

## **BAB I PENDAHULUAN**

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

Kanker merupakan salah satu ancaman utama di bidang kesehatan. Di Inggris, kematian akibat kanker menduduki peringkat kedua setelah penyakit kardiovaskuler (Anonim, 1988). Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO, 1998) disebutkan bahwa 12% dari kematian yang terjadi atas 50 juta kematian dalam tahun 1997 disebabkan oleh kanker, dan dua pertiga diantaranya terjadi di negara berkembang. Sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker (Anonim, 1995).

Kemajuan ekonomi dan peningkatan industri terutama pada Negara berkembang, mengakibatkan terjadinya perubahan pola hidup dan pola makan sehingga mengakibatkan meningkatnya jumlah penyakit degeneratif dan kanker. Kanker merupakan penyakit yang ditakuti karena sampai saat ini belum ditemukan cara pengobatan yang aman dan murah (Isselbacher, 2000).

Di Indonesia, karsinoma *cervix* uteri menempati urutan pertama dari keganasan yang ada, sedangkan di negara maju berada pada urutan kedua setelah karsinoma payudara (Tambunan, 1995). Di wilayah Australia barat, tercatat sebanyak delapan puluh lima orang wanita didiagnosa positif terhadap kanker leher rahim setiap tahun. Pada tahun 1993, empat puluh wanita telah tewas menjadi korban keganasan kanker ini. Kanker leher rahim adalah jenis kanker yang paling banyak ditemukan pada wanita Indonesia. Kanker ini telah banyak ditemukan dan diobati (Mangan, 2003).

Terapi pengobatan kanker yang utama seperti pembedahan dan radiasi hanya dapat dilakukan pada kanker lokal stadium awal. Pengobatan ini gagal digunakan

untuk kanker yang telah berkembang pada stadium lanjut dan sudah mengalami metastatis (Sugiyanto *et al.*, 2003).

Berdasarkan penelitian Sutrisna (2006) 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.

Berdasarkan penelitian yang terdahulu menunjukkan bahwa ceplukan berfungsi sebagai stimulan sistem imun yang efektif, juga toksik pada beberapa tipe sel kanker dan sel leukemia, serta memiliki efek antimikroba (Hsieh *et al.*, 2006). *Physalin F* dan *Physalin D* diperoleh dari fraksinasi ekstrak etanolik tanaman ceplukan yang menunjukkan efek sitotoksik pada beberapa sel kanker pada manusia (Chiang *et al.*, 2006).

Ekstrak etanolik tanaman ceplukan merupakan ekstrak dengan kandungan senyawa yang masih beragam. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian pada fraksi-fraksi tertentu dari ekstrak etanolik tanaman ceplukan tersebut untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari masing-masing fraksi ekstrak etanolik tanaman ceplukan.

Pada penelitian ini akan dilakukan penelitian tentang efek sitotoksik fraksi kloroform ekstrak etanolik tanaman ceplukan terhadap sel HeLa dengan menggunakan fraksinasi cair-cair dengan pelarut kloroform dan juga dilakukan pengamatan penghambatan kinetika proliferasi sel HeLa.

## **B. Perumusan Masalah**

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

1. Apakah fraksi kloroform ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa?

2. Apakah fraksi kloroform ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) mampu menghambat kinetika proliferasi sel HeLa?

### C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini merupakan salah satu usaha untuk mendapatkan tanaman obat yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa. Secara khusus penelitian ini dilakukan untuk menentukan kemampuan fraksi kloroform ekstrak etanolik tanaman ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) dalam menghambat kinetika proliferasi sel HeLa.

### D. Tinjauan Pustaka

#### 1. Kanker

Kanker terjadi sebagai akibat perubahan dinamik dari gen, terutama mutasi pada *oncogen* sehingga fungsinya menjadi dominan serta mutasi pada *tumor suppressor gen* sehingga gen ini kehilangan fungsinya (Hanahan and Weinberg, 2000).

Kanker sebenarnya merupakan suatu tumor atau neoplasma atau neoplastoma, yang terdiri dari tumor jinak (*benign*, *benigna*) dan tumor ganas (*malignant*, *maligna*, kanker). Kanker dibedakan menjadi dua yaitu sarkoma dan karsinoma. Sarkoma bersifat mesensimal misalnya fibrosarkoma, limposarkoma, osteosarkoma, sedangkan karsinoma bersifat *epithelial* sebagai contoh kanker payudara, kanker lambung, kanker uterus, kanker kulit (Mulyadi, 1997).

Terjadinya kanker meliputi banyak tahapan, dimana pada setiap tahapan menggambarkan perubahan genetik yang akan mendorong transformasi sel normal menjadi sel kanker / *malignant* (Hanahan and Weinberg, 2000).

