

**UJI AKTIVITAS SEDIAAN MBVG
(Microencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel)
EKSTRAK n-HEKSAN DAUN PARANG ROMANG
(*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) TERHADAP
SEL HELA**

**INDAH
N11109318**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

UJI AKTIVITAS SEDIAAN MBVG (Mikroencapsulated Bioadesive Vaginal Gel) EKSTRAK n-HEKSAN DAUN PARANG ROMANG (Boehmeria virgata (Forst) Guill) TERHADAP SEL HELA



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

UJI AKTIVITAS SEDIAAN MBVG (Mikroencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel)
EKSTRAK n-HEKSAN DAUN PARANG ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst)
Guill) TERHADAP SEL HELA



Pada tanggal: Agustus 2013

PENGESAHAN

UJI AKTIVITAS SEDIAAN MBVG (Mikroencapsulated Bioadesive Vaginal Gel)
EKSTRAK n-HEKSAN DAUN PARANG ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst)
Guill) TERHADAP SEL HELA

Oleh :

INDAH
N111 09318

Dipertahankan Di Hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 31 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua
Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS., Apt. :
2. Sekretaris
Usmar, S.Si., M.Si., Apt. :
3. Ex Officio
Prof. Dr. rer. nat. Hj. Marianti A Manggau, Apt. :
4. Ex Officio
Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. :
5. Anggota
Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. :

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Juli 2013

Penyusun

INDAH

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan berkah, rahmat dan hidayahNya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini merupakan salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar. Penulis tak lupa juga mengirimkan shalawat serta salam kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW.

Begitu banyak kendala dan tantangan yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Sediaan MBVG (Mikroencapsulated Bioadesive Vaginal Gel) Ekstrak n-Heksan Daun Parang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) Terhadap Sel HeLa, namun sampai dengan terwujudnya skripsi ini, begitu banyak bantuan dan dukungan yang mengalir dari berbagai pihak sehingga penulis dapat melalui semua kendala dan tantangan dan menyelesaikan skripsi ini.

Karena itu, penulis dengan tulus menghanturkan banyak terima kasih kepada kedua orang tua tercinta, Bapak Muchtar Dg Sanre' dan Ibu Satuwati Dg Ngai, saudara – saudariku Fitri, Nur Baya, Kurniawan, Nurdiana, Ilham, Happy. Terima kasih atas segala doa, kasih sayang, dukungan dan semangat yang bapak, ibu, dan saudara berikan selama ini. Semoga Bapak, Ibu dan Saudara selalu diberikan rahmat, kesehatan, dan keselamatan oleh ALLAH SWT.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada ibu Prof.Dr.rer.nat.Hj.Marianti A.Manggau,Apt selaku pembimbing utama dan ibu Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama yang telah begitu banyak memberikan bimbingan serta pengalaman yang sangat berharga buat penulis sehingga membantu dalam penyelesaian tugas akhir.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA, Wakil Dekan I Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt., Wakil Dekan II Prof. Dr.rer.nat. Hj. Marianti A.Manggau., Apt., dan Wakil Dekan III Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt. dan penasehat akademik bapak Drs. H. Hasyim Bariun M.Si.,Apt.

Terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS., Apt; Bapak Usmar, S. Si., M. Si. Apt; Prof. Dan Bapak Dr. Gemini alam, M. Si., Apt. selaku penguji dalam pelaksanaan ujian sidang.Bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Terima kasih atas segala ilmu, nasehat, dan saran yang telah diberikan selama penulis menjalani kehidupan perkuliahan ini, serta seluruh pegawai akademik dan staf pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu penulis dalam dunia kampus ini.

Terima kasih kepada seluruh staf yang sudah turut membantu demi kelancaran jalannya penelitian penulis, khususnya Ibu Syamsiah selaku staf Laboratorium Biofarmasi, Kanda Echi selaku staf laboratorium terpadu Universitas Hasanuddin, dan Kak Sumi Staf laboratorium Farmasetik

terima kasih atas dukungan dan bantuannya selama ini. Semoga kebaikan kalian bernilai ibadah di sisi Allah.

Kepada Kanda Nur Hasni Hasan M.Si., Apt Kanda Lukman S.Si., Apt; ku ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya telah membantu penyelesaian penelitian penulis, Kanda Zulfikar Syamsi senantiasa menjadi partner peneliti yang baik, kanda Idha, Kanda Haris, kanda Afdal, kanda Rey, kanda ipul dan kanda-kanda The Pacet Team lainnya yang tidak dapat disebut satu persatu, senantiasa memberikan angin segar kepada penulis pada saat semangat juang hampir pupus.

Sahabat NLT-ku tercinta, Dewi Purwaningsih, Ermawati, Nur Ariany, Dahlia Dm, Afrianti Novitasari, Andi Yulia Indriani, Rizky Cahya , sering mendukung pada hal-hal positif, terima kasih atas segala dukungan, kebersamaan, serta ketulusan yang kalian berikan. Persahabatan ini akan selalu terjaga bersama senyum dan tangis kita.

Kepada Suharafitaningsih S.Si., Wa Ode Sitti Munirah, Annisiah, Lucy capriny T, Jummah, Sasmita, Amal, Satria, Ian, Ayu Ashari, Hafilah dan Khairul Amry terima kasih atas segala dukungan dan doa yang telah diberikan.

Kepada teman-teman dan senior Fakultas Farmasi UNHAS, Rahmatun Sahra S.Si, Thry Susanty S.Si, Kusuma Wardani S.Si., Patry S.Si, Muh. Nur Amir, S.Si., Apt., Ismail S.Si., Apt., terima kasih atas segala bantuan dan kebaikan yang diberikan kepada penulis.

Kepada pihak yang tidak sempat disebut namanya, penulis mohon maaf dan Allah jualah yang Maha melihat dan Maha membalas dengan sangat sempurna.

Penulis sangat menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari bentuk kesempurnaan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya. Akhir kata semoga apa yang penulis persembahkan ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan kedepannya. Amin

Makassar, 2013

Indah

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian Uji aktivitas sediaan MBVG (Microencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel) Ekstrak n-Heksan Daun Parang Romang terhadap sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiproliferasi sediaan MBVG terhadap sel HeLa. Pengamatan aktivitas antiproliferatif dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Hasilnya menunjukkan bahwa pada sediaan mikrokapsul pada konsentrasi 15,625-1000 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 4,76%-95,50% sehingga diperoleh IC_{50} 189,73 $\mu\text{g/mL}$, Pada sediaan MBVG pada konsentrasi 156,25-10.000 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 4,76%-95,50% dan diperoleh IC_{50} 1989,234 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan sediaan mikrokapsul kurang aktif sebagai antiproliferasi pada sel HeLa, dan pada sediaan MBVG tidak aktif sebagai antiproliferasi pada sel HeLa.

ABSTRACT

The research concerning activity test of MBVG (Microencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel) preparation from n-hexane extract of Parang Romang leaf against HeLa cells. This research was aimed to determine the anti-proliferation activity of preparations MBVG against HeLa cell. The Observation of antiproliferative activity using MTT method. The results showed that the concentration of microcapsules preparation in 15.625 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ inhibited cell growth by 4.76%-95.50% with IC_{50} 189.73 $\mu\text{g/mL}$, the concentration of MBVG preparation in 156.25 to 10000 $\mu\text{g/mL}$ inhibited cell growth by 4.76% -95.50% with IC_{50} 1989.234 $\mu\text{g/mL}$. The conclusion of research showed that microcapsules preparation was less activity as anti-proliferation againts HeLa cells, and the MBVG preparation was inactive as anti-proliferation againts HeLa cells.

