

DIK RUTIN



LAPORAN KEGIATAN

JUDUL PENELITIAN :
PENGARUH EKSTRAK METANOL BUAH MAKASAR (*Brucea javanica* L)
DAN UBI KAYU (*Ipomea batatas* L) TERHADAP INDUKSI APOPTOSIS
SEL HELA

Oleh :

M. Arie Wuryanto, SKM
Dra. Retno Hestningsih, MKes

Dibiayai dengan dana DIK Rutin Universitas Diponegoro Tahun Anggaran 2004, sesuai dengan Perjanjian Tugas Pelaksanaan Penelitian Para Dosen Universitas Diponegoro, Nomor: 1269a/J07.11 /PG/2004, tanggal 5 Mei 2004

FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
OKTOBER, 2004

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DIK RUTIN**

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1.a. Judul Penelitian | : Pengaruh Ekstrak Metanol Buah Makasar (<i>Brucea javanica</i> L Merr) dan Ubi Kayu (<i>Ipomea batatas</i> L) terhadap Apoptosis Sel Hela. |
| b. Kategori Penelitian | : Penerapan Iptek |
| 2. Ketua Peneliti | : |
| a. Nama Lengkap & Gelar | : M. Arie Wuryanto, SKM |
| b. Jenis Kelamin | : Laki-laki |
| c. Pangkat/Golongan/NIP | : Penata Muda/IIIa/132 299 940 |
| d. Jabatan Fungsional | : Asisten ahli |
| e. Fakultas | : Kesehatan masyarakat |
| f. Universitas | : Diponegoro |
| g. Bidang Ilmu yang Diteliti | : Kesehatan |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 2 orang |
| 4. Lokasi Penelitian | : Yogyakarta |
| 5. Kerja sama dengan instansi lain | : - |
| 6. Jangka Waktu Penelitian | : 6 (enam) bulan |
| 7. Biaya yang Diperlukan | : Rp. 3.000.000,-
(Tiga juta rupiah) |

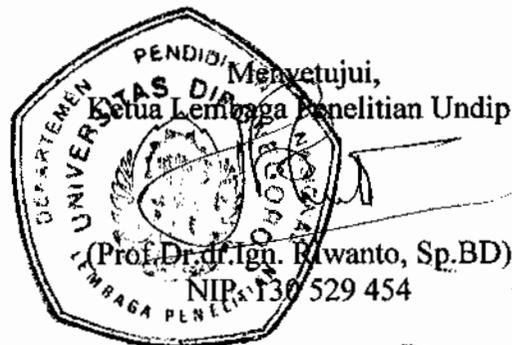
Semarang, 29 Oktober 2004



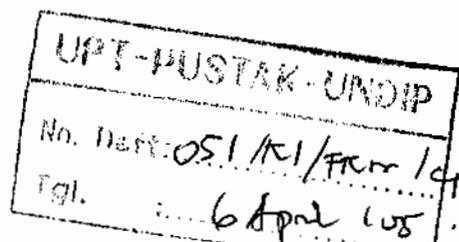
(dr. Ari Suwondo, MPH)
NIP. 131 610 342

Ketua Peneliti,

(M. Arie Wuryanto, SKM)
NIP. 132 299 940



(Prof. Dr. dr. Ign. Riwanto, Sp.BD)
NIP. 130 529 454



RINGKASAN

PENGARUH EKSTRAK METANOL BUAH MAKASAR (*Brucea javanica* L Merr) DAN UBI RAMBAT (*Ipomea batatas* L) TERHADAP INDUKSI APOPTOSIS SEL HELA

**M. Arie Wuryanto, Retno Hestiningsih
Tahun 2004**

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa 12% kematian yang terjadi dari 50 juta kematian dalam tahun 1997 disebabkan oleh kanker. Sebesar duapertiga dari jumlah tersebut terjadi di negara berkembang (WHO, 1998). Lebih jauh dilaporkan oleh *America Cancer Society* sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker (Anonim, 1995). Menurut WHO (1998), kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler diantara penyakit tidak menular (*non communicable disease* = NCD). Kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker serviks dengan frekuensi relatif 29,63% (Prajatmo et al., 1999). Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara (Longo, 1998).

Berbagai cara penyembuhan telah dilakukan untuk melawan kanker seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi dan imunoterapi namun demikian masing-masing cara mempunyai kelemahan sendiri sehingga pengobatan kanker belum memuaskan hingga saat ini (Hoffman, 1999). Penggunaan kemoterapi antikanker belum memberikan hasil optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik. Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya sel kanker yang resisten terhadap antikanker tersebut yang membuat antikanker tersebut tidak sensitif lagi. Dengan demikian usaha menemukan antikanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan.

Penelitian untuk mengkaji aktivitas antikanker dari tanaman yang diduga mempunyai khasiat antikanker penting dilakukan dalam usaha mencari dasar ilmiah penggunaan tanaman tersebut untuk pengobatan kanker oleh masyarakat. Uji apoptosis perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas biologis ekstrak metanol *Brucea javanica* (L) Merr dan *Ipomea batatas* (L.) terhadap sel kanker, sehingga diketahui kemampuannya sebagai antikanker serta untuk memperkirakan dosis yang akan digunakan.

Ke dalam mikrokultur 96 sumuran yang mengandung 100 ul sel uji dengan kerapatan 2×10^4 , ditambahkan 100 ul senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat) dengan konsentrasi dibawah nilai LC_{50} . Kemudian diinkubasikan dalam inkubator dengan aliran CO_2 pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Setelah diinkubasi semalam, sel dari masing-masing sumuran sebanyak 200 ul diambil dan masukkan dalam *ependoff*, kemudian disentrifugasi 1200 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang, sisakan peletnya, kemudian diresuspensi. Ambil suspensi sel tersebut dan letakkan di atas gelas obyektif. Kemudian sel difiksasi dengan metanol dengan volume 1 : 1 (10 ul sel : 10 ul metanol), dan dibiarkan sampai kering kurang lebih 1 menit. Ditambahkan PBS yang mengandung RNA-ase dengan kadar $1\mu g/10ml$, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar dan tambahkan ethidium bromide 10 μl , biarkan selama 20-30 menit sampai ethidium bromide meresap ke dalam sel, kemudian ditutup dengan *deck glass*. Amati hasilnya dibawah mikroskop fluorencens. Sel yang apoptosis akan tampak berwarna oranye, dengan karakteristik morfologi sebagai berikut : (1) sel mengecil, (2) kondensasi kromatin, (3) fragmentasi inti dan (4) membran sel *blebbing* (Lowe & Lin, 2000).

