosit sangat berkurang.
- 5) Myeloma, yakni kanker pada sumsum tulang, misalnya penyakit Kahler (*Multiple Myeloma*) dengan pertumbuhan liar sel-sel plasma di sumsum. Sel plasma termasuk leukosit dan pembentuk antibodi.
- 6) Melanoma, yakni neoplasma kulit yang luar biasa ganasnya, terdiri dari sel-sel pigmen yang dapat menyebar dengan pesat (Tjay dan Rahardja, 2002).

Penyebab kanker (Karsinogen) hingga kini dapat digolongkan menjadi beberapa faktor yaitu :

a. Senyawa kimia (Zat Karsinogen)

Misalnya ter atau jelaga berupa cairan atau gas sebagai hasil pembakaran zat biologi seperti kayu, di dalam ter banyak mengandung

karsinogen berupa benzena, toluen, fenol, cresol (Sukardja, 2000). Zat pewarna, zat pengawet, bahan tambahan pada makanan dan minuman, karbon tetraklorida, asbestos, merkuri, dan arsen (Dalimartha, 2002). Dalam asap rokok terdapat zat yang beracun dan karsinogen seperti karbon dioksida, karbon monoksida, vinil klorida dan nitrosamin. Pada biji kacang-kacangan yang ditumbuhi jamur *Aspergillus flavus* terdapat Aflatoksin yang merupakan karsinogen alami dan dapat menyebabkan kanker hati (Sukardja, 2003).

b. Faktor Fisika

Faktor fisika yang terutama adalah radiasi (Mulyadi, 1996) dan penyinaran (radiasi) yang berlebihan, terutama radiasi sinar matahari, sinar X (*röntgen*), elektromagnetik dan radiasi beracun nuklir (Mangan, 2003). Mekanisme terjadinya kanker dalam tubuh melalui faktor ini dianggap sebagai gejala molekular. Diduga bahwa gen-gen yang terdapat dalam asam deoksiribonukleat (DNA) dalam sel akan berubah, sehingga sel akan kehilangan daya aturnya.

Pengaruh radiasi pada molekul DNA dapat menimbulkan:

- 1). perubahan yang dapat kembali (reversibel)
- 2). molekul DNA berubah (rusak) dan sel akan mati
- 3). Terjadi perubahan pada molekul DNA yang tidak dapat kembali (irreversibel) dan mulai terjadinya kanker (Mulyadi, 1997).

c. Hormon

Hormon adalah zat yang dihasilkan kelenjar tubuh yang fungsinya adalah mengatur kegiatan alat-alat tubuh dan selaput tertentu, Pemberian hormon tertentu secara berlebihan dapat menyebabkan peningkatan terjadinya beberapa jenis kanker, seperti payudara, rahim, indung telur dan prostat (kelenjar kelamin pria) (Anonim<sup>a</sup>, 1995). Selain itu, kanker diduga dapat timbul karena ada gangguan keseimbangan hormonal. Hormon yang dapat menimbulkan kanker yaitu estrogen (menimbulkan kanker mamma dan endometrium), testosteron (menimbulkan kanker prostat) (Sukardja, 2000).

d. Virus

*Rous sarcoma virus* (RSV) dapat menyebabkan kanker pada ayam, leukemia pada burung dan mamalia. *Marks bisease virus* (MBV) menyebabkan limfoma pada ayam (Mulyadi, 1997).

Dari beberapa efek di atas diduga sekitar 70-90 % penderita kanker disebabkan oleh senyawa karsinogen. Dari studi penyebaran penyakit dan data laboratorium diperkirakan bahwa senyawa karsinogen yang terdapat dalam lingkungan dan makanan-minuman merupakan penyebab kanker yang terbesar (Mangan, 2003).

