AKTIVITAS ANTIKANKER CURCUSONE B, JATROPHONE DAN JATROPHOLONE A TERHADAP CASPASE-3 DAN p53 PADA SEL KANKER HELA

ANTICANCER ACTIVITY OF CURCUSONE B, JATROPHONE AND JATROPHOLONE A ON CASPASE-3 AND p53 IN HELA CANCER CELL

WAHYUNI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013

TESIS

AKTIVITAS ANTIKANKER CURCUSONE B, JATROPHONE DAN JATROPHOLONE A TERHADAP CASPASE-3 DAN p53 PADA SEL KANKER HELA

Disusun dan diajukan oleh

WAHYUNI

Nomor Pokok P2500211401

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 19 Agustus 2013

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,

Prof. Dr. rernat. Hj. Marianti A. Manggau	Prof. Dr. I. Sahidin	Subehan, S.Si, M.Pharm.Sc. Ph.D
Ketua	Anggota	Anggota

Ketua Program Studi Farmasi

Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Mursalim

AKTIVITAS ANTIKANKER CURCUSONE B, JATROPHONE DAN JATROPHOLONE A TERHADAP CASPASE-3 DAN p53 PADA SEL KANKER HELA

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan Diajukan Oleh

WAHYUNI

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama	: Wahyuni
Nomor Mahasiswa	: P2500211401
Program Studi	: Farmasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,

Yang Menyatakan

Wahyuni

PRAKATA

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

Puji dan syukur senantiasa dipanjatkan untuk Ia yang Maha Menggerakkan, Maha Menuntun, Maha Memberi petunjuk, Allah *Azza wa Jalla* atas hidayah-Nya jualah sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Salawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW dan para pengikutnya yang setia hingga akhir zaman.

Penyelesaian tesis ini, tidak lepas dari kerja keras dan dukungan dari berbagi pihak. Untuk itu, Penulis dengan tulus mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada;

1. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Bapak Prof.Dr. H. M. Natsir Djide, M.S, Apt., selaku Ketua Program Studi Farmasi Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
3. Ibu Prof. Dr. rer nat. Hj. Marianti A. Manggau, Apt., Bapak Prof. Dr. I. Sahidin dan Bapak Subehan, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt selaku Komisi Penasehat yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing penulis sejak awal perencanaan penelitian hingga selesainya penyusunan tesis ini.

4. Ibu Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt, Ibu Prof.Dr. Elly Wahyudin, DEA.,Apt., dan Ibu Yusnita Rifai S.Si., M.Pharm., Ph.D,Apt selaku Dosen penguji yang telah memberikan arahan dan bimbingan hingga selesainya tesis ini.
5. Bapak Prof.Dr.Ir.H. Usman Rianse, MS., selaku Rektor Universitas Haluoleo Kendari yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan pendidikan.
6. Bapak/Ibu dosen Farmasi khususnya Bapak/Ibu Dosen Pascasarjana Farmasi Universitas Hasanuddin.
7. Teman-teman sejawat di lingkup jurusan Farmasi dan Kimia FMIPA Universitas Haluoleo atas dukungan dan doanya.
8. Teman-teman Pasca Farmasi angkatan 2011; Nielma Auliah, Arief, Rusydi, Kak Tetty, Kak Fian, Yuli, K yus, Fawwas, Safar dan Faisal terima kasih atas kebersamaan, bantuan dan dukungannya selama ini.
9. Lukman Muslimin, S.Si., Apt dan Afrisusnawati Rauf, S.Si,M.Si, Apt terima kasih untuk semua bantuan dan dukungannya.

Doa yang tulus dan terima kasih yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Ayahanda Awaluddin Yahya (Alm.) dan Ibunda Hj. Martah (Almh.) semoga Allah memberikan tempat yang terbaik disisi-Nya.

Terima kasih yang tak terhingga kepada suami tercinta dr. Amry Ady Haris dan ananda tersayang Dzaky Adiwangsa Amry atas pengertian, waktu yang terbagi dan dukungan cinta yang tanpa batas selama penulis menjalani pendidikan. Terima kasih tak terhingga juga

kepada kakak-kakakku dan keluarga besar di Kendari dan Makassar atas dukungan, perhatian dan doanya hingga tesis ini dapat terselesaikan. Semoga Allah senantiasa menghimpun kita dalam rahmat dan cinta-Nya.

Sebagai penutup penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan mamfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang farmasi. Tak lupa penulis mohon maaf untuk hal-hal yang tidak berkenan dalam penulisan ini karena penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan hasil penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan. Olehnya itu, penulis amat mengharapkan masukan dari pembaca sekalian yang mana masukan tersebut boleh jadi akan sangat berarti bagi penulis.

Makassar, Juli 2013

Penulis

Wahyuni

ABSTRAK

WAHYUNI. Aktivitas Antikanker Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A terhadap Caspase-3 dan p53 pada Sel Kanker Hela (dibimbing oleh **Marianti A. Manggau, Sahidin, Subehan**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A terhadap Caspase-3 dan p53 pada Sel Kanker Hela.

Sampel yang digunakan berupa senyawa aktif Curcusone B dan Jatropholone A yang berasal dari tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*) serta Jatrophon yang berasal dari jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*). Metode penelitian dilakukan dengan menggunakan kultur sel kanker Hela yang diinduksi dengan sampel lalu diuji efeknya dengan mengamati aktivitas Caspase-3 dan p53 berdasarkan perubahan warna yang terjadi menggunakan Kit Human Caspase-1 dan Kit Human p53 yang serapannya diukur dengan menggunakan ELISA reader lalu dibandingkan dengan kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A dapat meningkatkan aktivitas Caspase-3 dan p53. Peningkatan kadar Caspase-3 tertinggi pada Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A berturut-turut sebesar 395,2%, 616,6%, 761,9%. Pada pengujian aktivitas p53 peningkatannya sebesar 716,6%, 805,2% dan 209,3%. Peningkatan aktivitas ini lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif yang peningkatannya hanya 100%. Jatropholone A dapat meningkatkan aktivitas Caspase-3 lebih tinggi dan Jatrophone menunjukkan peningkatan aktivitas p53 yang paling baik.

Kata kunci : Caspase-3, p53, sel hela, curcusone B, jatrophone, Jatropholone A

ABSTRACT

WAHYUNI. Anticancer Activity of Curcusone B, Jatrophone and Jatropholone A on Caspase-3 and p53 in Hela Cancer Cells (Supervised by **Marianti A. Manggau, Subehan, and Sahidin**).

This study aims to find out the anticancer activity of Curcusone B, Jatrophone and Jatropholone A on Caspase-3 and p53 in cancer cells Hela.

The samples used in the form of active compounds Curcusone B and Jatropholone A derived from Jarak pagar (Jatropha curcas) as well as Jatrophon which is derived from Jarak merah (Jatropha gossipyfolia). The research was carried out by using Hela cell culture cancer induced by the samples and tested their effect by observing the activity of p53 and Caspase-3 based on color change that occurs using a Kit of Human Caspase-1 and Human p53 where the absorbance is measured using ELISA reader and then compared with controls.

The results showed that Curcusone B, Jatrophone and Jatropholone A can increase the activity of Caspase-3 and p53. Increased levels of Caspase-3 highest Curcusone B, Jatrophone and Jatropholone A row of 395.2%, 616.6%, 761.9%. On the increase of p53 activity assays 716.6%, 805.2% and 209.3%. This increased activity was higher than the negative control only 100% increase. Jatropholone A can increase the activity of Caspase-3 and higher Jatrophone showed increased p53 activity is best.

