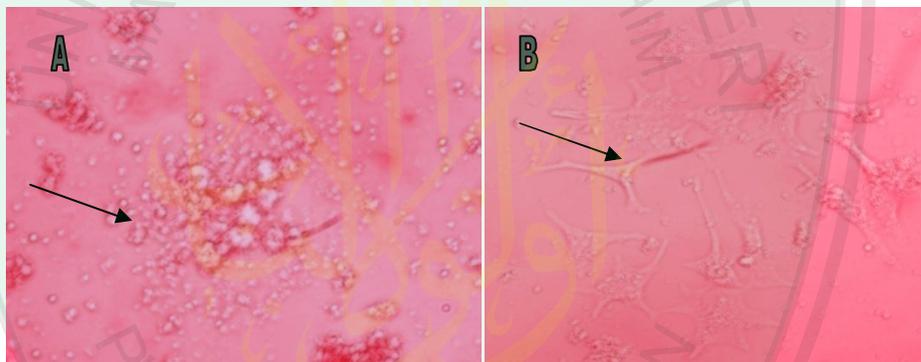


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Respon Kultur Primer Sel Otak *Baby* Hamster yang dipapar Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)

Pemberian DMBA dengan konsentrasi 0,1 μ g/ml pada kultur primer sel otak *baby* hamster selama 48 jam mengalami adanya perubahan morfologi pada sel tersebut dan konfluen yang lebih cepat dibandingkan dengan sel otak tanpa perlakuan DMBA, hal tersebut merupakan gejala awal dari karsinogenesis, seperti tampak pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 A. Kultur Primer Sel Otak *Baby* Hamster dengan perlakuan DMBA umur 1 hari. B, Kultur Primer Sel Otak *Baby* Hamster dengan perlakuan DMBA umur 2 hari.

Berdasarkan gambar di atas menunjukkan pemberian DMBA dengan konsentrasi 0,1 μ g/ml mengalami perubahan morfologi yaitu sel mengalami abnormalitas bentuk dan sel lebih cepat konfluen. Campbell (2002) menjelaskan bahwa sel normal yang telah diberi karsinogen akan mengalami perubahan morfologi dan sel tersebut menutupi seluruh cover disk. Menurut Susilowati (2010) proses perkembangan sel normal menjadi sel kanker disebut karsinogenesis. Salah satu

faktor terbentuknya kanker kerana adanya sel epitel yang terus berkembang (berproliferasi). Saat berproliferasi, genetik sel bisa berubah akibat adanya pengaruh agen karsinogen yang menyebabkan hilangnya penekanan terhadap proses proliferasi sel. Perubahan sel menjadi ganas juga melibatkan gen-gen yang mengatur pertumbuhan sel, akibatnya sel berkembang tidak terkendali

Abnormalitas sel terlihat adanya perbesaran bentuk sel. Menurut Freshney (2005) sel raksasa atau *giant cell* adalah sel yang mengalami perubahan dari volume selnya, DNA, RNA serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat dari pada sel normal. Perubahan morfologi tersebut disebabkan karena sel normal yang dipapar DMBA mengalami perubahan pada DNA.

Miyata (1999) menjelaskan bahwa metabolit aktif dari DMBA adalah DMBA-3,4-*diol*-1,2 *epoxides* yang mampu membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa *epoxide* tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksiguanosin (dG) pada DNA. Interaksi ini (DNA *adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan iniasi kanker

Metabolisme senyawa DMBA pada sel hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom p-450 untuk membentuk ikatan kovalen dengan DNA pada sel yang aktif membelah sehingga menyebabkan DNA *adduct*. Keberadaan karsinogen ini umumnya mengakibatkan mutasi gen *ras* dan meningkatkan ekspresi Ras dan fos. Senyawa ini

tergolong *indirect acting carcinogen* atau prokarsinogen yang memerlukan aktivasi metabolik (Ranasasmita, 1997).

Sitokrom P450 merupakan suatu *monooksidase dependen retikulum endoplasmik* yang mengubah karsinogen *proximate* menjadi karsinogen *intermediate* yang kekurangan elektron dan bersifat reaktif (*electrophilic*). *Intermediate* yang reaktif ini dapat berinteraksi dengan bagian DNA yang kaya elektron (*nucleophilic*) untuk menimbulkan mutasi. Interaksi antara karsinogen akhir dengan DNA dalam suatu sel diduga merupakan tahap awal terjadinya karsinogenesis kimiawi (Santoso, 1989).

Proses pembentukan kanker merupakan sekumpulan perubahan pada sejumlah gen yang terlibat dan berperan dalam sistem sinyal sel, pertumbuhan, siklus sel, differensiasi, dan respon atau perbaikan terhadap kerusakan pada DNA. Dalam sel kanker, banyak gen yang berbeda mengalami perubahan baik pada struktur atau jumlah dalam ratusan bahkan ribuan gen yang dapat diekspresikan secara berbeda (Alatas, 2007). Dasar perubahan seluler yang menyebabkan terjadinya kanker (karsinogenesis) adalah adanya perubahan basa DNA dan sel target yang biasa dikenal dengan mutasi (King, 2000).

Salah satu abnormalitas *phenotypic* yang sering patognomonis pada semua sel kanker adalah terjadinya disregulasi pada kontrol siklus sel dimana sel kanker akan bereplikasi lebih cepat dibanding sel normal. Timbulnya pertumbuhan yang tidak normal pada kanker disebabkan karena dua faktor yaitu kurangnya respons kontrol terhadap signal yang biasanya secara normal menyebabkan sel akan berhenti untuk

Dewasa ini pola makan manusia mengalami ketidakseimbangan, banyak sekali makanan cepat saji, bahan pengawet, penyedap, pewarna dan zat additive lain yang dapat membahayakan tubuh manusia, dengan adanya tambahan- tambahan tersebut maka banyak sekali penyakit yang menyerang tubuh. Salah satunya yaitu kanker, zat additive yang sering tercampur dalam makanan akan mengakibatkan proliferasi sel yang berlebih sehingga banyak orang yang mengalami penyakit kanker.

4.2 Hasil Presentase Konfluenitas Kultur Primer Sel Otak *Baby Hamster* yang Dipapar Dimetilbenz(*a*)antrasen dengan Pemberian Rebusan Daun Sirsak.