Pengecatan sel HeLa tanpa perlakuan (kontrol) menunjukkan sel HeLa tidak mengalami apoptosis, hal ini terlihat dengan tidak adanya fragmentasi inti dan sel HeLa tidak mengkerut atau mengecil. Demikian juga dengan hasil pengecatan sel HeLa dengan perlakuan ekstrak metanol ubi rambat (*I.batatas*) dan buah makasar (*B.javanica*) konsentrasi 10 $\mu g/ml$ juga tidak terjadi apoptosis, meskipun sel HeLa mengecil tetapi tidak terlihat adanya fragmentasi inti (DNA) yang merupakan karakteristik sel yang mengalami apoptosis. Hal ini disebabkan karena sel HeLa tahan terhadap apoptosis akibat adanya mutasi pada *downstream caspase 3* yang merupakan mediator apoptosis, dibuktikan dengan penelitian oleh Kawabeta *et al* (1999).

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* L Merr) dan ubi rambat (*I.batatas* L) tidak dapat memacu terjadinya proses apoptosis pada sel HeLa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas bimbinganNya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan akhir penelitian yang berjudul ” **Pengaruh Ekstrak Metanol Buah Makasar (*Brucea javanica L Merr*) dan Ubi Rambat (*Ipomea batatas L*) terhadap Induksi Apoptosis Sel Hela** ”. Laporan penelitian ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak.

Untuk itu pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada :

1. dr. Ludfi Santoso MSc, DTM & H selaku Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro.
2. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberikan bantuan DIK RUTIN demi terselenggaranya penelitian ini.
3. Seluruh staf Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan selama kami melakukan penelitian.
4. Seluruh staf Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan selama kami melakukan penelitian.
5. Seluruh staf bagian epidemiologi dan Penyakit Tropik Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama melakukan penelitian.

Kami menyadari bahwa laporan akhir penelitian ini masih jauh dari sempurna dan memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu segala masukan dan saran yang sifatnya membangun sangat kami harapkan demi kesempurnaannya sehingga dapat menambah pengetahuan dan wawasan bagi kami maupun para pembaca sekalian.

Semarang, Oktober 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	11
IV. METODE PENELITIAN.....	11
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	19
DAFTAR PUSTAKA.....	20
LAMPIRAN.....	21

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Pembuatan larutan senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat) dengan menggunakan pelarut media RPMI 1640.....	15

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Foto mikroskopis sel Hela tanpa perlakuan (kontrol) dengan pengecatan ethidium bromide.....	17
Gambar 2. Foto mikroskopis sel Hela dengan perlakuan ekstrak metanol ubi rambat dan buah maksar pada konsentrasi 10 ug/ml dengan pengecatan ethidium bromide.....	18

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Permasalahan

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa 12% kematian yang terjadi dari 50 juta kematian dalam tahun 1997 disebabkan oleh kanker. Sebesar duapertiga dari jumlah tersebut terjadi di negara berkembang (WHO, 1998). Lebih jauh dilaporkan oleh *America Cancer Society* sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker (Anonim, 1995). Menurut WHO (1998), kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler diantara penyakit tidak menular (*non communicable disease* = NCD).

Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1995, di Indonesia kanker merupakan penyebab kematian nomor delapan dengan kecenderungan adanya peningkatan angka insiden dari tahun ke tahun, yang diperkirakan mencapai kurang lebih 100 per 100.000 penduduk (Soemantri et al., 1995; Sibuea et al., 2000). Di Indonesia jumlah penderita kanker terus bertambah dari 3,8 % pada tahun 1990 menjadi 4,1% pada tahun 1995 (Depkes, 1997). Di Jawa Tengah dan sekitarnya, dilaporkan penderita kanker yang tercatat secara medis hanya penderita yang telah mencapai stadium lanjut, penderita kanker yang belum mencapai stadium tersebut masih tersembunyi di populasi masyarakat dan merupakan kelompok yang jumlahnya jauh lebih besar dan dari tahun ke tahun jumlahnya semakin bertambah (Soebroto, 1999). Kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker serviks dengan frekuensi relatif 29,63% (Prajatmo et al., 1999). Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara (Longo, 1998).

Bagi kebanyakan orang menerima diagnosis kanker hampir serupa dengan menerima vonis kematian, karena masalah pembiayaan pengobatan kanker yang sangat mahal dan harus membiayai sendiri pengobatannya (Sutojo, 2001). Berbagai cara penyembuhan telah dilakukan untuk melawan kanker seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi dan imunoterapi namun demikian masing-masing cara mempunyai kelemahan sendiri sehingga pengobatan kanker belum memuaskan hingga saat ini (Hoffman, 1999). Obat anti kanker yang ideal seharusnya dapat membunuh sel kanker

tanpa membahayakan jaringan sehat dan nyatanya belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria demikian, sehingga penggunaan klinik harus dengan pertimbangan untung dan rugi yang baik (Katzung, 1998). Penggunaan kemoterapi antikanker belum memberikan hasil optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik. Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya sel kanker yang resisten terhadap antikanker tersebut yang membuat antikanker tersebut tidak sensitif lagi. Dengan demikian usaha menemukan antikanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan.

Dari aspek farmakologi salah satu upaya yang sudah dirintis sejak jaman dulu adalah pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan zat/unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat antikanker. Cukup banyak obat antikanker yang bersumber dari tumbuh-tumbuhan yang telah diteliti secara cermat dan dipatenkan yang berdampak positif dalam penanggulangan berbagai jenis kanker. Berbagai anti kanker yang ada saat ini merupakan hasil pengembangan dari tanaman obat seperti vinka alkaloida, taksan, kamptotesin yang berasal dari tanaman antara lain : *Catharantus roseus*, *Taxus brevivolia*, dan *Camptotheca acuminata* dari Cina (Hoffman, 1999).

Indonesia sebagai salah satu pusat keanekaragaman hayati dunia sangat kaya akan tumbuhan berkhasiat pengobatan. Lebih dari 9000 spesies tanaman diduga memiliki khasiat pengobatan. Banyak tanaman obat tersebut diyakini memiliki khasiat untuk penyakit tertentu dan sebagai alternatif pengobatan berbagai penyakit, walaupun secara ilmiah belum banyak dibuktikan kebenarannya (Agoes et al., 2000). Beberapa tanaman obat diantaranya telah digunakan juga secara empiris oleh masyarakat secara tradisional untuk mengobati kanker , misalnya: buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr dan ubi rambat (*Ipomea batatas* (L.). Namun demikian bukti ilmiah mengenai efek antikanker tanaman tersebut belum banyak diungkapkan.

Brucea javanica (L) Merr (Buah makasar) merupakan salah satu tanaman yang digunakan di Indonesia sebagai obat tradisional. Buah yang telah masak oleh masyarakat digunakan sebagai obat disentri, sakit perut ,koreng dan penurun panas. Sedangkan di Cina dan Afirika, tanaman ini digunakn sebagai obat kanker. *Ipomea batatas* (L) atau Ubi rambat merupakan tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai antikanker (Barton, 1996). Tanaman-tanaman tersebut terbukti mengandung golongan senyawa aktif

yang dikenal mempunyai aktivitas sitotoksik seperti bruseantin , bruseantinol dalam *B. javanica* (L) Merr dan ipomeanol dalam *I. batatas* L. Namun hingga saat ini mekanisme kerja senyawa ini sebagai antikanker belum diketahui.