Key words: Caspase-3, p53, hela cells, curcusone B, jatrophone, Jatropholone A

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
E. Hipotesa	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7

A. Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder 6

B. Terpen 8
1. Monoterpen (C_{10}). 9
2. Seskuiterpen (C_{15}) 10
3. Diterpen (C_{20}) 10
4. Sesteterpen (C_{25}) 11
5. Triterpen (C_{30}) 11
6. Tetraterpen 12

C. Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A 12

D. Pemerian Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A 13

E. Proses Isolasi 15

F. Siklus Sel 16

G. Apoptosis 18
1. Jalur ekstrinsik 19
2. Jalur instrinsik 20

H. Gen p53 22

I. Caspase 23

J. Kanker 25

K. Kanker Leher Rahim 26

L. Kultur Sel 27

M. Sel Hela 30

N. *Enzyme Linked immunosorbent assay* (ELISA) 30

O. Kerangka Pikir 32

P. Kerangka Konsep 32

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian 33

B. Alat dan Bahan 33
1. Alat 33
2. Bahan 33

C. Prosedur Kerja 34
1. Penyiapan Alat 34
2. Penyiapan Sel Kanker Hela 35

3. Pemanenan Sel 35
4. Penyiapan sampel Curcusone B, Jatropon dan Jatropholone A
5. Penyiapan Kit Human Caspase-3 dan Uji Aktivitas Caspase-3 36
a. Penyiapan Reagen 36
b. Uji Aktivitas Caspase-3 36
6. Penyiapan Kit Human p53 dan Uji Aktivitas p53 37
a. Penyiapan Reagen 37
b. Uji Aktivitas p53 38
D. Analisis Data 39
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN 40
A. Hasil Penelitian 40
B. Pembahasan 41
BAB V PENUTUP 47
A. Kesimpulan 47
B. Saran 47
DAFTAR PUSTAKA 48
LAMPIRAN 52

DAFTAR TABEL

Nomor **halaman**

1. Kadar Caspase-3 aktif (µg/mL) yang diekspresikan oleh sel HeLa setelah diinduksi dengan jatrophone, jatropholene A dan Curcosone B (Means±SD) 40

2. Kadar p53 aktif (µg/mL) yang diekspresikan oleh sel HeLa setelah diinduksi dengan jatrophone, jatropholene A dan Curcosone B (Means±SD) 41

3. Data Hasil Elisa Caspase-3 55

4. Data Hasil Elisa p53 56

DAFTAR GAMBAR

Nomor **halaman**

1.	Contoh struktur senyawa Monoterpen	9
2.	Contoh struktur senyawa Seskuiterpen	10
3.	Contoh struktur senyawa Diterpen	11
4.	Contoh struktur senyawa sesteterpen	11
5.	Contoh struktur senyawa Triterpen	12
6.	Contoh struktur senyawa Tetraterpen	12
7.	Siklus Sel	17
8.	Aktivasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik	20
9.	Aktivasi apoptosis melalui jalur intrinsik	22
10.	Caspase dan kematian sel	24
11.	Metode Elisa	31
12.	Kurva hubungan serapan dan konsentrasi Caspase-3	57
13.	Kurva hubungan serapan dan konsentrasi p53	57
14.	Isolat Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A	64

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		halaman
1.	Skema kerja Penyiapan uji Caspase-3	52
2.	Skema kerja Uji aktivitas Caspase-3	
3.	Skema kerja Uji aktivitas p53	54
4.	Data hasil ELISA Caspase-3	55
5.	Data hasil ELISA p53	56
6.	Kurva standar Caspase-1 dan p53	57
7.	Perhitungan hasil regresi Caspase-3	58
8.	Perhitungan hasil regresi p53	61
9.	Gambar	64

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
BAX	Bcl2 associated X protein
BID	BH3 interacting domain death agonist
BAD	Bcl2 antagonist of cell death
CASPASE	Cysteine Aspartate Proteases
CDKs	Cyclin-dependent Kinase
CKIs	Cyclin-inhibitory Proteins
DISC	Death Inducing Signalling Complex
FasL	Fatty acid synthetase receptor
FADD	Fast associated death domain
FLIP	Flice inhibitory protein
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAF-2	TNF-Associated Factor-2
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan deferensiasi sel. Dalam keadaan normal pertumbuhan sel diatur secara ketat oleh suatu sistem regulasi untuk memenuhi kebutuhan organisme. Sebaliknya sel-sel kanker tumbuh autonom tidak terkendali, kemudian menginvasi jaringan organ disekitarnya yang berakibat fungsi organ terganggu (Kresno, 2011).

Kanker serviks merupakan salah satu kanker yang masih menjadi keganasan terbanyak kedua yang menjadi penyebab kematian di dunia. Distribusi secara geografik, banyak ditemukan di negara berkembang seperti Amerika latin, Asia tengah dan Asia Tenggara. Di Indonesia, insiden kanker serviks berkisar 100-190 per 100.000 orang pertahun. Sampai saat ini kanker serviks masih merupakan masalah kesehatan perempuan di Indonesia dimana angka survival rate hanya 52% (Rasjidi, 2007).

Untuk pencapaian hasil pengobatan yang lebih tepat, saat ini banyak dilakukan penelitian yang difokuskan kepada penemuan strategi terapi yang baru dan salah satu strategi yang terbaik untuk pengobatan

kanker adalah menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram. Apoptosis mempunyai peran penting dalam menjaga homeostatis perkembangan sel pada organisme multiseluler. Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang dapat menyebabkan kanker. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Tamaki, 2003).

Kanker serviks terjadi disebabkan oleh infeksi *Human Papillomavirus* (HPV). Sel kanker serviks yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan dua onkogen, yaitu E6 dan E7 yang dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak normal yang disebut dysplasia yang kemudian berkembang menjadi kanker. Sifat immortal tersebut disebabkan karena kedua viral onkogen tersebut dapat menghambat ekspresi gen p53 (Doorbar, 2006).

p53 merupakan gen supresor tumor yang penting dalam melawan kanker karena p53 ini mensupresi pertumbuhan tumor melalui regulasi siklus sel dan pengaturan apoptosis. Protein p53 berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang meregulasi ekspresi beberapa pro apoptosis maupun anti apoptosis. Terapi kanker dengan radiasi maupun obat dapat menyebabkan kerusakan DNA dalam sel yang dapat berakibat apoptosis melalui jalur p53. Sel yang kehilangan p53 baik karena mutasi, infeksi virus atau sebab lain mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis (Chang,2001).

Apoptosis adalah suatu proses fisiologis yang dikendalikan dengan kontrol genetik yang ketat, berlangsung melalui proteolisis, kondensasi dan fragmentasi DNA kemudian terjadinya pengkerutan sel. Kematian sel kanker dapat terjadi dengan pengaktifan jalur apoptosis yang ditandai dengan pengaktifan caspase-3. Caspase-3 merupakan enzim sentral yang teraktifkan melalui jalur reseptor kematian *(death receptor pathway)* maupun dari jalur mitokondria sehingga caspase-3 digunakan sebagai penanda sel yang telah mengaktifkan program apoptosisnya (Smolewski, 2003).

Saat ini, semakin banyak dikembangkan upaya pencarian dan penemuan bahan bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang memiliki aktivitas antikanker yang potensial dan selektif dengan menggunakan pendekatan biomolekuler khususnya yang memiliki aktivitas menginduksi apoptosis. Hal ini didorong oleh semakin banyaknya kasus kanker, termasuk di Indonesia dan adanya beberapa kelemahan obat-obat kemoterapi untuk antikanker yang menyebabkan efek samping sehingga membunuh sel kanker maupun sel normal. Pemacauan apoptosis merupakan salah satu mekanisme yang mungkin diperoleh dari senyawa bahan alam.

