



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**UJI DAYA HAMBAT ALKALOID BUAH *Ficus pruniformis* Bl.
TERHADAP PERTUMBUHAN SEL KANKER SERVIKS DENGAN
METODE MTT ASSAY**

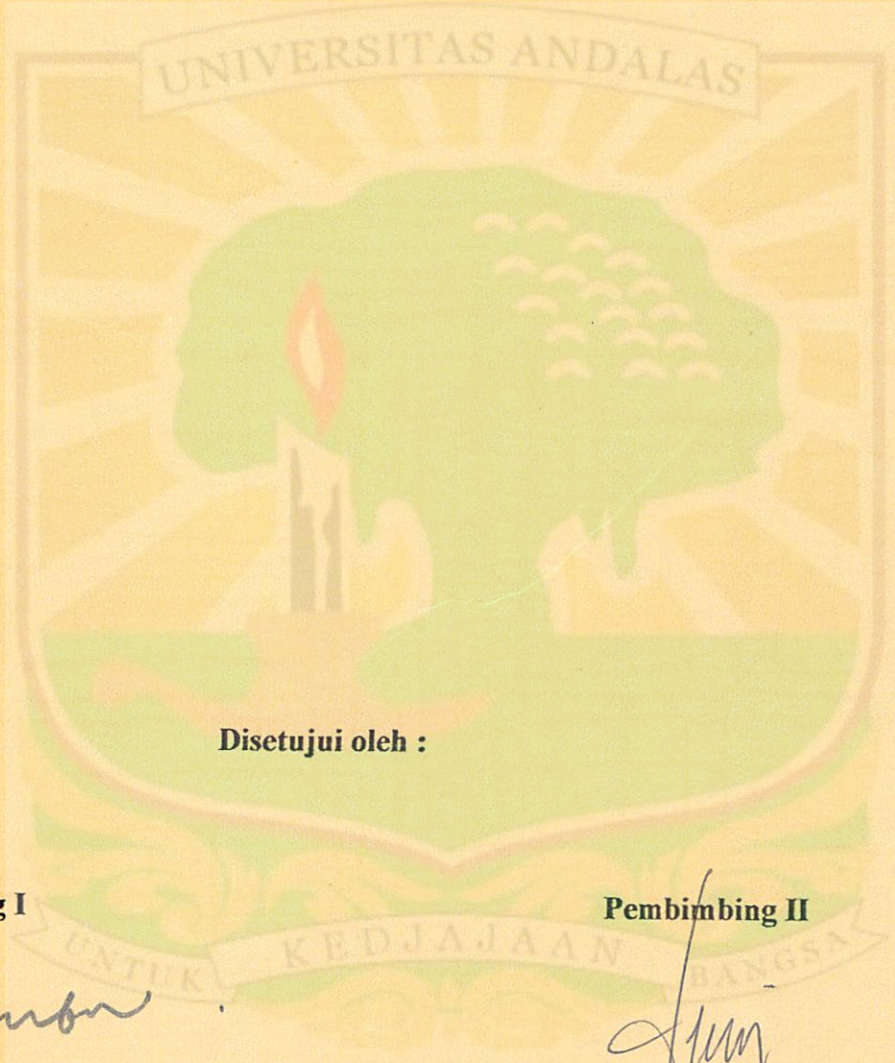
SKRIPSI



**NONI ZAKIAH
00121075**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian
Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Andalas
Padang**



Disetujui oleh :

Pembimbing I

of. Dr. rer. nat Adek Zamrud Adnan, MS, Apt

Pembimbing II

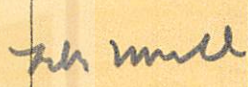
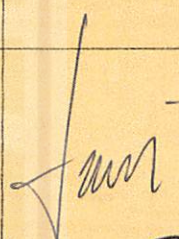
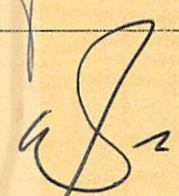
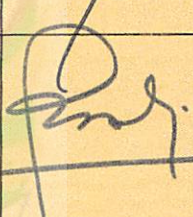

Dr. M. Husni Mukhtar, MS.DEA, Apt

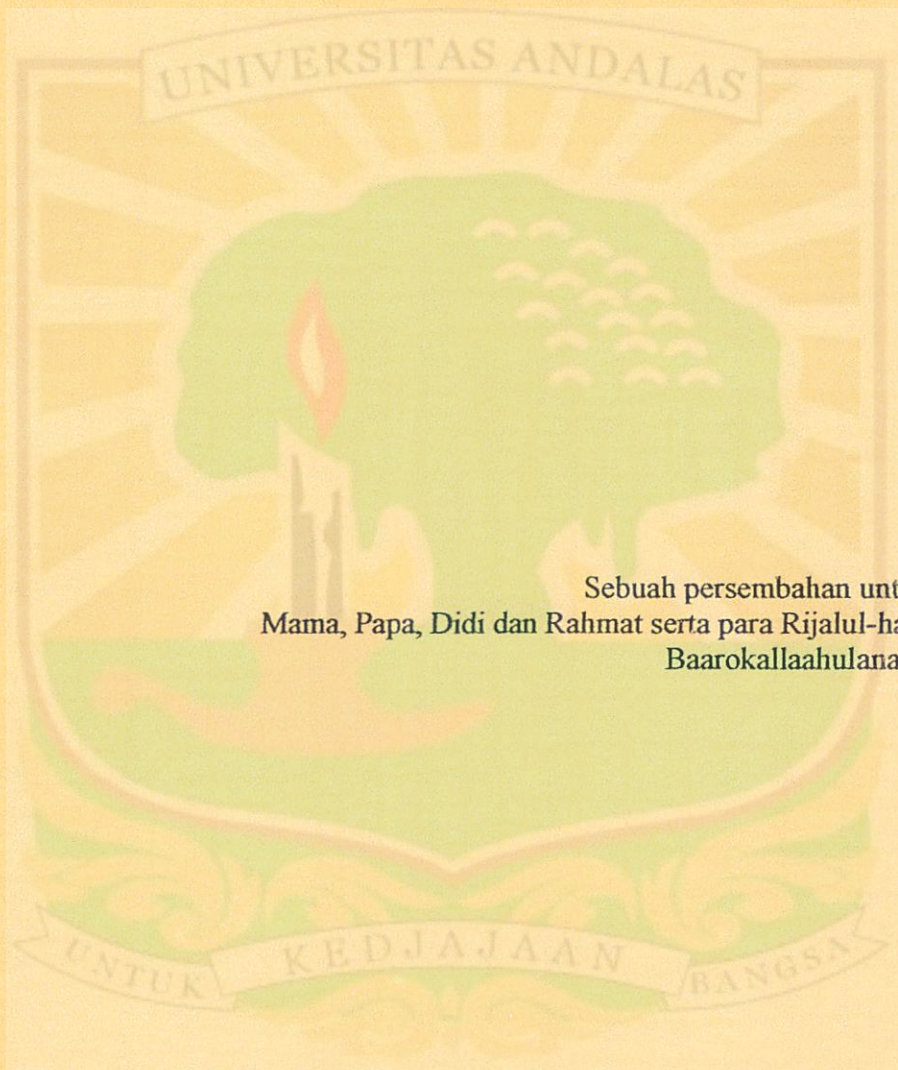
Skripsi ini telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Farmasi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Andalas Padang

Pada Tanggal: 18 Mei 2006

No.	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Prof. Dr. rer. nat. Adek Zambrud Adnan, MS, Apt	Ketua	
2	Dr. M. Husni Mukhtar, MS, DEA, Apt	Sekretaris	
3	Dr. Deddi Prima Putra, Apt	Anggota	
4	Dra. Ny. Hj. Rostiar Nasrul, Apt	Anggota	
5	Drs. Mahyuddin	Anggota	



Sebuah persembahan untuk
Mama, Papa, Didi dan Rahmat serta para Rijalul-haq.
Baarokallaahulanaa..

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul **UJI DAYA HAMBAT ALKALOID BUAH *Ficus pruniformis* BL. TERHADAP PERTUMBUHAN SEL KANKER SERVIKS DENGAN METODA MTT ASSAY**. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan strata satu pada Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

Selesainya penulisan skripsi ini tidak terlepas dari doa dan dukungan yang diberikan oleh orang tua, adik-adik dan keluarga besar tercinta baik moril maupun materil. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. rer. nat Adek Zamrud Adnan, MS, Apt dan Bapak Dr. M. Husni Mukhtar, MS, DEA, Apt, selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, serta petunjuk selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Akmal Djamaan, M.S, Apt, selaku penasehat akademik yang telah membimbing dan membantu dalam kelancaran studi penulis.
3. Bapak Dr. Deddi Prima Putra, Apt selaku penanggung jawab laboratorium Kimia Bahan Alam.
4. Bapak Dr. Edy Meiyanto, M.Si, Apt selaku pembimbing penelitian di Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

5. Bapak dan ibu dosen yang telah berdedikasi dalam memberikan ilmu.
6. Rekan-rekan mahasiswa laboratorium Kimia Bahan Alam Farmasi Unand.
7. Rekan-rekan mahasiswa laboratorium CCRC Farmasi UGM.
8. Rekan-rekan mahasiswa Farmasi terutama angkatan 2000 dan 2001 serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi perbaikan dan kesempurnaan skripsi ini.

Akhirnya kepada Allah SWT jualah penulis memohon semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Padang, Mei 2006

Penulis

ABSTRAK

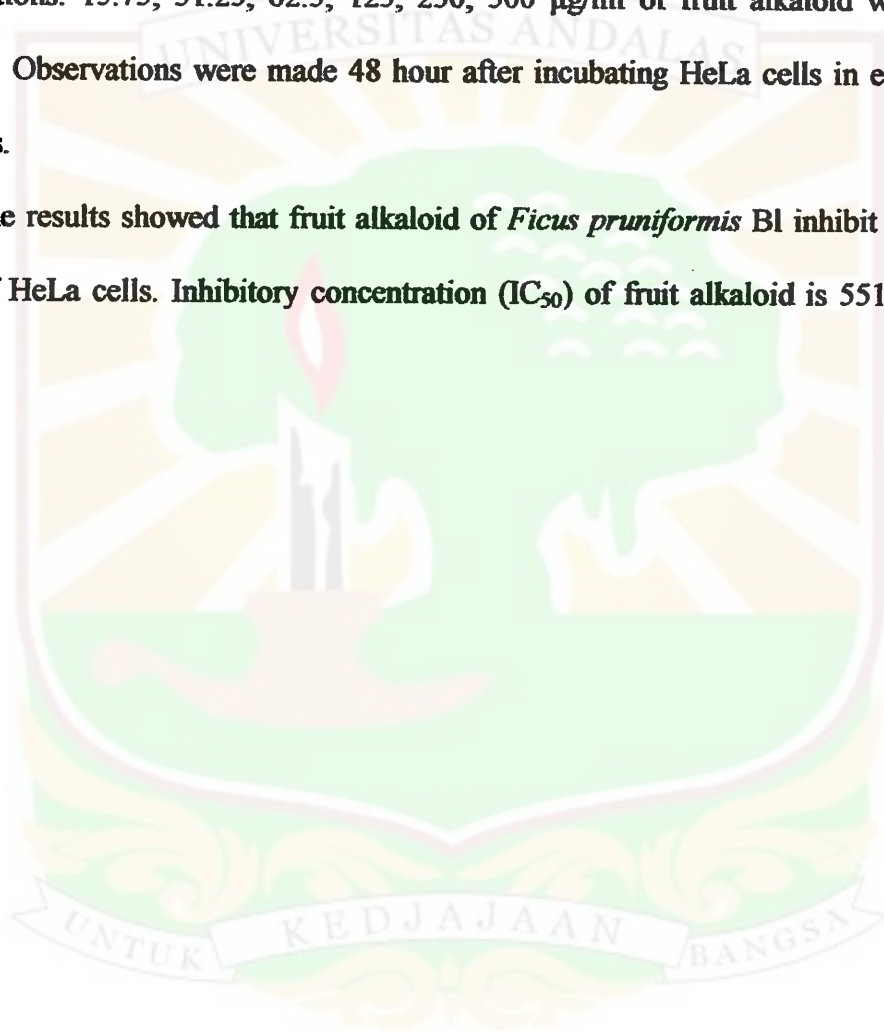
Telah dilakukan uji sitotoksik alkaloid buah *Ficus pruniformis* Bl. terhadap sel kanker rahim (sel HeLa) menggunakan metoda MTT . Berbagai konsentrasi alkaloid buah yang diperiksa yaitu 15,75; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/ml}$. Pengamatan dilakukan setelah 48 jam sel-sel HeLa perlakuan diinkubasi.