Karsinogenesis adalah suatu proses yang memberikan hasil suatu transformasi sel normal menjadi sel neoplastik yang disebabkan oleh perubahan genetik yang menetap atau mutasi (Underwood, 1999). Salah satu terbentuknya kanker karena adanya sel epitel yang terus berkembang

(berproliferasi). Saat berproliferasi, genetik sel bisa berubah akibat adanya pengaruh agen karsinogen yang menyebabkan hilangnya penekanan (supresi) terhadap proses proliferasi sel. Perubahan sel menjadi ganas juga melibatkan gena-gena yang mengatur pertumbuhan sel. Akibatnya, sel berkembang tidak terkendali. Perkembangan sel normal menjadi sel kanker melalui tiga tahap seperti berikut:

#### Tahap I (tahap inisiasi)

Pada tahap ini terjadi perubahan genetik yang menetap akibat rangsangan bahan atau agen inisiator yang menimbulkan proses inisiasi. Perubahan yang terjadi adalah irreversibel.

#### Tahap II (tahap promosi)

Dalam tahap ini terjadi perubahan ke arah pra-kanker akibat bahan-bahan promotor. Perubahan terjadi akibat pengaruh promotor yang berulang-ulang dan dalam jangka waktu yang lama. Tahap ini reversibel, artinya resiko timbulnya kanker akan hilang bila promotornya dihilangkan.

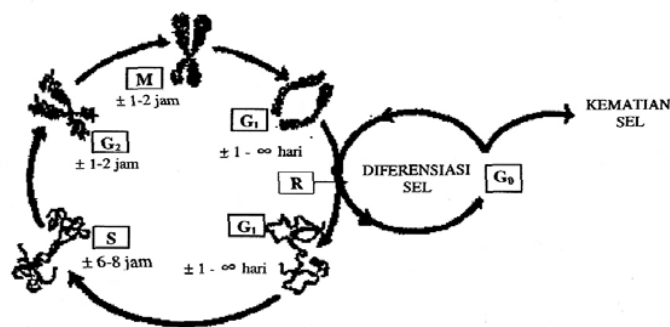
#### Tahap III (tahap progresif)

Telah terjadi pertumbuhan kanker, sudah meluas (invasif), dan menyebar ke tempat yang jauh (metastasis) (Dalimartha, 2004).

#### 4. Siklus Sel Kanker

Sel tumor dapat berada dalam 3 keadaan : (1) yang sedang membelah (siklus proliferasi); (2) yang dalam keadaan istirahat (tidak membelah,  $G_0$ ); dan (3) yang secara permanen tidak membelah. Sel tumor yang sedang

membelah terdapat dalam beberapa fase yaitu fase mitosis (M), pascamitosis ( $G_1$ ), fase sintesis DNA (fase S), fase pramitosis ( $G_2$ ) (Gambar 1). Pada akhir fase  $G_1$  terjadi peningkatan RNA disusul dengan fase S yang merupakan saat terjadinya replikasi DNA. Setelah fase S berakhir sel masuk dalam fase pramitosis ( $G_2$ ) dengan ciri : sel berbentuk tetraploid, mengandung DNA dua kali lebih banyak daripada sel fase lain dan masih berlangsungnya sintesis RNA dan protein. Sewaktu mitosis berlangsung (fase M) sintesis protein dan RNA berkurang secara tiba-tiba, dan terjadi pembelahan menjadi 2 sel. Setelah itu sel dapat memasuki interfase untuk kembali memasuki fase  $G_1$ , saat sel berproliferasi, atau memasuki fase istirahat ( $G_0$ ). Sel dalam fase  $G_0$  yang masih potensial untuk berproliferasi disebut sel klonogenik atau sel induk (*stem cell*) (Nafrialdi dan Ganiswara). Proliferasi yaitu suatu proses penggandaan sel, dari satu sel menjadi dua sel, empat sel dan seterusnya (Sukardja, 2000). Jadi yang menambah jumlah sel kanker ialah sel yang dalam siklus proliferasi dan dalam fase  $G_0$  (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).



