**BAB I**

**PENDAHULUAN**

1. ***Latar Belakang Masalah***

 Kanker adalah penyebab utama kedua kematian di dunia. Secara global diperkirakan 11 juta kasus baru kanker terjadi setiap tahun (National Cancer Institute. 2007). Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Indonesia tahun 2007 menunjukkan bahwa peringkat kematian akibat kanker adalah yang ke-7. Pada tahun 2008 kasus kanker leher rahim masih menduduki peringkat pertama insidensi kanker di Indonesia. Di dunia, setiap dua menit seorang wanita meninggal dunia akibat kanker leher rahim. Fakta-fakta tersebut menyebabkan kanker leher rahim menempati posisi kedua kanker terbanyak pada perempuan di dunia. Pengobatan kanker pada umumnya sama, yaitu salah satu atau kombinasi dari operasi, penyinaran (radioterapi), obat pembunuh sel kanker (sitostatika), meningkatkan daya tahan tubuh dan pengobatan dengan hormon. Hasilnya tentu bergantung pada keadaan pasien dan jenis kanker (Sofyan, 2000).

Pertimbangan penggunaan obat kanker alternatif ditekankan utamanya pada tumbuhan dan herbal. Obat-obat herbal menjadi popular karena penggunaannya untuk mengobati berbagai jenis penyakit dengan efek toksik yang rendah dan efek terapeutik yang lebih baik (Atmakuri, 2010).

Secara empiris, klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) digunakan untuk mengobati kanker rahim oleh masyarakat Sinjai, khususnya masyarakat dusun Bongkong Kabupaten Sinjai Tengah, Sulawesi Selatan. Selain untuk mengobati kanker, tumbuhan ini juga digunakan sebagai penghilang nyeri haid, penghilang bau badan, dan bedak dingin untuk mengencangkan kulit.

Tumbuhan ini telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 229,086 µg/ml (Samrina, 2013). Untuk menambah data ilmiah mengenai manfaat klika anak dara, utamanya dalam menemukan obat kanker alternatif, maka perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas klika anak dara (*croton oblongus* burm f.) terhadap penghambatan sel kanker leher rahim.

1. ***Rumusan Masalah***
2. Apakah ekstrak klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) memiliki aktivitas penghambatan terhadap sel kanker leher rahim?
3. Berapakah nilai IC50 ekstrak klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.)?
4. ***Tujuan Penelitian***
5. Mengetahui aktivitas klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) terhadap penghambatan sel kanker leher rahim
6. Mengetahui nilai IC50 ekstrak klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.)
7. ***Manfaat Penelitian***
8. Memberikan data ilmiah mengenai aktivitas klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) terhadap penghambatan sel kanker leher rahim
9. Pemanfaatan tumbuhan klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) sebagai salah satu alternatif pengobatan kanker leher rahim

**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

1. **Kanker**

Kanker didefenisikan sebagai penyakit dimana sel-se abnormal membelah tanpa control dan mampu menyerang jaringan lain. Saat ini, kanker merupakan penyebab kematian nomor satu di Amerika Serikat untuk orang-orang dengan usia dibawah 75 tahun (Mbeunkui dan Johann, 2009). Setiap tahun, lebih dari 11 juta orang didiagonis dengan penyakit kanker di seluruh dunia dan kemungkinan bias meningkat sampai 16 juta pada tahun 2020. Pada tahun 2005, kanker dicatat sebagai penyebab 7,6 juta kematian dari total 58 juta kematian di seluruh dunia (Jemal et al., 2011).