Hasilnya menunjukkan bahwa ternyata alkaloid buah *Ficus pruniformis* Bl. mempunyai efek dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa. Alkaloid buah mempunyai potensi penghambatan (Inhibitory Concentration = IC_{50}) sebesar 551.97 $\mu\text{g/ml}$.

ABSTRACK

Cytotoxic test of *Ficus pruniformis* Bl. fruit alkaloid has been studied on human uterine cervical carcinoma cells (HeLa cells) by the MTT method. Various concentrations: 15.75, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml of fruit alkaloid were evaluated. Observations were made 48 hour after incubating HeLa cells in each treatments.

The results showed that fruit alkaloid of *Ficus pruniformis* Bl inhibit the growth of HeLa cells. Inhibitory concentration (IC₅₀) of fruit alkaloid is 551.97 µg/ml.



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACK	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tinjauan Botani	3
2.1.1 Klasifikasi	3
2.1.2 Morfologi Ficus	3
2.1.3 Morfologi <i>Ficus pruniformis</i> Bl.	4
2.2 Alkaloid	4
2.3 Kanker	5
2.3.1 Karsinogenesis	6
2.3.2 Faktor-Faktor Penyebab Kanker	7
2.3.3 Klasifikasi Kanker	9
2.4 Daur Sel	10
2.5 Sitotoksisitas	12
2.5.1 <i>Continuous Cell Line</i>	12
2.5.2 Metoda MTT	13

2.6	Kanker Serviks dan Sel HeLa	14
III.	PELAKSANAAN PENELITIAN	15
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2	Metodologi Penelitian	15
3.2.1	Alat	15
3.2.2	Bahan	16
3.3	Prosedur Penelitian	16
3.3.1	Pengambilan Sampel	16
3.3.2	Identifikasi Tumbuhan	17
3.3.3	Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Metabolit Sekunder	17
3.3.4	Ekstraksi dan Fraksinasi	18
3.3.5	Pemeriksaan Aktifitas Sitotoksik	20
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1	Hasil	24
4.2	Pembahasan	24
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1	Kesimpulan	31
5.2	Saran	31
	DAFTAR PUSTAKA	32
	LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
I. Hasil uji pendahuluan kandungan metabolit sekunder buah tumbuhan <i>Ficus pruniformis</i> Bl.	36
II. Absorban larutan sampel dengan enam variasi konsentrasi, kontrol sel, kontrol DMSO dan media.	40
III. Hasil uji sitotoksik buah tumbuhan <i>Ficus pruniformis</i> Bl.	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daur sel	11
2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan oleh sel yang viabel	14
3. <i>Ficus pruniformis</i> Bl.	35
4. Skema ekstraksi dan fraksinasi buah <i>Ficus pruniformis</i> Bl.	37
5. Skema pemisahan fraksi kental diklorometan netral secara kromatografi kolom	38
6. Skema Uji Aktifitas Sitotoksik dengan Metoda MTT <i>assay</i> .	39
7. Grafik hubungan kadar larutan uji dengan % sel hidup	41
8. Kontrol sel HeLa (perbesaran 400 x)	42
9. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 15,75 µg/ml (perbesaran 400 x)	42
10. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 125 µg/ml (perbesaran 400 x)	43
11. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 500 µg/ml (perbesaran 400 x)	43
12. Pola KLT alkaloid	44

I. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit penyebab kematian di dunia setelah penyakit kardiovaskuler (1). Di negara maju seperti Amerika, Kanada dan Jepang angka kematian yang disebabkan oleh kanker sangat tinggi, yaitu dalam 3 kematian, satu kematian disebabkan oleh kanker (2). Diperkirakan pada tahun 2015, penyakit kanker akan menjadi penyebab separuh kematian di dunia (3). Di Indonesia, kanker menjadi salah satu penyebab utama kematian terutama kanker payudara dan leher rahim dan dari tahun ke tahun kasusnya semakin meningkat (4).

Penyakit kanker leher rahim atau yang biasa disebut kanker mulut rahim (*cervical cancer*) merupakan salah satu dari penyakit kanker yang sering diderita oleh wanita. Kanker ini terjadi pada serviks uterus, suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara uterus dengan vagina. Kanker leher rahim merupakan penyakit kanker yang berada pada urutan pertama dari seluruh jenis kanker yang diderita wanita. Dari 470.000 kasus-kasus baru di dunia yang muncul setiap tahunnya, diperkirakan 230.000 wanita meninggal karena penyakit kanker leher rahim (5). Menurut catatan RSCM pada tahun 1998 memperlihatkan persentase pasien penderita kanker leher rahim sebanyak 79% sedang kanker indung telur sebanyak 10% (6).

Berdasarkan data dari WHO, sepertiga dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah, sepertiga lagi dapat disembuhkan dan sepertiga lagi dapat dibebaskan

dari rasa nyeri jika diberi pengobatan (7). Dari beberapa fakta tersebut maka mutlak dilakukan penelitian dalam penemuan dan pengembangan obat kanker baru, baik obat yang bersifat sintetis maupun obat kanker yang berasal dari alam.

Indonesia adalah negara tropis yang terletak di garis khatulistiwa yang kaya akan tumbuhan bermanfaat untuk pengobatan berbagai macam penyakit. *Ficus* adalah salah satu genus tumbuhan yang diindikasikan mengandung alkaloid dan flavonoid yang memiliki sifat sitotoksik yang dapat dikembangkan menjadi antikanker (8). Salah satu spesies dari genus ini yang dapat dikembangkan adalah buah *Ficus pruniformis* Bl. yang dikenal dengan nama daerah buku-buku.

Dari uji pendahuluan tumbuhan ini mengandung golongan alkaloid, flavonoid, steroid dan fenol. Sebelumnya belum ada laporan tentang kandungan kimia dari buah *Ficus pruniformis* Bl ini. Namun dari uji sitotoksik dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Bioassay* diketahui bahwa aktivitas sitotoksik terhadap fraksi kloroform dari *Ficus pruniformis* Bl memberikan nilai LC_{50} sebesar 2,6009 $\mu\text{g/ml}$ yang berarti bahwa buah dari tumbuhan ini mempunyai aktivitas sitotoksik (9).

Berdasarkan informasi di atas, maka dilakukan beberapa kali pemisahan terhadap alkaloid buah tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl. Pemisahan senyawa alkaloid yang dituju dari fraksi diklorometan dilakukan dengan kromatografi kolom dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) (10). dan selanjutnya dilakukan uji aktifitas sitotoksik secara *in vitro* dengan metoda *MTT assay* menggunakan sel kanker leher rahim (11, 12).

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani

2.1.1 Klasifikasi

Tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl. Dapat diklasifikasikan sebagai berikut

(13):

Divisio	: Spermatophyta
Kelas	: Angiospermae
Sub-kela	: Dicotyledonae
Ordo	: Urticales
Famili	: Moraceae
Genus	: <i>Ficus</i>
Spesies	: <i>Ficus pruniformis</i> Bl.

2.1.2 Morfologi Ficus

Ficus merupakan salah satu dari genus famili Moraceae, ciri-cirinya berupa pohon, bergetah putih atau bening, daun menyebarkan dan umumnya berhadapan. Bagian dalam bunga membesar atau mempunyai ruang, dasar bunga berdaging, pada bagian ujung bunga dilengkapi dengan lubang yang ditutupi oleh kelopak. Perhiasan bunga 2-6. Buah melekat pada ketiak daun atau langsung menempel pada batang, pada dasar buah disokong oleh kelopak (13).

2.1.3 Morfologi *Ficus pruniformis* Bl.

Tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl. dikenal dengan nama daerah adalah tumbuhan buku-buku, berupa pohon. Buah menggantung, tangkai daun 0,8-2,5 cm, lamina daun tipis, daun berbentuk lanset atau elips lanset. Panjang daun 7,5-17,5 cm dan lebar 3-8,5 cm, ujung daun meruncing, dasar daun meruncing, tulang daun tersier, bentuk buah bulat (13).

2.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder yang terkenal dan sangat menarik perhatian. Hal ini terlihat pada usaha pencarian alkaloid yang terus menerus dilakukan. Istilah alkaloid diperkenalkan pada tahun 1819 oleh seorang ahli Farmasi Meissner, berasal dari kata alkali yang berarti basa dan oid berarti menyerupai (14). Definisi alkaloid yang paling umum digunakan adalah bahwa alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa, mengandung atom nitrogen heterosiklik, mempunyai aktifitas farmakologis dan umumnya berasal dari tumbuhan tingkat tinggi (15).

Alkaloid pada umumnya terdapat pada tumbuhan berbunga (Angiospermae), terutama pada kelas Dicotyledonae. Biasanya alkaloid dalam jumlah besar terlokalisasi pada organ-organ tertentu. Di dalam jaringan tumbuhan, alkaloid berada pada bagian vakuola (16). Selain dari tumbuhan, alkaloid juga terdapat pada hewan, serangga, organisme laut, mikroorganisme dan hewan tingkat rendah (14).

2.3 Kanker

Kanker atau karsinoma berasal dari kata Yunani, *karkinos* = kepiting. Secara istilah, kanker merupakan pembentukan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (*maligne*) (17).

Kanker menurut definisi yang umum adalah suatu penyakit dengan karakteristik pertumbuhan sel yang tidak teratur, menginvasi jaringan disekitar dan menyebar (metastatis) ke bagian lain dari tubuh. (18).

Sifat umum dari kanker adalah sebagai berikut (19, 20) :

- 1) Sel kanker mampu menginvasi jaringan di sekitarnya dan membentuk anak sebar (metastase).
- 2) Sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri.
- 3) Tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan.
- 4) Sel kanker mampu menghindari dari mekanisme apoptosis. Apoptosis merupakan proses bunuh diri sel ketika sel tersebut mengalami kerusakan. Namun sel kanker dapat menghindari dari kematian dengan memblok jalur terjadinya apoptosis di dalam sel.
- 5) Sel kanker memiliki potensi tak terbatas untuk mengadakan replikasi.
- 6) Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis untuk mencukupi kebutuhannya akan oksigen dan nutrisi.