**Gambar 1. Siklus sel, yang terdiri dari beberapa fase yaitu: Fase mitosis (M), Fase istirahat ( $G_0$ ), Fase pasca mitosis ( $G_1$ ), Fase sintesis DNA (S), Fase pra mitosis ( $G_2$ ) (Sukardja, 2000)**

## 5. Pengobatan Kanker

Secara umum, pengobatan kanker dilakukan dengan cara sebagai berikut, seperti pembedahan (operasi), penyinaran (radioterapi), peningkatan daya tahan tubuh (imunoterapi) (Mangan, 2003). Terapi hormon (dengan cara mengubah atau mengatur kadar hormon tertentu di dalam tubuh), terapi biologis (dengan cara menggunakan bahan-bahan alami yang mampu merangsang sistem kekebalan tubuh agar mampu melawan sel kanker) dan pemberian obat antineoplastik atau antikanker (kemoterapi) (Kardinan, 2003).

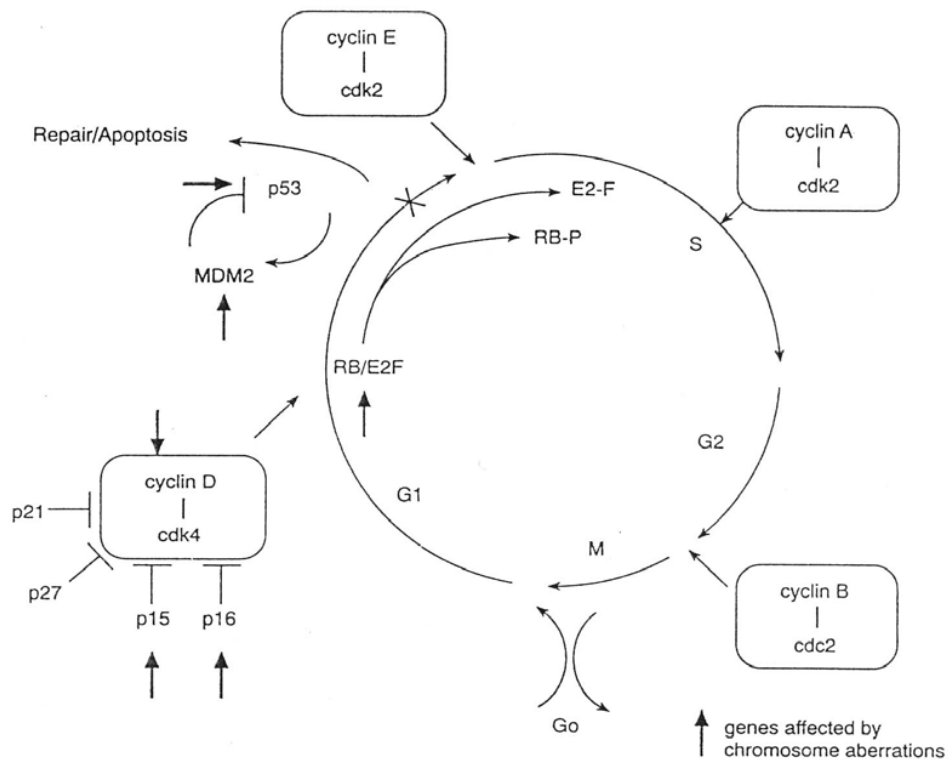
Ditinjau dari siklus sel (Gambar 1.), obat antikanker dapat digolongkan menjadi dua golongan. Pertama adalah obat yang memperlihatkan toksisitas selektif terhadap fase-fase tertentu dari siklus sel dan disebut zat *cell cycle spesific* (CSS), misalnya vinkristin, vinblastin, merkaptopurin, hidroksiurea, metotreksat dan asparaginase. Zat CSS ini terbukti efektif terhadap kanker yang berproliferasi tinggi misalnya kanker darah. Golongan kedua adalah zat *cell cycle nonspecific* (CCNS), misalnya zat alkilator, antibiotik antikanker (daktinomisin, daunorubisin, plikamisin, mitomisin), sisplatin, ptokarbazin dan nitrosourea. Perbedaan kerja tersebut lebih bersifat relatif dari pada absolut karena banyak zat yang tergolong CCNS lebih efektif terhadap sel yang berproliferasi dan terhadap sel-sel yang dalam fase-fase tertentu siklusnya (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