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Uji aktivitas antiproliferasi sediaan Mikrokapsul terhadap sel Hela	46
2. Uji aktivitas antiproliferasi sediaan MBVG terhadap sel Hela	46
3. Komposisi Mikrokapsul	58
4. Komposisi Gel	58
5. Komposisi MBVG.....	58
6. Hasil Uji aktivitas sediaan Mikrokapsul dan MBVG.....	60
7. Tabel probit.....	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Penggolongan Mikrokapsul	6
2. Kurva Pertumbuhan Sel	25
3. Siklus Sel.....	28
4. Perubahan MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromide) menjadi Kristal Formazan	37
5. Grafik Persentase Sel Hidup terhadap konsentrasi Mikrokapsul	65
6. Grafik presentasi del hidup Terhadap konsentrasi MBVG	65
7. Grafik log konsentrasi Mikrokapsul terhadap Probit	66
8. Grafik log konsentrasi MBVG terhadap Probit.....	66
9. Tanaman Parang Romang (<i>Boehmeria virgata Guill</i>).....	70
10. Ekstrak n-Heksan Daun Parang Romang.....	70
11. Mikrokapsul	71
12. MBVG (Microencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel).....	71
13. Kultur sel pada well plate, 4 jam setelah pemberian MTT	71
14. Mikroskop inverted	72
15. Autoclave.....	72
16. Elisa Reader	72
17. Oven.....	72
18. Bio Safety cabinet II.....	72
19. Sentrifuge	72

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja.....	56
2. Pengujian sitotoksik.....	57
3. Formula MBVG.....	58
4. Perhitungan pembuatan Larutan Sampel	59
5. Perhitungan Viabilitas Sel dan Probit Sel	61
6. Perhitungan IC50.....	67
7. Dokumentasi.....	70

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	3
II.1 Uraian Tanaman	3
II.1.1 Klasifikasi Tanaman	3
II.1.2 Nama daerah	3
II.1.3 Morfologi Tumbuhan	3
II.1.4 Tempat Tumbuh	4
II.1.5 Kegunaan.....	5
II.2 Uraian Sediaan MBVG	5
II.3 Uraian Tentang Kanker	14
II.3.1 Definisi kanker.....	14
II.3.2 Penyebab kanker	15

II.3.3 Pengembangan Obat Antikanker	16
II.3.4 Kanker Leher Rahim	18
II.4 Kultur Sel.....	21
II.4.1 Karakteristik dan Jenis Kultur Sel.....	23
II.4.2 Fase Pertumbuhan Sel dan Siklus Sel.....	25
II.4.3 Medium Kultur Sel.....	28
II.5 Sel HeLa	33
II.6 Uji sitotoksik.....	35
II.7 Inhibition Concentration(IC ₅₀).....	38
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	39
III.1 Penyiapan Alat dan Bahan.....	39
III.2 Pembuatan Bahan Penelitian.....	40
III.2.1 Pembuatan Phosphatase-Buffered Saline (PBS).....	40
III.2.2 Pembuatan Medium Pencuci	40
III.2.3 Pembuatan Medium Penumbuh.....	40
III.2.4 Penumbuhan Sel dari Tangki Nitrogen Cair	41
III.2.5 Pemanenan Sel.....	41
III.2.6 Pembuatan Sediaan MBVG	41
III.2.7 Pembuatan Stok Larutan Uji	43
III.3 Perlakuan Terhadap Kultur Sel.....	44
III.3.1 Kelompok Kontrol Sel.....	44
III.3.2 Kelompok Kontrol medium.....	44

III.3.3 Kelompok perlakuan.....	44
III.4 Pengujian Sampel Dengan Metode MTT.....	44
III.4 Pengumpulan dan Analisis Data.....	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
IV.1 Hasil Penelitian	46
IV.2 Pembahasan.....	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	51
V.1 Kesimpulan	51
V.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA.....	52
LAMPIRAN	

BAB I

PENDAHULUAN

Tumbuhan Parang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) termasuk dalam suku Urticaceae. Daunnya sering digunakan sebagai obat kanker oleh masyarakat Makassar, Sulawesi Selatan. Daun parang romang diketahui mengandung senyawa golongan alkaloid. Efek antikanker daun Parang Romang telah banyak diuji secara preklinis dan klinis. Ekstrak n-heksan memiliki aktifitas antiproliferasi terbesar terhadap sel kanker HeLa dengan nilai IC_{50} 3,453 $\mu\text{g/ml}$. Dengan data IC_{50} tersebut di atas, menunjukkan bahwa daun Parang Romang memiliki senyawa yang dapat membunuh sel kanker HeLa sehingga dapat dikembangkan menjadi salah satu alternatif dalam pengobatan kanker leher rahim. (1,2,3)

Beberapa batasan dalam penggunaan ekstrak herbal seperti ketidakstabilan, metabolisme oleh hati, efek toksiknya terhadap sel-sel lain, kelarutan yang rendah dalam air dan lain-lain menyebabkan kadar obat dalam darah dibawah konsentrasi terapeutiknya sehingga menyebabkan rendahnya atau tidak adanya efek terapeutik. Untuk mengatasi masalah tersebut maka ekstrak n-heksan daun parang romang diformulasi dalam bentuk mikrokapsul. Mikrokapsul merupakan salah satu penghantar obat herbal yang bertujuan untuk meningkatkan kelarutan, menaikkan stabilitas, perlindungan dari toksisitas, menaikkan aktifitas farmakologi, penghantaran secara terus menerus, dan mampu menghantarkan molekul obat langsung ke dalam sel target. (4)

Rute vagina telah digunakan secara konvensional untuk penghantaran beberapa obat lokal seperti antimikroba. Namun, sistem penghantaran obat lewat vagina secara konvensional seperti larutan, krim, busa, dan jeli melekat pada sisi target untuk waktu yang relatif singkat dikarenakan aksi pembersihan dari jalur vagina itu sendiri yang membatasi kadar efektif dari obat untuk suatu periode waktu yang singkat sehingga fluktuasi dalam kadar dosis obat menyebabkan peningkatan frekuensi dosis obat. (5,6)

Penggunaan gel bioadhesive vagina dengan pelepasan yang diperpanjang (mikroenkapsulasi) diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat antara lain waktu tinggal yang diperpanjang dari bentuk sediaan pada tempat absorpsi selama bioadhesi ke mukosa vagina. Pelepasan obat yang diperpanjang meningkatkan bioavailabilitas dan mengurangi efek samping dari obat dan akhirnya meningkatkan kenyamanan pasien. Oleh karena itu dibuat sediaan MBVG (Microencapsulated Bioadhesiv Vaginal gel) ekstrak n-heksan daun parang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill).

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan pengujian aktivitas antiproliferasi dari sediaan MBVG (Microencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel) ekstrak n-heksan daun Parang Romang terhadap sel kanker HeLa, dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antiproliferasinya dalam bentuk sediaan MBVG (Microencapsulated Bioadhesiv Vaginal gel).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1 Uraian Tumbuhan

II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan (8,9)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Monochlamydeae
Bangsa	: Urticales
Suku	: Urticaceae
Marga	: Boehmeria
Jenis	: <i>Boehmeria virgata</i> (Forst) Guillem

II.1.2 Nama Daerah (8)

Makassar	: Parang romang
Toraja	: Bo'to laki
Sunda	: Haramay

II.1.3 Morfologi Tumbuhan (8)

Tumbuhan berumah satu, tegak, tumbuh cepat sebagai herbal hijau atau belukar kecil, tinggi 1-2 m dan 3 m dengan rhizoma yang panjang dan akar yang berbonggol. Tangkai biasanya tidak bercabang dan

cekung, diameter 8-16 mm, awalnya hijau dan berambut, kemudian berubah coklat dan berkayu.

Daunnya memiliki tiga ibu tulang (*costa*), daun penumpu yang berlekatan menjadi satu dan mengambil tempat di dalam ketiak daun, berbentuk linear lanset, panjangnya sampai 1,5 cm, panjang tangkai daun 6-12 cm, tepi daun; bergerigi, ujung daun biasanya meruncing, warna daun hijau dan kasap dibagian atas permukaan daun, sedangkan dibagian bawah permukaan daun, gundul dan hijau.

Bunga; majemuk tak terbatas di ketiak daun, bunga bertangkai nyata, duduk pada ibu tangkainya, ibu tangkainya mengadakan percabangan demikian pula cabang-cabangnya sehingga disebut juga tandan majemuk, panjangnya 3-8 cm, setiap cabang dipisahkan dengan baik oleh kelompok bunga berkelamin tunggal. Kelompok bunga jantan jumlahnya sedikit, biasanya 3-10 bunga, kelompok bunga betina lebih banyak, biasanya 10-30 bunga. Bunga jantan bertangkai pendek, hiasan bunga 3-5 lekuk, benang sari sebanyak lekuk. Bunga betina memiliki 2-4 lekuk hiasan bunga, kehijauan sampai merah muda, putik dengan satu bakal buah yang didalam terdapat satu bakal biji. Buah; buah kurung, diameter 1 mm, tertutup oleh hiasan, berambut, lunak, berwarna hijau kecoklatan .

II.1.4 Tempat Tumbuh (10)

Tumbuh secara liar pada semak-semak belukar di daerah bukit.