Salah satu sistem di dalam tubuh manusia yang mencegah penyebaran sel kanker adalah “apoptosis” yang menyebabkan sel bunuh diri. Apoptosis terjadi kalau DNA sel rusak, atau sel berkembang menjadi tumor, atau gen p53 yang juga dikenal sebagai “gen pencegah kanker” kurang efektif. Meskipun apoptosis mungkin terkesan negatif, sebenarnya peristiwa ini sangat penting, karena dia merintangi penyimpangan berbahaya dan mencegah penyakit diturunkan ke generasi berikutnya (Yahya, 2002).

**a. Karakteristik sel kanker**

Dalam keadaan normal sel hanya akan membelah diri bila badan membutuhkan, umpamanya ada sel-sel yang perlu diganti karena mati atau rusak. Sedangkan sel kanker akan membelah diri meskipun tidak diperlukan, sehingga terjadi sel-sel baru yang berlebihan. Sel - sel yang baru mempunyai sifat seperti induknya yang sakit yaitu sel-sel yang tidak mempunyai daya atur (regulator) (Mulyadi, 1997).

Kanker terjadi sebagai akibat perubahan sel, sehingga sel tersebut dapat melepas diri dari mekanisme pengaturan tumbuh normal. Perkembangan sel-sel kanker diawali oleh adanya klon sel yang telah mengalami perubahan genetik pada gen-gen pengatur pertumbuhan. Dalam jangka waktu yang relatif lama dalam hitungan puluhan tahun, perubahan genetik pada sel tersebut akan bertambah sehingga mengakibatkan proliferasi yang berlebihan. Sel-sel kanker pada stadium lanjut pada umumnya mengalami perubahan genetik dalam jumlah yang relatif banyak yang memacu sel-sel tersebut jadi kehilangan kendali dalam perkembangbiakannya (Dean, 1998).

Kanker adalah penyakit yang ditandai oleh adanya pertumbuhan yang tidak terkontrol yang mengarah pada proses invasi ke jaringan sekitar dan menyebar

(metastatis) ke bagian tubuh lain (King, 2000). Penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler. Sel kanker punya fungsi khusus pada fenotipnya yang disebabkan karena adanya mutasi pada genotipnya yaitu mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri, tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferatif, mampu menghindar dari proses apoptosis, memiliki potensi tidak terbatas untuk replikasi, mampu menginduksi angiogenesis serta mampu menginvasi jaringan disekitarnya dan membentuk metastatis (Hanahan and Weinberg, 2000).

**Sifat-sifat sel kanker adalah:**

1) Pertumbuhan sel kanker diatur sendiri, lepas dari mekanisme pengendali yang lebih tinggi dari organisme (Schunack, 1990). Sel yang normal harus menerima *signal* pertumbuhan mitogenik terlebih dahulu sebelum mereka berubah dari fase istirahat menuju fase proliferasi yang aktif, sedangkan sel kanker mampu menghasilkan beberapa *signal* pertumbuhan sendiri sehingga mengurangi ketergantungan pada *signal* dari lingkungan sekitarnya. Kemampuan ini diperoleh dengan memodulasi *signal* pertumbuhan ekstraseluler, proses *signal* transduksi atau proses penerjemahan *signal* menjadi aksi dari sirkuit intraseluler. Sel kanker memiliki kemampuan untuk mensintesis faktor pertumbuhan dan mempunyai kemampuan pada pembalikan *signal* (*positive feed back signaling*) yang dinamakan *autocrine*. Liberasi dari ketergantungan *signal* secara eksogen ini merusak mekanisme homeostatis penting yang secara normal berfungsi menjamin keberaturan dari bermacam-macam sel dalam jaringan (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 2) Tidak sensitif terhadap *signal* antiproliferatif

*Signal* antiproliferatif bekerja untuk menjaga keteraturan sel dan homeostatis jaringan pada sel normal. *Signal* antiproliferatif dapat mengblokir proliferasi dengan dua mekanisme berbeda yaitu sel dipaksa keluar dari fase proliferasi yang aktif menuju fase istirahat ( $G_0$ ) atau sel diinduksi untuk melepaskan potensi proliferasi secara permanen dengan menginduksi sel masuk ke dalam fase postmitotik. Sel kanker mampu menghindar dari *signal* antiproliferatif yang berhubungan dengan daur sel secara spesifik dengan kemampuannya mengatur fase  $G_1$ . Mekanismenya antara lain melarutkan *signal* molekul  $TGF\alpha$   $TGF\beta$  menyebabkan sintesis protein p15 dan p21, yang dapat memblokir kompleks Cyc-Cdk sehingga tidak dapat memfosforilasi pRb (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 3) Mampu menghindar dari mekanisme apoptosis (program bunuh diri sel)