## 6. Regulasi *cell cycle*

Regulasi daur sel (*cell cycle*) menentukan proses pertumbuhan sel. Pada sel kanker terjadi regulasi abnormal dari *cell cycle* tersebut. Kanker muncul dari akumulasi perubahan genetik yang menyebabkan sel berkembang tanpa kontrol dan perubahan ini melibatkan empat sampai enam perubahan genetik (Hanahan and Weinberg, 2000). Pertumbuhan menunjukkan adanya perubahan ukuran sel dan merupakan hasil akhir dari proses-proses yang berpengaruh pada kehidupan sel tersebut seperti proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Sel yang mengalami diferensiasi tidak mengalami proliferasi atau potensi proliferasi sel tersebut berkurang. Sel kanker sering kali dikatakan sebagai sel yang berproliferasi lebih cepat dibanding dengan keadaan normal (King, 2000).

*Cell cycle progression* terdiri atas fase sintesis (S) dan fase mitosis (M) yang dipisahkan oleh fase gap 1 (G<sub>1</sub>) dan fase gap 2 (G<sub>2</sub>). Adanya sinyal ekstraselular akan menginduksi cyclin (CycD). Fosforilasi pRB oleh cdk4/6 terjadi melalui pembentukan kompleks CycD dengan cdk4/6. Fosforilasi pRB menyebabkan lepasnya E2F dari kompleks pRB dengan E2F. E2F merupakan faktor transkripsi CycE, CycA dan protein-protein lainnya yang terlibat dalam regulasi *cell cycle*. CycE dan CycA membentuk kompleks dengan cdk2 dan melanjutkan fosforilasi pRB. E2F yang dihasilkan menginduksi gena-gena esensial untuk proses sintesis dan mitosis. Proses tersebut dapat dihambat oleh protein p53, Cip/Kip (p21, p27), INK4 (p15, p16, p18, p19) yang merupakan penghambat cdk (CKI) (King, 2000).

Regulasi *Cell Cycle* progression yang diatur oleh famili protein INK4 yang merupakan penghambatan cdk4 dan cdk6. INK4 berikatan dengan cdk4/6 dan memacu terlepasnya cycD maka cdk4 menjadi inaktif. Hal ini mengakibatkan pRB tidak terfosforilasi sehingga E2F inaktif dan tidak terjadi *cell cycle*. Cip/Kip secara spesifik menginaktivasi cyclin E cdk2 sehingga menyebabkan terjadi *G<sub>1</sub> arrest*. Pada sel kanker regulasi tersebut berubah karena sel kanker memiliki kemampuan untuk menghentikan sinyal pertumbuhan sendiri ataupun hanya membutuhkan sedikit sinyal dari lingkungannya dan tidak memiliki respon terhadap stimulus negatif yang dapat menghentikan pertumbuhan sel (King, 2000).



**Gambar 2. Cell Cycle Progression (Teich, 1997)**



## 7. Sel Myeloma

Myeloma adalah kanker dari sel plasma dimana biasa ditemukan dalam sumsum tulang. Sel plasma merupakan bagian dari sistem imun dan pembentuk antibodi (Anonim, 2002).

Myeloma *cell line* pertama kali diambil pada tahun 1967 oleh R. Laskop dan M. D Seharff dari Merwin plasma sel tumor-11 (MPC-11) yang diisolasi dari mencit Balb/C yang diperoleh dari J. Fehey. Sel kanker ini diadaptasikan ke dalam kultur secara terus menerus sampai 6x dan dipelihara dalam flask yang berisi media Bulbecco's Eagle's dengan asam amino non esensial dan 20 % serum kuda, inaktif (*fetal brine serum*) (Anonim, 1983 *Cit* Prawoto, 2004).