II.1.5 Kegunaan

Daun Parang Romang di Makassar, Sulawesi Selatan digunakan untuk mengobati tumor. Ekstrak daun Parang Romang memiliki efek antiproliferasi terhadap sel kanker HeLa (3) dan sel kanker kandung kemih 5637, (11) meningkatkan titer antibodi IgG, dan IgM, meningkatkan jumlah dan jenis limfosit serta bobot relatif limpa. (3)

II. 2 Uraian sediaan MBVG

II.2.1 Mikroenkapsulasi

1. Definisi

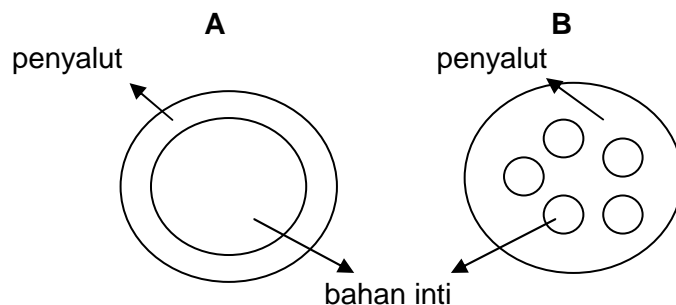
Mikroenkapsulasi adalah suatu proses dimana bahan-bahan padat, cairan bahkan gas dapat dijadikan kapsul dengan ukuran partikel mikroskopik, dengan membentuk salutan tipis (dinding) sekitar bahan yang akan dijadikan kapsul. Mikroenkapsulasi suatu proses enkapsulasi mikroskopik partikel-partikel obat dengan suatu bahan penyalut yang khusus, yang membuat partikel-partikel obat dalam karakteristik fisika dan kimia yang lebih dikehendaki. Dengan membeda-bedakan ketebalan dinding partikel obat mikrokapsul, laju larutnya dapat diubah sesuai dengan lepas lambat yang dihasilkan. (12) Mikrokapsul yang terbentuk dapat berupa partikel atau bentuk agregat, dan biasanya memiliki rentang ukuran partikel antara 5 – 5000 μm . Ukuran tersebut bervariasi tergantung metode dan ukuran partikel bahan inti yang digunakan. (13)

2. Tujuan Mikroenkapsulasi

Tujuan dari mikroenkapsulasi adalah mengontrol pelepasan dari obat terkapsulasi (*encapsulated*), melindungi bahan-bahan terkapsulasi dari oksidasi atau deaktivasi yang disebabkan oleh lingkungan, menutupi bau dan rasa dari bahan-bahan terkapsulasi, dan mengisolasi bahan-bahan terkapsulasi dari hal-hal yang tidak diinginkan. (14)

3. Penggolongan mikrokapsul

Mikrokapsul dapat memiliki berbagai macam struktur. Beberapa memiliki bentuk *spheres* dengan daerah inti yang bersambung yang dikelilingi dengan penyalut yang bersambung pula. Sedangkan yang lain memiliki bentuk irregular dan mengandung sejumlah kecil tetesan atau bahan inti. (14)



Gambar 1. Penggolongan mikrokapsul : (A) mikrokapsul dengan inti/penyalut yang bersambung, dan (B) mikrokapsul multinuklear

4. Metode mikroenkapsulasi

1) Proses kimia, meliputi :

a. Pemisahan fase koaservasi (*Coacervation*)

Metode koaservasi terdiri atas tiga tahap, yaitu: (13)

1. Tahap 1 : pembentukan tiga fase kimia tidak tercampurkan, yaitu fase cairan pembawa, fase bahan inti, dan fase bahan penyalut.
 2. Tahap 2 : penempatan penyalut polimer cair pada bahan inti. Penempatan polimer penyalut cair sekeliling bahan inti terjadi jika polimer teradsorpsi pada antarmuka yang terbentuk antara bahan inti dan fase cairan pembawa. Penempatan yang terus-menerus dari bahan penyalut didahului oleh pengurangan dalam seluruh energi bebas antarmuka dari sistem, terjadi dengan pengurangan luas permukaan bahan penyalut selama bersatu dengan butiran-butiran polimer cair.
 3. Tahap 3 : pengerasan penyalut, biasanya dengan teknik panas, ikatan silang, atau teknik desolvasi.
- b. Polimer-polimer yang tidak bercampur

Teknologi ini menggunakan polimer pemisahan fase yang berbeda dengan koaservasi kompleks. Polimer-polimer yang tidak bercampur terjadi karena dua polimer yang berbeda secara kimia dilarutkan bersama dalam pelarut yang tidak dapat bercampur dalam larutan. Kedua polimer ini saling menolak satu sama lain dan membentuk dua fase cair yang terpisah. Satu fase mengandung polimer yang dirancang untuk bertindak sebagai dinding kapsul, dan fase lainnya mengandung polimer yang tidak bercampur. (15)

2) Proses mekanik

a. Pengeringan semprot (*spray drying*) dan Pembekuan Semprot

Langkah pertama dalam proses enkapsulasi dengan metode pengeringan semprot adalah dengan mengemulsikan atau mendispersikan bahan inti dalam larutan bahan penyalut. (15)

Proses pengeringan dan pembekuan semprot sama-sama meliputi pendispersian bahan inti dalam bahan penyalut yang dicairkan, dan menyemprotkan campuran inti-penyalt ke dalam suatu kondisi lingkungan yang pematatannya terjadi relatif cepat. Perbedaan utama antara kedua metode adalah pada cara pematatan penyalut. Pematatan penyalut pada pengeringan semprot dipengaruhi oleh kecepatan penguapan pelarut yang digunakan untuk melarutkan bahan penyalut. Sedangkan pematatan penyalut pada pembekuan semprot dilakukan dengan membekukan bahan penyalut yang melebur, atau dengan memadatkan bahan penyalut yang dilarutkan dengan memasukkan campuran bahan inti-penyalt ke dalam suatu bahan bukan pelarut. Penghilangan bahan bukan pelarut atau pelarut dari bahan yang telah tersalut dilakukan dengan teknik peresapan, ekstraksi, atau penguapan. (13)

Variabel kontrol proses meliputi sifat bahan pengisi seperti viskositas, keseragaman, dan konsentrasi dari bahan inti dan bahan penyalut, laju pengisian, metode atomisasi, dan laju

pengeringan, yang biasanya dikontrol oleh temperatur pemasukan dan pengeluaran dan konsentrasi pelarut arus udara. Proses tersebut dapat menghasilkan mikrokapsul mendekati struktur sferis dengan ukuran 5 sampai 600 mikron. (13)

b. Proses multi lubang-sentrifugal

Southwest Research Institute (SWRI) telah mengembangkan suatu proses mekanik untuk memproduksi mikrokapsul yang menggunakan gaya sentrifugal untuk melingkari suatu bahan inti melalui pembungkus membran mikroenkapsulasi, sehingga mempengaruhi mekanika mikroenkapsulasi. (13)

Variabel proses meliputi kecepatan rotasi silinder, kecepatan aliran bahan inti dan bahan penyalut, konsentrasi dan viskositas bahan penyalut, serta viskositas dan tegangan permukaan dari bahan inti. Proses multi lubang sentrifugal mampu membuat mikroenkapsulasi cairan dan padatan (jika padatan didispersi dalam cairan) dari berbagai kisaran ukuran, dengan berbagai bahan penyalut. Bahan yang dienkapsulasi dapat disiapkan sebagai larutan kental dalam media yang mengeras atau sebagai serbuk kering. (13)

c. Penyalutan di dalam panci

Metode penyalutan di dalam panci digunakan untuk mikroenkapsulasi bahan dengan ukuran partikel yang relatif besar (lebih besar dari 600 mikron). Pada metode ini, penyalut yang

digunakan disiapkan sebagai larutan atau sebagai semprotan halus, ke suatu bahan inti padat, dalam panci penyalut. Untuk memindahkan larutan penyalut, biasanya digunakan air hangat pada bahan-bahan bersalut saat penyalut ada di dalam panci penyalut. Dalam beberapa hal, penghilangan penyalut terakhir dilakukan dalam oven pengering. (13)

3) Penguapan pelarut

Teknik penguapan pelarut untuk menghasilkan mikrokapsul dapat digunakan dalam variasi yang luas dari berbagai bahan inti cairan maupun padatan. Bahan inti dapat berupa bahan yang larut dalam air (hidrofilik) maupun yang tidak larut dalam air (hidrofobik). (13)

Prosesnya dilakukan pada suatu alat pembuat cairan. Penyalut mikrokapsul dilarutkan dalam suatu pelarut yang mudah menguap, yang tidak bercampur dengan fase cairan pembawa. Bahan inti yang akan dimikroenkapsulasi dilarutkan atau didispersikan dalam larutan penyalut polimer. Dengan pengocokan, campuran bahan penyalut inti terdispersi dalam fase cairan pembawa untuk memperoleh ukuran mikrokapsul yang sesuai. (13)

Variabel proses akan meliputi metode pembentukan dispersi, kecepatan penguapan pelarut untuk polimer penyalut, temperatur, dan kecepatan pengadukan. Faktor-faktor penting yang perlu diperhatikan dalam menyiapkan mikrokapsul dengan teknik penguapan pelarut meliputi pemilihan cairan pembawa dan pelarut untuk polimer

penyalut, karena pemilihan ini sangat mempengaruhi sifat-sifat mikrokapsul serta pemilihan teknik pemulihan pelarut. (13)

