LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

UJI ANTIKANKER DAN INDUKSI APOPTOSIS FRAKSI KLOROFORM DARI DAUN PEPAYA (*Carica papaya*) TERHADAP KULTUR SEL KANKER

Oleh:

Drs. Sukardiman, MS.,Apt.
Dra. Wiwied Ekasari, MSi.Apt

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005
Nomor Urut : 4.

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

November, 2005

LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

UJI ANTIKANKER DAN INDUKSI APOPTOSIS FRAKSI KLOROFORM DARI DAUN PEPAYA (*Carica papaya*) TERHADAP KULTUR SEL KANKER

Oleh:

Drs. Sukardiman, MS.,Apt.
Dra. Wiwied Ekasari, MSi.Apt

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005
Nomor Urut : 4.

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

November, 2005

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp.(031) 5995246, 5995248,5995247 Fax (31) 5962066
E-mail : infolemlit@unair.ac.id – htt: //lppm.unair.ac.id

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian	: UJI ANTIKANKER DAN INDUKSI APOPTOSIS FRAKSI KLOROFORM DARI DAUN PEPAYA (*CARICA PAPAYA* L) TERHADAP KULTUR SEL KANKER
b. Macam Penelitian	: (V) Fundamental () Terapan () Pengembangan
c. Kategori penelitian	: I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap	: **Drs.Sukardiman,Apt,MS**
b. Jenis Kelamin	: Laki-laki
c. Pangkat/Gol/NIP	: Pembina / IVb / 131 801 629
d. Jabatan Sekarang	: Lektor Kepala
e. Fakultas	: Farmasi Unair
f. Universitas	: Airlangga
g. Bidang Ilmu yang Di teliti	: Farmakognosi – Bahan Alam
3. Jumlah Peneliti	: 2 orang
4. Lokasi Penelitian	: Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair
5. Kerjasama dengan instansi lain :	
a. Nama instansi	: PUSVETMA
b. Alamat	: Jl. Achmad Yani , Surabaya
6. Jangka waktu penelitian	: 10 Bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 15.000.000,-

Surabaya, 21 Desember 2005

Mengetahui
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Airlangga

Prof.Dr.Noor Cholies Zaini, Apt
NIP : 130 355 372

Ketua Peneliti

Drs.Sukardiman,Apt,MSi
NIP : 131 801 629

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

Prof.Dr.H.Sarmanu,MS
NIP : 130 701 125

RINGKASAN

UJI ANTIKANKER DAN INDUKSI APOPTOSIS FRAKSI KLOROFORM DARI DAUN PEPAYA (CARICA PAPAYA L) TERHADAP KULTUR SEL KANKER

(Sukardiman, Wiwied Ekasari, 2004, 49 halaman)

Penyakit kanker masih merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular, serta masih adanya obat-obat kemoterapi untuk antikanker yang menyebabkan efek samping dimana selain membunuh sel kanker maupun sel normal. Sehingga dewasa ini banyak dikembangkan pencarian dan penelitian bahan bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang mempunyai khasiat sitotoksik atau antikanker yang potensial dan selektif.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas antikanker dan induksi apoptosis dari fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) terhadap sel kanker mieloma secara in vitro.

Penelitian dilakukan dengan tahapan pertama melakukan fraksinasi daun pepaya (*Carica papaya* L) dengan cara ekstraksi secara bertahap dengan kloroform , kemudian dilakukan identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan densitometri. Sel mieloma dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Fraksi kloroform dibuat dengan konsentrasi 25 ; 50 ; 75 ;100 ;150 ; 250 µg/ml dengan penambahan DMSO, dan ditambahkan kedalam biakan kultur sel mieloma dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO_2 selama 24 jam. Pengamatan aktivitas antikanker ditentukan dengan metode viabilitas sel dengan pewarnaan tripan biru dan aktivitas induksi apoptosis ditentukan dengan metode pewarnaan etidium bromide dan akridin orange dan dilakukan analisis dengan mikroskop flouresent. Analisis data dilakukan dengan analisis varian dan dilanjutkan dengan penentuan harga IC_{50}.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) memiliki aktivitas antikanker dan induksi apoptosis terhadap sel kanker mieloma secara in vitro.

Disarankan untuk penelitian lebih lanjut dari terhadap isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif dari fraksi kloroform dari daun peapaya (Carica papaya L) yang memiliki aktivitas antikanker dan induksi apoptosis terhadap kultur sel kanker mieloma mencit.

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,)

kata kunci : antikanker; kloroform ; daun pepaya. (carica papaya L.)

SUMMARY

ANTICANCER AND APOPTOSIS INDUCTION ACTIVITY OF CHLOROFORM FRACTION OF DAUN PEPAYA (CARICA PAPAYA L) AGAINST CANCER CELLS CULTURE

(Sukardiman, Wiwied Ekasari, 2004, 49 pages)

The cancer diseases are the second causing of human death after the cardiovascular diseases, and the many of anticancer chemotherapy causing side effect, which their killing cancer and normal cells. Now, many development and research to discovery of the bioactive compounds from Indonesian medicinal plants which have potential and selective anticancer activity.

The objective of this research was evaluated activity of chloroform fraction of daun papaya (*Carica papaya* L) against anticancer and apoptosis induction activity against mieloma cells in vitro.

These research has been carried out by the first step is fractionation activity with chloroform by extraction with step method and to identification compound by Thin Layer Chromatography (TLC) and densitometry . The mileoma cells were incubated in RPMI media, Fetal Bovine Serum 10%.The concentration of chloroform fraction were made many concentrations 25 ; 50 ; 75 ;100 ;150 ; 250 µg/ml, with initially dissolved in DMSO, and their solution to addition into mieloma cells culture and then to incubated for 24 hours, at 37°C in CO_2 incubator. Determination of anticancer activity are calculated by cell viability method with trypan blue exclusion. Determination of apoptosis induction activity are calculated by ethidium bromide and acridine orange exclusion and analysis by fluorescent microscope. The data analysed by analysis of variant and determination of IC_{50} by percent probit.

The result of these research showed that chloroform fraction of daun papaya (*Carica papaya* L) have anticancer and apoptosis induction activity against mieloma cells culture in vitro.

Researcher was suggested to planed future research of the isolation and identification of chloroform fraction of daun papaya (*Carica papaya* L) have anticancer and apoptosis induction activity .

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul :

UJI ANTIKANKER DAN INDUKSI APOPTOSIS FRAKSI KLOROFORM DARI DAUN PEPAYA (CARICA PAPAYA L) TERHADAP KULTUR SEL KANKER

Pada kesempatan ini Tim Peneliti menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga.
2. Kepala Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan, Ditjen Dikti, Depdiknas.
3. Kepala Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
4. Kepala PUSVETVA Farma Surabaya
5. Dekan Fakultas Farmasi Unair.
6. Kepala Bagian Imu Bahan Alam, Fakultas Farmasi Unair.
7. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini kurang sempurna, oleh sebab itu tim peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya penelitian ilmiah ini menjdi lebih sempurna.

Semoga penelitian tentang bioaktivitas antianker dari tanaman obat Indonesia ini bermanfaat bagi pembaca, khususnya peminat bidang aktivitas antikanker dari natural product atau bahan alam hayati Indonesia.

Surabaya, 14 Desember 2005

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR TABEL

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan penyebab kedua lebih dari 500.000 kematian di Amerika Serikat per tahun setelah penyakit jantung (Katzung, 1995). Pada tahun 1998, lebih dari 50% kasus kematian karena kanker di Amerika Serikat disebabkan oleh kanker payudara, prostat, paru-paru, dan kolon atau rektal (*National Cancer Institute*, 2001). Sedangkan di Indonesia, menurut catatan Departemen Kesehatan diperkirakan setiap tahun terdapat 100 penderita kanker baru dari 100.000 penduduk. Dengan jumlah penduduk lebih dari 200 juta, diperkirakan terdapat lebih dari 200.000 penderita kanker baru setiap tahunnya (Anonim, 2003).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain dengan pembedahan, radiasi, kemoterapi, endokrinoterapi, dan imunoterapi (Soekardjo, 2000). Dengan metoda pengobatan terkini, sepertiga dari penderita dapat disembuhkan dengan tindakan lokal, yaitu pembedahan atau terapi radiasi, yang cukup efektif bila belum terjadi metastase pada awal terapi. Adanya mikrometastase awal yang merupakan karakteristik dari neoplasma, menjadi indikasi dibutuhkannya terapi sistemik, yaitu kemoterapi (umumnya dikombinasi dengan pembedahan dan radiasi) untuk manajemen terapi kanker yang efektif. Terapi kombinasi tersebut dapat digunakan untuk membunuh baik neoplasma primer maupun mikrometastase yang tersembunyi sebelum penyebarannya dapat dideteksi oleh pemeriksaan fisik atau sinar X. Saat ini, 17% penderita kanker sembuh dengan kemoterapi sehingga ditambah dengan pembedahan dini, 50% penderita kanker dapat disembuhkan (Katzung, 1995).

Obat kemoterapi atau antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel kanker tanpa membahayakan sel normal. Sampai saat ini belum ada obat yang memenuhi kriteria tersebut. Selain itu, ada masalah utama yang dihadapi oleh kemoterapi kanker yaitu resistensi obat. Oleh karena itu, pengembangan obat antikanker dilakukan melalui skrining empirik, desain rasional senyawa obat baru maupun terapi genetik yang telah dilakukan selama tiga dekade terakhir ini (Katzung, 1995).

Salah satu sumber obat-obatan antikanker berasal dari tumbuhan dan beberapa di antaranya telah digunakan masyarakat luas secara klinis. WHO sebagai organisasi kesehatan terbesar di dunia telah menyarankan penggunaan obat tradisional. Karena ketersediaan hayati, biaya produksi dan toksisitas yang rendah serta efek sampingnya yang terbatas, WHO turut mensponsori proyek *International R&D* untuk mencari obat-obatan baru dari tumbuhan, terutama tumbuhan tropis (Roja, 2000).

Di Indonesia, pelaksanaan program *High Throughput Screening* (HTS) untuk pencarian bahan bioaktif antikanker dari tanaman Indonesia dengan molekul target enzim *DNA Topoisomerase II* telah dilakukan diantaranya oleh Sukardiman pada tahun 2000, terhadap 22 jenis tanaman yang berasal dari Indonesia. Pemilihan 22 jenis tanaman ini didasarkan pada penggunaan secara empiris di masyarakat bahwa tanaman tersebut digunakan sebagai obat tradisional antikanker. Adapun salah satu tanaman yang diteliti adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.).

Di Australia, daun pepaya telah terbukti secara empirik dapat mengobati kanker. *Gold Coast Bulletin* mendukung temuan ini dengan menerbitkan artikel-artikel mengenai keberhasilan penggunaan daun pepaya untuk mengobati kanker. Secara empirik pula, jenis pepaya yang digunakan untuk pengobatan adalah pepaya jantan (Tietze, 2002). Di Indonesia sendiri, penggunaan daun pepaya untuk mengobati kanker juga telah dilakukan (Dalimartha, 2003).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sukardiman (2000) menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim *DNA Topoisomerase II*. Enzim *DNA Topoisomerase* memegang peranan penting dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA, dan proliferasi dari sel; termasuk sel kanker. Dengan meningkatnya jumlah dan aktivitas enzim tersebut pada sel kanker maka proses replikasi, transkripsi, dan proliferasi sel kanker juga akan meningkat (Sukardiman, 2000). Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi / kerusakan

DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker yang diduga melalui mekanisme apoptosis.

Pada tahun 2001 juga dilakukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas antikanker dari ekstrak metanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel mieloma mencit. Dari penelitian tersebut, ekstrak metanol dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) dinyatakan memiliki aktivitas antikanker (Huda, 2001).

Berdasarkan data empirik dan penelitian pendahuluan dapat diduga bahwa ada kandungan dalam daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang memiliki aktivitas antikanker. Alkaloid merupakan kandungan metabolit sekunder mayoritas yang terdapat di daun pepaya (*Carica papaya* L.), yaitu sebesar 1000-1500 μg/mL (Duke,1996) sehingga diduga bertanggungjawab terhadap aktivitas antikankernya.