Program ini memiliki peranan yang amat penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel. Peran penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel- sel yang tidak diperlukan yang sekiranya dapat menyebabkan kanker (Meiyanto, 1999). Bila program apoptosis telah selesai pada sebuah sel maka akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan segera dikenali oleh makrofag dan dimakan (*engulfed*) (Peter *et al.*, 1997 *cit* Meiyanto, 2001). Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang, karena mutasi pada gen p53 (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 4) Kemampuan replikasi yang tak terbatas

Tiga kemampuan sel diatas menyebabkan hilangnya hubungan dengan *signal* pertumbuhan sel dalam lingkungan, sehingga sel kanker mampu tumbuh terus menerus tidak terbatas (Hanahan and Weinberg, 2000). Pertumbuhan tidak terbatas

ini disebabkan oleh karena sel-sel kanker mampu mengatasi krisis batas maksimum pertumbuhan yang disebabkan oleh adanya inhibisi kontak. *Senescence* adalah keadaan tidak terjadi pembelahan (*non dividing state*) yang umum terjadi pada sel normal ketika pertumbuhan telah mencapai inhibisi kontak. Keadaan ini terjadi karena pada setiap kali sel mengalami pembelahan akan terjadi pemendekan telomer (*telomer erosion*) dan pada saat panjang telomer mencapai batas ambang (sel mengalami krisis), sel akan berhenti untuk membelah dan selanjutnya diikuti dengan kematian sel (*mortal*). Sel kanker mempunyai kemampuan untuk mengatasi keadaan krisis ini sehingga sel menjadi *immortal*. Mekanismenya melalui upregulasi telomerase, yaitu enzim yang berperan dalam perpanjangan telomere (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### 5) Pemacuan angiogenesis

Untuk berkembang menjadi massa yang besar sel membutuhkan nutrisi dan oksigen. Nutrisi dan oksigen ini disuplai melalui pembuluh darah. Sel kanker memiliki kemampuan angiogenesis (Folkman, 1997) yaitu proses pembentukan pembuluh darah baru. *Signal* inisiasi pada proses angiogenesis ini diantaranya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### 6) Invasif *metastase*

Selama masa perkembangannya, kebanyakan sel kanker mampu menghasilkan dan melepas sel pioner yang dapat berpindah, menginvasi jaringan di dekatnya, kemudian pindah ke tempat lain, membentuk koloni dan tumbuh di tempat itu. Proses ini dinamakan *metastase*. *Metastase* merupakan penyebab 90% kematian penderita kanker. Beberapa protein terlibat yang pada proses perlekatan sel dalam

jaringan adalah *Cell-cell Adhesion Molecules* (CAMs). Diantaranya E-adhenin dan integrin yang menghubungkan sel dengan matriks ekstraseluler. Pada kanker kebanyakan CAMs telah hilang, sehingga terjadi proses invasi dan *metastase* (Hanahan and Weinberg, 2000).

## **b. Siklus sel kanker**

### **1) Perputaran daur sel**

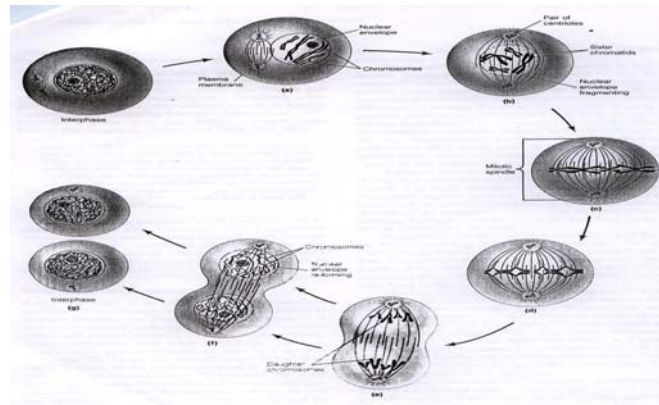
Sel kanker berada dalam tiga keadaan, sel yang sedang membelah atau dalam siklus proliferasi, sel dalam keadaan istirahat, sel yang secara permanen tidak dapat membelah (Ganiswara dan Nafrialdi, 1995).