Tanaman jarak *(Jatropha)* oleh masyarakat Indonesia telah banyak digunakan untuk pengobatan. Kajian bioaktivitas genus *Jatropha* juga telah diteliti dan dilaporkan memiliki sifat antiperadangan, modulator

imun, antimalaria, pembasmi larva,pembasmi moluska, antibakteri, dan memiliki sifat antikanker (Marquez, 2005).

Penelitian oleh Sahidin (2011) melaporkan bahwa curcusone B, dengan IC_{50} 1,93 µM memiliki sifat toksik terhadap sel Murine Leukimia P-388. Penelitian selanjutnya juga melaporkan bahwa Curcusone B dengan IC_{50} 19,6 µM, Jatrophone 5,13 µM dan Jatropholone A 36,15 µM memiliiki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker Hela sehingga senyawa ini memiliki potensi yang kuat sebagai antikanker (Sahidin,2011).

Penelitian oleh Afrisusnawati (2011) juga melaporkan bahwa curcusone B yang diisolasi dari tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*) dan Jatrophone yang diisolasi dari jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) memiliki kemampuan meningkatkan aktivitas p53 pada sel makrofag masing-masing sebesar 3,31 ppm dan 3,81 ppm dan menurunkan aktivitas caspase-1 masing-masing sebesar 6,80 ppm dan 9,06 ppm. Peningkatan aktivitas p53 dari kedua senyawa ini memungkinkan Curcusone B dan Jatrophone juga mampu mengiduksi apoptosis.

Berdasarkan uraian diatas, maka melalui penelitian ini akan dikaji bagaimana aktivitas antikanker Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone terhadap Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela dalam pengaktifan jalur apoptosis.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan di atas, maka permasalahan yang timbul adalah bagaimana aktivitas antikanker Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A terhadap Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui aktivitas antikanker Curcusone B terhadap Caspase-3 dan p53 dan caspase-3 pada sel kanker Hela
2. Mengetahui aktivitas antikanker Jatrophone terhadap Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela
3. Mengetahui aktivitas antikanker Jatropholone A terhadap Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela

D. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data aktivitas spesifik dari Curcusone B dan Jatropholone A yang diisolasi dari tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*) dan Jatrophone yang diisolasi dari jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) terhadap aktivitas Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela.

2. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai sumbangan teori dalam mendukung program pemerintah dalam pengembangan penemuan obat kanker yang berasal dari tanaman dalam upaya penanggulan kanker di Indonesia.

E. Hipotesa

1. Curcusone B dapat memberikan aktivitas antikanker dalam pengaktifan jalur apoptosis Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela.
2. Jatrophone dapat memberikan aktivitas antikanker dalam pengaktifan jalur apoptosis Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela.
3. Jatropholone A dapat memberikan aktivitas antikanker dalam pengaktifan jalur apoptosis Caspase-3 dan p53 pada sel kanker Hela.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder

Hasil metabolisme suatu organisme hidup berupa metabolit primer dan sekunder. Senyawa metabolit primer umumnya sama untuk setiap organisme, terdiri dari molekul-molekul besar seperti polisakarida, protein, asam nukleat, dan lemak. Fungsi senyawa metabolit primer adalah sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup organisme atau sebagai cadangan energi bagi organisme itu sendiri. Metabolit sekunder berupa molekul-molekul kecil, bersifat spesifik, artinya tidak semua organisme mengandung senyawa sejenis, mempunyai struktur yang bervariasi, setiap senyawa memiliki fungsi atau peranan yang berbeda-beda (Sastrohamidjojo, 1996).

Pada umumnya senyawa metabolit sekunder berfungsi untuk mempertahankan diri atau untuk mempertahankan eksistensinya di lingkungan tempatnya berada. Metabolit sekunder merupakan biomolekul yang dapat digunakan sebagai *lead compounds* dalam penemuan dan pengembangan obat-obat baru (Sastrohamidjojo, 1996).

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman sangat bervariasi. Tiap spesies tanaman menghasilkan senyawa tertentu sebagai *markernya.* Tanaman dalam satu genus atau satu famili akan memiliki

banyak kesamaan senyawa yang diproduksinya yang berfungsi sebagai ciri atau atau karakter dari famili atau genus tanaman tersebut dari segi kimia. Akan tetapi faktor lingkungan tempat tanaman itu tumbuh sangat mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Hal ini, di satu sisi sangat menguntungkan karena akan menghasilkan keragaman senyawa kimia yang sangat tinggi (Sahidin, 2012).

B. Terpen

Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan yang merupakan metabolit sekunder, diantaranya adalah terpen. Klasifikasi terpen ditentukan dari unit isopren atau unit C5 penyusun senyawa tersebut. Terpen yang memiliki 10 atom karbon, sebagai hasil penggabungan 2 unit isopren (C_5) membentuk senyawa golongan monoterpen (C_{10}). Seskuiterpen (C_{15}) tersusun atas 3 unit isoprene, diterpen (C_{20}) tersusun atas 4 unit isopren, sesteterpen (C_{25}) tersusun atas 5 isopren, triterpenoid (C_{30}) tersusun atas 6 unit isopren, dan tetraterpen (C_{40}) tersusun atas 8 isopren (Sahidin, 2012).

Secara umum biosintesa dari terpen terjadi dengan tiga reaksi dasar yaitu :

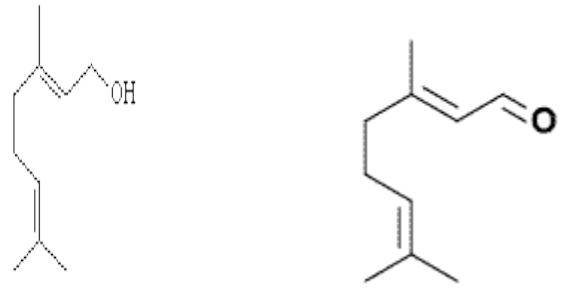
1. Pembentukan isopren aktif berasal dari asam asetat melalui asam mevalonat .

2. Penggabungan kepala dan ekor dua unit isopren akan membentuk mono-, seskui-, di-, sester- dan poli-terpenoid.
3. Penggabungan ekor dan ekor dari unit C-15 atau C-20 menghasilkan triterpenoid dan steroid (Rakshit, 2011).

Penggolongan senyawa terpenoid berdasarkan unit isopren:

1. Monoterpen (C_{10})

Monoterpen terbentuk dari dua satuan isopren dan biasanya mempunyai sepuluh atom karbon. Monoterpen merupakan komponen utama minyak atsiri berupa cairan tak berwarna, tidak larut dalam air, dapat disuling uap dan berbau harum. Senyawa monoterpen banyak dimamfaatkan sebagai antiseptik, ekspektoran, spasmolotik dan sedatif. Di samping itu monoterpen yang sudah dikenal banyak dimamfaatkan sebagai bahan pemberi aroma makanan dan parfum. Contoh senyawa monoterpen yaitu Geranial, Geraniol, Citronellol, Linalool dan lain-lain.