2.3.1 Karsinogenesis

Karsinogenesis adalah proses multistap yang merupakan proses perubahan genetik sel normal menuju bentuk progresif dan akhirnya menjadi ganas (malignant). Dasar perubahan selular yang menyebabkan terjadinya kanker (karsinogenesis) adalah adanya perubahan basa DNA dari sel target yang biasa dikenal dengan mutasi (18).

Terdapat 4 fase dari proses karsinogenesis yaitu inisiasi, promosi, progresi dan metastatis (17).

Inisiasi adalah proses *irreversibel* yang diawali dengan adanya paparan senyawa karsinogen dan aktivasi senyawa-senyawa karsinogen tersebut melalui metabolisme (biotransformasi). Pada fase inisiasi ini terjadi interaksi kovalen antara spesies reaktif (metabolit) dari senyawa karsinogen dengan molekul DNA sebagai sel target selanjutnya merusak struktural DNA dan akhirnya terjadi kerusakan genotoksik. Jika mutasi dalam DNA tidak diperbaiki, sel yang terinisiasi dan yang mengalami perubahan ini dapat melakukan ekspansi menjadi sel preneoplastic dalam tahap promosi (21).

Promosi merupakan tingkat lanjutan dari inisiasi. Pada fase ini, zat karsinogen tambahan (*co-Carcinogens*) diperlukan sebagai promotor untuk mencetuskan proliferasi sel. Dengan demikian sel-sel rusak menjadi ganas (17). Berbagai senyawa kimia mampu menginduksi fase promosi. Senyawa kimia ini biasa disebut sebagai agen promotor. Pada fase promosi tidak terdapat interaksi antara agen promotor atau metabolitnya dengan DNA. Potensi agen promotor ini diketahui karena kemampuannya untuk menginduksi pertumbuhan klonal dari

sel-sel yang telah terinisiasi oleh senyawa karsinogen. Fase promosi bersifat *reversible*, karena dengan adanya penghentian paparan agen promotor, pertumbuhan preneoplastic akan terhambat (22).

Progresi merupakan tahap karsinogenesis ketika gen-gen pertumbuhan yang diaktivasi oleh kerusakan DNA mengakibatkan mitosis dipercepat dan terjadi petumbuhan liar dari sel-sel ganas. Tumor menjadi manifes. Pada fase ini terjadi angiogenesis. Angiogenesis adalah pembentukan cabang baru pada pembuluh darah yang menuju sel kanker yang kemudian akan mensuplai kebutuhan nutrisi dan oksigen dari sel kanker (17).

Tahap terakhir pada karsinogenesis adalah metastatis. Pada tahap ini sel kanker dari tumor primer masuk ke dalam sirkulasi atau sistem limfatik dan menyerang permukaan jaringan organ yang baru membentuk jaringan kanker sekunder di tempat lain (anak sebar) (17).

2.3.2 Faktor-faktor Penyebab Kanker

Penyebab kanker (karsinogen) sampai saat ini belum diketahui dengan pasti. Ada banyak faktor penyebab yang dapat menimbulkan kanker pada binatang percobaan. Namun hal ini belum sepenuhnya dapat dibuktikan pada manusia, tetapi harus tetap menjadi perhatian. Gaya hidup modern dewasa ini juga dapat meningkatkan risiko pertumbuhan kanker.

Karsinogen secara umum dapat diartikan sebagai penyebab yang dapat merangsang pertumbuhan kanker. Beberapa karsinogen yang diduga dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker sebagai berikut (7, 18) :

1) Senyawa kimia

Ada 4 golongan senyawa kimia utama yang bertindak sebagai karsinogen yaitu; hidrokarbon aromatis polisiklik (contohnya benzopiren dan senyawa lain yang mengandung gugus fenantren), amina aromatis (contohnya 2-naftilamin), nitrosamine (contohnya N-metilnitrosourea) dan zat pengalkilasi (contohnya siklofosfamid). Karsinogen ini bekerja dengan cara merusak DNA. Senyawa tersebut memberikan efek dengan membentuk ikatan kovalen dengan basa DNA. Senyawa-senyawa tersebut bersifat elektrofilik (defisiensi elektron) yang akan berikatan dengan gugus nukleofilik (kaya elektron) pada asam amino DNA sehingga terbentuk DNA *adduct*. DNA *adduct* adalah DNA yang berikatan dengan karsinogen yang sebelumnya telah diaktivasi oleh adanya enzim sitokrom P450 oksigenase.

Untuk menjadi unsur karsinogenik, zat kimia tersebut harus dimetabolisme terlebih dahulu (prokarsinogenik). Proses yang terjadi disebut aktivasi metabolik, yaitu proses dimana satu atau lebih reaksi yang dikatalisis enzim mengubah prokarsinogen menjadi karsinogen aktif. Senyawa yang terbentuk disebut karsinogen proksimat dan senyawa akhir yang bereaksi dengan komponen seluler (misal DNA) adalah karsinogen ultimat. Enzim yang berperan dalam proses ini adalah enzim sitokrom P-450 yang terdapat di dalam retikulum endoplasma.

Zat-zat karsinogen ultimat tersebut berinteraksi dengan purin, pirimidin atau gugus fosfodiester pada DNA dan tempat penyerangan yang paling lazim adalah guanin.

2) Faktor fisika

Faktor fisika yang terutama adalah radiasi dari sinar X, sinar gamma, sinar ultra violet dan partikel radiasi dari bahan radioaktif. Pembentukan ion dalam sel jaringan di bawah radiasi bersifat sangat reaktif dan dapat menghancurkan rantai DNA, sehingga menyebabkan mutasi.

3) Virus

Virus yang dapat menyebabkan kanker disebut dengan virus onkogenik. Terjadinya kanker hati (hepatoma) meningkat tajam pada penderita hepatitis kronis akibat virus hepatitis B dan C (VHB dan VHC). Kanker serviks dihubungkan dengan terinfeksi leher rahim oleh *Human Papilloma Virus*.

4) Hormon

Hormon adalah zat yang dihasilkan oleh kelenjar tubuh yang berfungsi mengatur kegiatan organ-organ tubuh. Pemberian hormon tertentu secara berlebihan dapat menimbulkan kanker pada organ tubuh yang dipengaruhinya, seperti payudara, rahim, ovarium dan prostat.

Dietil stilbestrol suatu hormon seks buatan yang lazim digunakan untuk menggemukkan hewan ternak, terbukti sebagai penyebab timbulnya kanker rahim, payudara dan alat reproduksi lainnya.

2.3.3 Klasifikasi Kanker

Menurut jenis jaringan asal pertumbuhannya, kanker dapat diklasifikasikan (17) :

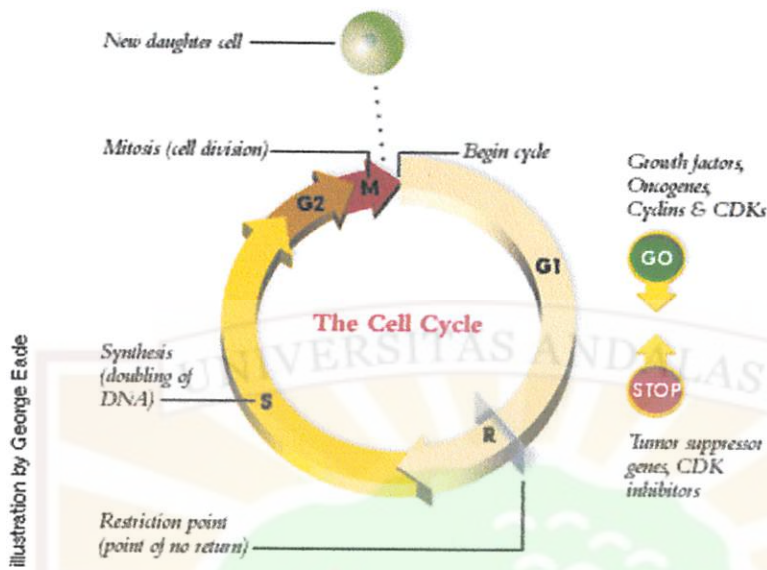
1. Limfoma: kanker pada kelenjar limfe, misalnya penyakit (non) Hodgkin dan penyakit Burkitt yang berciri benjolan rahang.

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

2. Sarkoma: kanker yang berasal dari pembuluh darah, jaringan ikat, otot atau tulang, misalnya sindroma Kaposi, suatu tumor pembuluh di bawah kulit tungkai bawah dengan bercak-bercak merah.
3. Leukemia: kanker darah yang berhubungan dengan produksi leukosit yang abnormal tinggi dan eritrosit sangat berkurang.
4. Myeloma: kanker pada sum-sum tulang, yaitu adanya pertumbuhan liar sel-sel plasma di sumsum.
5. Melanoma: kanker kulit yang luar biasa ganasnya, terdiri dari sel-sel pigmen yang dapat menyebar dengan pesat.
7. Karsinoma: kanker yang tumbuh dari jaringan epitel, meliputi membran mukosa dan kelenjar (seperti kanker payudara, paru-paru dan ovarium).
8. Blastoma merupakan kanker pada sistem syaraf .
9. Adenoma: benjolan maligne pada kelenjar, misalnya pada prostat dan mammae.

2.4 Daur Sel

Daur sel kanker pada dasarnya sama dengan sel normal, yaitu terdapat tiga keadaan : sedang membelah (fase proliferaatif), dalam keadaan istirahat (tidak membelah, Go) dan secara permanen tidak membelah. Sel tumor membelah melalui 4 fase, yaitu : fase G1, fase S (sintesis DNA), fase G2 dan fase M (23).



Gambar 1. Daur sel (24)

Fase G1 merupakan fase yang paling menentukan terhadap keseluruhan siklus sel. Fase ini berfungsi untuk memastikan cukupnya sinyal untuk kelangsungan sel dan akurasi transmisi informasi genetik (18). Pada fase ini sel melakukan persiapan untuk sintesis DNA. Proses sintesis DNA akan terjadi jika sel telah melewati titik restriksi (R) pada akhir fase G1. Persiapan ini meliputi sintesis protein-protein yang esensial untuk sintesis DNA sehingga sel akan melewati titik dan memasuki fase sintesis (25). Fase S (sintesis DNA) ditandai dengan adanya proses sintesis DNA dan replikasi genomnya (24). Sel mereplikasikan DNA menjadi dua set DNA yang identik, dan dengan begitu sel siap memasuki fase G2 (25).

Fase G2 ditandai dengan sel melakukan persiapan untuk proses pembagian genom ke sel anak dan juga memastikan ketepatan replikasi DNA dengan enzim preparasi DNA (24). Selain itu sel juga melakukan pertumbuhan dan sintesis protein sehingga cukup untuk kelangsungan dua sel yang akan terbentuk (25).

Fase M ditandai dengan sel melakukan pembagian genom kepada sel anak (24). Setelah proses ini selesai, sel akan melakukan pembelahan (sitokinesis) sehingga menghasilkan dua sel anak yang identik (25). Kedua sel akan masuk ke dalam fase G1 atau masuk fase istirahat (*Go*) (24). Regulasi siklus sel diatur oleh tiga jenis gen, yaitu onkogen, *supressor genes* dan gen yang mengatur replikasi DNA (1).