Proses penggandaan sel, dari satu sel menjadi dua sel, empat sel dst, disebut proliferasi. Fase pembelahan sel terdiri dari dua fase yaitu, fase interfase dan fase mitotik. Interfase ditandai dengan tidak terlihatnya kromosom di dalam inti dengan jelas. Fase interfase merupakan fase dimana tidak ada aktifitas pembelahan sel, namun pada fase ini sel mempersiapkan diri untuk pembelahan lagi dengan mengumpulkan materi dan energi. Interfase diawali dari fase  $G_1$ , yaitu fase pertumbuhan primer / subfase awal, dimana pada fase ini terjadi ekspresi dan sintesis protein yang diperlukan untuk sintesis DNA, fase S yaitu fase sintesis DNA dan fase pembentukan organel, dan fase  $G_2$ , yaitu fase pertumbuhan sekunder / subfase akhir menjelang fase mitosis, dimana pada fase ini sel akan mengalami pertumbuhan dan sintesis protein sehingga cukup untuk dua sel nantinya (Sukardja, 2000).

Fase mitotik yang terdiri dari profase, metafase, anafase, telofase, dan sitokinase. Pada profase ditandai dengan hilangnya nukleolus, kondensasi kromatin, sentriol akan berpindah dan membentuk dua kutub, dan dari sentromer akan keluar *fibers*. Pada metafase, *fibers* akan membawa kromosom agar berada di tengah sel. Pada anafase, kromosom terlepas dari pasangannya dan mulai tertarik ke arah masing-

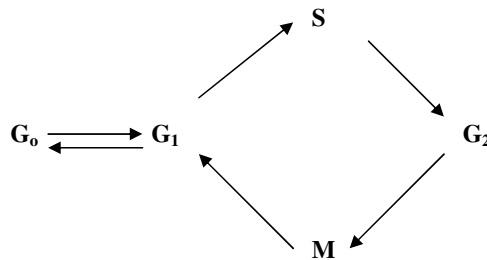


masing kutub. Pada telofase kromatid berada pada dua kutub dan sel siap untuk menjadi dua sel baru. Pembelahan untuk menjadi dua sel baru disebut sitokinesis (Sukardja, 2000). Gambar 1 menunjukkan tahap-tahap proses pembelahan sel.



**Gambar 1. Proses Pembelahan Sel Meliputi Beberapa Tahap (a) Profase, (b) Prometafase, (c) Metafase, (d) Anafase, (e) Awal Telofase, (f) Telofase (Becker, 1986)**

Umumnya sel eukariot yang sedang tumbuh mempunyai siklus sel pembelahan sel yang secara keseluruhan memerlukan waktu 24 jam. Pada tahap  $G_1$  membutuhkan waktu 8-10 jam, S membutuhkan waktu 6-8 jam,  $G_2$  membutuhkan waktu 4-6 jam. Dan pada mitosis memerlukan waktu kurang dari satu jam, kurang lebih 30-45 menit (Becker, 1986).



**Gambar 2. Skema Pembelahan Sel Pada Sel Kanker (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995)**

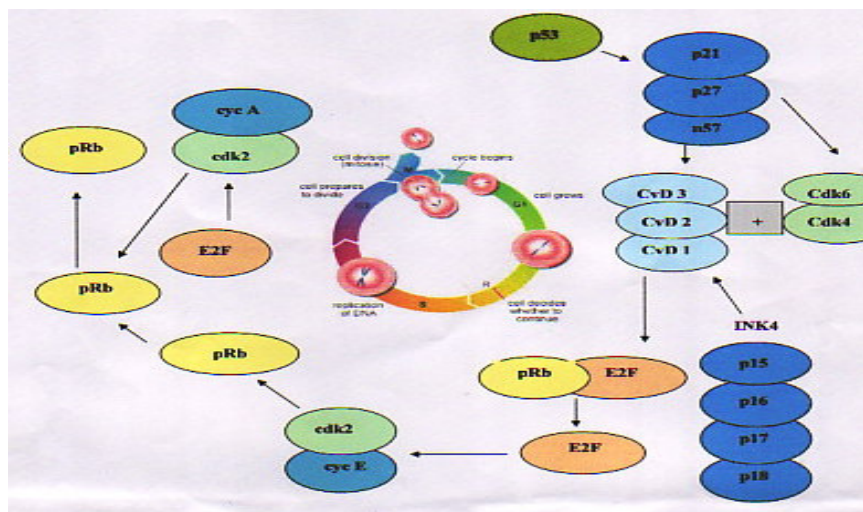
Gambar 2 menunjukkan skema pembelahan sel kanker. Sel tumor yang sudah membelah terdapat dalam beberapa fase yaitu fase mitosis (M), pasca mitosis ( $G_1$ ), fase sintesis DNA (fase S) dan fase pramitosis ( $G_2$ ). Pada akhir fase  $G_1$  terjadi peningkatan RNA disusul dengan fase S yang merupakan 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 sel fase lain dan masih berlangsungnya sintesis RNA dan protein. Sewaktu fase mitosis berlangsung (fase M) sintesis protein dan RNA berkurang secara tiba-tiba dan terjadi pembelahan menjadi dua sel. Setelah itu sel dapat memasuki interfase untuk kembali memasuki fase istirahat ( $G_0$ ). Sel pada fase  $G_0$  masih potensial untuk berproliferasi disebut klonogenik atau sel induk (stem sel) jadi yang dapat menambah jumlah sel kanker adalah sel yang dalam siklus proliferasi dan dalam fase  $G_0$  (Ganiswara dan Nafrialdi, 1995).