II.2.2 Gel

1. Definisi

Gel didefinisikan sebagai suatu sistem setengah padat yang terdiri dari suatu dispersi yang tersusun baik dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan saling diresapi cairan. (16)

2. Dasar Gel

Berdasarkan komposisinya, dasar gel dapat dibedakan menjadi dasar gel hidrofobik dan dasar gel hidrofilik. (16)

a) Dasar gel hidrofobik

Dasar gel hidrofobik terdiri dari partikel-partikel anorganik. Apabila ditambahkan ke dalam fase pendispersi, bilamana hanya sedikit sekali interaksi antara kedua fase. Berbeda dengan bahan hidrofilik, bahan hidrofobik tidak secara spontan menyebar, tetapi harus dirangsang dengan prosedur yang khusus. (16)

Dasar gel hidrofobik antara lain petrolatum, *mineral oil*/gel polyethilen, plastibase, alumunium stearat, carbowax. (17)

b) Dasar gel hidrofilik

Dasar gel hidrofilik umumnya adalah molekul-molekul organik yang besar dan dapat dilarutkan atau disatukan dengan molekul dari fase pendispersi. Istilah hidrofilik berarti suka pada pelarut. Pada umumnya karena daya tarik menarik pada pelarut dari bahan-bahan hidrofilik

kebalikan dari tidak adanya daya tarik menarik dari bahan hidrofobik, sistem koloid hidrofilik biasanya lebih mudah untuk dibuat dan memiliki stabilitas yang lebih besar. (16)

Dasar gel hidrofilik antara lain bentonit, veegum, silika, pektin, tragakan, metil selulosa, karbomer. (17)

3. Sistem bioadhesi

Bioadhesi dapat didefinisikan sebagai suatu keadaan dimana dua bahan, salah satunya adalah agen biologi, bersama-sama untuk periode waktu diperpanjang dengan gaya antar muka. (18) untuk tujuan penghantaran obat, tema bioadhesi mengimpilkasikan pelekatan suatu sistem pembawa obat ke suatu lokasi biologi spesifik. Permukaan biologi dapat berupa jaringan epitel atau lapisan mukosa pada permukaan dari suatu jaringan jika pelekatan adhesi pada lapisan mukosa, fenomena tersebut merujuk pada kata mukoadhesi. (19) Lapisan mukosa meliputi lapisan mucosal dari hidung, rectal, esophagus, vagina, mata dan rongga mulut.

Pemikiran mengenai sistem penghantaran obat bioadhesive diperkenalkan sebagai suatu konsep baru dari ilmu farmasi sebagai hasil dari kerja beberapa kelompok peneliti perintis di Amerika, Jepang, dan Eropa pada pertengahan 1980-an. (20) Sejak saat itu, ide bentuk sediaan yang melekat ke tempat pemberian dan atau absorpsi obat masing-masing mendorong peneliti di seluruh dunia. Secara original keuntungan dari system penghantaran obat bioadhesi terlihat pada potensinya

(1) untuk memperpanjang waktu tinggal pada tempat aksi absorpsi obat (sehingga mengurangi frekuensi pemberian obat untuk formulasi bioadhesive pelepasan terkontrol) dan (2) untuk meningkatkan kontak pada barrier epitel mukosa utama (sehingga dapat meningkatkan transport epitel dari obat yang biasanya absorpsinya rendah, seperti peptida dan protein). Kontak yang kuat dan dekat dari system penghantaran obat dengan absorpsi melalui mukosa dapat menghasilkan gradient konsentrasi yang tinggi sehingga meningkatkan absorpsivitas(7) Keutamaan ini khususnya mendorong harapan untuk meningkatkan bioavailabilitas dari obat-obat peptide.

Klasifikasi polimer dengan sifat bioadhesive :

1. Polimer hidrofilik

contoh : Asam Polyakrilat

2. Hidrogel

contoh : polikarbopol, karbopol dan polyox

3. Ko-Polimer/Kompleks antarpolimer

contoh : polistiren, polibutadiena

4. polimer thiolasi (Tiomer)

contoh : tiomer kationik (kitosan-sistein, kitosan-tiobutilamidin, kitosan-asam tioglikat), tiomer anionik (poliacrylic acid-sistein, CMC-sistein, alginate-sistein)

II.3 Uraian tentang Kanker

II.3.1 Definisi kanker

Kanker dapat didefinisikan sebagai penyakit dimana sekelompok sel abnormal yang tumbuh tidak terkontrol. (22) Sel kanker merupakan *the out law cell* karena tumbuh secara tidak teratur, melanggar semua kaidah normal, tidak peduli akan kontrol dalam perbanyakan dan menggunakan agendanya sendiri. Bila pertumbuhan ini tidak cepat dihentikan dan diobati, maka sel kanker akan berkembang terus. Sel kanker dapat mengganggu tuan rumah karena menyebabkan (1) desakan akibat pertumbuhan tumor; (2) penghancuran jaringan tempat tumor berkembang dan bermetastatis; (3) gangguan sistemik lain sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker .

Bentuk atau struktur sel kanker secara umum adalah (1) bentuknya bermacam-macam (*polymorph*); (2) warnanya lebih gelap (*hyperchromasy*) dan bermacam-macam (*Polychromasy*), karena kadar asam nukleat dalam inti tinggi serta distribusi kromatin tidak merata; (3) inti sel relatif besar dengan rasio inti/sitoplasma naik, sehingga mendekati satu; (4) rasio nukleol/nuclear naik; (5) insidens mitosis naik. Terdapat mitosis abnormal, seperti tetraploid atau polyploid. Mitosis normal ialah diploid, yaitu dari satu sel induk membelah menjadi dua sel anak; (6) susunan sel-sel tidak teratur (anaplastik). (23)

Sifat umum kanker adalah (1) pertumbuhan yang berlebihan, umumnya berbentuk tumor; (2) bersifat invasif, mampu tumbuh di jaringan

sekitarnya; (3) bersifat metastatik, menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru; (4) memiliki hereditas bawaan yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker.

II.3.2 Penyebab kanker

Riset pada dasawarsa terakhir mengungkapkan bahwa kanker disebabkan oleh terganggunya siklus sel akibat mutasi dari gen-gen yang mengatur pertumbuhan. Pada umumnya dibutuhkan minimal dua jenis mutasi untuk membentuk pertumbuhan sel ganas. Sel-sel tumor berdaya menjauhkan diri dari regulasi pertumbuhan sel normal. Hal ini dicapai dengan jalan perubahan genetis, sehingga sel tumor menjadi mandiri dari regulasi itu. (24)

Pertumbuhan sel kanker dapat disebabkan juga oleh adanya perubahan yang penting pada fisiologi sel yang akumulatif dapat merangsang pertumbuhan yang berbahaya. Perubahan-perubahan tersebut yaitu *self sufficiency* signal pertumbuhan, ketidaksensitivitas atas sinyal penghambat pertumbuhan, penghindaran atas kematian sel yang terprogram (apoptosis), potensi proliferasi sel yang tidak terbatas, angiogenesis yang berkelanjutan dan invasif terhadap jaringan lain serta bisa bermetastasis. (25)

Kanker terjadi melalui beberapa tingkat yaitu : (a) *fase inisiasi* : DNA dirusak akibat radiasi atau zat karsinogen (radikal bebas). Zat-zat inisiator ini mengganggu proses reparasi normal, sehingga terjadi mutasi DNA dengan kelainan pada kromosomnya. Kerusakan DNA diturunkan

kepada anak-anak sel dan seterusnya. (b) *fase promosi* : zat karsinogen tambahan (*co-carcinogens*) diperlukan sebagai promotor untuk mencetuskan proliferasi sel. Dengan demikian, sel-sel rusak menjadi ganas. (c) *fase progresi* : gen-gen pertumbuhan yang diaktivasi oleh kerusakan DNA mengakibatkan mitosis dipercepat dan pertumbuhan liar dari sel-sel ganas. Tumor menjadi manifes. (24)

II.3.3 Pengembangan Obat Antikanker

Upaya utama untuk mengembangkan obat antikanker baik melalui penapisan empiris maupun rancangan senyawa baru yang rasional hingga sekarang berjalan lebih dari tiga dekade. Kemajuan-kemajuan mutakhir di bidang ini termasuk sintesis peptida-peptida dan protein-protein dengan teknik-teknik DNA rekombinan dan antibody monoklonal. Program pengembangan obat ini telah dilakukan beberapa pengujian pada sistem-sistem tumor hewan cangkokkan yang mempunyai sifat khas yang baik. Uji *in vitro* sederhana untuk mengukur sensitivitas obat dari sederetan sel-sel tumor manusia memperbesar dan memperpendek program pengujian dan yang sekarang ini digunakan sebagai uji-uji penapisan primer untuk agen-agen baru oleh National Cancer Institute dan oleh sebagian besar perusahaan farmasi lainnya. Setelah obat-obat baru dengan aktifitas kanker yang potensial diidentifikasi, lalu diselidiki efek-efek toksikologi praklinis dan farmakologi pada obat-obat ini yang terbatas pada hewan.