Onkogen dan *supressor genes* bekerja secara harmonis untuk mengatur perkembangan sel dalam rangka menjaga integritas tubuh secara keseluruhan. Kerusakan pada gen-gen tersebut berisiko terhadap terjadinya kanker (25).

Pada tiap tahap dari siklus sel baik G1, S, G2 atau M ada mekanisme kontrol yang melibatkan *delay*, *arrest* atau kematian sel bila ada hal yang tidak beres, misalnya ada DNA yang rusak atau tidak tereplikasi. Mekanisme senyawa antikanker dapat melalui penghambatan daur sel (*cell cycle arrest*), penundaan atau memperlambat daur sel (*cell cycle delay*) atau pemacuan apoptosis (18).

2.5 Sitotoksisitas

2.5.1 *Continuous Cell Line*

Sitotoksisitas merupakan uji toksisitas secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel untuk mengevaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan dan mendeteksi adanya aktifitas antikanker dari suatu senyawa. Pada penelitian kanker, kultur sel yang digunakan adalah *Continuous cell line*.

Continuous cell line adalah sel yang dikultur dari *primary culture* yaitu sel yang langsung berasal dari organ atau jaringan, diperoleh dengan metoda

enzimatik atau secara mekanik kemudian dikultur di dalam kondisi hormonal yang sesuai (26).

Keuntungan Continuous cell line adalah (27) :

- 1) Laju pertumbuhannya cepat sehingga diperoleh kepadatan sel yang tinggi.
- 2) Dapat dipelihara dalam media yang sederhana dan dapat ditumbuhkan dalam suspensi.
- 3) Mempunyai derajat homogenitas yang tinggi.
- 4) Mudah diganti dengan stok beku (*frozen stock*) seandainya terjadi kontaminasi.

Akhir dari uji sitotoksisitas dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi obat maksimal yang masih memungkinkan sel bertahan hidup (maximal non-toxic concentration) melalui IC₁₀ nya serta konsentrasi toksik potensial melalui IC₅₀ nya (28).

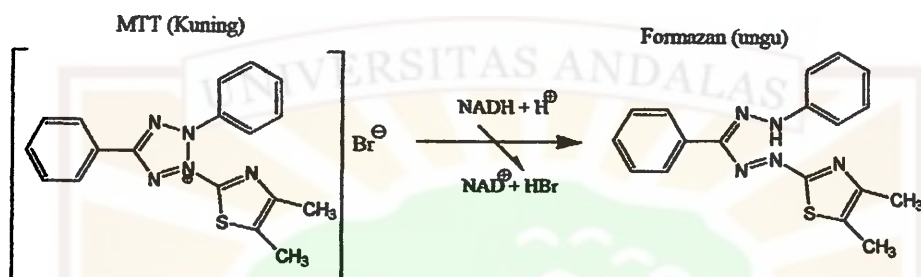
2.5.2 Metoda MTT

Untuk mengetahui respon populasi sel terhadap faktor eksternal diperlukan suatu metoda yang dapat mengkuantifikasi sel uji, salah satunya adalah metoda MTT (mengukur sel yang viabel) disamping metoda lain seperti hemositometer (mengukur sel yang viabel dan non viabel), dan colony-forming efficiency (mengukur sel yang viabel dan membelah) (29).

Uji viabilitas sel menggunakan metoda MTT merupakan metoda sitotoksisitas kolorimetrik yang cepat, sensitif dan akurat. Uji MTT {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolim Bromide} dikemukakan pertama

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

kali oleh Mosmann pada tahun 1983. Uji ini didasarkan pada kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria pada sel yang viabel (sel yang masih hidup) untuk memecah cincin tetrazolium dari MTT yang berwarna kuning pucat dan larut menjadi kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut.



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (12)

Kristal formazan yang berwarna ungu terakumulasi di dalam sel. Banyaknya sel yang bertahan hidup berbanding langsung dengan banyaknya produk formazan yang terbentuk. Kemudian kristal tersebut dilarutkan dalam pelarut organik, sehingga larutannya dapat diukur pada ELISA *plate reader*. Uji ini digunakan untuk melihat respon dari *cell lines* terhadap senyawa uji. (12).

2.6 Kanker Serviks dan Sel HeLa

Kanker leher rahim merupakan kanker yang terjadi pada jaringan epitel organ leher rahim (serviks) wanita (18). Yang berperan pada kanker leher rahim adalah *Human Papilloma Virus* (HPV). Sel serviks yang telah terinfeksi tersebut diisolasi pada tanggal 1 Februari 1951 dari seorang wanita yang bernama Henrietta Lacks berusia 31 tahun dari Baltimore USA, sehingga sel kanker yang diisolasi tersebut dinamakan dengan sel HeLa (*HeLa cell line*) (30).

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama lebih kurang 9 bulan, di Laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang dan Laboratorium Ilmu Hayati LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2 Metodologi Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan untuk isolasi senyawa adalah botol maserasi, destilasi vakum, *rotary evaporator*, penangas air, desikator, botol semprot, vial volume 20 ml, plat tetes, pipet tetes, tabung reaksi dan rak, spatel, timbangan analitik, corong, erlenmeyer (kapasitas 250 ml, 500 ml dan 2 l), gelas piala (kapasitas 100 ml), corong pisah (kapasitas 1 l), gelas ukur (kapasitas 10 ml, 100 ml dan 250 ml), lemari pengering (oven), lampu ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60 (230-400 mesh), sephadex LH, kolom kromatografi, bejana kromatografi (chamber), kertas saring (Whatman[®]), kapas, aluminium foil dan kertas pH.

Peralatan yang digunakan untuk pengujian aktifitas sitotoksik adalah sarung tangan, inkubator CO₂ (Heraceus), sentrifus (Sigma), Laminar Air Flow Cabinet (Nuair class II type A/B₃), mikropipet (Gilson), autoklaf (All American),

mikroskop inverted (Olympus CD-2), ELISA reader (SLT 340 ATC), 96-well plate (nunc), kamera digital (Canon Power Shoot S 49, 4,0 mega pixel), tabung reaksi, parafilm, *tissue culture flask*, timbangan analitik, tabung konikal, *haemocytometer* (Nebouer), autoklaf, filter polietilen sulfon dan vorteks.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi adalah buah *Ficus pruniformis* Bl segar, aquadest, Asam sulfat 2 N, serbuk logam Mg, Asam klorida pekat, Asam asetat anhidrat, FeCl₃, Pereaksi Mayer, Pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi Drogendorf, kloroform dan kloroform-amoniak 0,05 N, metanol, larutan asam asetat 5%, *n* – heksana, diklorometan, amoniak pekat, natrium sulfat anhidrat.

Bahan-bahan yang digunakan pada uji sitotoksik adalah sel HeLa (sel kanker serviks manusia), senyawa murni dari buah *Ficus pruniformis*, Dimetil sulfoksida (DMSO) 1,25% (sigma), media pertumbuhan sel (RPMI 1640 (Gibco)) dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 % (Gibco), *penicillin-streptomycine* 1% (Gibco), Fungison 0,5% (Gibco), etanol 70%, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromida), reagen stopper (HCl .10% dalam Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)), HEPES (sigma), Natrium bikarbonat (sigma)

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel diambil di Daerah Aliran Sungai Lembah Anai, Bukit Babungo, Padang Panjang, Propinsi Sumatera Barat pada bulan April 2005.

3.3.2 Identifikasi Tumbuhan

Tumbuhan diidentifikasi di Laboratorium Herbarium Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang dengan nomor koleksi AND AZA 10.

3.3.3 Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Metabolit Sekunder

3.3.3.1 Pemeriksaan Alkaloid (31).

Dilakukan dengan metoda Culvenor-Fritzgerald yaitu :

Sebanyak 4 g sampel segar dipotong halus, gerus dalam lumpang dengan bantuan pasir bersih dan tambahkan 10 ml kloroform. Tambahkan 10 ml kloroform amoniak 0,05 N, gerus, saring ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml asam sulfat 2 N, kocok selama 1 menit, biarkan sampai terjadi pemisahan. Ambil lapisan asam, pindahkan ke tabung reaksi lain, kemudian tambahkan beberapa pereaksi Mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih (+1) hingga gumpalan putih (+4).

3.3.3.2 Pemeriksaan Flavonoid (32).

Sebanyak 4 g sampel segar dipotong halus, dididihkan dengan 25 ml etanol dan saring selagi panas. Filtrat diuapkan hingga tinggal setengahnya, lalu tambahkan beberapa tetes asam klorida pekat dan serbuk magnesium. Adanya flavonoid akan memberikan warna merah intensif.

3.3.3.3 Pemeriksaan Steroid, Terpenoid, Saponin, dan Senyawa Fenol (33).

Dilakukan berdasarkan metoda Simes dkk. yang dimodifikasi yaitu : sebanyak 4 g sampel segar dipotong halus dan didihkan dengan 25 ml metanol selama 15 menit, saring selagi panas. Kemudian filtrat diuapkan sampai kering. Ekstrak yang didapat ditambahkan kloroform dan air (1:1) sebanyak 5 ml masing-masingnya, kocok, biarkan sejenak sehingga terbentuk lapisan kloroform dan lapisan air.

Pemeriksaan saponin, sebagian lapisan air dikocok kuat-kuat dalam sebuah tabung reaksi. Bila ada saponin akan terbentuk busa yang stabil selama 15 menit. Pemeriksaan fenolik, sebagian dari lapisan air ditambahkan dengan besi (III) klorida, menandakan adanya fenol, reaksi dinyatakan positif bila terjadi perubahan warna.

Pemeriksaan terpenoid dan steroid, pada lapisan kloroform, disaring dengan norit, filtrat dibiarkan kering pada plat tetes dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Terpenoid umumnya memberikan warna merah, sedangkan steroid memberikan warna biru-hijau.

3.3.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi atau perendaman dengan metanol. Sebanyak 17,5 kg buah segar tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl. ditumbuk, sampel dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap yang berkapasitas 2,5 L. Perendaman dilakukan 5 x 5 hari dengan sesekali diaduk. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kapas dan filtratnya diuapkan secara *in vacuo*.

Ekstrak bebas metanol yang telah diperoleh ditambahkan larutan asam asetat 5 % 500 ml, didiamkan semalam, lalu didekantasi. Filtrat yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana (3x 500 ml), sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi n-heksana diuapkan pelarutnya *in vacuo* dan didapatkan fraksi kental n-heksana.

Fraksi air selanjutnya difraksinasi dengan Diklorometan (3 x 500 ml), sehingga diperoleh fraksi Diklorometan dan fraksi air. Fraksi Diklorometan diuapkan pelarutnya secara *in vacuo* dan diperoleh fraksi kental Diklorometan. Dan fraksi air selanjutnya dibasakan dengan larutan amoniak hingga pH 9-10, kemudian larutan tersebut difraksinasi dengan Diklorometan (3 x 500 ml), sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi Diklorometan basa dan fraksi air. Fraksi Diklorometan basa diuapkan pelarutnya secara *in vacuo* dan diperoleh fraksi kental Diklorometan basa.