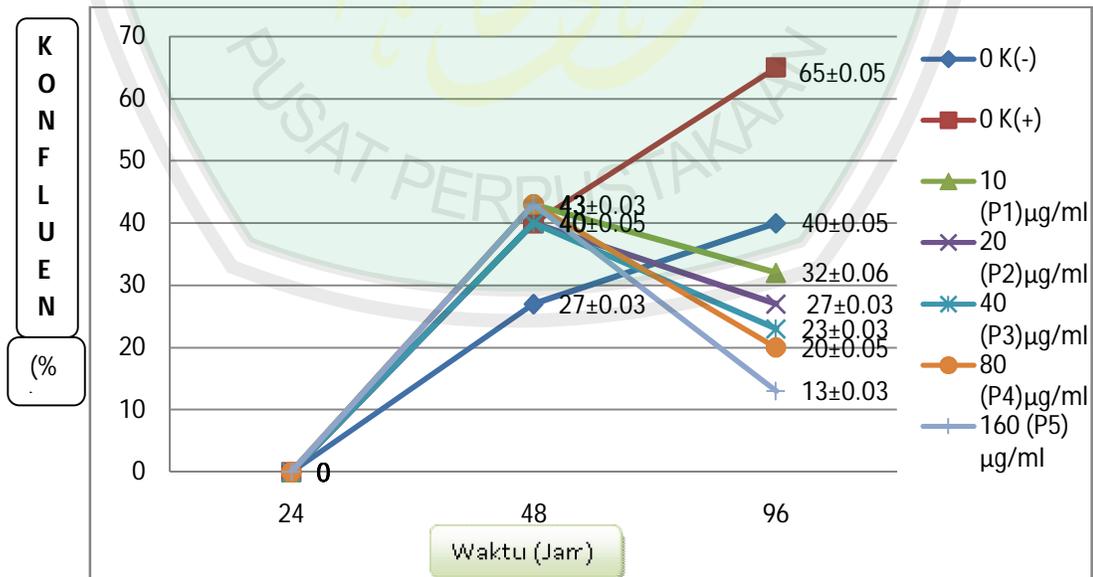
Berdasarkan hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa ada perbedaan pertumbuhan sel otak normal, yang dipapar DMBA dan sel otak yang dipapar DMBA yang diberi perlakuan rebusan daun sirsak terhadap presentase konfluen. Semakin tinggi konsentrasi pemberian rebusan daun sirsak, presentase konfluen semakin rendah sehingga pertumbuhan sel mengalami penurunan.

Tabel 4.1 Presentase Konfluen Kultur Primer Sel otak *Baby Hamster* yang dipapar DMBA yang diberi Rebusan Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

No.	Perlakuan	Rata- rata konfluen (%) \pm SD		
		24 jam	48 jam	96 jam
1.	K(-)	Masih menempel	27 \pm 0.03	40 \pm 0.05
2.	K(+)	Masih menempel	40 \pm 0.05	65 \pm 0.05
3.	P1	Masih menempel	43 \pm 0.03	32 \pm 0.06
4.	P2	Masih menempel	40 \pm 0.05	27 \pm 0.03
5.	P3	Masih menempel	40 \pm 0.05	23 \pm 0.03

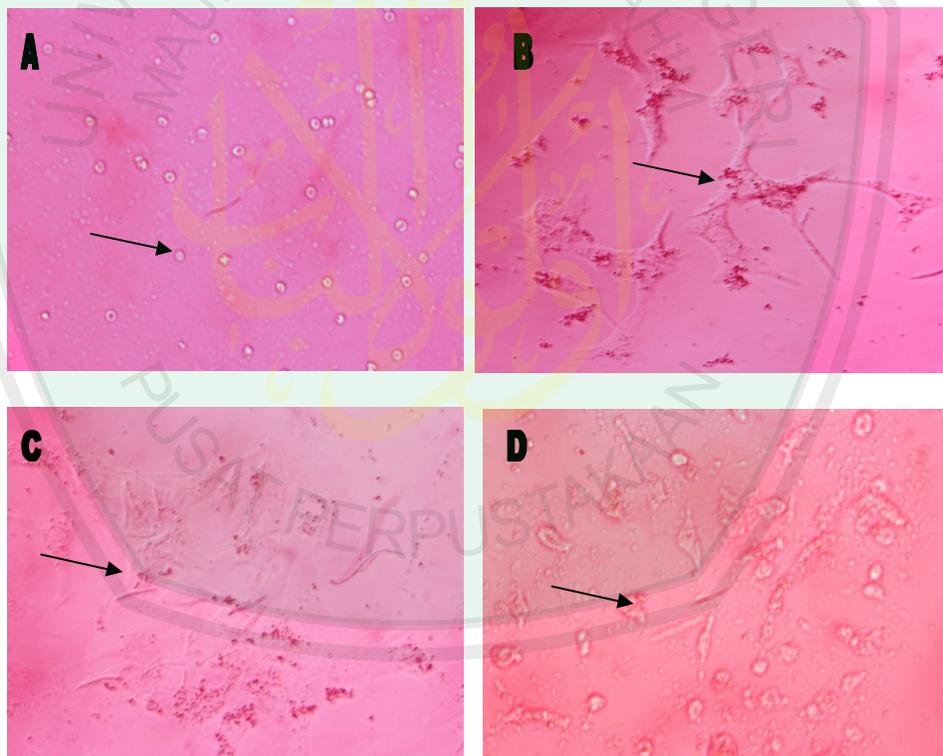
6.	P4	Masih menempel	43 ± 0.03	20 ± 0.05
7.	P5	Masih menempel	43 ± 0.03	13 ± 0.03

Hasil analisis data yang tercantum pada table 4.1 menunjukkan bahwa persentase konfluen pada jam ke 24 pada semua perlakuan menunjukkan masih menempel pada wellnya. Sedangkan pada jam ke-48 persentase konfluen lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan yang diberi DMBA. pada jam ke 96 presentase konfluen pada perlakuan yang diberi rebusan daun sirsak lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol (-) dan Kontrol (+). Hal tersebut menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak mampu menurunkan presentase konfluen kultur primer sel otak *baby hamster* yang dipapar dengan DMBA, lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar grafik 4.2



Gambar 4.2 Grafik Rataan Konfluen Kultur Primer Sel Otak *Baby Hamster* yang dipapar DMBA yang diberi Rebusan Daun Sirsak

Kultur sel pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat sitotoksitas suatu senyawa pada daun *Annona muricata* terhadap sel kanker otak. Kultur primer sel otak *baby* hamster yang berumur 3 hari ini ditumbuhkan dalam medium DMEM yang mengandung 10% serum. Pemberian serum 10% ini bertujuan untuk menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas seluler yang melibatkan hormon dan faktor pertumbuhan, meningkatkan adhesi seluler melalui protein spesifik dan menyediakan protein transport berupa hormon, mineral dan lipid (Freshney, 2002).



