

**UJI ANTIKANKER FIBROSARKOMA EKSTRAK KLOROFORM
BUNGA SIRSAK (*Annona muricata*. L) SECARA *IN VIVO* SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF DENGAN UV-VIS
DAN FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
AHMAD AMINNUDIN
NIM. 10630023



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK

IBRAHIM MALANG

2014

**UJI ANTIKANKER FIBROSARKOMA EKSTRAK KLOROFORM
BUNGA SIRSAK (*Annona muricata*. L) SECARA *IN VIVO* SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF DENGAN UV-VIS
DAN FTIR**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)**

Oleh:

**AHMAD AMINNUDIN
NIM. 10630023**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**UJI ANTIKANKER FIBROSARKOMA EKSTRAK KLOOROFORM
BUNGA SIRSAK (*Annona muricata*. L) SECARA *IN VIVO* SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF DENGAN UV-VIS
DAN FTIR**

SKRIPSI

**Oleh:
AHMAD AMINNUDIN
NIM. 10630023**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:
Tanggal : 3 September 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

Roihatul Muti'ah, M. Kes, Apt
NIP. 19800203 200912 2 003

Begum Fauziyah, M. Farm
NIP. 19830628 200912 2 004

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI ANTIKANKER FIBROSARKOMA EKSTRAK KLOOROFORM
BUNGA SIRSAK (*Annona muricata*. L) SECARA *IN VIVO* SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF DENGAN UV-VIS
DAN FTIR**

SKRIPSI

**Oleh:
AHMAD AMINNUDIN
NIM. 10630023**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal: 3 September 2014**

Penguji Utama	: Ahmad Ghanaim Fasya, M. Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Ketua Penguji	: Nur Aini, M. Si NIPT. 2013091022316	(.....)
Sekretaris Penguji	: Roihatul Muti,ah, M. Kes, Apt NIP. 19800203 200912 2 003	(.....)
Anggota Penguji	: Begum Fauziyah, M. Farm NIP. 19830628 200912 2 004	(.....)

Mengesahkan
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillah,.. Dengan senantiasa memanjatkan puji syukur atas rahmat dan ridlo Allah SWT serta lantunan sholawat salam kepada junjungan Rasulullah Muhammad SAW sehingga karya ini dapat terselesaikan dengan baik dan semoga memberikan manfaat bagi umat sedunia,.. Amien,..

Ku Persembahkan Buah Karya Ini Untuk :

Malaikatku,.. Bapak dan ibuku tercinta,.. Sungguh beruntung Allah menitipkanku padamu, yang tak pernah mengindahikan basah kuyup keringatmu demi membesarkanku,.. Engkau tak pernah memerahkan wajahmu karena kasih sayangmu begitu besar padaku,.. Engkau selalu melantunkan doa kepada yang menitipkanku, yang tak lain untuk kesuksesanku,.. Beribu maaf dari putramu tak akan cukup untuk semua khilaf yang aku lakukan padamu,..

*Terima kasih bapak,.. Engkau telah mengajarkanku tentang tujuan dari hidup ini yang hakiki,..
Terima kasih ibu,.. Engkau adalah separuh nyawaku, dalam setiap langkahku selalu ada doa darimu,..
Lembaran-lembaran ini adalah bagian terkecil kasih sayangku untukmu,.. Hal ini takkan terwujud tanpa kasih sayang yang engkau berikan,..*

Untuk adikku "UMI LAILA" terima kasih sudah menghiburku ketika kakakmu ini lelah dengan tugas-tugas dari kampus,..

Tak lupa,.. Terima kasih ku ucapkan pada tim antikanker fibrosarkoma (Qonita, Ikha', Muslikah & Andre), sahabat-sahabatku (Azrul, Aris, Cemot, Sanusi, Amin, Abdiel, Cingur, Cilok, Kacang, Dublok, Miab, Lukoto) dan segenap keluarga besar kontrakan 36,.. Teman-teman seperjuanganku (Selina, Fina, Desi, Selvi, Mifta, Kholida, Alfin, Andriyani, Asnal, Fery, Riski, Farah, Putri, Fidho, Nadziroh, Laila, Day Shine, Fida, Khoir, dll),.. Temen-temen PKPBA semua,.. Temen-temen KKM kelompok 14 terima kasih sudah bekerja sama dalam ilmu bermasyarakat,..

Eiiiiittss,... Hampir lupa,.. Yang terakhir untuk seseorang yang dulu pernah dihati aku, terima kasih banyak supportnya,.. Untuk yang sekarang ada di hati aku,.. Terima kasih atas semua pengertiannya, supportnya, dan semoga tetap sayang ya sama aku ☺

MOTTO

لَا تَحْزَنْ إِنَّ اللَّهَ مَعَنَا

"Janganlah kamu berduka cita, sesungguhnya Allah beserta kita"

الصَّلَاةُ عِمَادُ الدِّينِ

"Sholat Adalah Tiang Agama"



**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ahmad Aminnudin
NIM : 10630023
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Antikanker Fibrosarkoma Ekstrak Kloroform Bunga
Sirsak (*Annona muricata*. L) Secara *in vivo* Serta Identifikasi
Golongan Senyawa Aktif Dengan UV-Vis dan FTIR

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 disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 9 September 2014
Yang Membuat Pernyataan,

Ahmad Aminnudin
NIM. 10630023

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Maha Besar Allah SWT dengan segala firman-Nya. Segala puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Uji Antikanker Fibrosarkoma Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (*Annona muricata* L.) Secara In Vivo Serta Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Dengan UV-Vis dan FTIR”**.

Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada guru besar kita, Rasulullah SAW beserta keluarga, para sahabat, dan pengikutnya yang istiqomah hingga akhir zaman. Skripsi ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Tersusunnya skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada:

1. Ibu Roihatul Muti'ah, M. Kes, Apt, selaku Pembimbing.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku Konsultan.
3. Ibu Begum Fauziah, M. Farm, selaku Pembimbing Agama.
4. Bapak Ahmad Ghanaim Fasya, M. Si, selaku Penguji Utama.
5. Ibu Nur Aini, M. Si, selaku Ketua Penguji.

Atas bimbingan, pengarahan, dan nasehat serta segala bantuannya kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena

itu, penulis dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, menghaturkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, yang telah memberikan rahmad-Nya sehingga karya ilmiah ini dapat tersusun dengan baik tanpa adanya halangan yang berarti dalam proses penelitian.
2. Rasulullah SAW, yang telah menjadi panutan hidup sehingga penulis dapat meneladani sifatnya yaitu kesabaran dan ketekunan selama proses penelitian berlangsung sampai karya ilmiah ini selesai.
3. Ayah (Suprayit) dan Ibu (Setyo Agus Rini) tercinta, yang telah membesarkan, mendidik, merawat dan senantiasa mencurahkan segalanya baik tenaga, dukungan maupun iringan doa dengan penuh ketulusan.
4. Prof. Dr. Mudjia Rahardjo, M. Si, selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang yang telah memberikan arahan dan nasehat kepada penulis.
7. Bapak Ahmad Ghanaim Fasya, M. Si selaku Dosen Wali yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis
8. Para Dosen Pengajar di Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama menempuh pendidikan di UIN Maliki Malang.

9. Seluruh staf Laboratorium dan Administrasi Jurusan Kimia dan Biologi atas seluruh bantuan dan sumbangan pemikiran selama penyelesaian skripsi ini.
10. Teman-teman angkatan 2010 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah sehingga tetap terjaga persaudaraan kita.
11. Seluruh keluarga besar kimia tetap semangat dan terus semangat, tidak ada kesulitan yang tak dapat diatasi. Semoga ilmu kita dapat bermanfaat untuk masyarakat.
12. Teman-teman Kontrakan 36 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah sehingga tetap terjaga persaudaraan kita
13. Teman-teman Kontrakan Blok Q 1 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah.
14. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, 9 September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR PERSAMAAN	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
ABSTRAK	
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.5 Batasan Masalah	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tumbuhan Berkhasiat Obat dalam Perspektif Islam	9
2.2 Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	10
2.2.1 Morfologi Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	10
2.2.2 Taksonomi Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	12
2.2.3 Penyebaran Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	12
2.2.4 Khasiat Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	13
2.2.5 Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L) ...	14
2.3 Deskripsi Penyakit Kanker Secara Umum	14
2.3.1 Deskripsi Penyakit Kanker Fibrosarkoma	16
2.3.2 Patofisiologi Penyakit Kanker Fibrosarkoma	18
2.3.3 Gejala dan Pengobatan Kanker Fibrosarkoma	19
2.4 Senyawa 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene	21
2.5 Metotreksat Sebagai Obat Antikanker	24
2.6 Tinjauan Hewan Uji Mencit (<i>Mus musculus</i>)	25
2.7 Metode Pemisahan Secara Maserasi	27
2.8 Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak	30
2.9 Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak	33
2.9.1 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis	33
2.9.2 Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis	39
2.9.2.1 Aspek Kuantitatif Spektroskopi UV-Vis	41
2.9.2.2 Hal Penting Dalam Analisis Spektroskopi UV-Vis	41
2.9.3 Identifikasi dengan Spektrofotometri Infra Merah	44
2.10 Uji Antikanker Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	48
2.11 Analisis Data	49

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	50
3.2 Alat dan Bahan	50
3.2.1 Alat Penelitian	50
3.2.2 Bahan Penelitian	51
3.3 Rancangan Penelitian	52
3.4 Tahapan Penelitian	52
3.5 Pelaksanaan Penelitian	53
3.5.1 Preparasi Sampel	53
3.5.2 Analisis Kadar Air	53
3.5.3 Ekstraksi Maserasi dengan Pelarut Kloroform	54
3.5.4 Uji Antikanker Fibrosarkoma	55
3.5.4.1 Persiapan Hewan Uji	55
3.5.4.2 Pembuatan Pelarut CMC-Na 0,5 %	56
3.5.4.3 Pembuatan 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene	56
3.5.4.4 Induksi 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene	56
3.5.4.5 Perlakuan Hewan Uji	57
3.5.5 Identifikasi Senyawa Steroid Dengan KLT Preparatif	59
3.5.6 Identifikasi Senyawa Steroid Dengan Spektrofotometer UV-Vis	59
3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid Dengan Spektrofotometer Infra Merah ..	60
3.5.8 Analisis Data	60

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel	62
4.2 Analisis Kadar Air	63
4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Bunga Sirsak	65
4.4 Aktivitas Antikanker Fibrosarkoma Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak	69
4.4.1 Persiapan Hewan Uji	69
4.4.2 Perlakuan Induksi dan Terapi Terhadap Hewan Uji	71
4.4.3 Aktivitas Antikanker Berdasarkan Volume dan Berat Kanker	80
4.4.4 Aktivitas Antikanker Berdasarkan Gambaran Histopatologi	85
4.5 Pemisahan Senyawa Aktif Metode Kromatografi Lapis Tipis	91
4.5.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik	92
4.5.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	98
4.6 Identifikasi Senyawa Aktif Dengan Metode Spektroskopi	100
4.6.1 Identifikasi Senyawa Aktif Dengan Spektrofotometer UV-Vis	101
4.6.2 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Spektrofotometer Infra Merah	104
4.7 Pemanfaatan Bunga Sirsak dalam Perspektif Islam	109

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	113
5.2 Saran	113

DAFTAR PUSTAKA	114
----------------------	-----

LAMPIRAN	123
----------------	-----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bunga Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> . L)	11
Gambar 2.2 Gambaran Fibrosarkoma Sel Normal dan Kanker Fibrosarkoma	17
Gambar 2.3 Biotransformasi dari 7,12-dimethylbenz(a)antrasene	22
Gambar 2.4 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	26
Gambar 2.5 Struktur Golongan Steroid	32
Gambar 4.1 Grafik Berat Badan Rata-rata Hewan Uji pada Saat Induksi	76
Gambar 4.2 Grafik Berat Badan Rata-rata Hewan Uji pada Saat Terapi	77
Gambar 4.3 Gambaran Histopatologi Kelompok Normal dan Negatif	86
Gambar 4.4 Gambaran Histopatologi Kelompok Positif dan Negatif	87
Gambar 4.5 Gambaran Histopatologi Kelompok Dosis 25 mg dan Negatif	88
Gambar 4.6 Hasil KLT Analitik Senyawa Steroid	94
Gambar 4.7 Spektra Infra Merah Hasil KLT Preparatif Isolat ke-4	106

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Parameter-parameter Aplikasi yang Direkomendasikan	36
Tabel 2.2	Hubungan Warna dengan Panjang Gelombang	40
Tabel 2.3	Pita Absorbansi Infra Merah	45
Tabel 4.1	Kadar Air Bunga Sirsak	64
Tabel 4.2	Rendemen Ekstrak Pekat Kloroform Bunga Sirsak	68
Tabel 4.3	Persentase Angka Kematian Hewan Uji	74
Tabel 4.4	Berat Badan Rata-rata Hewan Uji	78
Tabel 4.5	Perubahan Kenaikan dan Analisis Statistik ANOVA	79
Tabel 4.6	Jumlah Hewan Uji yang Menderita Kanker	81
Tabel 4.7	Analisis Klinis dan Persentase Hambatan Kanker	83
Tabel 4.8	Hasil KLT Analitik Senyawa Steroid	95
Tabel 4.9	Hasil Pemisahan Dengan KLT Preparatif	99
Tabel 4.10	Hasil Serapan UV-Vis	103
Tabel 4.11	Interpretasi Spektra Infra Merah Isolat ke-4	107

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 Kadar Air	54
Persamaan 3.2 Faktor Koreksi	54
Persamaan 3.3 Rendemen Ekstrak	55
Persamaan 3.4 Volume Kanker	58
Persamaan 3.5 Persentase Hambatan	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Diagram Alir Penelitian	123
Lampiran 2.	Skema Kerja	124
Lampiran 3.	Pembuatan Larutan dan Reagen	129
Lampiran 4.	Penentuan dan Perhitungan Dosis	130
Lampiran 5.	Perhitungan Analisis Kadar Air	132
Lampiran 6.	Perhitungan Rendemen Ekstrak	135
Lampiran 7.	Perhitungan Rf Noda Hasil Elusi KLT	136
Lampiran 8.	Data Berat Badan Perlakuan Hewan Uji	138
Lampiran 9.	Uji Normalitas Berat Badan Hewan Uji	140
Lampiran 10.	Perhitungan Anova Berat Badan Hewan Uji	141
Lampiran 11.	Perhitungan Persentase Kematian Hewan Uji	143
Lampiran 12.	Grafik Perhitungan Rerata Berat Badan Hewan Uji	144
Lampiran 13.	Perhitungan Persentase Kejadian Kanker	146
Lampiran 14.	Hasil Analisis Spektra UV-Vis	149
Lampiran 15.	Hasil Analisis Spektra Infra Merah Isolat 4	155
Lampiran 16.	Dokumentasi Penelitian	156

ABSTRAK

Aminnudin, A. 2014. **Uji Antikanker Fibrosarkoma Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (*Annona muricata* L) Secara *In Vivo* Serta Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Dengan UV-Vis dan FTIR.** Pembimbing Utama : Roihatul Muti'ah, M. Kes, Apt, Pembimbing Agama : Begum Fauziyah, M. Farm, Konsultan : Elok Kamilah Hayati, M. Si

Kata Kunci: *Annona muricata*, antikanker, fibrosarkoma, *in vivo*, UV-Vis, FTIR

Usaha penyembuhan kanker fibrosarkoma dengan pengobatan modern belum mampu memberikan hasil yang memuaskan sehingga dilakukan dengan cara-cara pengobatan alternatif tradisional yang berasal dari tumbuhan, salah satunya adalah tanaman Sirsak (*Annona muricata*) yang dimanfaatkan sebagai obat alternatif kanker fibrosarkoma. Allah berfirman dalam al Quran surat asy Syuara ayat 7 bahwa Allah memerintahkan untuk memikirkan apa yang telah diciptakan di bumi berupa tumbuh-tumbuhan yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh dari ekstrak kloroform bunga Sirsak dalam menghambat pertumbuhan kanker fibrosarkoma dan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak bunga Sirsak.

Ekstraksi tanaman menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform selama 24 jam. Ekstrak yang didapat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan pengaliran gas N_2 . Ekstrak pekat selanjutnya digunakan untuk pengujian efek antikanker secara *in vivo*. Kemudian identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan metode KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat (6:4) diamati noda dengan lampu UV 366 nm untuk selanjutnya dikerok noda yang terbentuk dan dilarutkan dengan kloroform. Isolat yang diperoleh diidentifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Infra Merah.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform bunga Sirsak memiliki aktivitas sebagai antikanker fibrosarkoma pada hewan uji yang diinduksi DMBA pada dosis 25 mg/kg BB dengan persentase hambatan pertumbuhan kanker sebesar 3,1%. Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa senyawa yang terpisah dengan eluen n-heksana:etil asetat adalah senyawa steroid dengan terbentuknya noda warna ungu. Hasil identifikasi golongan senyawa steroid dengan UV-Vis dan FTIR terdapat pada panjang gelombang 274 nm dan 321 nm diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi-\pi^*$ dan transisi elektron dari $\eta-\pi^*$. Hasil identifikasi dengan Infra Merah bahwa golongan senyawa steroid tersebut memiliki gugus fungsi O-H, C=O, C=C, C-H, dan C-O.

ABSTRACT

Aminnudin, A. 2014. **Test of Anticancer Fibrosarkoma Chloroform Extract of Soursop Flower (*Annona muricata* L) With *In Vivo* And Identification of Active Compounds Group With UV-Vis and FTIR**. Primary Supervisor: Roihatul Muti'ah, M. Kes, Apt, Religious Advisor: Begum Fauziyah, M. Farm, Consultant: Elok Kamilah Hayati, M. Si

Keywords: *Annona muricata*, cancer, fibrosarcoma, *in vivo*, UV-Vis, FTIR

The efforts of fibrosarcoma cancer treatment with modern medicine has not been able to deliver satisfactory results, so done in ways traditional alternative medicine originating from plants, one of which plant is a Soursop (*Annona muricata*) is used as an alternative medicine cancer fibrosarcoma. Allah says in the Quran letter asy Syuara verse 7 that God commanded to think of what has been created in the earth in the form of herbs are good. The purpose of this study was to determine the effect of chloroform extracts of Soursop interest in inhibiting the growth of fibrosarcoma cancer and to determine the active compounds contained in extracts of Soursop flowers.