Berbagai golongan senyawa aktif antikanker berhasil diisolasi dari tumbuh-tumbuhan dan beberapa di antaranya termasuk ke dalam golongan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut antara lain campothecin yang diisolasi dari tanaman *Campotheca acuminata*, ellipticine yang diisolasi dari tanaman *Ochrosia elliptica*, serta harringtonine, yang diisolasi dari tanaman *Cephalotaxus harringtonia*. Vinkristin dan vinblastin yang telah ditemukan telebih dahulu juga termasuk senyawa alkaloid (Roja, 2000).

Penelitian terbaru yang dimuat Planta Medika bulan November 2003 menyebutkan bahwa dua senyawa yang diisolasi dari bunga tanaman *Senna spectabilis* dan satu senyawa derivat semisintetiknya terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap KB *cell lines*. Ketiga senyawa tersebut juga termasuk ke dalam golongan alkaloid (Sriphong, 2003).

Hultin dan Torssell (1965) mengemukakan cara khas untuk mengisolasi alkaloid dari tumbuhan melalui ekstraksi jaringan kering tumbuhan tersebut dengan metanol asam kemudian dibasakan dengan NH_4OH pekat dan dilanjutkan oleh ekstraksi dengan kloroform (Harborne, 1987). Fraksi kloroform tersebut diharapkan mengandung alkaloid yang diinginkan. Maka dari itu, penelitian ini dilakukan penelitian lanjutan terhadap aktivitas antikanker dan induksi apoptosis dari kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) mempunyai aktivitas antikanker dan induksi apoptosis terhadap sel kanker mieloma mencit ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Carica papaya* L.

2.1.1 Klasifikasi

Divisi	:	Spermatophyta
Anak divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Anak kelas	:	Dialypetalae
Bangsa	:	Parietales
Suku	:	Caricaceae
Marga	:	*Carica*
Jenis	:	*Carica papaya* L.

(Tjitrosoepomo, 1988)

2.1.2 Nama Daerah

Sumatera	:	Kabaelo, peute, pertek, pastelo, ralempaya, betik, embetik, botik, bala, si kailo, kates, kepaya, kustela, papaya, pepaya, sangsile, batiek, kalikih, pancene, pisang, katuka, pisang patuka, pisang pelo, gedang, punti kayu.
Jawa	:	Gedang, katela gantung, kates, ghedhang.
Kalimantan	:	Bua medung, pisang malaka, buah dong, majan, pisang mantela, gadang, bandas.
Nusatenggara	:	Gedang, kates, kampaja, kalujawa, padu, kaut, panja, kalailu, paja, kapala, hango,muu jawa, muku jawa, kasi.
Sulawesi	:	Kapalay, papaya, pepaya, kaliki, sumoyori, unti jawa, tangan-tangan nikanre, kaliki nikanre, kaliki rianre.
Maluku	:	Tele, palaki, papae, papaino, papau, papaen, papai, papaya, sempain, tapaya, kapaya.
Irian	:	Sampain, asawa, menam, siberiani, tapaya.

(Materia Medika, 1989)

2.1.3 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Pepaya tumbuh dengan sangat baik di daerah-daerah tropis dengan suhu berkisar antara 24-25°C. Pepaya juga mentoleransi pH tanah sebesar 4,3-8 dengan pH ideal 6. Tanaman ini membutuhkan tanah kering karena akar pepaya akan membusuk bila tergenang air (Tietze, 2002).

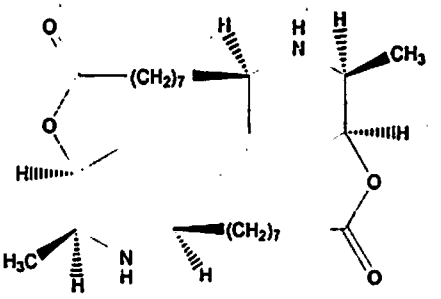
2.1.4 Morfologi

Semak berbentuk pohon, bergetah, tinggi 2,5-10 m, batang bulat berongga, kulit batang terdapat tanda bekas tangkai daun. Daun berkumpul di ujung batang, tangkai daun bulat silindris, berongga, panjang 25-100 cm. Helai daun berbentuk bulat telur, berbagi menjari, ujung runcing, pangkal berbentuk jantung, tulang daun menonjol di permukaan bawah, warna permukaan atas hijau tua, warna permukaan bawah lebih muda. Cuping-cuping daun berlekuk sampai berbagi tidak beraturan. Bunga jantan berkumpul dalam tandan, mahkota bentuk terompet, warna putih kekuningan. Buahnya buah buni dengan bentuk, warna dan rasa daging buah bermacam-macam. Bijinya banyak, berwarna hitam (Materia Medika, 1989; Dalimartha, 2003).

2.1.5 Kandungan

Kandungan dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) antara lain asam askorbat, beta karoten, besi, enzim papain, alkaloid karpaina, pseudo-karpaina, kalsium, glikosid, karposid, lemak, niasin, serat, dan saponin (Materia Medika, 1989; Duke, 1996).

Struktur kimia dari alkaloid karpain yang diduga memiliki aktivitas antikanker adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Struktur kimia alkaloid karpaina

2.1.6 Kegunaan

Untuk pengobatan cacing kremi, demam, malaria, beri-beri, disentri amuba, ASI tidak lancar, elephantiasis (kaki gajah), tidak nafsu makan, peluruh haid, dan penyakit kanker (Dalimartha, 2003). Selain itu, berdasarkan fakta empirik ternyata pepaya juga dapat digunakan untuk pengobatan alergi, asma, bronkitis, luka bakar, sembelit, batuk kronis atau yang disertai sesak nafas, gangguan pencernaan, radang kaki, flu, gastritis, serangan jamur, infeksi kulit atau digigit serangga, rematik, hemoroid, hipertensi, keracunan ubur-ubur, kesehatan mulut dan gigi, gangguan tenggorokan, dan kekurangan gizi (Tietze, 2002).

Selain kegunaannya dalam mengatasi berbagai penyakit, pepaya juga dapat digunakan untuk keperluan (Tietze, 2002), sebagai berikut :

(1) Kecantikan

Mengobati dan menghilangkan bekas jerawat dan bercak-bercak pada kulit, mengendalikan kegemukan, menghaluskan kulit

(2) Pengendalian kehamilan (aborsi)

(3) Pelunak daging

(4) Penghapus noda

(5) Pengawet bir

(6) Produksi sutra

(7) Bahan tambahan untuk permen karet, pasta gigi, shampo

2.1.7 Penelitian Pendahuluan tentang Daun Pepaya

Sukardiman dan Hadi Poerwono telah melakukan penelitian terhadap 22 jenis tanaman obat Indonesia yang secara tradisional telah digunakan sebagai antikanker. Penelitian ini menggunakan teknologi *High Throughput Screening* (HTS) terhadap berbagai ekstrak tanaman obat Indonesia dengan menggunakan berbagai metode penapisan. Dalam aplikasinya, penelitian ini menggunakan molekul target enzim *DNA Topoisomerase* sebagai enzim yang berperan penting dalam proses intraseluler sel kanker antara lain dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi *DNA* dan proliferasi sel kanker. Salah satu bahan tanaman yang diteliti adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.). Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa ekstrak metanol daun pepaya masih memberikan aktivitas

inhibisi terhadap enzim *DNA Topoisomerase II* sampai konsentrasi 10 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun pepaya memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim *DNA Topoisomerase II* seperti yang dinyatakan oleh Zahir, 1996, bahwa suatu senyawa dikatakan aktif sebagai inhibitor enzim *DNA Topoisomerase II* apabila harga MED < 10 µg/mL (Sukardiman, 2000).

Pada tahun 2001, dilakukan lagi penelitian terhadap ekstrak metanol daun pepaya. Penelitian kali ini dimaksudkan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun pepaya terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak metanol daun pepaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel mieloma mencit yang dinyatakan dengan harga LC_{50} sebesar 336,17 µg/mL (Huda, 2001).

2.2 Tinjauan tentang Kanker

Tumor adalah istilah umum yang digunakan untuk segala pembengkakan atau benjolan yang disebabkan oleh apapun, baik oleh pertumbuhan jaringan baru maupun adanya pengumpulan cairan seperti kista atau benjolan yang berisi darah akibat benturan. Namun, istilah tumor umumnya digunakan untuk menyatakan adanya benjolan yang disebabkan oleh pertumbuhan jaringan baru, bukan radang. Karena itu, dikenal istilah tumor jinak (*benign*) dan tumor ganas (*malign*) yang disebut kanker. Bedanya dengan kanker, tumor jinak tumbuh lambat, setempat (lokal), tidak menyebar ke bagian tubuh lain serta jarang mengganggu kesehatan (Dalimartha, 2003).

Kanker pada dasarnya adalah suatu penyakit yang dikarakterisasi oleh gangguan atau kegagalan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel sehingga sel memiliki kemampuan untuk mengalami siklus proliferasi secara berulang-ulang. Akibatnya, sel mengalami multiplikasi yang tidak terkontrol. Selain itu, sel ini juga memiliki kemampuan menginvasi struktur jaringan di sekitarnya yang normal dan bermigrasi ke bagian tubuh yang lain (metastasis) serta mengadakan pertumbuhan (Katzung, 1995).

Suatu sel normal dapat berubah menjadi sel kanker karena ada perubahan pada DNA (*Deoxyribonucleotide Acid*) sel tersebut. Ada dua kategori perubahan

genetika yang dapat menyebabkan terjadinya kanker, yaitu inaktivasi gen supresor tumor dan aktivasi proto-onkogen menjadi onkogen (Rang, 1995).

Bila terjadi kerusakan DNA, gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi, menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal, p53 akan memacu terjadinya kematian sel melalui dua mekanisme, yaitu melalui penghentian siklus sel atau melalui jalur apoptosis. Sel yang gen p53-nya mengalami mutasi atau berikatan dengan virus, tidak mampu menghentikan replikasi DNA yang abnormal. Sel-sel tersebut akan terus mengalami mutasi dan translokasi kromosom sehingga berkembang menjadi kanker (Rang, 1995; Anonim, 2003).

Perubahan dari sel normal menjadi sel ganas dapat ditelusuri dari adanya distorsi atau gangguan dari gen pengatur pertumbuhan sel. Proto-onkogen merupakan gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan diferensiasi normal sel. Bila diaktivasi, baik oleh adanya virus tertentu maupun maupun sebagai hasil dari mutasi, proto-onkogen dapat berkembang menjadi onkogen aktif dan memacu timbulnya keganasan (Rang, 1995).

Beberapa karakteristik khusus yang membedakan sel kanker dengan sel normal (Rang, 1995), antara lain :

(1) Proliferasi tidak terkontrol
(2) Hilangnya kemampuan sel untuk berdiferensiasi
(3) Menginvasi jaringan lain
(4) Bermigrasi ke bagian tubuh lain melalui sirkulasi darah atau limfatik

Faktor-faktor penyebab timbulnya kanker masih belum diketahui pasti. Namun ada beberapa yang diduga dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker (Dalimartha, 2003), antara lain :

(1) Senyawa kimia

Sisa-sisa dari industri batubara, ter, zat pewarna, zat pengawet, bahan tambahan makanan dan minuman, CCl_4, asbes, merkuri, arsen, kromium, benzene, kloramfenikol, fenilbutason, senyawa nitrosamin, aflatoksin B_1, aflatoksin G_1, asap rokok, dan sitostatika.

(2) Faktor fisika

Radiasi sinar radioaktif, seperti sinar X, sinar radiasi bom atom.

(3) Virus

Virus hepatitis B dan C, *human papilloma virus*.

(4) Hormon

Diethylstilbesterol dan hormon estrogen lainnya.

Jenis pengobatan kanker yang dapat digunakan pada dasarnya sama, yaitu dengan pembedahan (operasi), penyinaran (radioterapi), kemoterapi, imunoterapi, pengobatan dengan hormon, tumbuhan obat, simplisia dari binatang dan mineral lainnya. Umumnya pengobatan dilakukan dengan salah satu atau kombinasi terapi di atas. Kombinasi beberapa obat yang mekanismenya berbeda digunakan untuk memaksimalkan efektivitas obat antikanker karena prinsip *total cell-killed* sangat penting bagi keberhasilan terapi ini. Tindakan, pengobatan, dan hasilnya tergantung dari jenis dan stadium atau tingkat keparahan kanker, serta keadaan pasien itu sendiri (Nafrialdi, 1995; Dalimartha, 2003).