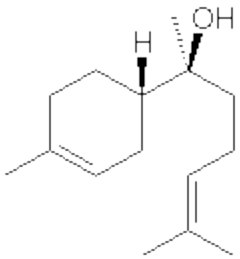


Geraniol Geranial

Gambar 1. Contoh struktur senyawa monoterpen

2. Seskuiterpen (C_{15})

Senyawa golongan seskuiterpen memiliki 15 atom karbon dan dan dibangun oleh 3 unit isopren. Seperti monoterpen, seskuiterpen terdapat sebagai komponen minyak atsiri. Senyawa seskuiterpen mempunyai bioaktivitas yang cukup besar, diantaranya sebagai antimikroba, antibiotik, hormon, dan toksin serta regulator pertumbuhan tanaman dan pemanis. Contoh seskuiterpen yaitu α-bisabolol, caryofilen, matricin, dan lain-lain.

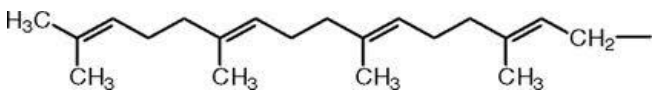


(-)-α-Bisabolol

Gambar 2. Contoh struktur senyawa Seskuiterpen

3. Diterpen (C_{20})

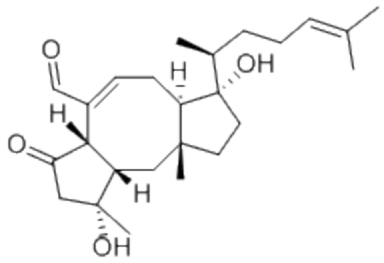
Senyawa diterpen merupakan senyawa yang mempunyai 20 atom karbon dan dibangun oleh 4 unit isopren. senyawa ini mempunyai bioaktifitas yang cukup luas yaitu sebagai hormon pertumbuhan tanaman, antifeedant serangga, inhibitor tumor, senyawa pemanis, anti fouling dan anti karsinogen. Contoh senyawa diterpen yaitu taksadien, geranilgeranil, marubin, asam abietat dan lain-lain.



Gambar 3. Geranilgeranil, contoh struktur senyawa Diterpen

4. Sesterterpen (C_{25})

Sesteterpen merupakan kelompok terpen dengan variasi senyawa relatif sedikit. Senyawa kelompok ini umumnya berasal dari jamur dan organisme laut. Kelompok senyawa ini tersusun dari 25 atom karbon yang merupakan turunan dari geranilfarnesilpirofosfat. Contoh senyawa sesteterpen ofiobolin dan sclarin.

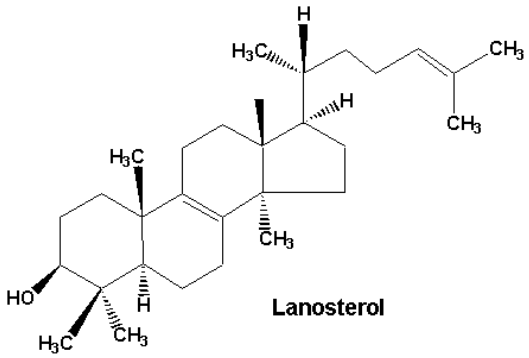


Ofiobolin

Gambar 4. Contoh struktur senyawa Sesteterpen

5. Triterpen (C_{30})

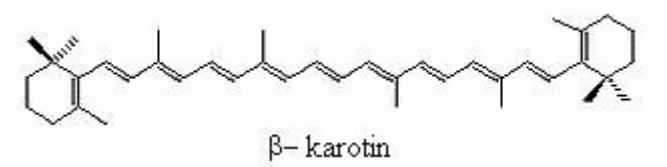
Triterpen merupakan kelompok senyawa terpenoid yang memiliki 30 atom karbon. Triterpenoid tersebar luas dalam damar, gabus dan kutin tumbuhan. Triterpenoid alkohol juga terdapat bebas dan sebagai glikosida. Triterpenoid asiklik yang penting hanya hidrokarbon skualena yang diisolasi untuk pertama kali dari minyak hati ikan hiu tetapi juga ditemukan dalam beberapa malam epikutikula dan minyak nabati (minyak zaitun). Senyawa triterpenoid yang paling dikenal seperti lanosterol yang terdapat dalam lemak wol, khamir dan beberapa senyawa tumbuhan tinggi.



Gambar 5. Contoh struktur senyawa Triterpen

6. Tetraterpen

Tetraterpen yang paling dikenal adalah karotenoid-pigmen larut dalam lemak berwarna kuning sampai merah terdapat pada semua tumbuhan dan dalam lemak berbagai jenis jaringan. Karotenoid sebagai reseptor cahaya untuk fototropisme. Senyawa ini terdapat pada kloroplas dan terikat secara longgar pada protein.Karotenoid yang paling tersebar luas adalah β- karoten (Robinson, 1995).



Gambar 6. Contoh struktur senyawa Tetraterpen

C. Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A

Curcusone B, Jatrophone dan jatropholone A merupakan tiga senyawa golongan diterpenoid yang diisolasi dari tanaman Jatropha. Curcusone B dan Jatropholone A diisolasi dari tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*). Sedangkan Jatrophone diperoleh dari isolat tanaman

Jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*). Jatropha diterpenoid memiliki spektrum bioaktivitas yang luas yang dapat digunakan sebagai *lead compounds* untuk sintesis senyawa baru dengan aktivitas biologis yang lebih baik untuk pemamfaatannya di industri farmasi.

Curcusone B menunjukkan kemampuan pengobatan pada metastasis kanker. Jatrophone memiliki aktivitas antileukemia pada sel leukemia limpositik P-388 0,17 µg/ml, aktivitas sitotoksik pada fibroblast paru dengan IC_{50} 2,8 µM dan efek antiproliferasi pada sel fibroblast CCl-171 dengan IC_{50} 0,29 µM. Jatropholone A memiliki aktivitas antiproliferasi pada lima sel fibroblast yaitu CCL-171, AGS CRL 1739, sel kanker paru HTB-58, kanker kandung kemih HTB-1 dan kanker leukemia CCl-240 pada >100 µM (Sabandar, 2013).

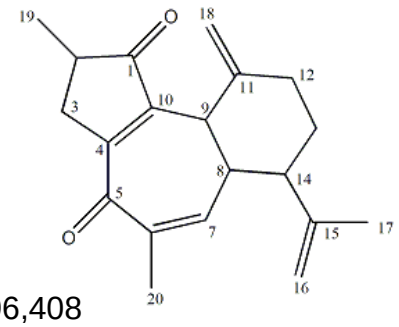
D. Pemerian Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A

1. Curcusone B

Nama IUPAC : 4(10),6,11(18),15-Rhamnofolatelene-1,5-diane (2βH,8β,9α,14αH)

Rumus molekul : $C_{20}H_{24}O_2$

Rumus struktur :



Berat molekul : 296,408

Bentuk : Kristal kuning

Titik leleh : 122-123^{o}

Rotasi optik : [α]$_{D}^{22}$ – 610 (CH_2Cl_2)

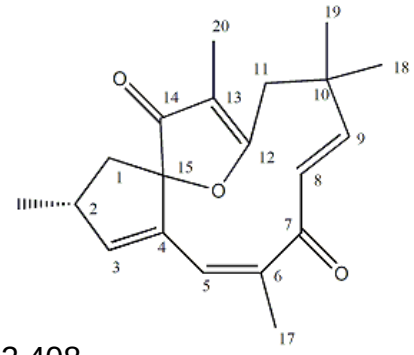
Kelarutan : Dalam metanol, etanol, hexan

2. Jatrophone

Nama IUPAC : 12,15-Epoxy-3,5,8,12-Jatrophatetraene-7,14-dione

Rumus molekul : $C_{20}H_{24}O_3$

Rumus struktur :



Berat molekul : 312,408

Bentuk : Kristal jarum

Titik leleh : 152-153^{o}

Rotasi optik : [α]^{24} + 292 (CH_2Cl_2)