Obat-obat antikanker yang menjanjikan yang tidak memiliki toksisitas berlebihan kemudian dilanjutkan ke uji klinis fase I, sementara

efek-efek farmakologis dan toksik agen-agen tersebut umumnya lebih banyak diuji pada pasien-pasien dengan stadium lanjut daripada terhadap relawan-relawan yang sehat. Uji klinis lainnya mirip dengan uji klinis untuk obat-obat lain tetapi mungkin dipercepat.

Obat-obat antikanker yang ideal paling tidak bisa memberantas sel-sel kanker tanpa merusak jaringan-jaringan normal. Golongan-golongan obat yang sekarang ini sedang dikembangkan termasuk induktor diferensial, yang ditunjukkan untuk mendesak sel-sel neoplastis, melampaui hambatan maturasi guna membentuk sel-sel tahap akhir dengan sedikit atau tanpa potensi proliferasi; obat-obat antimetastasis dirancang untuk mengganggu sifat-sifat permukaan sel-sel ganas sehingga kemudian mengubah potensi invasif dan metastasisnya, dan lain sebagainya. (26)

Secara teoritis dapat dihasilkan obat yang menyembuhkan kanker, tetapi obat yang ada sekarang belum memenuhi syarat terutama ditinjau dari segi efektifitas dan keamanan. Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Terapi dikatakan baik apabila dosis yang digunakan dapat membunuh sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi.

II.3.4 Kanker Leher Rahim

Kanker leher rahim adalah tumor ganas/karsinoma yang tumbuh di dalam leher rahim/serviks, yaitu suatu daerah pada organ reproduksi

wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara rahim (uterus) dengan liang senggama (vagina). Kanker ini biasanya terjadi pada wanita yang telah berumur, tetapi bukti statistik menunjukkan bahwa kanker leher rahim dapat juga menyerang wanita yang berumur antara 20 sampai 30 tahun.

Kanker serviks, 90% berasal dari sel skuamosa (pada jaringan epitel) yang melapisi serviks sedangkan 10% berasal dari sel kelenjar penghasil lendir pada saluran servikal yang menuju ke dalam rahim. Penyebab paling utama kanker servik adalah anggota famili Papovirida yaitu HPV (Human Papiloma Virus) yang mempunyai diameter 55 μm dan virus ini ditularkan secara seksual. HPV memiliki kapsul isohedral yang telanjang dengan 72 kapsomer, serta mengandung DNA circular double stranded dengan panjang kira – kira 8000 pasang basa. (27)

Terdapat 3 golongan tipe HPV dalam hubungannya dengan kanker serviks, yaitu : 1) HPV resiko rendah, yaitu HPV tipe 6 dan 11, 46 yang jarang ditemukan pada karsinoma invasif ; 2) HPV resiko sedang, yaitu HPV 33, 35, 40, 43, 51, 56, dan 58 ; 3) HPV resiko tinggi, yaitu HPV tipe 16, 18, 31. Ketiga jenis HPV ini dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang abnormal, namun hanya tipe 2 dan 3 yang menyebabkan kanker. Faktor resiko kanker leher rahim : (1) Infeksi virus HPV (Human Papiloma Virus) (2) Penyakit menular seksual (3) Memulai aktifitas seksual pada usia yang sangat muda (4) Berganti-ganti pasangan seks (5) Pemakaian

kontrasepsi (6) Pemakaian Dietilstilbestrol (DES) (7) Sering melahirkan (8) Penyakit yang menekan system imun (9) Merokok (10) Genetik. (27)

Terjadinya kanker leher rahim ditandai dengan adanya pertumbuhan sel-sel pada leher rahim yang tidak lazim (abnormal). Tetapi sebelum sel-sel tersebut menjadi sel-sel kanker, terjadi beberapa perubahan yang dialami oleh sel-sel tersebut. Perubahan sel-sel tersebut biasanya memakan waktu sampai bertahun-tahun sebelum sel-sel tadi berubah menjadi sel-sel kanker. Selama jeda tersebut, pengobatan yang tepat akan segera dapat menghentikan sel-sel yang abnormal tersebut sebelum berubah menjadi sel kanker. Sel-sel yang abnormal tersebut dapat dideteksi kehadirannya dengan suatu test yang disebut "Pap smear test", sehingga semakin dini sel-sel abnormal tadi terdeteksi, semakin rendahlah resiko seseorang menderita kanker leher rahim.

Pap smear test merupakan suatu test yang aman, cepat dan murah dan telah dipakai bertahun-tahun untuk mendeteksi kelainan-kelainan yang terjadi pada sel-sel leher rahim. Test ini ditemukan pertama kali oleh Dr. George Papanicolou, sehingga dinamakan Pap smear test. Pap smear test adalah suatu metode pemeriksaan sel-sel yang diambil dari leher rahim dan kemudian diperiksa di bawah mikroskop untuk melihat perubahan-perubahan yang terjadi dari sel tersebut. Pencegahan yang harus dilakukan untuk menghindari kanker leher rahim adalah pertama, jika pernah melakukan hubungan seksual maka harus melakukan Pap smear test secara teratur setiap dua tahun dan ini dilakukan sampai

berusia 70 tahun. Pada beberapa kasus mungkin dokter menyarankan untuk melakukan Pap smear test lebih sering. Hal yang kedua adalah melaporkan adanya gejala-gejala yang tidak normal seperti adanya perdarahan, terutama setelah coitus (senggama). Hal yang ketiga adalah tidak merokok. Data statistik melaporkan bahwa resiko terserang kanker leher rahim akan menjadi lebih tinggi jika wanita merokok. Dengan melakukan beberapa tindakan yang dapat memperkecil resiko tersebut, maka kejadian kanker leher rahim ini dapat dihindari. Terapi untuk kanker leher rahim berbeda untuk tiap stadium kanker. Pada stadium awal dapat dilakukan pembedahan terhadap jaringan yang mengandung sel kanker. Pada stadium selanjutnya, terapi dilakukan dengan radioterapi, kemoterapi, maupun kemoradioterapi. Jenis terapi ini dapat berpengaruh pada sel normal. (28)

II.4 Kultur Sel

Kultur dibuat dari suspensi sel yang telah dipisahkan dari jaringan dan kemudian dipindahkan ke cawan kultur dengan kondisi yang sama seperti ketika sel masih berada di dalam jaringan asalnya dalam tubuh suatu organisme. Kultur sel biasanya ditumbuhkan dalam wadah plastik atau kaca dengan permukaan yang memungkinkan sel-sel mengikatkan diri. Wadah-wadah tersebut dimasukkan dalam inkubator bersuhu 37 C dengan atmosfer yang terdiri dari 5% CO₂ dan 95% udara. (29)

Sel yang diisolasi dari suatu jaringan kemudian ditumbuhkan *in-vitro* dikenal sebagai kultur primer. Sel yang konfluen, yaitu ketika fase

pertumbuhan sel mulai menurun atau tidak ada pertumbuhan lagi karena nutrisi dalam medium telah habis, sehingga perlu dilakukan subkultur atau penggantian media. Subkultur memungkinkan terjadinya perluasan kultur yang dikenal dengan *cell line*. Setelah beberapa kali disubkulturkan suatu *cell line* dapat mati atau mengalami transformasi menjadi suatu *continuous cell line*. Keuntungan dari *continuous cell line* antara lain laju pertumbuhan cepat sehingga diperoleh kepadatan sel yang tinggi, dapat dipelihara dalam medium yang sederhana dan dapat ditumbuhkan dalam suspensi. (30)

Biakan sel yang diambil dari sel-sel kanker berbeda dengan yang diambil sel-sel normal antara lain : (1) Biakan sel kanker sering dapat tumbuh tanpa harus mengikatkan diri pada suatu permukaan. (2) Sel kanker dapat berkembang biak dengan kepadatan yang jauh lebih tinggi dalam cawan kultur dan sel-selnya homogen. (3) Sel kanker dapat disimpan pada suhu -70 C untuk waktu yang tidak terbatas dan masih terus hidup ketika diambil kembali. (29)

Penggunaan kultur sel (sel mamalia) untuk uji sitotoksisitas sebagai alternatif pengganti uji toksisitas pada hewan cenderung meningkat karena berbagai alasan. Diantaranya alasan tersebut adalah mampu mengurangi mahalanya biaya percobaan menggunakan binatang secara konvensional. Selain itu dengan menggunakan kultur sel, mekanisme toksisitas biokimia bisa dikerjakan lebih efektif, karena kondisi lingkungan sel lebih mudah dikontrol maupun dimodifikasi. (31)

Media yang digunakan untuk menumbuhkan sel adalah media RPMI 1640 yang mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam organik dan glukosa. Serum mengandung hormon yang memacu pertumbuhan. Seluruh komponen dalam media RPMI 1640 berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup agar sel dapat bertahan hidup dan bereproduksi. (30)

Kultur sel pertama kali ditemukan pada awal abad ke-20 sebagai metode yang digunakan untuk mempelajari sel hewan yang bebas dari masalah sistemik yang mungkin muncul pada metode *in vivo*. Kultur sel merupakan salah satu metode yang digunakan dalam tingkatan seluler dan biologi molekuler. Kultur sel adalah penghilangan sel dari hewan atau tumbuhan dan kemudian ditumbuhkan dalam lingkungan tiruan yang baik bagi sel. Sel dapat diperoleh dari jaringan secara langsung atau dilepas secara enzimatis atau mekanik sebelum dikulturkan.