2.3 Tinjauan tentang Antikanker

Obat antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel-sel kanker saja tanpa membahayakan sel-sel yang normal. Sampai saat ini belum ada obat yang mampu memenuhi kriteria tersebut. Oleh karena itu, penggunaan kliniknya dilakukan dengan memperhitungkan keuntungan atau kemanfaatannya dibandingkan efek toksisitasnya untuk dapat mencapai terapi yang optimal (Katzung, 1995). Adapun berbagai kelas obat antikanker atau kemoterapi (Soekardjo, 2000) adalah :

(1) Alkilator

Bekerja dengan membentuk senyawa kationik antara yang tidak stabil diikuti pemecahan cincin membentuk ion karbonium reaktif. Ion ini berikatan kovalen melalui reaksi alkilasi dengan gugus-gugus donor elektron, seperti gugus-gugus karboksilat, amin, fosfat, dan tiol, yang sangat dibutuhkan untuk proses biosintesis sel. Reaksi ini membentuk hubungan melintang antara dua rangkaian DNA dan mencegah mitosis.

Akibatnya, proses pembentukan sel terganggu dan terjadi hambatan pertumbuhan sel kanker.

Contoh : siklofosfamid, mekloretamin, melfalan, klorambusil

(2) Antimetabolit

Bekerja dengan menghambat jalur metabolik yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin, dan asam amino, serta jalur nukleosida pirimidin yang diperlukan pada sintesis DNA. Hambatan replikasi DNA ini dapat secara langsung maupun tidak langsung sehingga menyebabkan sel tidak berkembangbiak dan mengalami kematian.

Contoh : antagonis asam folat (metotreksat), antagonis purin (merkaptopurin, tioguanin, fludarabin, kladribin), antagonis pirimidin (fluorourasil, sitarabin, azasitidin)

(3) Antikanker Produk Alam

1. Antibiotik Antikanker

   Beberapa antibiotika yang mula-mula dikembangkan sebagai senyawa antibakteri ternyata didapatkan mempunyai efek sitotoksik tinggi. Efek samping tersebut dievaluasi dan kemudian dikembangkan menjadi obat-obat antikanker. Umumnya bekerja dengan menghambat sintesis DNA atau DNA dan RNA.

   Contoh : Mitomisin C bekerja dengan *cross-linking complementary DNA-strands* sehingga menghambat sintesis DNA.

2. Antikanker Produk Tanaman

   - Bekerja dengan mengikat tubuli dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumparan mitosis sehingga metafase terhenti.

     Contoh : Vinblastin, vinkristin

   - Bekerja dengan menghentikan pertumbuhan sel kanker pada fase S dan G_2.

     Contoh : Etoposida

- Bekerja dengan meningkatkan polimerisasi tubulin, kestabilan polimer mikrotubuli akan menyebabkan hambatan mitosis pada fase G_2 dan M.

  Contoh : Paklitaksel

3. Antikanker Produk Rekayasa Genetika

   Mekanisme kerja antikanker masih belum jelas, meskipun demikian diketahui pada percobaan *in vitro* Roferon-A (Interferon α-2a) menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada bermacam-macam tumor manusia.

   Contoh : Interferon α-2a (Roferon-A), Interferon α-2b (Intron-A)

(4) Hormon

Beberapa neoplasma dapat dikontrol dengan baik oleh hormon seks, seperti hormon androgen, progestin dan estrogen, serta hormon adrenokortikoid. Hormon androgen, progestin, estrogen dan hormon adrenokortikoid bekerja dengan mengikat secara khas reseptor pada sitoplasma dan mengubah struktur reseptor. Bentuk kompleks hormon-reseptor tersebut kemudian menuju inti, berinteraksi dengan inti dan mempengaruhi proses transkripsi.

Glukokortikoid dapat mempengaruhi jaringan limfatik sehingga mencegah *uptake* glukosa dan menghambat sintesis protein.

Antiestrogen memblok *uptake* estradiol dengan cara berkompetisi dengan estradiol pada reseptor estrogen sel kanker payudara.

Contoh :

- Hormon androgen : testosteron propionat, 2α-metiltestosteron
- Hormon estrogen : dietilstilbesterol, etinilestradiol
- Hormon progestin : hidroksiprogesteron asetat, medroksiprogesteron asetat
- Glukokortikoid : prednison, kortison
- Antiestrogen : tamoksifen sitrat
- Antiandrogen : flutamid

(5) Lain-lain

Contoh : mitotan, L-asparaginase, sisplatinum, hidroksiurea

2.4 Tinjauan tentang Kultur Sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatis, kimiawi, ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel, yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur sel ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell line*. Pemisahan kultur *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu akan menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut *strain cell* (Freshney, 1987).

Keuntungan penggunaan sistem kultur ini antara lain terletak pada segi kontrol lingkungan fisika kimia yang lebih tepat dan kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakterisasi dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel jauh lebih baik dibandingkan jaringan hidup dari hewan. Secara ekonomi, penggunaan sistem kultur sel ini juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit, konsentrasi larutan uji lebih kecil, dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit (Freshney, 1987).

Prinsip dasar pembiakan kultur sel secara *in vitro* yaitu dengan cara memindahkan atau mengambil sel yang akan diteliti pada jaringan asal (Dendy, 1976). Kemudian sel ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur, 37°C, lingkungan gas (5% CO_2 / 95% O_2) dan pH 7,4–7,7 (Spector, 1998). Saat ini ada dua media yang dilaporkan sama baiknya yaitu *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) dan *Dulbecco's Modification of Eagles Medium* (DMEM) (Bangun, 2000). Media yang digunakan merupakan campuran dari karbohidrat, asam amino, garam-garam, vitamin, hormon, dan faktor pertumbuhan. Garam dalam media dibuat isotonik untuk menjaga ketidakseimbangan osmotik. Bikarbonat sering ditambahkan sebagai sistem dapar bersama lingkungan CO_2 sehingga kultur dapat dipelihara pada pH optimal untuk pertumbuhan. *Phenol red* biasa ditambahkan ke dalam media sebagai indikator perubahan pH yang disebabkan oleh kontaminasi bakteri. Vitamin dan hormon terdapat dalam jumlah yang relatif rendah dan digunakan sebagai faktor yang mendukung pertumbuhan sel. Pada kebanyakan kultur, penambahan serum ke dalam media digunakan untuk pertumbuhan.

Permasalahan dalam menumbuhkan kultur sel adalah adanya kontaminasi mikroorganisme sehingga untuk mengurangi kontaminasi, preparasi dilakukan secara aseptik (Smith, 1991). Selain itu, dapat pula ditambahkan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur yang pertumbuhannya jauh lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan sel (Bangun, 1990).

Sampai saat ini, baik kultur sel primer maupun *cell line* mamalia telah banyak dikembangkan untuk keperluan berbagai penelitian secara *in vitro*, termasuk penelitian tentang antikanker menggunakan kultur sel mieloma mencit, untuk menghindari penggunaan hewan coba serta memberikan informasi tentang toksisitas dari bahan-bahan kimia dan obat-obatan (Freshney, 1987).

2.5 Tinjauan tentang Sel Mieloma Mencit

Sel mieloma adalah salah satu jenis sel tumor hasil transformasi sel-sel pembentuk antibodi yang diambil dari jaringan limpa yang akhirnya menjadi maligna. Dalam fakta empirik, sel mieloma dapat dimunculkan dengan pemberian senyawa karsinogen golongan hidrokarbon aromatik seperti minyak mineral atau pristane. Tahap pemunculan sel mieloma dimulai dengan terlebih dahulu menyuntikkan senyawa karsinogen tersebut melalui rute intraperitonial secara berturut-turut selang tiga hari, dengan harapan akan muncul dalam waktu satu tahun kemudian (Indrawati, 1999).

Sel mieloma yang tersedia berasal dari manusia, tikus dan mencit. Saat ini, mencit tampaknya merupakan hewan pilihan terbaik karena *cell line* yang berasal dari mencit telah ada yang kehilangan produksi imunoglobulinnya. Dengan menggunakan sel mieloma yang telah kehilangan kemampuan untuk mensintesis rantai imunoglobulinnya sendiri maka antibodi yang terbentuk benar-benar atau hanya berasal dari sel B parental (Bangun, 2000).

Jenis sel mieloma yang sering digunakan untuk uji *in vitro* adalah turunan hasil pemunculan dengan penyuntikan minyak mineral atau dikenal dengan galur *mineral oil plasmacytoma-21* (MPOC-21). Sel turunan MPOC-21 telah dilakukan uji ketahanan terus-menerus dan akhirnya menghasilkan kultur *cell line*. Turunan yang banyak dimanfaatkan adalah galur X63 yang merupakan hasil seleksi *cell*

line mieloma. Sel mieloma tersebut banyak dikembangbiakkan untuk keperluan uji *in vitro* (Indrawati, 1999).

2.6 Tinjauan tentang Metode Viabilitas Sel

Adanya pemaparan bahan-bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik inilah yang menjadi dasar dilakukannya uji sitotoksisitas dan salah satunya dengan menggunakan metode *cell viability test* (Freshney, 1987).

Secara garis besar, metode penentuan viabilitas sel digolongkan menjadi dua, yaitu berdasarkan :

(1) Penentuan respon singkat atau respon jangka pendek

(2) Penentuan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen

Penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka pendek atau respon singkat digunakan untuk menentukan jumlah sel yang hidup setelah dilakukannya prosedur penelitian yang berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan sel, seperti disagregasi jaringan, pemisahan sel serta pembekuan dan pengaktifan kembali kultur sel yang telah dibekukan. Sedangkan penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen digunakan jika efek yang dihasilkan oleh sebuah perlakuan pada tahapan penelitian hanya akan ditunjukkan setelah beberapa jam atau hari setelah perlakuan (Freshney, 1987).

Kerusakan atau kematian sel diikuti oleh adanya perubahan integritas membran dan ini dapat diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati besifat permeabel terhadap zat warna tertentu sehingga dapat menyerap warna, sedangkan sel yang hidup bersifat impermeable dan tidak dapat menyerap warna. Viabilitas sel dinyatakan sebagai prosentase sel yang hidup atau yang tidak terwarnai terhadap jumlah sel total. Zat warna yang dapat digunakan antara lain tripan biru, nigrosin dan eritrosin (Fresney, 1987; Suntoro, 1983).

Viabilitas sel dinyatakan sebagai persentase sel yang hidup atau tidak terwarnai. Zat warna yang digunakan antara lain nigrosin, tripan biru, dan

eritrosin. Untuk menghitung jumlah sel dapat digunakan metode atau alat (Freshney, 1987; Jaime, 1999), antara lain :

(1) *Cell Counting*

Ada beberapa metode *cell counting* yang dapat digunakan, antara lain :

1. Hemositometer
2. *Electronic Particle Counting*
3. *Coulter Counting*

(2) *Cell weight*

(3) *DNA Content*

Metode penghitungan yang sederhana dan tidak membutuhkan banyak biaya adalah *Cell Counting* dengan alat hemositometer (Freshney, 1987). Keuntungan lainnya bila menggunakan cara ini adalah morfologi sel, jumlah sel hidup, homogenitas suspensi sel dan adanya pencemaran dapat diamati (Bangun, 2000).

2.8 Tinjauan tentang Etoposida

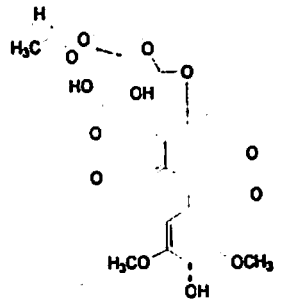
Etoposida merupakan derivat semisintetik podophyllotoksin yang berasal dari tanaman *Podophyllum peltatum.* Etoposida banyak digunakan dalam kemoterapi pengobatan kanker terutama kanker testis, kanker paru, leukemia mielogenous akut dan limfoma (Soekardjo, 2000; Anonim, 2004). Etoposida juga dapat diindikasikan untuk penyakit Hodgkin dan limfoma Non-Hodgkin (Pharmacia, 2002).

DNA Topoisomerase II Inhibitor merupakan kelompok obat sitotoksik poten yang banyak digunakan dan dikenal sebagai penginduksi apoptosis. Etoposida merupakan salah satu obat kemoterapi kelompok *DNA Topoisomerase II Inhibitor.* Tahapan pertama dari apoptosis yang disebabkan oleh induksi etoposida diketahui berawal dari interaksi obat ini dengan *DNA Topoisomerase II.* Namun, mekanisme detilnya masih belum diketahui. Penghambatan *DNA Topoisomerase II* terjadi pada fase G_2 dan fase S akhir sehingga etoposida menghentikan siklus sel dan membunuh sel pada fase G_2 dan akhir fase S. Interaksi ini menyebabkan rusaknya DNA. Efek sitotoksik etoposida diduga berkaitan dengan perusakan DNA tersebut (Butenko, 2000; Pharmacia, 2002).

