

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) TERHADAP  
PROLIFERASI SEL TULANG TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN*  
*VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**ALMERIS HANIFAH BASUKI**

**NIM. 11620068**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2018**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) TERHADAP  
PROLIFERASI SEL TULANG TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN*  
*VITRO***

**SKRIPSI**

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains

(S.Si)

**Oleh:**

**ALMERIS HANIFAH BASUKI**

**NIM. 11620068**



**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)**

**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

**2018**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) TERHADAP  
PROLIFERASI SEL TULANG TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ALMERIS HANIFAH BASUKI  
NIM. 11620068**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal 22 Juni 2018

**Pembimbing I,**



Kholifah Holil, M.Si.  
NIP. 1975 1106 200912 2 002

**Pembimbing II,**



Umairatus Syarifah, M.A.  
NIP. 1982 0925 200901 2 005

**Mengetahui  
Ketua Jurusan Biologi,**



Romadh, M.Si D.Sc  
NIP. 19810201 200901 1 019

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) TERHADAP  
PROLIFERASI SEL TULANG TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
SECARA *INVITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ALMERIS HANIFAH BASUKI  
NIM. 11620068**


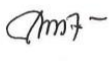


Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan  
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 29, Juni 2018

**Susunan Dewan Penguji**

- |                    |  |
|--------------------|--|
| 1. Penguji Utama : | <u>Dr. drh. Hj. Bayyinatul M.,M.Si</u><br>NIP. 19710919 200003 2 001 |
| 2. Ketua :         | <u>Dr.Hj RetnoSusilowati, M.Si</u><br>NIP. 196711131994022 001       |
| 3. Sekretaris :    | <u>KholifahHolil, M.Si.</u><br>NIP. 1975 1106 200912 2 002           |
| 4. Anggota :       | <u>UmayyatusSyarifah, M.A.</u><br>NIP. 1982 0925 200901 2 005        |

**Tanda Tangan**

(  )  
(  )  
(  )  
(  )

**Mengetahui dan Mengesahkan  
Ketua Jurusan Biologi,**



Romaidi, M.Si D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Almeris Hanifah Basuki

NIM : 11620068

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : **PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) TERHADAP PROLIFERASI SEL TULANG TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk bertanggungjawab jawabkan serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 21. Juni 2018

Yang membuat pernyataan,



Almeris Hanifah Basuki  
NIM. 11620068

## MOTTO

وَلَقَدْ يَسَّرْنَا الْقُرْآنَ لِلذِّكْرِ فَهَلْ مِنْ مُدَكِّرٍ

*17. dan Sesungguhnya telah Kami mudahkan Al-Quran untuk pelajaran, Maka Adakah orang yang mengambil pelajaran?*

*(Q.S. Al-Qomar :17)*

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*Bismillahirrahmanirrahim.*

Tulisan ini saya persembahkan untuk Allah *Subhanahu wa Ta'ala* dan Rasulullah *Sallallahu alaihi wa sallam*, atas segala nikmat yang telah diberikan tanpa henti semenjak tarikan nafas pertama hingga hembusan nafas terakhir. Kemudahan yang telah dijanjikanNya setelah kesulitan merupakan motivasi saya dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.

Terimakasih kepada kedua orang tua saya, terima kasih telah menjadi orang tua terbaik bagi penulis yang tak putus memberikan doa, cinta, kasih sayang dalam setiap langkah saya. Kemudahan saya dalam setiap langkah merupakan doa kedua orang tua yang dikabulkan Allah, semoga dengan selesainya studi ini menjadi sedikit bahagia bagi kedua orang tua saya. Terima kasih kepada adik-adik saya, yang telah menerima segala kekurangan kakak, semoga bisa mengambil pelajaran yang baik dari kakak yang banyak kekurangan ini.

Terima kasih kepada dosen pembimbing saya yang membimbing layaknya orang tua saya, dengan ridho dosen pembimbing semoga ilmu yang telah diberikan menjadi barokah. Terima kasih kepada teman-teman yang selalu menghibur dan memotivasi saya tanpa henti; dan kepada semua pihak yang terlibat dalam hidup saya.

## KATA PENGANTAR

*Alhamdulillahirobbil'alamin*, puji syukur kehadiran Allah *Subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia, ridho yang tiada batas. Segala limpahan rahmat taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Proliferasi Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro*, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains (S.Si).

Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya yang telah berjuang di jalan Allah sehingga Islam sampai pada zaman sekarang.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan bimbingan berbagai pihak. Untuk itu, iringan doa dan ungkapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M. Si., D. Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Kholifah Holil, M. Si. sebagai Dosen Wali dan Dosen Pembimbing Biologi. Terimakasih atas kesabaran serta keikhlasan telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan dalam penyusunan skripsi ini
5. Umaiatus Syarifah, MA selaku Dosen Pembimbing Agama atas bimbingan, dan pengarahan yang diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dosen Penguji Utama atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
7. Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku Ketua Penguji atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.



8. Lil Hanifah, S.Si selaku Laboran Lab. Kultur Jaringan Hewan yang telah banyak membantu dan membimbing dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Segenap Dosen, Koordinator Laboratorium, Staf Administrasi Jurusan Biologi yang telah banyak membantu penyusunan skripsi ini.
10. Ibu Enie Wahyu Listijaningsih dan Ayah Bambang Eko Basuki, adik-adik tersayang Faruq, Dira dan Nafis, serta segenap keluarga yang telah memberikan dukungan dan ketulusan kasih sayang serta doa yang tak pernah berhenti.
11. Teman seperjuangan Fikar dan seangkatan 2011 terima kasih atas dukungannya dalam menyelesaikan tugas akhir ini; Tim KJH dan KJT serta semuanya yang mengenal saya, atas bantuan dan dukungannya baik riil maupun nonriil.
12. Sahabat Biologi seangkatan maupun berbeda angkatan serta semua teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dan semangat selama menyelesaikan skripsi.
13. Serta semua pihak yang telah membantu penulis secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca, utamanya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin ya robbal 'alamin.*

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 25 Juni 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	v
HALAMAN MOTTO .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
مستخلص البحث.....	xvi

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesa penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
1.6 Batasan Masalah.....	3

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sirsak .....	4
2.1.1 Tinjauan Umum Sirsak.....	4
2.1.2 Taksonomi Sirsak .....	4
2.1.3 Morfologi Sirsak.....	5
2.1.4 Kandungan Bahan Aktif Sirsak.....	5
2.2 Tulang .....	6
2.2.1 Osteoblast .....	7
2.2.2 Osteosit .....	8
2.2.3 Osteoklas .....	8
2.2.4 Perkembangan Tulang.....	8
2.3 Kultur Tulang Secara <i>In Vitro</i> .....	9
2.4 Peran Ekstrak Daun Sirsak Terhadap Proliferasi Sel Tulang.....	11

### BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian.....	13
3.2 Variabel Penelitian .....	13
3.3 Waktu dan Tempat.....	13
3.4 Alat dan Bahan .....	13

3.4.1 Alat.....	13
3.4.2 Bahan .....	14
3.5 Prosedur Penelitian .....	14
3.5.1.1 Persiapan Alat .....	15
3.5.1.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak.....	15
3.5.1.3 Pengenceran Dimethylsulfoxide (DMSO).....	15
3.5.1.4 Pengenceran Ekstrak Daun Sirsak dengan DMSO.....	16
3.5.1.5 Penentuan Konsentrasi Ekstrak Daun Sirsak.....	16
3.5.1.6 Pembuatan Media Stok DMEM.....	16
3.5.1.7 Pembuatan Media Kerja... ..	16
3.5.2 Pelaksanaan .....	16
3.5.2.1 Isolasi Kultur Sel Tulang.....	16
3.5.2.2 Kultur Sel Tulang dan Perlakuan.....	17
3.5.3 Pengamatan dan Perhitungan Sel.....	17
3.5.3.1 Pengamatan Sel Tulang.....	17
3.5.3.2 Pengamatan Proliferasi Sel Tulang.....	18
3.6 Analisis Data.. ..	18

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> ) Terhadap Proliferasi Sel Tulang Tikus ( <i>Rattus novogicus</i> ) secara <i>In Vitro</i> .....	19
4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> ) Terhadap Proliferasi Sel Tulang Tikus ( <i>Rattus novogicus</i> ) secara <i>In Vitro</i> .....	21

#### **BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan .....	24
5.2 Saran .....	24

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	25
-----------------------------	----

<b>LAMPIRAN</b> .....	30
-----------------------	----

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Sirsak, Buah Sirsak, dan Biji Sirsak.....	5
Gambar 2.2 Struktur Tulang .....	7
Gambar 2.3 Kultur Sel Tulang yang Telah Konfluen.....	11
Gambar 3.1 Prosedur Penelitian.....	14
Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Sel Tulang .....	19

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.2.1 Rerata Jumlah Sel Tulang Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Telah Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> ) Selama 48Jam.....	21
Tabel 4.2.2 Hasil Uji Lanjut <i>Duncan</i> .....	22

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Gambar Hasil Penelitian.....	30
Lampiran 2 Perhitungan Sel dan Hasil Analisis SPSS.....	31

## ABSTRAK

Basuki, Almeris Hanifah.2018. **Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Proliferasi Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro***. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dosen Pembimbing: (I) Kholifah Holil, M.Si. dan (II) Umaiatus Syarifah, M.A.

**Kata Kunci:** daun sirsak (*Annona muricata*), sel tulang, proliferasi, *in vitro*

Sirsak merupakan salah satu tanaman herbal yang mengandung beberapa senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, asetogenin, vitamin A, vitamin C, vitamin E dan tanin sebagai antioksidan. Flavonoid pada tumbuhan merupakan sumber fitoestrogen yang didapat dari luar tubuh. Fitoestrogen dapat membantu meningkatkan kepadatan tulang pada masa prapubertas dan mencegah osteoporosis pada masa postmenopause. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap proliferasi sel tulang.

Sel tulang diambil dari anak tikus berumur 3 hari dikultur dalam media DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) yang diberi tambahan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dengan dan tanpa ekstrak daun sirsak. Penelitian ini terdiri atas lima perlakuan dengan lima ulangan. Perlakuan yakni kontrol tanpa ekstrak daun sirsak, dan empat konsentrasi ekstrak daun sirsak yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Parameter yang diamati yaitu tingkat proliferasi yang diamati dengan *inverted microscope* dan jumlah sel yang dihitung dengan hemositometer. Hasil pengamatan diuji dengan ANOVA dan uji Duncan. Hasil pengamatan dengan *inverted microscope* menunjukkan kelompok kontrol lebih banyak sel yang menempel pada substrat daripada kelompok perlakuan. Hasil uji ANOVA dan uji Duncan menunjukkan ada pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap proliferasi sel tulang tikus ( $p < 0.05$ ) yaitu menurunkan jumlah sel tulang yang menempel pada substrat. Uji Duncan menunjukkan kelompok kontrol berbeda nyata dengan kelompok konsentrasi 0,5%, sedangkan antar kelompok konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2% tidak berbeda nyata. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) berpengaruh menurunkan proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) namun variasi konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) tidak menunjukkan perbedaan dalam mempengaruhi penurunan proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*).

## ABSTRACT

Basuki, Almeris Hanifah.2018. **The Effect of Soursop Leaf Extract (*Annona muricata*) Against Rat Bone Cell Proliferation (*Rattus norvegicus*) In Vitro**. Thesis. Department of Biology. Faculty of Science and Technology. State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Counselor: (I) Kholifah Holil, M.Si. and (II) Umaiatus Syarifah, M.A.

