

# PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP PERTUMBUHAN SEL HEPAR *BABY* HAMSTER YANG DIINDUKSI DMBA (7,12 Dimethyl( $\alpha$ )anthracene) SECARA *IN VITRO*

Khafid Presti Mustika Rini

Mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Sains & Teknologi UIN Maliki Malang

## ABSTRAK

Kanker hepar merupakan salah satu penyakit yang mematikan. Pengobatan penyakit ini memerlukan biaya yang tinggi dan memberikan efek samping bagi tubuh, sehingga pemanfaatan tanaman obat menjadi salah satu pilihan efektif dalam upaya pengobatan kanker. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki senyawa yang disebut acetogenin yang diduga kuat sebagai anti kanker pada penelitian-penelitian sebelumnya. Ekstrak daun sirsak ini mampu meredam proliferasi sel berlebih dengan cara menghambat produksi energi berlebih pada mitokondria. Salah satu karsinogen yang dapat menyebabkan sel kanker adalah DMBA (7,12 Dimethylbenz ( $\alpha$ ) Anthracene). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap kultur primer sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak daun sirsak konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$ , dan 160  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel hepar yang telah diinduksi DMBA 0,1  $\mu\text{g/mL}$  selama 48 jam. Sampel dalam penelitian ini adalah sel hepar *baby* hamster umur 2 hari yang dikultur dalam medium DMEM 10% FBS + DMBA 0,1  $\mu\text{g/mL}$  bagi kontrol positif serta perlakuan, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya sampel diberi ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi berbeda pada perlakuan selama 24 jam. Setelah selesai pemberian ekstrak daun sirsak selama 24 jam, sel hepar *baby* hamster diamati konfluenitas, viabilitas dan efek sitotoksitas ekstrak daun sirsak terhadap sel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) berpengaruh terhadap konfluenitas, viabilitas dan sitotoksitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA 0,1  $\mu\text{g/mL}$  selama 48 jam. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki nilai LC<sub>50</sub> 22,3818  $\mu\text{g/mL}$  sehingga termasuk sitotoksik aktif.

**Kata kunci:** Ekstrak Daun Sirsak, Sel Hepar, Baby Hamster, DMBA., Uji Sitotoksitas.

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit berbahaya dan mematikan. Kanker merupakan penyakit tidak menular yang berawal dari kerusakan materi genetik. Dalimartha (2004), menyatakan bahwa di dalam organ tubuh yang mengalami kanker akan timbul dan berkembangbiak sel-sel baru yang tumbuh abnormal, cepat, dan tidak terkendali dengan bentuk, sifat dan gerakan yang

berbeda dengan sifat asalnya, serta merusak bentuk dan fungsi organ asalnya.

Salah satu jenis penyakit kanker yang kian meningkat kasusnya di dunia adalah penyakit kanker hepar. Kanker hepar merupakan kanker dengan kematian ketiga terbesar di dunia. Jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker hepar lebih dari satu juta kematian per tahun (NCI, 2009).

Gangguan pada hepar seringkali menyebabkan penyakit Gangguan tersebut bisa berasal dari dalam ataupun dari luar. Penyebab gangguan hepar antara lain karena paparan zat toksik, karsinogen, polusi, dan lain-lain. DMBA sebagai senyawa karsinogen sering digunakan dalam penelitian sebagai agen penginduksi kanker. Berdasarkan penelitian sebelumnya, secara *in vivo* DMBA dosis 20 mg/kg BB dalam *corn oil* secara per oral, dengan pemberian 10 kali selama 4 minggu menyebabkan inisiasi kanker dan membentuk nodul tumor (Dyani, 2008). Secara *in vitro*, pemberian 0,1 µg/mL selama 48 jam dapat menyebabkan kanker pada kultur *cell line* (Cheng, 2008).

Upaya yang dapat dikembangkan dalam pengobatan kanker antara lain adalah dengan pemanfaatan tanaman obat. Salah satu tanaman yang dapat digunakan dalam pengobatan kanker adalah *Annona muricata* Linn *Annona muricata* mengandung senyawa *Annonaceous acetogenins* yang dapat digunakan sebagai antitumor dan antikanker (Taylor, 2002).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *Annona muricata* Linn. terhadap perumbuhan sel hepar yang diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(α)anthracene) secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang terdiri dari 5 taraf perlakuan (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, dan 160 µg/mL). Penelitian ini menggunakan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan, dengan demikian secara keseluruhan terdapat 21 kombinasi perlakuan.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), incubator CO<sub>2</sub>

5%, timbangan analitik, sentrifus, mortar, mikroskop fluoresen, tabung sentrifus 10 ml, botol tutup ulir (scot), spuit, gunting, pinset, pipet pasteur, mikropipet 20-200 µl dan 100-1000 µl (Biored), *blue tips* dan *yellow tips*, cawan petri, multiwell (isi 24), tabung tube 1 ml, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass, filter single use 0.2 µm (Sartorius mini start), scalpel, parafilm, masker, hand glove, penutup kepala, kertas label, tissue, aluminium foil, mikroskop inverted, hemocytometer, hand counter, bunsen, korek dan karet.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sel hepar *baby* hamster yang berumur 2 hari, ekstrak daun sirsak, media Dulbeccos Modified Eagles medium with high glucose (DMEM, Gibco, Burlington, ON 12800-017), Phosphat Buffer Saline (PBS, Gibco 21600-051), tripsin (Gibco, 15090), tripsin EDTA 2.5% (Gibco, 15050-065), Foetal Bovine Serum (FBS, Sigma 12003c), penicillin (Meiji Indonesia), streptomycin (Meiji Indonesia), fungizone (Gibco, 15290-08), 0.2% DMSO, DI steril, NaHCO<sub>3</sub>, *tripan blue*, hepes, alkohol 70%, DI, tipol, aquades, daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.).

## PROSEDUR PENELITIAN

### Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dan *dissecting set* (pinset, gunting) direndam dengan tyopol selama 24 jam, kemudian digosok dan dibilas dengan air mengalir sebanyak 21 kali pada air mengalir dan pada bilasan terakhir menggunakan aquades. Dikeringkan dalam oven suhu 50°C. Peralatan yang berbahan kaca dibungkus dengan *aluminium foil* dan di oven selama 3 jam dengan suhu 125 °C, sedangkan peralatan dari plastik dibungkus dengan plastik tahan panas dan di autoklaf suhu 121 °C, tekanan 1,5atm selama 15 menit.

### Pembuatan Media DMEM

Pembuatan stok media DMEM untuk 100 ml yaitu ditimbang DMEM 1.35 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.37 g, hepes 0.238 g, penicilin 0.06 g, streptomycin 0.01 g, fungizone

100 µl, dan di larutkan dalam DI steril 100 ml. Semua bahan-bahan dihomogenkan dan disaring dengan filter *single use* 0.2 µm didalam Laminar Air Flow (LAF).

### **Pembuatan Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn**

Pembuatan ekstrak daun sirsak ini dilakukan dengan metode maserasi menggunakan atanol 70%. Daun yang diambil adalah daun ke tiga dan ke empat dari pucuk. Selanjutnya, daun *Annona muricata* Linn dicuci bersih, dikeringkan dengan suhu ruang dan dibuat serbuk simplisia kering. Selanjutnya diambil 200 gr serbuk simplisia ke dalam botol bermulut lebar, kemudian ditambah etanol 70% sebanyak 1 liter. Setelah 3 hari perendaman dengan pengadukan berkala, campuran disaring dan ampas yang diperoleh dilakukan perendaman berkali-kali hingga filtratnya tidak berwarna. Maserat yang diperoleh lalu dipartisi, kemudian sisanya dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C

### **Perhitungan Viabilitas, Sitotoksitas dan Konfluenitas Sel**

Penelitian ini menggunakan tiga parameter untuk diamati, yaitu konfluenitas, viabilitas dan sitotoksitas.. Pengamatan uji sitotoksitas dengan metode langsung (*variable count*), dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel yang hidup dan yang mati menggunakan *tripan blue*. Persentase kematian sel dihitung menggunakan rumus (Doyle dan Griffith, 2000):

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\sum \text{ sel yang hidup}}{\sum \text{ sel hidup} + \text{ mati}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas}$$

Angka persen kematian yang diperoleh dari masing masing konsentrasi dirubah ke dalam angka probit dengan menggunakan table probit. Selanjutnya dibuat persamaan regresi linear untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan kematian sel. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian disubstitusi dan dianti logaritma untuk mendapat nilai LC<sub>50</sub> (Ira, 2009).

Persentase konfluen sel dilihat berdasarkan banyaknya sel yang tumbuh dan melekat satu dengan yang lain pada *well/Tc disk* dengan ketentuan sebagai berikut (Freshney, 2000):

- a. Konfluen 100%, jika menempel dan berkembang memenuhi keseluruhan *attachmen site*.
- b. Konfluen 75%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{3}{4}$  *attachmen site*.
- c. Konfluen 50%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{1}{2}$  *attachmen site*.
- d. Konfluen 25%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{1}{4}$  *attachmen site*.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Konfluen Sel Hepar Yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene).**

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis dengan One-way ANOVA, ekstrak etanol daun sirsak berpengaruh terhadap konfluen sel hepar *baby* hamster. Hasil analisis tersebut tercantum pada tabel 1

Tabel 1 Ringkasan One-way ANOVA Tentang Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap Konfluen Sel Hepar *Baby* Hamster Yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimetylbenz( $\alpha$ )anthracene).

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan	6	5633,33	938,88	148,25*	2.77
Galat	14	88,66	6,33		
Total	20				

Keterangan: \* menunjukkan berbeda nyata

Berdasarkan perhitungan KK didapatkan nilai KK untuk konfluen sel hepar yang adalah 0,33%. Sehingga untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang ada dilakukan uji lanjut dengan

menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%. Hasil uji BNJ dari rata-rata konfluen sel hepar *baby* hamster yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) didapatkan notasi BNJ seperti pada tabel .2

Tabel 2 Ringkasan BNJ 5% Tentang Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Konfluen Sel Hepar *Baby* Hamster Diinduksi DMBA (7,12-Dimetylbenz( $\alpha$ )anthracene).

Perlakuan	Rata-rata (%)	Notasi 5%
P5	11,66	a
P4	18,33	ab
P3	33,33	abc
K(-)	36,66	bc
P2	39,33	c
P1	48,33	c
K(+)	64,33	c

Keterangan: Angka yang didampingi oleh adanya huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5%

Berdasarkan notasi BNJ 5% tersebut dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) berpengaruh nyata terhadap penurunan konfluen sel hepar *baby*.hamster. Hal tersebut dikarenakan kemampuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) mampu menghambat proliferasi berlebih pada sel yang berlebih.

*Acetogenin* bekerja menghambat produksi ATP dengan cara mengganggu kinerja pada kompleks I mitokondria. *Acetogenin* masuk dan menempel pada reseptor dinding sel dan merusak ATP di dinding mitokondria. Dampaknya produksi energi di dalam sel kanker berhenti dan akhirnya sel kanker mati. *Acetogenin*

sangat selektif, karena hanya menyerang sel kanker (Zeng, 1996)

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn) Terhadap Viabilitas Sel Hepar *Baby* Hamster Yang Diinduksi DMBA (7,12-dimetylbenz( $\alpha$ )anthracene).**

Berdasarkan penelitian dan analisis statistik menggunakan One-way ANOVA, ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) berpengaruh terhadap viabilitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA (7,12-Dimetylbenz( $\alpha$ )anthracene). Hasil analisis tersebut tercantum dalam tabel 3. Oleh karena itu, dilakukan uji lanjut BNJ 5% yang tercantum dalam tabel 4.

Tabel 3. Ringkasan One-way ANOVA Tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Viabilitas Sel Hepar *Baby* Hamster Yang Diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*)

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan	6	1818,43	303,07	4,60*	2.77
Galat	14	921,56	65,82		
Total	20				

Keterangan: \* menyatakan berbeda nyata

Tabel 4. Ringkasan BNJ 5% Tentang Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Viabilitas Sel Hepar *Baby* Hamster Diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*).

Perlakuan	Rata-rata (%)	Notasi 5%
P5	29,50	a
P4	36,83	ab
P3	39,85	abc
P2	44,67	abcd
K(+)	50,90	bcd
P1	52,61	cd
K (-)	58,47	d

Keterangan: Angka yang didampingi oleh adanya huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNJ taraf signifikan 5%

Berdasarkan notasi uji BNJ 5% tersebut, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) menunjukkan ada pengaruh terhadap penurunan viabilitas sel hepar baby hamster yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*).

Semakin tinggi konsentrasi pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) maka semakin rendah rata-rata viabilitas sel hepar, hal tersebut membuktikan bahwa senyawa *acetogenin* yang terkandung dalam ekstrak etanol. Daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*).

Abu Hurairah berkata bahwa Rasulullah bersabda (Qoyim, 2004):

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنْ دَاءٍ إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ دَوَاءً

Artinya: Allah tidak menurunkan suatu penyakit, melainkan Dia menurunkan obatnya.

Hadis tersebut menjelaskan bahwa sesungguhnya segala macam penyakit (داء)

terdapat obat (دواء) yang dapat menyembuhkan penyakit tersebut. Hal tersebut terbukti dalam penelitian ini bahwa ekstrak etanol daun sirsak berpengaruh terhadap penurunan viabilitas sel hepar baby hamster yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*).

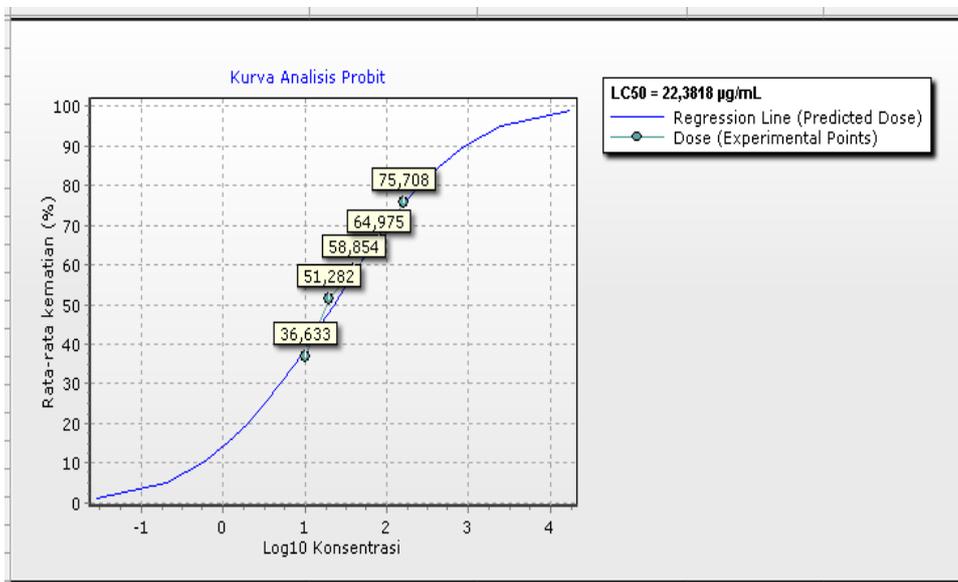
Inhibisi kompleks I mitokondria oleh *acetogenin* akan menyebabkan menurunnya produksi ATP. Penurunan jumlah ATP tersebut dapat menginduksi terjadinya apoptosis sel. Selain itu, penurunan produksi ATP juga dapat mengaktifkan gen p-53 (*tumorsupressor genes*) yang menyebabkan terhentinya siklus sel pada fase G1 sehingga dapat mencegah proliferasi yang berlebihan (Apte, 2009).

**Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Sitotoksitas Sel Hepar Baby Hamster Yang Diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*)**

Sitotoksitas merupakan kemampuan suatu bahan dalam

memberikan efek toksik terhadap sel pada konsentrasi tertentu. Dalam penelitian ini, uji yang digunakan adalah uji sitotoksitas sel dengan menggunakan analisis probit untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$ .  $LC_{50}$  (*Median*

*Lethal Concentration*) merupakan konsentrasi yang menimbulkan kematian sel sebanyak 50%. Hasil analisis probit dari penelitian ini tercantum dalam gambar 5.



Gambar 5. Analisis Kurva analisis probit hubungan antara log konsentrasi dengan persentase kematian sel melalui komputersasi Biostat 2009 profesional 5.8.4

Berdasarkan hasil analisis probit di atas, diketahui bahwa  $LC_{50}$  sebesar 22,3818.µg/mL, hal tersebut menunjukkan bahwa dengan konsentrasi 22,3818.µg/mL ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) mampu menyebabkan kematian sel hepar DMBA *baby* hamster yang diinduksi, sehingga dapat diartikan bahwa dengan konsentrasi tersebut ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) berpotensi dalam menurunkan proliferasi sel hepar yang diinduksi DMBA (7,12-Dimetylbenz(a)anthracene).

Kemampuan sitotoksitas ekstrak etanol daun sirsak dalam penelitian ini dikategorikan dalam sitotoksitas aktif, karena nilai  $LC_{50}$  kurang dari 50 µg/mL.

Kemampuan sitotoksik diartikan sebagai kemampuan menghambat pengangkutan ATP di dalam sel kanker. Sehingga sel kanker tidak mendapat sumber energi yang cukup untuk tumbuh dan berkembang biak sehingga akan mati. Sitotoksitas pada nilai  $LC_{50}$

diklasifikasikan menjadi empat, yaitu toksisitas tinggi ( $LC_{50} < 10$  µg/ml), aktif ( $10 < LC_{50} < 50$  µg/ml), aktif sedang ( $50 < LC_{50} < 100$  µg/ml), dan tidak aktif ( $LC_{50} > 100$  µg/ml). Nilai  $LC_{50}$  yang rendah menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang rendah sudah dapat membunuh sel kanker. (Osorio dkk, 2007).

*Acetogenin* merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau *NADH dehidrogenase* yang dapat mengakibatkan penurunan ATP yang dapat menyebabkan kematian sel kanker. Mekanisme inhibisi tersebut juga dapat memicu terjadinya aktivasi jalur apoptosis serta mengaktifkan gen P53 (*tumor supresor genes*) yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegah proliferasi sel berlebih (Kim, 1998).

**Daftar Pustaka**

- Apte Sp. Sarangrajan R. 2009. *Celluler Carcinogenesis And Respiration*. Newyork: Springer
- Cheng,Young. Ching Liang. Li-Te Chin. Jen Han Chenn. Chi Hong Chu. 2008. Prevention And Ameliorating Effects Of Garlic Extract On The Formation Of 7,12- Dimetylbenz (A)Anthracene Induced Dna Adducts In Cultured . *J. Biomed Lab Sci. Vol 19 No 4*
- Dalimartha, S. 2004. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jilid Ii. Jakarta: Puspa Swara
- Doyle A, Griffiths. 2000. *Cell And Tissue Culture For Medical Researce*. New York: John Willey& Sons
- Freshney, R.I. 2000. *Culture Of Animal Cell, Fourth Edition. A Manual Of Basic Technique*. New York : John Wiley And Sons, Inc Publication
- Ira, Djajanegara. 2009. Pemakaian Sel Hela Dalam Uji Sitotoksitas Fraksikloroform Dan Ethanol Ekstrak Daun Annona Squamosa. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, Vol. 7, No. 1*
- Kim, Soog Geum. Lu Zeng. Lingling. Feng. Jerry L. Mc Laughlin. And Soelaksono Sastrodihardjo. 1998. Two New Mono Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E And Muricapentocin, From The Leaves Of *Annona Muricata*. *American Chemical Society And American Society Of Pharmacognosy. Published On 03/11/1998*.
- National Cancer Institute.What You Need To Know About™ Liver Cancer. 2009. Available From: Url:[Http://Www.Cancer.Gov/CancerTopics/](http://www.Cancer.Gov/CancerTopics/) Diakses Tanggal 25 Desember 2012
- Taylor, Leslie. 2002. *Technical Data Report For Graviola (Annona Muricata)*. Preprinted From Herbal Secrets Of The Rainforest, 2nd Edition : Sage Press
- Qoyim, Ibnu. Al-Jauziyah. 2004. *Metode Pengobatan Ala Nabi*. Jakarta: Penerbit Griya Ilmu.