Etoposida hanya ditujukan untuk pemakaian intravena. Larutan infusnya dengan konsentrasi 20 mg/mL harus diencerkan terlebih dahulu dengan 5% dekstrosa dalam air atau 0,9% larutan NaCl sampai konsentrasi 0,2-0,4 mg/mL karena pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat terjadi pengendapan (Pharmacia, 2002).

Karena bersifat genotoksik, etoposida tidak boleh diberikan pada wanita hamil dan menyusui. Pria yang mendapatkan terapi ini sebaiknya memeriksakan kesuburannya karena etoposida dapat menginduksi kerusakan kromosom pada spermatozoa manusia (Pharmacia, 2002).

Sediaan etoposida yang beredar di Indonesia yaitu *Delta West Etoposide*-Upjohn (injeksi 100 mg/5 mL), Lastet-Kalbe Farma (25; 50; 100 mg/kapsul, injeksi 100 mg/ampul) dan Vapesid-Bristol-Myers Squibb (100 mg/kapsul, 20 mg/mL ampul) (ISFI,1999).



Gambar 2.2 Struktur kimia Etoposida

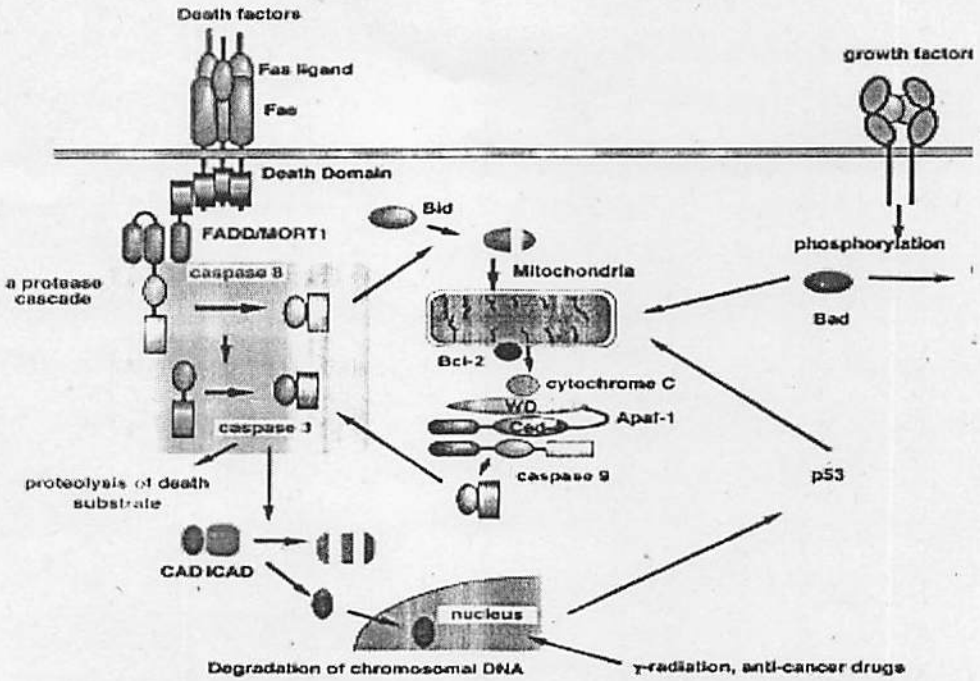
2.9. Tinjauan Tentang Apoptosis

Menurut Nagata (1997) , apoptosis adalah proses kematian sel yang terjadi selama masa pertumbuhan dan penunaan dari sel hewan. Apoptosis adalah mekanisme spesifik kematian sel yang terkontrol , *energy dependent* , yang dapat terjadi pada masa pertumbuhan , inflamsi jaringan, penuaan atau proses mekanisme imun dan hanya mempengaruhi sekelompok kecil atau satu sel saja. Hal inilah yang membedakan apoptosis dengan nekrosis. Nekrosis proses kematian sel yang bersifat pasif, tidak terkontrol, yang disebabkan oleh adanya perubahan mendadak pada lingkungan di sekitar sel , seperti karena terpapar bahan toksik dan menyerang sejumlah besar sel yang lain.

Apoptosis merupakan mekanisme alamiah yang dialami oleh sel. Ada dua alasan utama mengapa sel melakukan mekanisme itu. Pertama apoptosis memang diperlukan untuk proses pertumbuhan atau perkembangan sel, jaringan atau organ lebih lanjut. Hal ini dapat dilihat pada peristiwa pemutusan ekor kecebong sebelum menjadi katak atau penghilangan selaput diantara jari-jari tangan pada janin di dalam rahim.

Alasan kedua adalah untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus , sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker.

Beberapa faktor yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis dapat diklasifikasi menjadi dua kelompok besar, yaitu rangsangan instrinsik dan ekstrinsik. Kerusakan DNA, stress oksidatif dan hipoksia dapat merangsang terjadinya apoptosis dari dalam sel itu sendiri sehingga mengaktifkan apoptosis melalui jalur mitokondria (jalur instrinsik). Sedangkan dari luar sel adalah ***death factor***, seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor –alpha)* , limfotksin dan *Fas ligand* (FasL) serta kurang atau tidak adanya survival factor, seperti interlukin-2 dan interlukin –3 , dapat mengaktifkan apoptosis melalui jalur *death factor* (jalur ekstrinsik). Obat kemoterapi antikanker yang bersifat ***genotoxic*** seperti etoposid dan radiasi sinar gamma dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel kanker maka gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi , menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal , p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c ke sitosol , dan dalam hal ini akan dihalangi oleh *anti-apoptosis member* yaitu gen Bcl-2. Di dalam sitosol sitokrom c bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro-caspase 9 membentuk caspase 9, komplek ini disebut *apoptosome*. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekusioner , yaitu caspase 3, 6 dan 7 sehingga dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis.



Gambar 1

Skema sinyal tranduksi dari apoptosis (Nagata, 1997)

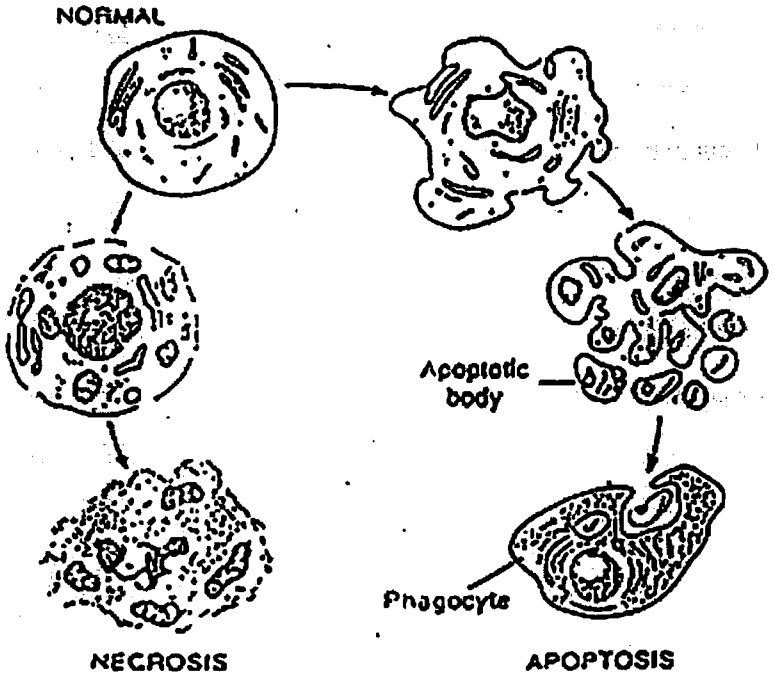
Banyak metode dan alat yang dapat digunakan untuk menganalis terjadinya apoptosis (Spector, 1998) beberapa diantaranya adalah :

1. Mikroskop cahaya dan flouresen

   Ada beberapa pewarnaan yang dapat digunakan , yaitu :

   a. Pewarnaan leukostat
   b. Pewarnaan Acridine Orange / Ethidium Bromida
   c. Pewarnanan Hoechst 33258
   d. Pelabelan dengan TUNEL

2. mikroskop elektron
3. analisis *flow cytometri*



Gambar 2

Gambaran morfologis apoptosis dan nekrosis (Cotran, 1999)

Sel-sel yang mengalami apoptosis dapat dikenali dengan mikroskop cahaya dan elektron karena sel-sel tersebut memiliki penapakan morfologi yang spesifik yaitu (Spector, 1998 dan Cotran, 1999) :

1. Sel mengkerut
2. Timbul tonjolan di membran sitoplasma
3. Mitokondria pecah dan mengeluarkan sitokrom c
4. Terbentuk badan apoptosis yang mengandung sitoplasma, organel dan fragmen inti sel yang diliputi oleh membran
5. Fosfolipid fosfatidilserin yang biasanya tersembunyi dalam membran plasma akan tampak di permukaan sel
6. Sel berikatan dengan reseptor di sel fagosit
7. Fagositosis oleh sel-sel di sekitarnya atau makrofag dan sel fagosit mengeluarkan sitokin

BAB III
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

(1) Menentukan aktivitas antikanker fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) secara in vitro menggunakan sel kanker mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

(2) Menentukan induksi apoptosis dari fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap sel mieloma mencit.

3.2. Hipotesis Penelitian

Dari uraian latar belakang dan masalah yang ada dapat disusun hipotesis bahwa : Fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas antikanker dan induksi apoptosis terhadap pertumbuhan kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

3.3. Manfaat Penelitian

1. Memberikan landasan ilmiah mengenai tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) yang digunakan secara empiris oleh masyarakat sebagai obat tradisional antikanker.
2. Memberikan data ilmiah yang dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai isolat senyawa aktif dari fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.).
3. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi bahan baku obat antikanker ataupun menjadi bentuk sediaan fitofarmaka sehingga dapat diterima dalam pelayanan kesehatan formal.

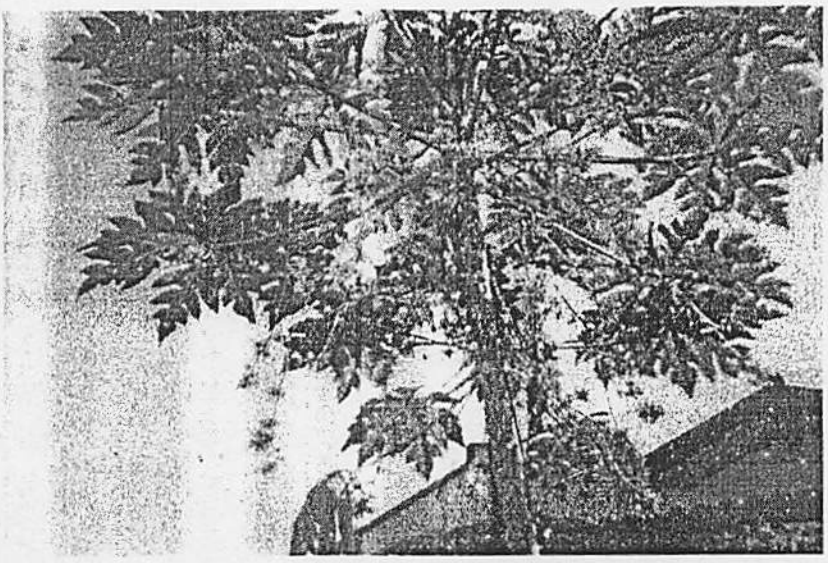
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang akan digunakan adalah pepaya (*Carica papaya* L.). Jenis pepaya yang digunakan adalah pepaya jantan dan bagian pepaya yang akan diteliti yaitu daun, yang dikumpulkan dari Sidoarjo pada bulan Oktober 2002. Determinasi tanaman dilakukan di LIPI Kebun Raya Purwodadi. Daun yang diambil adalah daun-daun yang terletak di ujung-ujung pohon sehingga daun tidak terlalu tua. Daun pepaya yang diambil dicuci terlebih dahulu dengan air sampai bersih, kemudian dikeringkan di udara terbuka atau diangin-anginkan. Setelah cukup kering, daun pepaya tersebut diserbuk menjadi serbuk yang halus.



