

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Sitotoksik digunakan untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker. Oleh karena itu biasanya uji sitotoksik dilakukan pada suatu ekstrak pada sel kanker.

Kanker merupakan penyakit yang menempati peringkat kedua sebagai penyebab kematian (Anderson, 2001). Sejak dahulu hingga sekarang penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa pada tahun 2008 hampir 460.000 wanita meninggal karena kanker payudara (Anonim^a, 2011). Penderita kanker payudara di Indonesia sebanyak 12,10%, terbanyak kedua setelah kanker leher rahim (19,18%) (Tjindarbuni dan Mangunkusumo, 2002).

Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan berbagai cara, antara lain operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi, kemoterapi, serta yang berkembang sekarang adalah imunoterapi. Salah satu masalah yang mempersulit upaya pengobatan kanker adalah kondisi ekonomis sebagian besar masyarakat yang belum memadai. Oleh karena itu dibutuhkan obat dari alam karena alam merupakan sumber agen terapeutik yang potensial selama ribuan tahun (Ira dan Prio, 2009).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tumbuhan *Annona squamosa* yang lebih dikenal dengan nama srikaya. Srikaya adalah tanaman yang tergolong ke dalam genus *Annona* yang berasal dari daerah tropis. Srikaya termasuk pohon buah-buahan kecil yang tumbuh di tanah berbatu, kering, dan terkena cahaya matahari langsung. Tumbuhan yang asalnya dari Hindia Barat ini akan berbuah setelah berumur 3-5 tahun (Gunawan dkk, 2001).

Penelitian Yang *et al* (2009) tentang senyawa sitotoksik asetogenin yang diisolasi dari biji srikaya menyebutkan bahwa dalam biji srikaya terkandung

senyawa asetogenin yang memiliki aktivitas biologi dengan *range* luas seperti aktivitas sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan immunosupressife. Selain itu pernyataan ini juga diperkuat dengan adanya bukti bahwa kandungan skuamosin A dan skuamosin B di dalam memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *Human Breast Carcinoma* (MCF-7) dengan nilai IC_{50} $1,17 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji pendahuluan ini mengindikasikan bahwa senyawa asetogenin yang terdapat dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik sehingga berpotensi sebagai kandidat yang menjanjikan untuk generasi masa depan sebagai obat untuk melawan tumor atau kanker (tumor ganas). Penelitian Xie *et al.* (2003) juga mengemukakan bahwa senyawa asetogenin dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap sel tumor. Aktivitas sitotoksik pada ekstrak organik biji srikaya memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel tumor payudara (MCF-7) lebih baik dibandingkan ekstrak airnya (Pardhasaradhi *et al.*, 2004; Pardhasaradhi *et al.*, 2005).

Oleh karena itu, dengan adanya aktivitas sitotoksik isolat biji srikaya terhadap sel kanker payudara (MCF-7) mendorong peneliti untuk menguji aktivitas sitotoksik fraksi polar ekstrak etanol biji srikaya. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat tentang pemilihan obat antikanker yang murah, praktis, mudah diperoleh serta memiliki efek samping yang relatif kecil dibanding obat-obat modern.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah fraksi polar ekstrak etanol biji Srikaya (*Annona squamosa* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D?
2. Berapakah harga IC_{50} dari fraksi polar ekstrak etanol biji Srikaya (*Annona squamosa* L.)?

C. Tujuan Penelitian

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

1. Mengetahui aktivitas sitotoksik dari fraksi polar ekstrak etanol biji Srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap sel T47D.
2. Menentukan nilai IC₅₀ dari fraksi polar ekstrak etanol biji Srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap sel T47D.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman srikaya

a. Klasifikasi tanaman

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Magnoliopsida (Berkeping dua/ dikotil)
 Sub Kelas : Magnoliidae
 Ordo : Magnoliales
 Famili : *Annonaceae*
 Genus : *Annona*
 Spesies : *Annona squamosa* L. (Cronguist, 1981)

b. Nama daerah

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

c. Morfologi tumbuhan

Perawakan perdu sampai pohon, berumah satu, berkelamin banci, dan tinggi 2-7 m. Batang gilik, percabangan simpodial, ujung rebah, dan kulit batang coklat muda. Kulit pohon tipis berwarna keabu-abuan serta 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, dan hijau mengkilat. Bunga tunggal, dalam berkas, 1-2 berhadapan atau disamping 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, dan mudah rontok. Buah majemuk agregat, berbentuk bulat membengkok di ujung, garis tengah 5-10 cm, permukaan berduri, berlilin, bagian buah dengan ujung yang melengkung, pada waktu masak sedikit atau banyak melepas diri satu dengan yang lain, dan daging buah putih keabu-abuan. Biji dalam satu buah agregat banyak hitam mengkilat (Gunawan dkk, 2001).