Gambar 4.3 (→) Kultur Primer sel otak *baby* hamster (Perbesaran 100x) (A. sel otak umur 1 hari , tampak sel sudah menempel pada substrat tetapi belum berlekatan satu sama lain. (B. sel otak *baby* hamster umur 4 hari sudah menempel dan sudah konfluen 40%, tampak sel saling berlekatan dengan sel yang lain.(C. sel otak yang dipapar DMBA, menunjukkan sel sudah

menempel 45%. (D. Sel otak yang dipapar DMBA yang diberi Rebusan daun sirsak, menunjukkan sel- sel tidak berikatan satu dengan yang lain.

Berdasarkan gambar 4.3 menunjukkan bahwa pada jam ke 24 jam sel telah melekat pada substratnya. Menurut Trenggono (2009) pada kultur sel yang berasal dari disgregasi jaringan, sel yang tumbuh dan melekat pada substrat merupakan hasil seleksi dari sel- sel yang ada, sifat dari kultur sel primer yaitu dapat bertahan hidup setelah dilakukan disgregasi dan memiliki sifat adhesive, yaitu mampu melekat pada substrat.

Sedangkan pada hari ke-4, kultur primer sel otak *baby* hamster telah mengalami konfluen 40%, hasil tersebut menunjukkan bahwa sel telah mengalami pertumbuhan tahap log phase (fase eksponensial) yaitu fase dimana sel mengalami peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen. Sedangkan pada gambar D, sel telah mengalami pelepasan ikatan antar sel, hal tersebut menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak mampu menghambat pertumbuhan sel kanker.

Membran sel yang melekat pada substrat yang banyak mengandung integrin. Integrin- integrin ini mengakibatkan substrat tau materi ekstrasel yang melapisi substrat dengan sitoskeleton. Perlekatan sel dengan substratnya secara *in vitro* disebut *focal contact*, beberapa waktu setelah sel ditetaskan ke dalam cawan, sel- sel akan mulai menempel pada permukaan cawan yang menjadi substratnya. Penempelan ini akan dilanjutkan dengan pembentukan juluran- juluran sel. Terbentuknya juluran yang semakin panjang perlekatan sel dengan substrat menjadi semakin kuat. Sel

selanjutnya akan memipih dan melebar (*spreading*) diatas permukaan substrat. Proses perlekatan dengan substrat dan “*spreading*” sel melibatkan perubahan organisasi sitoskeleton dan protein- protein membran. Pada saat membrane sel mulai menempel pada substrat, protein- protein integrin dan mikrofilamen akan menyusun diri membentuk *focal contact* di tempat membran menempel pada substrat (Istanti, 1999).

Faktor yang berperan dalam keberhasilan pertumbuhan sel secara *in vitro* antara lain lingkungan kultur. Kondisi dan pengaturan lingkungan kultur terdiri atas substrat, medium, gas, dan suhu. Komposisi medium dapat mempengaruhi arah pertumbuhan sel yang dikultur. Medium yang dibutuhkan dalam kultur pada umumnya membutuhkan bahan-bahan tambahan yang sesuai untuk tipe sel tertentu (Freshney, 2005).

Bahan-bahan tambahan tersebut antara lain asam amino, vitamin, garam-garaman, glukosa, suplemen organik, hormon dan *growt factor*, antibiotik serta serum (Riris, 2008). Pada penelitian ini, sel ditumbuhkan dalam medium DMEM, DMEM mengandung konsentrasi asam amino dua kali lipat lebih banyak dari *Eagle's Minimal Essential Medium* (MEM), empat kali vitamin, dan mengatur konsentrasi HCO₃ dan CO₂ (Freshney, 2005).

Hasil Pengamatan menunjukkan kultur sel otak *baby hamster* setelah mengalami konfluen berbentuk seperti sel fibroblast. Trenggono (2009) menjelaskan bahwa Sel glia yang berasal dari mencit dan manusia dalam kultur *in vitro* tumbuh seperti fibroblast yang multipolar. Sel glia mampu menjalankan serangkaian pembelahan mitosis sehingga jumlah sel glia dalam kultur bertambah dan jumlah sel

glia lebih banyak dari jumlah sel saraf. Ukuran sel menjadi semakin kecil pada setiap pembelahan sehingga mencapai suatu konfluenitas sel pada Tc Disk.

Juwita (2005) mengemukakan bahwa persentase konfluen dapat diketahui hasilnya dengan mengamati sel yang menempel pada dasar TC disk. Pada penelitian yang dilakukan perbedaan yang ada pada kedua perlakuan disebabkan karena perbedaan DMBA yang ditambahkan. DMBA berdasarkan yang dikemukakan oleh Syukri (2008) merupakan karsinogen yang cukup poten dan secara luas telah digunakan untuk menginduksi terjadinya kanker yang mempunyai kemampuan untuk menstimulasi proliferasi sel secara berlebih (kanker).

Sedangkan Waymout (1972) menambahkan bahwa Sel otak mampu berkembang menjadi sel neuron dan neuroglia, hal ini dikarenakan faktor media yang paling kompleks dalam mengontrol dan memenuhi kebutuhan gizi sel. Selain itu media kultur juga memiliki faktor pertumbuhan yang diperlukan seperti pH, osmolaritas, pertukaran O₂ dan CO₂. Sebenarnya yang mengalami kemampuan untuk terus membelah atau berproliferasi adalah sel neuroglia atau bisa disebut sel glia, hal tersebut sesuai dengan pernyataan Soewolo (2000) bahwa sel- sel glia memiliki kemampuan membelah diri, oleh karena itu kebanyakan tumor otak berasal dari sel- sel glial (gliomas), sedangkan sel- sel saraf telah kehilangan kemampuannya untuk membelah diri.