## 2) Regulasi daur sel

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, 2002). 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 lebih cepat dibandingkan dengan keadaan normalnya (King, 2000).

*Cell cycle progression* terdiri atas fase sintesis (S) dan fase mitosis (M) yang dipisahkan oleh fase gap satu ( $G_1$ ) dan fase gap dua ( $G_2$ ). Adanya sinyal ekstraseluler akan menginduksi *Cyclin D* (*cycD*). Fosforilasi pRb oleh cdk4/6 terjadi melalui pembentukan kompleks *cycD* dengan *cyclin dependent kinase* (cdk-4/6). Fosforilasi pRb menyebabkan lepasnya  $E_2F$  dari kompleks pRb dengan  $E_2F$ .

$E_2F$  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.  $E_2F$  yang dihasilkan menginduksi gen-gen esensial untuk proses sintesis dan mitosis. Proses tersebut dapat dihambat oleh protein p53, CIP/KIP (p21, p27), *inhibitor kinase* / INK4 (p15, p16, p18, p19) yang merupakan penghambat cdk (ck1) (Horwittz, 2000 *cit* Da`i, 2003).



Gambar 3. *Cell Cycle Progression* dan Regulator-Regulatornya (Meiyanto, 2001)

Gambar 3 menunjukkan *cell cycle progression* dan regulator-regulatornya. Regulasi *cell cycle progression* juga diatur oleh *family* protein INK4 yang merupakan penghambat cdk-4 dan cdk-6. INK4 berikatan dengan cdk4/6 dan memacu terlepasnya cycD yang kemudian terdegradasi. Dengan terlepasnya kompleks cycD maka cdk4 menjadi inaktif. Hal ini mengakibatkan pRb tidak terfosforilasi sehingga E<sub>2</sub>F inaktif dan tidak terjadi *cell cycle*. CIP/KIP secara spesifik menginaktivasi cyclin-E-cdk2, sehingga menyebabkan terjadinya G<sub>1</sub> *arrest*. Pada sel kanker, regulasi tersebut berubah karena sel kanker memiliki kemampuan untuk menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri ataupun hanya membutuhkan sedikit sinyal dari lingkungannya dan tidak memiliki respon terhadap stimulus negatif yang dapat menghentikan pertumbuhan sel (King, 2000).

#### **c. Karsinogen dan Karsinogenesis**

Karsinogen secara umum dapat diartikan sebagai penyebab penyakit kanker. Penyebab penyakit kanker hingga kini dapat digolongkan menjadi 3 faktor yaitu: fisika, virus, dan senyawa kimia (Mulyadi, 1997).

Karsinogenesis adalah suatu proses yang memberikan hasil sutau transformasi sel normal menjadi sel neoplastik yang disebabkan oleh perubahan genetic yang menetap atau mutasi (Underwood, 1999).

#### **d. Penanggulangan dan Penanganan Kanker**

Hingga kini pengobatan neoplastik atau kanker dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu: pembedahan, radiasi dan dengan pemberian obat antineoplastik atau antikanker (Mangan, 2003). Terapi kanker pada umumnya dilakukan dengan mengkombinasi beberapa macam terapi, umumnya khemoterapi lebih diutamakan karena mampu menghasilkan sel-sel yang tidak terjangkau oleh pembedahan atau

penyinaran (Himawan, 1973). Obat antikanker seharusnya dapat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan sel normal. Penggunaan obat perlu mempertimbangkan untung rugi untuk mendapatkan efek terapi yang baik (Katzung, 1997).

Salah satu strategi untuk pengembangan obat kanker adalah dengan menemukan senyawa-senyawa yang mendasarkan pada target aksinya pada gen-gen pengatur pertumbuhan atau proliferasi sel (Gibbs, 2000). Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya resistensi dari sel kanker terhadap antikanker tersebut sehingga tidak sensitif lagi (Sonlimar *et al.*, 2002).

## **2. Sel HeLa**

Sel HeLa atau HeLa *cell lines* merupakan *continous cell lines* yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) manusia. Sel ini diisolasi sejak tahun 1951 dari rahim seorang wanita penderita kanker leher rahim, berasal dari Baltimore yang bernama Henrieta Lacks (31 tahun). HeLa merupakan singkatan dari namanya (Labwork, 2000 *cit* Julia, 2001).