Perkembangan sel-sel kanker akibat kerusakan DNA umumnya disebabkan oleh faktor eksternal (bahan kimia, virus, asap rokok, radiasi, paparan sinar matahari yang terlalu banyak dan infeksi) dan faktor internal (metabolisme mutasi yang diturunkan, hormon, dan kondisi kekebalan tubuh). DNA yang rusak atau berubah,akan memproduksi mutasi yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembelahan sel normal, sel-sel yang seharusnya mati tetap hidup dan sel-sel baru terbentuk meskipun tubuh tidak membutuhkannya. Penyebab kerusakan DNA, meskipun belum dapat dijelaskan dengan tepat, dapat dikaitkan dengan aktivasi telomerase yang ditemukan oleh Carol W. Greider dan Elizabeth Blackburn pada tahun 1984 yang diberikan hadiah nobel dalam Fisiologi atau Kedokteran tahun 2009. Untuk sel-sel normal, telomer, yang terdapat di ujung kromosom, akan diperpendek setelah tiap siklus replikasi yang mengakibatkan kematian terprogram (apoptosis) sel. Sedangkan untuk sel-sel kanker, adanya telomerase yang merupakan enzim yang menambah pengulangan urutan DNA pada ujung 3’ dari untai DNA di daerah telomer, telomer akan diperpanjang dan tidak akan diperpendek setelah replikasi sel. Akibatnya, sel-sel kanker akan menjadi abadi (Blackburn, 2005). Selanjutnya, sel-sel tambahan dapat membentuk suatu massa dari pertumbuhan jaringan abnormal di sekitar pembuluh darah yang disebut tumor. Diantara tumor, tumor jinak bukanlah kanker, kebanyakan dapat dihilangkan dan dalam banyak kasus tidak muncul kembali. Sel-sel dalam tumor jinak tidak menyebar ke bagian lain dari tubuh. Tetapi tumor ganas adalah kanker, dimana sel-selnya dapat menyerang jaringan sekitar dan menyebar ke bagian lain dari tubuh. Proses penyebaran sel kanker dari satu bagian tubuh ke bagian yang lain melalui aliran darah atau system getah bening dimana mereka mulai tumbuh dan menggantikan jaringan normal disebut metastatis (Klein, 2008).

1. **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 menunjukan 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 (Sjamsuddin, 2001).

Berdasarkan penelitian Sjamsuddin (2001), disimpulkan bahwa 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.

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.

1. **Uji Sitotoksik**

Uji sitotoksisitas 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.

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 (Doyle and Griffiths, 2000).

1. **Tumbuhan Klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm F.)**
2. Klasifikasi

 Regnum : Plantae

 Divisi : Spermatophyta

 Sub Divisi : Angiospermae

 Kelas : Dicotyledonea

 Ordo : Euphorbiales

 Famili : Euphorbiaceae

 Genus : Croton

 Spesies : *Croton oblongus* Burm f.

1. Deskripsi

 Tumbuhan bawah pohon sampai 19 m dan 26 cm dbh. Stipula sangat sempit 4 mm. Daun alternatif, sederhana, Penni-berurat, berbulu, tangkai daun dengan dua kelenjar mencolok dekat pangkal daun. Bunga ca. 3 mm diameter, kehijauan-putih, ditempatkan dalam tandan bunga jantan dengan bunga-bunga atas dan perempuan di bagian pangkal. Buah ca. 5 mm, kehijauan, pecah, berkutil, 3-lobed kapsul. Habitus: perdu tinggi ± 3 m; batang : bulat, berkayu, keras, bercabang, coklat pucat; daun: lonjong (oblongus) ujung meruncing, panjang ±10-15 cm lebar ± 5-7 cm; Bunga : majemuk, bentuk tandan.

1. Kandungan Kimia

Adapun kandungan kimia yang terdapat pada tanaman korteks kayu anak dara yaitu flavanoid, tanin, minyak atsiri, fenol, diterpenoids termasuk pimarane, kaurane, labdane, cembrane, cleisthantane, dan diterpenoids clerodane,

1. Kegunaan

Etno farmakologi ; antiaging, penghilang bau badan, penghilang nyeri haid dan mengobati kanker (Khanitha Pudhom, 2011).

1. **Kerangka Konseptual**

Penyebab utama kedua kematian di dunia

Kanker

Peringkat pertama insidensi kanker di Indonesia

Kanker Leher Rahim

Efek samping besar

Terapi Antikanker

Efek toksik rendah

Obat Kanker Alternatif

Secara empiris digunakan untuk mengobati kanker

Klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm F.