Penelitian untuk mengkaji aktivitas antikanker dari tanaman yang diduga mempunyai khasiat antikanker penting dilakukan dalam usaha mencari dasar ilmiah penggunaan tanaman tersebut untuk pengobatan kanker oleh masyarakat. Agar penggunaan obat atau tanaman obat menjadi rasional, harus didasarkan pada patofisiologi kanker serta mekanisme kerja obat dalam mengobati kanker. Disamping itu mekanisme kematian sel kanker juga perlu diketahui , salah satunya dengan melihat pengaruh ekstrak metanol *B.javanica* (L) Merr dan *I.batatas* (L) terhadap induksi apoptosis yang merupakan salah satu jalur kematian sel kanker.

Penelitian ini untuk mengkaji pengaruh ekstrak metanol *Brucea javanica* (L) Merr dan *Ipomea batatas* (L) terhadap induksi apoptosis sel HeLa dengan menggunakan metode pengecatan dengan ethidium bromide.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan pada informasi-informasi diatas maka aktivitas ekstrak metanol buah dari tanaman buah makasar (*B.javanica* (L) Merr) dan daun ubi rambat (*I.batatas* (L)) sebagai antikanker perlu dibuktikan secara *in vitro* pada sel kanker, sebagai upaya menemukan obat baru untuk kanker.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini diarahkan untuk menjawab permasalahan-permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* (L) Merr) dapat menginduksi apoptosis pada sel HeLa?
2. Apakah ekstrak metanol daun ubi rambat (*Ipomea batatas* L) dapat menginduksi apoptosis pada sel HeLa?

II. TINJAUAN PUSTAKA

1. Kanker

Kanker pada hakekatnya adalah suatu tumor ganas yang tumbuh dan berkembang secara abnormal, berasal dari sel tubuh oleh suatu sebab yang tidak diketahui berubah menjadi kanker (Anonim, 1995). Pada sel terjadi suatu pergeseran mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi. Sel yang sudah mengalami transformasi neoplastik biasanya mengekspresikan antigen permukaan sel yang tampaknya merupakan tipe normal fetal dan mempunyai tanda lainnya dari ketidakmatangan yang jelas, dan dapat menunjukkan kelainan kromosom, termasuk juga translokasi gen. Sel-sel tadi berkembang dengan cepat dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menyerang struktur jaringan sehat di sekitarnya. Sel induk tumor mempunyai kemampuan untuk mengulangi siklus proliferasi berkali-kali dan berpindah ke sisi yang jauh di dalam tubuh untuk membentuk koloni dalam berbagai organ tubuh yang disebut proses metastase (Katzung, 1998). Kanker dapat juga dipandang sebagai nama kumpulan dari banyak penyakit yang satu dengan yang lain dapat amat berbeda dalam hal tempat terjadinya, sifat biologik, terapi dan prognosis (van de Velde, 1999).

Ada dua agen penyebab terjadinya yaitu mutagen dan mitogen. Mutagen adalah agen yang langsung menyebabkan mutasi DNA, bisa bahan kimia atau radiasi. Sedangkan mitogen adalah agen yang secara tidak langsung dapat menyebabkan mutasi dengan merangsang pertumbuhan sel. Mutasi pada sel kanker melibatkan 3 tipe gen : (1) onkogen, misalnya *rat*, *src*, *erbB*, *myc*, *ras*, (2) gen penekan tumor, misalnya *p53* dan *pRb*, serta (3) gen yang mengendalikan perbaikan DNA (Best, 1996)

Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan. Secara umum, ciri-ciri dari sel kanker adalah :

- a). Memiliki kemampuan mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri yang dapat memacu siklus sel. Sel normal menerima sinyal mitogenik sebelum mereka berubah dari fase istirahat menuju fase proliferasi yang aktif. Sel kanker menghasilkan beberapa sinyal pertumbuhan sendiri dengan mengurangi ketergantungan pada stimulasi dari jaringan normal di sekitarnya. Hilangnya ketergantungan sinyal secara eksogen merusak

mekanisme homeostasis penting yang secara normal berfungsi menjaga bermacam-macam sel dalam jaringan.

- b). Insensitivitas terhadap anti faktor pertumbuhan yang menyebabkan siklus sel tidak terhenti. Dalam sel normal, sinyal antiproliferasi bekerja menjaga keteraturan sel dan homeostasis jaringan. Sinyal anti pertumbuhan dapat memblokir proliferasi melalui dua mekanisme yang berbeda, yaitu sel dipaksa keluar dari proliferasi yang aktif menuju fase istirahat *G₀* atau sel diinduksi untuk melepaskan potensi proliferasi secara permanen melalui induksi untuk memasuki fase postmitotik. Sel kanker mampu menghindari dari sinyal anti pertumbuhan yang berhubungan dengan daur sel melalui mekanisme rusaknya gen *Rb*.
- c). Kehilangan kemampuan apoptosis (kemampuan melakukan program bunuh diri), sehingga sel tersebut terus bertambah. Resistensi kanker terhadap mekanisme apoptosis didapat dengan berbagai macam cara, yang secara umum melibatkan *p53 tumor suppressor gene*. Protein *p53* mencegah replikasi DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri sel yang mengandung DNA yang tidak normal, peristiwa ini disebut apoptosis (Sofyan, 2000). Mutasi gen *p53* ini menyebabkan proliferasi dan transformasi sel menjadi kehilangan kendali.
- d). Invasi ke jaringan lain dan masuk ke peredaran darah, sehingga dapat mengalami metastasis. Sel kanker dapat terlepas dan menempel pada jaringan lain dengan akibat sel kanker dapat membentuk koloni di jaringan lain (Hanahan dan Weinberg, 2000).
- e). Potensi replikasi yang tidak terbatas (*immortal*), dengan kemampuan untuk memenuhi kebutuhan sinyal pertumbuhan dan kemampuan menghindari dari mekanisme apoptosis, sel kanker memiliki kemampuan untuk bereplikasi tak terbatas (Hanahan dan Weinberg, 2000). Kemampuan tersebut berkaitan dengan enzim telomerase yang menjaga integritas telomer pada kromosom. Pada sel normal, telomer akan mengalami degradasi (pemotongan) pada saat sel mengalami replikasi (Weinberg, 1986), sehingga sebagian besar sel kanker yang ditumbuhkan dalam kultur tampak kehilangan hambatan kontak dan sel kanker menjadi *immortal* karena pertumbuhan tak terbatas ini.
- f). Kemampuan untuk membentuk saluran darah ke sel kanker (*angiogenesis*).