Masing-masing ekstrak kental fraksi diuji menggunakan reagen Drogendorf untuk memonitor keberadaan alkaloid yang terdapat di dalam masing-masing ekstrak fraksi. Ekstrak fraksi yang memberikan hasil positif dengan reagen Drogendorf selanjutnya diisolasi menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam silika gel 60 (230-400 mesh) dan fase gerak campuran pelarut yang berbeda kepolaran secara SGP (*Step Gradien Polarity*). Setiap fraksi yang keluar ditampung dengan vial masing-masing sekitar 10 ml. Setiap fraksi tersebut dimonitor dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan penampak bercak sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan reagen Drogendorf yang akan

memberikan warna ungu terhadap fraksi yang positif alkaloid. Selanjutnya kromatografi kolom dilanjutkan hingga diperoleh isolat alkaloid mendekati murni. Isolat tersebut dilanjutkan dengan uji daya hambat pertumbuhan sel kanker menggunakan metoda MTT *assay*.

3.3.5 Pemeriksaan Aktifitas Sitotoksik

3.3.5.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan harus dalam keadaan bersih dan steril. Alat-alat dari plastik hanya digunakan untuk sekali pakai dan untuk alat-alat gelas, disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb selama 20 menit. Untuk penggunaan *Laminar Air Flow* (LAF), lampu UV harus terlebih dahulu dinyalakan selama 15 menit, lalu dihidupkan blower dan jendela dibuka sedikit, dasar dari LAF disemprot secara merata dengan menggunakan etanol 70% dan dibersihkan dengan tisu yang sebelumnya telah disemprot etanol.

3.3.5.2 Pembuatan media pencuci dan penumbuh biakan sel

Media pencuci dibuat dengan melarutkan medium RPMI 1640 dalam aquadest, ditambah 2 gram NaHCO₃ dan 2 gram Hepes. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen, tambahkan larutan HCl 1 N hingga pHnya 7,2-7,4 menggunakan pH meter. Selanjutnya larutan tersebut disaring menggunakan filter polietilen sulfon steril 0,2 µm secara aseptis.

Media penumbuh sel dibuat dengan cara mencampurkan larutan FBS 10% 30 ml, fungizon 1,5 ml dan penstrep 3 ml. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilen sulfon steril 0,2 µm secara aseptis.

3.3.5.3 Pengaktifan sel HeLa

Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung *conica* steril yang berisi medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifus 1500 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml medium penumbuh yang mengandung 10% FBS, diresuspensikan perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (3-4 buah), diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen sehingga jumlahnya cukup untuk penelitian.

3.3.5.4 Panen sel HeLa

Setelah jumlah sel cukup, medium diganti dengan medium RPMI 1640 yang baru sebanyak 5 ml dan sel dilepaskan dari koloninya dengan cara flask digoyang perlahan dan jika perlu diresuspensi perlahan. Sel dipindah ke dalam tabung *conica* steril dan ditambah medium RPMI 1640 sampai volume 10 ml dan disentrifus 1500 rpm selama 5 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah sejumlah medium sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 3×10^4 sel/100 μ l dan siap untuk penelitian.

3.3.5.5 Pembuatan dan penyiapan larutan uji

Isolat dilarutkan menggunakan DMSO 1,25% dalam aquadest steril. Selanjutnya larutan uji dimasukkan dalam conical steril, ditutup dengan parafilm dan disimpan dalam lemari es. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi dari senyawa yang akan diujikan dari larutan stok dalam media RPMI. Pembuatan larutan uji ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow (LAF) cabinet*.

Seri konsentrasi yang digunakan adalah 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, dan 15,75 µg/ml. Jumlah pengulangan perlakuan dilakukan tiga kali untuk masing-masing konsentrasi.

3.3.5.6 Uji sitotoksitas menggunakan metoda MTT

Sel didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi bersama berbagai seri konsentrasi senyawa uji selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 10 µl MTT 2,5 µg/ml dalam media RPMI. Kemudian diinkubasi lagi selama 6 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (HCl 10% dalam SDS), lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Persen kehidupan sel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{Absorban Sumuran Uji} - \text{Absorban Kontrol Larutan Uji}}{\text{Absorban Kontrol sel} - \text{Absorban Kontrol Media}}$$

Dari persen kehidupan sel tersebut kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi sampel versus persentase kehidupan sel. Dari perhitungan

persentase akan terlihat harga IC_{50} yang terletak diantara kadar sampel yang dibuat.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

1. Pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia *Ficus pruniformis* Bl. memperlihatkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, steroid dan fenol (lampiran 2, tabel 1).
2. Dari 17,5 kg buah segar *Ficus pruniformis* Bl dilakukan proses maserasi dan diperoleh ekstrak metanol 164,78 g (0,98 %). Dari 82,39 g ekstrak metanol yang difraksinasi diperoleh fraksi heksan sebanyak 1,77 g, fraksi diklorometan netral sebanyak 1,34 g dan fraksi diklorometan basa sebanyak 0,33 g (lampiran 3, gambar 2).
3. Ekstrak fraksi yang mengandung alkaloid adalah ekstrak fraksi diklorometan netral. Setelah dilakukan beberapa kali pemisahan, diperoleh isolat alkaloid yang diberi kode FPR-3-2-2 yang berwarna hijau muda dengan berat 80 mg (lampiran 4, gambar 3).
4. Hasil uji sitotoksikitas isolat terhadap sel HeLa memperlihatkan bahwa isolat dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 551,97 $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Pembahasan

Penelitian yang dilakukan ini merupakan salah satu tahap dalam upaya mencari sumber antikanker baru. Skrining awal telah dilakukan terhadap fraksi kloroform buah segar *Ficus pruniformis* Bl dengan metoda *Brine Shrimp Lethality*

Bioassay yang merupakan uji toksisitas secara *in vitro* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach., diketahui bahwa aktifitas sitotoksiknya memberikan nilai LC_{50} sebesar 2,6009 $\mu\text{g/ml}$ yang berarti bahwa buah dari tumbuhan ini mempunyai aktifitas sitotoksik (9). Tahap selanjutnya dilakukan uji terhadap isolat alkaloid dari fraksi diklorometan terhadap sel kanker serviks (sel HeLa).

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah buah yang masih dalam keadaan segar, dengan tujuan untuk menghindari rusaknya kandungan kimia, terutama alkaloid selama pengeringan, karena belum diketahui apakah kandungan alkaloid tumbuhan ini stabil atau tidak pada proses pengeringan. Pada mulanya sampel buah segar *Ficus pruniformis* Bl. sebelum digunakan terlebih dahulu ditumbuk. Hal ini dilakukan untuk memperluas permukaan sampel agar terjadi penetrasi pelarut yang baik ke dalam membran sel sehingga proses pelarutan senyawa-senyawa yang terdapat di dalam sampel menjadi lebih sempurna.

Penyarian sampel dilakukan dengan cara maserasi karena metoda ini ditinjau dari cara pengerjaan dan alat-alat yang digunakan cukup sederhana, yaitu dengan merendam sampel 3-5 hari dengan 3-5 kali pengulangan. Maserat yang diperoleh selanjutnya disaring menggunakan kapas. Selama perendaman sampel sesekali dikocok untuk mempercepat proses pelarutan senyawa kimia dalam tumbuhan. Untuk menghindari terjadinya penguraian senyawa yang tidak stabil terhadap cahaya maka maserasi dilakukan di tempat yang terlindung dari cahaya dan pada botol yang berwarna gelap. Penggunaan metanol sebagai pelarut dalam proses maserasi ini bertujuan karena metanol merupakan pelarut yang dapat

melarutkan hampir seluruh senyawa organik dalam tumbuhan baik yang bersifat polar maupun non polar, mempunyai titik didih yang rendah (65°C) sehingga mudah diuapkan dan harganya relatif lebih murah jika dibandingkan dengan pelarut organik yang lain.

Ekstrak metanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya secara *in vacuo* karena dalam keadaan vakum tekanan uap pelarut menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa termolabil yang terdapat dalam sampel.

Ekstrak kental diasamkan dengan asam asetat 5%, dimaksudkan untuk meningkatkan kelarutan garam alkaloid dalam air. Selanjutnya ekstrak kental didiamkan satu malam lalu didekantasi agar fraksi asam yang mengandung alkaloid terbebas dari senyawa-senyawa pengotor yang tidak larut dalam air atau asam. Kemudian dilakukan fraksinasi dengan beberapa pelarut sesuai kepolarannya, dimana senyawa-senyawa organik yang berbeda kepolarannya akan larut di dalam pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama atau hampir sama. Fraksinasi dilakukan mulai dari pelarut non polar heksan, dimana senyawa-senyawa lipofil seperti lemak, lilin dan minyak atsiri akan masuk ke dalam fraksi heksan ini, sementara pada larutan sisa yang mengandung alkaloid difraksinasi lagi dengan diklorometan yang bersifat semi polar sehingga senyawa-senyawa semi polar termasuk alkaloid akan tertarik ke fraksi diklorometan ini, fraksi yang diperoleh diuapkan dengan rotari evaporator sampai didapatkan ekstrak fraksi kental diklorometan. Pada larutan sisa yang masih mengandung garam alkaloid asetat tadi ditambahkan NH_4OH pH 9-10 untuk membebaskan alkaloid dari garam

asetatnya, selanjutnya larutan ini difraksinasi lagi dengan diklorometan dan fraksi diklorometan yang diperoleh diuapkan dengan rotari evaporator sampai didapatkan fraksi kental diklorometan basa (34). Setelah dilakukan monitor keberadaan alkaloid di dalam masing-masing fraksi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan penampak bercak Drogendorf, ternyata fraksi yang mengandung alkaloid adalah fraksi diklorometan netral.

Ekstrak fraksi diklorometan netral selanjutnya dilakukan pemisahan dengan cara kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel 60 (230-400 mesh) dan fasa gerak diklorometan dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya dengan membuat berbagai perbandingan. Kromatografi kolom merupakan metoda pemisahan yang paling umum dilakukan dan juga dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah banyak (10, 35). Hasil kromatografi kolom dari 1,34 g fraksi diklorometan netral diperoleh fraksi FPR-1 sampai FPR-6. Uji penampak bercak dengan Drogendorf memperlihatkan bahwa fraksi yang positif alkaloid adalah fraksi FPR-3 (vial 17-36). Selanjutnya fraksi FPR-3 dilakukan pemisahan lanjutan secara kromatografi kolom, diperoleh fraksi FPR-3-1 sampai fraksi FPR-3-3. Pada uji penampak bercak dengan Drogendorf memperlihatkan bahwa fraksi yang positif alkaloid adalah fraksi FPR-3-2 (vial 14-27). Selanjutnya fraksi FPR-3-2 dilakukan pemisahan lanjutan secara kromatografi kolom, diperoleh fraksi FPR-3-2-1 sampai fraksi FPR-3-2-3. Pada uji penampak bercak dengan Drogendorf memperlihatkan bahwa fraksi yang positif alkaloid adalah fraksi FPR-3-2-2 (vial 10-22). Berat isolat yang diperoleh adalah 80 mg (lampiran 4, gambar 5).

Isolat tersebut kemudian diuji aktifitas sitotoksiknya dengan metoda MTT *assay* terhadap sel kanker serviks (sel HeLa). Uji sitotoksikitas dilakukan untuk mengetahui potensi ketoksikan senyawa uji terhadap sel dengan parameter IC_{50} yang merupakan kadar dimana 50% dari populasi sel mengalami penghambatan pertumbuhan (28). Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan potensi penghambatan yang semakin besar (29).