**Keyword:** Soursop leaf (*Annona muricata*), bone cells, proliferation, *in vitro*

Soursop is one of the herbs that contain several chemical compounds such as alkaloid, flavonoid, polyphenol, acetogenin, vitamin A, vitamin C, vitamin E and tannin as antioxidants. Flavonoid in plants is a source of phytoestrogens obtained from outside the body. Phytoestrogens can help increase bone density in prepubertal periods and prevent osteoporosis in the postmenopausal period. This purpose of this study is to determine the effect of soursop leaves extract on bone cell proliferation.

Bone cells taken from 3-day-old rats cultured in DMEM media (Dubelcco's Modified Eagle Medium) were given an additional 10% FBS (Fetal Bovine Serum) with and without soursop leaf extract. This research were consisted of five treatments with five replications. The treatment was controlled without soursop leaf extract, and four concentrations of soursop leaf extract were 0.5%, 1%, 1.5%, and 2%. The parameters of this research were the proliferation rate that observed by inverted microscope, and the number of cells calculated by the hemocytometer that examined with ANOVA and Duncan test. The result of Inverted microscope showed a control group had more cells attached to the substrate than the treatment group. Then, the result of ANOVA and Duncan test showed that there is an effect of soursop leaf extract on rats bone cell proliferation ( $p < 0.05$ ) i.e. decreasing the number of bone cells attached to the substrate. Duncan test showed that control group significantly different with concentration group as 0.5%, while between concentration group as 1%, 1.5%, and 2% were not significantly different. The conclusion of this research is soursop leaf extract (*Annona muricata*) has effect to decrease rats bone cell proliferation (*Rattus norvegicus*), but variation of soursop leaf extract concentration (*Annona muricata*) did not show difference in decreasing proliferation of rats bone cells (*Rattus norvegicus*).



## الملخص

باسوكي، المايريس حنيفة. ٢٠١٨. تأثير استخراج أوراق قشطة شانكة (اننونا موريكاتا) ضد العظام تكاثر الخلايا الجرد (الجرذ النرويحي) في المختبر. أطروحة. قسم علم الأحياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة الدولة الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج. محاضر علم الأحياء: خليفه هليل، ماجستير المستشار امية الديني: الشريفة، الماجستير

كلمات البحث: أوراق قشطة شانكة (اننونا موريكاتا)، وخلايا العظام، والانتشار، في المختبر

قشطة شانكة هو عشب واحد يحتوي على العديد من المركبات الكيميائية مثل قلويدات، الفلافونويد، بوليفينول اسيتوجينين، فيتامين ا، فيتامين ج، وفيتامين اي والتانين ومضاد للأكسدة. وقد تم تطبيق البحث على نشاط المركبات النشطة في استخراج أوراق قشطة شانكة على نطاق واسع. يوفر استخراج ورقة قشطة شانكة تأثير كايح لانتشار الخلايا السرطانية. وجود مصلحة استخراج أوراق قشطة شانكة يجعل أساس من البحث لتحديد تأثير مستخلص أوراق قشطة شانكة على انتشار الخلايا الطبيعية.

كانت خلايا العظام المأخوذة من الفئران الذين تتراوح أعمارهم بين 3 أيام متقف في دم اي م وسائل الإعلام (دوبي القو في التعديل النسب متوسطة) من قبل 10% ف ب س إضافية (مصل بقري جنيني) مع وبدون استخراج أوراق قشطة شانكة. تتألف الدراسة من خمسة معاملات بخمس تكرارات. معاملة السيطرة من دون استخراج أوراق قشطة شانكة، وأربعة قشطة شانكة استخراج أوراق بتركيز 0.5%، 1%، 1.5%، 2% وكانت المعلمات الملاحظة معدل الانتشار لوحظ من قبل المجهر المقلوب وعدد الخلايا المحسوبة من قبل عدادة الكريات. تم اختبار الملاحظات مع اختبار انوفا و دونجان. الملاحظة مع مجهر مقلوب تظهر المزيد من مجموعة السيطرة على خلايا تعلق على الركيزة من مجموعة العلاج. وأظهرت نتائج انوفا واختبار دنكان أي تأثير مستخلص أوراق قشطة شانكة على خلية العظام في الفئران انتشار ( $p < 0.05$ )، مما يقلل من كمية الخلايا العظمية التي تعلق على الركيزة. أظهر دنكان اختبار كانت المجموعة الضابطة تختلف كثيرا عن تركيز مجموعة من 0.5%، في حين أن التركيز بين مجموعة من 1%، 1.5%، و 2% لم تكن تختلف كثيرا. الاستنتاج من هذه الدراسة هو مستخرج من أوراق قشطة شانكة (اننونا موريكاتا) خفض تأثير على العظام تكاثر الخلايا الفئران (الجرذ النرويحي)، ولكن أظهرت اختلافات في استخراج أوراق تركيز قشطة شانكة (اننونا موريكاتا) لا فرق في التأثير على انخفاض في الفئران الخلايا العظمية انتشار (الجرذ النرويحي).

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Sirsak (*Annona muricata*) merupakan salah satu tanaman dari famili Annonaceae yang banyak tumbuh di daerah tropis dan subtropis (Mahmiah, 2006). Seluruh bagian tumbuhan yang berasal dari famili Annonaceae dikenal sebagai tanaman obat (Baskar dkk., 2007; Mahmiah, 2006; Evira, 2013) karena banyak mengandung senyawa aktif yang penting bagi kesehatan baik penyembuhan maupun pencegahan penyakit. Salah satu bagian dari tanaman sirsak yang berpotensi untuk tanaman obat adalah daun.

Allah SWT berfirman dalam surat Thaha (20): 53

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَوَسَّلَكَ لَكُمُ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً ۖ فَخَرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

53. yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.

Lafal *Syattaa* ini menjadi kata sifat daripada lafal *Azwaajan*, maksudnya, yang bermacam-macam warna dan rasa serta lain-lainnya. Lafal *min nabaatin* berarti dari tumbuhan, yakni berbagai macam tumbuhan yang ditumbuhkan Allah berupa tanam-tanaman dan buah-buahan, baik yang asam, manis, maupun pahit, dan berbagai macam lainnya (Katsir, 2004). Salah satu contohnya yaitu tumbuhan sirsak yang memiliki berbagai macam rasa buahnya, manfaat dan kandungan senyawa.

Daun sirsak mempunyai banyak kandungan senyawa antara lain alkaloid, flavonoid, steroid atau triterpenoid dan asetogenin (Saifulhaq, 2009; Sari, *et al.*, 2010). Dari beberapa kandungan tersebut Annonaceous acetogenins merupakan kandungan terbanyak yang terdapat dalam daun sirsak. Senyawa ini berperan penting sebagai antioksidan dan antiinflamasi terhadap sel-sel abnormal pada tubuh (Wahyuningsih, 2010). Selain kandungan acetogenin yang bersifat antioksidan, juga terdapat kandungan senyawa flavonoid. Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid merupakan sekelompok besar antioksidan dan juga antiinflamasi yang terdiri atas antosianidin, biflavon, katekin, flavanon, flavon dan flavanolol (Wientarsih dkk., 2012). Flavonoid akan meningkatkan ekspresi enzim glutathion S-transferase yang dapat mendetoksifikasi karsinogen sehingga cepat dieliminasi oleh tubuh (Retnani, 2011).

Flavonoid mempunyai efek estrogenik pada tubuh. Tubuh dapat menginduksi estrogen dari luar. Estrogen yang berasal dari luar tubuh yang diperoleh dari tumbuhan disebut fitoestrogen. Kandungan estrogen (fitoestrogen) dan aktifitas estrogenik dalam daun sirsak dapat menjadi salah satu alternatif estrogen dari luar. Fitoestrogen banyak dimanfaatkan untuk meningkatkan kepadatan tulang pada masa prapubertas dan dapat mencegah osteoporosis dikemudian hari (Djuwita, 2011). Menurut penelitian Ohashi *et al.* (1991) reseptor estrogen terdapat pada sel osteogenik dan berperan langsung terhadap proses osteogenesis. Estrogen yang tinggi akan meningkatkan proses osteogenesis melalui ikatan dengan reseptor estrogen dan menstimulasi proliferasi sel.

Kandungan acetogenin, flavonoid dan aktivitas estrogenik yang dimiliki daun sirsak hampir sama dengan kandungan jintan hitam dan batang sipatah-patah yang mampu menstimulasi proliferasi sel tulang. Susana (2014) menyatakan bahwa pemberian ekstrak *Nigella sativa* (NS) 0,5% dan 0.005% dalam medium kultur dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel tulang secara *in vitro*, namun presentase osteosit dan osteoblas tidak berbeda nyata antar kelompok perlakuan, sehingga perlu modifikasi konsentrasi perlakuan

Djuwita (2012) melaporkan bahwa pemberian ekstrak batang tumbuhan sipatah-patah (*Cissus quadrangular*) (QC) 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, dan 1,2 mg/ml ke dalam medium kultur dapat meningkatkan proliferasi osteoblast. Batang sipatah-patah memiliki kandungan flavonoid dan fitoestrogen berupa isoflavon yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga dapat menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel tulang. Hasil penelitian proliferasi sel tulang menunjukkan hasil signifikan daripada kontrol negatif DMEM. Pemberian ekstrak pada dosis CQ 0,6 menunjukkan persentase jumlah osteoblas terendah yakni sebesar  $62,90 \pm 15,93$  dan persentase jumlah osteosit tertinggi sebesar  $37,09 \pm 15$ . Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak batang *Cissus quadrangula* menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas menjadi osteosit. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada dua penelitian tersebut yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Pemberian ekstrak daun sirsak diharapkan dapat meningkatkan proliferasi sel tulang sehingga kerusakan tulang dapat dihindari.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ada pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*?
2. Berapakah konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) yang optimal dalam mempengaruhi proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*?

### 1.3. Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka tujuan dalam penelitian adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) yang optimal dalam mempengaruhi proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

### 1.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ada pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

### 1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Dapat memberikan informasi tentang pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.
2. Dapat memberikan alternative penggunaan daun sirsak sebagai obat herbal dalam mengatasi berbagai hal terkait tulang.

### 1.6. Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sel tulang tikus didapatkan dari tikus (*Rattus norvegicus*) berumur tiga hari yang diperoleh dari Rattus Breeding Centre Malang yang kulitnya masih berwarna merah dan belum ditutupi rambut diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C dalam medium DMEM yang mengandung 10% FBS.
2. Simplisia daun sirsak (*Annona muricata*) diperoleh dari Materia Medica Batu. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.
3. Konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) yang dipakai dalam penelitian ini adalah 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%.
4. Parameter yang diamati adalah proliferasi sel tulang yaitu jumlah sel tulang yang menempel.
5. Medium kultur sel tulang yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium DMEM yang mengandung 10% FBS.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sirsak (*Annona muricata*)

##### 2.1.1 Tinjauan Umum Sirsak (*Annona muricata*)

Sirsak, gun banana, nangka Belanda, atau durian Belanda (*Annona muricata*) berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Di berbagai daerah Indonesia dikenal sebagai nangka sebrang, nangka landa (Jawa), nangka walanda, sirsak (Sunda), nangka buris (Madura), srikaya jawa (Bali), durian betawi (Minangkabau), serta jambu landa (di Lampung). Penyebutan "Belanda" dan variasinya menunjukkan bahwa sirsak (dari bahasa Belanda: zuurzak, berarti "kantong asam") didatangkan oleh pemerintah kolonial Hindia-Belanda ke Nusantara, yaitu pada abad ke-19 (Meiyanto, 2007).

Firman Allah SWT dalam surat Al- A'raf ayat 58 (07:58):

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ ۖ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۖ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًا ۗ كَذَلِكَ  
نُصِرْفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ

58. dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur.