Nutrisi dan oksigen disuplai oleh pembuluh darah yang berguna untuk menjaga fungsi pertumbuhan sel. Sel kanker memiliki kemampuan untuk berangiogenesis, sinyal inisiasi pada proses angiogenesis diantaranya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Hanahan dan Weinberg, 2000)

2.Siklus Sel dan Apoptosis

Siklus sel didefinisikan sebagai periode yang dibutuhkan oleh suatu sel mulai dari saat sebelum pembelahan sampai membelah menjadi dua sel anak (Goodman, 1999). Dalam kultur, sel-sel manusia tumbuh dengan cepat, siklus sel pada umumnya berlangsung lebih kurang 20-24 jam. Di dalam tubuh manusia siklus sel tersebut dapat berubah relatif menjadi lebih pendek, seperti dalam kultur, atau bahkan lebih lama. Misalnya sel epitel usus hanya 12 jam, untuk epidermis 21 hari dan sel hepatosit hepar yang membelah hanya dua kali dalam setahun (Goodman, 1999; Bosman, 1999).

Pada siklus sel terdapat beberapa fase yaitu : S, G1, G2 dan fase M. Lamanya fase S dan fase G2 pada umumnya berlangsung relatif konstan. Variasi yang besar terjadi untuk sel tumor dalam fase G₀ atau fase G1. Terdapat sel-sel yang bertahun-tahun berada dalam fase G₀ yaitu sel yang telah berdiferensiasi dengan satu fungsi yang spesifik. Sel tersebut pada akhirnya mempunyai sensitivitas yang berbeda-beda terhadap pengaruh eksogen, misalnya karena sinar ionisasi dan sitostatika dalam berbagai fase siklus sel.

Sel dalam tubuh dapat terdiferensiasi sedemikian rupa sehingga tidak dapat membelah lagi (postmitotik), atau masih dalam keadaan membelah (mitotik), atau masih dalam keadaan pembelahan yang teratur dan berada dalam keadaan antar dua pembelahan (intermitotik). Kebanyakan sel tumbuh berada dalam keadaan intermitotik. Fase intermitotik disebut fase G₀ dari siklus sel. Dari fase G₀, sel dengan stimulus yang adekuat, dapat kembali masuk ke G1, tetapi sel bila dalam keadaan postmitotik tidak dapat kembali ke fase G1. Dari fase G1 berlanjut menjadi fase S, dalam fase ini sel mensintesis DNA untuk melipat duakan material genetika sebagai persiapan pembelahan. Kalau fase G1 disebut periode pertumbuhan seluler, sementara fase G2 disebut masa persiapan sel untuk mitosis. Selama mitosis atau fase M, dalam kultur sel mengadakan

penggabungan, kromosom dikondensasi, spindle mitotik terbentuk kemudian kromosom memisah ke arah kutub yang berlawanan. Setelah kromosom memisah ke arah kutub spindle yang berlawanan, sel tersebut memisah menjadi dua sel anak dengan proses yang disebut sitokinesis. Peristiwa pembelahan inti disebut kariokinesis. Peristiwa fase M ini biasanya berlangsung dalam waktu 12 jam. Peristiwa selain fase M dalam siklus sel disebut juga interfase.

Pada individu dewasa dalam keadaan biasa terdapat keseimbangan antara pembuatan jaringan dan kerusakan jaringan. Pertumbuhan tumor biasanya mempunyai keseimbangan khas yang positif, membuat sel-sel lebih banyak dari pada sel-sel yang rusak. Tetapi kecepatan pertumbuhan ini biasanya lebih rendah dari jaringan fetal normal dan jaringan dalam keadaan regenerasi. Waktu yang dibutuhkan suatu tumor untuk melipatgandakan volumenya bergantung pada tipe tumor dan keadaannya, dapat bervariasi dari satuan minggu hingga tahunan. Pertambahan volume ini bergantung pada waktu yang berlangsung antara dua pembelahan sel, fraksi pertumbuhan (persentase sel-sel yang tumbuh aktif) dan jumlah sel yang mati dalam periode tertentu (Bosman, 1999).

Pengendalian siklus sel dilakukan agar siklus sel berjalan normal. Cdk (*cyclin dependent kinase*) bersama dengan siklin adalah pengendali utama siklus sel, yang menyebabkan pergerakan dari G1 ke S, atau dari G2 ke M (Guardavaccaro et al., 2000). MPF (*Maturation Promoting Factor*) bersama cdk dan siklin menjadi pencetus progresivitas siklus sel. Protein p53 berfungsi menghambat siklus sel bila terjadi kerusakan DNA, dan bila kerusakan cukup berat dapat menyebabkan apoptosis (Brown dan Wouters, 1999). Sedangkan protein p27 adalah protein yang mengikat siklin dan cdk, sehingga terjadi hambatan menuju fase S (Shapiro dan Harper, 1999).

Apoptosis adalah proses aktif tergantung energi, dimana sel berperan dalam merusak diri, sehingga terjadi kematian sel. Apoptosis atau kematian sel terprogram berasal dari bahasa Yunani yang berarti gugur (*falling off*). Apoptosis merupakan bagian dari perkembangan fisiologis tubuh normal selama masa perkembangan serta sebagai mekanisme homeostasis jaringan dan mekanisme pertahanan pada waktu sel rusak karena penyakit atau penyebab lain. Homeostasis pada organisme multiseluler dikontrol oleh proliferasi dan diferensiasi serta kematian sel. Proses apoptosis meliputi kondensasi dan

segmentasi dari inti, kondensasi dan fragmentasi dari sitoplasma dan seringkali fragmentasi meluas dari kromosom DNA menjadi unit nukleosom (Nagata dan Golstein, 1995).

Apoptosis terjadi karena adanya sinyal yang menginisiasi terjadinya apoptosis baik secara fisiologis maupun patologis berbagai faktor yang menstimulasi. Secara fisiologis antara lain Transforming Growth Factor β , Kalsium kelompok TNF (Fas Ligand dan TNF), Neurotransmitters (Glutamate, Dopamine, N-methyl-D- aspartate) dan Glukokortikoids. Secara patologis antara lain radiasi Ultra Violet, infeksi virus, toksin bakteri, radikal bebas, obat kemoterapi (Thompson, 1995). Setelah ada sinyal yang menginisiasi apoptosis, sistem regulator sel pada mitokhondria akan bekerja dengan cara menghambat atau menstimulasi apoptosis.

Tingkatan molekuler apoptosis ditandai dengan pelepasan sitokrom c mitokondria, aktivasi Apaf-1 dan aktivasi kaspase 9. Kaspase dapat menyebabkan kerusakan pada sejumlah protein sel, seperti PARP, laminin, dan β -aktin (Shah dan Schwartz, 2001).

Gambaran histologis apoptosis pada umumnya terlihat pada sel tunggal, terjadinya kondensasi kromatin, badan-badan apoptotik (*apoptotic bodies*) dan fagositosis badan apoptotik tanpa reaksi radang (Cotran et al., 1999).

3. Tanaman Obat Indonesia sebagai Antikanker.

a. Buah Makasar (*B. javanica* (L.) Merr).