Sel HeLa sebelum digunakan untuk uji perlu ditumbuhkan hingga konfluen terlebih dahulu supaya jumlahnya mencukupi untuk keperluan uji. Sel yang konfluen adalah kondisi sel ketika fase pertumbuhannya mulai menurun atau tidak ada pertumbuhan sama sekali karena nutrisi telah habis. Kemudian dilakukan subkultur atau penggantian media kultur yang baru.

Kelarutan isolat dalam air sangat terbatas. Namun, larut dengan baik dalam DMSO (dimetil sulfoksida) sehingga sebagai pelarut digunakan DMSO. Penggunaan DMSO sampai 1,25% v/v pada sel Hela relatif tidak berpengaruh terhadap proliferasi sel (36). Berdasarkan pertimbangan tersebut, pelarut DMSO digunakan dalam uji sitotoksikitas ini disertai kontrol uji menggunakan DMSO. Konsentrasi DMSO yang diuji disamakan dengan konsentrasi DMSO yang digunakan untuk melarutkan isolat uji. Selain kontrol DMSO diperlukan juga kontrol sel dan kontrol media. Kontrol sel digunakan untuk mengetahui besarnya absorbansi yang dihasilkan jika kehidupan sel 100%. Dan kontrol media diperlukan karena ternyata media juga memberikan absorbansi pada panjang gelombang yang digunakan.

Konsentrasi senyawa uji yang digunakan adalah 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, dan 15,75 µg/ml. Waktu uji adalah 48 jam yaitu dengan menginkubasi sel bersama dengan isolat uji dalam inkubator bersuhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Waktu uji tersebut akan memberikan kesempatan pada isolat uji untuk bereaksi.

Kemudian ditambahkan MTT sebanyak 10 µl MTT dengan konsentrasi 2,5 µg/ml dalam media RPMI dan diinkubasi kembali selama 6 jam. Sel yang viabel akan memetabolisme MTT tersebut dan menghasilkan formazan yang berwarna ungu. Kristal-kristal formazan yang terbentuk masih berada dalam sel. Untuk itu perlu ditambahkan pereaksi *stopper* yang akan menghentikan reaksi MTT dengan melisis sel sehingga formazan dapat keluar dari sel dan juga melarutkannya dalam media. Inkubasi semalam pada suhu kamar akan memberikan kesempurnaan pelarutan formazan sebelum diukur absorbannya.

Absorban yang terukur akan berbanding lurus dengan intensitas warna ungu yang dihasilkan formazan. Sehingga semakin banyak sel yang hidup, akan semakin besar pula absorban yang dihasilkan. Absorban yang diperoleh dikonversikan dalam bentuk persentase sel hidup (*cell viability percent*) (lampiran 6, gambar 5). Hubungan tersebut akan menggambarkan bahwa kenaikan konsentrasi isolat uji akan menurunkan *cell viability*.

Sel HeLa dipilih sebagai sel uji karena sifatnya yang sensitif dan tidak selektif terhadap banyak sampel uji. Sel ini telah direkomendasikan oleh NCI (*National Cancer Institute*) untuk digunakan dalam pengujian aktifitas sitotoksik secara *in vitro*.

Dari uji aktifitas sitotoksik alkaloid FPR-3-3-2 terhadap sel HeLa diketahui bahwa isolat tersebut mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan nilai potensi penghambatan (*Inhibitory Concentration* = IC_{50}) sebesar 551,97 $\mu\text{g/ml}$. Alkaloid FPR-3-3-2 mampu menghambat sel HeLa dengan persentase daya hambat pada konsentrasi berturut-turut 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,25 $\mu\text{g/ml}$, dan 15,75 $\mu\text{g/ml}$ adalah 43 %, 27,9 %, 24 %, 15,1 %, 2,7 % dan 0,5 %. Keberadaan DMSO sebagai pelarut tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan sel karena persentase kehidupan sel pada kontrol DMSO relatif masih besar yaitu sekitar 80 % (lampiran 6, tabel 3).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Dari 17,5 kg buah segar *Ficus pruniformis* Bl. diperoleh ekstrak metanol 164,78 g (0,98 %), dan dari fraksinasi ekstrak metanol diperoleh ekstrak heksan sebanyak 1,77 g, fraksi diklorometan netral sebanyak 1,34 g dan fraksi diklorometan basa sebanyak 0,33 g.
2. Fraksi yang mengandung alkaloid adalah fraksi Diklorometan netral.
3. Jumlah alkaloid yang diperoleh adalah 80 mg
4. Alkaloid buah *Ficus pruniformis* Bl. mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa
5. Uji aktifitas sitotoksik alkaloid FPR-3-3-2 terhadap sel HeLa dengan metoda MTT assay memberikan nilai potensi penghambatan IC_{50} sebesar 551,97 $\mu\text{g/ml}$.

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan isolasi lanjutan terhadap fraksi diklorometan netral sehingga diperoleh senyawa alkaloid murni dan dilakukan karakterisasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sofyan, R., "Terapi Kanker pada Tingkat Molekuler", *Cermin Dunia Kedokteran*, **127**, 2000, 5-10.
2. Hong, L. S., Universitas Tokyo, "Keilmiahn Falun Dafa Dan Keterbatasan Ilmu Pengetahuan Modern: Dari Perkembangan Ilmu Pengetahuan Modern dan Persentasi Terjangkit Penyakit Kanker" (2004) http://www.falundafa.or.id/p_surveykesehatan6.htm. Accessed on December 2005.
3. Annonymous, "Kanker Jadi Penyakit Paling Mematikan" (2005), <http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/2005/0505/09/0305.htm>. Accessed on December 2005.
4. Novalina, "Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif Dalam Terapi Kanker" (2003) http://rudycr.topcities.com/ppp702_71034/novalina.htm. Accessed on October 2004.
5. Fehrmann, F., and L.A. Laimins, "Human Papilloma Viruses: Targeting, Differentiating Epithelial Cells for Malignant Transformation", *Oncogene*, **22**, 2003, 5201-5207.
6. Annonymous, *Henrietta Lacks*, 2000 <http://www.micro.msb.le.ac.uk/labwork/lacks/lacks1.htm>.
7. Dalimartha, S., *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker*, Cetakan II, Penebar Swadaya Press, Jakarta, 1999.
8. Riono, Y., Dept of Surgery Holywood Hospital (1999), "Kanker leher Rahim", <http://dokter.indo.net.id/serviks.html>. Accessed on December 2005.
9. Syaifuddin, R., "Skrining Sitotoksikitas Fraksi n-Hexana dan Fraksi Kloroform Ficus spp Dengan Metoda Brine Shrimp Lethality Bioassay", *Skripsi S1*, Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas, Padang, 2006.
10. Gritter, R.J., J.M. Bobbitts, and A.E. Schwarting, *Pengantar Kromatografi*, Edisi ke-2, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1991.
11. Twentyman, P.R., and M. Luscombe, "A Study of Some Variables in A Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity", *Cancer J.*, **56**, 1987, 279-285.

12. Mosmann, T., "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *Journal of Immunological Methods*, **65**, 1993, 55-63.
13. Backer, C.A., and R.C. Bakhuizen Van den Brink, *Flora of Java*, Volume. II, N.V.P. Noordhoff, Gronigen, The Netherlands, 1965.
14. Pelletier, S.W., *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*, Volume I, A. Willey-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, 1983.
15. Miller, L.P., *Phytochemistry Organic Metabolites*, Volume II, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1973.
16. Goodwin, T.W. and E.I. Mercer, *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press, New York, 1972.
17. Tan, H.T. dan K. Rahardja, *Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya*, Edisi V, Jakarta, 2002.
18. King, R.J.B., *Cancer Biology*, 2nd Ed, Pearson Education Limited, London, 2000.
19. Ganiswarna, G. Sulistia, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 1995.
20. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, "The Hallmark of Cancer", *Cell*, **100**, 2000, 57-70.
21. Surh, Y. J., "Cancer Chemoprevention by Dietary Phytochemicals a Mechanistic Viewpoint", *Cancer J.* **11**, 1998, 6-10.
22. Pitot, H.C. and Y.P. Dagan, *Chemical Carcinogenesis, Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 6th Ed., Mc. Graw Hill. Medical Publishing Division, New York, 2001.
23. Foster, J.S., D.C. Henley, S. Ahamed, and J. Wimalasena, "Estrogen and Cell Cycle Regulation in Breast Cancer, Trend in Endocrinology and Metabolism", *Cancer J.* **12** (7), 2001, 320-327.
24. Wyllie, A., V. Donahue, B. Fischer, D. Hill, J. Keeseey, and S. Manzow, *Cell Death-Apoptosis and Necrosis*, Roche Diagnostic Corporation, 2000, 2-64.
25. Meiyanto, E., *Biologi Molekuler*, Buku Ajar, Proyek QUE Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, 2002.

26. Burdall, E.S., M.A. Hanby, R.J.M. Lansdown, and V. Speirs, "Breast Cancer Cell Lines : Friend or Foe?", *Breast Cancer Res.*, **5**, 2003, 89-95.
27. Freshney, R.I., *Animal Cell Culture, A Practical Approach*, 1st Ed, IRL Press, Washington D.C, 1986.
28. Pusztai, L., C.E. Lewis, and E. Yap, *Cell Proliferation in Cancer Regulatory Mecanisms of Neoplastic Cell Growth*, Oxford University Press Inc., New York, 1996.
29. Doyle, A. and J.B. Griffiths, *Cell and Tissue Culture For Medical Research*, John Willey and Sons Ltd, New York, 2000.
30. Anonim, HeLa, www.vaccines.plus.com/Hela-50years%20on.html, 2005.
31. Fisher, and K. L. Williamson, *Organic Experiments*, 7th ed., D. C. Heath and Company, Lexington, Massachusetts, Toronto, 1992.
32. Markham, K.R, *Cara mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh K. Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1988.
33. Harbone, J.B., *Metoda Fitokimia, Penuntun Cara Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan ke-2, diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan Iwung Soediro, Penerbit ITB, Bandung, 1987.
34. Yuharzi, " Skrining Hipokratik Alkaloid Kasar Fraksi Kloroform dari Tumbuhan *Ficus lepicarpa* Bl.", *Skripsi S1*, Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas, Padang, 1998.
35. Braithwaite, A. and F.J. Smith, *Cromatography Methods*, 5th Ed, Blackie Academic and Professional, New York, 1987.
36. Da'i, M., "Uji Aktivitas Antiproliferatif Pentagamavunon-O terhadap Sel Raji, Sel Hela, dan Sel Myeloma", *Tesis S2*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2003.

Lampiran 1. *Ficus pruniformis* Bl.