Plant extraction using maceration method with chloroform for 24 hours. The extract obtained was separated from the solvent using a rotary evaporator with a N₂ gas flow. Concentrated extract was subsequently used for testing anticancer effects with *in vivo*. Then, the identification of classes of active compounds using TLC with eluent n-hexane: ethyl acetate (6: 4) observed the stain with 366 nm UV light for the next scraped off stains formed and dissolved with chloroform. Isolates obtained were identified by UV-Vis spectrophotometer and Infra Red.

The results of the study showed that the chloroform extract Soursop flowers have anticancer activity in animal test fibrosarcoma induced DMBA at a dose of 25 mg / kg body weight by percentage of growth inhibition of cancer by 3.1%. Results of thin-layer chromatography showed that the compounds were separated with eluent n-hexane: ethyl acetate is a steroid compound with the formation of a purple stain. The results of the identification of classes of steroid compounds with UV-Vis and FTIR are at a wavelength of 274 nm and 321 nm caused by the transition of electrons from the π - π^* and the transition of electrons from η - π^* . Infrared identification results with that group of steroid compounds that have a functional group O-H, C = O, C = C, C-H, and C-O.

المخلص

امين الدين أحمد. ٢٠١٤. مكافحة السرطان اختبار فيبروساركوما الكلوروفورم زهرة استخراج وسيرسك (*Annona muricata. L*) وفي فيفو تحديد المركبات النشطة المجموعة مع UV-فيس و FTIR. المشرف الرئيسي : رويهاطول موتيعه، الماجستير الصيدلي سيد الصحية. المشرف الدين : بيغوم فوزية، الماجستير صيدلية. استشاري : إيلو كا ميلهيا تي، درجة الماجستير في العلوم

الكلمات الرئيسية: *Annona muricata* ، ومكافحة السرطان، فيبروساركوما، فيفو، UV، فيس، FTIR

علاج السرطان الشركات فيبروساركوما بالطب الحديث لم تكن قادرة على إعطاء نتائج مرضية حيث أنها تجري عن طريق الطب البديل التقليدية المشتقة من النباتات، واحدة منها هي محطة وسيرسك (*Annona muricata*) يستخدم كبديل فيبروساركوما السرطان الطب. ويقول الله في نادي القرآن الكريم سورة سيوارا الآية ٧ أن الله أوعز إلى التفكير في ما قد تم إنشاؤها على الأرض في شكل الغطاء النباتي جيد. وكان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد تأثير مستخلصات الكلوروفورم زهور وسيرسك في تثبيط نمو سرطان فيبروساركوما وتحديد المركبات النشطة الواردة في مقتطفات من الزهور وسيرسك. استخراج النباتية باستخدام طريقة النقع مع الكلوروفورم لمدة ٢٤ ساعة. يتم فصل المقتطفات التي تم الحصول عليها من بيلاروتنيا استخدام مبخر دوراني مع تيار غاز N_2 . ثم يتم استخدام خلاصة مركزة اختبار تأثيرات السرطان في المجرة. ثم تحديد فئات من المركبات النشطة باستخدام TLC مع شاطئ ن الهكسان: خلات الإيثيل (٦:٤) لوحظ وصمة عار مع ٣٦٦ نانومتر ضوء الأشعة فوق البنفسجية للبقع كشفت القادمة وشكلت المنحل مع الكلوروفورم. العزلات التي تم الحصول عليها تم تحديدها بواسطة مقياس الطيف الضوئي UV-فيس و FTIR. وأظهرت نتائج الدراسة أن مستخلص الكلوروفورم الزهور وسيرسك لها نشاط السرطان فيبروساركوما على حيوانات الاختبار التي يسببها دمبا في جرعات ٢٥ ملغم / كغم من وزن الجسم عن طريق النسبة المئوية للتثبيط نمو سرطان بنسبة ٣,١%. وأظهرت نتائج طبقة رقيقة اللوني أن المركبات تم فصل مع شاطئ ن الهكسان: خلات الإيثيل هو مركب الستيرويد مع تشكيل وصمة عار الأرجواني. نتائج تحديد فئات من مركبات الستيرويد مع UV-فيس و FTIR هي في طول موجة من ٢٧٤ نانومتر و ٣٢١ نانومتر الناجمة عن انتقال الإلكترونات من $\pi-\pi^*$ و $\eta-\pi$ انتقال الإلكترونات من نتائج تحديد الأشعة تحت الحمراء مع تلك المجموعة من المركبات الستيرويدية التي لديها مجموعة وظيفية O-H، C=O، C-H، C=C و C-O

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker dalam pengertian sederhana adalah sel yang tumbuh terus-menerus secara tidak terkendali, tidak terbatas, dan tidak normal (abnormal). Pertumbuhan sel-sel kanker tidak terkoordinasi dengan jaringan lain sehingga berbahaya bagi tubuh. Konteks lain menyebutkan bahwa kanker merupakan tumor ganas yang mengalami pertumbuhan abnormal yang tidak diketahui secara pasti penyebabnya. Kanker termasuk penyakit yang tidak menular.

Penyebab utama tingginya angka penderita kanker belum diketahui secara pasti oleh para ahli hingga sekarang. Namun, terjadinya kanker dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti keturunan, umur, makanan, bahan kimia, serta pola hidup yang tidak sehat (Maharani, 2009). Sumber lain menyebutkan penyebab kanker dapat dikelompokkan menjadi faktor fisik, virus, dan senyawa karsinogen. Secara umum karsinogen dapat diartikan sebagai penyebab penyakit kanker (Mulyadi, 1998).

Terdapat beberapa jenis dari penyakit kanker yang cukup terkenal akan keganasannya. Salah satunya adalah kanker jenis sarkoma, yaitu kanker yang menyerang jaringan penunjang yang berada dipermukaan tubuh seperti jaringan ikat, termasuk sel – sel yang ditemukan di otot dan tulang. Salah satu jenis kanker sarkoma adalah kanker fibrosarkoma. Menurut Krygier (2009) kanker fibrosarkoma adalah kanker neoplasma ganas yang berasal dari sel mesenkim, dimana secara histologi sel yang paling dominan adalah sel fibroblas.

Data statistik WHO mencatat perkiraan bahwa 1,4 juta kasus kematian disebabkan oleh kanker jenis sarkoma di tahun 2008, dan diperkirakan 458.400 kematian akibat kanker fibrosarkoma. Mayoritas dari semua kasus kematian akibat kanker fibrosarkoma terjadi di negara berkembang (American Cancer Society, 2011). Di Indonesia sendiri tercatat bahwa penderita kanker fibrosarkoma pada tahun 2004 jumlah kasus penderita kanker fibrosarkoma 5.207 penderita. Pada tahun 2005 terdapat 7.850 penderita, tahun 2006 dan 2007 mengalami peningkatan yaitu 8.277 dan 8.328 penderita (Profil Kesehatan Indonesia, 2008).

Melihat dari kasus tersebut, beberapa usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan meliputi pengobatan secara fisik dengan pembedahan maupun pengobatan dengan senyawa kimiawi (*kemoterapi*). Usaha penyembuhan kanker dengan pengobatan tersebut belum mampu memberikan hasil yang memuaskan sehingga dilakukan dengan cara-cara pengobatan alternatif antara lain dengan obat tradisional yang umumnya berasal dari tumbuh-tumbuhan.

Mengingat bahwa Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alamnya. Banyak sekali tumbuh-tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat, karena kandungan bahan aktif yang terkandung dapat digunakan sebagai obat suatu penyakit. Terbukti tanaman obat mampu mengurangi dan menghambat perkembangan sel kanker dalam tubuh. Secara *etnofarmakologi* tanaman telah lama digunakan oleh nenek moyang sebagai obat. Pada prinsipnya tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan kanker berfungsi menghambat pertumbuhan kanker, menghancurkan kanker, dan memperbaiki fungsi organ vital yang rusak oleh kanker. Namun, menurut Mardiana (2004) penggunaan tanaman

sebagai salah satu alternatif pencegahan dan penyembuhan kanker masih membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Keanekaragaman tumbuhan yang dimiliki Indonesia merupakan salah satu nikmat yang diberikan oleh Allah, sehingga kita patut bersyukur dan memanfaatkannya dengan sebaik-baiknya. Allah berfirman dalam al Quran surat asy Syuaraa ayat 7 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. asy Syuaraa : 7)

Pada ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah memerintahkan kita untuk memikirkan apa yang telah Allah ciptakan di bumi (tumbuh-tumbuhan yang baik) sebagai bentuk tanda kekuasaan Allah. Dalam ayat ini, Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam, masing-masing mempunyai karakteristik yang berbeda baik pada daun, bunga, dan buahnya untuk kita pikirkan (manfaatkan) sebagai bentuk syukur kita pada Allah (Departemen Agama, 2007). Menurut Abdullah (2003) kata “memikirkan” dalam ayat al Quran tersebut berarti memanfaatkan, baik digunakan sebagai makanan maupun obat-obatan.

Seperti halnya dengan sabda Nabi Muhammad SAW yang diriwayatkan oleh Ibnu Mas’ud (Syuyuti, 2010):

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عَلِمَهُ مَنْ عَلِمَهُ وَجَهَلَهُ مَنْ جَهَلَهُ

“Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya.” (HR. Ahmad, Baihaqi, dan Al-Hakim).

Menurut Al-Hilali (2010) dalam hadits tersebut terdapat tanda kekuasaan Allah, dimana setiap cobaan (penyakit) yang Allah berikan pasti terdapat suatu obatnya. Manusia dianjurkan untuk berusaha mencari setiap penyelesaian dari cobaan yang Allah berikan tanpa berputus asa dengan keadaan yang dialaminya dan tidak lupa untuk selalu memohon kesembuhan pada Allah. Ungkapan Rasulullah, *“Untuk setiap penyakit ada obatnya...”* memberikan penguatan jiwa kepada orang sakit, serta memberikan dorongan untuk tidak berhenti berusaha mencari obat. Apabila orang sakit meyakini bahwa ada obat yang dapat menyembuhkan penyakitnya, maka terbukalah pintu harapan baginya dan hilanglah keputusasaan dari dalam dirinya (Hakim, 2010).

Salah satu dari tumbuhan atau bagian dari tumbuhan yang digunakan sebagai obat antikanker adalah bunga Sirsak (*Annona muricata*. L). Pada umumnya bagian tanaman yang telah banyak diteliti adalah bagian daun, biji, buah dan bunganya. Arthur *et al.* (2012), Kim *et al.* (1997), dan Sousa *et al.* (2010) meneliti pada bagian daun, sementara Gleye *et al.* (2000) dan Giawa *et al.* (2013) meneliti pada bagian biji. Melot *et al.* (2009) meneliti pada bagian buah, dan Putri (2013) meneliti pada bagian bunganya.

Bukti ilmiah menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata*. L) dapat digunakan sebagai antidiabetes (Purwatresna, 2012; Adewole,

2010). Ekstrak daun Sirsak juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Widiana, 2010). Ekstrak biji Sirsak juga dapat digunakan sebagai pestisida nabati (Santi, 2011). Tanaman Sirsak juga dapat digunakan sebagai antikanker dengan menggunakan bagian daun (Harinta *et al.*, 2011; Hendana, 2012; Rahmawati *et al.*, 2012). Selain itu, daun Sirsak juga berpotensi sebagai antioksidan penurun kadar asam urat (Artini, 2012) dan Mulyawati (2010) dalam penelitiannya tentang biji Sirsak dapat digunakan sebagai insektisida alami.

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut kloroform. Penggunaan pelarut kloroform berdasarkan pada penelitian Putri (2013) memiliki nilai LC_{50} 2,916 ppm, lebih kecil dibandingkan dengan pelarut n-heksana dan etanol yaitu 6,627 ppm dan 833,400 ppm. Dalam penelitian ini sampel yang akan digunakan adalah bunga Sirsak (*Annona muricata*. L). Alasan pemilihan bunga Sirsak sebagai sampel, karena pada bagian ini belum banyak dilakukan penelitian lebih lanjut.

Berdasarkan penelitian tersebut di atas, maka peneliti memilih kloroform sebagai pelarut ekstraksi dengan asumsi bahwa senyawa aktif terutama yang memiliki aktivitas sitotoksik dapat tertarik dengan pelarut tersebut. Penelitian Putri (2013) pada ekstrak kloroform dapat diidentifikasi bahwa golongan senyawa yang dikandung adalah steroid. Putri dan Hidajati (2012) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa senyawa kolestan steroid ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* dapat digunakan sebagai bioinsektisida.

Pada penelitian ini, pemisahan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut kloroform yang bertujuan untuk

mengikat senyawa golongan metabolit sekunder yang bersifat semipolar. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh di uji potensinya sebagai antikanker secara *in vivo* pada hewan uji mencit (*Mus musculus*) dengan parameter variasi dosis yaitu kontrol positif, kontrol negatif, kontrol dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB. Hasil penelitian yang didapatkan, diharapkan dapat mengetahui efektifitas ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*. L) sebagai antikanker fibrosarkoma. Selanjutnya dilakukan pemisahan golongan senyawa aktif yang diduga sebagai antikanker dengan kromatografi lapis tipis preparatif, kemudian dilanjutkan dengan mengidentifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*. L) tersebut dengan menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis dan FTIR yang memiliki aktivitas sebagai antikanker fibrosarkoma.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dari latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat diangkat adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*. L) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker fibrosarkoma pada hewan uji yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) ?
2. Apakah jenis golongan senyawa aktif yang terdapat dalam bunga Sirsak (*Annona muricata*. L) berdasarkan hasil pemisahan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dan identifikasi dengan menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata. L*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker fibrosarkoma pada hewan uji yang diinduksi DMBA.
2. Untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat dalam bunga Sirsak (*Annona muricata. L*) dari pemisahan dengan kromatografi lapis tipis preparatif yang diidentifikasi dengan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian yang akan dilakukan ini adalah masyarakat mendapatkan informasi tentang golongan senyawa aktif yang terkandung dalam bunga Sirsak (*Annona muricata. L*) yang dapat digunakan sebagai obat antikanker. Selain itu, juga dapat mengetahui pengaruh ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata. L*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker pada hewan uji yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA).

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian yang akan dilakukan ini adalah:

- 1) Sampel bunga Sirsak (*Annona muricata. L*) yang diperoleh dari daerah Kabupaten Malang.

- 2) Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut kloroform.
- 3) Identifikasi senyawa aktif golongan steroid digunakan instrumen UV-Vis dan FTIR.
- 4) Senyawa yang berperan sebagai karsinogen adalah 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA).
- 5) Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) berkelamin jantan dengan berat badan 25-30 gram dan berumur 8-12 minggu.
- 6) Metode uji antikanker yang digunakan adalah secara *in vivo*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Berkhasiat Obat dalam Perspektif Islam

Dunia tumbuhan dibagi menjadi *Thallophyta* dan *Embriophyta*. Dalam *Thallophyta* dikenal dengan tumbuhan bersel satu yang berkembang biak dengan membelah diri. Dalam *Embriophyta* dikenal dengan tumbuhan berpembuluh dan lumut. Di bumi, terdapat berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat alternatif. Tumbuhan yang paling banyak digunakan sebagai tanaman obat adalah tumbuhan yang memiliki daun, batang, dan akar sejati dengan mengutamakan tumbuhan berbunga. Firman Allah dalam al Quran surat Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

“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”.(QS. Thaha:53)

Ayat tersebut menjelaskan bahwa banyak jenis tanaman yang mampu tumbuh di bumi dengan adanya air hujan, termasuk di dalamnya tumbuhan yang tergolong ke dalam tumbuhan tingkat rendah dan tumbuhan tingkat tinggi (Savitri, 2008). Allah menurunkan air hujan ke bumi dan menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang berupa tanaman-tanaman dan buah-buahan baik yang

asam, manis maupun pahit, dan berbagai macam lainnya (Departemen Agama, 2007).

Berbagai macam tumbuhan yang tumbuh di bumi memiliki manfaat baik sebagai makanan maupun sebagai obat. Hal ini juga tercantum dalam al Quran surat asy Syuara' ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. asy Syuara':7)

Pada ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah memerintahkan kita untuk memikirkan apa yang telah Allah ciptakan di bumi (tumbuh-tumbuhan yang baik) sebagai bentuk tanda kekuasaan Allah. Dalam ayat ini, Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam, masing-masing mempunyai karakteristik sendiri baik di dalam daun, bunga, dan buahnya untuk kita pikirkan (manfaatkan) sebagai bentuk syukur kita kepada Allah (Departemen Agama, 2007).

2.2 Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

2.2.1 Morfologi Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

Sirsak, Nangka Belanda, atau Durian Belanda (*Annona muricata*) adalah tumbuhan berguna yang berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Pohon tanaman Sirsak mencapai 3-8 m. Daun memanjang, bentuk lanset

atau bulat telur terbalik, ujung meruncing pendek, seperti kulit dengan panjang 6-18 cm. Daun kelopak dan daun mahkota yang terluar dalam kuncup tersusun seperti katup dengan benang sari sangat banyak. Memiliki biji buah belah berwarna hitam dan daging buah berwarna putih. Buah majemuk tidak beraturan dengan bentuk telur miring atau bengkok dan panjang buah 10-15 cm. Bunga berdiri sendiri berhadapan dengan daun dan baunya tidak sedap (Steenis, 2006).