Metode kultur sel menjadi sangat luas digunakan, terutama setelah ditemukan antibiotik yang dapat memperpanjang masa perkembangbiakan dan pengembangan penetapan medium yang menyediakan kondisi lingkungan yang dapat dikontrol. Beberapa keuntungan dari penggunaan kultur sel yaitu kondisi lingkungan yang dapat dikontrol; karakterisasi dan homogenitas sampel; metode *in vitro* menunjukkan kondisi secara *in vivo*, mutagenesis dan karsinogenesis; konsistensi dan kemampuan reproduksi hasil yang tinggi; serta ekonomi, skala dan mekanisasi kultur. Kultur sel sering diaplikasikan untuk

mempelajari fisiologi, biokimia sel, mutagenesis, carsinogenesis, pencarian obat , pengembangan obat, dan pembuatan bahan kimia dalam skala besar. (32,33,34,35)

II.3.1 Karakteristik dan Jenis Kultur Sel

1. Primary culture

Primary culture merupakan bagian dari tahap kultur yang diperoleh langsung dari jaringan hewan normal dan ditumbuhkan di bawah kondisi yang tepat menjadi suspensi sel tunggal oleh enzim digesti. *Primary culture* juga diartikan bahwa merupakan kultur yang belum disubkulturkan.

2. Cell line

Cell line diperoleh dari *primary culture* yang telah disubkulturkan. Sel disubkulturkan dengan menstransfer sel ke wadah dan medium baru yang menyediakan ruang yang lebih untuk pertumbuhan sel selanjutnya. Sel normal biasanya hanya tumbuh pada jumlah terbatas sebelum kehilangan kemampuan hidup mereka untuk melakukan proliferasi, biasa disebut *finite cell line*. Selanjutnya apabila *finite cell line* mengalami perubahan dan memperoleh kemampuan hidup untuk proliferasi dengan tidak terbatas, maka sel akan menjadi *continuous cell line*.

3. Cell Strain

Cell strain adalah subpopulasi *cell line* yang diseleksi dari kultur dengan kloning atau dengan metode lain untuk ditumbuhkan lebih lanjut.

(33,36)

Pertumbuhan sel kultur ada 2 bentuk yaitu suspensi sel atau dalam bentuk selapis sel yang saling berdempetan menjadi jaringan dalam botol culture. Suspensi kultur sel juga dapat diklasifikasikan berdasarkan morfologi sel (bentuk dan penampakan dalam mikroskop), yaitu:

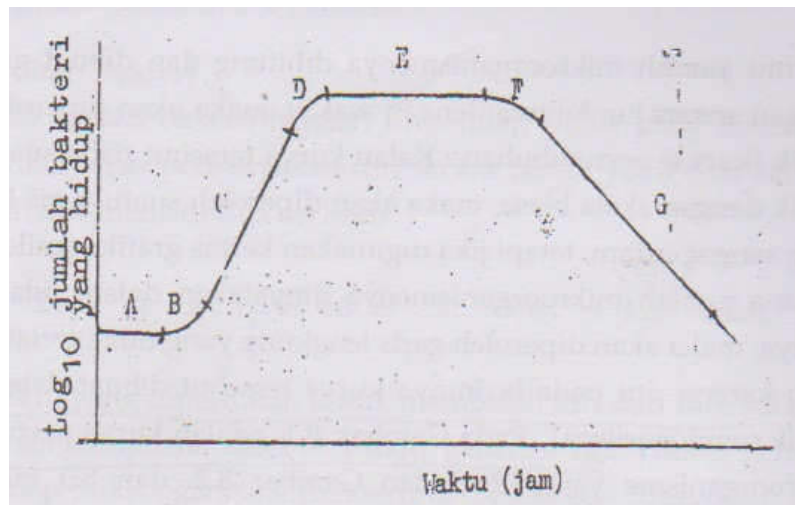
- a. Sel fibroblastic, yaitu sel bipolar atau multipolar yang memiliki bentuk yang memanjang dan tumbuh berdempetan pada substrat.
- b. Sel epithelial, yaitu sel yang berbentuk poligonal dengan dimensi biasa dan tumbuh berdempetan pada substrat dalam potongan yang berlainan.
- c. Sel Lymphoblast, yaitu sel yang berbentuk bola dan biasanya tumbuh dalam suspensi tanpa saling berdempetan pada masing-masing permukaan sel. (33)

II.3.2 Fase Pertumbuhan Sel dan Siklus Sel

Tiap waktu cell line yang disubkulturkan akan tumbuh menjadi sel seperti sebelumnya dalam jangka waktu hidup yang terbatas. Terdapat 6 tahap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu:

1. Fase Permulaan

Pada fase tersebut mikroorganisme melakukan penyesuaian diri dengan lingkungannya yang baru. Berbagai macam enzim dan zat-zat perantara yang dibentuk pada fase ini, sehingga memungkinkan akan terjadi pertumbuhan lebih lanjut. Sel-sel pada fase ini mulai membesar, tetapi belum melakukan pembelahan.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan Mikroorganisme pada fase-fase pertumbuhannya (A. Fase permulaan, B. Fase pertumbuhan yang dipercepat, C. Fase logaritma, D. Fase pertumbuhan mulai terhambat, E. Fase stasioner yang maksimum, F. Fase kematian yang dipercepat, G. Fase kematian logaritma)

2. Fase Pertumbuhan yang dipercepat

Pada fase ini mikroorganisme mulai melakukan pembelahan diri tetapi waktu generasinya masih panjang. Pada pertumbuhan yang dipercepat bersama-sama dengan fase permulaan tadi sering disebut “lag phase” atau phase of adjustment.

3. Fase Pertumbuhan Logaritma

Pada fase pertumbuhan ini kecepatan pertumbuhan yang paling cepat, waktu generasinya pendek dan konstan. Selama fase ini metabolisme paling cepat dan pesat, jadi sintesa bahan sel sangat cepat dan konstan. Keadaan tersebut berlangsung sampai salah satu atau beberapa nutrisi habis atau telah terjadi penimbunan hasil-hasil metabolisme yang bersifat racun, sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme. Untuk mikroorganisme yang bersifat aerob, maka sebagai bahan pembatasnya adalah oksigen. Panjang pendeknya

waktu generasi pada fase ini sangat bergantung pada spesies mikroorganisme, medium dan faktor lingkungan selama pertumbuhan.

4. Fase Pertumbuhan Mulai Terhambat

Pada fase ini pertumbuhan mulai terhambat, hal ini disebabkan karena adanya pengurangan nutrisi dan mulai terjadi penimbunan hasil-hasil metabolisme yang bersifat racun, juga terjadi perubahan lingkungan seperti pH dan lain-lain. Kalau dilakukan penambahan nutrisi atau penetralan racun-racun pada keadaan ini, maka pada fase logaritma dapat diperpanjang.

5. Fase Stasioner atau Fase Konstan

Karena adanya penurunan kadar nutrisi dan adanya penimbunan zat-zat yang bersifat racun, maka kecepatan pertumbuhan dan perbanyakan mikroorganisme akan terhambat. Selain dari pada itu jumlah mikroorganisme yang mati sama dengan yang hidup. Panjang pendek fase stasioner ini sangat bergantung pada kepekaan mikroorganisme dalam menghadapi faktor-faktor pertumbuhan serta perubahan-perubahan yang berlangsung dalam mediumnya.