Sel akan mengalami proliferasi kemudian akan mengalami apoptosis atau mati. Setiap sel memiliki siklus sel tertentu sehingga menyebabkan keseimbangan antar sel, baik sel itu sendiri maupun dengan sel yang lain. Sel- sel tersebut akan

berkumpul membentuk jaringan sampai membentuk suatu individu baru. Semua peristiwa tersebut telah diatur oleh Allah SWT dengan keadaan yang kompleks, sehingga manusia bisa memanfaatkan fenomena tersebut untuk dipelajari. Allah berfirman dalam surat An-Nuh ayat 13-14 :

مَا لَكُمْ لَا تَرْجُونَ لِلَّهِ وَقَارًا ﴿١٣﴾ وَقَدْ خَلَقَكُمْ أَطْوَارًا ﴿١٤﴾

Artinya :” Mengapa kamu tidak percaya akan kebesaran Allah? padahal dia Sesungguhnya Telah menciptakan kamu dalam beberapa tingkatan kejadian.”

Pertumbuhan sel dalam sistem kultur terdiri 3 fase yaitu *Lag Phase*, *Log Phase* dan *Plateu Phase*. Pada *Lag Phase* konsentrasi sel adalah sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada saat subkultur. Fase ini disebut juga dengan fase adaptasi atau fase lambat, yaitu fase sel yang meliputi pelekatan pada substrat dan penyebaran sel. *Log Phase* merupakan fase terjadinya peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen, proliferasi akan terhenti setelah 1 atau 2 siklus berikutnya. Fraksi pertumbuhan pada fase ini mencapai 90-100%. *Plateu Phase* merupakan fase terjadinya penurunan dan berkurangnya kemampuan sel untuk tumbuh apabila sel telah mencapai konfluen. Pada fase ini fraksi pertumbuhan akan mencapai 0-10% (Budiono, 2002).

Konfluen diketahui hasilnya dimulai dari hari ke 0 sampai sel menempel pada dasar dan menutupi luas permukaan *cover glass*.. Waktu koenfluen ditunjukkan dengan ditemukannya jumlah sel yang paling banyak di antara hari-hari tersebut (Juwita, 2005).

4.3 Hasil Pengujian Sitotoksitas Rebusan Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap Kultur Primer Sel Otak *Baby* Hamster yang dipapar DMBA.

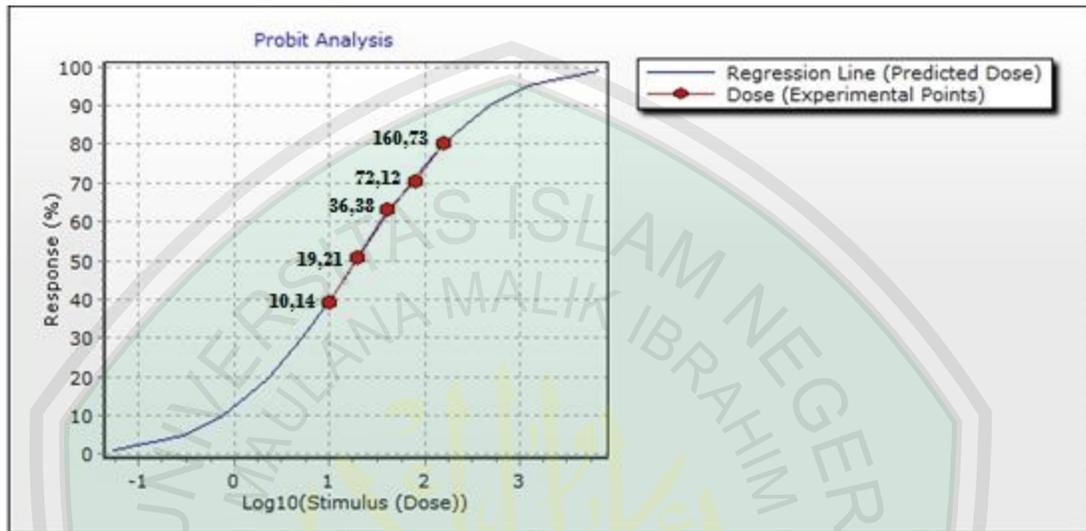
Berdasarkan uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung menggunakan tripan Blue 0.4% melalui uji Analisis Probit didapatkan nilai LC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian sel) sebesar 19,21 µg/ml setelah inkubasi 48 jam.

Table 4.2 Data Nilai LC₅₀ Kematian Sel Otak yang dipapar DMBA dengan Pemberian Rebusan Daun Sirsak

Dose (Stimulus) Percentile	Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error
	1	2.6732	-1.2672	0.3563	0.0541	0.0495
	5	3.3548	-0.52	0.2655	0.302	0.1963
	10	3.7183	-0.1215	0.2174	0.7559	0.3945
	16	4.0056	0.1935	0.1799	1.5612	0.6654
	20	4.1585	0.3611	0.1602	2.2969	0.8664
	25	4.3258	0.5445	0.1389	3.5036	1.1397
	30	4.476	0.7092	0.1202	5.1188	1.4349
	40	4.7471	1.0063	0.0883	10.147	2.0765
	50	5	1.2836	0.0632	19.2142	2.8076
	60	5.2529	1.5609	0.0504	36.3839	4.2331
	70	5.524	1.8581	0.0598	72.1235	9.957
	75	5.6742	2.0227	0.0728	105.3718	17.7426
	80	5.8415	2.2061	0.0905	160.73	33.7331
	84	5.9944	2.3738	0.1083	236.4777	59.5766
	90	6.2817	2.6888	0.1438	488.3823	164.6833
	95	6.6452	3.0872	0.1906	1,222.4746	553.8562
	99	7.3268	3.8344	0.2805	6,830.27	4,723.8392

Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa pemberian rebusan daun sirsak mampu memberikan pengaruh terhadap jumlah kematian sel otak yang dipapar dengan DMBA dengan nilai LC₅₀ 19,21 µg/ml setelah inkubasi 48 jam, hal tersebut menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak bersifat sangat toksik terhadap sel otak yang dipapar dengan DMBA. Pada tabel tersebut juga dijelaskan bahwa sel yang mengalami kematian 90% memiliki nilai *Lethal Concentration* sebesar 488.38

$\mu\text{g/ml}$, hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi kematian sel maka konsentrasi yang diberikan juga semakin tinggi, seperti tampak pada gambar 4.4