Dalam Tafsir Ibnu Katsir (2003) maksudnya yaitu tanah yang baik akan menumbuhkan tumbuhan dengan cepat dan baik. Mujahid dan ulama lain mengatakan seperti misalnya tanah yang berair dan lain sebagainya. Tanaman sirsak dapat tumbuh baik mulai dari dataran rendah beriklim kering sampai basah dengan ketinggian 1200 m dpl akan tumbuh sangat baik pada keadaan iklim bersuhu 22-28 °C, dengan kelembaban dan curah hujan berkisar antara 1500-2500mm per tahun (Bilqisti, 2013). Pada dataran beriklim kering dan selama terdapat air tanah dangkal (kurang dari 150 cm), tanaman ini masih mampu tumbuh dan berbuah. Curah hujan yang sesuai antara 1.500 – 2.000 mm per tahun dengan musim kemarau selama 4 – 6 bulan (Sunarjono, 2005).

##### 2.1.2 Taksonomi Sirsak (*Annona muricata*)

Taksonomi dari sirsak (*Annona muricata*) adalah :

Kingdom : Plantae

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Ranales
Famili	: Annonaceae
Genus	: Annona
Species	: <i>Annona muricata</i> Linn (Tjitrosoepomo, 1994).

### 2.1.3 Morfologi Sirsak (*Annona muricata*)

Sirsak merupakan tanaman dengan tinggi pohon bisa mencapai 6 meter. Batang coklat berkayu, bulat, bercabang. mempunyai daun sirsak berbentuk bulat telur, berwarna hijau muda sampai hijau tua, dengan ujung daun meruncing, pinggiran rata dan permukaan daun mengkilat, pertulanganya menyirip, panjang tangkai 5 mm. Bunga terletak pada batang atau ranting, daun kelopak kecil, kuning keputihan-putihan, benang sari banyak berambut. Daging buah sirsak berwarna putih dan berbiji hitam sedangkan kulit buah sirsak bergerigi. Akar pohon sirsak berwarna coklat muda, bulat dengan perakaran tunggang (Sunarjono, 2005).



Gambar 2.1 Tanaman sirsak, buah sirsak, dan biji sirsak (Haryoto,1998)

### 2.1.4 Kandungan Bahan Aktif Sirsak (*Annona muricata*)

Allah SWT berfirman dalam surat Al-Hijr (15): 19

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ

19. dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran.

Ibnu ‘Abbas mengatakan tentang *mauzun* artinya *maklum* (diketahui, tertentu), demikian juga dikatakan Sa’id bin Jubair, ‘Ikrimah, Abu Malik, dan Qatadah. Sebagian ulama mengatakan *mauzun* artinya ditentukan kadarnya (Katsir, 2004). Allah menumbuhkan tumbuhan dengan

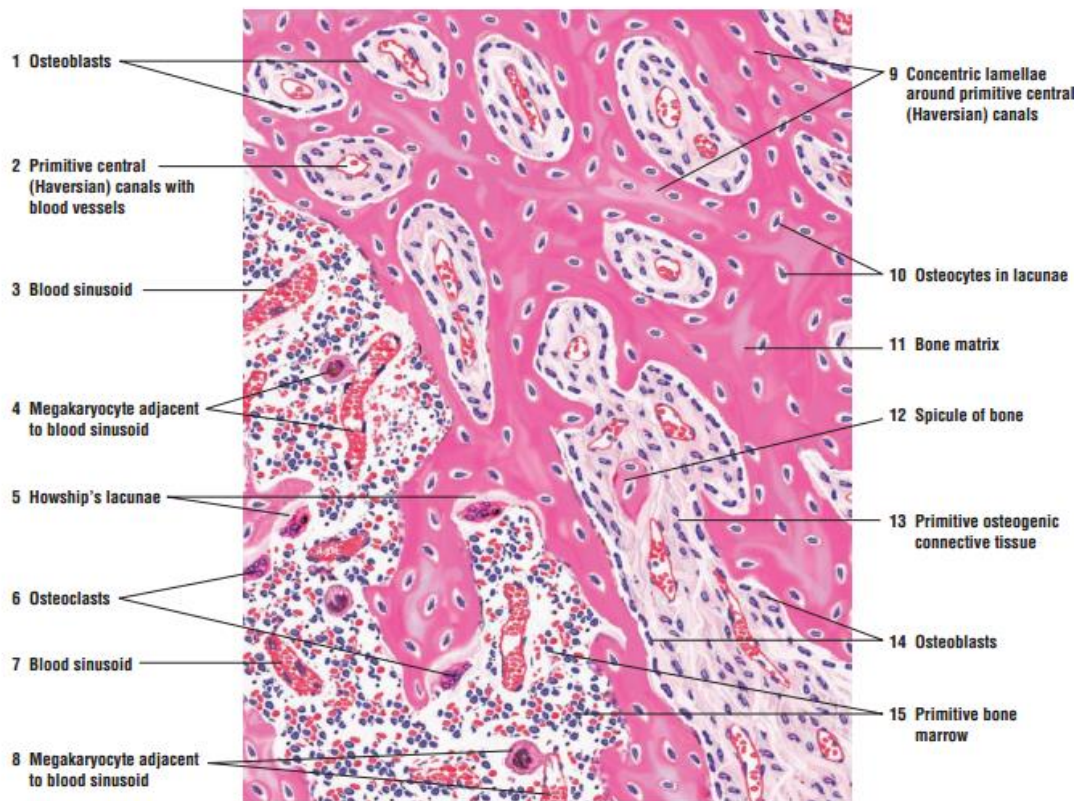
ditentukan kadarnya, setiap tumbuhan memiliki kandungan bahan aktif yang telah ditentukan kadarnya dan berbeda-beda setiap macamnya. Tumbuhan satu dengan yang lain berbeda kandungan aktif dan kadarnya. Salah satu contohnya yaitu tanaman sirsak yang diciptakan dengan kandungan bahan aktif yang bermanfaat bagi manusia.

Tanaman sirsak secara empiris telah digunakan sebagai obat baik daun, akar maupun buah sebagai antioksidan potensial yang merupakan sumber perhatian masyarakat karena khasiatnya dalam pengobatan penyakit kanker (Sunarjono, 2010). Sirsak merupakan salah satu tanaman herbal yang mengandung beberapa senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, asetogenin, vitamin A, vitamin C, vitamin E dan tanin sebagai antioksidan (Saifulhaq, 2009; Sari *et al.*, 2010; Prasetyorini *et al.*, 2014).

Flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel  $\beta$  pankreas, serta meningkatkan efek hormon insulin dan adrenalin (Rianti, 2013). Menurut Rarangsari (2015) aktivitas antidiabetes ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) pada tikus yang diinduksi aloksan tidak mempengaruhi kadar SOD hepar, histologi luas vena sentralis, sinusoid dan jumlah sel normal dan abnormal hepatosit hepar tikus. Wu *et al.* (1995) melaporkan bahwa senyawa *annonaceous acetogenins* selektif sebagai agen sitotoksik terhadap sel tumor paru-paru pada manusia. Firdausi (2013) melaporkan bahwa rebusan daun sirsak (*Annona muricata*) mampu menurunkan presentase konfluenitas terhadap kultur primer sel otak baby hamster yang dipapar DMBA secara *in vitro*. Pemberian ekstrak etanol daun sirsak dapat meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada timus secara signifikan (Dewi *et al.*, 2012).

## 2.2 Tulang

Tulang merupakan bagian tubuh yang memiliki fungsi utama sebagai pembentuk rangka dan alat gerak tubuh, pelindung organ-organ internal, serta tempat penyimpanan mineral (Ca, P) (Djuwita *et al.* 2012). Secara makroskopis tulang tersusun atas beberapa bagian, yakni diafise, epifise, metafise, periosteum, dan osteum. Secara mikroskopis tulang terbentuk atas tiga jenis sel tulang yaitu osteoblast, osteosit, dan osteoklas; matriks ekstraselular tulang terdiri atas serat osteokolagen berupa serat kolagen tipe 1 atau jaringan ikat longgar, dan saluran-saluran yang tersusun secara sempurna dan kompak yaitu sistem *havers* (Tortora dan Derrickson 2009). Berikut ini adalah gambaran struktur tulang:



Gambar 2.2 Struktur Tulang (Eroschenko, 2005)

### 2.2.1 Osteoblas

Osteoblas berasal dari sel pluripoten mesenkim dan menyimpan osteoid, yakni matriks organik yang tidak termineralisasi pada tulang. Osteoblas berfungsi untuk menginisiasi dan mengontrol proses mineralisasi osteoid (Kierszenbaum 2002). Osteoblas berhubungan dengan pembentukan tulang dan ditemukan pada permukaan tulang, yaitu matriks tulang ditambahkan. Bentuk selnya bermacam-macam, dari kuboid sampai piramidal dan seringkali berwujud lembaran utuh yang menyerupai susunan epitel intinya besar dan biasanya memiliki satu anak inti. Sitoplasmanya sangat basofil karena kandungan nukleoprotein yang berperan untuk sintesis unsur organik matriks tulang seperti kolagen dan glikoprotein. Sel-sel ini mempunyai tonjolan-tonjolan sitoplasma mirip jari yang menjulur ke dalam matriks tulang yang sedang dibentuk dan berhubungan dengan tonjolan-tonjolan sitoplasma osteoblas yang berdekatan (Leeson *et.al*, 1996). Osteoblast tersusun seperti epitel selapis, jika aktif mensintesa protein berbentuk kubus, jika tidak aktif terlihat gepeng. Sel ini memiliki tonjolan pendek. Tonjolan menjadi panjang jika sel terpisah dari kumpulan, karena makin banyak bahan organik di sekeliling osteoblas. Saat demikian osteoblast berubah menjadi osteosit (Yatim, 1996).



### 2.2.2 Osteosit

Osteosit berasal dari osteoblas yang berdiferensiasi dan terdapat di dalam lacuna yang terletak diantara lamela-lamela matriks pada saat pembentukan lapisan permukaan tulang berlangsung. Jumlahnya 20.000 – 30.000 per mm<sup>3</sup> (Junqueira dan Carneiro 2005; Tortora dan Derrickson 2009). Setelah pembentukan tulang selesai, sebagian kecil (10-20%) dari osteoblas melekat ke dalam bentuk baru dari matriks ekstraseluler dan kemudian menjadi osteosit (Junqueira dan Carneiro 2005; Lian dan Stein 1996). Sitoplasmanya bersifat basofil ringan mengandung titik-titik lemak, sejumlah glikogen, dan butir-butir halus mirip dengan yang terdapat pada osteoblas. Intinya terpulas gelap. Tonjolan-tonjolan halus sitoplasma osteosit menjulur ke dalam kanalikuli yang memancar keluar lacuna (Leeson *et.al*, 1996).

### 2.2.3 Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa hasil peleburan monosit (jenis sel darah putih) yang terkonsentrasi di endosteum dan melepaskan enzim lisosom untuk memecah protein dan mineral di matriks ekstraseluler (Smith 1993; Ott 2002). Osteoklas bersifat mirip dengan sel fagositik lainnya dan berperan aktif dalam proses resorpsi tulang. Osteoklas merupakan sel fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus (10-20 nuklei) dengan ukuran besar dan berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Marcus *et al.* 1996). Sitoplasma tampak granular dan basofil ringan mengandung vakuola-vakuola yang menandakan adanya lisosom. Permukaan osteoklas yang menghadap matriks penuh dengan tonjolan sitoplasma dan mikrovili (Leeson, *et.al*, 1996).