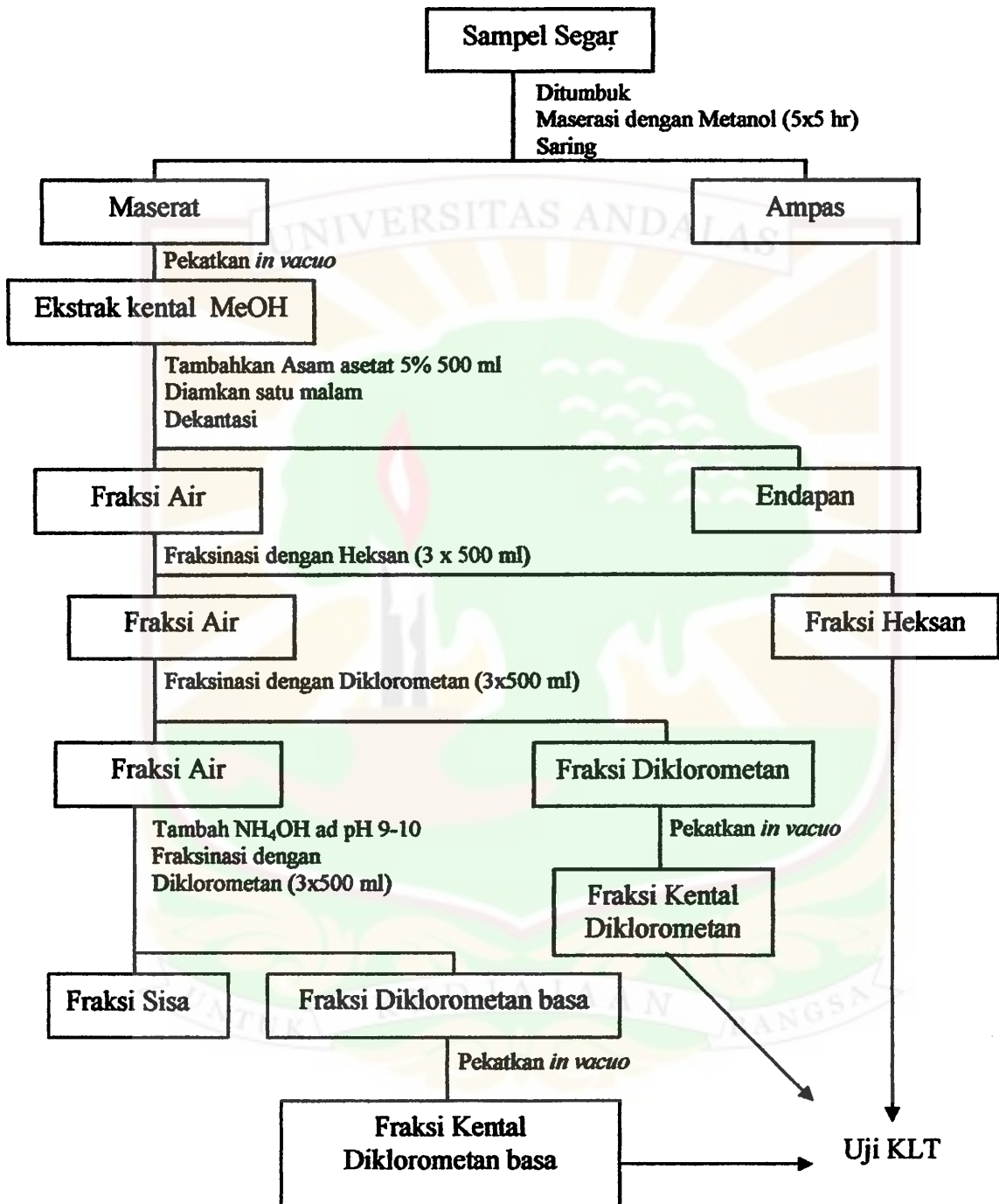
Gambar 3. *Ficus pruniformis* Bl.

Lampiran 2. Uji Pendahuluan Kandungan Metabolit Sekunder Buah Tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl.

Tabel I. Hasil uji pendahuluan kandungan metabolit sekunder buah tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl.

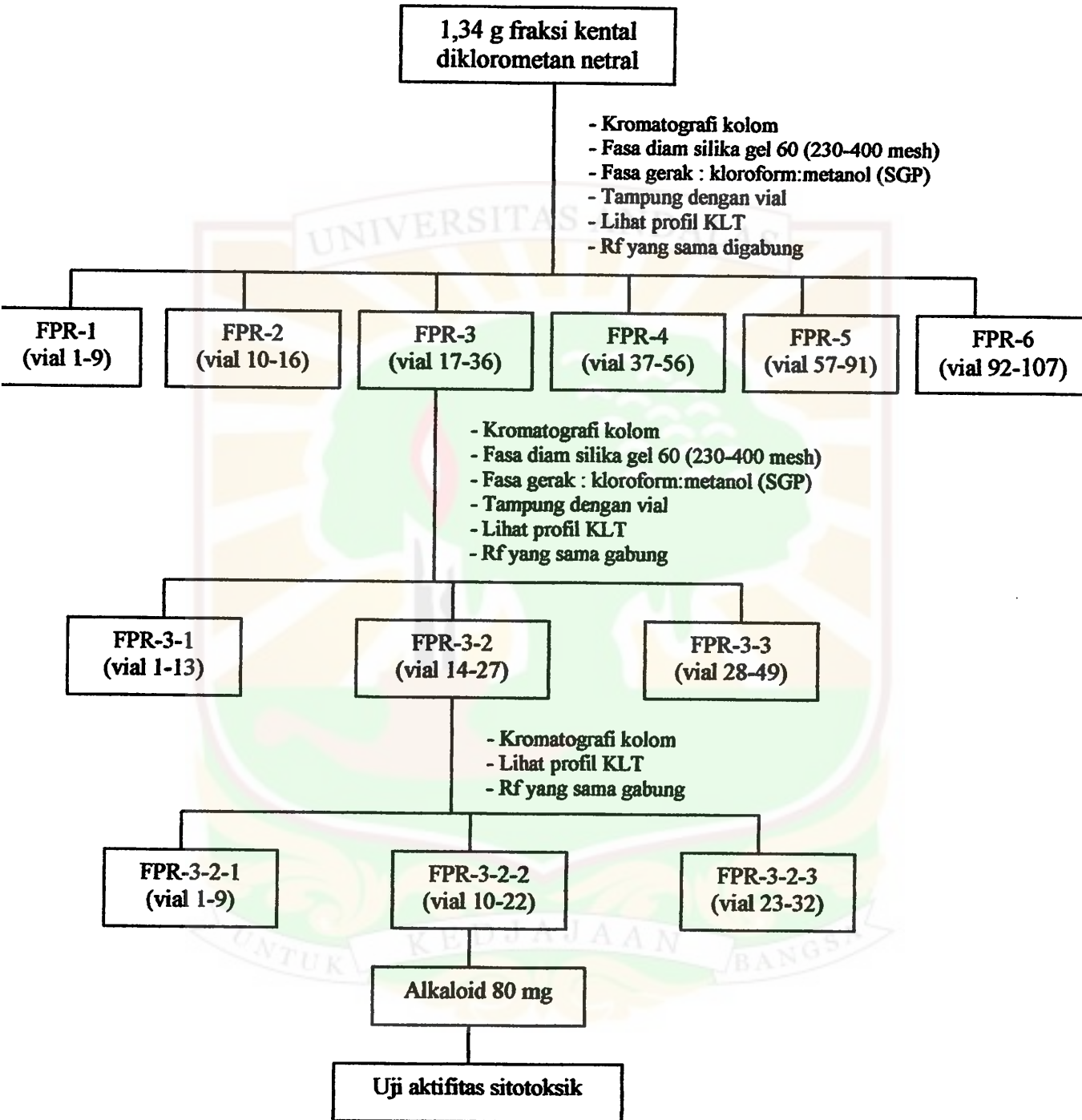
No.	Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil
1.	Alkaloid	Mayer	+
2.	Flavonoid	Logam Mg / HCl	+
3.	Terpenoid	Liebermann – Burchard	-
4.	Steroid	Liebermann – Burchard	+
5.	Saponin	Air / kocok	-
6.	Fenol	FeCl ₃	+

Lampiran 3. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Alkaloid Buah *Ficus pruniformis* Bl.



Gambar 4. Skema ekstraksi dan fraksinasi buah *Ficus pruniformis* Bl.

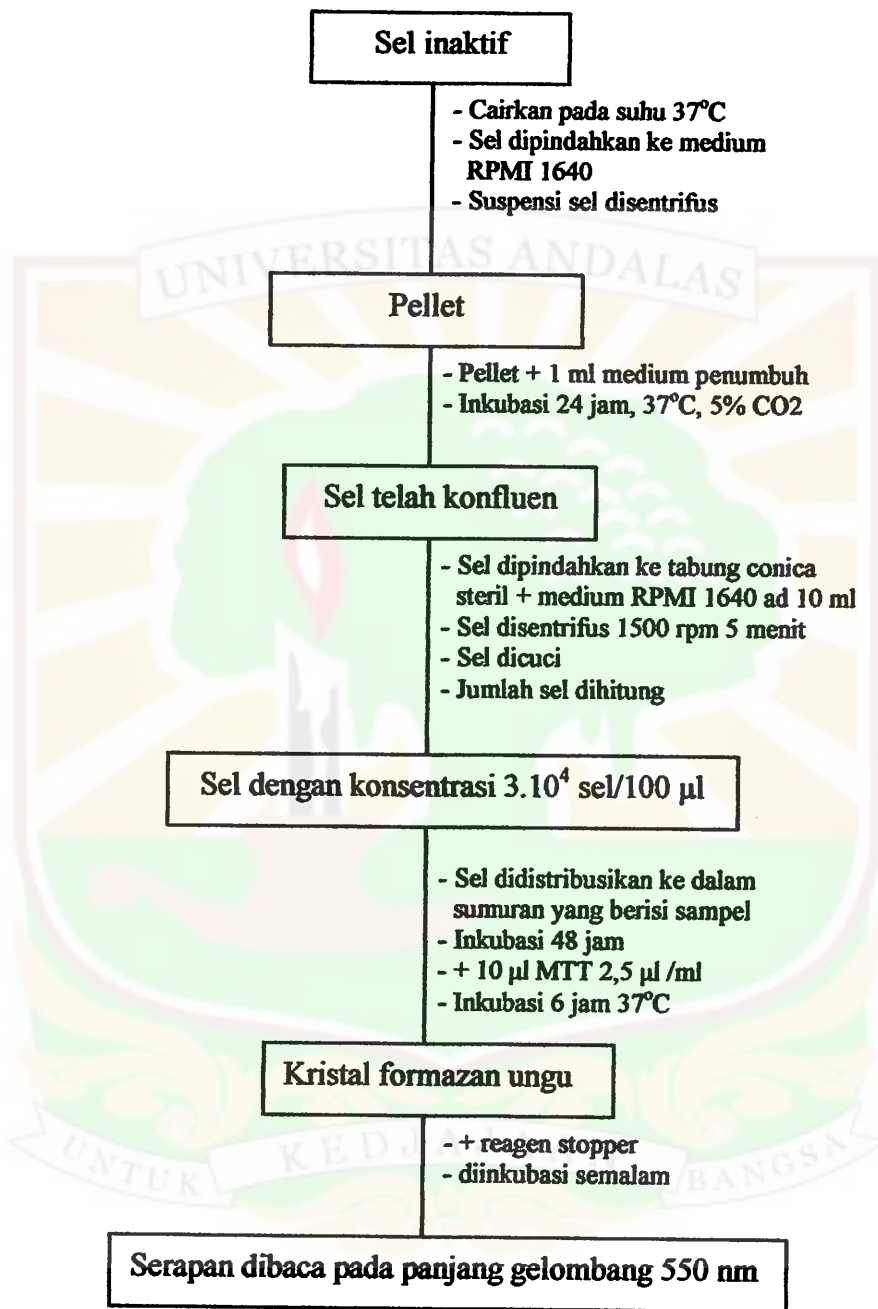
Lampiran 4. Skema Kerja Isolasi Alkaloid Buah *Ficus pruniformis* Bl.