Biji srikaya secara makroskopik adalah biji keras, bentuk bulat telur terbalik, panjang 6 mm sampai 18 mm, lebar 4 mm sampai 9 mm, tebal di bagian tengah lebih kurang 6 mm. Permukaan biji licin, kulit biji tipis, warna hitam mengkilat atau agak kecoklatan. Keping biji berwarna putih kecoklatan. Sedangkan secara mikroskopik adalah pada penampang melintang biji tampak epidermis terdiri dari satu lapis sel, bentuk hampir persegi; dibawahnya terdapat beberapa lapis sel batu bentuk hampir bulat, dinding tebal bernoktah, lumen sempit; epidermis keping biji terdiri dari lapisan serabut yang letaknya tidak

beraturan ada yang menjorok ke endosperm. Sel serabut; panjang, keduanya runcing, dinding tebal (Anonim, 1989).

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 (Gunawan, 2001).

d. Kandungan kimia

Secara umum, biji mengandung senyawa asetogenin, skuamosin A, skuamosin B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N; skuamostat B, asam lemak, asam amino, dan protein. Komposisi asam lemak penyusun minyak lemak biji srikaya terdiri dari metal palmitat, metal stearat, metal linoleat (Sudarsono, 2002).

e. Khasiat biji srikaya

Biji berkhasiat memacu enzim pencernaan, abortivum, anthelmintik, dan pembunuh serangga (insektisida). Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai obat yaitu daun, akar, buah, kulit kayu, dan bijinya (Dalimartha, 2003). Kandungan skuamosin A dan skuamosin B di dalam senyawa asetogenin memiliki efek sitotoksik pada tumor yaitu human breast carcinoma (MCF-7). Senyawa ini terdapat pada bagian biji srikaya (*Annona squamosa* L.) (Yang *et al.*, 2009, Rahman *et al.*, 2005). Selain itu berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan immunosupresife (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).

Proses penyarian dilakukan dengan cara ekstraksi di mana terjadi proses penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. 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 atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Ansel, 1989).

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi-fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar. Begitu pula senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (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 di fraksinasi 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)

Salah satu cara pemisahan adalah kromatografi cair vakum. Kromatografi cair vakum adalah kromatografi kolom yang dipercepat dan bekerja pada kondisi vakum. Alat yang digunakan terdiri dari corong G-3, sumbat karet, pengisap yang dihubungkan dengan pompa vakum serta wadah penampung fraksi (Soediro dkk, 1986).

3. Kanker

a. Tinjauan umum

Kanker disebabkan karena ketidakaturan kerja hormon yang mengakibatkan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas. Tumor atau neoplasma adalah kelompok sel yang mendadak menjadi liar dan memperbanyak diri secara cepat dengan tidak tertahan yang mengakibatkan pembengkakan atau benjolan (Tjay dan Rahardja, 2000).

b. Karakteristik sel kanker

Beberapa sifat sel kanker antara lain:

- 1) Kontrol pertumbuhan sudah hilang.
 - 2) Daya melekat sel satu dengan yang lain berkurang.
 - 3) Inhibisi kontak sudah tidak ada.
 - 4) Sistem enzimnya lebih sedikit jumlah/macamnya, misalnya sel kanker tidak mempunyai asparagin sintetase.
 - 5) Enzim – enzim untuk pertumbuhan lebih besar dibanding sel normal.
- (Mulyadi, 1997)

Kanker sebenarnya merupakan suatu tumor atau neoplasma atau neoblastoma 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).

c. Penyebab sel kanker

Beberapa faktor penyebab kanker karsinogen antara lain :

1) Senyawa kimia (zat karsinogen)

Senyawa kimia bisa menyebabkan terjadinya kanker seperti ter atau jelaga berupa cairan atau gas sebagai hasil pembakaran zat biologi. Di dalam ter terkandung karsinogen berupa benzena, toluena, fenol, dan aerosol (Sukardja, 2004).