### 2.2.4 Perkembangan Tulang (Osteogenesis)

Proses pembentukan tulang disebut osteogenesis atau osifikasi. Osifikasi adalah istilah lain untuk pembentukan tulang. Osifikasi (osteogenesis) berdasarkan asal embriologisnya terdapat dua jenis osifikasi, yaitu ossifikasi intramembran yang terjadi pada sel mesenkim yang berdiferensiasi menjadi osteoblast di pusat osifikasi secara langsung tanpa pembentukan kartilago terlebih dahulu dan osifikasi endokondral yaitu mineralisasi jaringan tulang yang dibentuk melalui pembentukan kartilago terlebih dahulu (Leeson *et al.* 1996; Junqueira dan Carneiro 2005).

Ossifikasi intramembran merupakan perkembangan tulang terjadi secara langsung. Selama ossifikasi intramembran, sel mesenkim berproliferasi ke dalam area yang memiliki vaskularisasi yang tinggi pada jaringan penghubung embrionik dalam pembentukan kondensasi sel atau pusat osifikasi primer (Leeson *et al.* 1996; Junqueira dan Carneiro 2005). Proses

osifikasi ini merupakan sumber pembentukan tulang pipih, salah satu diantaranya yaitu tulang pipih kepala. Pada awal perkembangan tulang pipih atap kepala, tulang yang baru dibentuk diendapkan pada pinggir dan permukaan tulang tersebut. Untuk tetap menjaga adanya ruang bagi pertumbuhan otak, rongga kranium harus membesar yaitu dengan cara resorpsi tulang pada permukaan luar dan permukaan dalam oleh osteoklas, bersamaan dengan terjadinya pengendapan tulang yang terus menerus pada kedua permukaan tulang (Leeson *et al.* 1996; Junqueira dan Carneiro 2005).

Osifikasi endokondral adalah proses pembentukan tulang rawan yang terjadi pada masa fetal dari mesenkim lalu diganti dengan tulang pada sebagian besar jenis tulang (Moore dan Agur, 2002). Pusat pembentukan tulang yang ditemukan pada corpus disebut diafisis, sedangkan pusat pada ujung-ujung tulang disebut epifisis. Lempeng rawan pada masing-masing ujung, yang terletak di antara epifisis dan diafisis pada tulang yang sedang tumbuh disebut lempeng epifisis. Metafisis merupakan bagian diafisis yang berbatasan dengan lempeng epifisis (Snell, 2012). Penutupan dari ujung-ujung tulang atau dikenal dengan epifise line rerata sampai usia 21 tahun, hal tersebut karena pusat kalsifikasi pada epifise lineakan berakhir seiring dengan penambahan usia, dan pada setiap tulang (Byers, 2008).

### **2.3 Kultur Tulang secara In Vitro**

Kultur sel (*cell culture*) didefinisikan teknik menumbuhkan dan memelihara sel-sel dari organisme multiseluler di luar tubuh organisme terutama dalam wadah khusus yang ditempatkan pada kondisi lingkungan menyerupai kondisi tubuh organisme seperti temperatur, kelembaban, nutrisi, dan kondisi bebas kontaminasi. Sel, jaringan, dan organ yang diisolasi serta dipelihara pada laboratorium merupakan objek hidup yang dikultur. Perkembangan kultur sel berkaitan erat dengan kultur jaringan dan organ.

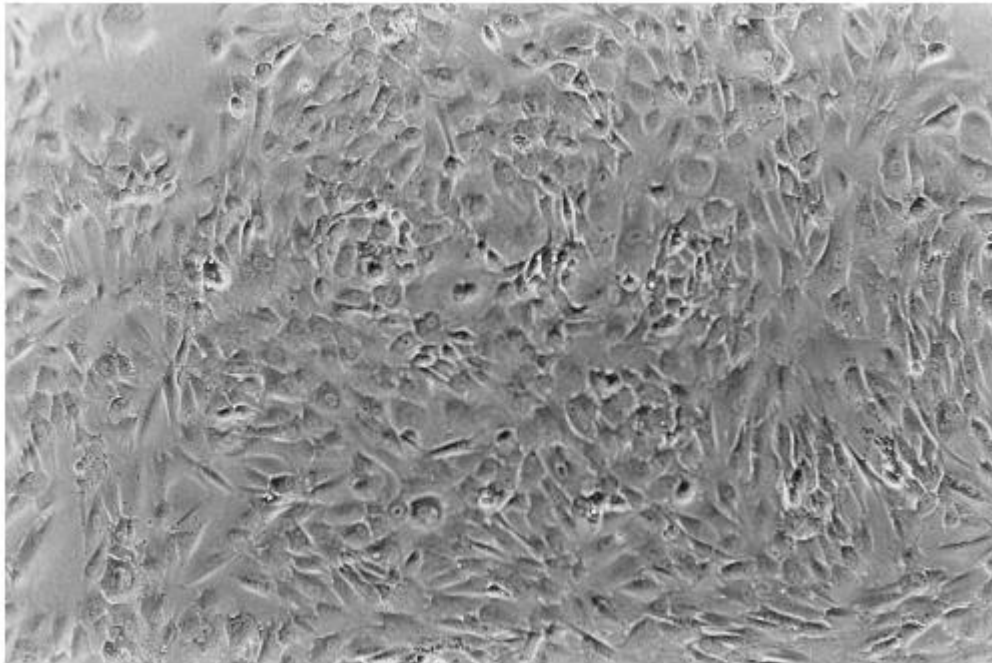
Kultur primer adalah menempatkan sel secara langsung yang berasal dari jaringan hewan ke dalam medium pertumbuhan. Jaringan yang sering digunakan pada kultur sel, antara lain (1) Jaringan epitel, tersusun atas selapis sel yang menutup organ dan saluran seperti kulit dan saluran pencernaan. Sel-sel epitel tumbuh dengan baik pada kultur sebagai sel tunggal monolayer. (2) Jaringan ikat membentuk komponen utama struktur tubuh hewan. Fibroblas merupakan jenis sel jaringan ikat yang paling banyak digunakan untuk kultur sel karena mampu tumbuh dengan baik pada laju pertumbuhan 18-24 jam. Osteoblas merupakan sel dalam jaringan tulang yang dapat ditumbuhkan dalam kultur. (3) Jaringan otot mampu tumbuh dalam kultur khususnya sel myoblas. Sel tersebut mampu berdiferensiasi membentuk myotubes, yakni suatu proses yang hanya bisa diamati dalam kultur. (4) Jaringan saraf dapat ditumbuhkan pada kultur dengan

menambahkan growth factors pada kultur neuron sehingga membentuk neurit. Kultur sel saraf sering digunakan untuk mengetahui pertumbuhan neuroblastoma. (5) Darah dan getah bening (lymph) mengandung suspensi sel yang dapat tumbuh dalam kultur. Limfoblast merupakan salah satu jenis sel darah putih yang secara luas digunakan dalam kultur karena mampu mensekresikan senyawa immunoregulasi (Butler, 2004).

Keberhasilan suatu kultur *in vitro* ditentukan oleh komponen-komponen utama seperti medium, serum, antibiotik, dan faktor pertumbuhan (Halim *et al.*2010). Medium berperan untuk menciptakan kondisi lingkungan dengan pH, tekanan osmotik, dan faktor pendukung lain yang dapat membantu pertumbuhan sel untuk tumbuh dan berkembang secara optimal. Tingkat keasaman medium *in vitro* diatur oleh sistem bufer, yaitu gas CO<sub>2</sub> di inkubator dan ion bikarbonat yang ditambahkan ke dalam medium. Serum yang ditambahkan dalam medium kultur memiliki fungsi utama sebagai faktor hormonal yang menstimulasi pertumbuhan sel, menyediakan biomatriks yang mendukung perlekatan sel, mineral, lipid, dan lain-lain (Freshney 1986). Antibiotik dibutuhkan untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan sel. Faktor pertumbuhan dapat ditambahkan untuk menginduksi pertumbuhan, mempertahankan proliferasi, dan menginduksi proses diferensiasi (Halim *et.al*, 2010). Penambahan serum dalam medium berkisar antara 5-20%. Serum berfungsi sebagai sumber faktor pertumbuhan, faktor hormonal, faktor pelekat sel, dan faktor penyebar sel (Malole 1990). Untuk mengatasi adanya kontaminasi pada kultur dapat ditambahkan antibiotik pada medium (Buttler 2004).

Sel hewan memiliki bentuk dan karakteristik tertentu yang bersatu membentuk jaringan berbeda-beda. Jaringan ikat membentuk komponen utama struktur tubuh hewan. Fibroblas merupakan jenis sel jaringan ikat yang paling banyak digunakan untuk kultur sel karena mampu tumbuh dengan baik pada laju pertumbuhan 18-24 jam. Osteoblas merupakan sel dalam jaringan tulang yang dapat ditumbuhkan dalam kultur (Butler, 2004). Tulang merupakan salah satu jaringan ikat yang dapat dikembangkan dan ditumbuhkan secara *in vitro* (di luar tubuh hewan) untuk tujuan tertentu, seperti mengetahui tingkat proliferasi osteoblas (Butler 2004). Pada individu muda sel osteoblas lebih cepat berproliferasi dan berdiferensiasi dibandingkan individu dewasa (Pradel *et al.* 2008). Kultur osteoblas dilakukan antara lain untuk: (1) mengetahui biokimia dan fisiologi dari pembentukan tulang; (2) mengetahui hingga tingkat molekuler dan seluler dari penyakit tulang; (3) mengetahui peran sel pada garis osteoblastik dalam meregulasi penyerapan tulang; (4) menguji agen terapeutik yang potensial; (5) untuk mengembangkan dan menguji biomaterial baru; dan (6) untuk menggunakan terapi sel pada

teknik jaringan dan transplantasi tulang (Gallagher 2003). Menurut Binderman *et al.* (1974), sel tulang tikus memiliki population doubling time sekitar 2-4 hari. Sel tulang pada penelitian tersebut didapat dengan cara mengisolasi secara langsung tulang tikus. Medium yang digunakan pada penelitian diberi penambahan serum sebesar 10% FCS. Dari penelitian tersebut selain mengetahui proliferasi juga dapat mengetahui diferensiasi sel tulang yang dikultur (Pradel, *et al.* 2008). Berikut ini adalah gambaran kultur sel tulang yang telah konfluen:



Gambar 2.3 Kultur sel tulang yang telah konfluen (Grayeli *et al.*, 2000).

#### **2.4 Peran Ekstrak Daun Sirsak Terhadap Proliferasi Sel Tulang**

Efek biologik estrogen dimulai ketika estrogen (sebagai ligan) berdifusi ke dalam sel lalu berikatan dengan domain pengikat ligan. Sebelum mengikat ligan, reseptor estrogen berada dalam keadaan inaktif di dalam nukleus atau sitoplasma sel dan terikat dengan protein tertentu yang disebut *receptor-associated protein* (RAP). RAP terikat pada domain pengikat DNA (DBD) dan berfungsi sebagai saperon (*chaperone*) yang menstabilkan struktur reseptor sebelum ia teraktivasi. Saat berikatan dengan ligan dan terlepas dari RAP, reseptor akan teraktivasi dan terbentuklah kompleks estrogen-reseptor yang mampu menembus masuk ke nukleus (translokasi) apabila ia masih berada dalam sitoplasma. Kompleks estrogen-reseptor ini akan berikatan dengan bagian tertentu pada DNA yang disebut estrogen-response-element (ERE). Proses ini berlanjut sebagai transkripsi genetik yang kompleks yang menentukan efek biologis estrogen di dalam sel bersangkutan (Grubber *et al.*, 2002).