Buah makasar (*B.javanica* (L.) Merr merupakan salah satu tumbuhan famili *Simarubaceae* yang digunakan sebagai obat tradisional. Buah yang telah masak oleh masyarakat digunakan sebagai obat disentri, sakit perut, koreng, dan penurun panas. Di Cina dan Afrika, tanaman ini digunakan sebagai obat kanker. Tumbuhan ini banyak terdapat sebagai tumbuhan liar di pagar- pagar, hutan jati mulai dari Sumatera, Jawa, Makasar dan Ambon. Di jawa Timur banyak dijumpai terutama daerah hutan jati. Tergolong tumbuhan perdu dengan tinggi rata-rata 0,3-10 , daunnya menyirip tunggal, ganjil dengan anak daun berjumlah lima sampai tigabelas, sebagian besar berhadapan bentuk lancet memanjang dengan ujung meruncing.

Buah dalam tandan kecil diketiak daun, termasuk buah batu, bentuk bulat telur, permukaannya kasar seperti jala. Telah dilakukan penelitian terhadap *Brucea javanica*, isolasi terhadap komponen buahnya, alkaloid, saponin dan polifenol (Wonohadi, 1986; backer, 1968), digunakan sebagai antikanker (Agoes et al., 2000; Hembing, 2000).

b. Ubi rambat (*Ipomea batatas* L.)

Ubi rambat (*Ipomea batatas* L.) merupakan tanaman yang termasuk dalam famili *Convolvulaceae*. Tanaman ini merupakan herba semusim, panjangnya dapat mencapai 5 meter. Batangnya bulat bercabang, lunak, bergetah, beruas, tiap buku bisa tumbuh akar membentuk umbi hijau pucat. Daun tunggal bertangkai, bulat, ujung runcing, tepi rata, pangkal romping, pertulangan menyirip, panjangnya 4-11 cm, lebar 4-14 cm, berwarna hijau. Bunga majemuk bentuk termpet di ketiak daun, kelopak bentuk lonceng, bertaju lima, hijau, mahkota bentuk corong, putih, benang sari lima, melekat pada mahkota, putik bentuk benang, kepala putik kecil, putih. Buah kotak, bulat telur beruang dua sampai empat, masih muda hijau, setelah tua hitam. Akar tunggang putih. Nama daerah lain ketelo, setilo, gadong enjolor (Depkes, 1991). Penggunaan tanaman ini sebagai antikanker dilaporkan oleh Barton (1996).

4. Sel HeLa

Sel HeLa merupakan *contineous cell line* yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) manusia. Sel ini diisolasi tahun 1951 dari seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks, berusia 30 tahun. Sel HeLa cukup aman digunakan untuk penelitian dan kepentingan kultur sel (LabWork, 2000, *cit* Julia, 2001). Medium yang digunakan untuk mengkultur sel HeLa adalah RPMI 1640 serum mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin dan garam anorganik dan glukosa. Serum mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel, sehingga dengan media dan serum tersebut sel dapat bertahan hidup dan memperbanyak diri (Freshney, 1986 *cit* Julia, 2001).

Kanker cervix diantaranya terjadi karena adanya infeksi Human Papilloma Virus (HPV), pada manusia terdapat lebih dari 70 macam HPV (de Villiers, 1994). HPV dikategorikan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok yang memberikan risiko tinggi seperti HPV 16, HPV 18, HPV 31 dan HPV 33 yang mengakibatkan terjadinya kanker dan HPV yang berisiko rendah seperti HPV 6, HPV 11 dan HPV 13 yang menyebabkan *condyloma* lunak. Selama menginfeksi, HPV 18 akan mengekspresikan protein E6 dan E7 yang diekspresi dari promotor tunggal P105 yang diregulasi oleh 800 pasang basa (Their et al., 1987). Protein ini merupakan protein *supressor* yang berpengaruh pada proliferasi sel dan kematian sel. E6 berikatan dengan *p53* yang terfosforilasi sedang E7 berikatan dengan protein pRb (Dyson et al., 1989). Ikatan E7 dengan pRb mengakibatkan lepasnya E2F yang menginduksi gen-gen esensial untuk proses sintesis dan mitosis, akibatnya sel memasuki proses *cell cycle* (Anonim, 1999; Sher, 2000). Protein pRb mengikat E2F sehingga E2F tidak dapat berikatan dengan promotor ekspresi *c-myc* dan *c-fos* yang merupakan onkogen. Degradasi dan inaktivasi pRb tersebut dapat berakibat sel dapat berproliferasi secara terus-menerus (Anonim, 1999). Ikatan E6 pada *p53* menyebabkan degradasi *p53*, hal ini mengakibatkan sel tidak mengalami apoptosis ataupun memasuki *cell cycle arrest* pada G1 atau S.

5. Landasan Teori

Tanaman buah maksar (*Brucea javanica* (L.) Merr) dan ubi rambat (*Ipomea batatas* (L.)) telah banyak digunakan secara tradisional oleh masyarakat diberbagai negara untuk mengobati kanker. Tanaman-tanaman tersebut terbukti mengandung golongan senyawa aktif yang dikenal mempunyai aktivitas sitotoksik seperti bruceantin, bruceantinol dalam buah maksar (*B. javanica* (L.) Merr), dan *ipomeanol* dalam ubi rambat (*I. batatas*.L). Kematian sel kanker bisa disebabkan karena berfungsinya kembali mekanisme perbaikan DNA atau terjadinya apoptosis. Apoptosis terjadi karena adanya sinyal yang menginisiasi terjadinya apoptosis baik secara fisiologis maupun patologis berbagai faktor yang menstimulasi, seperti pengaruh dari senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman obat.

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan Penelitian :

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji mekanisme antikanker ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* (L) Merr), dan daun ubi rambat (*I. batatas* L.), khususnya mempelajari pengaruhnya terhadap induksi apoptosis pada sel HeLa secara *in vitro*.

B. Manfaat Penelitian :

Dengan diketahuinya mekanisme antikanker ekstrak metanol buah *Brucea javanica* (L.) Merr dan daun *Ipomea batatas* terhadap sel HeLa, maka akan semakin memperkuat data bahwa tanaman – tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker. Lebih jauh diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat terhadap usaha pengembangan obat kanker yang poten, selektif dengan efek samping yang kecil. Disamping itu dapat mendukung program pemanfaatan sumber daya alam di Indonesia.

IV. METODE PENELITIAN

1. Jenis Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah : ekstrak metanol buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr) dan ubi rambat (*Ipomea batatas* (L)).

b. Variabel Tergantung :

Variabel tergantung yang diteliti adalah : apoptosis sel HeLa .

2. Hipotesis Penelitian

Atas dasar landasan teori diatas dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Ekstrak metanol buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr) dapat menginduksi apoptosis sel HeLa.
2. Ekstrak metanol Ubi rambat (*Ipomea batatas* (L.) dapat menginduksi apoptosis sel HeLa.

3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan salah satu penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan pendekatan *post test with control group design*.

