

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Dasar dari uji sitotoksik adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik yang diberikan. Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai tidak hilangnya metabolik atau proliferasi dan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, naiknya jumlah protein, atau DNA yang disintesis. Salah satu dari uji sitotoksik adalah mengukur kemampuan sel kanker untuk bertahan hidup karena adanya senyawa uji yang di berikan.

Sejak lama penyakit kanker telah menjadi momok bagi banyak orang (Sudewo, 2004). Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa pada tahun 2008, hampir 460.000 wanita meninggal karena kanker payudara (Anonim^b, 2011). Penderita kanker payudara di Indonesia sebanyak 12,10%, terbanyak kedua setelah kanker leher rahim (19,18%) (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Kanker payudara merupakan tumor ganas yang menyerang jaringan payudara dan merupakan penyebab utama kematian pada wanita di dunia (Klauber *et al.*, 2001; Mardiana, 2004; Walker *et al.*, 1997).

Kanker adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker. Dalam perkembangannya sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian. Para peneliti kanker menyimpulkan bahwa 70-90% kanker pada manusia dapat pula disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan, makanan, konsumsi alkohol, rokok, polusi udara, air, bahan kimia di tempat kerja (misal: pabrik), radiasi, dan sinar ultraviolet (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Salah satu upaya untuk mengobati kanker adalah dengan menggunakan tanaman herbal yang berkhasiat obat. Menurut data Departemen Kesehatan Republik Indonesia, sampai saat ini telah ditemukan sekitar 7.500 jenis tanaman obat. Sekitar 10% di antaranya merupakan tanaman obat untuk penyakit kanker (Hariana, 2006). Tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tumbuhan *Annona squamosa* yang lebih dikenal di Indonesia dengan nama

srikaya. Srikaya adalah tanaman yang termasuk dalam genus *Annona* yang berasal dari daerah tropis. Srikaya termasuk pohon buah-buahan kecil yang tumbuh di tanah berbatu dan terkena cahaya matahari langsung. (Gunawan *et al.*, 2001).

Menurut penelitian Yang *et al.* (2009) menyebutkan bahwa senyawa sitotoksik yang di isolasi dari fraksi nonpolar ekstrak etanol 95% biji srikaya terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel tumor seperti *human colon adenocarcinoma* (HCT) dengan nilai IC_{50} $3,97 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, *human lung carcinoma* (A-549) dengan nilai IC_{50} $5,67 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, *human breast carcinoma* (MCF-7) dengan nilai IC_{50} $5,63 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, dan *human prostate adenocarcinoma* (PC-3) dengan nilai IC_{50} $1,62 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Xie *et al.* (2003) juga mengemukakan bahwa senyawa asetogenin dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap sel tumor. Asetogenin banyak terkandung dalam bangsa *Annonaceae* yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker, parasitisidal, dan antimikroba (Pardhasaradhi, 2004). Ekstrak diklorometan konsentrasi 5% dan ekstrak air konsentrasi 25% dari biji srikaya juga memiliki aktivitas antitumor terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al.*, 2005)

Adanya aktivitas sitotoksik isolat biji srikaya terhadap sel tumor ini mendorong dilakukannya penelitian untuk menguji aktivitas sitotoksik fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya terhadap sel kanker payudara (T47D) dan mengetahui golongan kandungan senyawa yang terkandung dalam biji srikaya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi yang bermanfaat dalam pemilihan obat alternatif antikanker yang murah, ekonomis, dan mudah diperoleh.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka didapat rumusan masalah sebagai berikut.

1. Apakah fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan berapa nilai IC_{50} -nya?
2. Apakah golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah maka tujuan pada penelitian ini adalah.

1. Mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya terhadap sel T47D dan nilai IC_{50} -nya.
2. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tumbuhan Srikaya

a. Sistematika tumbuhan srikaya

Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona squamosa</i> L. (Cronquist, 1981)

b. Nama daerah

- 1) Jawa : sarikaya, srikaya, serkaya, surikaya, srikawis, sarkaja, serakaja, sirikaja
- 2) Sumatera: delima bintang, serba bintang, sarikaya, seraikaya.
- 3) Jawa: sarikaya, srikaya, serkaya, surikaya, srikawis, sarkaja, serakaja, sirikaja.
- 4) Kalimantan: sarikaya
- 5) Nusa Tenggara: sirkaya, srikaya, garoso, ata.
- 6) Sulawesi: atis soe walanda, sirikaja, perse, atis, delima srikaya, srikaya.
- 7) Maluku: atisi, hirikaya, atis (Gunawan *et al.*, 2001)

c. Morfologi tumbuhan

Perawakan perdu sampai pohon, berumah satu, berkelamin banci, tinggi 2-7 m. Batang gilik, percabangan simpodial, ujung rebah, kulit batang coklat muda. Kulit pohon tipis berwarna keabu-abuan, getah kulitnya beracun. Batangnya (pada dahan) coklat muda, bagian dalamnya berwarna kuning muda dan agak pahit.