Pada umumnya, bunga Sirsak dapat tumbuh pada batang tumbuhan Sirsak meskipun tidak berhadapan dengan daunnya. Seperti pada Gambar 2.1, bunga Sirsak termasuk berumah satu artinya dalam satu tanaman terdapat dua kelamin (jantan dan betina) yang terdapat dalam bunga Sirsak.



Gambar 2.1 Bunga Tanaman Sirsak (image.google.com)

Masaknya kedua jenis kelamin yang terdapat dalam bunga Sirsak tersebut tidak bersamaan waktunya, sehingga penyerbukan tidak dapat berlangsung. Oleh karena itu dalam sistem penyerbukannya diperlukan serbuk sari yang berasal dari bunga Sirsak pada tumbuhan lain dengan bantuan serangga atau angin (Sudjijo,

2008). Sirsak merupakan tumbuhan obat yang dapat hidup pada iklim tropis. Tanaman Sirsak mampu beradaptasi dengan baik terhadap lingkungan tropis dan tumbuh baik sampai pada ketinggian 1.000 m diatas permukaan laut. Perbanyakan tanaman ini sangat mudah dilakukan melalui biji, akan tetapi cara ini tidak dianjurkan karena dapat berubah sifat yang tidak sesuai dengan induknya.

Hasil observasi di pertamanan Sirsak banyak dijumpai bunga yang tidak membentuk buah (gugur), hal ini disebabkan proses penyerbukan yang kurang sempurna. Di samping itu, pada umumnya buah Sirsak yang dijumpai di pertamanan memberikan tampilan yang tidak menarik, seperti buah berukuran kecil, dan bentuk buah bengkok dengan kulit yang menyerupai duri.

2.2.2 Taksonomi Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

Menurut Putri (2013) klasifikasi ilmiah atau taksonomi tanaman Sirsak (*Annona muricata*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Magnolidae
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i> L.

2.2.3 Penyebaran Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

Penyebaran tanaman Sirsak dengan menggunakan biji. Pada proses penyebarannya dapat dilakukan dengan bantuan manusia atau hewan. Tanaman

Sirsak dapat hidup di Indonesia karena memiliki iklim yang cocok dengan daerah asal dari tanaman tersebut. Tanaman ini sangat mudah untuk dipelihara dan membutuhkan air seperti tanaman lain dengan cara penyiraman secara merata. Tanaman Sirsak dalam penyebarannya di berbagai daerah Indonesia dikenal sebagai *Nangka Sebrang*, *Nangka Landa* (Jawa), *Nangka Walanda*, *Sirsak* (Sunda), *Nangka Buris* (Madura), *Srikaya Jawa* (Bali), *Bohlôna* (Aceh), *Durio Ulondro* (Nias), *Durian Betawi* (Minangkabau), serta *Jambu Landa* (di Lampung) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

2.2.4 Khasiat Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

Pemanfaatan tanaman Sirsak (*Annona muricata*) sebagai obat-obatan sebenarnya bukanlah hal baru dalam pengobatan secara tradisional di Indonesia. Mulai dari nenek moyang kita sampai sekarang pemanfaatan tanaman Sirsak sebagai obat untuk mengobati suatu penyakit masih digunakan. Masyarakat Sunda misalnya, menggunakan buah Sirsak yang masih muda untuk obat penurun tekanan darah tinggi. Sedangkan masyarakat Aceh menggunakan buah Sirsak sebagai obat penyakit hepatitis dan daunnya digunakan sebagai obat sakit batuk. Sementara itu, di daerah Sulawesi Selatan daun Sirsak digunakan sebagai penurun panas. Mardiana (2004) menyatakan bahwa saat ini sudah banyak para dokter dan herbalis yang meresepkan daun Sirsak untuk mengatasi beberapa penyakit.

Bukti ilmiah menyebutkan bahwa Sirsak dapat digunakan sebagai obat anti diabetes mellitus (Purwatresna, 2012). Sirsak juga berpotensi sebagai anti kanker payudara (Retnani, 2011), dan kanker serviks (Rachmawati, 2012). Selain itu,

bukti ilmiah lainnya adalah bahwa Sirsak dapat digunakan sebagai anti bakteri (Widiana, 2011), dan berpotensi juga sebagai insektisida (Mulyawati, 2010).

2.2.5 Kandungan Senyawa Kimia Tanaman Sirsak (*Annona muricata*)

Buah Sirsak memang menawarkan berbagai kandungan positif bagi kesehatan manusia, mulai dari buahnya, daunnya, bahkan pohonnya. Telah banyak diketahui bahwa buah Sirsak banyak mengandung vitamin C, kandungan serat dan nutrisi penting lainnya banyak terkandung dalam buah yang banyak ditemui di negara tropis ini. Indonesia merupakan salah satu negara yang mempunyai pohon Sirsak yang banyak. Tapi ternyata pemanfaatannya hanya sebatas pada buahnya saja, ini karena kurangnya pengetahuan tentang manfaat lain dari bagian tumbuhan Sirsak (Sunarjono, 2005).

Daun Sirsak ternyata mengandung banyak manfaat untuk bahan pengobatan herbal, dan untuk menjaga kondisi tubuh. Dibalik manfaatnya tersebut ternyata tak lepas dari kandungannya yang banyak mengandung acetogenins, annocatacin, annocatalin, annohexocin, annonacin, annomuricin, anomurine, anonol, cacLOURINE, gentisic acid, gigantetronin, linoleic acid, muricapentocin. Kandungan senyawa ini merupakan senyawa yang banyak sekali manfaatnya bagi tubuh, bisa sebagai obat penyakit atau untuk meningkatkan kekebalan tubuh (Zuhud, 2011).

2.3 Deskripsi Penyakit Kanker Secara Umum

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan

di sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta saraf tulang belakang. Dalam keadaan normal, sel hanya akan membelah diri jika terdapat penggantian sel-sel yang telah mati dan rusak. Sebaliknya, sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga akan terjadi penumpukan sel baru. Mangan (2010) menyebutkan bahwa penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal yang nantinya akan merusak dan mengganggu organ yang ditempatinya.

Salah satu pemicu terjadinya kanker adalah senyawa-senyawa yang memiliki sifat karsinogen. Karsinogen adalah bahan yang dapat memicu terjadinya kanker atau keganasan sel-sel dalam tubuh. Karsinogen dapat mempengaruhi DNA atau suatu protein yang berperan pada pengaturan siklus pembelahan sel, seperti *protooncogene* atau *tumor suppressorgene* (Sudiana, 2008). Pada umumnya karsinogen dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu bahan kimia, radiasi, dan virus. Ketiga kelompok ini tersedia di alam, dan diperkirakan akan mengalami peningkatan yang tajam selaras dengan perkembangan budaya atau perilaku manusia.

Kanker tidak termasuk penyakit menular dan pada umumnya tidak menurun secara genetik. Namun, ada beberapa jenis kanker yang dapat diturunkan oleh orang tua pada anaknya, seperti kanker payudara dan kanker nasofaring. Selain itu, ditemukan penyakit *William disease*, yaitu adanya benjolan yang tumbuh dalam ginjal bayi sejak dalam kandungan. Meskipun kanker sama sekali tidak menular, ada beberapa faktor penyebab kanker yang dapat ditularkan misalnya

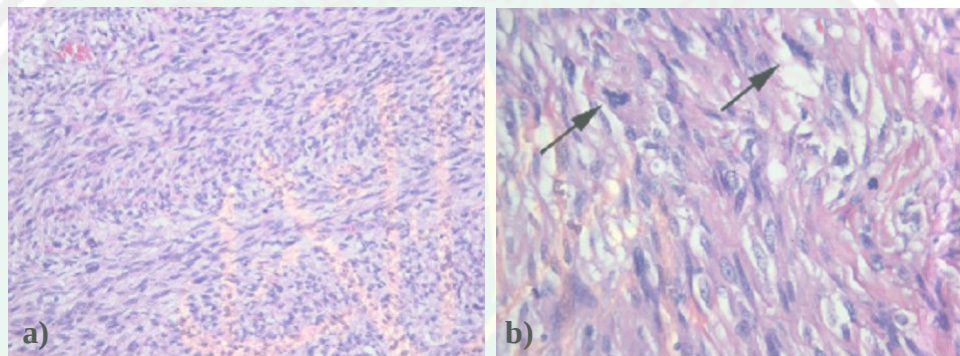
virus hepatitis B yang menjadi salah satu penyebab terjadinya kanker hati (Mangan, 2010).

2.3.1 Deskripsi Penyakit Kanker Fibrosarkoma

Fibrosarkoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari sel mesenkim, dimana secara histologi sel yang dominan adalah sel fibroblas. Pembelahan sel yang tidak terkontrol dapat menginvasi jaringan lokal serta dapat bermetastase jauh ke bagian tubuh yang lain (Krygier *et al.*, 2009). Penyebab pasti dari fibrosarkoma belum diketahui, namun ada beberapa faktor yang sering berkontribusi seperti faktor radiasi yang menyebabkan adanya perubahan genetik oleh karena hilangnya alel, poin mutasi, dan translokasi kromosom.

Selain beberapa penyebab di atas, fraktur tulang, penyakit paget, dan operasi patah tulang juga dapat menimbulkan fibrosarkoma sekunder. Fibrosarkoma merupakan keganasan yang sering terjadi terutama akibat paparan radiasi. Sebagian besar kasus mengenai usia diantaran 30-50 tahun dengan proporsi jumlah laki-laki yang lebih dominan terkena. Seseorang dengan riwayat infeksi tulang atau iradiasi merupakan faktor risiko pada fibrosarkoma sekunder. Fibrosarkoma pada grade yang tinggi merupakan faktor risiko yang signifikan untuk terjadi metastasis dan kekambuhan lokal (Cance *et al.*, 2010). Tingkatan fibrosarkoma dihubungkan dengan resiko metastasisnya. Resiko ini meningkat dengan semakin dalamnya jaringan lunak. Pada fibrosarkoma tingkat tinggi, diiringi dengan resiko yang signifikan untuk bermetastase jauh. Resiko sarkoma meningkat dengan meningkatkan kedalaman jaringan lunak. Yang membahayakan adalah fibrosarkoma tingkat rendah yang dihubungkan dengan kecenderungannya

menyerang bekas luka lokal dan metastase yang luar biasa yang dikenal sebagai *low-grade myxofibrosarcoma*. Neoplasma ini sering menyebabkan kematian pada penderita ketika timbul di tubuh. Fibrosarkoma tingkat rendah, meskipun memiliki karakter ganas, namun mirip dengan tumor desmoid, dimana secara lokal agresif tetapi tidak bermetastasis (Bakotic, 2006).



Gambar 2.2 a) Fibrosarkoma tingkat rendah. Penebalan proliferasi seluler pada sel *spindle* dengan pola pertumbuhan seperti kerangka haring, b) Fibrosarkoma tingkat tinggi. Sel tidak teratur dengan pola pertumbuhan yang tidak jelas. Ketidakteraturan mitosis ditunjukkan dengan anak panah (Bakotic, 2006).

Dalam dua dekade terakhir penderita sarkoma melakukan pengobatan melalui pembedahan (operasi) dan juga melakukan kombinasi kemoterapi dan radioterapi sebagai pengganti amputasi (Smookler *et al.*, 2001). Sebelum dilakukan pembedahan, diberikan kemoterapi yang biasanya akan menyebabkan tumor mengecil. Kemoterapi juga penting karena akan membunuh setiap sel tumor yang sudah mulai menyebar. Kemoterapi yang biasa diberikan adalah Metotreksat, Doxorubicin (adriamisin), Cisplatin, Cyclophosphamide (sitoksan) dan Bleomycin.

Namun cara-cara pengobatan ini seringkali tidak mengatasi kanker dan menimbulkan efek samping. Efek samping operasi diantaranya dapat menyebabkan infeksi, kekambuhan kanker dan luka pada jaringan yang mengelilinginya. Radiasi dapat menyebabkan kelelahan, kehilangan nafsu makan serta kerusakan kulit dan jaringan lunak disekelilingnya. Kemoterapi selain membunuh sel kanker juga dapat membunuh sel normal lainnya dan menimbulkan efek samping seperti muntah, kerontokan rambut, infeksi, kelelahan dan peningkatan daya tahan tubuh (imunoterapi) (Maharani, 2009).

2.3.2 Patofisiologi Penyakit Kanker Fibrosarkoma

Fibrosarkoma dapat terjadi akibat pengaruh paparan radiasi dari lingkungan yang mengakibatkan terjadinya translokasi kromosom pada sekitar 90% kasus. *x-radiation* dan *gamma radiation* paling berpotensi menyebabkan kerusakan jaringan. Ionisasi radiasi menyebabkan terjadinya perubahan genetik yang meliputi mutasi gen, mutasi *mini-satellit* (perubahan jumlah *DNA sequences*), formasi mikronukleus (tanda kehilangan atau kerusakan kromosom), aberasi kromosomal (struktur dan jumlahnya), perubahan ploidi (jumlah dan susunan kromosom), *DNA stand breaks* dan instabilitas kromosom. Ionisasi radiasi mempengaruhi semua fase dalam siklus sel, namun fase G_2 merupakan yang paling sensitif (Cance *et al.*, 2010).

Sepanjang hidup sel pada sumsum tulang, mukosa usus, epitelium testikular seminiferus, folikel ovarium rentan mengalami trauma dan sebagai akibatnya akan selalu mengalami proses mitosis. Iradiasi selama proses mitosis mengakibatkan aberasi kromosomal. Tingkat kerusakan bergantung pada

intensitas, durasi, dan kumulatif dari radiasi. DNA dapat mengalami kerusakan secara langsung maupun tidak langsung melalui interaksi dengan *reactive products* yang berupa radikal bebas. Pengamatan terhadap kerusakan DNA diduga sebagai hasil perbaikan DNA atau sebagai akibat dari replikasi yang salah. Perubahan ekspresi gen memicu timbulnya suatu tumor. Sebagai akibat paparan *x-radiation* dan *gamma radiation* sangat kuat berkorelasi terhadap timbulnya keganasan atau kanker. Kerusakan DNA yang dimanifestasikan dalam bentuk translokasi kromosom gene COL1A1 pada kromosom 17 dan gen *platelet-derived growth factor B* pada kromosom 22 mengakibatkan terjadinya keganasan pada jaringan fibrous. Perubahan fibrosarkoma dicirikan dengan pertumbuhan pola *herringbone* yang nampak pada klasik fibrosarkoma (Wong, 2008).

2.3.3 Gejala dan Pengobatan Kanker Fibrosarkoma

Gejala pada fibrosarkoma pada awal mulanya sering tidak tampak atau tanpa dirasakan adanya nyeri. Biasanya tumor baru tampak setelah timbul gejala dan teraba suatu benjolan. Pada sisi yang besar terjadi peregangan pada kulit dan nampak mengkilat berwarna keunguan. Pada massa yang sangat besar terjadi pelebaran pembuluh darah vena. Tanda dan gejala pada fibrosarkoma sulit dibedakan dari tumor lainnya sehingga diperlukan pemeriksaan jaringan dengan mikroskop sehingga didapatkan grade dan staging dari fibrosarkoma (Sriwibowo, 2005).

Menurut Maharani (2009) pencegahan dan pengobatan kanker ada tiga cara yaitu dengan menggunakan radioterapi, kemoterapi, dan pembedahan. Namun, terdapat cara lain untuk pencegahan dan pengobatan kanker khususnya

kanker fibrosarkoma. Berikut ini adalah langkah-langkah yang biasa dilakukan untuk menangani kanker fibrosarkoma.

1. Penghilangan Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa kimia yang bermuatan listrik yang terdapat dalam tubuh serta dapat menyerang dan merusak protein serta DNA sehingga dapat mengubah informasi genetis. Jika kerusakan terjadi pada segmen-segmen DNA dari suatu sel yang mengontrol pertumbuhan sel, maka kanker dapat berkembang dari sel-sel yang mengalami kerusakan tersebut.

Bagaimana pun, beban berlebihan yang diakibatkan oleh radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan pada sistem yang memiliki kemampuan dapat menghancurkan radikal bebas dalam tubuh, juga kerusakan pada sistem-sistem yang berfungsi memperbaiki DNA. Kerusakan sistem imun juga dapat mendorong perkembangan radikal bebas dalam tubuh untuk membentuk sel kanker.

2. Senyawa Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang mencegah suatu tipe reaksi kimia yang dapat disebut dengan oksidasi. Oksidasi merupakan sumber utama pembentukan radikal bebas. Antioksidan juga membersihkan radikal bebas yang terdapat dalam tubuh. Antioksidan yang secara alamiah antara lain adalah beta karoten, vitamin E, dan vitamin C. Buah-buahan dan sayuran juga merupakan sumber-sumber yang kaya akan senyawa yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan.

3. Olahraga Secara Teratur

Olahraga secara regular dan teratur dapat mengurangi resiko kanker fibrosarkoma. Seseorang yang teratur dalam berolahraga memiliki resiko yang lebih rendah dibandingkan seseorang yang sama sekali tidak pernah berolahraga.