6. Fase Kematian yang Dipercepat

Kedua fase ini sering disebut sebagai fase penurunan kematian. Pada fase ini kecepatan kematian meningkat terus-menerus sedangkan kecepatan pembelahan menjadi nol. Setelah sampai ke fase kematian logaritma kecepatan kematian mencapai maksimum. Jumlah selnya

menurun menurut deret ukur, tetapi penurunan jumlah tersebut akan mencapai keadaan yang minimum. (35)

Pada pertumbuhan sel, terjadi beberapa tahapan mekanisme yang disebut siklus sel, yaitu:

1. Fase M (Mitosis)

Pada fase mitosis, kromatin menjadi kromatid akan membentuk kromosom, kemudian memisahkan sel induk menjadi 2 sel baru.

2. Fase G1 (Gap 1)

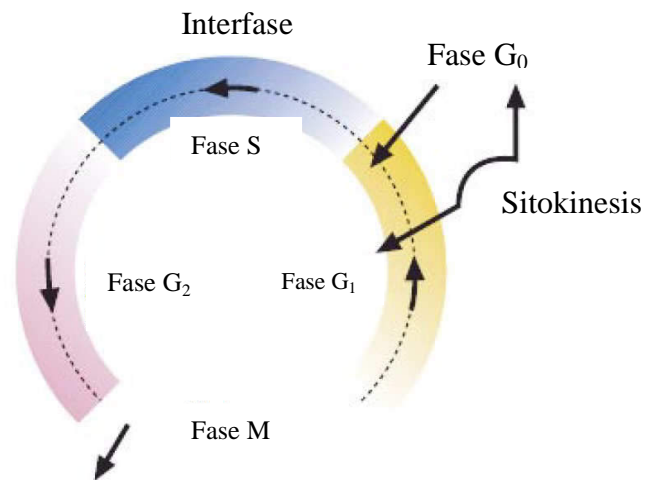
Kedua sel berkembang ke arah sintesis DNA dan siklus divisi lain atau keluar dari siklus sel secara *reversible* (G_0) atau *irreversible* untuk melaksanakan differensiasi. Selama tahap G1, sel pada umumnya rentan terhadap kontrol progresi siklus sel pada jumlah poin restriksi yang menentukan sel yang akan kembali ke dalam siklus.

3. Fase S (Sintesis)

Pada fase sintesis, DNA mulai bereplikasi.

4. Fase G2 (Gap 2)

Pada fase ini, sel mempersiapkan untuk proses mitosis. Pemeriksaan dimulai pada sintesis DNA, penentuan integritas DNA, dan akan menghentikan siklus sel untuk memperbaiki DNA atau memasuki proses apoptosis jika perbaikan DNA tidak memungkinkan. (32,34)



Gambar 3. Siklus sel (Sumber: Roche Applied Science. Culture and Monitoring of Animal Cells Basic Techniques. Roche Diagnostics. Germany. Januari 2009. hal.15)

II.3.3 Medium Kultur Sel

Pengembangan kultur sel terus mengalami peningkatan sesuai kebutuhan untuk mengadaptasikan medium untuk kultur sel yang membutuhkan kondisi tertentu. Ada 3 macam jenis medium untuk kultur sel, yaitu:

1. Basal medium

Sebagian besar *cell line* tumbuh baik dalam basal medium yang mengandung asam amino, vitamin, garam anorganik, dan sebuah sumber karbon seperti glukosa. Formulasi basal medium harus ditambahkan serum.

2. *Reduced serum medium*

Reduced serum medium merupakan strategi lain untuk mengurangi efek serum yang tidak baik. *Reduced serum medium* adalah formulasi

basal medium yang diperkaya dengan nutrisi dan derivat hewan yang mengurangi jumlah kebutuhan terhadap serum.

3. *Serum-free medium*

Serum-free medium menghindari persoalan penggunaan sera hewan melalui penggantian serum dengan formulasi nutrisi dan hormonal yang tepat. *Serum-free medium* ada pada banyak *primary cultures* dan *cell line*, termasuk rekombinan protein dan beberapa sel hibridoma. Keuntungan besar dari penggunaan *serum-free medium* adalah kemampuan membuat medium selektif untuk jenis sel spesifik dengan pemilihan kombinasi faktor tumbuh yang tepat. (33)

Hal-hal yang perlu dipertimbangkan dalam memilih medium yang tepat untuk suatu kultur sel, yaitu:

1. Sifat fisika-kimia medium

Sebagian besar sel terutama sel mamalia membutuhkan pH optimum untuk pertumbuhan sekitar pH 7.4. Buffer yang bagus digunakan untuk menjaga pH ini adalah HEPES. HEPES biasanya digunakan dalam konsentrasi 10-20 mM. (33) Pada beberapa organ tertentu, sel membutuhkan oksigen sangat banyak, bahkan mencapai 95%, serta membutuhkan 5-7% CO₂.

Banyak juga kultur yang membutuhkan tekanan osmotik dan viskositas tertentu. Biasanya tekanan osmotik yang dibutuhkan adalah sekitar 310 mOsmol/kg pada sel tikus secara *in vitro*. Viskositas dipengaruhi oleh serum, tetapi tidak mempengaruhi pertumbuhan sel. Ada

beberapa hal yang menyebabkan viskositas menjadi penting untuk diperhatikan, yaitu apabila suspensi kultur sel terganggu, medium dengan konsentrasi serum rendah, dan suspensi sel pada stirred bioreaktor. Viskositas bisa diatur dengan penambahan CMC dan PVP.

Temperatur juga sangat penting dalam kultur sel. Biasanya sel mamalia membutuhkan temperatur sekitar 37°C untuk pertumbuhan yang optimum. Apabila kultur sel akan disimpan dalam beberapa hari, biasanya kultur sel disimpan pada suhu 4°C atau dibekukan pada suhu sampai -190°C. (32,33,34)

2. Komponen medium

Pertumbuhan kultur sel yang baik membutuhkan medium yang lengkap, yaitu mengandung semua komponen dan suplemen yang dibutuhkan oleh sel. Beberapa komponen yang penting dalam medium kultur sel, yaitu:

- a. Garam anorganik membantu memelihara keseimbangan osmotik sel dan membantu mengatur potensial membran oleh ion natrium, kalium, dan kalsium. Semuanya diperlukan dalam matriks sel dan kofaktor enzim.
- b. Sistem buffer dibutuhkan untuk menjaga pH medium 7.2-7.4. Beberapa medium kultur ditambahkan fenol red sebagai indikator pH yang dapat berubah.
- c. Karbohidrat merupakan sumber energi bagi sel. Biasanya dalam bentuk gula, misalnya glukosa dan galaktosa. Bagaimanapun, ada

beberapa medium yang mengandung maltosa dan fruktosa. Konsentrasi glukosa yang dibutuhkan bervariasi, mulai dari 1 g/L – 4 g/L.

- d. Asam amino adalah zat penyusun protein. Asam amino esensial, misalnya glutamin, ditambahkan pada medium kultur yang tidak dapat disintesis oleh medium. Konsentrasi asam amino ditentukan oleh kerapatan maksimum sel yang dapat tercapai.
- e. Vitamin adalah prekursor sejumlah kofaktor. Banyak vitamin, misalnya vitamin B, diperlukan untuk pertumbuhan sel dan proliferasi. Penambahan retinoid dapat meningkatkan adhesi sel, sebaliknya sifat adheren menjadi lemah terhadap substrat. Retinol atau asam retinol dapat ditambahkan sampai pada konsentrasi 1 mg/mL. Efek vitamin mungkin mempengaruhi sintesis glikokonjugasi spesifik pada permukaan sel. Vitamin yang umumnya digunakan adalah riboflavin, thiamin, dan biotin.
- f. Protein dan peptida penting dalam medium tanpa serum. Protein dan peptida yang umum digunakan adalah albumin, transferin, fibronectin, fetuin.
- g. Asam lemak dan lipid penting dalam medium tanpa serum, misalnya kolesterol dan steroid esensial untuk sel tertentu.
- h. Serum adalah campuran kompleks dari albumin, hormon, faktor tumbuh, dan penghambat tumbuh. Serum merupakan suatu komponen yang penting dalam medium kultur sel. Serum yang

umum digunakan adalah fetal bovine serum (FBS). Serum dapat membantu sel berada pada permukaan kultur, meningkatkan sel berproliferasi, meningkatkan kapasitas buffer, dan dapat membantu melawan kerusakan mekanik yang terjadi pada kultur pada saat digerakkan.