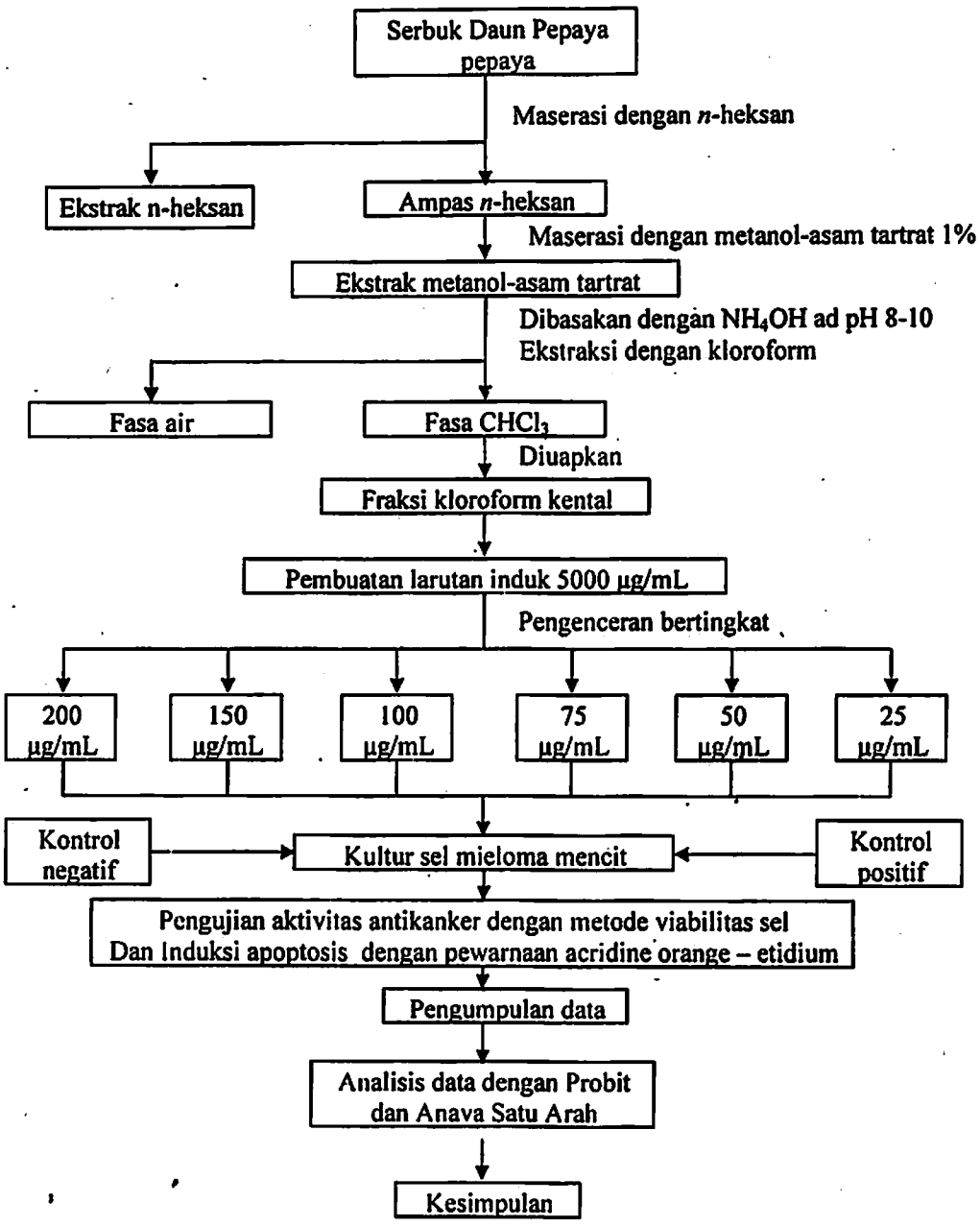
Gambar 4.1 Tanaman pepaya (*Carica papaya* L.)

4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain

- Kultur sel mieloma mencit P_3UI
- *n*-heksan
- Metanol
- NH_4OH
- Kloroform
- Pewarna Dragendorff
- Media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI)
- *Fetal Bovine Serum* (FBS)
- Dimetil sulfoksida (DMSO)
- HEPES
- Larutan tripan biru dalam saline
- Etoposida
- Acridin orange – etidium bromide

4.2 Alat-Alat

- Maserator dan pengaduk
- Bejana kromatografi
- Penyemprot untuk KLT
- Penyaring Buchner
- Vakum
- Rotavapor
- Oven pengering
- Botol kultur
- *Microwell plate*
- *Microtube*
- Mikroskop cahaya dan mikroskop flouresen
- Hemositometer
- Mikropipet
- Inkubator CO_2
- *Object* dan *cover glass*
- Sentrifugator



Gambar 4.2 Skema rancangan penelitian uji antikanker fraksi kloroform *Carica papaya* L. terhadap kultur sel mieloma mencit

4.4 Tahapan Percobaan

4.4.1. Pembuatan Fraksi Bahan Uji

Ditimbang 500 gram serbuk daun pepaya di dalam bejana dan ditambahkan *n*-heksan ± 1,5 L hingga terbasahi dan terendam seluruhnya. Selanjutnya, didiamkan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah itu, disaring menggunakan penyaring Buchner dengan bantuan pompa vakum. Ampas dimaserasi lagi dengan pelarut yang sama, yaitu *n*-heksan. Proses maserasi ini ditujukan untuk menghilangkan lemak dan klorofil dari daun pepaya dan dilakukan berulang kali sampai hasil rendaman menunjukkan warna jernih terang.

Maserasi dilanjutkan dengan menggunakan metanol suasana asam (+ asam tartrat 1%) dengan pH 3-5 untuk melarutkan alkaloid yang berada dalam bentuk garam. Ampas dalam bejana ditambahkan metanol-asam tartrat 1% ± 1,5 L hingga terbasahi dan terendam seluruhnya. Selanjutnya, didiamkan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah itu, disaring menggunakan penyaring Buchner dengan bantuan pompa vakum. Proses maserasi ini dilakukan beberapa kali. Maserat dalam metanol-asam diorientasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak kloroform : metanol (5 : 1) dan penampak noda Dragendorff. Bila noda menunjukkan warna jingga, merah jingga, coklat jingga atau coklat, maserat metanol yang diperoleh tadi kemudian dibasakan dengan NH_4OH sampai pH 8-10 agar menjadi bentuk *base*-nya. Setelah itu, diekstraksi dengan kloroform dalam corong pisah. Pada tahap ini juga dilakukan orientasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak dan penampak noda yang sama dengan sebelumnya. Bila noda menunjukkan warna jingga, merah jingga, coklat jingga atau coklat berarti fraksi kloroform yang dihasilkan telah mengandung zat uji (alkaloid). Hasil ekstraksi dengan kloroform kemudian diuapkan dalam lemari asam, ditutup, dan disimpan dalam lemari es sebelum digunakan.

4.5.2 Identifikasi Kandungan Kimia Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan metode KLT-Densitometri. Mula-mula dilakukan analisis KLT terhadap fraksi kloroform dengan menggunakan :

Fasa diam : Silica gel $60F_{254}$

Fasa gerak : Kloroform : Metanol (5 : 1)

Penampak noda : 1. Sinar ultraviolet

2. Dragendorff

Dari perlakuan tersebut, dilakukan pengamatan dengan menggunakan densitometri dan didapatkan profil kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) pada λ 365 dan 665 nm (sebelum dan sesudah disemprot penampak noda Dragendorff).

4.5.3 Pembuatan Larutan Uji

(1) Pembuatan larutan induk

Konsentrasi larutan induk yang akan dibuat adalah 5000 μg/mL sehingga dilakukan prosedur sebagai berikut : ditimbang fraksi kental 50,0 mg, dilarutkan dengan bantuan 1,0 mL DMSO sampai larut kemudian ditambah media RPMI sampai tepat 10,0 mL dan campur sampai homogen. Larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung tertutup steril.

(2) Pembuatan larutan baku kerja

Dibuat larutan baku kerja dengan pengenceran sebagai berikut :

1. Larutan baku kerja 1500 μg/mL

   Dipipet 0,6 mL larutan induk 5000 μg/mL kemudian ditambah 1,4 mL media RPMI.

2. Larutan baku kerja 750 μg/mL

   Dipipet 1,0 mL larutan baku kerja 1500 μg/mL kemudian ditambah 1,0 mL media RPMI.

3. Larutan baku kerja 375 μg/mL

Dipipet 1,0 mL larutan baku kerja 750 µg/mL kemudian ditambah 1,0 mL media RPMI.

4. Larutan baku kerja 1000 µg/mL
   Dipipet 0,4 mL larutan induk 5000 µg/mL kemudian ditambah 1,6 mL media RPMI.
5. Larutan baku kerja 500 µg/mL
   Dipipet 1,0 mL larutan baku kerja 1000 µg/mL kemudian ditambah 1,0 mL media RPMI.
6. Larutan baku kerja 250 µg/mL
   Dipipet 1,0 mL larutan baku kerja 500 µg/mL kemudian ditambah 1,0 mL media RPMI.
7. Larutan baku kerja 125 µg/mL
   Dipipet 1,0 mL larutan baku kerja 250 µg/mL kemudian ditambah 1,0 mL media RPMI.

(3) Pembuatan larutan uji

Dibuat satu seri larutan uji : dipipet masing-masing 0,2 mL dari larutan baku kerja konsentrasi 1000; 750; 500; 375; 250 dan 125 µg/mL ke dalam *microwell plate* yang nantinya akan ditambah media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker hingga volume 1,0 mL kemudian dihomogenkan.

Perhitungan konsentrasi larutan uji yang didapat adalah sebagai berikut :

a. (0,2 mL / 1,0 mL) x 1000 µg/mL = 200 µg/mL
b. (0,2 mL / 1,0 mL) x 750 µg/mL = 150 µg/mL
c. (0,2 mL / 1,0 mL) x 500 µg/mL = 100 µg/mL
d. (0,2 mL / 1,0 mL) x 375 µg/mL = 75 µg/mL
e. (0,2 mL / 1,0 mL) x 250 µg/mL = 50 µg/mL
f. (0,2 mL / 1,0 mL) x 125 µg/mL = 25 µg/mL

4.5.4 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Dipipet 1,0 mL DMSO, ditambah media RPMI sampai tepat 10,0 mL kemudian campur sampai homogen. Larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung tertutup steril.

Dipipet 0,2 mL dari larutan di atas ke dalam *microwell plate*, kemudian ditambah media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker hingga volume 1,0 mL, kemudian dihomogenkan. Konsentrasi larutan uji = 0 μg/mL.

4.5.5 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

(1) Pembuatan larutan induk

Dipipet 2,5 mL larutan injeksi Etoposida "Ebewe" (PT. Ferron Par Pharmaceutical), ditambah 1,0 mL DMSO dan RPMI sampai volume 10,0 mL kemudian dicampur sampai homogen sehingga didapatkan konsentrasi 5000 μg/mL.

(2) Pembuatan larutan baku kerja

1. Larutan baku kerja 500 μg/mL

   Dipipet 0,1 mL dari larutan induk 5000 μg/mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 0,9 mL media RPMI.

2. Larutan baku kerja 100 μg/mL

   Dipipet 0,2 mL larutan 500 μg/mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah 0,8 mL media RPMI.

3. Larutan baku kerja 50 μg/mL

   Dipipet 0,1 mL dari larutan 500 μg/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah 0,9 mL media RPMI.

4. Larutan baku kerja 5 μg/mL

   Dipipet 0,1 mL dari larutan 50 μg/mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah 0,9 mL media RPMI.

(3) Pembuatan larutan kontrol positif dalam sumuran *microwell plate*

Dipipet masing-masing 0,2 mL dari larutan etoposida konsentrasi 100; 50; dan 5 μg/mL ke dalam *microwell plate* yang nantinya akan ditambahkan media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker hingga volume 1,0 mL, kemudian dihomogenkan.