Selama tahun 1960 dilakukan berbagai cara untuk menghasilkan sejumlah besar antibodi yang digunakan untuk studi struktur dan genotipe. Sumber utama antibodi yang ditemukan adalah sel Myeloma. Myeloma atau plasmasitona yaitu merupakan neoplasma dari sel penghasil antibodi, dimana setiap sel kanker menunjukkan proliferasi dari klon tunggal sel pembentuk antibodi (Anonim, 1983 *Cit* Prawoto, 2004). Medium pertumbuhan untuk sel Myeloma adalah RPMI 1640. Media ini mengandung garam-garam yang diperlukan, asam amino dan vitamin untuk pertumbuhan sel. Beberapa media RPMI mengandung bikarbonat atau hepes, glutamin dan serum sebagai tambahan *essensial*, dapat juga ditambahkan antibiotik, dan 2-merkпто etanol sebagai bahan *non essential* (Mahardika, 2003).

## 8. Kultur Sel

Sel atau jaringan yang dikembangkan sebagai kultur antara lain: fibroblast, jaringan rangka (tulang rawan), rangka, otot jantung dan mulut, jaringan epitel (seperti hati, paru-paru, dada, kulit, ginjal, sel syaraf, sel endokrin (*adrenal pituitari*), melanosit dan beberapa tipe sel tumor. Ketika sel diambil dari jaringan atau organisme dan kemudian ditempatkan dalam kultur, medium yang digunakan harus memberikan kondisi sel di mana dapat hidup berproliferasi dan berdiferensiasi seperti pada keadaan *in vivo* (Anonim, 1983 *Cit* Prawoto, 2004).

Sel yang diisolasi dari suatu jaringan atau organ aslinya kemudian ditumbuhkan secara *in vitro* dalam kultur media yang mempunyai sifat dan kondisi sama seperti ketika sel masih berada dalam jaringan aslinya dikenal sebagai kultur primer. Medium kultur ini harus memenuhi persyaratan untuk pertumbuhan dan pertahanan hidup sel. Dengan demikian medium kultur harus memenuhi kebutuhan sel akan nutrisi dan hormon (Freshney, 1986).

## 9. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang ditentukan (Anonim<sup>c</sup>, 2000).

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel ditarik oleh cairan penyari sehingga zat

aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik jika permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986). Metode dasar penyarian adalah maserasi, perkolasi, dan soxhletasi. Pemilihan terhadap ketiga metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

a. Maserasi

Maserasi merupakan proses penyarian yang paling sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus. Simplisia ini direndam dalam penyari sampai meresap dan melemahkan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut. Serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan dalam wadah atau bejana bermulut besar, ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk keseluruh permukaan serbuk simplisia (Ansel, 1989).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan penyarian serbuk simplisia dengan pelarut yang cocok dengan melewati secara perlahan-lahan melewati suatu kolom. Serbuk simplisia dimasukkan kedalam perkolator. Dengan cara penyarian ini, mengalirnya penyari melalui kolom dari atas kebawah menuju celah untuk keluar ditarik oleh gaya berat cairan dalam kolom.

Dengan pembaruan yang terus menerus bahan pelarut, memungkinkan berlangsungnya suatu maserasi bertingkat (Ansel, 1989).

Cara perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi karena:

- a). Aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi (Ansel, 1989).
- b). Ruang antara butir-butir serbuk membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari, karena kecilnya saluran tempat mengalir cairan penyari, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi (Ansel, 1989).
- c. Soxhletasi

Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Anonim, 2000). Prinsip kerja dari alat Soxhlet yaitu cairan penyari dimasukkan pada labu, serbuk simplisia diisikan pada tabung dari kertas saring atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas, baja tahan karat atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap penyari naik keatas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak, cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia. Cairan penyari sambil turun melarutkan zat aktif serbuk

simplisia. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu (Anonim, 1986).

Keuntungan penyarian dengan cara Soxhletasi yaitu:

- a). Cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit, dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat.
- b). Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak.
- c). Penyarian dapat diteruskan sesuai dengan keperluan, tanpa menambah volume cairan penyari.

Kerugian penyarian dengan cara Soxhletasi yaitu:

- a). Larutan dipanaskan terus menerus, sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok.
- b). Cairan penyari dididihkan terus menerus, sehingga cairan penyari yang baik harus murni (Anonim, 1986).