Fitoestrogen dan aktifitas estrogenik yang didapatkan pada aktifitas flavonoid sirsak mempengaruhi sel tulang pada proses remodeling yaitu proses resorpsi dan pembentukan tulang baru sebagai estrogen alami dari tumbuhan. Fitoestrogen dan flavonoid (isoflavon) dapat menempel pada reseptor estrogen yang berperan penting pada saat terjadinya remodeling tulang. Tahap awal remodeling tulang dimulai dengan inisiasi, osteoblast memerlukan estrogen untuk mengubah osteoklas progenitor menjadi osteoklas aktif. Estrogen juga berperan dalam menempelnya RANK (*receptor activator nuclear factor kappa B*, *NF-κB*) dengan ligannya RANKL untuk menjadikan osteoklas aktif. Dalam proses ini estrogen juga menginduksi produksi TGFβ untuk diferensiasi osteoklas. Setelah osteoklas aktif, dimulai proses resorpsi tulang oleh osteoklas yang akan membentuk *lacunae* atau cekungan. Kemudian osteoklas meninggalkan cekungan itu, lalu materi organik dan matriks tulang dalam cekungan akan dibersihkan oleh sel-sel pembersih. Proses ini dinamakan fase reversal. Kemudian dilanjutkan proses pembentukan tulang, osteoblas akan memerlukan estrogen untuk memproduksi faktor penyeimbang yaitu IGF 1 dan TGF β. Faktor penyeimbang ini menstimulasi proliferasi dan diferensiasi osteoblast pada fase pembentukan tulang. Osteoblast akan berdiferensiasi menjadi osteosit dan berproliferasi untuk mengisi cekungan atau *lacunae*. Proses pembentukan selesai maka remodeling tulang selesai (Lerner, 2006; Sihombing, *et al*, 2012).

Isoflavon memiliki kemampuan dalam mengikat reseptor estrogen-β dalam osteoblas dan menstimulasi proliferasi osteoblas (Yamaguchi 2002; Song *et al.*, 2011). Disamping itu fitoestrogen mampu meningkatkan produksi *insulin-like growth factor* (IGF-1) yang memiliki hubungan positif terhadap pembentukan massa tulang (Rahman *et al.*, 1996). *Insulin-like growth factor* merupakan protein yang menyerupai hormon insulin endogen dan berperan penting dalam pertumbuhan dan metabolisme sel. *Insulin-like growth factor* juga berperan dalam proliferasi sel dan menghambat kematian sel (Hill *et al.*, 1997). Kandungan fitoestrogen yang terdapat dalam Isoflavon yang terkandung dalam fitoestrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen β yang terdapat pada osteoblas dan menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas melalui aktivasi *transforming-growth factor* β (TGF-β) (Kim *et al.*, 1998). *Transforming-growth factor* β merupakan salah satu protein yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi, determinan, diferensiasi, motilitas, dan kematian sel. *Transforming-growth factor* β akan mempengaruhi kerja enzim tirosin kinase yang merupakan enzim penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel (Massague, 1998).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah:

1. K0 : Tanpa perlakuan
2. K1 : sel tulang + ekstrak daun sirsak 0,5%
3. K2 : sel tulang + ekstrak daun sirsak 1%
4. K3 : sel tulang + ekstrak daun sirsak 1,5%
5. K4 : sel tulang + ekstrak daun sirsak 2%

#### 3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* meliputi :

1. Variabel bebas: Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*).
2. Variabel terikat: Proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.
3. Variabel terkontrol: DMEM, CO<sub>2</sub> 5%, FBS 10%, suhu 37 °C.

#### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* dilaksanakan pada bulan Maret - Mei 2018 di Kultur Jaringan Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.

#### 3.4 Alat dan Bahan

##### 3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi neraca analitik, rotary evaporator, LAF (laminar air flow), inkubator CO<sub>2</sub> 5%, oven, autoklaf, mikroskop inverted, hemositometer, tissue culture dish 35 mm-SPL, mortal, pistil, sentrifus, botol schott, erlenmeyer, beaker glass 50 mL, petri dish, gunting, pinset, aluminium foil, mikropipet 20-200 µl, mikropipet 100-1000 µl, TC dish, blue tip, yellow tip, tabung sentrifus, filter single use 0,20 µm, bunsen, korek api, masker, hand glove, nursecup, kantong plastik tahan panas, kertas label dan tissue.

### 3.4.2 Bahan

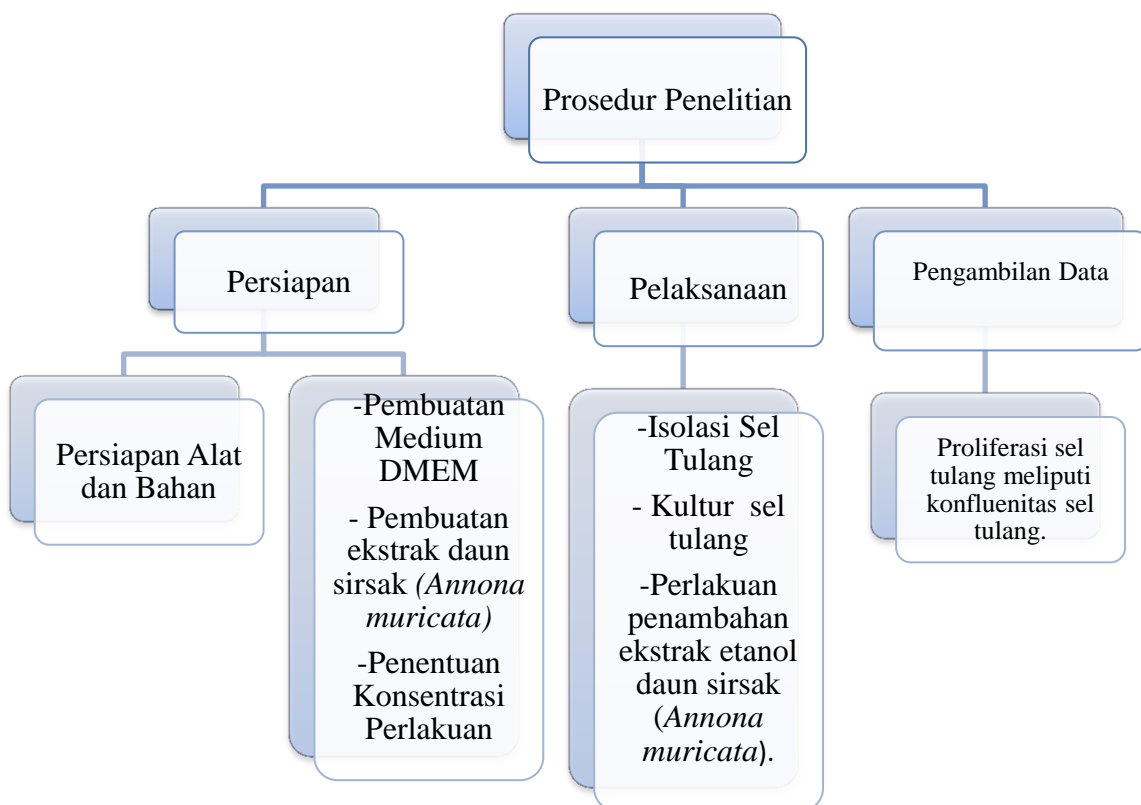
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) berumur tiga hari, ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*), DMEM, aquades, NaCl fisiologis (0,9 %), alkohol 70%, pewarna trypan blue, trypsin, spirtus, penicillin, streptomycin, tissue, spiritus, NaHCO<sub>3</sub>, Hepes, deionized water(DI), FBS, tipol, wipol, dan etanol analitis.

### 3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu:

1. Tahap persiapan: tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan, pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*), pembuatan medium DMEM, dan penentuan konsentrasi perlakuan.
2. Tahap pelaksanaan: tahap ini meliputi isolasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*), kultur sel tulang dan perlakuan penambahan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*).
3. Tahap pengambilan data: tahap ini mengamati proliferasi sel tulang meliputi konfluenitas sel tulang.

Skema prosedur penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 3.1. Prosedur Penelitian

### **3.5.1. Persiapan**

#### **3.5.1.1 Persiapan Alat**

1. Direndam alat-alat yang akan digunakan dengan menggunakan air yang ditambah dengan teepol selama 24 jam.
2. Disikat dan dibilas alat-alat tersebut di bawah air mengalir sebanyak 20x.
3. Dibilas dengan aquades sampai tidak ada busa yang menempel pada glassware.
4. Dikeringkan alat-alat tersebut dalam oven suhu 50°C -60°C. Jika sudah kering dibungkus dengan aluminium foil.
5. Sterilisasi kering untuk glassware dan alat-alat stainless lainnya dalam oven pada suhu 125° C selama 3 jam atau pada suhu 160°C selama 1 jam.
6. Sterilisasi basah untuk alat-alat yang bukan tergolong glassware dan alat-alat stainless dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 50°C -60°C.
7. Simpan alat-alat yang sudah disterilisasi dalam oven dengan suhu 50°C -60°C tersebut atau simpan dalam lemari penyimpanan yang disinari dengan bola lampu dalam ruang steril.
8. Alat-alat siap untuk digunakan (maksimal penyimpanan 48 jam).

#### **3.5.1.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*)**

Sampel yang digunakan adalah serbuk daun sirsak (*Annona muricata*) yang didapatkan di laboratorium Materia Medika kota Batu. Serbuk daun sirsak (*Annona muricata*) diekstraksi menggunakan etanol analitis dengan metode ekstraksi maserasi. Serbuk daun sirsak (*Annona muricata*) direndam etanol 96% selama 24 jam kemudian disaring dengan kertas saring, langkah ini diulang sebanyak dua kali. Kemudian hasil penyaringan tersebut dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator dengan suhu 50-60°C kecepatan 60 rpm sampai ekstrak pekat dan pelarutnya tidak ada.

#### **3.5.1.3 Pengenceran dimethylsulfoxide (DMSO)**

Ekstrak daun sirsak diencerkan dengan dimethylsulfoxide (DMSO) 10% (Violante *et.al*, 2002), untuk mendapatkan konsentrasi DMSO 10% maka dibutuhkan DMSO sebesar 10 ml dan ditambah akuades steril sebesar 90 ml. Stok DMSO digunakan untuk mengencerkan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*).



#### **3.5.1.4 Pengenceran Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) dengan DMSO (dimethylsulfoxide)**

Ekstrak daun sirsak sebanyak 5mg diencerkan kedalam larutan stok DMSO konsentrasi 10% sebanyak 5ml didalam tabung sentrifus. Setelah itu, larutan tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vortex agar partikel-partikel dari ekstrak daun sirsak tersebut dapat homogen. Larutan yang telah homogen disterilkan dengan menggunakan millipore ukuran 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan kedalam botol schot. Larutan tersebut menjadi larutan ekstrak daun sirsak dan DMSO sebanyak 5ml dengan konsentrasi 1%.

#### **3.5.1.5 Penentuan Konsentrasi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*)**

Penentuan konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) adalah:

1. Kelompok K (0 %) = 50  $\mu\text{l}$  Sel tulang + 3000  $\mu\text{l}$  DMEM 10% FBS + 0% Ekstrak.
2. Kelompok P1 (0,5 %) = 50  $\mu\text{l}$  Sel tulang + 2985  $\mu\text{l}$  DMEM 10% FBS + 15  $\mu\text{l}$  Ekstrak.
3. Kelompok P2 (1 %) = 50  $\mu\text{l}$  Sel tulang + 2970  $\mu\text{l}$  DMEM 10% FBS + 30  $\mu\text{l}$  Ekstrak.
4. Kelompok P3 (1,5 %) = 50  $\mu\text{l}$  Sel tulang + 2955  $\mu\text{l}$  DMEM 10% FBS + 45  $\mu\text{l}$  Ekstrak.
5. Kelompok P4 (2 %) = 50  $\mu\text{l}$  Sel tulang + 2940  $\mu\text{l}$  DMEM 10% FBS + 60  $\mu\text{l}$  Ekstrak.