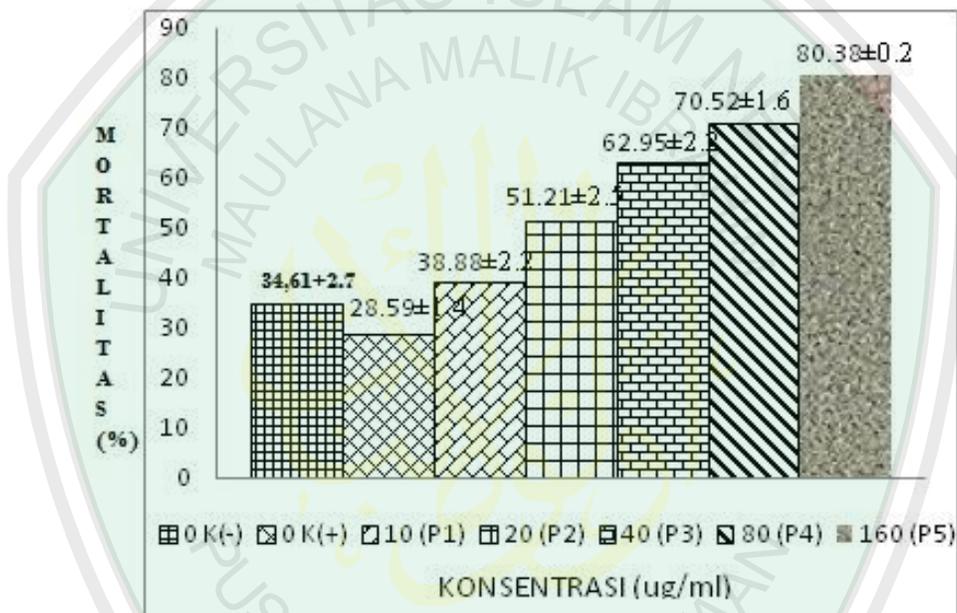


Gambar 4.4 Kurva pengaruh rebusan daun sirsak terhadap kultur primer sel otak yang dipapar dengan DMBA

Meyer et al (2000) menjelaskan bahwa apabila nilai $LC_{50} \leq 30 \text{ ug/ml}$ maka zat tersebut bersifat sangat toksik, $31 \text{ ug/ml} \leq LC_{50} \leq 1000 \text{ ug/ml}$ zat bersifat toksik dan nilai $Lc_{50} > 1000 \text{ ug/ml}$ maka bersifat tidak toksik.

Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50%* (LC_{50}), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50 %. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan probit analisis yang dirumuskan oleh Finney pada tahun 1971 untuk menentukan nilai LC_{50} pada derajat kepercayaan 95 % (Meyer et al. 2000).

Analisis probit digunakan dalam pengujian biologis untuk mengetahui respon obyek yang diteliti oleh adanya stimuli (hewan uji) dengan mengetahui respon berupa mortalitas. Pendugaan nilai toksisitas ekstrak tumbuhan terhadap sel kanker diukur dengan nilai LC50, yaitu suatu konsentrasi atau dosis yang tepat yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan yang diuji (Moekasana, 1993).



Gambar 4.5 Diagram Rataan tentang Respon Rebusan Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap Mortalitas Biakan Sel yang dipapar DMBA pada Kultur Primer Otak *Baby* Hamster.

Pada gambar 4.5 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi rebusan daun sirsak memberikan hasil presentasi kematian sel yang meningkat pula. Konsentrasi tertinggi yaitu 160 ug/ml memiliki mortalitas sebesar 80,38%±0.2. Hal tersebut menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak dapat meningkatkan kematian sel otak yang telah dipapar DMBA.

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel otak *baby* hamster, hal ini disebabkan karena kanker otak merupakan salah satu kanker yang membahayakan dan dapat menyerang anak- anak sampai orang dewasa. Kejadian kanker otak selama ini sangat sulit diidentifikasi karena gejala- gejala yang timbulkan juga hampir sama dengan orang sakit kepala biasa. Kanker otak ini dinyatakan sebagai kanker yang berbahaya karena menyerang otak yang merupakan pusat organ yang mengatur segala aktivitas atau gerakan tubuh manusia dan hewan. Selain itu, penelitian tentang kanker otak ini juga lebih sedikit dibandingkan dengan kanker- kanker yang lain. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk menentukan dosis yang tepat untuk mematikan sel kanker otak.

Uji sitotoksitas yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji sitotoksitas secara langsung yang dilakukan secara manual dengan menghitung jumlah sel hidup dibandingkan dengan sel yang mati. Perhitungan sel hidup secara manual dilakukan dengan pengecaca menggunakan tripan blue. Sel yang mati akan menyerap warna biru sedangkan sel yang hidup tidak, hal ini disebabkan karena sel yang mati mengalami kerusakan pada membrane selnya, protein dalam sel keluar dan berikatan dengan tripan blue. Perhitungan jumlah sel yang hidup dilakukan langsung pada *haemocytometer* (Djajanegara, 2010).

Penelitian ini menggunakan ekstraksi dengan metode rebusan, karena metode ini yang paling sering digunakan oleh masyarakat Indonesia dalam mengkonsumsi obat herbal, salah satunya yaitu menggunakan daun sirsak dalam mengobati penyakit kanker. Metode rebusan diperbolehkan dalam meracik suatu obat jika senyawa pada

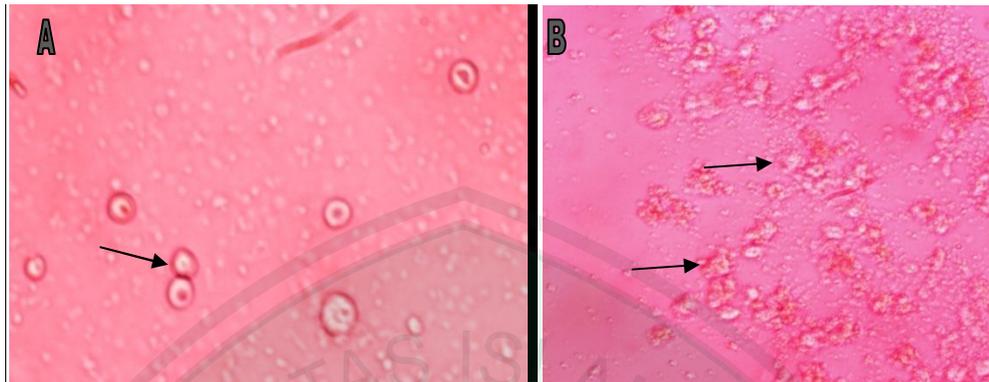
daun yang dibutuhkan memiliki titik didih yang lebih tinggi dibandingkan dengan titik didih air. Berdasarkan uji fitokimia kualitatif menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak mengandung senyawa polyfenol, flavonoid, dan tannin yang merupakan senyawa yang bersifat antikanker.