HeLa *cell line* masih memiliki gen *p53* yang normal (Desaintes *et al.*, 1999) sehingga masih cukup sensitif terhadap induksi apoptosis (Schneider, 1997). Sel HeLa dapat digunakan untuk tes antitumor, transformasi, uji tumorigenesitas, uji sitotoksisitas, biologi sel dan invasi bakteri. Sel ini secara morfologi merupakan sel epithelial dan sudah dimasuki oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) tipe 18. Sel ini bersifat immortal dan sangat agresif sehingga mudah untuk dikultivasi tetapi sel ini mudah menginvasi kultur sel lain (Doyle dan Griffith, 1998).

Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik dan glukosa. Dan serum mengandung hormon yang memacu pertumbuhan sel, albumin merupakan protein transport, lipid yang diperlukan untuk pertumbuhan sel dan mineral yang merupakan kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media RPMI-serum tersebut untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Freshney, 1987).

### 3. Kanker Leher Rahim (*Cervix*)

Kanker *cervix* atau kanker pada leher rahim adalah kanker yang terjadi pada *cervix* uterus, suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara rahim (uterus) dengan vagina terjadi karena adanya HPV (*Human Papilloma Virus*) (Riono, 1999). Pada stadium dini, kanker jenis ini sering tidak memberikan tanda atau gejala yang khas (Mangan, 2003).

Kanker *cervix* adalah kanker yang disebabkan oleh infeksi HPV (*Human Papilloma Virus*). *Papilloma Virus* adalah DNA yang kecil yang infeksiya dapat menyebabkan lesi pada kulit atau sel epitel pipih (Desaintes *et al.*, 1999). Saat awal infeksi, HPV mengekspresikan protein E1 dan E2. E2 berperan pada regulasi dalam transkripsi dan replikasi DNA (Desaintes *et al.*, 1999). Seiring dengan terjadinya karsinogenesis, sekuen tertentu terinsersi pada kromosom manusia sehingga gen E2 akan mengalami *splicing* dan menjadi inaktif. E2 berfungsi menghambat ekspresi E6 dan E7 (King, 2000). HPV dapat mengkode pembentukan dua *oncogen*, yaitu E6 dan E7 yang dapat mengubah keratinisit dengan berinteraksi dengan regulator daur sel. Protein E6 berikatan dengan regulator protein p53 dan mendegradasinya, sedangkan protein E7 berinteraksi dengan anggota kelompok pRb (Desaintes *et al.*, 1999).

#### 4. Skrining Aktivitas Tanaman Obat Indonesia

Hutan Indonesia memiliki spesies tanaman dan tumbuhan obat tidak kurang dari 9.609 spesies. Dari jumlah itu, baru 3-4% yang sudah dibudidayakan dan dimanfaatkan secara komersial, dan sudah 283 spesies tanaman obat yang sudah terdaftar digunakan oleh industri obat tradisional di Indonesia (Pranoto, 1999). Secara umum pengobatan cara timur bertujuan meningkatkan daya tahan tubuh, menghambat pertumbuhan kanker, mengurangi keluhan dan memperbaiki fungsi utama tubuh. Di masyarakat, pengobatan ala timur sering dijadikan alternatif jika cara konvensional tidak dapat dilakukan. Bahkan telah muncul paradigma baru dalam dunia pengobatan modern, yaitu *back to nature* atau kembali ke alam. Paradigma baru tersebut mendorong cara pengobatan barat menjadi *back to east* atau kembali ke timur (Mangan, 2003).

Tumbuhan yang beraneka ragam di daerah tropis merupakan sumber obat-obatan untuk berbagai penyakit manusia. Salah satu penyakit yang paling mematikan adalah kanker. Kanker bagi sebagian manusia amat menakutkan sehingga penelitian mengenai obat kanker yang berasal dari tumbuhan tropis amat gencar dilakukan oleh para peneliti dari dalam negeri dan luar negeri. Salah satu tanaman obat asal negara tropis yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat melawan kanker adalah ceplukan. Ceplukan telah lama menarik perhatian peneliti karena memiliki kemampuan melawan beberapa penyakit kanker (Anonim, 2006).

Hemerson dkk. Mengevaluasi aktivitas antitumor dari *physalin B* dan *physalin D* yang diisolasi dari bagian rongga udara *Physalis angulata*. In vitro, kedua komponennya menunjukkan sitotoksik melawan beberapa *cell lines*, menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> batasnya antara 0,58 sampai 15,18 µg/ml untuk *physalin B*, dan 0,28 sampai

2,43 µg/ml untuk *physalin D* (Magalhaes, 2006).