#### **3.5.1.6 Pembuatan Media Stock DMEM**

1. Ditimbang 1.35g DMEM, 0,37g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,006g penicillin, 0,01 gram streptomycin, dan 0,238g Hepes.
2. Dilarutkan bahan-bahan tersebut dalam 100 ml deionized water (DI) steril.
3. Dihomogenkan dengan magnetic stirrer.
4. Difilter dengan menggunakan Millipore ukuran 0,22 $\mu\text{m}$ .
5. Disimpan stock pada suhu 4°C dan siap untuk digunakan.

#### **3.5.1.7 Pembuatan Media Kerja**

Media kerja DMEM dengan 10% FBS dibuat dengan menyiapkan 2700 $\mu\text{l}$  DMEM kemudian ditambah 300 $\mu\text{l}$  FBS, lalu dihomogenkan. Media kerja tersebut dengan volume total 3ml dengan konsentrasi FBS 10%.

### **3.5.2 Pelaksanaan**

#### **3.5.2.1 Isolasi dan Kultur Sel Tulang**

1. Disemprot fetus tikus dengan menggunakan alkohol 70%. Dimasukkan ke dalam LAF yang telah diberi alas aluminium foil.

2. Dilakukan dislokasi dengan cara menekan bagian leher dengan menggunakan pinset dan menarik bagian ekor.
3. Digunting pangkal paha fetus tikus.
4. Diambil tulang femur, fibia, dan tibia. Dibersihkan tulang dari darah
5. Dimasukkan ke dalam beaker glass kecil yang berisi NaCl 0.9%.
6. Dilakukan pembilasan sekali lagi.
7. Dicacah tulang hingga halus.
8. Diwashing hasil cacahan tulang dengan NaCl 0,9%.
9. Disaring hasil cacahan tulang dengan kain sablon steril yang berukuran 230 *mesh*.
10. Dimasukkan hasil saring tulang ke dalam tabung sentrifus steril.
11. Disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 3500rpm.
12. Dibuang supernatant dan pellet ditambah dengan 2 ml NaCl 0,9%.
13. Disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 3500rpm.
14. Dibuang supernatant dan pellet ditambah dengan 2 ml DMEM 0%.
15. Dibuang supernatant, disisakan pellet.

### **3.5.2.2 Kultur Sel Tulang dan Perlakuan**

1. Diambil 50  $\mu$ l pellet sel tulang.
2. Dimasukkan ke dalam medium kerja sebanyak 3000 $\mu$ l yang telah disiapkan dengan setiap perlakuan konsentrasi ekstrak.
3. Diinkubasi dengan suhu 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.
4. Dilakukan pergantian media DMEM 10% FBS dengan beberapa perlakuan konsentrasi ekstrak pada hari ke-4.
5. Kultur dilakukan sampai hari ke-7, untuk melihat tingkat proliferasi sel tulang.

### **3.5.3 Pengamatan dan Perhitungan Sel Tulang**

#### **3.5.3.1 Pengamatan Sel Tulang yang Menempel**

Pengamatan sel tulang yang menempel menggunakan mikroskop *inverted*. Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut telah tumbuh merata dan menempel memenuhi TC dish. Kriteria untuk pengamatan konfluen sel adalah 100% apabila sel sudah menutupi semua wadah TC dish, 75% apabila sel menutupi tiga per empat TC dish, 50% apabila sel menutupi setengah TC dish, 25% apabila sel menutupi satu per empat TC dish dan 0% apabila sel belum menutupi TC dish (Trenggono, 2009).

### 3.5.3.2 Pengamatan Proliferasi Sel Tulang

Tingkat proliferasi ditentukan dengan menghitung jumlah sel pada saat sebelum dikultur dan setelah kultur hari kedua. Pada hari kedua medium dibuang lalu sel hasil kultur dicuci dengan PBS kemudian dimasukkan larutan tripsin 0.1% dalam mPBS sebanyak 1 mL. Sel diinkubasi selama 5 menit sampai sel terlihat soliter dan diamati di bawah mikroskop. Pemipetan berulang dapat dilakukan untuk mempermudah disosiasi sel. Sel yang telah terdisosiasi disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000rpm di dalam PBS. Kemudian sel tulang dihitung dengan hemositometer yang menggunakan trypan blue sebagai pewarna untuk mengetahui sel yang hidup dan sel yang mati atau viabilitas sel. Perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan tripan blue 0,4%. langkah-langkah dalam menentukan viabilitas sel dan tingkat proliferasi sel adalah sebagai berikut :

1. Diambil suspensi sel 10  $\mu$ l.
2. Dimasukkan ke dalam tabung endorf 1,5 mL.
3. Ditambahkan 10  $\mu$ l tripan blue 0,4%.
4. Dihomogenkan selama 5 menit.
5. Diteteskan 10  $\mu$ l suspensi sel pada kedua bilik hemositometer.
6. Dihitung sel dengan rumus:

$$\text{Total sel (sel/mL)} = \text{jumlah sel pada 4 kotak} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4$$

### 3.6. Analisis Data

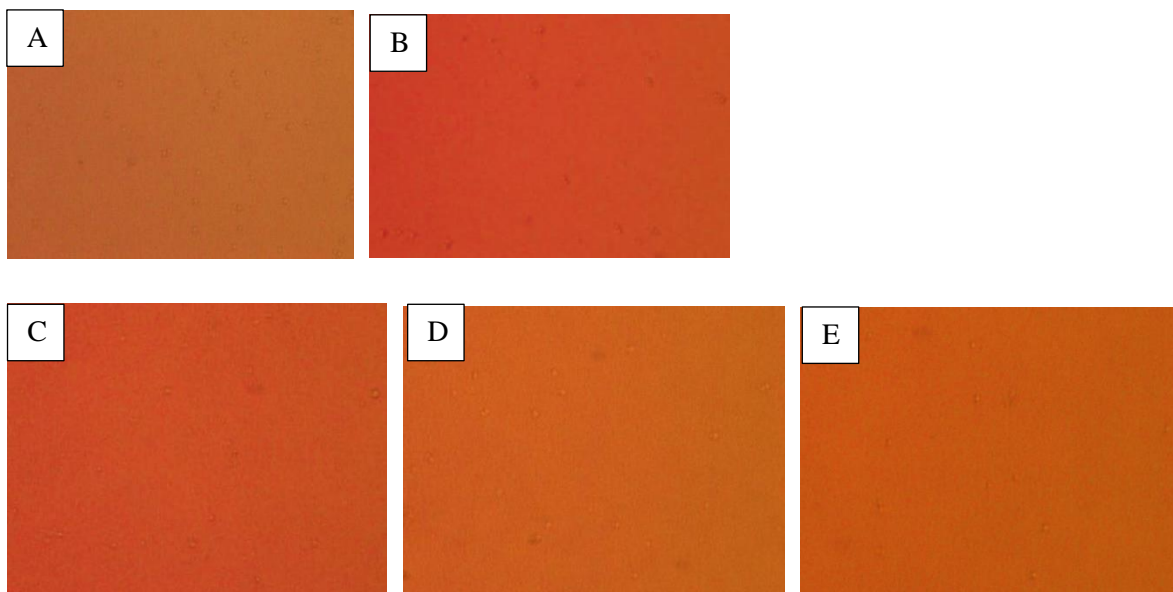
Analisis data dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) secara in vitro. Hasil pengamatan meliputi konfluenitas dari hasil pengamatan dengan *inverted microscope* dan jumlah sel dari hasil perhitungan sel dengan hemositometer. Data dari hasil pengamatan yang sudah dilakukan, diuji statistik dengan ANOVA One Way (*Analysis Of Variance*) atau ANOVA tunggal dengan uji lanjut duncan.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Proliferasi Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*) secara In Vitro

Penelitian pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan eksplan sel tulang tikus berumur tiga hari diberi perlakuan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Hasil penelitian setelah dilakukan inkubasi selama 48 jam sebagai berikut:



Gambar 4.1 Pengaruh Ekstrak daun Sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) dengan perbesaran 200x. (A) Kontrol. (B) konsentrasi ekstrak daun sirsak 0,5%. (C) konsentrasi ekstrak daun sirsak 1%. (D) konsentrasi ekstrak daun sirsak 1,5%. (E) konsentrasi ekstrak daun sirsak 2%.

Hasil penelitian di atas menunjukkan sel tulang dapat menempel pada substrat dengan bentuk *single cell* (untuk melihat gambar lebih jelas dapat melihat lampiran 1). Gambar A merupakan kontrol tampak sel tulang paling banyak menempel. Kultur sel primer memiliki sifat dapat menempel pada substrat setelah dilakukan pemisahan menjadi *single cell*. Sel-sel yang melekat merupakan hasil seleksi dari proses pemisahan atau disgregasi (Trenggono, 2009). Konfluenitas adalah meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi tissue culture dish. Faktor yang mempengaruhi konfluenitas sel secara *in vitro* antara lain lingkungan kultur. Pengaturan lingkungan kultur terdiri atas substrat, suhu dan medium. Komposisi medium yang digunakan untuk kultur sel harus menyediakan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel,

seperti asam amino, vitamin, dan ion. Medium yang dibutuhkan dalam kultur sel pada umumnya membutuhkan bahan-bahan tambahan, antara lain hormon, glukosa, dan factor pertumbuhan (Freshney, 2005). Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media DMEM dan serum FBS sebagai faktor pertumbuhan. DMEM mengandung asam amino dan vitamin empat kali lebih banyak dibanding *Eagle's Basal Medium* (EBM). Penambahan serum dalam medium berkisar antara 5-20%. Serum berfungsi sebagai sumber faktor pertumbuhan, faktor hormonal, factor pelekat sel, dan faktor penyebar sel (Malole 1990). Untuk mengatasi adanya kontaminasi pada kultur dapat ditambahkan antibiotik pada medium (Buttler 2004).

Gambar B, C, D, dan E merupakan perlakuan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi masing- masing 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Pada semua perlakuan tampak sel tulang menempel lebih sedikit daripada kontrol dan yang paling rendah di gambar E yaitu perlakuan dengan konsentrasi 2%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun sirsak, semakin rendah sel tulang yang menempel Hasil pengamatan bisa terjadi karena pemberian ekstrak daun sirsak yang terlalu tinggi konsentrasinya pada sel tulang.

Allah SWT berfirman dalam surat Al-A'la ayat 3 (87:3)

وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ

*dan yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk*

Menurut Imam Mujahid kata *قَدَّرَ* berhubungan dengan celaka atau beruntung, sedangkan kata *هدى* berhubungan dengan petunjuk ataukah kesesatan, petunjuk ( *هدى* ) untuk manusia menurut Imam Mujahid adalah berkaitan dengan beruntung atau celaknya manusia, dan petunjuk bagi hewan adalah berkaitan dengan makanannya. Menurut Ibnu Athiyah kata *قَدَّرَ* adalah penentuan Allah SWT atas segala kemampuan, waktu, kadar, kebaikan, dan kesempurnaan mahluk (Katsir, 2004). Konsentrasi dalam penelitian ini menunjukkan kadar dalam ayat tersebut, selanjutnya dengan kadar atau konsentrasi didapatkan petunjuk. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun sirsak, semakin sedikit sel tulang yang menempel pada substrat.