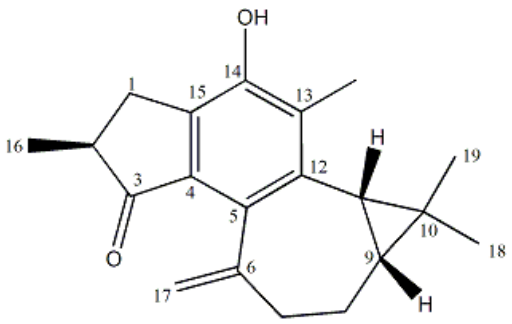
Kelarutan : Dalam metanol, etanol, hexan

3. Jatropholone A

Nama IUPAC : 2-Epimer Jatropholone B

Rumus molekul : $C_{20}H_{24}O_2$

Rumus struktur :



Berat molekul : 296,408

Bentuk : Kristal

Titik leleh : 152-153^{o}

Rotasi optik : $[\ \alpha\ ]_D^{24}$ + 292 (CH_2Cl_2)

Kelarutan : Dalam metanol, etanol, hexan

E. Proses Isolasi Curcusone B, Jatrophone dan Jatropholone A

Sampel yang digunakan untuk isolasi yaitu kulit batang *Jatropha curcas* dan *Jatropha gossipyfolia* yang diperoleh dari Pusat Pengembangan Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Sulawesi Tenggara "Arboretum Prof.Mahmud Hamundu" Universitas Haluoleo. Tanaman tersebut kemudian diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Bogor.

Isolasi senyawa dari *Jatropha curcas,* yaitu sebanyak 1 kg serbuk batang *Jatropha curcas* dimaserasi dengan metanol 3x3 L selama 3x24 jam. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian diuapkan dengan vacuum rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat berwarna coklat (100 g). Sebagian ekstrak methanol (50 g) kemudian difraksinasi dengan

kromatografi vakum cair (KVC) menggunakan kolom Φ 10 cm, adsorben: Si-gel (150g) dan campuran etilasetat:n-heksana (40-100%,MeOH100%) sebagai eluen, menghasilkan 4 fraksi yaitu F1 (5,1g), F2 (18,0 g), F3 (14,3 g), dan F4 (10,2 g). Fraksi F2 kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi vakumcair (KVC) dengan kolom Φ 5 cm, adsorben: Si-gel (70 g) dan campuran eluen etilasetat:n hexane(30-100%, MeOH 100%) menghasilkan 5 fraksi yaitu F1 (1,2 g), F2 (3,0 g), F3 (4,8 g), F4 (2,2 g) dan F5 (5,1 g). Selain itu, pemurnian F3 mendapatkan kristal kuning (300 mg) dan dari fraksi F4 diperoleh Kristal putih sebanyak 60 mg.

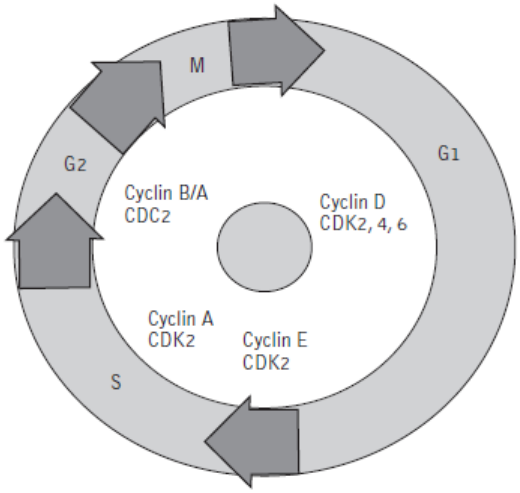
Isolasi senyawa dari *Jatropha gossypifolia* menggunakan metode isolasi yang sama dengan *Jatropha curcas*, dimana sebanyak 1 kg serbuk batang *Jatropha gossypifolia* yang telah diisolasi menghasilkan dua komponen senyawa masing-masing Kristal putih (33 mg) dan Kristal putih lainnya sebanyak 240 mg.

Penentuan struktur senyawa murni menggunakan teknik spektroskopi termasuk UV-vis, FTIR, NMR 1-D (1H dan 13C) dan NMR 2-D (HMQC, HMBC dan H-H Cosy) (Sahidin, 2011).

F. Siklus Sel

Perkembangan dan pertumbuhan sel normal membutuhkan koordinasi intraseluler maupun interaksi antar sel yang terkendali dalam organisme yang bersangkutan. Proliferasi sel normal berlangsung melalui suatu siklus sel yang terdiri atas 4 fase yang ditentukan oleh

waktu sintesis DNA, yaitu fase G1, fase S, fase G2 dan fase M. Setelah mitosis, sel memasuki fase G1, yaitu fase dimana sel sangat aktif tetapi tidak mensintesis DNA atau memasuki fase GO untuk beristirahat. Pada fase GO/G1 kandungan DNA sel adalah 2N (diploid). Siklus sel kemudian berlanjut ke fase S dimana terjadi sintesis DNA dan kandungan DNA berubah menjadi 4N. Fase selanjutnya adalah fase G2 sebelum memasuki fase M dimana sel membelah diri menjadi 2 sel diploid. Waktu yang diperlukan untuk satu siklus sel bergantung pada jenis sel, dan perbedaan waktu itu terutama terjadi di fase G1, dimana bila diperlukan siklus sel berhenti pada fase ini (G1 arrest) ataupada interphase G1/S (Kresno, 2011).



Gambar 7 . Siklus sel

Keluar dan masuknya sel kedalam siklus sel dikontrol oleh perubahan tingkatan dan aktivitas protein yang disebut *cyclin.* Protein yang berhubungan dengan siklus sel yaitu *cyclins dependent kinase*

(CDKs**)** dan *Cyclin–dependent kinase inhibitor* (CKIs). *Cyclins* tersebut sangat penting untuk signal transduksi dan koordinasi pada tiap tahapan siklus sel (Cassidy, 2002).

Sintesis dan degradasi dari CDKs diatur oleh ikatan CDK *inhibitors.* Penting untuk pengaturan *Cells cycle checkpoins* (G1→S dan G2→M) menahan siklus sel bila terjadi kerusakan DNA supaya tidak terjadi replikasi. *Checkpoint* yang berfungsi untuk merespon sel terhadap kerusakan DNA, proses ini sangat penting untuk menjaga integritas sel/genome. Pada siklus sel terdapat beberapa *checkpoint* yaitu : G1 *checkpoint* untuk pada fase S, G2 *checkpoint* menahan siklus sel, sebagai respon kerusakan DNA yang tidak replikasi selama fase S, M *check point* untuk menginaktifkan *chromosomal segregation* sebagai respon dari *misalignment* pada *mitoticspindle.* Komponen dari checkpoint adalah protein yang beraksi sebagai sensor kerusakan DNA, *signal transducer* atau *effector.* Gangguan dari fungsi *checkpoint* akan mengakibatkan mutasi yang dapat menginduksi karsinogenesis (Ford C.H 2004).

G. Apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram. Apoptosis terjadi normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk memelihara populasi sel dalam jaringan. Apoptosis penting untuk mengatur kematian sel untuk mengkontrol jumlah sel dan membersihkan sel yang rusak yang mempunyai peran penting

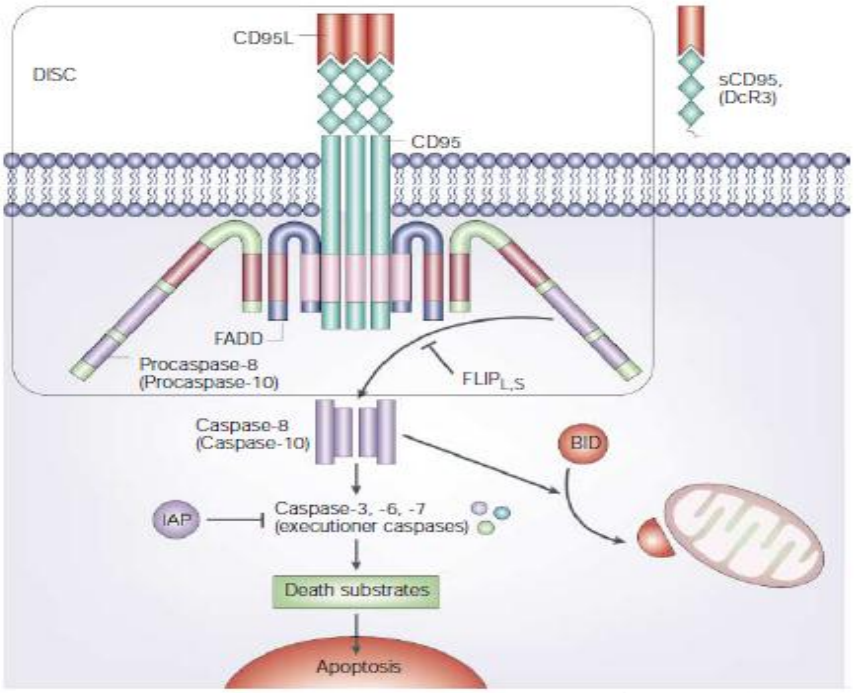
untuk supresi tumor. Sel yang apoptosis akan menunjukkan sel melisut (*cell shrinkage*), pemadatan kromatin (*chromatin condensation*) kemudian menjadi sel apoptosis atau badan apoptosis yang akan memudahkan untuk difagositosis oleh makrofag (Ford C.H,2004).

Mekanisme terjadinya apoptosis melibatkan suatu kaskade aktivasi berbagai molekul bergantung energi *(energy-dependent)*. Saat ini diketahui ada 2 jalur utama apoptosis yaitu jalur ekstrinsik atau jalur reseptor kematian *(death receptor pathway)* dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria (Kresno, 2011).

a. **Jalur ekstrinsik**

Jalur ekstrinsik diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota *dari tumor necrosis factor receptor family* (TNF) mempunyai *cytoplasmic domain* yang berisi protein interaksi disebut *death domain*, yang penting untuk mengirim *apoptotic signals.* Mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh death receptor diawali *Fas ligand* (FasL) yang melepaskan *Fas* dari ligandnya. Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat death domain, tempat untuk berikatan dengan adapter protein yang juga mempunyai death domain dan disebut FADD (*fas-associated death domain*). FADD yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan procaspase-8 melalui *death domain*. Setelah caspase-8 diaktivasi, enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan mengaktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan

execution phase dari apoptosis. Mekanisme apoptosis dapat dihambat oleh protein yang disebut FLIP, yang berikatan dengan *procaspase-8* tetapi tidak dapat berikatan dan mengaktifkan enzim karena kurang mempunyai aktifitas enzim. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan digunakan untuk menghambat dan memproteksi infeksi dan memproteksi sel normal dari *Fas mediatedapoptosis* (Ferraro, 2010).



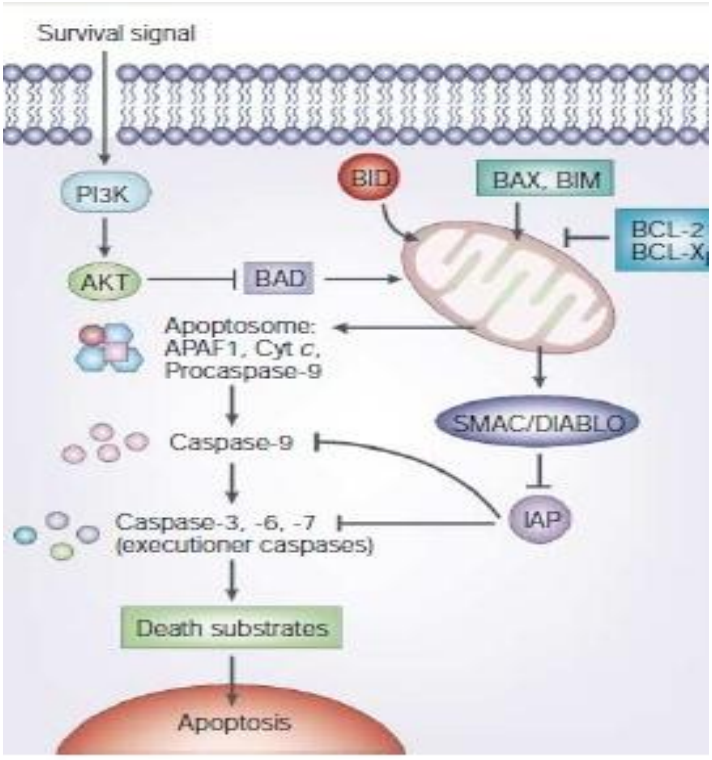
Gambar 8. Aktivasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik (Igney,F.H,2002)

a. Jalur intrinsik

Jalur intrinsik yang mengawali apoptosis melibatkan sejumlah besar stimulus yang tidak dimediasi reseptor *(non-receptor-mediated)* yang menghasilkan sinyal intraseluler yang langsung bereaksi dengan sasaran intrasel dan berkaitan erat dengan mitokonria. Jalur intrinsik

disebabkan oleh peningkatan permiabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma (Ferraro, 2010).

Pengontrolan dan pengaturan proses dan jalur mitokonria dilakukan melalui keluarga protein Bcl-2. Bcl-2 *family* mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi untuk regulasi apoptosis. Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti-apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membran mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan digantikan kelompok protein pro-apoptotis seperti Bad,Bax atau Bid . Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade.* Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c.* Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) dan mengaktifkan *caspase-9*. (Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1). Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade* (Wataguli, 2008).



Gambar 9. Aktivasi apoptosis melalui jalur intrinsik (Igney,F.H,2002)

H. Gen p53

p53 merupakan gen repressor tumor yang penting dalam mengatur apoptosis. Protein p53 berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang meregulasi ekspresi beberapa protein proapoptosis (Bax,Bid maupun anti apoptosis. Diketahui di dalam sel tumor yang kehilangan fungsi gen p53, ditemukan adanya ekspresi Bax yang rendah. Protein p53 diketahui juga dapat menekan ekspresi protein antiapoptosis seperti Bcl-2. Hal ini ditunjukkan pada sel yang kekurangan Bcl-2 ternyata terjadi overekspresi protein p53 (Rumiyati, 2006).