#### **a. Ekstraksi**

Metode penyarian antara lain:

##### **1) Metode Maserasi**

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Anshel, 1989).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Dan kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anshel, 1989).

##### **2) Metode Perkolasi**

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Kekuatan yang berperan pada perkolasi antara lain gaya berat, kekentalan, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosa, adhesi, daya kapiler, dan daya geseran (friksi) (Anonim, 1986).

##### **3) Ekstraksi dengan alat Soxhlet**

Wadah gelas yang mengandung kantung diletakkan antara labu penyulingan dengan pendingin aliran balik dan dihubungkan dengan labu melalui pipa. Labu tersebut berisi bahan pelarut, yang menguap dan mencapai kedalaman pendingin aliran balik melalui pipet, berkondensasi di dalamnya, menetes ke atas bahan yang



diekstraksi dan menarik keluar bahan yang diekstraksi. Larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimalnya, secara otomatis dipindahkan ke dalam labu. Dengan demikian zat yang terekstraksi terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya (Anonim, 1986).

Keuntungan penyarian dengan alat Soxhlet 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 alat Soxhlet 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).

## **b. Tanaman Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.)**

### **1) Klasifikasi Tanaman**

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Sympetalae
Ordo	: Tubiflorae (Solanales, Personatae)

Famili : Solanaceae  
Genus : *Physalis*  
Spesies : *Physalis angulata* Linn.

(Van Steenis, 1997)

## 2) Nama lain

Ceplukan juga dikenal dengan nama ciplukan, ceplukan, dan ciplukan (Jawa); cecendet, cecendetan, cecenet (Sunda); yoryoran (Madura); keceplukan, angket (Bali); serta daun boba dan daun kapo-kapo (Sumatera) (Mangan, 2003). Leletop (Sumatra Timur), Dedes (Nusa Tenggara), Lapunumat (Maluku) (Hutapea, 2000).

## 3) Manfaat Tanaman

Tanaman ceplukan berkhasiat analgetik (penghilang nyeri), diuretik (peluruh air seni), *detoxifies* (penetrat racun), pereda batuk, serta pengaktif fungsi kelenjar-kelenjar tubuh. Khasiat untuk pengobatan kanker ada pada zat saponin yang terkandung pada ciplukan memberikan rasa pahit dan berkhasiat sebagai antitumor dan menghambat pertumbuhan kanker, terutama kanker usus besar. Sementara itu, flavonoidal dan polifenol berkhasiat sebagai antioksidan (Mangan, 2003). Kegunaan di masyarakat akar digunakan sebagai obat cacing dan penurun demam, daun digunakan untuk penyembuhan patah tulang, busung air, bisul, borok, penguat jantung, keseleo, nyeri perut, kencing nanah. Buahnya digunakan untuk mengobati ayan, tidak dapat kencing, dan penyakit kuning (Sudarsono *et al.*, 2002).

## 4) Kandungan Kimia Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.)

Kandungan kimia tanaman ceplukan adalah saponin, flavonoid, polifenol,

asam kologenat, zat gula, *elaidic acid* dan fisalin (Anonim, 2006). Buah Ciplukan mengandung senyawa kimia asam sitrun dan fisalin (Anonim, 2004). Herba mengandung fisalin B, fisalin D, fisalin F, withangulatin A. Biji mengandung 12-25% protein, 15-40% minyak lemak dengan komponen utama asam palmitat dan asam stearat (10-20%). Akar mengandung alkaloid, terdapat pada akar tumbuhan yang termasuk suku solanaceae. Daun pada jenis *Physalis* pada umumnya ditemukan glikosida flavonoid (Luteolin) (Sudarsono *et al.*, 2002).

### **5) Morfologi Tanaman**

Ceplukan termasuk suku *Solanaceae*, dengan nama spesies *Physalis angulata* L., tumbuhan ini hidup di tempat dengan ketinggian 1-1550 m dpl dan tumbuh liar di ladang, taman, pinggiran jalan dan pinggiran hutan. Tumbuhan ini dapat ditemukan di semua negara dengan iklim tropis terutama di Afrika, Asia, dan Amerika (Anonim, 1986). Menurut Sugati dan Hutapea (1991), ceplukan adalah tanaman semak dengan sifat tumbuh setahun (*annual*).