5. Definisi Operasional

Definisi operasional variabel-variabel di atas adalah sebagai berikut :

- a. Ekstrak metanol *B.javanica* (L.) Merr dan *I.batatas* (L.) adalah ekstrak kering buah *B. javanica* (L.) Merr dan daun *I. batatas* (L.) yang diperoleh dengan cara maserasi. Bahan tanaman uji dikeringkan secara tidak langsung dibawah sinar matahari , diserbuk dengan blender dan disaring. Kemudian direndam dalam metanol selama 24 jam , ampasnya diperas dan disaring sampai diperoleh ekstrak kental atau hampir kering. Ekstrak tanaman ini diberikan dalam berbagai konsentrasi yaitu 1; 5; 10; 50; 100; 200 µg/ml.
- b. Apoptosis sel HeLa adalah kematian sel HeLa yang terjadi akibat pemberian ekstrak metanol *B. javanica* (L) Merr dan *I.batatas* L. pada berbagai konsentrasi. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan pengecatan menggunakan ethidium bromide. Sel yang apoptosis tampak berpendar dibawah mikroskop fluorescens. Sel Hela yang mengalami apoptosis akan berwarna oranye dengan karakteristik morfologi berupa : sel mengecil, fragmentasi inti, kondensasi kromatin dan membran sel *blebbing*.

6. Prosedur Penelitian.

a. Bahan dan Alat Penelitian.

a1. Bahan Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* L. Merr), daun ubi rambat (*I.batatas* L.) yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan uji apoptosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah ethidium bromide, akuades, dan metanol. Sel uji yang digunakan adalah sel HeLa yang diperoleh dari laboratorium Ilmu Hayati UGM Yogyakarta.

a2. Alat Penelitian

Untuk pembuatan ekstrak diperlukan seperangkat alat ekstraksi yang meliputi alat-alat gelas, alat penyari, *rotavapor* (Heidolph), dan *freeze dryer* (Mitamura Riken Kogyo Inc.).

Untuk keperluan uji apoptosis diperlukan alat-alat meliputi gelas obyek, *deck glass*, penyedot pipet pasteur, mikroskop fluorescens.

b. Jalannya Penelitian

b1. Pembuatan Ekstrak Metanol

Bahan uji yang diperoleh dibersihkan, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari tidak langsung. Dari hasil pengeringan ini dilanjutkan dengan pengeringan di oven, kemudian diserbuk dengan blender dan diayak untuk memperoleh serbuk tanaman uji.

Pembuatan ekstrak ini dilakukan dengan cara maserasi terhadap bahan uji dengan cara sebagai berikut : lebih kurang 50 gram serbuk bahan uji, dimasukkan dalam bejana erlenmeyer, kemudian dituangi 250 gram bagian cairan penyari (metanol), ditutup dan dibiarkan 24 jam terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk pada suhu kamar. Setelah 24 jam pertama diserkai, ampas diperas, filtrat ditampung, maserasi diulang tiga kali dengan menambahkan cairan penyari secukupnya ke dalam ampas yang diperoleh, demikian diulangi hingga diperoleh filtrat terakhir sudah jernih. Filtrat yang ditampung dalam bejana selanjutnya diuapkan ke dalam cawan dengan menganginkan sampai diperoleh ekstrak kental atau hampir kering. Pada akhirnya masing-masing ekstrak masih dievaporasi di dalam *freeze dryer vaccum* hingga diperoleh ekstrak kering. Selanjutnya disimpan di lemari es suhu -20°C .

b2. Pembuatan Media RPMI 1640 Pencuci dan Media RPMI 1640 Kultur

Serbuk RPMI 1640 dilarutkan dalam akuabides \pm 800 ml, ditambah natrium bikarbonat 2 g dan hepes 2 g aduk dengan stirer sampai larut. Kemudian ditambahkan akubides sampai 1 liter. Larutan dibuat sampai pH 7,4 jika perlu dengan menambahkan 1M NaOH atau 1M HCl. Kemudian disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter

millipore 0,2 μm ke dalam botol yang bertutup yang steril. Beri label dan simpan dalam lemari es 4°C.

Media RPMI kultur dibuat menjadi 100 ml dengan cara : media RPMI 1640 86 ml ditambah FBS 10% sebanyak 10 ml, penisilin-streptomisin 3% sebanyak 3 ml dan fungison 1% sebanyak 1 ml.

b3. Menumbuhkan (*Thawing*) Sel Hela dari Penyimpanan Nitrogen Cair.

Cryotube diambil dari tangki nitrogen cair, segera masukkan dalam penangas air (*waterbath*) 37°C. Biarkan sebagian es dalam *cryotube* mencair . Kemudian pindahkan *cryotube* yang masih ada sedikit es ke dalam *blue capped tubes* (tabung *conical*) yang mengandung 20 ml medium pendingin tanpa serum. Kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama 5 menit. Setelah itu supernatannya dibuang, pelet diresuspensi dalam 1ml medium RPMI komplet dan pindahkan dalam *plate* 24 sumuran. Kemudian *plate* 24 sumuran diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan aliran CO₂ 5%. Diamkan beberapa saat dalam inkubator. Setelah sel tumbuh baik, sel di subkultur dalam beberapa buah *tissue culture flask* kecil (10 ml) dengan medium penunbuh yang mengandung 20% FBS. Setelah 24 jam media diganti dan sel ditumbuhkan hingga konfluen dan siap untuk dipanen.

b4. Panen Sel Hela.

Setelah sel *confluent*, medium diganti dengan medium RPMI 1640 baru \pm 5 ml. Sel Hela merupakan sel yang melekat pada dasar *flask*, sehingga perlu dilepaskan dari dinding *flask* tetapi langsung dipenen. Sel dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril , kemudian disentrifugasi 1200 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang, sisakan peletnya, tambahkan media RPMI 1640 serum sebanyak 1ml. Hitung jumlah sel menggunakan *viable dye tripan blue* di bawah mikroskop cahaya.

b5. Penghitungan Jumlah Sel dengan *Tripan Blue*

Resuspensi sel yang akan dihitung. Ambil 10 ul suspensi sel masukkan dalam tabung *ependoff*. Tambahkan 90 ul *viable dye tripan blue* 0,5 % dan campur dalam

tabung *ependoff*. Kemudian dari campuran sel tersebut, diambil 10 ul, masukkan dalam *hemocytometer*, dan hitung jumlah sel di bawah mikroskop cahaya.

Jumlah sel dihitung dengan rumus : $(X/4) \times \text{pengenceran} \times 10^4$, dimana X : jumlah sel yang diperoleh dari 4 kotak hitung *hemocytometer*.

b6. Pembuatan Larutan Senyawa Uji

Timbang 0,001 gram (1 mg) senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* L Merr) dan ubi rambat (*I.batatas* L)), selanjutnya dilarutkan dalam media RPMI 1640 *ad* 1 ml sehingga diperoleh konsentrasi akhir 1000 ug/ml (1mg/ml). Larutan ini disebut sebagai larutan stok.