4. Operasi untuk Pencegahan

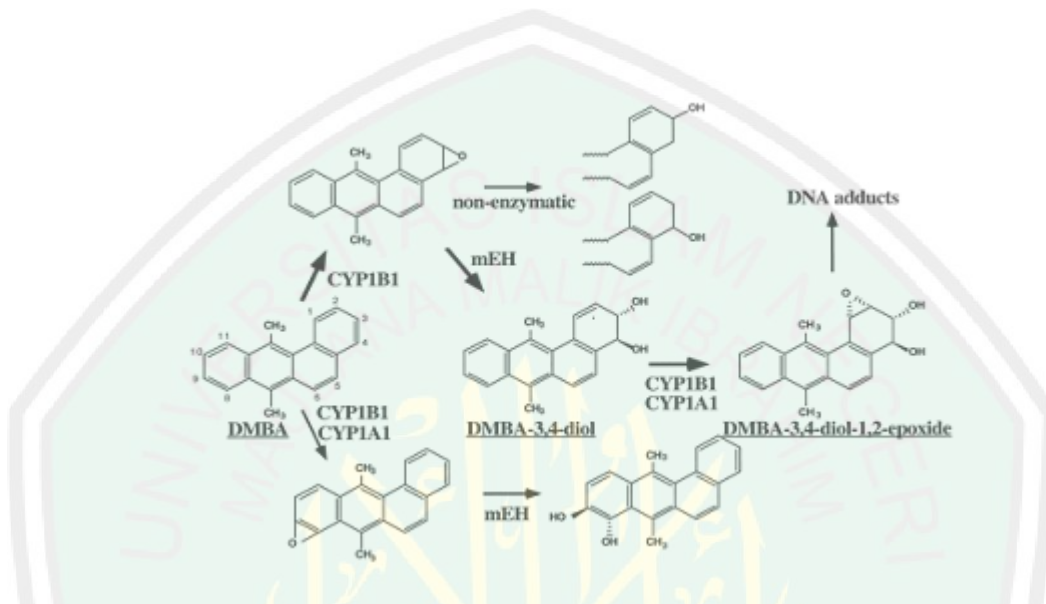
Salah satu teknik operasi untuk pencegahan adalah *Preventive*, yaitu pengangkatan sel kanker fibrosarkoma pada penderita yang mempunyai resiko moderat sampai tinggi terpapar kanker fibrosarkoma. Teknik ini dapat mengurangi hingga 90 persen dari kemungkinan berkembangnya kanker fibrosarkoma.

2.4 Senyawa DMBA (7, 12-Dimethylbenz(α)Anthracene)

7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) merupakan senyawa karsinogen spesifik untuk kanker payudara dan kanker kulit pada hewan percobaan, tetapi bukan merupakan karsinogen *direct*. Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi melalui aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis. Jalur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450 membentuk *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen* (Dandekar *et al.*, 1986).

Hasil biotransformasi dari DMBA merupakan DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxides* yang mampu membentuk DNA *adduct* (Gambar 2.2). Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu

mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel yang melebihi batas normal. Hal ini dapat dikatakan bahwa sel tersebut adalah sel kanker.



Gambar 2.3 Biotransformasi dari 7,12-dimethylbenz(a)antrasene

Senyawa *epoxide* tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksoguanosin (dG) pada DNA. Interaksi ini (*DNA adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan inisiasi kanker (Hakkak *et al.*, 2005). Kemampuan metabolit DMBA yang merupakan *ultimate carcinogen* berikatan dengan DNA salah satunya menyebabkan mutasi somatik yang nantinya akan menyebar dan memperlebar daerah kanker dalam tubuh.

Dandekar *et al.*, (1986) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa struktur senyawa karsinogen sangat beraneka ragam, sehingga sukar untuk dapat menentukan suatu senyawa bersifat karsinogenik atau tidak. Senyawa karsinogen mempunyai efek fisiologis yang sama dengan senyawa beracun lainnya, walaupun

terdapat perbedaan yang penting. Kesamaan itu terlihat pada beberapa hal seperti hubungan antara dosis dan respon (*dose response relationship*) mengalami biotransformasi. Respon yang terjadi sangat dipengaruhi oleh spesies, galur, dan jenis kelamin hewan coba. Selain itu, faktor lingkungan sangat penting karena dapat menyebabkan naik turunnya respon. Menurut Mulyadi (1998) metabolisme senyawa karsinogen dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu:

- 1) Senyawa karsinogen primer adalah senyawa yang dapat langsung mengubah sel normal menjadi sel kanker. Senyawa ini tidak memerlukan adanya metabolisme aktivasi untuk menjadi bentuk aktif. Senyawa ini dapat langsung berinteraksi dengan makromolekul (DNA) sehingga terjadi perubahan molekul dan mulai terjadi karsinogenesis. Golongan senyawa yang termasuk senyawa karsinogen primer adalah alkimilin, alkilen, epoksida, aril epoksida, propilolakton, dimetilsulfat, metilmetansulfonat, 1,4-butanediol dimetansulfonat, bis (2-kloroetil) sulfida, dan bis (2-dikloroetil) amin.
- 2) Senyawa karsinogen sekunder adalah senyawa karsinogen yang memerlukan metabolisme aktivasi, sehingga senyawa ini diubah menjadi bentuk aktif yang dapat menyebabkan interaksi dengan makromolekul (DNA) dan terjadi perubahan molekul yang tidak dapat kembali dan mulai terjadi karsinogenesis, selanjutnya menjadi kanker dengan bantuan enzim dalam tubuh. Senyawa yang diaktifkan oleh enzim dalam tubuh diantaranya benz(a)antrasena, 4-dimetilaminoazobenzene, aflatoksi B1, safrol, dimetilnitrosamina, 1,2-dimetilhidrazina, dan etionin. Termasuk senyawa

yang diaktifkan dengan cara hidrolisis diantaranya N-metilnitrosoourea, N-metilnitrosoouretan, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, dan sikasin

- 3) Senyawa kokarsinogen adalah senyawa yang tidak bersifat karsinogenik secara mandiri, tetapi apabila terdapat senyawa lain tertentu maka akan bersifat karsinogenik, misalnya asap rokok.

2.5 Metotreksat Sebagai Obat Antikanker

Metotreksat merupakan obat yang secara luas digunakan dalam kemoterapi berbagai jenis kanker. Senyawa ini merupakan golongan antimetabolit. Metotreksat diberikan secara oral dengan dosis 2,5 – 5 mg/hari dan secara intralekal diberikan dengan dosis 10 mg 1 – 2 kali seminggu. Obat ini dapat digunakan untuk penyakit leukimia, limfolistik, akut, koriokarsinoma, kanker payudara, kanker leher dan kepala, buli-buli, sarkoma osteogenik, mesotelioma dan kanker paru (Departemen Farmakologi dan Terapeutik, 2007).

Mekanisme kerjanya golongan antimetabolit adalah dengan menghambat sintesis DNA dan RNA melalui penghambatan pembentukan asam nukleat dan nukleotida. Antipurin dan antipirimidin mengambil tempat purin dan pirimidin dalam pembentukan nukleosida, sehingga mengganggu berbagai reaksi penting dalam sel kanker. Penggunaannya sebagai obat antikanker didasarkan pada metabolisme purin dan pirimidin lebih tinggi pada sel kanker daripada sel normal. Dengan demikian penghambatan sintesis DNA lebih tinggi daripada terhadap sel kanker (Habib, 2008).

Meskipun Metotreksat digunakan secara luas dalam kemoterapi kanker, salah satunya untuk kemoterapi fibrosarkoma, namun obat ini memiliki efek samping. Metotreksat dapat potensial menyebabkan pneumositis yang membahayakan (bisa terjadi selama terapi pada dosis berapapun) dan potensial menyebabkan reaksi dermatologi (tanpa tergantung dosis). Metotreksat dapat menyebabkan kegagalan ginjal, gastrointestinal toksisitas, atau supresi sum-sum tulang. Metotreksat diberikan secara bersama dengan radioterapi dapat meningkatkan infeksi oportunistik. Formulasi metotreksat dan/atau pelarut yang mengandung pengawet sebaiknya tidak digunakan untuk intratekal atau dosis tinggi. Injeksi dari metotreksat akan mempengaruhi beberapa organ tubuh terutama pada ginjal sebesar 99 % dan 67 % pada hati (Christian, 2009).

2.6 Tinjauan Hewan Uji Mencit (*Mus musculus*)

Hewan percobaan atau sering di sebut pula sebagai hewan laboratorium adalah semua jenis hewan yang dapat digunakan sebagai salah satu sarana dalam berbagai kegiatan penelitian biologi dan kedokteran dengan persyaratan tertentu. Seperti yang telah diketahui bahwa penelitian dengan menggunakan hewan percobaan akan sering memerlukan pembunuhan hewan untuk mendapatkan jaringan untuk kemudian dilanjutkan pada penelitian *in vitro* pada akhir atau selama penelitian, untuk menilai bagaimana efeknya. Isbagio (1992) menyebutkan apabila hewan percobaan yang digunakan mengalami nyeri hebat atau kronik, penderitaan, rasa yang tidak enak, cacat yang tidak dapat disembuhkan, maka harus dilakukan *euthanasia* yaitu hewan harus dibunuh dengan cara yang layak.

Mencit (*Mus musculus*) (Gambar 2.4) merupakan hewan yang dapat digunakan sebagai hewan coba dalam melakukan penelitian biologis maupun biomedis. Untuk memperoleh hasil yang sesuai dengan tujuan penelitian dan daya produksi yang tinggi, maka hewan yang digunakan harus memenuhi persyaratan dan standar dasar sebagai hewan percobaan.



Gambar 2.4 Mencit (*Mus musculus*) (image.google.com)

Taksonomi *Mus musculus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Sub-famili	: Murinae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Kurnianto *et al* (2001) menyebutkan hewan percobaan dapat digunakan sebagai materi penelitian karena mempunyai beberapa keuntungan, seperti halnya dengan hewan coba mencit antara lain:

- 1) Mempunyai siklus reproduksi yang singkat.
- 2) Selang generasi yang pendek.
- 3) Mempunyai keturunan yang relatif lebih banyak per kelahiran.

Mus musculus dewasa dapat mencapai 30-40 gram pada umur enam bulan atau lebih. Pada umumnya mencit betina dan jantan sulit untuk dibedakan karena jarak antara lubang anus dan lubang genitalnya saling berdekatan. *Mus musculus* akan lebih aktif pada senja atau malam hari, mereka tidak menyukai terang. Mereka juga hidup di tempat tersembunyi yang dekat dari sumber makanan dan membangun sarangnya dari bermacam-macam material lunak. Muliani (2011) menyebutkan lama hidup mencit dapat mencapai satu sampai tiga tahun, dengan masa kehamilan yang pendek (18-21 hari) dan masa aktifitas reproduksi yang lama (2-14 bulan) sepanjang hidupnya.

2.7 Metode Pemisahan Secara Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan dalam temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma

akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

Keuntungan dari metode maserasi adalah cara pengerjaannya menggunakan peralatan yang sederhana, mudah, dan murah. Selain itu, dikhawatirkan senyawa yang terkandung dalam sampel merupakan senyawa yang tidak tahan terhadap panas. Kekurangannya adalah waktu pengerjaannya relatif lama dengan membutuhkan banyak pelarut dan ekstraksi kurang sempurna tanpa adanya tahap ekstraksi selanjutnya.

Diantara berbagai jenis metode pemisahan, ekstraksi pelarut merupakan metode pemisahan yang baik dan sering digunakan. Alasan utamanya adalah bahwa pemisahan ini dapat dilakukan baik dalam tingkat makro sampai pada tingkat mikro. Prinsip dari metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur seperti benzene, karbon tetraklorida atau kloroform. Batasannya adalah zat terlarut dapat ditransfer pada jumlah yang berbeda dalam kedua fase pelarut. Teknik ini dapat digunakan untuk kegunaan preparatif, pemurnian, memperkaya, pemisahan serta analisis pada semua skala kerja. Menurut Khopkar (2010) terdapat tiga metode dasar pada ekstraksi cair-cair yaitu:

- 1) Ekstraksi bertahap merupakan cara yang paling sederhana. Caranya cukup dengan menambahkan pelarut pengekstraksi yang tidak bercampur dengan pelarut semula kemudian dilakukan pengocokan sehingga terjadi kesetimbangan konsentrasi zat yang akan diekstraksi pada kedua lapisan,

setelah tercapai, maka lapisan didiamkan dan dipisahkan. Metode ini sering digunakan untuk pemisahan analitik.

- 2) Ekstraksi kontinue digunakan bila perbandingan distribusi relatif kecil sehingga untuk pemisahan yang kuantitatif diperlukan beberapa tahap ekstraksi. Efisiensi yang tinggi pada ekstraksi kontinue tergantung pada viskositas fase dan faktor-faktor lain yang mempengaruhi kecepatan tercapainya kesetimbangan.
- 3) Ekstraksi kontinue *counter current*, fase cair pengekstraksi dialirkan dengan arah yang berlawanan dengan larutan yang mengandung zat yang akan diekstraksi. Metode ini sangat bermanfaat untuk fraksinasi senyawa organik, tetapi kurang bermanfaat untuk senyawa-senyawa anorganik.

Guenther (2006) menyebutkan bahwa metode maserasi merupakan suatu proses ekstraksi yang cukup terkenal, sebelum dikenalnya proses yang menggunakan pelarut yang mudah menguap dalam metode ekstraksi bahan yang berasal dari alam. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan pada tumbuhan yang akan diekstraksi. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam bahan alam dapat larut dalam pelarut yang memiliki perbedaan sifat kepolarannya. Menurut Septyaningsih (2010) senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan pelarut nonpolar juga akan larut dalam pelarut nonpolar, sehingga pelarut yang akan digunakan akan selektif memisahkan kandungan dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam tersebut.

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Menurut Sastrohamidjojo (1991) pada umumnya senyawa yang terikat oleh pelarut nonpolar tersebut adalah golongan metabolit sekunder steroid atau terpenoid yang memiliki sifat nonpolar.

Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah kloroform. Pemilihan kloroform sebagai pelarut utama dalam ekstraksi maserasi yang akan dilakukan tidak lepas dari penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak kloroform bunga Sirsak memiliki nilai LC_{50} 2,916 ppm yang dapat digunakan sebagai antikanker (Putri, 2013). Biva *et al* (2009) dalam penelitiannya tentang *in vitro* antioksidan dari daun Srikaya menyebutkan bahwa nilai LC_{50} ekstrak kloroform daun Srikaya adalah 4,16 ppm yang digunakan sebagai antioksidan.

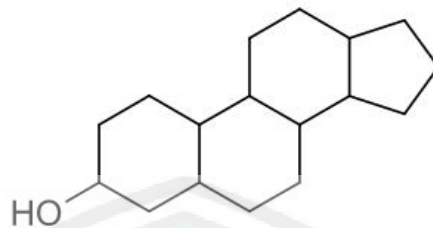
2.8 Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak

Setiap tumbuhan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda. Hal ini dipengaruhi oleh banyak faktor, misalnya geografis daerah dan iklim daerah tumbuhan tersebut tumbuh. Beberapa dari senyawa metabolit sekunder telah terbukti bermanfaat sebagai obat dari suatu penyakit. Senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan memiliki sifat kepolaran yang berbeda antar satu dengan yang lainnya, oleh karena itu untuk mengambil golongan senyawa aktif yang terdapat dalam sampel haruslah digunakan pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan senyawa aktif tersebut. Agar

golongan senyawa aktif yang diinginkan akan terikat pada pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sama.

Dalam penelitiannya Putri (2013) menggunakan variasi pelarut kloroform, n-heksana, dan etanol untuk mengambil senyawa aktif yang terdapat dalam sampel bunga Sirsak. Dengan menggunakan variasi pelarut tersebut diasumsikan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam bunga Sirsak dapat diambil dengan berdasarkan kesamaan sifat kepolaran pelarut dengan senyawa aktif yang terdapat dalam bunga Sirsak. Setelah diuji fitokimia, maka dapat diketahui bahwa senyawa yang terikat dengan pelarut n-heksana adalah golongan steroid, yang terikat dengan pelarut kloroform juga golongan steroid, dan yang terikat pelarut etanol adalah golongan tannin dan triterpenoid. Dari hasil ini, maka diambil pelarut kloroform yang mengikat steroid karena memiliki nilai LC_{50} 2,916 ppm. Putri dan Hidajati (2012) pada penelitiannya menyebutkan bahwa senyawa kolestan steroid ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* dapat digunakan sebagai bioinsektisida.

Struktur steroid, seperti pada Gambar 2.5 di bawah tersusun dari isoprene-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Namun pada umumnya senyawa steroid bersifat semipolar. Beberapa persenyawaan steroid mengandung gugus $-OH$ yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar.



Gambar 2.5 Struktur Golongan Steroid (Robinson, 1995)

Robinson (1995) menyebutkan bahwa senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lainnya. Menurut Poedjiadi (2006) steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan tiga cincin sikloheksana terpadu dan satu cincin siklopentena yang bergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Beberapa turunan steroid yang penting adalah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain adalah asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid.

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan menggunakan reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan sesolvan NK) dapat menghasilkan warna coklat. Penelitian yang dilakukan Putri (2013) menyebutkan bahwa uji steroid menunjukkan hasil positif pada ekstrak n-heksana dan kloroform, masing-masing membentuk cincin warna hijau kebiruan. Hasil identifikasi senyawa aktif

berdasarkan uji fitokimia dengan menggunakan reagen menunjukkan ketoksikan ekstrak disebabkan adanya senyawa aktif golongan steroid. Senyawa steroid ternyata memiliki efek toksik yang cukup tinggi sebagaimana ditunjukkan dengan nilai LC_{50} yang rendah pada ekstrak kloroform dari bunga Sirsak.

2.9 Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak

2.9.1 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu metode pemisahan komponen menggunakan fase diam berupa plat dengan lapisan bahan adsorben inert dan fase geraknya berupa eluen. KLT merupakan salah satu jenis kromatografi analitik. Prinsip dari pemisahan dengan menggunakan KLT adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk larut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian), kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan (adsorpsi, penyerapan).

Sastrohamidjojo (1991) menyebutkan bahwa kromatografi lapis tipis (KLT) sering digunakan untuk identifikasi awal, karena banyak keuntungan menggunakan KLT, di antaranya adalah sederhana dan murah. KLT termasuk dalam kategori kromatografi planar, selain kromatografi kertas. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan-pemisahan ini bergantung pada gerakan relatif dari fase gerak maupun fase diam.