Data Ilmiah sebagai salah satu obat kanker alternatif

Uji Aktivitas Terhadap Penghambatan Sel Kanker Leher Rahim

**BAB III**

**METODOLOGI PENELITIAN**

## Jenis dan Lokasi Penelitian

### Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif.

### Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar dan Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada. Dimulai pada bulan April 2014.

## Pendekatan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium.

## Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, rotavapor, vakum eksikator, ELISA reader, hemasitometer, inkubator CO2, Laminar Air Flow(LAF), membran non pirogenik, mikroplate 96 sumuran, mikropipet, *microscope inverted*, otoklaf, pH meter, pipet Pasteur, syringe filter 0,2 µm, tabung konikal steril, timbangan analitik, dan botolkultur 75 cm2.

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah klika anak dara (*Croton oblongus* Burm F.) yang diambil di Kabupaten Sinjai, heksan, methanol, etanol 70%, aseton, polioksietilen- polioksipropilen (F68), sel kanker HeLa, media RPMI 1640 dengan *foetal bovine serum* (FBS) 10%, MTT {[*3-*(*4,5-dimetil tiazol 2-yl*)*-2,5-difenil tetrazolium bromida*]}, Hepes (*N-2-hydroxyethilpiperazine-2-ethanesulfonic acid*), HCl, Natrium bikarbonat (NaHCO3), penisilin-streptomisin 2%, fungizon 0,5%, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS).

## Pengolahan Sampel

Klika anak dara dicuci bersih lalu dikeringkan, setelah kering, lalu diserbukkan. Klika yang telah diserbukkan diekstraksi secara maserasi bertingkat dengan heksan, proses maserasi diulangi sampai filtrat menjadi bening. Ampas kemudian diekstraksi kembali dengan menggunakan metanol, dan terakhir ampas diekstraksi dengan etanol 70%. Filtrat dikumpulkan lalu diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental kemudian dikeringkan di dalam vakum eksikator.

## Uji Aktivitas Penghambatan Sel Kanker Leher Rahim (sel HeLa)

1. **Pembuatan Medium Pencuci (RPMI 1640)**

 Medium RPMI 1640 dilarutkan dalam aquades sebanyak 800 ml, ditambah 2 g Natrium Bikarbonat dan 2 g Hepes kemudian ditambahkan aquades hingga 1 L, lalu distirer hingga homogen selama 10 menit. Medium ditambahkan HCl 1N hingga pH medium 7,2-7,5. Medium lalu disterilkan dengan penyaringan menggunakan membran filter polietilen sulfon steril berdiameter 0,22 µm secara aseptik.

1. **Pembuatan Medium Penumbuh**

Medium penumbuh dibuat dengan cara mencampurkan 200 ml larutan RPMI 1640 dengan 20 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 4 ml Penisilin-Streptomisin dan 1 ml Fungizon. Medium lalu disterilkan dengan penyaringan menggunakan membran filter polietilen sulfon steril berdiameter 0,22 µm secara aseptik. Baik medium pencuci maupun medium penumbuh disimpan pada suhu 4ºC.

1. **Penumbuhan Sel dari Tangki Nitrogen Cair (*Cell Thawing*)**

Medium disiapkan 3 ml dalam *conical tube* steril, sel HeLa dalam ampul (*cryo tube*) diambil dari tangki nitrogen cair, lalu dicairkan pada suhu kamar, tepat setelah mencair suspensi sel diambil dengan mikropipet, lalu dimasukkan ke dalam *conical tube*. Suspensi sel disentrifugasi pada 1500 rpm selama 5 menit. Pencucian dilakukan sekali lagi, kemudian supernatan dibuang. Pellet ditambah 1 ml medium penumbuh lalu diresuspensi hingga homogen, kemudian sel dalam beberapa tissue culture flask kecil, diinkubasi dalam inkubator suhu 37ºC dengan aliran 5% CO2 selama 24 jam. Setelah 24 jam medium diganti dan sel ditumbuhkan hingga *konfluen*.