Konsentrasi senyawa uji yang digunakan : 1000 ug/ml, 500 ug/ml, 250 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml dan 10 ug/ml. Untuk membuat konsentrasi senyawa uji 500 ug/ml, caranya : ambil 500 ul dari larutan stok (1000 ug/ml) kemudian tambahkan 500 ul media RPMI sehingga volume akhirnya 1ml (1000 ul). Karena konsentarsi 500 ug/ml adalah pengenceran 2 x dari konsentrasi 1000 ug/ml (larutan stok). Cara yang sama dilakukan untuk membuat konsentrasi 250 ug/ml. Sedangkan untuk konsentrasi 100 ug/ml maka ambil 100 ul dari larutan stok kemudian tambahkan media RPMI 900 ul karena konsentrasi 100 ug/ml merupakan pengenceran 10 x dari konsentrasi 1000 ug/ml. Demikian juga untuk konsentrasi 50 ug/ml dan 10 ug/ml. Secara terperinci pembuatan larutan senyawa uji terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pembuatan larutan senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat) dengan menggunakan pelarut media RPMI 1640.

No.	Konsentrasi Senyawa Uji (ug/ml)	Larutan Senyawa Uji (ul)	Media RPMI 1640 (ul)
1.	1000	-	-
2.	500	500	500
3.	250	500	500
4.	100	100	900
5.	50	100	900
6.	10	100	900

b7. Uji Apoptosis

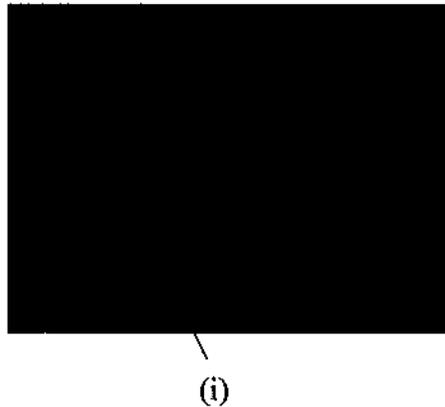
Ke dalam mikrokultur 96 sumuran yang mengandung 100 ul sel uji dengan kerapatan 2×10^4 , ditambahkan 100 ul senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat) dengan konsentrasi dibawah nilai LC_{50} . Kemudian diinkubasikan dalam inkubator dengan aliran CO_2 pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Setelah diinkubasi semalam, sel dari masing-masing sumuran sebanyak 200 ul diambil dan masukkan dalam *eppendoff*, kemudian disentrifugasi 1200 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang , sisakan peletnya, kemudian diresuspensi . Ambil suspensi sel tersebut dan letakkan di atas gelas obyek. Kemudian sel difiksasi dengan metanol dengan volume 1 : 1 (10 ul sel : 10 ul metanol), dan dibiarkan sampai kering kurang lebih 1 menit. Ditambahkan PBS yang mengandung RNA-ase dengan kadar $1\mu g/10ml$, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar dan tambahkan ethidium bromide 10 μl , biarkan selama 20-30 menit sampai ethidium bromide meresap ke dalam sel, kemudian ditutup dengan *deck glass*. Amati hasilnya dibawah mikroskop fluorencens. Sel yang apoptosis akan tampak berwarna oranye, dengan karakteristik morfologi sebagai berikut : (1) sel mengecil, (2) kondensasi kromatin, (3) fragmentasi inti dan (4) membran sel *blebbing* (Lowe & Lin, 2000).

c. Analisa Data

Pengamatan apoptosis dilakukan secara deskriptif. Sel yang apoptosis dengan pemberian ekstrak metanol ubi rambat (*Ipomea batatas* L) dan buah makasar (*Brucea javanica* L Merr) diamati dengan menggunakan pemeriksaan dibawah mikroskop fluorencens, kemudian dibandingkan dengan sel kontrol (tanpa perlakuan). Sel Hela yang mengalami apoptosis akan berwarna oranye dengan karakteristik morfologi berupa : sel mengecil, fragmentasi inti, kondensasi kromatin dan membran sel *blebbing*.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

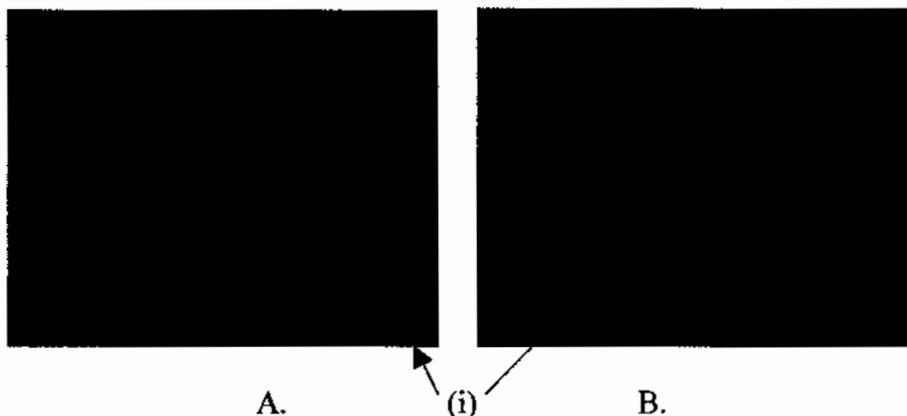
Pengamatan apoptosis pada sel HeLa dilakukan dengan menggunakan pengecatan ethidium bromide. Sifat antiproliferatif ekstrak metanol buah makasar (*B. javanica* L Merr) dan ubi rambat (*I. batatas* L) dianalisis dengan pengamatan perubahan morfologi dan DNA sel, sel yang apoptosis akan menunjukkan karakteristik perubahan morfologi yaitu : sel mengecil, membran sel *blebbing*, kondensasi kromatin dan fragmentasi inti (Lowe dan Lin, 2000). Pengecatan sel HeLa tanpa perlakuan (kontrol) menunjukkan sel HeLa tidak mengalami apoptosis, hal ini terlihat dengan tidak adanya fragmentasi inti dan sel HeLa tidak mengerut atau mengecil (Gambar 1).



Gambar 1. Foto mikroskopis sel HeLa tanpa perlakuan (kontrol) dengan pengecatan ethidium bromide: (i) sel yang tidak mengalami apoptosis.

Demikian juga dengan hasil pengecatan sel HeLa dengan perlakuan ekstrak metanol ubi rambat (*I. batatas*) dan buah makasar (*B. javanica*) konsentrasi 10 ug/ml juga tidak terjadi apoptosis, meskipun sel HeLa mengecil tetapi tidak terlihat adanya fragmentasi inti (DNA) yang merupakan karakteristik sel yang mengalami apoptosis (Gambar 2). Hal ini disebabkan karena sel HeLa tahan terhadap apoptosis akibat adanya mutasi pada *downstream* caspase 3 yang merupakan mediator apoptosis, dibuktikan dengan penelitian oleh Kawabeta *et al* (1999). Penelitian tersebut diperoleh hasil perlakuan sel HeLa dengan C2-Ceramida dan dengan diamida menyebabkan kematian sel setelah selama 48 jam. Kematian sel ini disebabkan oleh turunnya potensial transmembran mitokondria dilanjutkan dengan aktivasi caspase 3 yang merupakan

merupakan penyebab kematian sel kanker melalui apoptosis. Pada penelitian tersebut terlihat sel tidak mengalami fragmentasi DNA yang merupakan karakteristik terjadinya apoptosis.