Menurut Hostettman *et al* (1995) proses isolasi yang terjadi berdasarkan perbedaan daya serap dan daya partisi serta kelarutan dari komponen-komponen kimia yang akan bergerak mengikuti kepolaran eluen yang digunakan, oleh karena daya serap adsorben terhadap komponen kimia tidak sama, maka akan menyebabkan komponen bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda sehingga hal inilah yang menyebabkan pemisahan itu terjadi.

a. Fase Diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap yang memiliki ukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya (Gandjar dan Rohman, 2007). Khopkar (2010) yang sering digunakan sebagai materi pelapisnya adalah selika gel, tetapi terkadang juga dapat digunakan bubuk selulosa dan tanah diatome. Fase diam hidrofilik dapat digunakan pengikat seperti semen Paris, kanji, disperse koloid plastic, dan silika terhidrasi.

Putri (2013) menyebutkan bahwa fase diam umumnya berupa plat silika yang biasa digunakan adalah plat dengan kode $G_{60}F_{254}$, maksudnya adalah bahwa plat tersebut terbuat dari gypsum dengan ukuran pori-pori 60 $\text{\AA}$ dengan kemampuan berfluorosensi pada panjang gelombang minimal 254 nm.

b. Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal.

Menurut Gandjar dan Rohman (2007) terdapat beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa, sehingga diharapkan harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan suatu pemisahan.
- Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase geraknya akan dapat menentukan kecepatan dari migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai dari R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti halnya dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzena yang dapat meningkatkan nilai R_f secara signifikan.
- Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

Pada penelitian yang dilakukan Putri (2013) menyebtkan bahwa hasil KLT dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (6:4) merupakan eluen terbaik dari eluen lain yang mampu memisahkan golongan senyawa pada ekstrak kloroform bunga Sirsak yang menghasilkan 12 spot noda yang terpisah. Hal ini menunjukkan bahwa eluen n-heksana : etil asetat (6:4) mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan baik.

c. Penotolan

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak noda sekecil mungkin. Sebelum sampel ditotolkan, dibuat garis tepi untuk menotolkan sampel pada kertas kromatografi lapis tipis. Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μL . Jika volume sampel yang ditotolkan besar dari 2-10 μL , maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

Menurut Khopkar (2010) sampel yang akan ditotolkan pada salah satu bagian tepi pelat kromatografi lapis tipis sebanyak 0,01-10 μg ekstrak kasar. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak noda yang menyebar dan puncak ganda. Penotolan ekstrak kasar pada umumnya menggunakan pipa kapiler, namun dapat juga digunakan mikro-syringe (penyuntik berukuran mikro). Gandjar dan Rohman (2007) berdasarkan pada tujuan analisis, berbagai macam jumlah sampel telah disarankan untuk digunakan seperti pada Tabel 2.1 dibawah.

Tabel 2.1 Parameter-parameter aplikasi yang direkomendasikan (Gandjar dan Rohman, 2007)

Tujuan	Diameter Bercak (nm)	Konsentrasi Sampel (%)	Banyaknya Sampel (μg)
Densitometry	2 nm untuk volume sampel 1 μL	0,02-0,2	0,1-1 (untuk KLT-KT)1-10 (Konvensional)
Identifikasi	3 nm untuk volume sampel 1 μL	0,1-1	1-20
Uji Kemurnian	4 nm untuk volume sampel 2 μL	5	100

d. Fase Pengembangan

Menurut Khopkar (2010) pada tahapan pengembangan ini merupakan tahapan pemisahan senyawa yang terdapat dalam sampel yang ditotolkan. Teknik *ascending* digunakan untuk melaksanakan pemisahan yang dilakukan pada temperatur kamar, sampai permukaan pelarut mencapai tinggi 15-18 cm. Waktu yang diperlukan untuk tahapan pengembangan ini pada umumnya relatif lama yaitu antara 20-40 menit.

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah dengan mengembangkan sampel dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak. Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (akan tetapi harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan. Gandjar dan Rohman (2007) menyebutkan bahwa untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung dari kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh.

e. Deteksi Bercak

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan cara pencacahan radioaktif dan fluorosensi sinar ultraviolet. Fluorosensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluorosensi, membuat bercak

akan terlihat jelas. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak (Gandjar dan Rohman, 2007):

- Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solute yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
- Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluorosensi terang pada dasar yang berfluorosensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluorosen yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluorosensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluorosensi setelah dilakukan pengembangan. Menurut Sudjadi (1988) pada UV 254 nm, lempeng akan berfluorosensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm adalah karena adanya daya interaksi sinar UV dengan indikator fluorosensi yang terdapat pada lempeng. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi.

- Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
- Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam *chamber* tertutup.
- Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrument yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatatan (*recorder*).

2.9.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometri UV-Vis

Radiasi elektromagnetik yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak (*visible*) merupakan salah satunya dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Sinar ultraviolet memiliki panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak (*visible*) memiliki kisaran panjang gelombang 400-750 nm (Gandjar dan Rohman, 2007). Penyerapan sinar ultraviolet dan tampak oleh suatu molekul organik akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik pada molekul tersebut dari tingkat energi dasar ke tingkat energy yang tereksitasi (Supratman, 2010).

Warna sinar tampak dapat dihubungkan dengan panjang gelombangnya. Sinar putih mengandung radiasi pada semua panjang gelombang pada daerah sinar tampak. Sinar pada panjang gelombang tunggal (radiasi monokromatik) dapat dipilih dari sinar putih. Warna komplementer memiliki makna apabila salah satu komponen warna dihilangkan (dengan absorpsi) maka sinar yang akan dihasilkan

akan tampak sebagai komplemen warna yang diserap tadi. Tabel 2.2 merupakan tabel hubungan antara warna dengan panjang gelombang.

Tabel 2.2 Hubungan antara warna dengan panjang gelombang sinar tampak (Gandjar dan Rohman, 2007)

Panjang gelombang	Warna yang diserap	Warna yang diamati/warna komplementer
400 - 435 nm	Ungu (lembayung)	Hijau kekuningan
450 - 480 nm	Biru	Kuning
480 - 490 nm	Biru kehitaman	Oranye
490 - 500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500 - 560 nm	Hijau	Merah anggur
560 - 580 nm	Hijau kekuningan	Ungu (lembayung)
580 - 595 nm	Kuning	Biru
595 - 610 nm	Oranye	Biru kekuningan
610 - 750 nm	Merah	Hijau kebiruan

Penelitian Putri (2013) mendapatkan hasil senyawa yang terkandung dalam ekstrak kloroform bunga Sirsak adalah senyawa dengan golongan steroid. Sedangkan menurut Kasal *et al* (2010) terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi spektra spektrofotometer UV-Vis khususnya spektra dari senyawa steroid salah satunya adalah pengaruh dari pelarut yang digunakan pada saat analisis. Dari pelarut kloroform yang digunakan oleh Putri (2013), maka spektra steroid akan terbentuk pada panjang gelombang 200-280 nm.

Penelitian Putri dan Hidajati (2012) menyebutkan hasil pengukuran senyawa kolestan steroid dari ekstrak kloroform dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya serapan pada daerah panjang gelombang maksimum 222 nm. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut mengandung kromofor ikatan rangkap tak terkonjugasi.

2.9.2.1 Aspek Kuantitatif Spektrofotometri UV-Vis

Dalam aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada cuplikan (larutan sampel) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh cuplikan ditentukan dengan cara membandingkan intensitas sinar yang diteruskan dengan intensitas sinar yang diserap jika tidak terdapat spesies penyerap lainnya. Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton yang melalui satu satuan luas penampang perdetik.

Menurut Gandjar dan Rohman (2007) serapan dapat terjadi jika suatu foton/radiasi yang mengenai cuplikan memiliki energi yang sama dengan energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan tenaga. Kekuatan radiasi juga mengalami penurunan dengan adanya penghamburan dan pemantulan cahaya, akan tetapi penurunan karena hal ini sangat kecil dibandingkan dengan proses penyerapan.

2.9.2.2 Hal Penting dalam Analisis Spektrofotometri UV-Vis

Terdapat beberapa hal-hal yang perlu diperhatikan dalam analisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, terutama untuk senyawa-senyawa yang semula tidak memiliki warna yang akan dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer visibel karena senyawa-senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa-senyawa yang memiliki warna. Menurut pendapat Gandjar dan Rohman (2007) terdapat tahapan-tahapan yang harus diperhatikan pada saat analisis dengan menggunakan instrument spektrofotometri UV-Vis yaitu:

a) Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu diperhatikan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu:

- Reaksinya selektif dan sensitif
- Reaksinya cepat, kuantitatif, dan reproduibel
- Hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama

Keselektifan dapat dinaikkan dengan mengatur pH, pemakaian *masking agent*, atau penggunaan teknik ekstraksi.

b) Waktu operasional (*Operating time*)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan suatu warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan dengan absorbansi larutan. Pada saat awal terjadinya reaksi, absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran, maka ada kemungkinan senyawa yang memiliki warna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warna turun yang mengakibatkan absorbansinya juga akan turun. Karena alasan inilah maka untuk pengukuran senyawa-senyawa yang memiliki warna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada saat waktu operasional.

c) Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal, yaitu:

- Pada panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.
- Disekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi.
- Jika dilakukan pengukuran ulang, maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali, ketika digunakan panjang gelombang maksimal.

d) Pembuatan kurva baku

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi. Apabila hukum Lambert-Beer dapat terpenuhi, maka kurva baku berupa garis lurus. Kurva baku sebaiknya sering diperiksa

berulang-ulang. Penyimpangan dari garis lurus biasanya dapat disebabkan oleh kekuatan ion dari senyawa yang tinggi, perubahan suhu, dan reaksi ikatan yang terjadi.

e) Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

Absorban yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15 % sampai 70 % jika dibaca sebagai transmitan (T). Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan dalam pembacaan T adalah 0,005 atau 0,5 % (kesalahan fotometrik).

2.9.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometri Infra Merah

Daerah radiasi spektroskopi infra merah atau *infrared spectroscopy* (IR) berkisar pada panjang gelombang $12800\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, atau panjang gelombang $0,78\text{-}1000\text{ }\mu\text{m}$. Umumnya daerah radiasi IR terbagi dalam daerah IR terdekat ($12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, $3,8\text{-}1,2 \times 10^{14}\text{ Hz}$ ($0,78\text{-}2,5\text{ }\mu\text{m}$); daerah IR tengah ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$, $0,012\text{-}6 \times 10^{14}\text{ Hz}$ ($2,5\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$); daerah IR jauh ($200\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, $60\text{-}3 \times 10^{14}\text{ Hz}$ ($50\text{-}1000\text{ }\mu\text{m}$). Daerah yang paling banyak digunakan untuk berbagai keperluan praktis yaitu $4000\text{-}690\text{ cm}^{-1}$ ($12\text{-}2 \times 10^{14}\text{ Hz}$; $2,5\text{-}1,5\text{ }\mu\text{m}$).

Spektroskopi IR biasanya digunakan untuk menentukan struktur, dapat dilihat pada Tabel 2.3 di bawah khususnya senyawa organik dan juga digunakan untuk analisis kuantitatif, seperti analisis kuantitatif untuk pencemar udara, misalnya karbon monoksida dalam udara dengan teknik *non-dispersive*. Spektrum infra merah memberikan puncak-puncak maksimal yang jelas sebaik puncak minimumnya (Khopkar, 2010).

Tabel 2.3 Pita absorpsi infra merah (Khopkar, 2010)

Gugus	Senyawa	Frekuensi cm^{-1}	Lingkungan spektral (μ)	Nama lingkungannya
OH	Alkohol	3580-3650	2,7-3,0 μ	Vibrasi ulur hydrogen
	Asam	2500-2700		
NH	Amina primer	~ 3500		
	Amina sekunder	3310-3500		
	Amida	3140-3320	3,0-3,5 μ	
CH	Alkana	3300		Ikatan rangkap tiga
	Alkena	3010-3095		
	Aromatik	~ 3030		
	Alkana	2853-2962		
	Aldehida	2700-2900	4,0-4,5 μ	
SH	Sulfur	2500-2700		Ikatan rangkap dua
$\text{C}\equiv\text{C}$	Alkana	2190-2260		
$\text{C}\equiv\text{N}$	Alkilnitril	2240-2260	5,0-5,5 μ	
	Iosianat	2240-2275		
	Arilnitril	2220-2240		
$-\text{C}=\text{C}=\text{N}$	Diimida	2130-2155		Daerah sidik jari
$-\text{N}_3$	Azida	2120-2160		
$> \text{CO}$	Aldehid	1720-1740	5,5-6,0 μ	
	Keton	1675-1725		
	Asam karboksilat	1700-1725		
	Ester	2000-2300		Daerah sidik jari
	Asilhalida	1755-1850	6,0-6,5 μ	
	Amida	1670-1700		
$\text{C}=\text{O}$	Ester	1650		
$\text{C}=\text{C}$	Alkena	1620-1680		
NH	Amina	1575-1650	6,5-7,5 μ	

Suatu ikatan dalam sebuah molekul dapat mengalami berbagai vibrasi molekul. Secara umum terdapat dua tipe vibrasi molekul:

- **Stretching** (vibrasi regang/ulur)

Vibrasi terjadi sepanjang ikatan sehingga terjadi perpanjangan atau pemendekan ikatan.

- **Bending** (vibrasi lentur/tekuk)

Vibrasi yang disebabkan oleh sudut ikatan sehingga terjadi pembesaran atau pengecilan sudut ikatan.

Putri dan Hidajati (2012) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa spektra infra merah senyawa kolestan steroid dengan pelarut kloroform menunjukkan sejumlah serapan pada bilangan gelombang $3436,7\text{ cm}^{-1}$ menggambarkan bahwa terdapat gugus (OH) yang membentuk ikatan hidrogen. Adanya vibrasi ulur C-H pada $2918,7\text{ cm}^{-1}$ dan $2849,75\text{ cm}^{-1}$. Adanya vibrasi ulur C=O pada $1705,7\text{ cm}^{-1}$. Adanya vibrasi ulur C=C pada $1637,8\text{ cm}^{-1}$. Pada daerah $1463,8\text{ cm}^{-1}$ dan $1376,8\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi tekuk C-H serta vibrasi ulur C-O yang puncaknya terletak pada daerah sidik jari $1169,8\text{ cm}^{-1}$.

Beberapa cara pengolahan sampel tergantung dari jenis sampelnya (padat, cair, dan gas). Spektrum infra merah biasanya menunjukkan pengaruh dari perbedaan pengolahan sampel ini dalam bentuk pergeseran frekuensi bilangan gelombang atau pita serapan. Menurut Supratman (2010) pengolahan sampel yang akan digunakan dibedakan atas:

- **Gas**

Dalam fase uap, perubahan rotasi dalam molekul dapat bebas terjadi dan proses energi rendah ini (frekuensi sangat rendah) dapat mengatur pita vibrasi dengan energi yang lebih tinggi. Dalam fase uap, sampel dimasukkan dalam sel khusus. Biasanya panjang sel 10 cm, yang ditempatkan langsung pada bagian yang terkena sinar infra merah pada spektrofotometer. Sel tersebut biasanya terbuat dari natrium klorida yang transparan terhadap sinar infra merah.

- **Cairan Murni**

Jika jumlah sampel sedikit atau tidak ada pelarut yang cocok, maka setetes cairan murni diapit dan ditekan diantara dua lempeng natrium klorida. Ketebalan dapat diatur antara 0,1 – 0,3 mm.

- **Padatan**

Ada dua cara untuk pengolahan sampel padatan:

- a) Mull atau pasta, 1 mg dari zat padat digerus hingga halus dalam mortar dengan meneteskan hidrokarbon cair (Nujol, Kaydol), atau jika vibrasi C-H akan diidentifikasi ditambahkan heksaklorobutadiena. Mull selanjutnya ditekan diantara dua plat natrium klorida.
- b) Lempeng kalium bromida, dibuat dengan cara menggerus sampel (0,1-0,2 %) dengan KBr dalam mortar agate dan kemudian ditekan sehingga diperoleh sebuah lempeng transparan.

- **Larutan**

Sampel dilarutkan dalam pelarut CCl_4 , CS_2 , CHCl_3 (1-5 %), selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam sel larutan yang mempunyai jendela transparan dengan alat pengatur ketebalan (0,1-1 mm), sel kedua (pelarut murni) diletakkan pada berkas baku, sehingga serapan dari pelarut ditiadakan dan diperoleh spectrum serapan dari sampel.

2.10 Uji Antikanker Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (*Annona muricata. L*)

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan pendekatan *Randomized post test only control group design*. Hewan uji yang digunakan pada penelitian tersebut adalah mencit *Mus musculus* jantan yang berumur 8-12 minggu dengan berat $\pm$ 20-30 gram dalam keadaan sehat dan tidak terdapat abnormalitas anatomi.

Sebanyak 30 ekor mencit tersebut diaklimatisasi di laboratorium dan diberikan pakan standar dan pemberian susu selama satu minggu. Kemudian hewan uji tersebut dibagi menjadi lima kelompok yang masing-masing berisikan enam ekor mencit yang ditentukan secara acak, lalu masing-masing kelompok dikandangkan secara terpisah dan mendapatkan pakan standar secara *ad libitum*.

Kemudian semua mencit mendapatkan induksi senyawa yang bersifat karsinogenik yaitu 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) sebanyak 25 μ g/100 μ L yang injeksikan pada tengkuk mencit sebanyak dua kali dalam satu minggu selama enam minggu. Selanjutnya seluruh mencit dipelihara dengan pemberian pakan standar. Sedangkan ekstrak kloroform bunga Sirsak diberikan sebagai terapi ketika injeksi DMBA telah dilakukan selama 6 minggu. Kemudian mencit yang telah menderita kanker dikelompokkan menjadi lima kelompok pengujian sebagai berikut:

1. Kelompok I adalah kontrol negatif yang hanya diberikan CMCNa tanpa pemberian ekstrak kloroform bunga Sirsak yang diinduksi DMBA.
2. Kelompok II adalah kontrol positif yaitu mencit yang diinduksi DMBA dengan pemberian obat dengan dosis 2,5 mg/kg BB

3. Kelompok III diberikan CMCNa dan ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 25 mg/kg BB yang diinduksi DMBA.
4. Kelompok IV diberikan CMCNa dan ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 50 mg/kg BB yang diinduksi DMBA.
5. Kelompok V diberikan CMCNa dan ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 100 mg/kg BB yang diinduksi DMBA.