- i. Zat lain yang disebut *trace elementer*, yaitu zink, tembaga, selenium, dan intermediet asam tricarboxilic. Selenium kemungkinan dapat membantu detoksifikasi radikal bebas dan berfungsi sebagai kofaktor untuk sintesis glutathion.
- j. Antibiotik biasa digunakan untuk mengurangi resiko kontaminasi, tetapi terkadang antibiotik tidak diperlukan dengan pengerjaan teknik aseptik. Penggunaan antibiotik, sebaiknya tidak digunakan terus-menerus. Antibiotik dapat meningkatkan resistensi organisme, maka dari itu antibiotik biasa digunakan hanya pada *primary culture* atau kultur dalam skala besar. (32,34,36,37)

Jenis medium yang sering digunakan pada kultur sel adalah RPMI 1640, DMEM, dan MEM (Minimal Essential Medium). Medium tersebut dinyatakan dapat terjual sampai 75%. RPMI 1640 pada umumnya telah luas digunakan dan sering pada sel yang saling melekat, meskipun RPMI 1640 didesain untuk kultur suspensi dan kekurangan kalsium.

Komponen nutrisi yang terdapat dalam medium RPMI 1640, yaitu: asam amino (L-arginine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-cystine, L-glutamic acid, L-glutamine, Glycine, L-histidine, L-hydroxy-proline, L-

isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine, L-valine), vitamin (p-Aminobenzoic acid, Biotin, Choline chloride, Folic acid, myo-Inositol, Nicotinamide, D-Ca pantothenate, Pyridoxine HCl, Riboflavin, Thiamin, α -Tocopherol, Retinol acetate, Glutathione), garam anorganik (KCl, $MgSO_4$, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4), sumber energi (D-glucose), dan komponen lain (phenol red).(32)

II.5 Sel HeLa

Kultur sel HeLa atau HeLa cell line merupakan continuous cell line yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel. (38)

Sel HeLa merupakan sel epitel serviks yang terinfeksi oleh (HPV). Sel ini diketahui dapat hidup dan berkembang dengan sangat baik dalam kultur buatan di laboratorium sehingga sel HeLa banyak digunakan dalam laboratorium untuk penelitian di seluruh dunia. Kultur sel ini tumbuh dengan sangat agresif dan dapat dengan mudah menginvasi kultur sel lain. Sel ini cukup aman digunakan untuk kepentingan kultur sel. (38) Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung

nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim. (30)

Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker. (39)

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktifitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression. (40) Sebagian besar sel kanker

leher rahim, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun, aktifitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV. (39)

II.6 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksitas adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetika, zat tambahan makanan, pestisida dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya aktifitas antineoplastik dari suatu senyawa. Keuntungan penggunaan metode secara *in vitro* adalah (1) dapat digunakan sebagai tahap awal pengembangan suatu obat; (2) hanya dibutuhkan sedikit senyawa uji dalam pengujian; (3) secara drastis mengurangi jumlah hewan laboratorium; (4) untuk berbagai tujuan penggunaan kultur sel primer dari berbagai organ target (liver, ginjal, paru, kulit, sistem saraf dan lainnya) dapat memberikan informasi secara langsung tentang potensi efeknya pada sel target manusia, yang secara ilmiah memberikan hasil yang lebih valid.

Beberapa syarat yang harus dipenuhi oleh sistem uji sitotoksitas baik untuk evaluasi keamanan senyawa atau mendeteksi aktifitas antineoplastik suatu senyawa. Antara lain sistem uji tersebut harus menghasilkan kurva dosis respon yang reproduibel dan dapat menggambarkan efek senyawa uji yang sama bila diberikan secara *in vivo*. Uji sitotoksitas untuk uji aktifitas antineoplastik menunjukkan

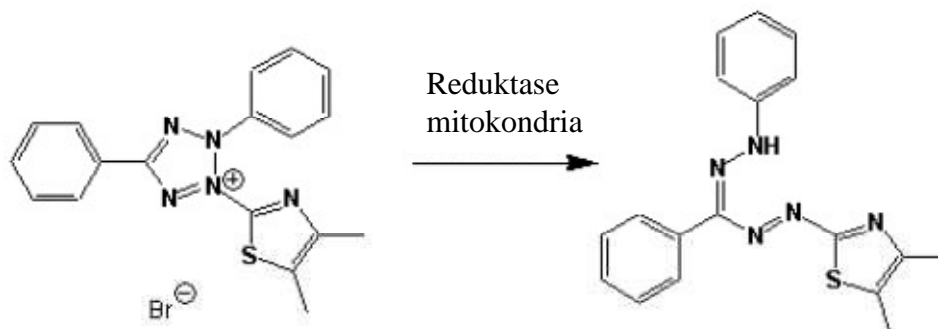
adanya perbedaan respon dari populasi sel kanker lebih besar daripada sel normal. (41)

Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup pada uji sitotoksitas dapat dilakukan dengan berbagai cara yang didasarkan pada parameter kerusakan membran, gangguan sintesis dan degradasi makromolekul, modifikasi kapasitas metabolisme serta perubahan morfologi sel. (23)

Sejumlah metode telah dikembangkan dalam studi viabilitas dan proliferasi dari populasi sel. Metode modern yang paling baik telah dikembangkan pada suatu mikroplat (*96-well plates*). Miniaturisasi ini memungkinkan banyak sampel yang dapat dianalisis dengan cepat dan simultan. Bentuk mikroplat juga mengurangi jumlah medium kultur dan sel yang dibutuhkan dengan baik. Pengujian secara kolorimetri memungkinkan sampel diukur secara langsung dalam mikroplat dengan menggunakan alat ELISA. Metode ini didasarkan pada perbedaan parameter-parameter yang berhubungan dengan viabilitas dan proliferasi sel. Parameter terpenting yang digunakan adalah aktifitas metabolisme dan sintesis DNA.

Kerusakan seluler menyebabkan hilangnya kemampuan sel untuk bertahan dan menyediakan energi untuk fungsi metabolisme dan pertumbuhan sel. Pengujian aktifitas metabolisme adalah berdasarkan hal tersebut. Umumnya, dilakukan pengukuran terhadap aktifitas mitokondria. Sel-sel kemudian diinkubasi dengan substrat kolorimetri seperti MTT.

Salah satu parameter yang merupakan dasar pengujian kolorimetri adalah aktifitas metabolisme dari sel yang hidup. Sebagai contoh, mikroplat yang menggunakan garam tetrazolium MTT yang sekarang banyak digunakan secara luas untuk mengukur kuantitas proliferasi sel dan sitotoksisitas. Garam tetrazolium mengalami reduksi menjadi kristal ungu formazan yang tak larut air hanya oleh aktifitas metabolisme sel-sel, sehingga pengujian ini hanya mendeteksi sel-sel yang masih hidup. Selanjutnya, formazan dilarutkan sehingga dengan mudah dan cepat diukur kuantitas sel pada alat ELISA pada panjang gelombang 570 nm (serapan maksimum). (41)



Gambar 4. Perubahan MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) menjadi Kristal Formazan

Keuntungan dari metode ini adalah dapat dilakukan dengan mudah dan cepat, reagen-reagen yang digunakan cukup aman, dan hasilnya akurat dan bisa diadaptasikan untuk *High Through Put screening*. Metode MTT ini lebih sensitif daripada metode trypan blue dan banyak diaplikasikan untuk uji sensitivitas obat, sitotoksisitas, respon terhadap faktor-faktor pertumbuhan dan aktifitas sel. (41)

II.7 Inhibition Concentration (IC₅₀)

Banyak kriteria atau petunjuk ketoksikan yang dapat digunakan terhadap zat-zat baru, kriteria awal yang biasa digunakan dalam evaluasi toksikologi dengan menggunakan kematian untuk memperkirakan dosis letal yang mungkin terjadi. Pengukuran kematian tepat dan tidak meragukan berguna untuk memperkirakan tingkat atau derajat dan besarnya potensi suatu zat. (41)

Pada kurva dosis-respon, bagian antara 16% dan 84% adalah yang paling linear dan dapat digunakan untuk menentukan beberapa parameter seperti ED₅₀, TD₅₀, atau LD₅₀. Dosis-dosis ini, dari kurva dosis-respon, dapat memperkirakan penyebab 50% respon (baik secara farmakologi, toksik atau kematian) terhadap 50% hewan atau 50% inhibisi (IC₅₀) dari enzim sebagai contoh. Sifat linear kurva dosis-respon dapat ditingkatkan dengan memplot logaritma dosis atau konsentrasi, meskipun ini merupakan bentuk eksperimen. Pada beberapa kasus, kurva dosis-respon dapat dibuat linear dengan menggunakan bentuk lain.

Konversi bentuk *sigmoid* kurva dosis-respon menjadi hubungan yang linear dapat digunakan analisis probit, bergantung pada unit standar deviasi yang digunakan. Unit-unit probit menggambarkan angka median seperti probit lima, dan lalu masing-masing unit simpangan baku adalah satu unit probit di atas atau di bawah. Kurva dosis-respons dapat linear, ketika logaritma dari dosis digunakan. (43)