Perhitungan konsentrasi larutan kontrol positif yang didapat adalah sebagai berikut :

a. (0,2 mL / 1,0 mL) x 100 μg/mL = 20 μg/mL
b. (0,2 mL / 1,0 mL) x 50 μg/mL = 10 μg/mL
c. (0,2 mL / 1,0 mL) x 5 μg/mL = 1 μg/mL

4.5.6 Preparasi Kultur Sel Mieloma Mencit

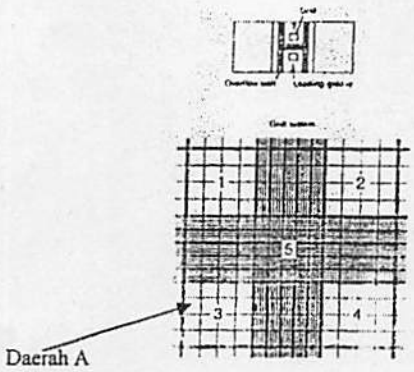
Prosedur kerja :

(1) Sel mieloma mencit dalam media RPMI disiapkan.
(2) Sel mieloma mencit dalam media RPMI dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi.
(3) Media yang berisi sel mieloma disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
(4) Supernatan dipisahkan dari endapan sel. Tahap ini dikerjakan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC).
(5) Sel ditanam dalam media yang sudah disiapkan dengan FBS 10% pada botol kultur sampai volume 10 mL. Tahap ini dikerjakan dalam LAFC.
(6) Kultur disimpan dalam inkubator 5% CO_2 pada suhu 37°C.
(7) Kultur sel dikeluarkan dari inkubator, dihomogenkan kemudian dihitung jumlah selnya sebanyak minimal 10^5–2.10^6 sel/mL menggunakan hemositometer sebelum dituang ke dalam *microwell plate*.
(8) Bila jumlah sel telah mencukupi, pindahkan kultur sel ke dalam lubang *microwell plate* hingga volume 1,0 mL. Masing-masing lubang *microwell plate* telah berisi 0,2 mL larutan baku kerja uji dengan konsentrasi 1000; 750; 500; 375; 250 dan 125 μg/mL, 0,2 mL larutan baku kerja kontrol positif dengan konsentrasi 100; 50; 5 μg/mL, serta 0,2 mL larutan kontrol negatif.

4.5.7 Cara Menghitung Sel dengan Hemositometer

Dihitung jumlah sel kanker yang berada pada daerah 1, 2, 3, dan 4. tiap daerah mempunyai 16 daerah A. Luas daerah A = 0,0625 mm^2 dan kedalaman = 0,1 mm. Volume dari 16 A = 16 x 0,0625 x 0,1 mm^3 = 0,1 mm^3 = 10^{-4} mL.

Sel-sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung, sedangkan yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung atau sebaliknya. Pengisian suspensi sel ke dalam alat hemositometer harus tepat penuh, tidak boleh berlebihan. Apabila berlebihan, dibersihkan dan ulangi lagi.



Gambar 4.5 Alat Hemositometer

4.5.8 Uji Antikanker Fraksi Kloroform Daun Pepaya

Prosedur kerja :

(1) Dipipet 0,2 mL dari masing-masing larutan baku kerja uji 1000; 750; 500; 375; 250 dan 125 µg/mL serta larutan kontrol negatif dan larutan baku kerja kontrol positif dengan konsentrasi 100; 50; dan 5 µg/mL ke dalam *microwell plate*.

(2) Ditambahkan 0,8 mL media yang berisi sel mieloma sebanyak minimal 10^5 sel/mL ke dalam *microwell plate*.

(3) Inkubasi dalam inkubator 95% O_2 dan 5% CO_2 pada suhu 37°C selama 24 jam.

(4) Setelah diinkubasi, *microwell plate* dikeluarkan dari inkubator.

(5) Diambil suspensi sel dari tiap-tiap sumuran kemudian dipindahkan ke dalam *microtube*.

(6) Dari tiap-tiap *microtube* diambil 50 µL suspensi sel dan dipindahkan ke dalam *microtube* yang lain untuk pengamatan viabilitas.

(7) Ditambahkan 50 µL larutan tripan biru 0,4% ke dalam tiap *microtube* yang telah berisi suspensi sel untuk pengamatan viabilitas kemudian dihomogenkan dengan vortex *mixer*.

(8) Larutan dalam *microtube* tersebut dipipet dengan mikropipet Socorex, diletakkan di hemositometer dan *cover glass* diletakkan di atasnya. Cara meletakkannya, pipet diletakkan di bawah *cover glass* kemudian Socorex ditekan dan larutan dalam pipet dimasukkan perlahan-lahan ke bawah *cover glass*.

(9) Kamar hitung diletakkan di bawah mikroskop dan penghitungan dilakukan dengan pembesaran 100x.

(10) Persentase viabilitas sel dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\Sigma \text{ sel hidup}}{\Sigma \text{ sel hidup} + \Sigma \text{ sel mati}} \times 100\%$$

(10) Data yang diperoleh dianalisis dengan uji Anava satu arah dan Probit.

4.5.9. Analisis induksi apoptosis fraksi kloroform dengan Pewarnaan Acridine Orange / Etidium Bromida (AO/EB).

Kultur sel mieloma hasil perlakuan dengan fraksi kloroform dilakukan pewarnaan dengan Acridine Orange / Etidium Bromida (AO/EB) dengan perbandingan volume kultur 25 µl dan pereaksi sebanyak 1 µl. Kemudian hasil analisis induksi apoptosis digunakan pengamatan dengan mikroskop flouresensi . Sel hidup akan berwarna hijau sedangkan sel kanker yang mengalami apoptosis akan berwarna kuning / orange dengan bintik-bintik putih yang berpendar. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung dari sampel sel kanker minimal 300 sel.

4.5 Analisis Data

4.6.1 Analisis Probit

Analisis probit digunakan untuk menentukan harga LC_{50}, yakni konsentrasi larutan uji yang membunuh 50% jumlah sel mieloma mencit.

4.6.2 Anava Satu Arah

Data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah untuk mengetahui pengaruh penambahan fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap viabilitas sel mieloma mencit dan induksi apoptosis.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Fraksi Bahan Uji

Untuk memperoleh fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) maka simplisia kering daun pepaya (*Carica papaya* L.) dimaserasi terlebih dahulu dengan pelarut heksan untuk menghilangkan kandungan lemaknya (*defatted*). Maserasi dilakukan sampai maserat menunjukkan warna yang jernih.

Ekstraksi selanjutnya sudah mulai diarahkan untuk menarik alkaloid dari daun pepaya (*Carica papaya* L.). Mula-mula ampas yang telah dimaserasi dengan heksan, dimaserasi lebih lanjut dengan metanol suasana asam. Suasana asam yang diinginkan minimal dicapai pada pH 3, tidak lebih rendah karena dapat mendestruksi alkaloid yang ingin ditarik. Dalam penelitian ini digunakan asam tartrat 1% (El-Sayyad,1984). Maserasi ini dilakukan dengan tujuan untuk menarik alkaloid yang berada dalam bentuk garam dan dilakukan berulang-ulang sampai maserat berwarna jernih. Tahapan selanjutnya adalah membasakan maserat metanol-asam dengan NH_4OH 5% sampai pH 9. Tahapan ini bertujuan untuk menghidrolisis alkaloid dalam bentuk garam menjadi bentuk *base*-nya sehingga dapat ditarik oleh pelarut organik seperti kloroform. Selain itu, dengan pH yang tinggi, diharapkan protein-protein yang terkandung dalam fraksi telah terdenaturasi sehingga dapat mencegah hasil positif palsu pada analisis kualitatif. Fraksi kloroform yang didapat kemudian diuapkan di lemari asam sehingga didapatkan fraksi kental kehitaman.

Dari 350 gram serbuk daun pepaya yang telah dikeringkan diperoleh ekstrak metanol sebanyak 150,2 gram. Ekstrak metanol yang telah dibasakan dengan NH_4OH 5% ad pH 9 diekstraksi dengan kloroform dan dihasilkan 25,2 gram fraksi kloroform kental berwarna kehitaman.

5.2 Aktivitas Antikanker Fraksi Kloroform Daun Pepaya

Sebelum diinkubasi, dilakukan penghitungan jumlah sel awal. Bila telah memenuhi syarat, dapat dilanjutkan dengan penambahan larutan uji, kontrol positif etoposida dan kontrol negatif serta diinkubasi selama 24 jam.

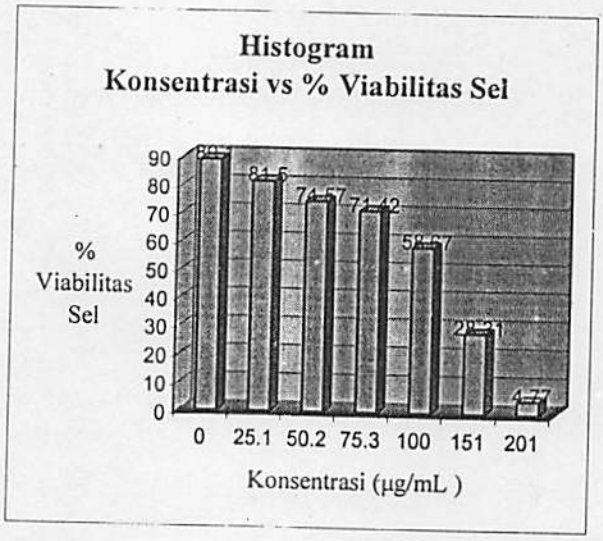
Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan perhitungan viabilitas sel mieloma mencit. Untuk dapat membedakan antara sel yang hidup dan mati, digunakan larutan tripan biru 0,4%. Data viabilitas sel mieloma mencit tertera pada tabel berikut :

Tabel V.2 Hasil uji aktivitas antikanker fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap kultur sel mieloma mencit setelah perlakuan dan diinkubasi selama 24 jam

Nama Bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah sel (x 10^4 sel/mL)			% Viabilitas Sel	% Viabilitas Rata-rata
			Sel Hidup	Sel Mati	Total Sel		
Kontrol Negatif	0 µg/mL	1	23,5	1,5	25	94,00	89,10
		2	24	4	27,5	87,27	
		3	52	8	61	86,04	
Larutan Uji	25,1 µg/mL	1	48,5	8	56,5	85,84	81,50
		2	56	14	70	80,00	
		3	35	9,5	44,5	78,65	
	50,2 µg/mL	1	22,5	12,5	30	75,00	74,57
		2	42	14,5	56,5	74,34	
		3	29	10	39	74,36	
	75,3 µg/mL	1	43,5	16,5	60	72,50	71,42
		2	38	14,5	52,5	72,38	
		3	45	19,5	64,5	69,77	
	100,4 µg/mL	1	25,5	23	48,5	52,58	58,67
		2	26,5	18	44,5	59,55	
		3	38	21,5	59,5	63,87	
	150,6 µg/mL	1	17,5	30,5	48	36,46	28,31
		2	9,5	31	40,5	23,47	
		3	11	33	44	25,00	
	200,8 µg/mL	1	1	30,5	31,5	3,12	4,77
		2	2,5	35,5	38	6,58	
		3	1,5	43,5	45	4,62	

Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan hemositometer dan pewarna larutan tripan biru 0,4%. Sel yang mati akan menyerap tripan biru karena permeabilitas membrannya telah rusak. Maka dari itu, sel yang mati akan terwarnai biru. Sel yang akan dihitung kepadatannya, dirontokkan terlebih dahulu dari dasar botol kultur dan dihomogenkan. Selanjutnya diambil suspensi sel dan

larutan tripan biru dengan perbandingan 1 : 9. Campuran tersebut dihomogenkan dan siap dihitung dengan hemositometer. Sebelum dimasukkan ke hemositometer, sebaiknya ditunggu minimal 3 menit dengan tujuan memberikan waktu untuk penyerapan warna dan perhitungan harus diselesaikan dalam waktu kurang dari 10 menit agar tidak ada sel yang mati karena pengaruh zat warna tersebut (Spector, 1998).



Gambar 5.2 Histogram efek antikanker fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap kultur sel mieloma mencit setelah diinkubasi selama 24 jam

Kepadatan sel yang digunakan untuk uji aktivitas antikanker antara lain sebanyak 7,12 x 10^5; 4,1 x 10^5 dan 4,79 x 10^5 sel/mL sedangkan persyaratan jumlah kepadatan sel minimal yang bisa digunakan untuk uji aktivitas antikanker dengan metode viabilitas sel ini adalah 10^5-2 x 10^6 sel/mL (Bangun, 1990).

Hasil penelitian menunjukkkan bahwa harga persen viabilitas rata-rata dari larutan uji dengan konsentrasi 25,1 µg/mL sampai 200,8 µg/mL secara berturut-turut adalah 81,50%; 74,57%; 71,42%; 58,67%; 28,31% dan 4,77%. Sedangkan harga persen viabilitas rata-rata dari larutan kontrol positif dengan konsentrasi 1 µg/mL sampai 20 ppm secara berturut-turut sebagai berikut 52,66%; 31,69% dan 3,20%. Data tersebut menunjukkan bahwa viabilitas sel mieloma setelah diinkubasi selama 24 jam menurun dengan meningkatnya konsentrasi larutan uji, begitu pula terhadap larutan kontrol positif.