Pada bagian ranting berwarna coklat dengan bintik coklat muda, lenti sel kecil, oval, berupa bercak bulat pada batang.

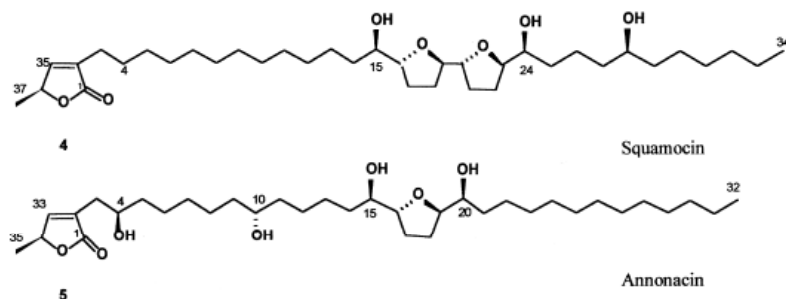
Daun tunggal, berseling, helaian bentuk elips memanjang sampai bentuk lanset, ujung tumpul, sampai meruncing pendek, panjang 6-17 cm, lebar 2,5-7,5 cm, tepi rata, gundul, hijau mengkilat. Bunga tunggal, dalam berkas, 1-2 berhadapan atau di samping daun. Daun kelopak segitiga, waktu kuncup bersambung seperti katup, kecil. Daun mahkota segitiga, yang terluar berdaging tebal, panjang 2-2,5 cm, putih kekuningan, dengan pangkal yang berongga berubah ungu, daun mahkota yang terdalam sangat kecil atau mereduksi.

Dasar bunga bentuk tugu (tinggi). Benang sari berjumlah banyak, putih, kepala sari bentuk topi, penghubung ruang sari melebar, dan menutup ruang sari. Putik banyak, setiap putik tersusun dari 1 daun buah, ungu tua, kepala putik duduk, rekat menjadi satu, mudah rontok. Buah majemuk agregat, berbentuk bulat membengkok di ujung, garis tengah 5-10 cm, permukaan berduri, berlipit, bagian buah dengan ujung yang melengkung, pada waktu masak sedikit atau banyak melepaskan diri satu dengan yang lain, daging buah putih keabuabuan. Biji dalam satu buah agregat banyak hitam mengkilat.

Tanaman mulai berbuah pada umur 1-2 tahun dan untuk mendapatkan hasil yang maksimal tidak dilakukan pemangkasan. Buah lebat dicapai setelah tanaman berumur 3-4 tahun. Pemanenan dilakukan pada saat buah berwarna kekuningan atau sekitar 110-120 hari setelah berbunga. (Backer dan Bakhuizen, 1965)

d. Kandungan kimia biji srikaya

Secara umum, biji srikaya mengandung senyawa poliketida dan suatu senyawa turunan bistetrahidrofurana; asetogenin (skuamostanin A, B, C, D, anonain, anonasin A, anonin 1, IV, VI, VIII, IX, XVI, bulatasin, bulatasinon, skuamon, ncoanonin B, neo desasetilurarisin, neo retikulasin A, skuamosten A, asmisin, skuamosin, sanonasin, anonastatin, neoanonin). Juga ditemukan skuamosin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N; asam lemak, asam amino dan protein. Komposisi asam lemak penyusun minyak lemak biji srikaya terdiri dari metil palmitat, metil stearat, metil linoleat (Sudarsono, 2002).



Gambar 1. Struktur asetogenin

e. Khasiat biji srikaya

Secara empirik biji srikaya berkhasiat sebagai pembunuh serangga (insektisida), memacu enzim pencernaan, dan abortivum (Gunawan *et al.*, 2001). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan immunosupresif (Xie *et al.*, 2003; Pardhasaradhi *et al.*, 2004; Pardhasaradhi *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009).