Semua bahan uji diberikan secara oral dan diberikan setiap hari selama 14 hari. Setelah itu, mencit dikorbankan dan dilakukan pengambilan jaringan kanker dan kemudian dilakukan penimbangan berat kanker. Perhitungan aktivitas efek kemoterapi antikanker dilakukan dengan menentukan volume, berat, gambaran histologi serta presentasi hambatan pertumbuhan kanker (Sukardiman, 2007)

2.11 Analisis Data

Anova merupakan bagian dari metode analisis statistika yang tergolong analisis komparatif (perbandingan) lebih dari dua rata-rata (Riduwan, 2009). Sedangkan gunanya untuk menguji kemampuan generalisasi. Maksudnya dari signifikansi hasil penelitian (*one way*). Jika terbukti berbeda berarti kedua sampel tersebut dapat digeneralisasikan artinya data sampel dianggap dapat mewakili populasi (Riduwan, 2009). Analisis data dalam penelitian ini menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui signifikansi rata-rata pengaruh perlakuan. Nilai p bermakna apabila $p < 0,05$. Selanjutnya untuk mengetahui signifikansi perbedaan setiap kelompok perlakuan dilakukan uji perbandingan berganda *Post Hoc-Tukey*.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2014 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Optik, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, dan Laboratorium Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : untuk tahap analisis kadar air, alat-alat yang digunakan adalah oven, desikator, cawan penguap dan timbangan analitik. Alat yang digunakan untuk preparasi sampel adalah oven dan blender, sedangkan untuk ekstraksi menggunakan alat-alat seperti Erlenmeyer 500 mL, timbangan analitik, shaker, corong Buchner, alumunium foil, dan rotary evaporator. Alat-alat yang digunakan untuk uji Kromatografi Lapis Tipis dan identifikasi senyawa steroid antara lain bejana pengembang, silica gel F₂₅₄, oven, pipa kapiler, lampu UV, beaker glass, Spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometer Infra Merah.

Alat yang digunakan dalam penelitian uji antikanker diantaranya adalah alat untuk adaptasi mencit antara lain kandang hewan coba, kawat, botol minum dan tempat makan mencit. Pada perlakuan pengenceran senyawa karsinogen DMBA

alat yang digunakan adalah spatula, neraca analitik, labu ukur 100 mL, pipet volume 10 mL, beker glass 100 mL, dan gelas pengaduk. Alat yang digunakan untuk induksi senyawa DMBA pada hewan uji antara lain mikropipet, yellow tip, pinset dan spuit 1 mL. Alat yang digunakan dalam pengukuran berat dan gambaran kanker diantaranya adalah Mikroskop cahaya dan neraca analitik. Sedangkan alat yang digunakan untuk perlakuan terapi antara lain sonde lambung, vial ± 15 mL dan spuit 1 mL.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga Sirsak (*Annona muricata L*) yang berasal dari perkebunan Kecamatan Pagelaran Kabupaten Malang. Bahan kimia yang digunakan dalam ekstraksi maserasi adalah kloroform. Bahan yang digunakan untuk identifikasi golongan senyawa dengan KLTP diantaranya adalah, kloroform, etil asetat, n-heksana.

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih *Mus musculus* berkelamin jantan dikarenakan memiliki daya tahan tubuh yang lebih kuat dengan usia antara 8-12 minggu dengan berat 20-30 gram. Bahan untuk adaptasi mencit antara lain pakan mencit (pelet) jenis SP, air minum, serta kandang yang bersih. Bahan yang digunakan untuk induksi senyawa yang bersifat karsinogen 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) dan alkohol 70 % sebagai antiseptik jika terdapat luka. Bahan untuk pengenceran senyawa DMBA adalah aseton 70 %. Bahan yang diperlukan untuk terapi mencit terinfeksi diantaranya adalah ekstrak bunga Sirsak dan larutan CMC-Na 0,5 %.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium. Sampel yang diambil adalah bunga dari tanaman Sirsak yang kemudian dikeringkan dan dihaluskan dalam bentuk serbuk menggunakan blender. Serbuk yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut kloroform dengan masa perendaman selama 24 jam. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak yang agak pekat dengan dibantu dengan pengaliran gas N_2 pada ekstrak. Ekstrak pekat selanjutnya digunakan untuk pengujian antikanker secara *in vivo* untuk dapat mengetahui pengaruh pertumbuhan sel kanker fibrosarkoma dan uji statistik pada hewan uji mencit *Mus musculus* berkelamin jantan dengan berat badan 20-30 gram. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi golongan senyawa aktif (steroid) dengan KLT Preparatif menggunakan eluen terbaik n-heksana:etil asetat (6:4) diamati noda dengan lampu UV untuk selanjutnya dikerok noda yang terbentuk dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut awal kloroform sebagai isolat. Isolat yang diperoleh dari hasil KLT Preparatif diidentifikasi dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometer Infra Merah.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilaksanakan adalah sebagai berikut:

- 1 Preparasi Sampel
- 2 Analisis Kadar Air

- 3 Ekstraksi bunga Sirsak dengan metode maserasi menggunakan pelarut kloroform
- 4 Uji antikanker secara *in vivo*
- 5 Pemisahan golongan senyawa aktif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)
- 6 Identifikasi senyawa aktif dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel yaitu diambil sebanyak 1 kg bunga Sirsak, kemudian dicuci sampai bersih dan. Hal ini perlu dilakukan agar sampel yang akan digunakan terbebas dari kotoran, tanah, hama tanaman yang masih menempel pada sampel. Kemudian dikeringkan untuk selanjutnya dipotong dengan ukuran kecil-kecil, dikeringkan kembali pada oven dengan suhu pemanasan sekitar 40 °C selama kurang lebih 60 menit dan dihaluskan dengan cara diblender sampai sampel bunga Sirsak dalam bentuk serbuk.

3.5.2 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri, yaitu suatu metode pemisahan dengan cara pemanasan. Analisis ini dilakukan menggunakan sampel bunga Sirsak dalam keadaan basah dan kering dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Analisis kadar air dengan sampel bunga Sirsak basah dan kering dilakukan dengan cara memanaskan cawan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar

airnya, kemudian cawan didinginkan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan yang digunakan selanjutnya ditimbang dan dilakukan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan.

Sampel bunga Sirsak yang telah diambil, ditimbang sebanyak ± 5 gr kemudian dibersihkan dengan dicuci bersih, lalu dipotong menjadi potongan kecil-kecil, kemudian dikeringkan dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 100-105 °C selama 30 menit. Selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator. Setelah kering sampel bunga Sirsak diblender hingga berbentuk serbuk dan diukur kadar airnya dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100\%}{100\% - \text{kadar air}} \dots\dots\dots (3.2)$$

% kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

3.5.3 Ekstraksi dengan Metode Maserasi Menggunakan Pelarut Kloroform

Setelah dilakukan preparasi sampel, dilakukan proses maserasi dengan menggunakan pelarut kloroform. Serbuk dari bunga Sirsak ditimbang sebanyak 100 gr untuk proses maserasi, kemudian ditambahkan dengan pelarut kloroform sebanyak 250 mL. Kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar dengan

pengocokan selama 3 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian disaring menjadi filtrat dan ampas dengan menggunakan corong pisah.

Kemudian ampas hasil dari penyaringan tersebut direndam kembali dengan menggunakan pelarut kloroform sebanyak 250 mL sampai diperoleh warna filtrat yang pucat. Selanjutnya dilakukan proses penyaringan dan diambil filtratnya. Ampas dari hasil penyaringan dipanaskan pada suhu ruang hingga terbebas dari pelarut kloroform. Filtrat hasil penyaringan awal dan akhir digabungkan dan dilakukan proses pemekatan ekstrak dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C dengan dialiri gas N₂ sampai diperoleh ekstrak pekat kloroform. Hasil yang didapatkan nantinya akan dilarutkan dengan CMC-Na 0,5% dengan perbandingan 1:1 untuk dilakukan uji antikanker secara *in vivo* pada tubuh mencit. Rendemen dari ekstrak dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{a}{b} \times 100 \% \dots \dots \dots (3.3)$$

Keterangan :

a = berat ekstrak (g)

b = berat contoh awal (g)

3.5.4 Uji Antikanker

3.5.4.1 Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih (*Mus musculus*) dengan jenis kelamin jantan yang berusia 8-12 minggu, berat badan 25-30 gram dan tidak ada abnormalitas anatomi. Sebelum dilakukan perlakuan, mencit putih dipelihara dalam kandang yang diberikan alas serbuk kayu dan anyaman kawat sebagai

penutup. Pemberian makanan dan minuman dilakukan setiap hari secara teratur (Retnani, 2011).

3.5.4.2 Pembuatan Persediaan Larutan CMC-Na 0,5 %

CMC-Na merupakan turunan dari selulosa dan sering dipakai dalam industri pangan untuk mencegah terjadinya retrogradasi. CMC-Na digunakan sebagai pelarut ekstrak pada saat pemberian terapi pada mencit. Persediaan larutan CMC-Na dibuat dengan cara menaburkan 500 mg CMC-Na ke dalam 10 mL aquades yang sudah dipanaskan. Kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume menjadi 100 mL.

3.5.4.3 Pembuatan Persediaan 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA)

7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) merupakan senyawa karsinogenik yang nantinya akan menimbulkan kanker pada hewan uji. Persediaan DMBA diberikan pada konsentrasi 18 mg/g BB yang telah dihomogenkan dengan 72 mL aseton. Larutan Dimetilbenz(α)antrasena disetiap pemberian memiliki konsentrasi 0,025 mg Dimetilbenz(α)antrasena/ 0,1 mL.

3.5.4.4 Induksi 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena pada Hewan Uji

Pemberian Dimetilbenz(α)antrasena diinjeksikan pada mencit setiap perlakuan dilakukan sebanyak dua kali dalam satu minggu. Dosis yang diberikan pada mencit adalah 0,025 mg/0,1 mL setiap mencitnya. Lama dari induksi DMBA pada mencit ini selama 6 minggu sampai kanker terbentuk.

3.5.4.5 Perlakuan Hewan Uji

Penelitian dilakukan dengan lima kelompok perlakuan. Jumlah sampel dari setiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus: (Indra, 1999 dalam Muti'ah, 2010).

$$\text{Rumus : } p(n-1) \geq 16; \quad p = \text{jumlah kelompok perlakuan}$$

$$n = \text{jumlah pengulangan setiap sampel}$$

Perlakuan (p) dalam penelitian ini adalah 5, maka jumlah sampel setiap perlakuan (p) dapat dihitung sebagai berikut:

$$5(n-1) \geq 16 \rightarrow 5n-5 \geq 16 \rightarrow 5n \geq 16+5 \rightarrow n = 4,2$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel yang diperlukan adalah 4 ekor mencit untuk setiap kelompok perlakuan. Dengan demikian, jumlah minimal seluruh sampel hewan uji yang digunakan adalah 20 ekor mencit. Dalam perlakuan pada kelompok hewan uji ini membutuhkan ekstrak pekat bunga Sirsak (*Annona muricata L*) sekitar 5 gram. Berikut adalah ketentuan dari perlakuan setiap kelompok:

1. Kelompok I adalah kontrol negatif diberikan perlakuan DMBA dan hanya diberikan CMC-Na 0,5 %.
2. Kelompok II adalah kontrol positif diberikan perlakuan DMBA dan diberikan obat Metotreksat dengan dosis 2,5 mg/kg BB.
3. Kelompok III diberikan perlakuan DMBA dan pemberian ekstrak kloroform bunga Sirsak dosis 25 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.
4. Kelompok IV diberikan perlakuan DMBA dan pemberian ekstrak kloroform bunga Sirsak dosis 50 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.

5. Kelompok V diberikan perlakuan DMBA dan pemberian ekstrak kloroform bunga Sirsak dosis 100 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.

Bahan diberikan per oral dengan sonde lambung selama 14 hari. Parameter yang diamati meliputi bobot kanker yang diambil data dengan penimbangan berat badan setiap hari (Sukardiman, 2007). Sebelum diketahui berat kanker, terlebih dahulu menghitung volume kanker dengan mengukur diameter terpendek dan terpanjangnya. Diameterr terpendek dan terpanjangnya dicatat untuk dimasukkan ke dalam rumus: (Wardhani, 2013)

$$\text{Volume Kanker (CV)} = 0,52 \times a \times b^2 \dots\dots\dots (3.4)$$

a = diameter terpendek jaringan kanker (mm)

b = diameter terpanjang jaringan kanker (mm)

Jaringan kanker yang sudah diketahui berat kankernya, digunakan untuk menghitung persentase hambatan pertumbuhan kanker dengan rumus: (Sukardiman, 2007)

$$\text{Hambatan (\%)} = \left(1 - \frac{BT}{BC}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (3.5)$$

BT = berat jaringan kanker kelompok perlakuan (g)

BC = berat jaringan kanker kelompok kontrol negatif (g)

Pemeriksaan histopatologi untuk melihat pertumbuhan sel kanker dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel pada jaringan. Pengamatan secara mikroskopik preparat histopatologi kanker pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya, dengan perbesaran 400x.

3.5.5 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Kromatografi Preparatif

Pada penelitian ini, digunakan eluen terbaik dari penelitian Putri (2013) sebagai pengembang yaitu n-heksana:etil asetat (6:4). Lempeng preparatif silika gel 60 F₂₅₄ Merck disiapkan dengan ukuran panjang 20 cm dan lebar 20 cm. Ekstrak pekat bunga Sirsak yang telah dilarutkan dengan kloroform ditotolkan sepanjang lempeng tepi bawah dan diangin-anginkan beberapa saat. Lempeng dimasukkan ke dalam chamber yang berisi eluen yaitu campuran homogen lapisan bawah pelarut antara n-heksana:etil asetat (6:4) (Putri, 2013). Lempeng dibiarkan terelusi hingga eluen mencapai batas atas lempeng kemudian dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Pengamatan noda menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm. Lempeng tersebut dipanaskan dengan hair dryer untuk memperjelas warna noda yang terbentuk. Penelitian Putri (2013) menyatakan bahwa noda-noda yang terbentuk pada bagian tepi lempeng dihubungkan dengan garis dari tepi satu ke tepi lainnya. Bagian dalam garis yang dikerok adalah noda yang memiliki warna hijau kebiruan karena menunjukkan adanya senyawa aktif steroid dengan membuang bagian yang telah dipanaskan dan dilarutkan dengan kloroform sebagai isolat.

3.5.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid diidentifikasi secara kualitatif dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Isolat noda ungu pada KLT preparatif yang dilarutkan dalam kloroform diambil sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam kuvet hingga sepertiganya dan dilakukan analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang

200-800 nm. Pada blanko, pelarut kloroform dimasukkan kedalam kuvet setengahnya dan dianalisis dengan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 200-800 nm. Spektra yang terbentuk diamati dan dicatat panjang gelombang serta absorbansinya pada puncak yang terbentuk.

3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer Infra Merah

Isolat hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer Infra Merah. Pelet KBr (Kalium Bromida) dibuat dengan cara ditimbang dengan berat sekitar 0,1 gram padatan KBr yang terbebas dari kandungan air. Kemudian digerus sampai halus dan dipres hingga diperoleh pelet KBr yang sudah jadi. Isolat hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dengan pelarut kloroform. Kemudian disentrifugasi hingga diperoleh isolat dan silikanya yang terpisah. Isolat tersebut dipisahkan dari silikanya dan diuapkan. Isolat cair yang diperoleh diteteskan pada pelet KBr yang sudah jadi. Selanjutnya diidentifikasi dengan spektrofotometer Infra Merah dengan bilangan gelombang $4000-400\text{ cm}^{-1}$.

3.6 Analisis Data

Data yang dianalisis adalah persentase penghambatan pertumbuhan sel kanker fibrosarkoma ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan pengujian dosis ekstrak yang diberikan pada perlakuan. Data yang diperoleh dari penghambatan kanker yang disebabkan dosis diterangkan dalam bentuk statistik program Minitab *one way anova*. Data dari pemisahan dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan

memperhatikan pola pemisahan dan penampakan noda pada kromatogram dari eluen yang digunakan.

Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan memperhatikan bentuk dari spektrum yang terbentuk dari hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada keadaan sampel dalam kloroform. Identifikasi dengan UV-Vis juga didukung dengan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer Infra Merah untuk lebih mengetahui gugus-gugus fungsional yang menyusun suatu senyawa. Data yang didapatkan secara instrumentasi ditinjau lebih lanjut berdasarkan data sekunder berupa jurnal-jurnal penelitian yang dilakukan sebelumnya tentang spektrofotometer UV-Vis dan FTIR senyawa steroid.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian yang diperoleh disusun dalam pembahasan berdasarkan dengan tahapan penelitian yang telah dilakukan, yaitu dimulai dengan preparasi sampel, analisis kadar air, ekstraksi bunga Sirsak menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform, uji antikanker fibrosarkoma secara *in vivo*, kemudian pemisahan golongan senyawa aktif dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif, serta identifikasi senyawa dengan menggunakan analisis spektroskopi UV-Vis dan Infra Merah.