Pada saat sel tulang ditanam dengan perlakuan ekstrak daun sirsak, ekstrak tersebut menghambat sel tulang menempel pada substrat dengan cara menghancurkan dinding sel. Fenol merupakan salah satu gugus dari *acetogenin* sebenarnya juga merupakan senyawa toksik. Fenol sering digunakan sebagai antiseptik dan antibakteri. Fenol menghancurkan dinding sel dan presipitasi (pengendapan) protein sehingga terjadi koagulasi dan kegagalan fungsi pada sel (Kim, 1998). Restuati (2014) melaporkan Ekstrak etanol daun sirsak berpengaruh terhadap

kerusakan histologi ginjal tikus putih, yaitu sel ginjal terkena degenerasi hidropis yang bersifat *reversible*.

#### 4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Jumlah Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro*

Kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan metabolismenya dalam media kultur menjadi faktor keberhasilan proliferasi kultur sel (Bolt, 2001). Hasil pengamatan pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap jumlah sel tulang tikus secara *in vitro* dapat dilihat dalam tabel berikut:

Tabel 4.2.1 Rerata Jumlah Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Telah Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Selama 48 Jam

Perlakuan	Jumlah sel yang menempel pada ulangan ke-					Rerata (sel/ml)
	1	2	3	4	5	
Kontrol (0%)	82500	80000	70000	60000	57500	70000
P1 (0,5%)	75000	52500	32500	62500	47500	54000
P2 (1%)	45000	42500	32500	12500	27500	32000
P3 (1,5%)	45000	25000	32500	25000	30000	31500
P4 (2%)	20000	12500	22500	12500	25000	18500

Tabel 4.2.1 menunjukkan rerata jumlah sel pada tiap perlakuan berbeda. Jumlah sel kelompok kontrol lebih tinggi daripada kelompok perlakuan. Rerata tersebut kemudian diuji normalitas dan homogenitas dengan hasil normal dan homogen, selanjutnya diuji dengan One Way ANOVA (lampiran 2) dengan hasil signifikansi  $< 0,05$  yang berarti ada pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap proliferasi sel tulang tikus. Hasil ANOVA kemudian diuji lanjut dengan uji *Duncan*. Hasil uji *Duncan* dapat dilihat dalam tabel berikut:

Tabel 4.2.2 Hasil Uji Lanjut *Duncan*

Perlakuan	Rerata	Notasi
Kontrol (0%)	70000	a
P1 (0,5%)	54000	b
P2 (1%)	32000	c
P3 (1,5%)	31500	c
P4 (2%)	18500	c

Uji lanjut *post hoc Duncan* memperlihatkan bahwa kelompok kontrol berbeda nyata dengan kelompok perlakuan konsentrasi 0,5%, sedangkan konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2% tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak daun sirsak menurunkan jumlah sel yang menempel pada substrat. Sirsak dikenal sebagai anti kanker, senyawa aktif yang bersifat anti kanker bekerja pada sel- sel yang aktif membelah (Ifora,2017). Sel tulang merupakan sel yang aktif membelah untuk mempertahankan kepadatan tulang, maka bisa dilihat pengaruh ekstrak daun sirsak pada sel tulang yaitu ekstrak daun sirsak dapat menurunkan jumlah sel yang menempel . aktivitas senyawa aktif pada daun sirsak berperan dalam menurunkan jumlah sel yang menempel pada substrat. Fenol pada sirsak dapat merusak transmembran mitokondria pada sel mamalia (Hermawan,2013). Senyawa golongan flavonoid juga mampu menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel melalui mekanisme inhibisi enzim topoisomerase. Senyawa terpenoid dapat pula memblok siklus sel pada fase G2/M dengan menstabilkan benang-benang spindle pada fase mitosis sehingga proses mitosis dapat terhambat. Terpenoid juga dapat memicu apoptosis melalui mekanisme seperti flavonoid (Ren, 2003; Subianto, 2003). Allah SWT berfirman dalam surat Al-An'am ayat 141 (06:141):

وَهُوَ الَّذِي ۖ أَنشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرِ مَّعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكُلُهُ ۖ  
وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَآتُوا حَقَّهُ ۖ يَوْمَ  
حَصَادِهِ ۚ وَلَا تُسْرِفُوا ۚ إِنَّهُ ۚ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ

141. dan Dialah yang menjadikan kebun-kebun yang berjunjung dan yang tidak berjunjung, pohon korma, tanam-tanaman yang bermacam-macam buahnya, zaitun dan delima yang serupa

*(bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). makanlah dari buahnya (yang bermacam-macam itu) bila Dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya (dengan disedekahkan kepada fakir miskin); dan janganlah kamu berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan.*

Makna lahiriah ayat bila ditinjau dari segi teksnya yang mengatakan: *Maka makanlah dari buahnya bila dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya, dan janganlah kalian berlebih-lebihan.* (Al-An'am: 141) maka *damir* yang ada dikembalikan kepada *al-akl* (makan). Dengan kata lain, janganlah kalian berlebih-lebihan dalam makan, karena hal ini mengakibatkan *mudarat* (bahaya) terhadap akal dan tubuh (Katsir, 2004). Hasil penelitian pada kelompok konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2% merupakan contoh berlebihan dalam hal pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) pada sel tulang memberikan *mudarat* yaitu jumlah sel tulang sedikit.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) berpengaruh menurunkan proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Variasi konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) tidak menunjukkan perbedaan dalam mempengaruhi penurunan proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*).

#### **5.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian dapat dikemukakan saran sebagai berikut:

1. Untuk membedakan sel tulang perlu dilakukan karakterisasi sel.
2. Untuk mengetahui tingkat konfluen, perlu dilakukan perhitungan dengan kertas *millimeter block*.
3. Untuk mengetahui tingkat proliferasi sel tulang yang optimal, konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) perlu diturunkan.
4. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang yang optimal maka perlu diinkubasi dalam waktu yang lebih lama.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adelina, Rosa. Rahmi Febriyanti, Intan Sari Oktoberia, Putri Reno Intan. 2013. Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn. sebagai Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. Vol.4.1.2014:1-12.
- Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. 2007. In Vitro Antioxidant Studies in Leaves of annona Species. *Indian J Exp Biol*. 45(5):480-485.
- Bilqisti F. 2013. Efek Kemopreventif Pemberian Infusa Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Pada Epitel Duktus Jaringan Payudara Tikus Betina Galur Sprague Dawley yang Diinduksi Senyawa 7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene (Dmba) [Skripsi]. Lampung: Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Butler, M. 2004. *Animal Cell Culture And Technology*. Cornwall UK: Bios Scientific Publisher.
- Byers, S.N. 2008. *Basics of Human Osteology and Odontology. Introduction to Forensic Anthropology. Third Edition*. Boston.
- Compston, J.E. 2001. Sex steroids and bone. *Physiol. Rev*. 81:419-447.
- Dewi. L.K, Sri Widyarti, Muhaimin Rifa'i. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata*Linn.) Terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4 dan CD8 pada Mencit (*Mus musculus*). *Biotropica*. Vol 1. No.1.
- Djuwita I, Pratiwi I A, Winarto A, Sabri M. 2012. Proliferasi dan Diferensiasi Sel Tulang Tikus Dalam Medium Kultur In Vitro yang Mengandung Ekstrak Batang *Cissus quadrangula* Salisb. (sipatah-patah). *J Med Vet*. 6(2):75-80.
- Eroschenko VP. 2003. *Atlas histology Di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta: EGC.
- Evira D, 2013. *The Miracle of Fruits*. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Freshney, R.I. 1986. *Culture of Animal Cell, A Manual of Basic Technique*. New York: John Willley And Sons Publication.
- Fitri susana. 2014. Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) pada Kultur In Vitro Sel Tulang Tikus (*Rattus norvegicus*). Srikpsi. Bogor:IPB.

- Gruber CJ, Tschugguei W, Schneebege C, Huber JC. 2002. Production and action of estrogens. *N Engl J Med* .
- Herni Asih Setyorini, Arifayu Addiena Kurniatri, Rosa Adelina dan Winarsih. 2016. Karakterisasi Mutu Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*L.) dari Tiga Tempat Tumbuh. *Buletin Penelitian Kesehatan, Vol. 44, No. 4, Desember 2016 : 279 – 286*.
- Hill, P.A., A. Tumbler, and M.C. Meikle. 1997. Multiple Extracellular Signals Promote Osteoblast Survival and poptosis. *Endocrinology 138:3849-3858*.
- Hill, P.A, Orth, M. 1998. Bone Remodelling. *British Journal of Orthodontics/ Vol.25/ 1998/ 101-107*.
- Iknes Sihombing, Sunny Wangko, Sonny J. R. Kalangi 2014. Peran Estrogen pada Remodeling Tulang. *Jurnal Biomedik, Volume 4, Nomor 3, Suplemen, November 2012, hlm. S18-28*.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2005. *Basic Histology: Text and Atlas. Ed ke- 11*. Poule(Br): Mc Graw-Hill.
- Karimian H, Moghadamtousi SZ, Kadir HA., Rouhallahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, 2014. *Annona muricata* Leaves Induced G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis Through Mitochondrial-Mediated Pathway in Human HCT-116 and HT-29 Colon Cancer Cells, *Journal of Ethnopharmacology. Vol 156:277-289*.
- Katsir, Ismail Ibnu. 2004. *Terjemah Ibnu Katsir*. Bogor: Pustaka Imam Syafi'i
- Kierszenbaum AL. 2002. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. St. Louis (US): Mosby, Inc. An Affiliate of Elsevier.
- Leeson RC, Leeson TS, Paparo AA. 1996. *Buku Ajar Histology. Ed. 7*. Jakarta (ID). Terjemahan dari: Textbook of Histology.
- Lerner,U.H.2006. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res85(7):584-595, 2006*.
- Malole, M.B.M. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat antaruniversitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.

- Manolagas, S.C. 2000. Birth and Death of Bone Cells; Basic Regulatory Mechanisms and Implications for The Pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Review*21(2):115-137.
- Martina Restuati, dan Elen Elizabeth Panggabean.2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Terhadap Gambaran Histologi Organ Ginjal Dan Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus L.*) Dengan Pemberian SRBC Sebagai Antigen. Medan: *Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya.*
- Marcus R, Feldman D, Klasey J.1996. *Osteoporosis*.New York: Academic Pr.
- Massague, J. 1998. TGF- $\beta$ signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*67:753-91.
- Montgomery R, Robert LG, Thomas WC, Arthur AS. 1993. Biokimia: Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Ismadi, penerjemah. Yogyakarta (ID): UGM Pr. Terjemahan dari: *Biochemistry A Case-Oriented Approach.*
- Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, dan Sugiyanto. Penghambatan Karsinogenesis kanker payudara tikus ter-induksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak-etanolik daun *Gynura procumbens*(Lour), Merr. *Majalah Farmasi Indonesia* 2007;18(4):169-17.
- Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Rouhallahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, Karimian H, 2014. *Annona muricata* Leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF-kB. *BMC Complementary and Alternative Medicine. Vol 14 (1): 299.*
- Moore, K.L. dan Agur, A.M.R. 2002. *Anatomi Klinis Dasar*. Jakarta: Hipokrates.
- Nuzula, Firdausi. 2013. *Uji Sitotoksitas Rebusan Daun Sirsak (Annona muricata Linn.) terhadap Kultur Primer Sel Otak Baby Hamster yang Dipapar 7,12 Dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA)* Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ohashi T, Kusuhara S, Ishida K. 1991. Estrogen target cells during the early stage of medullary bone osteogenesis: immuno-histochemical detection of estrogen receptors in osteogenic cells of estrogen-treated male Japanese quail. *Calcif Tissue Int* 49: 124-127.
- Ott SM. 2002. Osteoporosis and bone physiology. *J Am Med.* 228:334-341.