#### 10. Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat-zat tambahan makanan dan digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa (Freshney, 1986).

Uji sitotoksik yang merupakan kelanjutan dari uji toksisitas senyawa bahan alam dapat dilakukan dengan menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Uji sitotoksik ini merupakan perkembangan metode untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru dari bahan alam yang berpotensi sebagai

antikanker (Burger, 1970). Adapun dasar dari percobaan ini antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis akan menghasilkan kurva dosis respon dan kriteria respon seharusnya menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Informasi yang didapat dari kurva seharusnya berhubungan dengan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama. Sitotoksik senyawa merupakan syarat aktivitas antikanker (Burger, 1970).

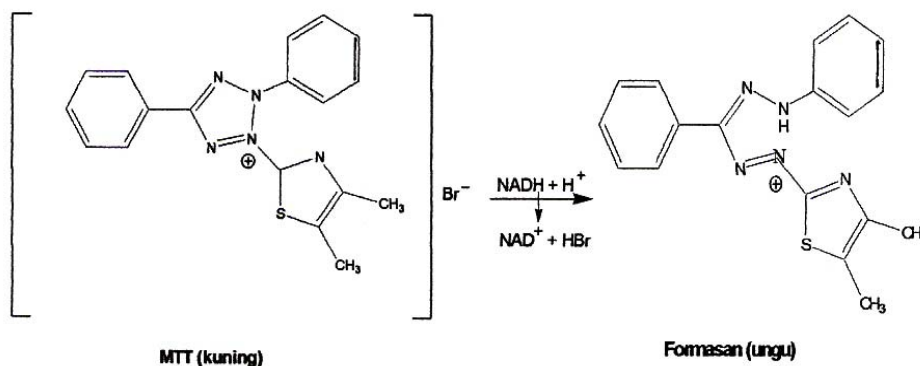
Uji sitotoksik sebagian besar masih menggunakan hewan percobaan meskipun terdapat kesulitan untuk diekstrapolasikan pada manusia. Pengembangan metode *in vitro* sebagai alternatif sebagai pengganti pengujian menggunakan hewan uji mempunyai relevansi cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Doyle dan Griffith, 2000).

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah sebagai berikut :

- a). Metode perhitungan langsung (*Direct Counting*) dengan menggunakan biru tripan (*Trypan Blue*)
- b). MTT *assay* (Junedy, 2005).

Efek sitotoksik dari ekstrak ditentukan dengan mengukur jumlah sel hidup menggunakan pereaksi MTT (garam tetrazolium 3 (4,5 dimethylthiazol-2-il) -2,5-diphenyl tetrazolium bromida). Metode ini merupakan metode kolorimetri yang berdasarkan atas pembentukan kompleks warna antara sel Myeloma yang hidup dengan garam tetrazolium (MTT). Garam tetrazolium tersebut dipecah menjadi formazan oleh sistem suksinat terazolium reduktase

yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Formazan merupakan kompleks warna ungu yang tidak larut dalam air, tetapi larut dalam SDS 10 % (Doyle and Griffiths, 2000). SDS 10% disebut dengan *stop solution* yang berfungsi untuk mendenaturasi protein menjadi unit rantai polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida dan untuk melarutkan garam formazan (Burgess, 1995), sehingga formazan dapat diukur absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA *readar* pada panjang gelombang 550 nm. Absorbansi tersebut menggambarkan jumlah sel hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang diperoleh absorbansi akan semakin tinggi, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel hidup yang bereaksi dengan garam tetrazolium, sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak, absorbansi ini yang akan digunakan untuk menghitung prosentase sel hidup sebagai respon. Metode ini banyak digunakan karena cara pengerjaannya relatif cepat, reliabilitas tinggi dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Siewerts *et al.*, 1995 *Cit Avilana*, 2004).



**Gambar 3. Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan (Mossman, 1983)**

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai *sitostatik*. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

#### **E. Hipotesis**

Ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* L.) mempunyai efek sitotoksik dan mampu memperpanjang kinetika proliferasi sel Myeloma.