4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian dari bunga tumbuhan Sirsak (*Annona muricata*) yang dalam keadaan muda atau sudah tua. Sampel dalam penelitian ini diambil dari perkebunan di Kecamatan Pagelaran, Kabupaten Malang. Sampel sebanyak 10 kg dibersihkan dengan cara dicuci untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada bunga Sirsak, baik kotoran yang berasal dari tanah atau debu dari udara bebas yang akan berakibat mengganggu pada proses ekstraksi apabila masih menempel pada sampel yang akan digunakan.

Sampel yang sudah dibersihkan kemudian dikeringkan. Pengeringan dapat dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada tempat terbuka yang terbebas dari sinar matahari secara langsung dengan ditutup dengan menggunakan kain yang berwarna gelap agar sampel terjaga dari sinar UV dan panas matahari dilanjutkan

dengan cara dioven pada suhu 30-45 °C selama 24 jam sampai sampel benar-benar dalam keadaan kering. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah tumbuhnya mikroorganisme pada sampel serta menghentikan reaksi enzimatis (Hayati *et al.*, 2012). Sampel bunga Sirsak (*Annona muricata*) yang dalam keadaan kering selanjutnya dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil untuk memudahkan dalam proses selanjutnya yaitu penggilingan.

Setelah sampel dipotong kecil-kecil, tahapan selanjutnya adalah penggilingan agar sampel menjadi bentuk serbuk dengan warna coklat. Hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel ketika terjadi kontak dengan pelarut yang akan digunakan, dimana semakin besar luas permukaan maka semakin besar interaksi sampel dengan pelarut, sehingga proses ekstraksi akan semakin efektif (Hayati *et al.*, 2012). Serbuk hasil penggilingan kemudian dilakukan pengayakan dengan ukuran pori 60 mesh yang bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel dan memperbesar luas permukaan. Dari proses ini, diperoleh berat sampel serbuk halus bunga Sirsak yang berwarna coklat sebesar $\pm$ 500 g serbuk halus.

4.2 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel yang akan digunakan dalam penelitian. Pada penelitian ini, akan dilakukan analisis kadar air basah dan kering dengan menggunakan metode pengeringan atau oven (*thermogravimetri*). Langkah awal dalam penentuan kadar air dalam sampel yang akan digunakan adalah dengan mengeringkan cawan

penguap dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 15 menit yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam cawan penguap. Selanjutnya cawan didinginkan didalam desikator selama 10 menit dan dilakukan penimbangan dengan menggunakan neraca analitik. Langkah tersebut dilakukan sama sampai diperoleh berat cawan penguap yang konstan.

Setelah berat cawan penguap konstan, diambil sampel seberat ± 5 gram dan dilakukan langkah yang sama seperti di atas sampai berat cawan penguap yang berisi sampel konstan. Tabel 4.1 menunjukkan kadar air pada sampel bunga Sirsak basah dan kering dengan perhitungan pada Lampiran 5.

Tabel 4.1 Kadar Air Bunga Sirsak

Sampel	Kadar Air
Basah	66,98 %
Kering	6,39 %

Dari Tabel 4.1 menunjukkan bahwa kadar air yang terkandung dalam bunga Sirsak segar lebih tinggi daripada kadar air bunga Sirsak dalam keadaan kering. Hal ini disebabkan oleh kandungan air yang banyak pada sampel bunga Sirsak, selain itu sampel kering juga telah melalui proses pengeringan sebelumnya untuk dijadikan serbuk. Menurut Setyowati (2009) dalam Setyaningsih (2013) dalam proses ekstraksi maksimum kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan dengan lancar yaitu sebesar 11 %. Hasil pengukuran kadar air pada sampel bunga Sirsak kering adalah 6,39 %, hal ini menunjukkan bahwa sampel yang akan digunakan dalam proses ekstraksi maserasi mempunyai kadar air yang baik, karena semakin rendah kadar air dalam suatu sampel yang akan digunakan

maka semakin besar kontak antara pelarut yang digunakan dengan komponen senyawa aktif yang terkandung dalam sampel bunga Sirsak.

4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Bunga Sirsak (*Annona muricata*)

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan atau pengeluaran suatu komponen yang terkandung dalam campuran dari campurannya. Pada penelitian yang akan dilakukan ini menggunakan ekstraksi maserasi. Ekstraksi maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan dalam temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

Perlakuan ekstraksi maserasi pada penelitian ini dibagi menjadi dua, dengan tujuan untuk mempermudah dalam proses ekstraksi. Serbuk bunga Sirsak yang didapatkan ditimbang sebanyak 200 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer tutup 500 mL masing-masing berisi 100 g sampel. Perlakuan selanjutnya adalah dengan penambahan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah kloroform masing-masing sebanyak 300 mL dan direndam selama 24 jam. Tujuan perlakuan ini agar senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel tersebut dapat terekstrak dengan sempurna ke dalam pelarut. Menurut Khopkar (2010) prinsip utama dari ekstraksi maserasi adalah

kemampuan dari suatu pelarut dalam menarik atau mengikat metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel berdasarkan tingkat kepolaran dari pelarut yang digunakan, atau disebut juga dengan istilah *like dissolves like*.

Setelah direndam selama 24 jam, sampel disaring dengan menggunakan corong *buchner*. Hasil dari penyaringan tersebut adalah berupa filtrat dan residu berupa ampas sampel. Filtrat yang didapat disimpan kedalam wadah, sedangkan ampas sampel digunakan kembali pada proses perendaman dengan menggunakan pelarut yang sama. Perlakuan ekstraksi maserasi pada penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan sampai filtrat yang didapatkan berwarna pucat dengan volume pelarut yang digunakan pada proses perendaman berturut-turut adalah 300, 300, 200, dan 200 mL. Pada pengulangan keempat didapatkan perubahan warna filtrat dari pengulangan sebelumnya yang berwarna hijau pekat menjadi hijau pucat. Hal ini diasumsikan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam sampel bunga *Sirsak* sudah terikat habis dengan pelarut kloroform. Jumlah keseluruhan pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi maserasi 100 g sampel bunga *Sirsak* sebanyak 1000 mL.

Filtrat dari proses ekstraksi maserasi yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum* untuk mendapatkan ekstrak dalam keadaan pekat yang nantinya akan digunakan dalam proses terapi pada hewan uji dan pengujian golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Menurut Pranoto *et al* (2012) prinsip dari *rotary evaporator* yaitu menguapkan pelarut dengan merotasikan atau dengan memutar labu sebagai wadah filtrat untuk memperoleh endapan ekstrak.

Dalam penguapan pelarutnya, filtrat dituangkan dalam labu alas bulat dengan volume $\frac{1}{2}$ bagian dari volume labu alas bulat yang memiliki volume 1000 mL. Untuk memudahkan dalam proses penguapan pelarut dalam *rotary evaporator vacum* terlebih dahulu diketahui titik didih dari pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi maserasi. Dalam penelitian ini, pelarut yang digunakan adalah kloroform yang memiliki titik didih sebesar 60 °C. Penguapan pelarut dilakukan dibawah titik didih pelarutnya yakni dengan menggunakan suhu 50 °C di atas *waterbath* dan diputar dengan kecepatan yang telah ditentukan, sehingga dalam proses ini akan terjadi pencampuran yang sempurna dan mencegah terjadinya *bumping*.

Teknik yang digunakan dalam *rotary evaporator vacum* ini bukan hanya terletak pada pemanasannya tapi dengan menurunkan tekanan pada labu alas bulat dan memutar labu alas bulat dengan kecepatan tertentu. Menurut Vogel (1978) tekanan yang diberikan oleh pompa vakum lebih kecil pada rangkaian alat *rotary evaporator vacum* sehingga pelarut dibawah titik didihnya dapat teruapkan dan uap yang dihasilkan akan mudah tertarik ke dalam kondensor yang selanjutnya didinginkan sehingga akan dihasilkan pelarutnya kembali dalam wujud cair. Karena teknik itulah, suatu pelarut akan menguap dan senyawa yang larut dalam pelarut tersebut tidak ikut menguap, melainkan akan mengendap. Dan dengan pemanasan dibawah titik didih pelarut, sehingga senyawa yang terkandung dalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi.

Penguapan pelarut dengan menggunakan *rotary evaporator* dihentikan ketika sudah dipastikan bahwa pelarut sudah tidak menetes pada labu penampung

pelarut. Untuk mempertegas hasil tersebut dengan metode penimbangan konstan dengan perlakuan penimbangan setiap kali setelah di lakukan *rotary evaporator* seperti pada Lampiran 6.1. Selain itu, dengan cara diuapkan dengan menggunakan gas N₂. Tabel 4.2 menunjukkan hasil rendemen ekstrak pekat dari proses ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut kloroform.

Tabel 4.2 Rendemen ekstrak pekat kloroform bunga Sirsak

Berat Sampel (g)	Pelarut Kloroform (mL)	Warna Filtrat	Warna Ekstrak Pekat	Berat Ekstrak Pekat (g)	Rendemen
200	2000	Hijau pekat sampai hijau pucat	Hijau kehitaman	4,8092	2,4043 %

Dari Tabel 4.2 di atas bahwa dalam ekstrak pekat yang dihasilkan menunjukkan adanya kandungan senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan pelarut yang digunakan yaitu kloroform. Hal ini juga menunjukkan bahwa dalam bunga Sirsak (*Annona muricata*) terkandung senyawa-senyawa yang bersifat semipolar. Putri (2013) dalam penelitiannya mengekstrak bunga Sirsak dengan menggunakan variasi pelarut *n*-heksana, kloroform, dan etanol menunjukkan bahwa rendemen terbesar terdapat pada ekstrak dengan pelarut kloroform yaitu 0,811 % b/b. Dari ekstrak yang diperoleh tersebut, kemudian akan digunakan untuk pengujian selanjutnya yaitu uji antikanker Fibrosarkoma secara *in vivo* terhadap hewan uji mencit jantan galur Balb/C, dan identifikasi golongan senyawa aktifnya dengan menggunakan KLT Preparatif untuk selanjutnya dilanjutkan pada tahapan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

4.4 Aktivitas Antikanker Fibrosarkoma Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak

4.4.1 Persiapan Hewan Uji

Uji aktivitas antikarsinogenik dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek yang diberikan oleh ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) dalam kemopreventif pada penyakit kanker. Pengujian antikarsinogenik tersebut secara *in vivo* dilakukan dengan melakukan pengamatan pada preparat jaringan dari subkutan yang telah diinjeksi dengan senyawa karsinogen. Selain pengamatan secara histopatologi, dilakukan juga pengamatan terhadap parameter pendukung berupa jumlah hewan uji yang mati untuk setiap kelompok perlakuan, berat dan volume kanker, serta berat badan hewan uji. *In vivo* (bahasa Latin: "dalam hidup") adalah eksperimen dengan menggunakan keseluruhan hidup dari suatu organisme. Kelebihan dari uji *in vivo* adalah lebih cocok untuk mengamati efek keseluruhan percobaan pada subjek organisme hidup.

Pada penelitian ini, senyawa karsinogen yang digunakan dalam proses terjadinya suatu kanker pada hewan uji adalah karsinogen yang berasal dari senyawa kimia 7,12-Dimetilbenz(*a*)antrasena (DMBA). DMBA merupakan senyawa prokarsinogen dengan rumus empiris $C_{20}H_{16}$ dan memiliki berat molekul 256,43 g/mol. DMBA berbentuk padat, berwarna kuning kehijau-hijauan (Sigma-Aldrich, 2010). DMBA termasuk dalam senyawa karsinogen golongan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) yang merupakan polutan lingkungan dan produk pirolisis dari minyak dan material biologi. DMBA merupakan jenis karsinogen

sekunder (*prokarsinogenik*) sehingga harus mengalami aktivasi metabolisme (*biotransformasi*) untuk menghasilkan karsinogenesis. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan DMBA salah satunya adalah aseton.

Penggunaan aseton sebagai pelarut karena sifat aseton yang mampu larut dalam air dan pelarut organik lainnya. Selain itu, secara alami aseton juga ditemukan pada tubuh manusia dalam jumlah kecil. Kanker dapat terjadi karena adanya perubahan DNA sel atau disebut juga mutasi. Salah satu mutagen adalah *polisiklik aromatis hidrokarbon* (PAH) yang ditemukan pada saat pembakaran bahan organik yang tidak sempurna. *7,12 dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) merupakan salah satu dari tiga produk degradasi PAH yang berpotensi sebagai bahan sitotoksik, mutagenik, agen immunosupresif, dan karsinogen.

Pengujian antikanker ini dilakukan secara *in vivo* terhadap hewan uji mencit. Hewan uji (*animal model*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Balb/C dengan berat 20-30 gram dengan usia 8-12 minggu. Alasan dipilihnya mencit sebagai hewan uji menurut Coutrier (2008) adalah karena mencit memiliki kesetaraan taksonomi dengan manusia, seperti reaksi terhadap penyakit maupun pengobatan, serta mempunyai kemiripan dalam hal fisiologi manusia. Selain itu, menurut Jacobson dan Keller (2006) juga dengan mempertimbangkan faktor ukuran, kemudahan dalam perawatan, harga yang relatif lebih terjangkau, serta hasil yang cukup konsisten dan relevan.

Pengujian antikanker, hewan uji yang akan digunakan untuk perlakuan diusahakan dalam keadaan yang seragam seperti umur, galur dan jenis kelaminnya harus sama. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk memperkecil variabilitas

biologis sehingga dapat memberikan respon yang relatif lebih seragam terhadap rangsangan yang diberikan. Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji dipelihara terlebih dahulu dalam kandang yang beralaskan serbuk kayu dan anyaman kawat sebagai penutupnya serta pemberian makan dan minum secara *ad libitum* selama satu minggu. Pemberian makan dan minum secara *ad libitum* ini adalah pemberian makanan dan minuman secara bebas tanpa adanya batasan dan terus-menerus sampai hewan uji tersebut berhenti sesuai dengan keinginannya. Sedangkan tujuan dari pemeliharaan selama satu minggu adalah agar hewan uji dapat beradaptasi terhadap lingkungan barunya.

4.4.2 Perlakuan Induksi dan Terapi Terhadap Hewan Uji

Pengelompokan hewan uji dilakukan berdasarkan rentang berat badan hewan uji yang ada secara acak. Pengacakan dalam pengelompokan ini bertujuan agar masing-masing kelompok perlakuan terdapat hewan uji dengan rentang berat badan 20-30 g sehingga setiap hewan uji memiliki kesempatan yang sama sebagai sampel. Hewan uji dikelompokkan menjadi 5 perlakuan yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dosis 25 mg/kg, 50 mg/kg, dan 100 mg/kg.

Masing-masing larutan uji dibuat dengan kontrol negatif yaitu kontrol dengan penginduksian senyawa karsinogen DMBA dengan pemberian CMC-Na 0,5 % yang bertujuan untuk mengetahui apakah pelarut CMC-Na yang digunakan juga dapat memberikan pengaruh pada pertumbuhan kanker, kontrol positif yaitu kontrol yang dilakukan dengan penginduksian senyawa karsinogen DMBA dengan pemberian obat kemoterapi kanker Metotreksat dengan dosis 0,023 mg/g BB secara oral selama satu minggu sekali. Metotreksat merupakan obat yang

secara luas digunakan dalam kemoterapi berbagai jenis kanker. Obat ini dapat digunakan untuk penyakit leukemia, limfolistik, akut, kariokarsinoma, kanker payudara, kanker leher dan kepala, buli-buli, sarkoma osteogenik, mesothelioma, dan kanker paru (Departemen Farmakologi dan Terapeutik, 2007). Kontrol positif ini diberikan dengan tujuan untuk mendapatkan gambaran yang jelas tentang potensi penghambatan kanker dan membandingkan efek antikanker dengan ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) sebagai acuan pengaruh terhadap pertumbuhan kanker Fibrosarkoma.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini telah mewakili dosis yang memiliki pengaruh terhadap penghambatan kanker dengan variasi dosis bertingkat sebesar 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB. Pembuatan masing-masing dosis yang digunakan untuk uji antikanker tersebut sesuai dengan perhitungan dosis larutan uji pada Lampiran 4. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak adalah pelarut yang tidak berbahaya dan tidak memiliki efek samping terhadap hewan uji. Dalam penelitian ini pelarut yang digunakan adalah CMC-Na 0,5 %. Penggunaan pelarut CMC-Na 0,5 % dikarenakan pelarut ini bersifat netral dan kemampuannya dalam membentuk koloid untuk meningkatkan viskositas, yang artinya bahwa CMC-Na mampu mengental (gel) dalam tubuh sehingga lebih mudah dicerna oleh hewan uji dibandingkan dengan penggunaan pelarut lain.

Pemberian perlakuan dosis ekstrak pada hewan uji dilakukan setelah penginduksian senyawa karsinogen DMBA. Senyawa DMBA tersebut diinduksikan pada hewan uji pada daerah subkutan lapisan kulit yang berada di

tengkuk hewan uji. Hal ini mengacu pada penelitian Mitelman dan Levan (1972) yaitu Fibrosarkoma dengan berbagai tingkat diferensiasi, berkembang ketika DMBA diinduksikan secara subkutan. Penginduksian senyawa DMBA pada hewan uji dilakukan dua kali dalam satu minggu selama 6 minggu. Harapan dari penginduksian DMBA dalam tubuh hewan uji adalah terbentuknya kanker Fibrosarkoma. Kanker Fibrosarkoma merupakan salah satu kanker yang dapat merusak jaringan ikat pada tubuh. Terjadinya kanker ini ditandai dengan benjolan-benjolan abnormal yang muncul pada tubuh hewan uji. Terapi dapat dilakukan ketika waktu induksi pada hewan uji telah berakhir.