Tanaman herbal sudah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pencegahan dan pengobatan suatu penyakit, salah satunya tanaman sirsak yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Penggunaan tanaman herbal banyak dilakukan karena tanaman herbal lebih mudah didapatkan, aman dan relative lebih murah.

Pemberian rebusan daun sirsak mampu meningkatkan jumlah kematian sel, hal tersebut disebabkan pada daun sirsak mengandung suatu senyawa yang berpotensi sebagai antikanker yaitu senyawa *Annonaceous acetogenin*. *Acetogenin* adalah senyawa *polyketides* dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone* (Shiddiqi, 2008).

Annona muricata Linn. mengandung bermacam-macam senyawa kimia antara lain alkaloid, karbohidrat, lipid, asam amino, protein, polyphenol, minyak esensial, terpen, dan senyawa aromatik (Yus, 1996). Daun sirsak mengandung bahan aktif annonain, saponin, flavonoid, tanin (Kardinan, 2004).

Naria (2005) juga menyatakan bahwa pada sirsak ditemukan senyawa bersifat bioaktif yang dikenal dengan nama *acetogenin*. Daun sirsak mengandung senyawa *acetogenin* antara lain *asimisin*, *bulatacin*, dan *squamosin*. Disamping itu, daun, biji, akar dan buahnya yang mentah juga mengandung senyawa kimia *annonain* (Mulyaman, dkk. 2000 dalam Tenrirawe, 2007).



Gambar 4.6 (←→) kultur primer sel otak perbesaran 200x, a) Morfologi Sel otak yang dipapar DMBA, tampak sel belum mengalami kematian b) Sel otak yang telah dipapar DMBA yang diberi Rebusan Daun Sirsak selama 48 jam. tampak sel mengalami kerusakan membran.

Gambar 4.6 menunjukkan adanya perbedaan morfologi kultur primer sel otak yang dipapar DMBA sebelum dan sesudah diberi perlakuan. Kultur sel otak yang dipapar DMBA sebelum diberi perlakuan tampak berbentuk bulat tanpa mengalami kerusakan membran, sedangkan pada pemberian perlakuan rebusan daun sirsak dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ sudah terlihat adanya perubahan bentuk sel, yaitu bentuk sel sudah tidak bulat dan telah mengalami kerusakan membran.

Rebusan daun sirsak bersifat sitotoksik dan mampu menghambat kerja sel kanker dalam proliferasi sel, senyawa *Annonain Acetogenin* yang terdapat pada daun sirsak mampu menghambat kerja sel kanker yaitu mampu mengendalikan mitokondria yang overacting. Woo Mi Hee (2000) menyatakan bahwa *Acetogenin* berfungsi menghambat transport elektron mitokondria (kompleks 1) dan menghambat membran plasma NADH oksidase pada sel kanker.

Kim (1997) juga menambahkan bahwa potensi bioaktif Acetogenin telah ditunjukkan dalam menghambat produksi ATP yaitu dengan menghambat enzim NADH ubiquinone oksidoreduktase (kompleks 1) secara terus menerus pada sistem transport elektron mitokondria (ETS) dan ubiquinone yang berhubungan dengan NADH oksidase pada membrane plasma sel tumor, mereka secara selektif menghambat sel tumor.

Villo (2008) juga menambahkan bahwa mekanisme kerja *Acetogenin* yaitu menghambat ikatan respirasi pada mitokondria (kompleks 1). Pada struktur kimia acetogenin terdiri dari Y- lacton yang berfungsi sebagai penghambat karena dapat berikatan dengan ubiquinon pada transfer elektron. Sedangkan pada bagian tetrahydrofuran (THF) dapat berikatan dengan lipid membrane mitokondria.

Pengobatan menggunakan daun sirsak merupakan suatu usaha manusia untuk mengobati suatu penyakit. Rasulullah SAW menjelaskan dalam hadistnya yang diriwayatkan oleh Imam Muslim yang berbunyi

وَلِمُسْلِمٍ عَنْ جَابِرٍ رَفَعَهُ لِكُلِّ دَاءٍ نَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ نَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ تَعَالَى

Artinya :”Setiap penyakit pasti obatnya. Jika obat yang diberikan tepat, dengan izin Allah penyakit itu akan sembuh.”(HR. Ahmad dan Hakim) (Al-Jauziyah, 2008).

Hadist di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan setiap penyakit pasti menurunkan pula obatnya. Pengobatan yang dilakukan selama ini adalah sebuah usaha manusia untuk terus berfikir mencari obat yang tepat tetapi semua usaha itu

juga diiringi dengan do'a kepada Allah SWT, karena Allahlah yang Maha Penyembuh berbagai penyakit.

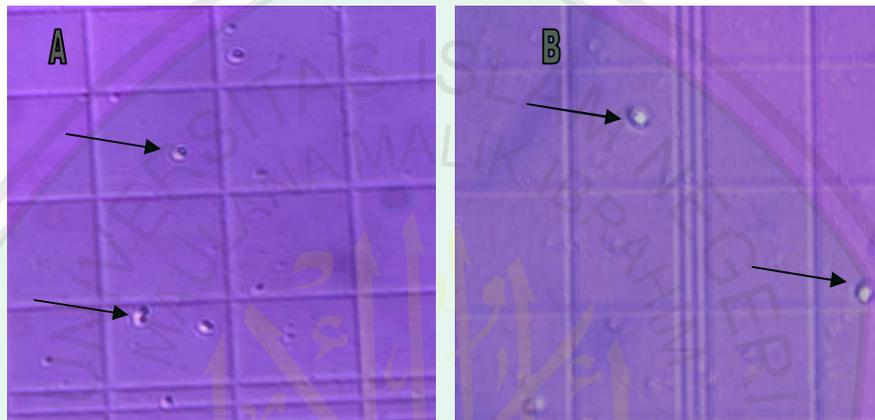
Pada sel kanker mekanisme kerjanya berbeda dengan sel normal, karena sel kanker tidak memiliki sinyal pertumbuhan sehingga sel kanker bisa berproliferasi secara terus-menerus. Pada mitokondria sel kanker menghasilkan ATP yang berlebih yang digunakan oleh sel kanker untuk terus membelah. Senyawa pada daun sirsak mengandung *Acetogenin* yang merupakan senyawa yang mampu menghambat kinerja pembentukan ATP oleh mitokondria pada sel kanker.