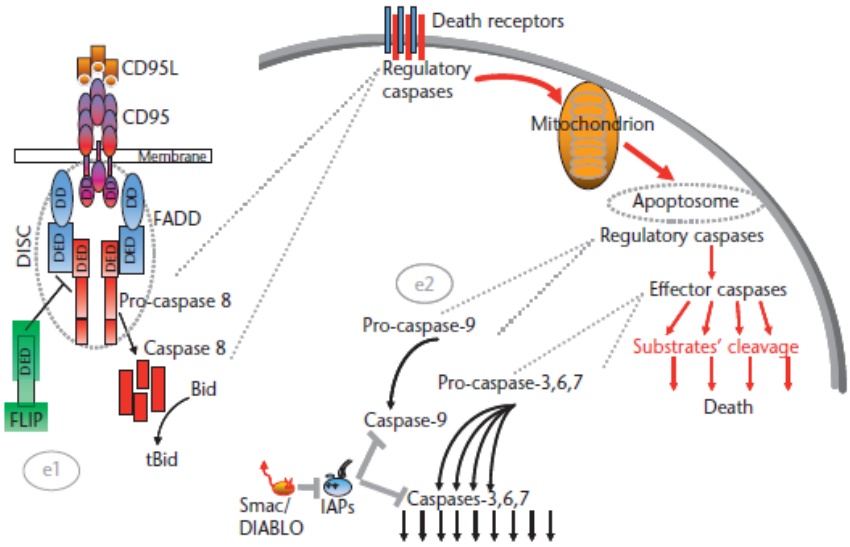
Pengendalian apoptosis dihubungkan dengan gen yang mengatur siklus sel, diantaranya gen p53 ,Rb,myc dan lain-lain. Fungsi produk gen p53 dan Rb terkait erat dengan peristiwa dalam siklus sel pada fase G1. Mekanisme kerja p53 sangat kompleks, dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Dalam beberapa tahun terakhir terungkap bahwa p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis. Sel yang kehilangan p53 baik karena mutasi, infeksi virus atau sebab lain, mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis yang diinduksi oleh khemoterapi, radiasi, kehilangan Rb, ekspresi c-myc dan anoksia. Pada keadaan hilangnya fungsi Rb, siklus sel tetap berlanjut ke fase S, tetapi gen p53 yang aktif akan menginduksi sel tersebut untuk apoptosis (kresno,2011).

I. Caspase

Caspase *(cysteine aspartate-specific protease)* adalah kelompok enzim protease sistein yang berperan penting dalam mengatur dan mengeksekusi kematian sel melalui apoptosis.Di dalam sel, kaspase diekspresikan dalam bentuk zimogen yang tidak aktif dan menjadi aktif melalui proses-proses proteolitik bila di dalam substrat terdapat residu aspartat. Beberapa anggota caspase ini tidak terlibat dalam apoptosis , tetapi lebih berperan dalam proses-proses yang memperantarai sitokin.

Saat ini telah ditemukan 13 anggota famili caspase pada manusia. Beberapa anggota keluarga caspase yang terlibat dalam

apoptosis dibedakan menjadi 2 golongan. Golongan yang pertama terdiri dari 8,9,10 yang mengandung prodomain yang panjang pada terminal N, fungsinya sebagai inisiator dalam proses kematian sel. Golongan yang kedua terdiri dari caspase 3, 6,7 yang mengandung prodomain yang pendek yang berfungsi dan berfungsi sebagai efektor, membelah berbagai substrat yang mati yang pada akhirnya menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia yang tampak pada sel yang mengalami apoptosis (Lorraine, 2010).



Gambar 10. Caspase dan kematian sel (Lorraine, 2010)

Induksi apoptosis melalui reseptor kematian adalah hasil aktivasi dan inisiator caspase seperti caspase 10. Caspase ini kemudian dapat mengaktifkan caspase lain dalam cascade. Cascade ini akhirnya mengarah pada aktivasi caspase efektor seperti caspase 3 dan caspase 6. Caspase ini bertanggung jawab untuk pemecahan kunci protein selular,

seperti protein sitoskeletal, yang mengarah ke perubahan morfologi yang khas yang diamati pada sel yang mengalami apoptosis (Lavrik, 2005).

J. Kanker

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan diferensiasi sel. Sel-sel kanker tumbuh autonom tidak terkendali, kemudian menginvasi jaringan organ disekitarnya yang berakibat fungsi organ tersebut terganggu. Transformasi sel normal menjadi sel kanker terjadi sebagai akibat terganggunya sistem regulasi, akibatnya sel-sel kanker mampu membelah diri menjadi lebih banyak dan tidak menghasilkan pertumbuhan sel-sel progenitor normal (Kresno, 2011).

Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan serta mempunyai cirri-ciri umum sebagai berikut :

a. Mandiri dalam signal pertumbuhan
b. Tidak peka terhadap signal antipertumbuhan
c. Menghindari apoptosis
d. Memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas
e. Angiogenesis
f. Invasi dan metastase ke jaringan lain (Manahan dan Wierberg,2002)

Kanker umumnya disebut dalam kaitannya dengan jenis jaringan tempat mereka muncul. Sebagai contoh, sarkoma menjelaskan istilah tumor yang timbul dari jaringan mesodermal, yang mencakup jaringan ikat atau pendukung tulang, tulang rawan, lemak, otot, dan pembuluh darah. Osteosarcoma mengacu pada kanker tulang, dan karsinoma mengacu pada tumor jaringan epitel seperti membran mukosa dan kelenjar, termasuk kanker ovarium, paru dan payudara. Kanker sumsum tulang sel yang disebut sebagai myelomas dan multiple myeloma (kanker sumsum tulang yang paling umum), sel plasma yang terlibat (Sukardja,2000).

K. Kanker Leher Rahim

Kanker Leher Rahim (*Kanker Serviks*) adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim/*serviks* (bagian terendah dari rahim yang menempel pada puncak *vagina*. Kanker serviks biasanya menyerang wanita berusia 35-55 tahun. 90% dari kanker serviks berasal dari *sel skuamosa* yang melapisi serviks dan 10% sisanya berasal dari sel kelenjar penghasil lendir pada saluran servikal yang menuju ke dalam rahim (Doorbar, 2006).

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. Berbagai patogen berkaitan erat dengan kanker serviks terutama adalah

virus papiloma humanus (HPV), virus herpes simpleks tipe II (HSV II), sitomegalovirus humanus (HCMV) dan klamidia (Desen, 2011).

Infeksi HPV merupakan penyakit ditularkan lewat hubungan kelamin, umumnya asimtomatik, puncak infeksi pada usia 18-28 tahun, umumnya lenyap sekitar 8-10 bulan pasca infeksi, 10-15% wanita usia 35 tahun ke atas karena terus terinfeksi sehingga risiko terkena karsinoma serviks meningkat (Desen, 2011).

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 (Sofyan, 2000).

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. 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 terhadap jaringan yang mengandung sel kanker. Pada stadium selanjutnya, terapi

dilakukan dengan radioterapi, kemoterapi, maupun kemoradioterapi. Jenis terapi ini dapat berpengaruh pada sel normal (Sofyan, 2000).

L. Kultur Sel

Kultur sel merupakan teknik yang biasa dipergunakan untuk mengembangbiakkan sel diluar tubuh (in vitro). Biakan sel atau jaringan ini dimaksudkan untuk mempelajari sifat sel diluar tubuhnya. Kultur sel adalah sel-sel yang berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan secara mekanis atau secara enzimatis menjadi suspensi sel. Suspensi tersebut kemudian dibiakkan menjadi satu lapisan jaringan (monolayer) diatas permukaan yang keras atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh (Alberts, 1994).

Jenis sel atau jaringan yang dikembangkan sebagai kultur yaitu, fibrolast, jaringan rangka (tulang dan tulang rawan), rangka, otot jantung dan mulut, jaringan epitel (seperti hati, paru-paru, dada, kulit, ginjal), sel saraf, sel endokrin, melanosit dan beberapa sel tumor. Pada saat sel diambil dari jaringan atau organisme dan kemudian ditempatkan dalam kultur, media yang digunakan harus memberikan kondisi dimana sel dapat hidup, berpoliferasi dan berdiferensiasi seperti dalam keadaan invivo (Alberts, 1994).