Tabel V.3 Hasil uji aktivitas antikanker Etoposida terhadap kultur sel mieloma mencit setelah perlakuan dan diinkubasi selama 24 jam

Nama bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah sel (x 10^4 sel/mL)			% Viabilitas Sel	% Viabilitas Rata-rata
			Sel Hidup	Sel Mati	Total Sel		
Kontrol Negatif	0 µg/mL	1	23,5	1,5	25	94,00	89,10
		2	24	4	27,5	87,27	
		3	52	8	61	86,04	
Kontrol Positif Etoposida	1 µg/mL	1	36	32,5	68,5	52,55	52,66
		2	44,5	37,5	82	54,27	
		3	33,5	32	65,5	51,15	
	10 µg/mL	1	17	28,5	45,5	37,36	31,69
		2	21	46,5	67,5	31,11	
		3	7	19	26	26,92	
	20 µg/mL	1	1,5	43,5	45	3,33	3,20
		2	1,5	48	49,5	3,03	
		3	1	31	32	3,23	

5.3 Aktivitas Induksi Apoptosis Fraksi Klorofom Daun Pepaya

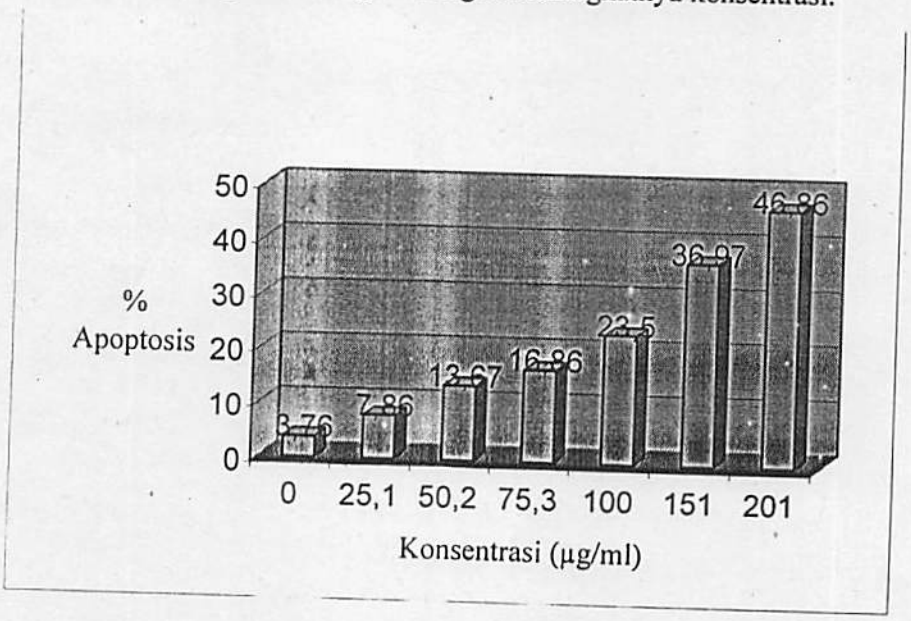
Sel kanker mieloma hasil perlakuan dengan fraksi kloroform dari daun pepaya yang diinkubasi selama 24 jam, dilakukan perhitungan sel mieloma mencit yang mengalami apoptosis . Sel hidup akan berwarna hijau sedangkan sel kanker yang mengalami apoptosis akan berwarna kuning atau orange dengan bintik-bintik putih yang berpendar. Data sel mieloma mencit yang mengalami apoptosis tertera pada tabel berikut :

Tabel V.5 Hasil aktivitas induksi apoptosis fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap kultur sel mieloma mencit setelah perlakuan dan diinkubasi selama 24 jam

Nama Bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah sel		% Sel Apoptosis	Rata-rata % Sel apoptosis
			Sel Apoptosis	Total Sel		
Kontrol Negatif	0 µg/mL	1	10	300	3,3	3,76
		2	14	300	4,7	
		3	10	300	3,3	
Larutan Uji	25,1 µg/mL	1	23	300	7,6	7,86
		2	27	300	9	
		3	21	300	7	
	50,2 µg/mL	1	34	300	11,3	13,67
		2	42	300	14	
		3	47	300	15,6	
	75,3 µg/mL	1	53	300	17,6	16,86
		2	49	300	16,3	

		3	50	300	16,7	
	100,4 µg/mL	1	67	300	22,3	23,5
		2	71	300	23,6	
		3	74	300	24,6	
	150,6 µg/mL	1	125	300	41,6	36,97
		2	108	300	36	
		3	100	300	33,33	
	200,8 µg/mL	1	132	300	44	46,86
		2	146	300	48,6	
		3	144	300	48	

Hasil penelitian menunjukkkan bahwa harga persen rata-rata sel apoptosis dari larutan uji dengan konsentrasi 25,1 ppm sampai 200,8 ppm secara berturut-turut adalah 3,76%; 7,86%; 13,67%; 16,86%; 28,5% ; 36,97% dan 46,86%. Data tersebut menunjukkan bahwa sel mieloma yang mengalami apoptosis setelah diinkubasi selama 24 jam meningkat dengan meningkatnya konsentrasi.



Gambar 5.4 Histogram efek induksi apoptosis fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap kultur sel mieloma mencit setelah diinkubasi selama 24 jam

Kematian sel kanker mieloma secara apoptosis karena pengaruh fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) dengan kandungan utama alkaloid diduga melalui tahapan awal menghambat enzim DNA Topoismerase II. Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk

Protein Linked DNA Breaks (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi atau kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh proses replikasi sel yang DNA sel kanker maka gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi , menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal , p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c. ke sitosol , dan dalam hal ini akan dihalangi oleh *anti-apoptosis member* yaitu gen Bcl-2. Di dalam sitosol sitokrom c bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro-caspase 9 membentuk caspase 9, komplek ini disebut *apoptosome*. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekusioner , yaitu caspase 3, 6 dan 7 sehingga dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Cotran , 1998).

5.6 Analisis Data

5.6.1 Analisis Probit untuk Aktivitas Antikanker Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) dan Etoposida.

Harga LC_{50} dari larutan fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang dihitung dengan menggunakan analisis Probit adalah 104,4 µg/mL.

Harga LC_{50} dari kontrol positif etoposida yang dihitung dengan menggunakan analisis Probit adalah 5,2 µg/mL.

5.6.2 Analisis Anava untuk Aktivitas Antikanker Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Data hasil pengamatan viabilitas sel dari percobaan larutan fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang telah didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah.

Tabel V.6 Anava hasil uji antikanker fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.)

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F_{hitung}	Sig.
Antar kelompok	17350,541	6	2891,757	161,821	,000
Dalam kelompok	250,181	14	17,870		
Total	17600,722	20			

($\alpha = 0,05$)

Dari analisis diperoleh harga probabilitas atau signifikansi < 0,05 pada derajat kepercayaan 95% (α = 0,05) dengan demikian Ho ditolak dan Ha diterima. Maka dari itu dapat ditarik kesimpulan bahwa ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel mieloma antar minimal 1 pasang kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang berbeda bermakna digunakan uji HSD. Hasil yang diperoleh dari uji HSD tertera pada tabel di bawah ini :

Tabel V.5 Perbedaan harga rata-rata hitung persentase viabilitas antar kelompok perlakuan

Konsentrasi (µg/mL)	0	25,1	50,2	75,3	100,4	150,6	200,8
0	0	5,6167	14,5333*	17,6800*	30,4333*	60,7900*	84,3267*
25,1		0	8,9167*	12,0633*	24,8167*	55,1733*	78,7100*
50,2			0	3,1467	15,9000*	46,2567*	69,7933*
75,3				0	12,8833*	43,2400*	66,7767*
100,4					0	30,3567*	53,8933*
150,6						0	23,5367*
200,8							0

Keterangan :

* : Ada perbedaan harga rata-rata persen viabilitas yang bermakna pada harga α < 0,05

Hasil analisis dengan anava satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan perbedaan hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit secara bermakna antara minimal 1 pasang kelompok perlakuan. Dari hasil uji Anava satu arah, diketahui bahwa fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas antikanker yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit secara bermakna. Dan dari analisis HSD dapat diketahui bahwa kelompok uji dengan konsentrasi 50,2 µg/mL; 75,3 µg/mL ; 100,4 µg/mL; 150,6 µg/mL dan 200,8 µg/mL memiliki perbedaan hambatan pertumbuhan terhadap kultur sel mieloma mencit secara bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif sedangkan kelompok uji dengan konsentrasi 25,1 µg/mL tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) masih memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit.

5.6.3 Analisis Anava untuk Aktivitas Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Tabel V.7 Anava induksi apoptosis fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.)

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F_{hitung}	Sig.
Antar kelompok	4411,609	6	735,268	159,493	,000
Dalam kelompok	64,541	14	4,610		
Total	4476,150	20			

($\alpha = 0,05$)

Dari analisis diperoleh harga probabilitas atau signifikansi < 0,05 pada derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dengan demikian Ho ditolak dan Ha diterima. Maka dari itu dapat ditarik kesimpulan bahwa ada perbedaan induksi apoptosis sel mieloma antar minimal 1 pasang kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang berbeda bermakna digunakan uji HSD. Hasil yang diperoleh dari uji HSD tertera pada tabel di bawah ini :

Tabel V.5 Perbedaan harga rata-rata hitung persentase apoptosis antar kelompok perlakuan

Konsentrasi (µg/mL)	0	25,1	50,2	75,3	100,4	150,6	200,8
0	0	4,10*	9,86*	13,10*	19,73*	33,21*	43,10*
25,1		0	5,76*	9*	15,6*	29,11*	39*
50,2			0	3,2	9,8*	23,3*	33,3*
75,3				0	6,6*	20,1*	30*
100,4					0	13,47*	23,3*
150,6						0	9,8*
200,8							0

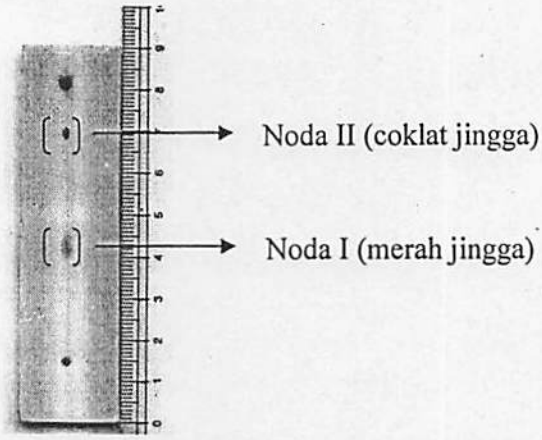
Keterangan :

* : Ada perbedaan harga rata-rata persen apoptosis yang bermakna pada harga $\alpha <$ 0,05

Dari hasil uji Anava satu arah, diketahui bahwa fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas induksi apoptosis yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan % apoptosis sel mieloma mencit secara bermakna. Dan dari analisis HSD dapat diketahui bahwa kelompok uji dengan konsentrasi 50,2 μg/mL ; 75,3 μg/mL ; 100,4 μg/mL ; 150,6 μg/mL dan 200,8 μg/mL ppm memiliki % apoptosis mieloma mencit secara bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif sedangkan kelompok uji dengan konsentrasi 50,2 μg/mL tidak berbeda bermakna dengan 75,3 μg/mL . Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dan mampu menginduksi apoptosis. Di mana apoptosis adalah kematian sel yang terpogram , dan penggunaan aplikasi klinik dari bahan obat tersebut tidak menimbulkan efek samping seperti inflamasi dan diharapkan lebih selektif dengan hanya membunuh sel kanker saja tanpa membunuh sel normal (Peter *et al*, 1997).