Proses pembentukan kanker merupakan sekumpulan perubahan pada sejumlah gen yang terlibat dan berperan dalam sistem sinyal sel, pertumbuhan, siklus sel, diferensiasi, angiogenesis, dan respon atau perbaikan terhadap kerusakan pada DNA. Dalam sel kanker, banyak gen yang berbeda mengalami perubahan baik pada struktur atau jumlah dalam ratusan bahkan ribuan gen yang dapat diekspresikan secara berbeda (Alatas, 2007). Dasar perubahan seluler yang menyebabkan terjadinya kanker (karsinogenesis) adalah adanya perubahan basa DNA dan sel target yang biasa dikenal dengan mutasi (King, 2000).

4.4 Hasil Apoptosis Kultur Primer Sel Otak *Baby* Hamster yang Dipapar dengan DMBA yang diberi Rebusan Daun Sirsak

Kultur primer sel otak *baby* hamster yang diberi rebusan daun sirsak dengan berbagai konsentrasi memiliki jumlah kematian sel yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi rebusan daun sirsak maka semakin tinggi pula mortalitasnya. Selain

presentase kematian sel, untuk mendukung bahwa rebusan daun sirsak bersifat sitotoksik dapat dilihat dari morfologi sel. Pengamatan secara mikroskopik menggunakan pewarna tripan blue menunjukkan adanya perbedaan sel yang hidup dan sel yang mati.



Gambar 4.7 Sel Otak *Baby* Hamster dengan Pewarnaan Tripan Blue dengan Perbesaran 100x, a) Sel Mati Tampak Warna biru dan b) Sel Hidup Tampak Bening.

Berdasarkan gambar tersebut menunjukkan bahwa sel otak hamster yang dipapar DMBA dengan diberi perlakuan rebusan daun sirsak tampak berwarna biru. Hal tersebut disebabkan oleh pemberian tripan blue untuk menentukan sel hidup atau sel mati. Pada sel mati akan mengalami kerusakan membrane sehingga zat warna akan masuk dan terserap. Sedangkan pada sel yang hidup tidak mengalami kerusakan pada membrane sehingga tetap bening tanpa terwarnai.

Menurut Trenggono (2009), tripan blue tidak mengubah integritas membrane plasma, memperlambat kematian sel, dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop. Sel yang masih hidup akan berpendar dan berwarna bening

sedangkan sel yang mati akan menyerap tripan blue karena permeabilitas membrannya rusak, sehingga sel yang akan mati akan terlihat berwarna biru.

Sel otak *baby* hamster dipapar dengan DMBA telah menyebabkan gejala karsinogenesis, hal tersebut disebabkan karena DMBA mampu membentuk *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen* pada jalur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450. *Proximate carcinogen* adalah metabolit intermediet yang akan mengalami metabolisme lebih lanjut menjadi *ultimate carcinogen*. *Ultimate carcinogen* merupakan metabolit akhir dari karsinogen induk yang akan membentuk *DNA adduct*, suatu proses awal inisiasi kanker (Susilowati, 2010). kemudian sel tersebut diberi perlakuan rebusan daun sirsak dengan berbagai konsentrasi. Dari masing- masing konsentrasi tersebut sel mengalami kematian yang berbeda, semakin tinggi konsentrasi makin kematian sel juga semakin tinggi.

Pada kanker terjadi overekspresi onkogen seperti BCL dan BCL-XL yang berperan sebagai antiapoptosis, yaitu melalui penghambatan pembukaan Pt-pore pada membrane mitokondria, sehingga sel menjadi immortal. Bila terjadi mutasi (MT) dari gen p-53 atau BCL-2, maka p-53 mutan yang dihasilkan bersifat inaktif, sehingga protein ini tidak mampu memicu pembentukan p-21. Rendahnya p-21 mengakibatkan CDK tidak dihambat dan akhirnya siklus pembelahan sel berjalan terus. Di sisi lain, p-53 tidak mampu memicu aktivitas protein BAX, sehingga Pt-pore pada membrane mitokondria tidak mampu membuka dan akhirnya sel tidak bisa diapoptosis (Sudiana, 2008).

Kultur primer sel otak *baby* hamster yang dipapar DMBA yang telah diberi rebusan daun sirsak mampu mematikan sel yang diasumsikan bahwa sel tersebut mengalami apoptosis. Senyawa Acetogenin pada daun sirsak memiliki cincin THF (Tetrahydrofuran) pada C23 bersifat hidrofilik yang mampu membantu membuka Pore mitokondria sehingga mengakibatkan terjadi pelepasan cythocrom-C ke sitosol, Cythocrom-C kemudian mengaktifkan Apaf-1. Selanjutnya, Apaf-1 yang aktif mengaktivasi kaspase kaskade dan terjadilah kematian sel (Apoptosis) dan Y-Lacton yang dimiliki acetogenin mampu menghambat NADH Ubiquinone oksireduktase (kompleks 1) sehingga mitokondria tidak mampu menghasilkan energi.

Dalam menjalankan hidupnya, sel melakukan suatu aktivitas yang disebut siklus replikasi sel yang dibagi menjadi 4 fase yakni Gap-1 (fase antara mitosis dan sintesis DNA, G1), Sintesis (S), Gap-2 (fase antara sintesis dan mitosis, G2) dan Mitosis (M). Replikasi DNA berlangsung pada fase S dan pemisahan mitotic sister chromatid berlangsung pada fase M. Fase S dan M adalah fase yang paling mudah dipengaruhi oleh berbagai faktor. Oleh karena suatu faktor, misalnya paparan radiasi, sel biasanya melakukan “*arrest*” pada fase G1 atau G2. Hanya setelah perbaikan DNA selesai, pembelahan sel akan memasuki fase berikutnya. Bila sel mengalami kerusakan yang besar, mereka akan mengaktifkan apoptosis yakni kematian sel terprogram melalui digesti enzimatik oleh dirinya sendiri. Apoptosis merupakan suatu mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan mungkin berbahaya sehingga dapat menyelamatkan organisme (William, 1991).

Sel di dalam tubuh makhluk hidup akan mengalami pertumbuhan dan kematian. Banyak faktor yang menyebabkan sel mengalami kematian, diantaranya yaitu faktor iskemia (kekurangan oksigen), aktivitas enzim lisozim, faktor karsinogen, mekanisme genetic maupun kematian sel yang telah terprogram oleh sel itu sendiri. Setelah berkembangnya biologi molekuler, kematian sel dapat diidentifikasi lebih mendalam yaitu melalui jalur apoptosis (Sudiana, 2008).

Allah berfirman dalam surat Yaasin ayat 68

وَمَنْ نُعَمِّرْهُ نُنَكِّسْهُ فِي الْخَلْقِ أَفَلَا يَعْقِلُونَ ﴿٦٨﴾

Artinya :”Dan barangsiapa yang kami panjangkan umurnya niscaya kami kembalikan dia kepada kejadian(nya). Maka apakah mereka tidak memikirkan?.”

Dalam tafsir Al- Mishbah dijelaskan bahwa dahulu ketika bayi menusia lemah, tidak memiliki pengetahuan, lalu dari hari ke hari ia menjadi kuat dan banyak tahu, selanjutnya bila usianya menanjak hingga mencapai batas tertentu, dia dikembalikan Allah menjadi pikun, lemah, serta membutuhkan bantuan yang banyak. *Maka apakah mereka tidak berfikir* tentang kekuasaan Allah mengubah keadaanya itu, dan tentang kelemahannya agar dia sadar bahwa kekuatannya tidak langgeng, dan bahwa dunia ini fana, dan bahwa dia harus memiliki sandaran yang kuat, lagi langgeng dan abadi. Sandaran itu tidak lain kecuali Allah SWT. Penjelasan tersebut sama halnya dengan sel yang mengalami pertumbuhan dan juga mengalami kematian.

Secara fisiologis, system pertumbuhan sel dalam individu juga diatur oleh suatu system keseimbangan, yaitu apoptosis dan proliferasi. Apabila pada individu

terjadi apoptosis yang berlebihan, maka individu tersebut akan mengalami kemunduran fungsi dari suatu system organ yang dapat menimbulkan suatu penyakit. Demikian halnya juga bila terjadi proliferasi sel secara berlebihan, maka akan terjadi massa tumor (*malignancy*) (Sudiana, 2008).

Keseimbangan proses kejadian pembentukan manusia juga diatur dalam Al-Qur'anul Karim surat Al-infithaar ayat 7-8 yang berbunyi:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾ فِي أَيِّ صُورَةٍ مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ ﴿٨﴾

Artinya: "Yang Telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang. Dalam bentuk apa saja yang dia kehendaki, dia menyusun tubuhmu."

Kata *فعدلك* terambil dari kata (*عدل*) dalam tafsir Al Mishbah yang antara lain berarti seimbang. Kata ini dapat berarti menjadikan anggota tubuh manusia seimbang. Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan manusia dari beberapa tahap yang kompleks dan teratur. Mulai dari tahap molekuler, sel sampai menjadi individu yang sangat kompleks. Kejadian- kejadian tersebut akan berlangsung sampai manusia tersebut menjadi lemah dan mati. Maha Besar Allah yang telah menciptakan segala yang ada di bumi dengan sangat sempurna.

Pada sel kanker mempunyai kemampuan proliferasi dan diferensiasi yang sangat tinggi. Perubahan perilaku tersebut terjadi karena sel mengekspresikan berbagai protein yang abnormal. Berbagai protein abnormal muncul karena sel yang bersangkutan mengalami mutasi/kecacatan gen, khususnya gen- gen yang mengkode protein, yang sangat berperan pada pengaturan siklus pembelahan sel. Contohnya

antara lain beberapa gen yang termasuk kelompok protooncogene atau kelompok tumor suppressogene, serta gen yang mengatur atau menghambat pemendekan telomere pada ujung kromosom.

Vahakangas (1992) menjelaskan bahwa sel kanker berbeda dari sel normal pada sifat biologi molekulernya yang khas. Berbagai studi telah mempelajari sifat ini seperti kelainan sistem transduksi signal seluler yang berhubungan dengan kontrol perkembangan biakan sel seperti reseptor dari faktor pertumbuhan atau penghambatan kontak antar sel, transmisi signal intraseluler, dan transfer signal pada gen pengontrol pertumbuhan sel.

Pemicu kanker (karsinogen) eksogen (dari luar) dan proses biologik endogen dapat menyebabkan mutasi pada untai DNA berupa delesi, insersi atau substitusi basa baik transisi maupun transversi. Mekanisme endogen kerusakan DNA tersebut adalah fenomena deaminasi 5-metilsitosin. Metilasi DNA merupakan mekanisme epigenetic yang melibatkan pengaturan ekspresi suatu gen (Vahakangas, 1992).

Bila sel mengalami kerusakan yang besar, mereka akan mengaktifkan apoptosis yakni kematian sel terprogram melalui digesti enzimatik oleh dirinya sendiri. Apoptosis merupakan suatu mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan mungkin berbahaya sehingga dapat menyelamatkan organism (Nurhayati, 2006).

Senyawa *Annonain Acetogenin* yang terdapat pada daun sirsak mampu menghambat kerja mitokondria dalam menghasilkan ATP yang diperlukan oleh sel kanker untuk proliferasi. Ikatan kimia pada senyawa tersebut mengandung γ -lacton

yang berfungsi sebagai penghambat karena dapat berikatan dengan ubiquinon pada transfer electron. Sedangkan pada bagian tetrahydrofuran (THF) dapat berikatan dengan lipid membrane mitokondria (Villo, 2008). Jika kerja mitokondria terhambat maka sel kanker akan mati.

Wang (2011) menjelaskan bahwa mitokondria sebagai regulator pusat jalur apoptosis intrinsik Selain memperkuat dan mediasi jalur apoptosis ekstrinsik, mitokondria juga memainkan peran sentral dalam integrasi dan propagasi dari sinyal kematian yang berasal dari dalam sel seperti kerusakan DNA, stres oksidatif, kelaparan, maupun yang diinduksi dengan obat-obat antikanker.