2. Metode Penyarian

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 bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani (yang telah dikeringkan) menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15-20°C dalam waktu 3 hari sampai bahan-bahan yang larut akan melarut (Ansel, 1989).

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar. Begitu pula senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Harborne, 1987).

Salah satu metode fraksinasi adalah dengan menggunakan kromatografi kolom. Kolom diisi dengan penyerap padat sebagai fase diam dan dialiri dengan pelarut sebagai fase gerak. Sebagian kecil cuplikan yang ingin difaksinasi dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom yang akan membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa. Bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran dari fase gerak dan campuran itu sendiri (Sastrohamidjojo, 1991)

3. Sel Kanker Payudara (T47D)

Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Sel kanker payudara pertama kali diambil dari jaringan payudara seorang wanita berumur 54 tahun yang terkena *ductal carcinoma*. Sel ini dapat ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Anonim^a, 2011). Kanker payudara dapat terjadi pada pria maupun wanita, hanya saja prevalensi pada wanita jauh lebih tinggi (Anonim^c, 2011).

Sel T47D ini dapat ditumbuhkan dengan medium penumbuh RPMI 1640 dengan *fetal bovine serum 10%* dan antibiotik bebas pada suhu 37°C dan dapat tumbuh secara kontinyu, menempel pada dasar flask. Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik dan glukosa. Serum mengandung hormon yang memacu pertumbuhan sel, albumin merupakan protein transport, lipid yang diperlukan untuk pertumbuhan sel dan mineral yang merupakan kofaktor enzim (Freshney, 1987). Sel tumor dengan mutasi p53, diketahui terjadi pengurangan respons terhadap agen-agen yang menginduksi apoptosis dan tumor-tumor tersebut kemungkinan menjadi resisten terhadap obat antineoplastik yang memiliki target pengrusakan DNA (Crawford, 2003 cit Anonim^a, 2011).

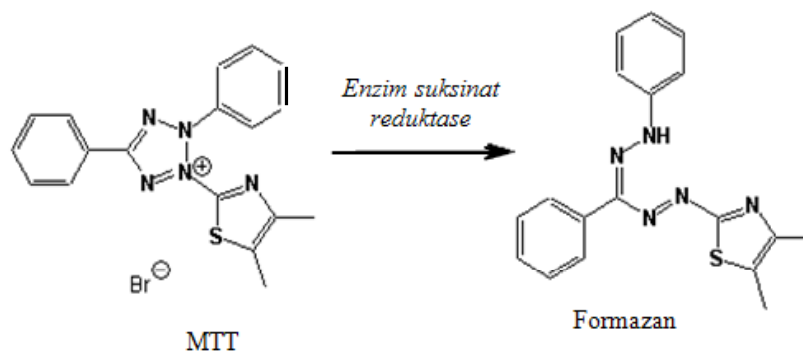
4. Sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksitas pada kultur sel merupakan salah satu cara

penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney, 1987).

Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode *MTT assay*. Uji *MTT assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Metode ini merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan (Gambar 2) oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan *ELISA reader* (Junedy, 2005).



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan oleh enzim reduktase.

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan penghambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto dkk, 2003).

E. Landasan Teori

Menurut penelitian Yang *et al.* (2009) menyebutkan bahwa senyawa sitotoksik yang di isolasi dari fraksi nonpolar ekstrak etanol 95% biji srikaya terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel tumor seperti *human colon adenocarcinoma* (HCT) dengan nilai IC_{50} $3,97 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, *human lung carcinoma* (A-549) dengan nilai IC_{50} $5,67 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, *human breast carcinoma* (MCF-7) dengan nilai IC_{50} $5,63 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, dan *human prostate adenocarcinoma* (PC-3) dengan nilai IC_{50} $1,62 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Xie *et al.* (2003) juga mengemukakan bahwa senyawa asetogenin dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap sel tumor. Asetogenin banyak terkandung dalam bangsa *Annonaceae* yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker, parasitoidal, dan antimikroba (Pardhasaradhi, 2004). *Acetogenin* adalah senyawa *polyketides* dengan struktur 30–32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Ekstrak diklorometan konsentrasi 5% dan ekstrak air konsentrasi 25% dari biji srikaya juga memiliki aktivitas antitumor terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al.*, 2005)

F. Hipotesis

Fraksi nonpolar ekstrak etanol biji srikaya (*Annona squamosa* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.