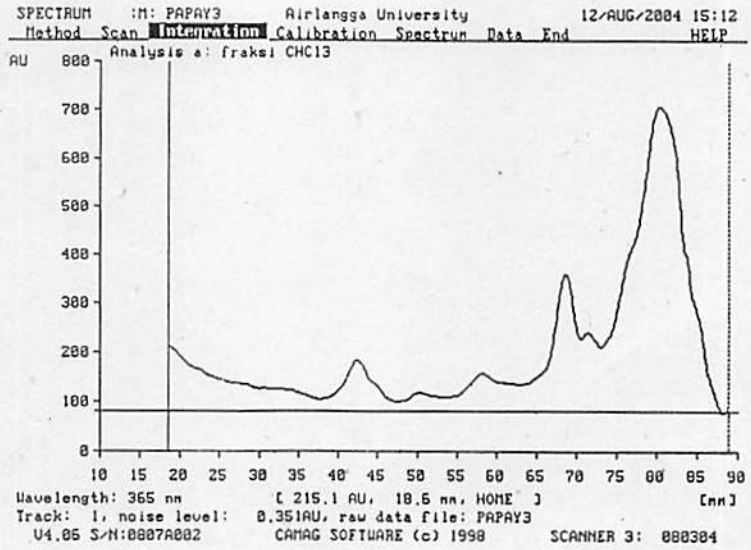
Potensi aktivitas antikanker dari fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) jika dibandingkan dengan aktivitas ektrak metanol yang telah dilakukan sebelumnya oleh Huda, 2001 terlihat adanya peningkatan aktivitas. Hal tersebut ditunjukkan dari harga LC_{50}, di mana ekstrak metanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas antikanker terhadap sel mieloma mencit dengan harga LC_{50} sebesar 336,17 μg/mL sedangkan fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan harga LC_{50} sebesar 104,40 μg/mL. Dengan demikian tampak bahwa dengan mengkerucutkan senyawa aktif yang dimaksud maka harga LC_{50} juga semakin kecil, yang berarti aktivitasnya juga semakin besar. Jika dibandingan dengan kontrol positif senyawa etoposida maka potensi aktivitas fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) sekitar 20% , hal ini terlihat dari harga LC50 senyawa etopoida terhadap sel mieloma mencit sebesar 5,2 μg/mL.

5.7 Identifikasi Kandungan Kimia Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

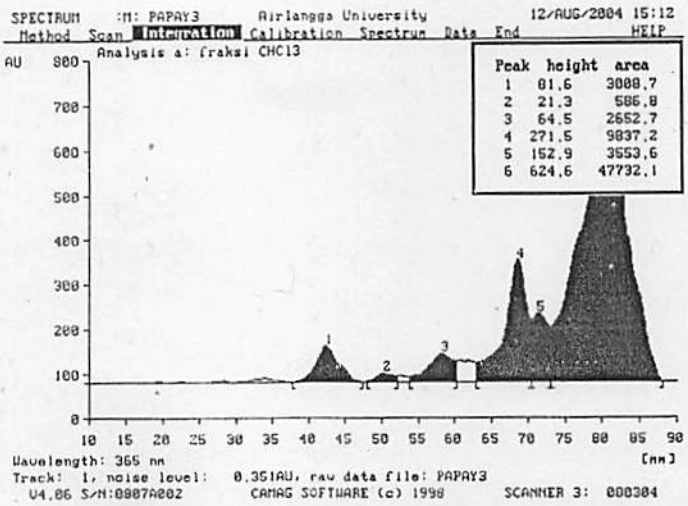


Gambar 5.1 Hasil analisis KLT fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) setelah disemprot Dragendorf

Fasa diam	: Silica gel $60F_{254}$
Fasa gerak	: Kloroform : Metanol (5 : 1)
Penampak noda	: Dragendorff
Harga Rf	: 0,4 (noda I); 0,78 (noda II)



Gambar 5.2 Profil kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan menggunakan Densitometer pada $\lambda = 365$ nm



Gambar 5.3 Luas area profil kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) setelah disemprot Dragendorff dengan menggunakan Densitometer pada $\lambda = 365$ nm

Analisis KLT fraksi kloroform dilakukan pada fasa diam silika gel $60F_{254}$ dengan fasa gerak kloroform : metanol (5 : 1). Penampak noda yang digunakan adalah sinar UV dan dragendorff. Pada saat disinari dengan penampak noda sinar UV dekat (254 nm), tidak tampak adanya perpendaran warna atau noda pada lempeng. Sedangkan dengan sinar UV jauh (365 nm) tampak noda-noda dengan pendaran warna merah muda-ungu, dengan nilai Rf yang sama dengan nilai Rf noda setelah disemprot dragendorff. Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi kloroform mengandung alkaloid yang ditunjukkan dengan dua noda yang bereaksi positif dengan pereaksi dragendorff. Noda berwarna jingga, merah jingga, coklat jingga atau coklat dianggap bereaksi positif terhadap pereaksi Dragendorff (Harborne, 1987; Uboh, 1998). Adapun dua noda yang bereaksi positif pada hasil KLT yaitu satu noda berwarna oranye dengan nilai Rf = 0,4 dan satu noda berwarna coklat jingga dengan nilai Rf = 0,78.

Profil kandungan kimia dari fraksi kloroform daun pepaya ini dapat diketahui dari analisis densitometri pada λ 365 nm. Pada profil tersebut terlihat ada puncak-puncak pada jarak migrasi 40-50 mm, 50 mm , 55-60 mm , 65-70 mm, 70-75 mm ; 80-85mm yang menunjukkan adanya noda-noda pada jarak migrasi tersebut. Dengan melihat profil KLT-densitometri ternyata ada perbedaan

noda yang teramati langsung pada lempeng KLT hanya terlihat tiga noda , dua noda posistif dan satu negatif negatif dengan pereaksi dragendorf yang diduga adalah klorofil, sedangankan pada profil KLT-densitometri terlihat ada 6 puncak. Puncak pada profil KLT-densitometri yang diduga sebagai senyawa alkaloid adalah puncak pada jarak migrasi 40-50 mm dan 65-70mm.

Dengan melihat hasil identifikasi kualitatif kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) adalah senyawa alkaloid , hal in sesuai dengan laporan Duke , 1996 bahwa kandungan metabolit sekunder dari daun pepaya antara lain adalah senyawa alkaloid karpaina, pseudokarpaina yang merupakan alkaloid golongan piperidina . Adapun senyawa alkaloid golongan piperidina yang memiliki aktivitas antikanker dan memiliki mekanisme antikanker dengan menginduksi apoptosis adalah senyawa flavopiridol, yang merupakan senyawa hasil semisintesa dari alkaloid piperidina dengan senyawa flavonoid (Wittmann *et al*, 2003).

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker mieloma mencit dengan harga LC_{50} sebesar 104,4 µg/ml.
2. Fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) memiliki aktivitas menginduksi apoptosis sel kanker mieloma mencit dengan metode pewarnaan etidium bromida dan acridine orange.
3. Hasil analisis kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) dengan KLT menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloida.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu isolasi dan identifikasi terhadap kandungan bioaktif fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L) yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker mieloma mencit.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2004. **Etoposide**, cited from , http: // www. tevaeoncology. com/product/index/.cfm?Fuse AQction=Show Fad and pid=8, 28 Januari 2004.

Bangun, A., 1.990. **Antibodi Monoklonal**, Karya Aksara, Jakarta, Halaman 16 - 48.

Butenko, Z. A., 2000, Different Etoposide-Induced Apoptotic Response Of Human Malignant Lymphoid Cell Lines. **Experimental Oncology** 22, Ukraine, pp. 26-31.

Dalimartha, S., 2003. **Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker**, Seri Agrosehat Penebar Swadaya, Jakarta, halaman 1-5, 76-77.

Dendy, P.P., *1976.* **Human Tumours in Short Term Culture Technique and Clinical Aplication**, Academic Press, London, pp. 4-8, 20-24, 150-155.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989. Materia Medika Indonesia, Jilid V, Dirjen POM, Jakarta, halaman 116-119.

Duke, 1996. **Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases**, cited from http : // www. rain – tree .com/db/Carica-papaya-phytochem.htm, 27 September 2002.

El Sayyad, S.M., Ross, S.A. and Sayyed, H.M., 1984. New Isoquinolone Alkaloids From The Leaves of *Cassia siainea In* : **Journal of Natural Products**, No.4, Vol. 47, pp. 708-710.

Freshney, I.R., 1987. **Culture of Animal Cell : A Manual Basic of Technique**, 2nd edition, Alan R. Liss Inc., New York, pp. 227-292.

Harborne, J.B., 1987. Metode Fitokimia : **Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**, ITB, Bandung, halaman 234-245.

Harborne, J.B.I. Baxter, H. and Moss, G.P. (Eds), 1999. **Phytochemical Dictionary**, 2nd edition, Taylor & Francis Ltd., London, pp. 278.

Hostettmann, K. (Ed.), 1991. **Methods In Plant Biochemistry**, Vol 6, Assays For Bioactivity, Academic Press, Lond

Huda, N, 2001. **Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Daun *Carica papaya* Linn. pada Kultur Sel Mieloma Mencit dengan Metode Viabilitas Sel**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia, 1999. **Informasi Spesialite Obat Indonesia**, Vol. XXXII, PT. Anem Kosong Anem, Jakarta, halaman 97-99.

Indrawati., R., Lazuardi, M., Ratna, S.M., 1999. **Pengkajian Hambat Pertumbuhan Sel Kanker Mieloma secara In Vitro antara Maserasi Benalu Duku dan Maserasi Benalu Teh Dibandingkan dengan Metotreksat**, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, halaman 8-9.

Jaime, A.R. and Marcella Haun, 1999. Cytotoxicity of trans-Dehydrocrotinin from Croton cajucara on V 79 Cells and Rat Hepatocytes, *In :* **Planta Medica**, Vol 65, pp. 522.

Katzung, B.G., *1995.* **Basic & Clinical Pharmacology**, 7th edition, Prentice Hall International, pp. 881.

Mangan, Y, 2003. **Cara Bijak Menaklukkan Kanker**, PT. AgroMedi.a Pustaka, Jakarta, halaman 78-81.

Nafrialdi, Ganiswara, *1995,* **Farmakologi dan Terapi**, edisi 4, FakultasKedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, halaman 686-701.

Nagata ,S. 1997. Apoptosis by Death Factor, Cell. 88 : 355 – 365.

National Cancer Institute, 2001, **Measuring Cancer Deaths**, cited from from http : // www. cancer.gov/csr, , 15 Oktober 2003.

Peter.M.E., Houfelder.A.E., and Heugartner,M.O., 1997. Advance in Apoptosis Research, **Proc. Acad. Sci**, USA, 94 : 12736-12737.

Phramacia, 2002, Etoposide-Data Sheet, cited from http://www.medset.govt.nz/profs/data-sheet/DSForm.asp, 30 januari 2004.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., *1995.* **Pharmacology, 3rd edition**, Churchil Livingstone Inc., New York, pp. 696-713.

Roja, G. and Rao, P.S., 2000, **Journal of Herbs, Spices and Medical Plant Anticancer Compounds from Tissue Cultures of Medical Plants,** *Vol. 7 (2),* The Haworth Press. Inc., New York, pp. *71-96.*

Shripong, L., Sotanaphun, U., Limsirichaikul , S., Wetwitayaklung, P., Chaichantipyuth C. and Pummangura, S., 2003. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis, In :* **Planta Medica**, cited from http://www.ncbi.nlm.nih.gov,15 Maret *2004.*

Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**, edisi kedua, Airlangga University Press, Surabaya, halaman 163- 183

Spector, David L., Goldman, Robert D., Leinwand, Leslie A., 1998. **Cells a Laboratory Manual : Culture and Biochemical Analysis of Cells**, Cold Spring Harbore Laboratory Press.

Sukardiman, Poernomo H., 2000, **Penapisan Senyawa Antikanker dariTanaman Obat Indonesia dengan Molekul Target Enzim DNATopoisomerase, Laporan Program DCRG**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Suntoro H., 1983, **Metode Pewarnaan : Histologi dan Histokimia**, Jakarta: Brata Karya Aksara, Halaman 80-88.

Swanson, S.M., Pezzuto, J.M., 1990. Bioscreening Tecnique for Citotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis, *In* Thompson, E.B., **Drug Bioscreening : Drug Elevation Technique I Pharmacology,** VCH Publisher Inc., New York.

Tietze, H. W., 2002. **Terapi Pepaya,** PT. Prestasi Pustaka Raya, Jakarta.

Tjitrosoepomo, G., 1988. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta),** Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, halaman 256-259.

Uboh and Soma, 1998. **Methylphenidate Detection and Confirmation Procedures,** cited from :
http: //www.testingintegrityprogram.org/download/TIPmpen.pdf,
29 Agustus 2004.

Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG & Bhalla K. (2003). Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. **Cancer Res 63:** 93–99.