1. **Pemanenan Sel**

Medium dibuang, kemudian flask dicuci dengan PBS, lalu ditambah tripsin secukupnya kemudian inkubasi dalam inkubator suhu 37ºC dengan aliran 5% CO2 selama 5-10 menit. Selanjutnya, ditambah medium secukupnya lalu dituang ke dalam *conical tube* steril, kemudian dihitung jumlah sel dengan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah sejumlah medium hingga diperoleh konsentrasi sel 2 x 104 sel/100 µl medium dan sel siap dipakai untuk pengujian.

1. **Penyiapan Sampel Uji**

Disiapkan ekstrak klika anak dara dengan konsentrasi yang berbeda. Masing-masing sampel dibuat seri sebanyak 20 µg/ 100 µl sel, 40 µg/ 100 µl sel, 80 µg/ 100 µl sel, 100 µg/ 100 µl sel, 160 µg/ 100 µl sel, 200 µg/ 100 µl sel; dimasukkan ke dalam sumuran yang berbeda untuk pengujian terhadap sel HeLa.

1. **Pengujian Sampel dengan Metode MTT**

 Suspensi sel sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam 96 well-plate, kecuali kontrol medium tidak berisi suspensi sel, lalu diinkubasi dalam inkubator suhu 37ºC dengan aliran 5% CO2 selama 24 jam. Setelah 24 jam, sel diamati di bawah mikroskop. Dilakukan inkubasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Setelah inkubasi 24 jam, semua isi 96 well-plate dibuang, lalu semua sumuran diisi dengan 10 µl larutan MTT dan 100 µl medium, lalu diinkubasi 4 jam. Setelah inkubasi, ditambahkan 100 µl SDS 10%, lalu dibiarkan 24 jam pada suhu kamar, selanjutnya dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm, sehingga diperoleh data nilai absorban dari semua perlakuan. Hal demikian berlaku untuk perlakuan inkubasi 48 jam dan 72 jam.

1. **Analisis Data**

 Semua data pengamatan yang telah terkumpul diolah dan dihitung persentase kematian sel dengan rumus :

(∆ kontrol sel – ∆ kontrol media) – (∆ sampel – ∆ kontrol media)

% Kematian =

X 100%

(∆ kontrol sel – ∆ kontrol media)

**BAB IV**

**DAFTAR PUSTAKA**

Atmakuri, L.R. and Dathi, S. 2010. Current Trends in Herbal Medicines. *J. Pharm Res*. 3(1): 109-113.

Blackburn, E.H. 2005. Telomeres and Telomerase: Their Mechanisms of Action and The Effects of Altering Their Functions. *FEBS Lett.* 579: 859-862.

Doyle, A., dan Griffiths, J.B. 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research, John Wiley and Sons.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin*. 61: 69-90.

Klein, C.A. 2008. Cancer: The Metastasis Cascade. *Science*. 321: 1785-1787.

Mbeunkui, F., and Johann, D.J. 2009. Cancer and The Tumor Microenvironment: A Review of an Essential Relationship, Cancer Chemother. *Pharmacol*. 63: 571-582.

National Cancer Institute. 2008. *The Nation’s Investment in Cancer Research: A Plan and Budget Proposal for Fiscal Year 2008*, (Online), (<http://plan.cancer.gov/science.shtml>, diakses 4 Desember 2011).

Pudhom, K. dan Damrong Summit. 2011. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from Croton oblongifolius. *Phytochemistry Letter*. 4: 147-150.

Samrina. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Klika Anak Dara (*Croton Oblongus* Burm F) Terhadap 1,1 Diphenyl-2-Picrylehidrazil (DPPH).(Skripsi). Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan. UIN Alauddin Makassar.

Sjamsuddin, S. 2001. Pencegahan dan Deteksi Dini Kanker Serviks, *Cermin Dunia Kedokteran*. 133: 8-13.

Sofyan, R. 2000. Terapi Kanker pada Tingkat Molekuler. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*. 127: 5-10.