Sel memerlukan media pertumbuhan yang dapat membuat sel dapat bertahan hidup, berkembang dan berdiferensiasi. Jumlah dan kualitas media menentukan jumlah sel yang dapat tumbuhkan dalam

kultur (Malole, 1990). Media yang digunakan untuk menumbuhkan sel yaitu media RPMI 1640 yang mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam organik dan glukosa. Serum mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan. Seluruh komponen dalam media RPMI 1640 berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup agar sel dapat bertahan hidup dan berproduksi (Freshney,2000).

M. Sel Hela

Kultur sel Hela berasal dari jaringan tumor serviks seorang wanita yang bernama Henrietta Lacks yang meninggal pada tahun 1951 di usia 30 tahun. Sel Hela tersebut kemudian menjadi standar laboratorium dan ditumbuhkan di luar tubuh. Sel Hela ini bersifat immortal dan dapat membelah dalam jumlah yang tak terbatas selama kondisi kebutuhan sel terpenuhi (Desaintes, 1999).

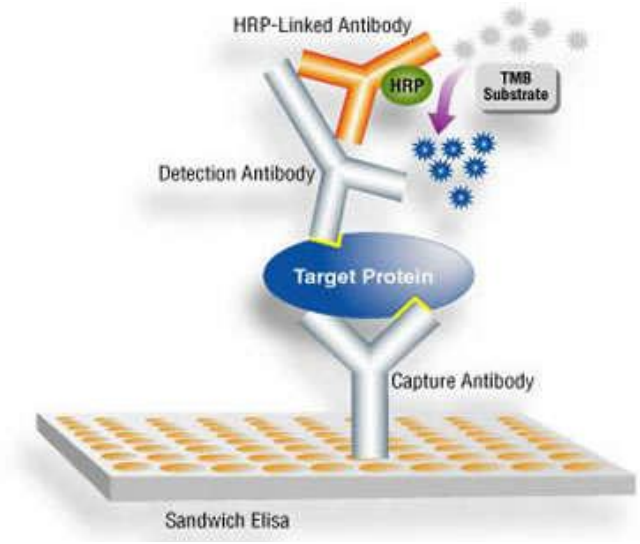
Kultur sel Hela tumbuh sebagai sel yang semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker untuk mempelajari sinyal tranduksi seluler. Disamping itu kultur sel ini juga digunakan untuk tes antitumor, transformasi, uji tumorigenesis, biologi sel dan invasi bakteri. Sel ini secara morfologi merupakan sel epithelial yang sudah terinfeksi *Human Papiloma Virus* (HPV). Sel ini bersifat immortal dan sangat agresif sehingga mudah untuk dikultivasi tetapi sel ini mudah menginvasi kultur sel lain (Doyle A, 2000).

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 (Desaintes, 1999).

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 (Freshney, 2000).

N. *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

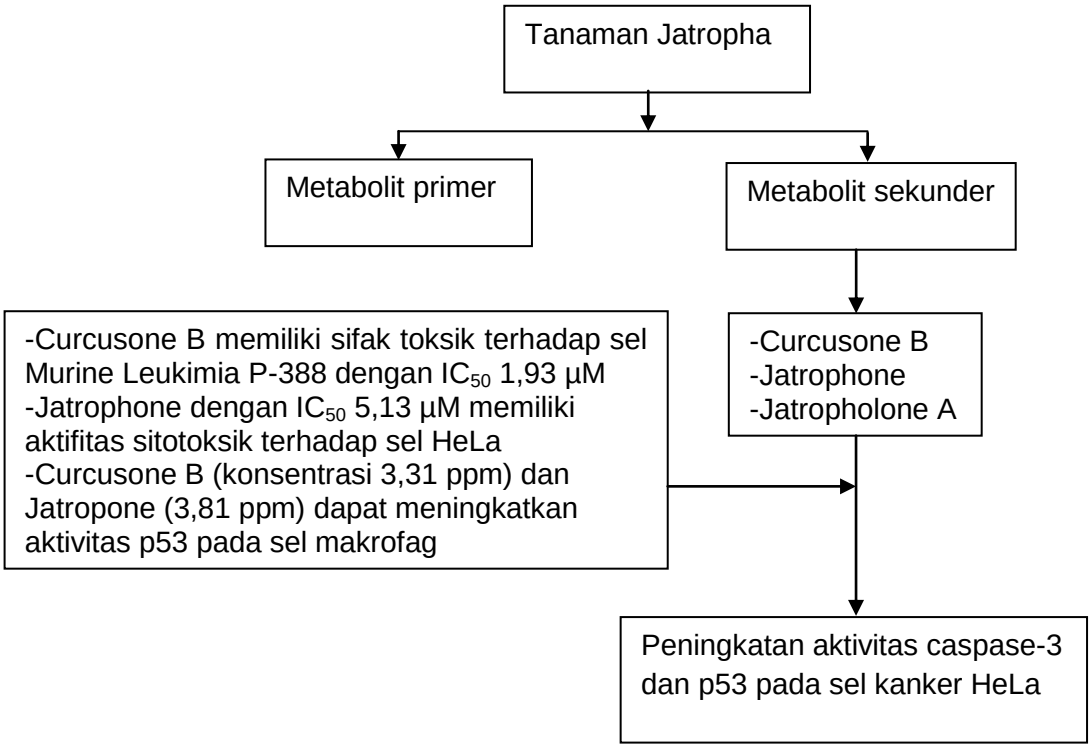
Teknik ELISA adalah cara kuantitatif untuk mengukur antigen yang diendapkan pada permukaan padat dengan mengukur antibodi spesifik yang diikat dengan enzim kovalen. Jumlah antibodi yang diikat antigen sebanding dengan jumlah antigen yang ada dan ditentukan dengan cara spektrofotometris. Perubahan substrat jernih menjadi produk berwarna atas pengaruh enzim yang diikat (Baratawidjaja, 2012).



Gambar 11. Metode Elisa (Kresno, 2010).

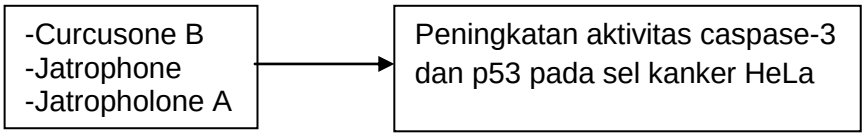
Pada teknik ELISA, harus ada antibodi dan antigen yang dikonjugasikan dengan enzim dan substrat yang sesuai. Enzim yang paling sering digunakan adalah *fosfatase alkali* (AP) dan *horseradish peroksidase* (HRP) sedangkan substrat yang paling sering digunakan adalah *o-phenylenediamine* (OPD) dan *tetramethylbenzidine* (TMB). Hidrolisis substrat oleh enzim biasanya berlangsung dalam waktu tertentu dan reaksi dihentikan dengan menambahkan asam atau basa kuat. Karena banyaknya antibodi berlabel enzim (AB^E) yang terikat pada kompleks Ag-Ab^E sesuai dengan kadar Ag dalam spesimen, maka banyaknya enzim yang terikat pada kompleks dan intensitas warna yang timbul setelah substrat dihidrolisis oleh enzim yang terikat pada kompleks Ag-AbE merupakan ukuran untuk kadar Ag yang diuji. Intensitas warna diukur dengan ELISA reader dan merupakan ukuran untuk kadar antigen yang ada dalam specimen (Kresno, 2010).

O. Kerangka Pikir



Gambar 12. Kerangka Pikir

P. Kerangka Konsep



Gambar 13. Kerangka Konsep