2) Faktor fisika

Radiasi merupakan faktor fisika yang utama. Pengaruh radiasi pada molekul DNA menimbulkan :

- a) Perubahan yang dapat kembali (reversibel)
- b) Molekul DNA berubah (rusak) dan sel akan mati
- c) Terjadi perubahan pada molekul DNA yang tidak dapat kembali (irreversibel) dan mulai terjadinya kanker (Mulyadi, 1997).

Radiasi dapat menyebabkan DNA mengalami mutasi yang menyebabkan kemampuan DNA dalam mengontrol sifat suatu sel menjadi hilang. Sel tumbuh sendiri tanpa terkendali dan mempunyai sifat yang berbeda dengan sel normal yang menyebabkan terjadinya kanker.

3) Hormon

Pengamatan klinik pada manusia membuat sangat akseptabel bahwa terjadinya kanker dan sifat karsinoma payudara, endometrium, dan prostat dipengaruhi oleh hormon-hormon endogen atau eksogen (Velde *et al.*, 1996).

4) Virus

Human papiloma virus (HPV) menyebabkan perubahan paraneoplas dan neoplastik di dalam serviks uteri. Sedangkan kanker pada sel hepar disebabkan oleh virus hepatitis B (HBV) (Velde *et al.*, 1996).

Rous Sarcoma Virus (RSV) dapat menyebabkan kanker pada ayam, leukemia pada burung dan mamalia, Mork Disease Virus (MPV) menyebabkan limphoma pada ayam (Mulyadi, 1997).

4. Sel T47D

Kanker payudara merupakan kanker terbesar dan terbanyak yang dialami oleh wanita Indonesia (Dalimartha, 2003). Sel T47D merupakan *continous cell lines* yang morfologinya seperti sel epitel yang 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 Institut*) 1640 (Anonim^b, 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. Seluruh komponen dalam media RPMI-serum tersebut untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Freshney, 1987).

Awalnya, proses metastase kanker payudara di inisiasi oleh adanya aktivasi atau overekspresi beberapa protein seperti reseptor estrogen (ER) dan c-erbB-2 (HER2) yang merupakan protein predisposisi kanker payudara. Sekitar 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang tergantung estrogen dan sekitar 30% kasus merupakan kanker yang positif mengekspresi HER-2 berlebihan. Adanya kompleks estrogen dengan reseptornya juga akan memacu transkripsi beberapa gen tumor suppressor seperti BRCA1, BRCA2, dan p53. Akan tetapi pada penderita kanker payudara (yang umumnya telah lewat masa menopause) gen-gen tersebut telah mengalami perubahan akibat dari *hiperproliferasi* sel-sel payudara selama perkembangannya sehingga tidak berperan sebagaimana mestinya (Chintamani, 2007).

5. Uji sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Uji sitotoksitas pada kultur sel digunakan untuk penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney, 1986).

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 (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan langsung (*viable cell count*) yang merupakan sistem penetapan *in vitro* untuk uji pendahuluan suatu bahan obat yang mengandung sejumlah besar zat aktif yang berpotensi sebagai obat antikanker. Metode ini dilakukan dengan menambahkan larutan biru tripan pada setiap sumuran agar dapat membedakan sel yang hidup dan sel yang mati. Sel yang mati akan terlihat berwarna biru, karena mengalami

lisis sehingga protein dalam plasmanya akan berikatan dengan biru tripan sehingga sel menjadi biru (Ira dan Prio, 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 oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazon ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader* (Junedy, 2005). Semakin besar harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

E. Landasan teori

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yang *et al* (2009) menyebutkan bahwa dalam biji srikaya terkandung senyawa asetogenin yaitu skuamosin A dan skuamosin B yang memiliki aktivitas biologi dengan range luas seperti aktivitas sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan immunosuppressife. Penelitian Xie *et al.* (2003) juga mengemukakan bahwa senyawa asetogenin dalam biji srikaya memiliki aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap sel tumor. Aktivitas sitotoksik pada ekstrak organik biji srikaya memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel tumor payudara (MCF-7) lebih baik dibandingkan ekstrak airnya (Pardhasaradhi *et al.*, 2004; Pardhasaradhi *et al.*, 2005).

F. Hipotesis

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