Herba 1 tahun, tegak, tinggi 0,1-1 m. bagian yang hijau berambut pendek atau boleh dikatakan gundul batang berusuk bersegi tajam, berongga helaian daun bulat telur melayang bentuk lanset, dengan ujung runcing, bertepi rata atau tidak, 5-15 kali 2,5-10,5 cm (Van steenis, 1997). Batangnya beruas, berwarna hijau dengan tinggi kurang dari satu meter dan kulit batang berbulu (Anonim, 2006). Tangkai bunga tegak dengan ujung yang mengguk, 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 noda-noda coklat atau kuning coklat, dibawah 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 (Anonim, 2006). Bunga termasuk bunga tunggal, kelopak berlekatan dan bercangap lima, warna mahkota kuning. Jumlah benang sari lima. Warna tangkai sari kuning, kepala sari biru. Jumlah putik satu dan berwarna putih. Buah termasuk buah buni, berbentuk bulat pipih berwarna kuning. Biji berwarna kuning, berbentuk bulat dan berukuran kecil (Anonim, 2006). Buah buni bulat memanjang, pada masak kuning, panjang 14-18 mm, dapat dimakan. Asalnya dari amerika, seluruh jawa, 1550 m. Terdapat di kebun, tegalan, tepi jalan, semak, hutan ringan, dan tepi hutan (Van Steenis, 1997).

### **5. Uji Sitotoksik**

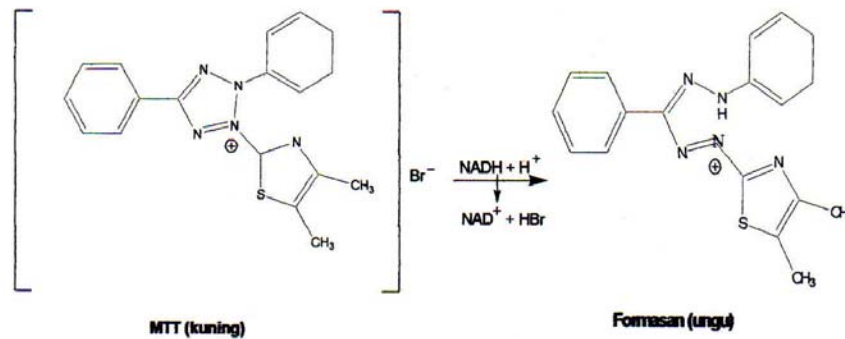
Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitostatik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel. Akhir-akhir ini uji sitotoksik digunakan secara luas menggantikan uji toksisitas secara *in vivo* yang menggunakan hewan. Ada beberapa alasan yaitu *in vitro* sebagai tahap awal mengembangkan obat baru lebih ekonomis dibanding uji toksisitas secara *in vivo* dan keterbatasan hewan uji untuk dikorelasikan hasilnya pada manusia karena adanya perbedaan antara kedua *species* (Freshney, 1986).

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

1. Menggunakan biru tripan (*Trypan Blue*)
2. Menggunakan senyawa aktif radioaktif contohnya tritium berlabel timiden
3. MTT assay
4. Perhitungan Langsung

(Juneidi, 2005)

Efek sitotoksik dari ekstrak ditentukan dengan mengukur jumlah sel hidup menggunakan pereaksi MTT, yaitu suatu garam tetrazolium yang dapat dipecah oleh sistem reduktase suksinat-tetrazolium menjadi formazan. Formazan merupakan zat berwarna ungu dan setelah ditambah dengan *stop solution*, intensitas warna ungu yang terbentuk dapat ditetapkan secara spektrofotometri (Sigma, 1999). Dalam hal ini *stop solution* berfungsi untuk mendenaturasi protein (berstruktur kuaterner) menjadi unit rantai polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida dan untuk melarutkan garam formazan (Burgess, 1995) Reaksi reduksi MTT menjadi formazan ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Mosmann, 1983).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter  $IC_{50}$ . 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 (Meiyanto, 2002). Nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Meyer *et al.* 1982), persentase kehidupan dihitung dengan cara jumlah sel hidup kontrol dikurangi jumlah sel hidup perlakuan, dibagi jumlah sel hidup kontrol dikali 100%  $IC_{50}$  dihitung dengan analisa probit.

### **E. Hipotesis**

Penelitian-penelitian sebelumnya:

1. Ceplukan berfungsi sebagai stimulan sistem imun dari sel leukemia serta efek antimikroba (Hsieh *et al.*, 2006).
2. *Physalin F* dan *Physalin D* diperoleh dari fraksinasi ekstrak etanolik tanaman ceplukan yang menunjukkan efek sitotoksik pada beberapa sel kanker (Chiang *et al.*, 1992).
3. Ekstrak etanol ceplukan memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Sutrisna, 2006).

Berdasarkan hasil penelitian-penelitian terdahulu pada tanaman ceplukan, maka dapat disusun suatu hipotesis yaitu fraksi kloroform ekstrak etanolik tanaman ceplukan kemungkinan bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dan mampu menghambat kinetika proliferasi pada sel HeLa.