Gambar 2. Foto mikroskopis sel Hela dengan perlakuan: (A). Ekstrak metanol ubi rambat (*I.batatas*) konsentrasi 10 ug/ml, (B). Ekstrak metanol buah makasar (*B. javanica* L Merr) konsentrasi 10 ug/ml dengan menggunakan pengecatan ethidium bromide. Keterangan : (i) sel mengecil tetapi tidak mengalami apoptosis.

Penghambatan apoptosis ini dikaitkan dengan terjadinya peningkatan ekspresi Bcl₂ anti apoptosis dan c-myc yang bersifat sinergis. Sehingga dengan ekspresi tersebut sel Hela tidak mengalami apoptosis (Arcinas *et al.*, 2001). Peningkatan ekspresi c-myc juga telah dibuktikan oleh Kanda *et al.*, 2000. Selain itu adanya perubahan (mutasi) pada *pRb* dan *p53* yang merupakan *tumor supressor gene* dan juga pada gen-gen lain seperti *Bax*, *p73* dan *Bcl6* yang menyediakan kecukupan sinyal pertumbuhan dapat menghambat terjadinya apoptosis pada sel kanker (Lindstrum dan Wiman, 2002).

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan data-data yang telah dikumpulkan dalam penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak metanol buah makasar (*Brucea javanica* L Mer) tidak dapat memacu terjadinya proses apoptosis pada sel Hela.
2. Ekstrak metanol ubi rambat (*Ipomea batatas* L) tidak dapat memacu terjadinya proses apoptosis pada sel Hela.

B. Saran.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme antikanker lain seperti penghambatan *angiogenesis* dan penghambatan *metastasis* untuk mendapatkan laporan komprehensif mengenai aktivitas antikanker ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A., Halimi E.S., Djafar, Z.R. & Kamaluddin, M.T., 2000, Studi pengobatan dan jenis ramuan tanaman obat di Propinsi Sumatera Selatan, *Majalah Kedokteran Sriwijaya* (MKS). 32(1): 1-5
- Anonim, 1995, *Cancer Basic Fact: Cancer Fact & Figures*, America Cancer Society revised 1/1995.
- Brown, J. Martin, & Wouter, Bradly, G., 1999, Apoptosis, p53 and Tumor Cell Sensitivity to Anticancer Agent, *Cancer Research*. 59 : 1391-99
- Cotran, R.S., Kumar, V., dan Collins, T., 1999, *Pathologic Basis of Diseases*, Ed 6, WB. Saunders Company, Philadelphia
- Cosman, J., Schlegel, R., 1991, p53 in The Diagnosis of Human Neoplasma, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 : 980-981
- Chan, K.L., O'Neil, M.J., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., 1986, Plants as sources of Antimalarial drugs, Part 3 *Eurycoma longifolia*, *Planta Medica* 52: 105-107.
- Departemen Kesehatan RI, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*, Pusat Penelitian Dan Pengembangan Farmasi, Badan Litbangkes Depkes RI, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI, 1997, *Profil Kesehatan Indonesia*, Depkes RI, Jakarta.
- Guardavaccaro, D., Corrente, G., Covone, F., Michelli, L., D'agano, I., Starace, G., Caruso, M., Tirone, F., 2000, Arrest of G1-S Progression by the p53-Inducible Gene PC3 Is Rb dependent and Relies on the Inhibition of Cyclin D1 Transcription, *Mol Cel Biol* 20: 1797-1815.
- Hembing, 2000, *Ensiklopedia Milenium : Tumbuhan Obat Indonesia Prestasi Insan Indonesia*, Jakarta.
- Hoffman, E.J.m 1999, *Cancer and the Search for Selective Biochemical Inhibitors*, CRC Press, Boca Raton, London.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Herris, C.C., 1991, p53 Mutations in Human Cancers, *Science* 253 : 49-53
- Iggo, R., Gatter, K., Bartele, J., Lane, D.P., Herris, A., 1990, Increased Expression of Mutant Forms of p53 Oncogene in Primary Lung Cancer, *Lancet* 353 : 675-679
- Katzung, G., Bertram, 1998, *Farmakologi Dasar dan Klinik* edisi VI edisi terjemahan, Agoes A (ed) penerbit ECG, Jakarta.

- Mellor, Robert C., 2002, *Neoplasia*, Will Medical College of Cornell University, nl.
- Okano, M., Fukamiya, N., Lee, K.H., 1990, Biologically active compounds from Simaroubaceous plants. In: Atta-ur-Rahman (Ed), *Studies in Natural Products Chemistry Vol.7*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp: 369-404.
- Perry, L.M., 1980, *Medical Plants of East and Southeast Asia : Attribute Properties and Uses*. MIT Press, Massachusetts : 389
- Prajatmo Heru, Hakimi, M. & Sofowan, S., 1999, Survival Rate of Cervical Cancer Patient in Province of Yogyakarta, *Indon J Clin Epidemiol Biostat.* 6(3):4-8
- Saphiro, Geoffrey I. dan Harper, J., Wade, 1999, Anticancer drug targets : cell cycle and checkpoint control, *J Clin Invest.* 104: 1645-53.
- Shah, M.A. dan Schwartz, G.K., 2001, Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy, *Clin Research Can.* 7: 2168-81
- Soebroto J.B., 1999, *Penanggulangan Kanker Terpadu Paripurna (PKTP) sebagai Penanggulangan dan Penanganan Mutakhir Penyakit Kanker*, Dies Natalis 50 UGM, Yogyakarta.
- Soemantri, S., Budiarmo, K.L., Suhardi, Sarimawar, Bachroen, C., 1997, *Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 1995*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Sibuea W.H., Mangunkusumo R.R., Akbar N., Widjanarko A., Djayadiman G., Windiastuti E., 2000, Hospital-based cancer registry in Cipto Mangunkusumo Hospital Jakarta, *Med J. Indonesia.* 9: 181-201
- Sutojo S., 2001, Quo vadis JPKM , *Majalah Kesehatan*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 161 : 30-3
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1980, An Improved Colorimetric Assay for Interleukin 2, *J. Immunological Methods*, 93 : 156-157
- Veletenza, A.V., Scumacher, A.M., Weiss, C., Egli, M. Watterson, D.M., 2001, A Protein Kinase Associated with Apoptosis and Tumor Supression, *J Biol Chem.* 276: 38956-65.
- World Health Organization, 1998, *The World Health Report: Live in the 21st Century, A Vision for All*, WHO, Geneva.