Keterangan : FPR = *Ficus pruniformis* Bl.

Gambar 5. Skema pemisahan fraksi kental diklorometan netral secara kromatografi kolom

Lampiran 5. Skema Uji Aktifitas Sitotoksik dengan Metoda MTT assay.



Gambar 6. Skema Uji Aktifitas Sitotoksik dengan Metoda MTT assay.

Lampiran 6. Hasil Penelitian

Tabel II. Absorban larutan sampel dengan enam variasi konsentrasi, kontrol sel, kontrol DMSO dan media.

Kadar (µg/ml)	Absorban sumuran uji	Absorban kontrol larutan uji	Absorban kontrol sel	Absorban kontrol media	Absorban DMSO
500	0,528	0,280	0,830	0,467	0,841
250	0,674	0,359	0,815	0,418	0,836
125	0,752	0,421	0,860	0,459	0,818
62.5	0,803	0,432	0,945	0,438	0,916
31.25	0,846	0,421	1,000	0,455	1,017
15.75	0,871	0,436	0,859	0,421	0,915

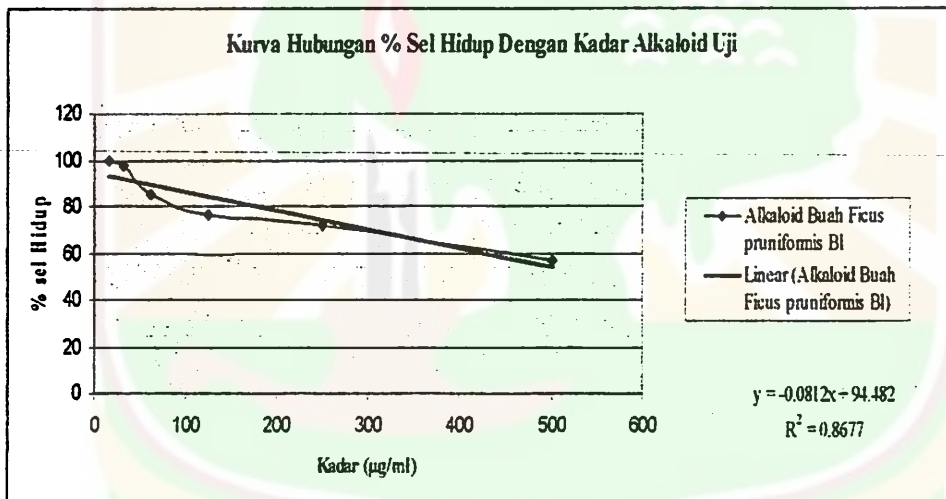
Persen kehidupan sel (cell viability percent) dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{Absorban Sumuran Uji} - \text{Absorban Kontrol Larutan Uji}}{\text{Absorban Kontrol sel} - \text{Absorban Kontrol Media}}$$

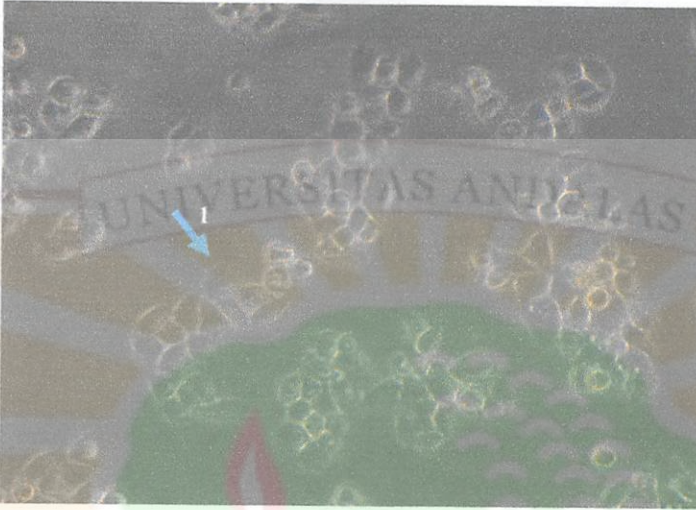
Lampiran 6. Hasil Penelitian (Lanjutan)

Tabel III. Hasil uji sitotoksik buah tumbuhan *Ficus pruniformis* Bl.

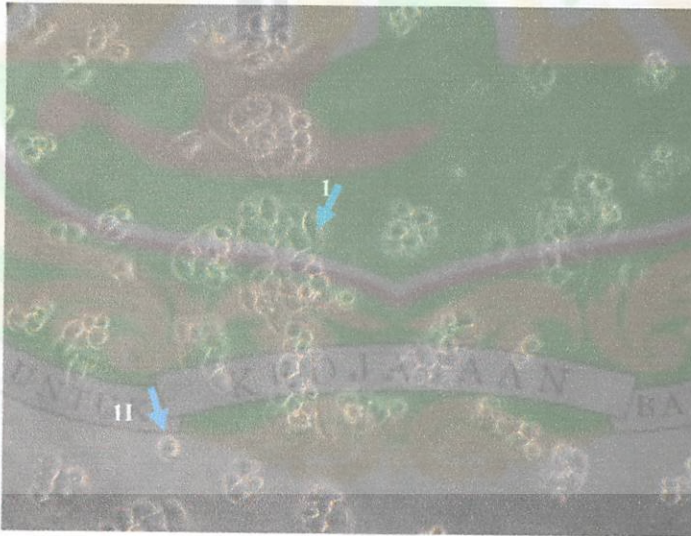
Kadar (µg/ml)	% kehidupan sel perlakuan	% kehidupan sel DMSO	Standar Deviasi
500	57.0 %	84,1 %	1,1
250	72.1 %	83,6 %	2,28
125	76.0 %	81,8 %	5,17
62.5	84.9 %	91,6 %	1,38
31.25	97.3 %	101,7 %	11,65
15.75	99.5 %	91,5 %	16,27



Gambar 7. Grafik hubungan kadar larutan uji dengan % sel hidup.

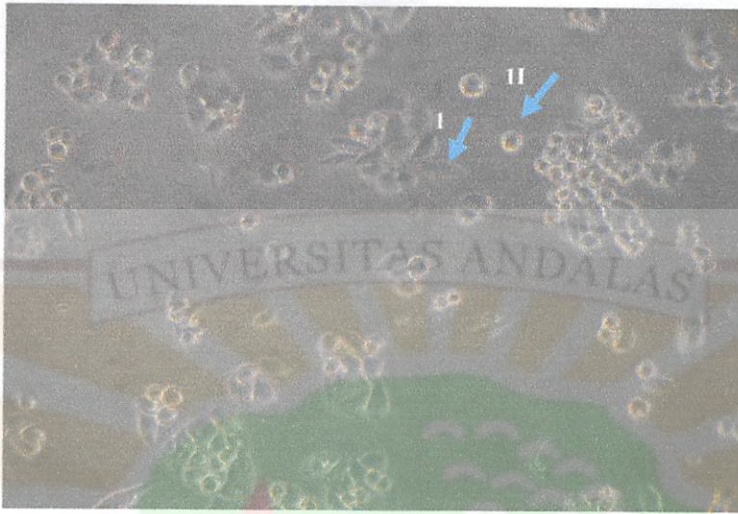
Lampiran 6. Hasil Penelitian(Lanjutan)

Gambar 8. Kontrol sel HeLa (perbesaran 400 x)



Gambar 9. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 15,75 µg/ml (perbesaran 400 x)

Lampiran 6. Hasil Penelitian (Lanjutan)



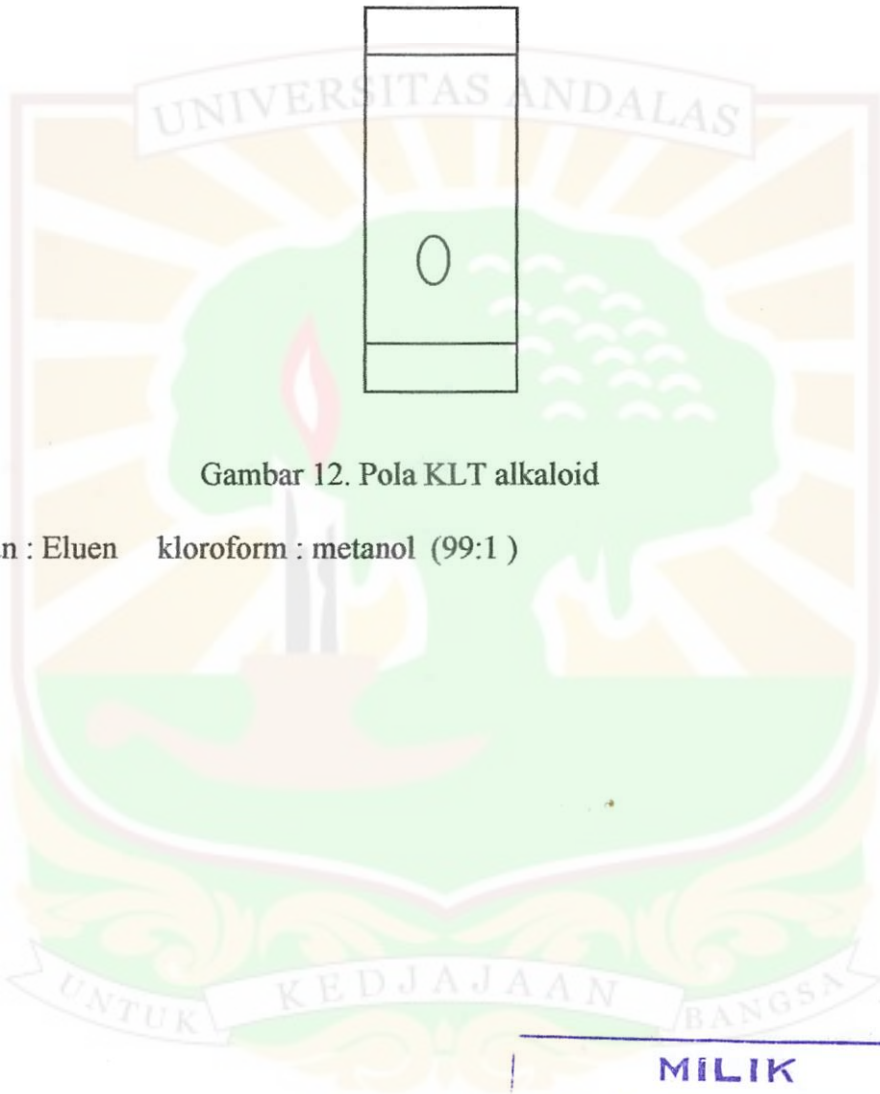
Gambar 10. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 125 $\mu\text{g/ml}$ (perbesaran 400 x)



Gambar 11. Sel HeLa dengan perlakuan isolat kadar 500 $\mu\text{g/ml}$ (perbesaran 400 x)

Keterangan : I = sel hidup masih berbentuk daun
 II = sel mati berbentuk bulat dan mengempung

Lampiran 6. (Lanjutan)



Gambar 12. Pola KLT alkaloid

Keterangan : Eluen kloroform : metanol (99:1)

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS