

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar *Baby* Hamster yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimetilbenz(a)antracene)

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik menggunakan One-way ANOVA tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap konfluenitas sel hepar *baby* hamster menunjukkan F hitung > F tabel 5% (tabel 4.1), berarti ada pengaruh nyata pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan konsentrasi berbeda selama 24 jam terhadap konfluenitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA (7, 12-Dimetilbenz(a)antracene) 0,1µg/mL selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan uji BNP 5% (tabel 2) yang didasarkan atas nilai Koefisien Keragaman (KK) 0,33%.

Tabel 4.1 Ringkasan One-way ANOVA Tentang Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Konfluen Sel Hepar *Baby* Hamster.

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

Tabel 4.2 Ringkasan Uji BNJ 5% Tentang Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Konfluen Sel Hepar *Baby* Hamster.

Perlakuan	Rata-Rata (%)	Notasi BNJ 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 huruf yang sama tidak berbeda nyata

Berdasarkan uji lanjut BNJ 5% (tabel 4.2) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) berpengaruh terhadap konfluen sel hepar *baby* hamster. Pada P5 tidak berbeda nyata dengan P4, P3, dan K(-) tetapi berbeda nyata dengan P2, P1 dan K(+). P4 tidak berbeda nyata dengan P5, P3, dan K(-) tetapi berbeda nyata dengan P2, P1, dan K(+). P3 tidak berbeda nyata dengan P5, P4, K(-), P2, P1 dan K(+). P2, P1 dan K(+) tidak berbeda nyata dengan P3 dan K(-) tetapi berbeda nyata dengan P5 dan P4.

Notasi BNJ 5% tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi berbeda selama 24 jam berpengaruh nyata terhadap penurunan konfluen sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA (7, 12-Dimetilbenz( $\alpha$ )antracene). Hal tersebut dikarenakan kemampuan ekstrak daun etanol sirsak dalam menghambat proliferasi berlebih pada sel dengan cara menghambat produksi ATP pada mitokondria.

Induksi DMBA (7, 12-Dimetilbenz( $\alpha$ )antracene) sebagai karsinogen pemicu sel kanker menyebabkan sel berproliferasi dengan cepat, karena sel kanker

dalam pertumbuhannya dapat selalu tumbuh tanpa adanya faktor pertumbuhan sekalipun. Sel kanker dapat memproduksi faktor pertumbuhannya sendiri dengan cara membentuk hormon pertumbuhan serta tidak memperhatikan pertumbuhan sel lain, akan tetapi aktifitas DMBA tersebut dapat diredam oleh *acetogenin* yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn).

*Acetogenin* bekerja menghambat produksi ATP dengan cara mengganggu kinerja pada kompleks I mitokondria. Sel kanker membutuhkan banyak energi sehingga membutuhkan banyak ATP. *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).

Berdasarkan nilai rata-rata konfluenitas sel hepar, semakin tinggi pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn), maka semakin rendah rata-rata konfluen sel hepar *baby* hamster Yang diinduksi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn). Hal tersebut terjadinya penghambatan aktifitas DMBA (*7,12Dimethylbenz(α)anthracene*).

Pengaruh *acetogenin* menjadikan permeabilitas membran terganggu dan menghambat berkembangnya sel kanker sehingga memberikan kesempatan bagi sel untuk melakukan mekanisme pengaturan kematian sel melalui apoptosis, sehingga menurunkan tingkat konfluenitas sel. *Acetogenin* berperan dalam menghambat sel kanker dengan cara menghambat aktifitas NADH ubiquinon reduktase pada mitokondria dalam produksi ATP (Betancur, 1999).

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

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan One-way ANOVA tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap viabilitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA 0,1µg/mL menunjukkan bahwa F hitung > dari F tabel 5% (tabel 4.3), berarti bahwa ada pengaruh nyata dari pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan konsentrasi berbeda (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, dan 160 µg/mL) terhadap sel hepar yang telah diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam. Sehingga dilakukan uji BNJ 5% (tabel 4.4).

Tabel 4.3 Ringkasan One-way ANOVA Tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Viabilitas Sel Hepar *Baby* Hamster

SK	db	KT	JK	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 4.4 Ringkasan Uji BNJ Tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Viabilitas Sel Hepar *Baby* Hamster.

Perlakuan	Rata-Rata (%)	Notasi BNJ 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%

Dari hasil tabel 4.4 dapat diketahui bahwa perlakuan P5 berbeda nyata dengan K(+), P1 dan K(-) tetapi tidak berbeda nyata dengan P4, P3, dan P2. P4

berbeda nyata dengan P1 dan K(-) tetapi tidak berbeda nyata dengan P5, P3, P2 dan K(+). P3 berbeda nyata dengan K(-) tetapi tidak berbeda nyata dengan P5, P4, P2, K(+) dan P1. P2 tidak berbeda nyata dengan P5, P4, P3, K(+), P1 dan K(-). K(+) berbeda nyata dengan P5 tetapi tidak berbeda nyata dengan P4, P3, P2, P1, dan K(-). P1 berbeda nyata dengan P5 dan P4 tetapi tidak berbeda nyata dengan P3, P2, K(+) dan K(-). K(-) berbeda nyata dengan P5, P4, P3 tetapi tidak berbeda nyata dengan P2, P1 dan K(+).

Berdasarkan notasi uji BNJ 5% dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi berbeda selama 24 jam berpengaruh terhadap penurunan viabilitas sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL 48 jam. Semakin tinggi konsentrasi pemberian ekstrak etanol daun sirsak (P5), maka semakin rendah rata-rata viabilitas sel hepar. Kelompok P5 memiliki tingkat viabilitas sel terendah hingga 29,5 hal tersebut membuktikan bahwa senyawa acetogenin yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel hepar yang diinduksi DMBA (*7,12-dimethylbenz(α)anthracene*). sebagai karsinogen penyebab kanker.

*Annona muricata* Linn memiliki kandungan senyawa *acetogenin* yang memiliki efek kuratif terhadap sel kanker melalui mekanisme inhibisi kompleks I mitokondria yang akan mengganggu proses transfer elektron. 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).

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 (Qoyim, 2004).*

Berdasarkan hadis di atas, terdapat makna bahwa segala macam penyakit pasti terdapat obat yang dapat menyembuhkan (دواء). Hal tersebut terbukti dalam penelitian ini, pengaruh pemberian DMBA dalam kultur sel hepar, yang diasumsikan bersifat kanker dapat diredam aktivitas proliferasinya dengan menggunakan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn). Aktivitas tersebut ditunjukkan dengan adanya penurunan viabilitas sel. Hadis tersebut juga didukung oleh ayat Al-Qur'an dalam surah Ali Imran ayat 191 sebagai berikut:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا

مَا خَلَقْتَهُذَا بَطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

*Artinya: (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka (Qs. Ali Imran:191).*

Al-Maraghi (1986), menerangkan bahwa orang-orang yang berdzikir lagi berpikir (يتفكر) mengatakan bahwa tidak sekali-kali Allah menciptakan alam yang ada di atas dan yang di bumi yang kami saksikan tanpa arti, dan Allah tidak menciptakan semuanya dengan sia-sia (بطلا). Mahasuci Allah wahai Tuhan kami, dari segala yang tidak berarti dan sia-sia, bahkan semua ciptaan-Mu itu adalah

hak, yang mengandung hikmah-hikmah yang agung dan maslahatan-maslahat yang besar

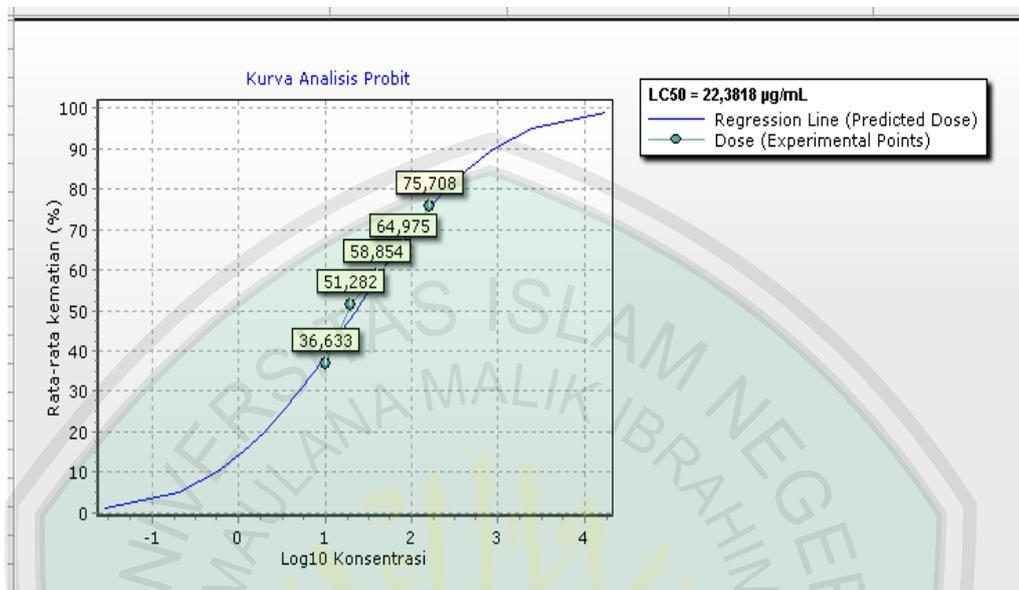
Ayat di atas menerangkan bahwa penciptaan segala sesuatu yang ada di bumi ini memiliki manfaat (بطلا). Hal tersebut dibuktikan dalam penelitian ini bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dapat meredam aktifitas DMBA sebagai karsinogen yang dapat menimbulkan kanker, dengan cara menghambat produksi ATP mitokondria yang ditunjukkan dengan penurunan viabilitas sel hepar.

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

Uji sitoksisitas merupakan uji untuk mengetahui kemampuan suatu ekstrak dalam memberikan efek toksik pada sel dengan konsentrasi tertentu. Uji sitoksisitas ini menggunakan analisis probit untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  dari beberapa konsentrasi ekstrak yang telah diberikan.  $LC_{50}$  (*Median Lethal Concentration*) yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian sel sebanyak 50% kultur sel hepar yang diberi DMBA (7,12- Dimetylbenz( $\alpha$ ) anthracene) yang dapat ditunjukkan dengan grafik dan perhitungan.  $LC_{50}$  dari penelitian ini dapat bermanfaat untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun sirsak terhadap kematian sel hepar yang diinduksi DMBA (7,12- Dimetylbenz( $\alpha$ ) anthracene).

Hasil penelitian menggunakan analisis probit menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) mempunyai efek toksik terhadap kultur sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA 0,1 $\mu$ g/mL selama 48 jam

dengan nilai  $LC_{50}$  22,3818  $\mu\text{g/mL}$ .  $LC_{50}$  didapatkan dari hubungan log konsentrasi dengan persentase kematian yang tercantum dalam kurva 4.5



Gambar 4.5 Kurva analisis probit hubungan antara log konsentrasi dengan persentase kematian sel melalui komputerisasi Biostat 2009 profesional 5.8.4

$LC_{50}$  sebesar 22,3818  $\mu\text{g/mL}$  pada penelitian ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi tersebut ekstrak etanol daun sirsak dapat menyebabkan 50% kematian kultur sel hepar yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene*) 0,1  $\mu\text{g/mL}$  selama 48 jam, sehingga dapat diartikan bahwa konsentrasi 22,3818  $\mu\text{g/mL}$  berpotensi dalam menurunkan proliferasi sel hepar yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene*). Peningkatan konsentrasi pemberian ekstrak etanol daun sirsak, akan meningkatkan kematian pertumbuhan kultur sel hepar yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene*) 0,1  $\mu\text{g/mL}$  selama 48 jam.

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

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

Nilai sitotoksitas ekstrak etanol daun sirsak dengan  $\text{LC}_{50}$  sebesar 22,3818  $\mu\text{g/mL}$  berada antara P2 dan P3, karena pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada P2 sebesar 20  $\mu\text{g/mL}$  dan P3 sebesar 40  $\mu\text{g/mL}$ . Efek sitotoksitas ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan sel hepar yang diinduksi DMBA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktifitas sebagai anti kanker, karena daun sirsak (*Annonamuricata* Linn) memiliki senyawa aktif *acetogenin* sebagai zat anti kanker.

*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).

Adewolo (2009), menyebutkan bahwa *acetogenin* dalam ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki efek kuratif terhadap sel kanker

melalui inhibisi kompleks I mitokondria yang akan mengganggu proses transfer elektron. Inhibisi kompleks I mitokondria oleh *acetogenin* akan menurunkan produksi ATP. Penurunan jumlah ATP akan menginduksi terjadinya apoptosis. Selain itu, penurunan produksi ATP juga dapat mengaktifkan p53 sebagai tumor supresor genes yang menyebabkan terhentinya siklus sel pada fase G1 sehingga dapat mencegah proliferasi sel.

Secara fisiologis, sistem pertumbuhan sel juga diatur oleh sistem keseimbangan sel. Sel hepar yang diasumsikan bersifat kanker memiliki pertumbuhan sel yang berlebih, hal tersebut menunjukkan adanya mekanisme yang tidak seimbang dalam pertumbuhan sel tersebut Allah S.W.T telah berfirman dalam Al-Qur'an surat Al-Mulk ayat 3

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا ۗ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۗ فَارْجِعِ الْبَصَرَ  
هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾

*Artinya: Yang Telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka Lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang? (Qs. Al-Mulk : 3).*

Firman Allah tersebut menunjukkan bahwa dalam penciptaan langit semuanya saling bersesuaian dan seimbang (فطور). Tidak ada pertentangan, benturan, ketidakcocokan, kekurangan, dan kerusakan (Abdullah, 2007).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dalam keadaan seimbang (فطور) Sebagaimana halnya pemberian ekstrak etanol daun sirsak dapat memberikan respon positif terhadap kultur sel hepar yang diasumsikan sebagai sel kanker. Respon positif tersebut berupa terpacunya

mekanisme penghambatan produksi ATP berlebih, sebagai perlawanan terhadap sel hepar yang tumbuh secara berlebih sehingga dapat digunakan sebagai penyeimbang pertumbuhan sel. Cara kerja *acetogenin* dengan cara menurunkan produksi ATP pada mitokondria, selanjutnya penurunan produksi ATP juga dapat mengaktifkan gen p-53 sebagai agen penekan kanker.

Gen p-53 merupakan faktor transkripsi terhadap pembentukan p-21. Peningkatan p-21 yang disintesis dapat menekan CDK. CDK sendiri merupakan protein kinase yang bergantung pada *cyclin* dalam pengaktifannya, dan terjadinya siklus pembelahan sel sangat tergantung pada ikatan kompleks CDK dengan *cyclin*. Apabila terjadi pengikatan p-21, maka semua CDK akan ditekan,, terjadinya penekanan semua CDK pada fase siklus sel mengakibatkan siklus sel berhenti. P-53 akan memicu aktifitas BAX ketika siklus sel berhenti, dimana protein BAX akan menekan aktifitas BCL-2 pada membran dari mitokondria. Perubahan ini mengakibatkan terjadi pelepasan cytotkrom-C ke sitosol. Di sitosol, cytotkrom-C akan mengaktifasi kaskade kaspase dan kaspase yang aktif akan mengaktifkan DNA-se. Kemudian DNA-se yang aktif menembus membran inti dan merusak DNA, sehingga DNA sel yang bersangkutan rusak (fragmentasi) dan akhirnya sel mengalami kematian (apoptosis) (Sudiana, 2008).

Daun sirsak juga mengandung senyawa lain antara lain senyawa polifenol dan flavonoid yang diduga juga berpengaruh terhadap mekanisme kematian kultur sel hepar baby hamster yang diberi DMBA. Adewolo (2009) menyebutkan bahwa ekstrak daun sirsak selain mengandung *acetogenin*. Juga mengandung berbagai macam senyawa kimia lainnya seperti alkaloid, asam lemak, minyak esensial,

flavonoid, saponin, triterpenoid, dan senyawa polifenol yang kemungkinan besar juga memiliki efek anti karsinogenesis.

Senyawa golongan flavonoid juga mampu menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel melalui mekanisme inhibisi enzim topoisomerase. Selain itu flavonoid juga dapat menghambat aktivitas karsinogen melalui inhibisi sitokrom P-450 sehingga senyawa karsinogen menjadi tidak reaktif. Flavonoid juga meningkatkan ekspresi enzim *glutheparon S-transferase* yang dapat mendetoksifikasi karsinogen sehingga cepat dieliminasi tubuh, sedangkan senyawa polifenol bersifat sebagai antioksidan (Ren, 2003).