- Parhizkar S, Latiff LA, Rahman SA, Dollah MA, Parichehr H. 2011. Assessing estrogenic activity of *Nigella sativa* in ovariectomized rats using vaginal cornification assay. *Afr J Pharm Pharmacol.* 5(2):137-14.
- Pradel, W., R. Mai, T. Gedrange, and G. Lauer. 2008. Cell passage and composition of culture medium effects proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells from facial bone. *J. Physiol. Pharmacol.* 59(5):47-58.
- Prasetyorini, Zaldy Rusli, Moerfiah, Sri Wardatun. 2014. Potensi Antioksidan Berbagai Sediaan Buah Sirsak (*Annona muricata*). *Penel. Gizi Makan, Desember 2014 Vol. 37 (2): 137-144.*
- Rachman, I.A., A. Baziad, T.Z. Jacob, and H. Isbagio. 1996. Pengobatan estrogen dan progesterone pada osteoporosis pascamenopause. *Majalah Osbtetri dan Ginekologi Indonesia* 20(2):121-127.
- Rarangsari, Novi Endah. 2015. *Pengaruh ekstrak daun sirsak (Annona muricata L.) terhadap SOD dan histologi hepar tikus (Rattus norvegicus) yang diinduksi aloksan.* Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Retnani V. 2011. *Pengaruh suplementasi ekstrak daun Annona muricata terhadap kejadian displasia epitel kelenjar payudara tikus sprague dawley yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA).* Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro: Semarang.
- Saifulhaq, M. 2009. Pengaruh pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat Terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit BALB/C. *Biomedika* 1.2.33.
- Smith R. 1993. Bone physiology and the osteoporotic process. *Resp Med* 87 (Suppl A): 3-7
- Sunarjono H. 2005. *Sirsak dan Srikaya : Budi Daya untuk Menghasilkan Buah Prima.* Bogor: Penebar Swadaya.
- Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat-Obatan.* Yogyakarta:Gajahmada University Press
- Torres MP, Satyanarayana R, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, Johansson SL, Singh PK, Ganti AK, Batra SK, 2012. Graviola: A novel promising natural-derived drug that

inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters*. Vol 323: 29–40.

Tortora, G. J. dan Derrickson, B.H. 2009. *Principles of anatomy and physiology 12th edition*. USA: John Wiley & Sons Inc

Trenggono, Bambang S. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Jakarta: Universitas Trisakti

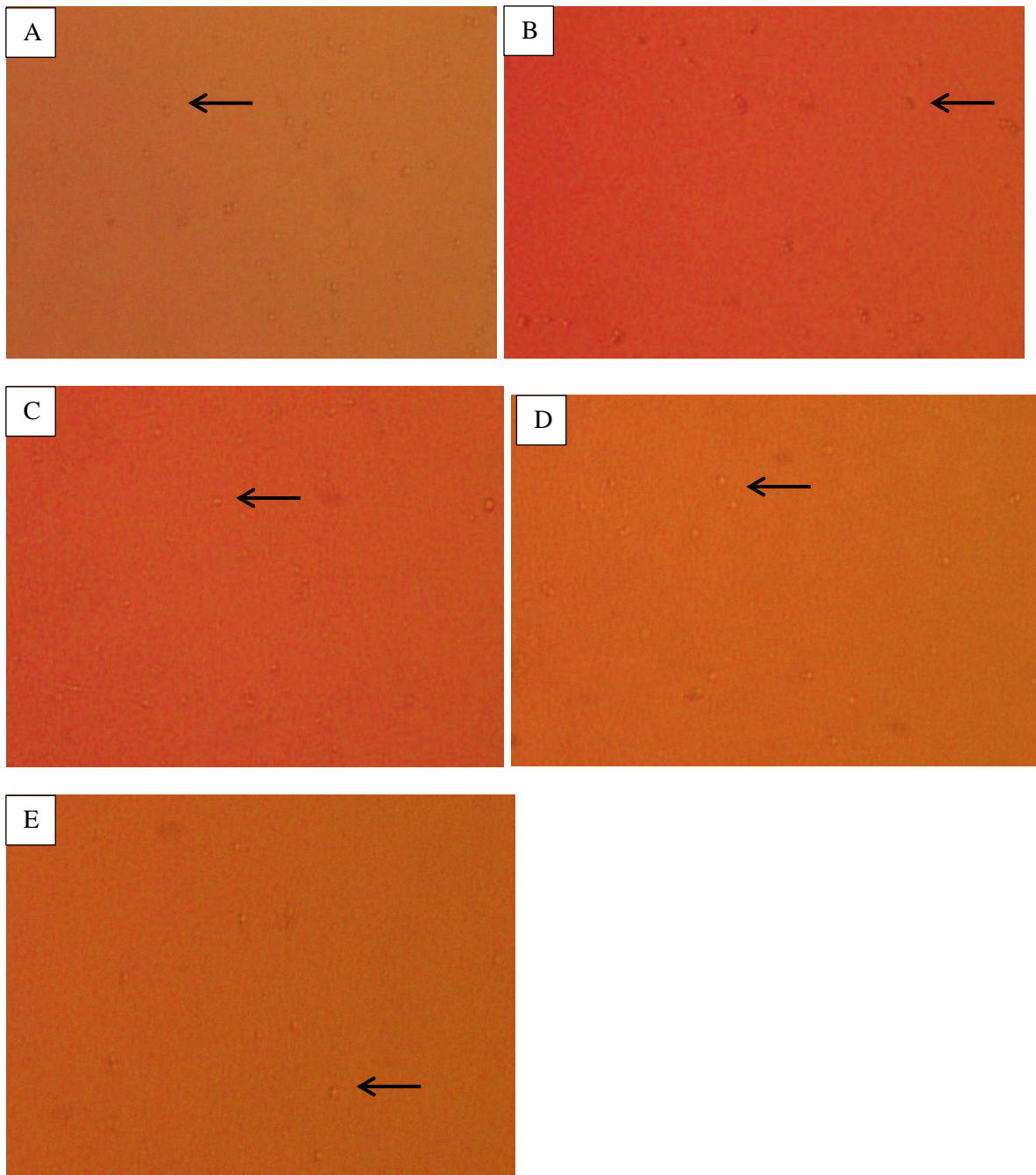
Violante, Georges DA, Naima Zerrouk, Isabelle Richard, Gérard Provot, Jean Claude Chaumeill, and Philippe. 2002. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol. Pharm. Bull.* 25(12) 1600—1603 (2002) Vol. 25, No. 12.

Wientarsih I, Madyastuti R, Prasetyo BF, Firnanda D. 2012. Gambaran serum ureum, dan kreatinin pada tikus putih yang diberi fraksi etil asetat daun alpukat. *Jurnal Veteriner*. 13(1): 57–62.

Yeni Dianita Sari, Sitti Nur Djannah, Laela Hayu Nurani. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata*L.) Secara in Vitro Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 Serta Profil Komatografi Lapis Tipisnya. 2010. *KES MAS* Vol. 4 No. 3, September 2010 : 144 – 239

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil Pengamatan



Pengaruh Ekstrak daun Sirsak (*Annona muricata*) terhadap proliferasi sel tulang tikus (*Rattus norvegicus*) dengan perbesaran 200x. Tanda (←) menunjukkan sel tulang, (A) Kontrol. (B) konsentrasi ekstrak daun sirsak 0,5%. (C) konsentrasi ekstrak daun sirsak 1%. (D) konsentrasi ekstrak daun sirsak 1,5%. (E) konsentrasi ekstrak daun sirsak 2%.

## Lampiran 2. Perhitungan Sel dan Hasil Analisi SPSS

Tabel Perhitungan Jumlah Sel

Perlakuan	U	Jumlah Sel pada kotak ke-				Jumlah sel	Sel/ml	Total sel
		1	2	3	4			
K (0%)	1	7	5	13	8	33	$8.25 \times 10^4$	82500
	2	7	8	6	7	32	$8 \times 10^4$	80000
	3	14	6	5	1	28	$7 \times 10^4$	70000
	4	9	3	5	7	24	$6 \times 10^4$	60000
	5	6	7	3	5	23	$5.75 \times 10^4$	57500
P1 (0,5%)	1	29	0	0	1	30	$7.5 \times 10^4$	75000
	2	12	8	0	1	21	$5.21 \times 10^4$	52500
	3	10	1	0	2	13	$3.25 \times 10^4$	32500
	4	5	7	5	8	25	$6.25 \times 10^4$	62500
	5	1	3	8	7	19	$4.75 \times 10^4$	47500
P2 (1%)	1	6	1	7	4	18	$4.5 \times 10^4$	45000
	2	2	2	4	5	17	$4.25 \times 10^4$	42500
	3	3	2	8	0	13	$3.25 \times 10^4$	32500
	4	1	0	4	0	5	$1.25 \times 10^4$	12500
	5	0	5	5	1	11	$2.75 \times 10^4$	27500
P3 (1,5%)	1	5	7	0	6	18	$4.5 \times 10^4$	45000
	2	0	4	6	0	10	$2.5 \times 10^4$	25000
	3	2	3	0	8	13	$3.25 \times 10^4$	32500
	4	1	1	5	3	10	$2.5 \times 10^4$	25000
	5	2	2	5	3	12	$3 \times 10^4$	30000
P4 (2%)	1	2	4	2	0	8	$2 \times 10^4$	20000
	2	1	0	3	1	5	$1.25 \times 10^4$	12500
	3	3	5	1	0	9	$2.25 \times 10^4$	22500
	4	0	2	3	0	5	$1.25 \times 10^4$	12500
	5	0	6	4	0	10	$2.5 \times 10^4$	25000

Uji Normalitas



### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlahsel
N		25
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	40800.00
	Std. Deviation	2.143E4
Most Extreme Differences	Absolute	.171
	Positive	.171
	Negative	-.093
Kolmogorov-Smirnov Z		.854
Asymp. Sig. (2-tailed)		.460
a. Test distribution is Normal.		

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

jumlahsel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.612	4	20	.210

### Uji ANOVA

#### ANOVA

jumlahsel	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.196E9	4	2.049E9	14.507	.000
Within Groups	2.825E9	20	1.412E8		
Total	1.102E10	24			

## Uji Lanjut Duncan

**jumlahsel**

## Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2%	5	1.85E4		
1.5%	5	3.15E4		
1%	5	3.20E4		
0.5%	5		5.20E4	
0%	5			7.00E4
Sig.		.104	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

### BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Ameris Hanifah Daruki  
NIM : 11620068  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Genap TA. 2017/2018  
Pembimbing : Khalifah Holi, M.Si  
Judul Skripsi : Pengaruh ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Proliferasi Sel Tiang Tikor (*Rattus norvegicus*) Secara In Vitro

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	28-09-2017	Usulan Judul Skripsi	✓
2	13-10-2017	Bab I	✓
3	21-11-2017	Revisi Bab I	✓
4	14-02-2018	Revisi Bab I	✓
5	26-02-2018	Bab II	✓
6	06-03-2018	Revisi Bab II	✓
7	15-03-2018	Bab II	✓
8	19-03-2018	Revisi Bab II	✓
9	02-04-2018	Revisi Bab II	✓
10	11-04-2018	Proposal skripsi Bab I, II, dan III	✓
11	06-06-2018	Bab IV	✓
12	07-06-2018	Revisi Bab IV	✓
13	08-06-2018	Bab IV, Bab V, dan Abstrak	✓

Pembimbing Skripsi,

..Khalifah Holi, M.Si  
NIP. 1975 1106 200912 2 002