Pemberian terapi obat atau ekstrak larutan uji pada hewan uji mencit harus diberikan melalui jalur yang biasa digunakan pada manusia, yaitu melalui oral. Mencit akan diterapi obat secara per-oral, dimana terapi tersebut diberikan dengan menggunakan alat suntik yang dilengkapi dengan sonde lambung atau kanula yang berujung tumpul berbentuk bulat. Sonde lambung atau kanula dimasukkan ke dalam mulut hewan uji mencit secara perlahan-lahan melalui langit-langit mulut hewan uji mencit ke belakang sampai esophagus. Kemudian dimasukkan ekstrak secara cepat untuk mengurangi kesalahan (obat tidak tertelan) dalam memberikan obat atau ekstrak larutan uji pada hewan uji mencit. Terapi diberikan selama 14 hari dengan tujuan diharapkan dalam waktu tersebut sudah dapat menghambat pertumbuhan kanker Fibrosarkoma secara efektif.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menimbang berat badan hewan uji mencit. Selama penelitian tentang antikarsinogenik dari ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*), terdapat banyak sekali hewan uji yang mati. Baik

selama proses induksi atau pada proses terapi. Hal ini disebabkan berbagai faktor yang dapat menyebabkan hewan uji tersebut mati sebelum penelitian selesai. Menurut Hutomo *et al* (2005) berpendapat bahwa kematian hewan uji selama perlakuan penelitian juga dapat diakibatkan oleh sistem imunitas pada diri hewan uji itu sendiri yang lemah, salah satu hal yang dapat mempengaruhi adalah kebersihan tempat hewan uji dan makanan. Tabel 4.3 berikut adalah ringkasan dari data kematian hewan uji yang didapatkan pada saat penelitian berlangsung.

Tabel 4.3 Persentase angka kematian hewan uji pada saat induksi dan terapi pada setiap perlakuan.

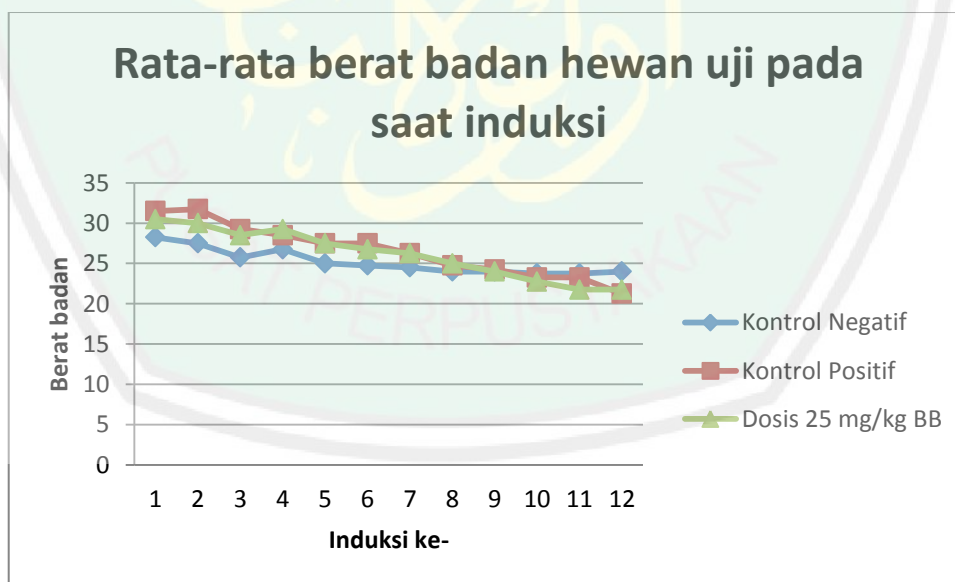
Perlakuan	Jumlah awal	Angka kematian		Sisa	Persentase Kematian
		Induksi	Terapi		
Kontrol Positif (Metotreksat 2,5 mg)	6	2	0	4	33,3
Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	6	2	0	4	33,3
Ekstrak bunga Sirsak 25 mg/kg	6	0	2	4	33,3
Ekstrak bunga Sirsak 50 mg/kg	6	1	5	0	100
Ekstrak bunga Sirsak 100 mg/kg	6	2	4	0	100

Dari Tabel 4.3 dapat dilihat pada dosis tertinggi yaitu dosis 50 mg/g BB dan dosis 100 mg/g BB menunjukkan angka kematian yang besar yaitu 100 %. Dari data di atas dapat dilihat bahwa jumlah kematian terbanyak terjadi pada saat terapi yaitu 11 ekor hewan uji. Menurut Elya *et al* (2010) Kematian hewan uji juga dapat disebabkan oleh larutan uji yang terdapat senyawa metabolit sekunder yang cukup toksik sehingga pemberian dalam jumlah yang sangat besar dapat menyebabkan kematian hewan uji. Jika dihubungkan dengan pernyataan yang dikemukakan

Elya *et al* (2010) di atas dengan ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) yang digunakan, maka terdapat hubungan sebab akibat dimana pada penelitian Putri (2013) yang menyatakan bahawa nilai LC_{50} dari ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) adalah 2,916 ppm. Menurut Meyer *et al* (1982) tingkat toksisitas dari suatu ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat nilai dari LC_{50} . Suatu ekstrak dianggap sangat toksik apabila memiliki nilai LC_{50} dibawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC_{50} 30-1000 ppm dan dianggap tidak toksik bila nilai LC_{50} di atas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut memberikan makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor. Semakin kecil harga LC_{50} semakin toksik suatu senyawa. Dari sini dapat diambil kesimpulan bahwa nilai LC_{50} ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) bersifat sangat toksik, sehingga dapat diasumsikan bahwa kematian hewan uji juga dapat disebabkan oleh ekstrak yang bersifat sangat toksik.

Selain itu, pemberian suatu dosis dalam jumlah banyak juga dapat memberikan dampak yang buruk pada kelangsungan hidup hewan uji. Ibrahim *et al* (2012) menyatakan bahwa dosis dibuat sebagai suatu peringkat dengan kelipatan logaritmik yang tetap. Dosis terendah merupakan dosis yang tidak menyebabkan timbulnya efek atau gejala keracunan, dan dosis tinggi merupakan dosis yang menyebabkan kematian semua (100 %) hewan uji. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa dosis 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB tidak dapat dilanjutkan untuk uji aktivitas kanker. Hal ini disebabkan oleh kematian seluruh hewan uji pada kelompok kontrol tersebut.

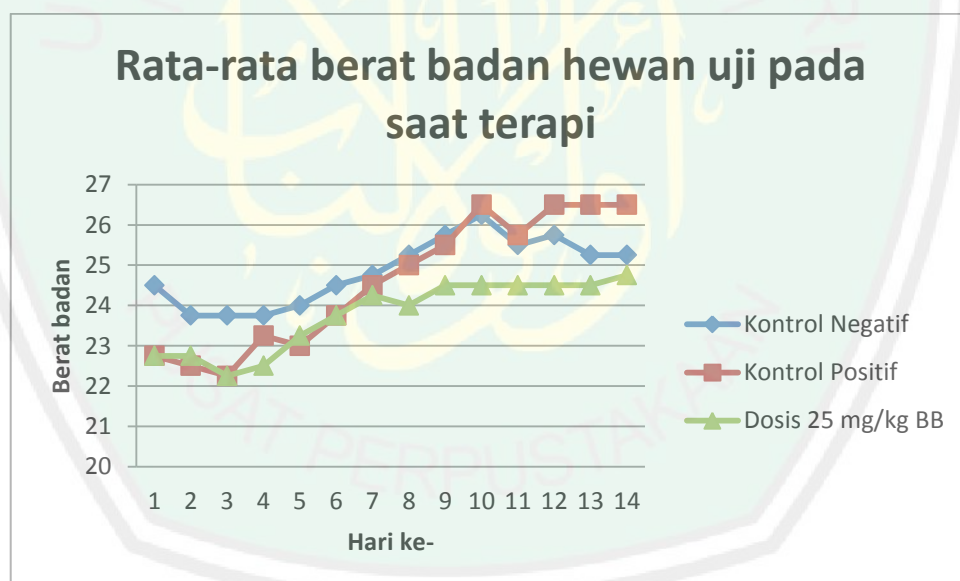
Parameter yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh dari suatu ekstrak terhadap pertumbuhan kanker juga dapat dilihat dari berat badan dari hewan uji yang digunakan. Pada umumnya berat badan pada saat dilakukan induksi DMBA pada hewan uji mengalami penurunan atau bahkan mengalami kenaikan dan penurunan yang tidak stabil. Menurut Mun'im (2006) kematian hewan uji selama masa penelitian biasanya diawali dengan kecenderungan penurunan berat badannya. Hal ini disebabkan karena rasa sakit akibat kanker yang diderita oleh hewan uji, sehingga mempengaruhi nafsu makan dari hewan uji tersebut. Berikut adalah Gambar 4.1 menunjukkan rata-rata berat badan hewan uji pada saat induksi DMBA.



Gambar 4.1 Grafik berat rata-rata hewan uji pada saat induksi DMBA

Gambar 4.1 di atas memberikan gambaran tentang rata-rata berat badan hewan uji mencit pada saat induksi senyawa karsinogen DMBA yang mengalami

penurunan berat badan pada semua kelompok perlakuan. Hal yang menyebabkan hilangnya berat badan pada hewan uji ini dimungkinkan karena pengaruh induksi senyawa DMBA pada tubuh hewan uji, sehingga hewan uji mengalami penderitaan yang cukup berat dan bahkan mengalami stres dengan ditandai menghilangnya nafsu makan. Stres dapat menyebabkan penurunan nafsu makan yang berakibat lebih lanjut terhadap ketidakstabilan berat badan (Hatim, 2012). Gambar 4.2 di bawah ini merupakan gambaran berat badan hewan uji mencit ketika mendapatkan perlakuan terapi.



Gambar 4.2 Grafik berat rata-rata hewan uji pada saat terapi

Pengamatan dari Grafik 4.2 di atas dapat disimpulkan bahwa pada saat hewan uji menerima perlakuan terapi, berat badan rata-rata hewan uji mengalami peningkatan. Pemberian terapi pada hewan uji mencit cukup memberikan pengaruh terhadap peningkatan rata-rata berat badan hewan uji, meskipun hanya

sedikit sekali jika dibandingkan penurunan berat badan hewan uji ketika mendapat perlakuan induksi DMBA. Hal ini dapat diasumsikan bahwa pada saat perlakuan terapi pada hewan uji mencit, rasa sakit yang disebabkan kanker sedikit demi sedikit berkurang dan dapat mengembalikan nafsu makan hewan uji. Tabel 4.4 di bawah menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap berat badan hewan uji mencit selama pengamatan.

Tabel 4.4 Perubahan berat badan rata-rata hewan uji selama induksi dan terapi

Perlakuan	Berat badan rata-rata $\pm$ Standar deviasi		Perubahan berat badan (%)
	Induksi	Terapi	
Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	25,162 $\pm$ 4,222	25,315 $\pm$ 2,980	+0,15
Kontrol Positif (Metotreksat 2,5 mg)	26,582 $\pm$ 1,148	24,582 $\pm$ 1,884	-2
Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	26,165 $\pm$ 1,446	23,767 $\pm$ 2,437	-2,4

Keterangan : (-) penurunan BB, (+) kenaikan BB

Data Tabel 4.4 menunjukkan bahwa perubahan terhadap berat badan hewan uji setiap kelompok memperlihatkan penurunan dan kenaikan rata-rata berat badan pada kelompok perlakuan pada saat dilakukan induksi DMBA dan terapi. Perubahan rata-rata berat badan kelompok perlakuan Metotreksat 2,5 mg/kg BB dan dosis 25 mg/kg BB mengalami penurunan berat badan, sedangkan pada perlakuan kontrol negatif mengalami kenaikan rata-rata berat badan. Hal ini dapat dimungkinkan oleh daya tahan tubuh dari masing-masing hewan uji yang berbeda-beda, sehingga perubahan rata-rata berat badan setiap perlakuan memiliki perbedaan.

Efek dari perubahan berat badan hewan uji juga dapat diketahui dari hasil analisis statistika dengan menggunakan program SPSS 16.00 pada uji *One Way ANOVA* ini digunakan untuk mengetahui signifikansi berat rata-rata hewan uji perlakuan kontrol. Sedangkan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata berat hewan uji antar perlakuan pada masing-masing tahapan perlakuan digunakan uji Tukey. Uji Tukey ini digunakan untuk mengetahui signifikansi perbedaan setiap kelompok perlakuan seperti yang disajikan pada Tabel 4.5 dengan hasil analisa pada Lampiran 10.

Tabel 4.5 Hasil analisis statistika ANOVA dengan Uji Tukey

Perlakuan	Perlakuan pembanding	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence	
					Lower Bound	Upper Bound
Negative	metotreksat 2,5 mg	-19.64977*	6.66820	.039	-38.2674	-1.0321
	dosis 25 mg	-28.34931*	6.66820	.005	-46.9670	-9.7316
metotreksat 2,5 mg	negatif	19.64977*	6.66820	.039	1.0321	38.2674
	dosis 25 mg	-8.69953	6.66820	.428	-27.3172	9.9181
dosis 25 mg	negatif	28.34931*	6.66820	.005	9.7316	46.9670
	metoteksat 2,5 mg	8.69953	6.66820	.428	-9.9181	27.3172

Berdasarkan Tabel 4.5 hasil analisis statistika di atas menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB yang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna yakni perbandingan antara kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB dengan kelompok kontrol negatif tersebut memiliki nilai $p < 0,05$ (Lampiran 10). Hal ini menunjukkan adanya perubahan berat rata-rata hewan uji yang bermakna terhadap

kelompok kontrol negatif atau dapat dikatakan bahwa dosis 25 mg/kg BB lebih berpengaruh terhadap perubahan berat rata-rata hewan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif pada saat perlakuan terapi. Pada kelompok kontrol positif terhadap kelompok negatif juga memiliki perbedaan yang bermakna. Hal ini kemungkinan bisa disebabkan pemberian terapi kontrol positif (Metotreksat 2,5 mg) mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Sedangkan kontrol positif dan dosis 25 mg/kg BB tidak terdapat perbedaan bermakna yang berarti memiliki pengaruh yang sama terhadap pertumbuhan sel kanker. Menurut Mun'im (2006) sampai saat ini belum terdapat teori yang secara memuaskan dapat menjelaskan antara kejadian kanker dengan penurunan berat badan yang dialami oleh penderita. Namun dengan demikian, kejadian kanker pada manusia biasanya diikuti dengan masalah penurunan nafsu makan sehingga menyebabkan penurunan berat badan.

4.4.3 Aktivitas Antikanker Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (*Annona muricata*) Berdasarkan Volume dan Berat Jaringan Kanker

Pengamatan terhadap uji antikarsinogenesis dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis dilakukan selama 8 minggu meliputi proses penginduksian senyawa karsinogen DMBA dan proses perlakuan terapi pada hewan uji mencit untuk semua kelompok yang meliputi jumlah mencit yang terkena kanker dan berat kanker. Pengamatan pada saat induksi senyawa DMBA diakhiri pada minggu ke 6 setelah benjolan kanker sudah tampak oleh pengamatan dan menyebabkan penderitaan pada hewan uji untuk kemudian dilakukan perlakuan terapi pada setiap kelompok perlakuan.

Menurut Sukardiman (2007), pengamatan makroskopis pertumbuhan kanker pada hewan uji mencit dilakukan setiap hari selama 2 bulan. Parameter keberhasilan pada penelitian yang dilakukan adalah benjolan kanker pada daerah subkutan tengkuk hewan uji dan gambaran mikroskopik berupa irisan histopatologi. Tabel 4.6 menyatakan jumlah hewan uji yang menderita kanker Fibrosarkoma setelah pembedahan.

Tabel 4.6 Jumlah hewan uji yang menderita kanker Fibrosarkoma

Perlakuan	Jumlah awal	Hewan uji yang mengalami kanker Fibrosarkoma		Lokasi
		Jumlah hewan uji	Persentase (%)	
Kontrol Positif (Metotreksat 2,5 mg)	4	2	50	Subkutan pada tengkuk
Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	4	3	75	Subkutan pada tengkuk
Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	4	2	50	Subkutan pada tengkuk

Dari Tabel 4.6 hewan uji yang mendapatkan perlakuan ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) memiliki angka kejadian kanker yang sama dengan hewan uji pada kelompok kontrol positif (50 %). Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa kanker tidak hanya tumbuh di tengkuk. Hal ini disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah faktor imunitas dari tubuh hewan uji itu sendiri. Rendahnya laju pertumbuhan jumlah mencit penderita kanker pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis juga dapat diakibatkan rendahnya stres yang diterima. Dari Tabel 4.6 di atas juga dapat dilihat bahwa lokasi kanker pada umumnya berada pada jaringan subkutan kulit pada daerah

tengkuh hewan uji. Mun'im (2006) mengemukakan bahwa kejadian kanker yang paling banyak ditemukan pada hewan uji mencit yang telah diinduksi DMBA adalah pada organ paru-paru dan kulit.

Berdasarkan hasil pembedahan dan pengamatan secara visual ditunjukkan bahwa kejadian kanker pada hewan uji mencit terjadi pada organ di bawah kulit atau subkutan. Pada hewan uji mencit, angka kejadian kanker paling tinggi ditemukan pada kelompok hewan uji pada kelompok perlakuan kontrol negatif yaitu kelompok yang mendapatkan induksi DMBA dan mendapatkan terapi pelarut yang digunakan larutan uji yaitu CMC-Na 0,5 %. Hal ini dimungkinkan karena pemberian terapi pada kontrol negatif tidak dapat memberikan pengaruh terhadap hambatan pertumbuhan kanker, sehingga memberikan pengaruh terhadap angka terjadinya kanker yang besar. Selain itu, hewan uji pada kelompok perlakuan kontrol positif dan dosis 25 mg/kg BB harus diberikan ekstrak serta obat setiap harinya, sedangkan kontrol negatif hanya diberikan pelarut CMC-Na. Patut diduga bila stres yang diakibatkan prosedur penelitian menyebabkan kanker lebih ganas dengan memicu metastasis, yang dapat dilihat dari tingkat kejadian kanker.

Berdasarkan hasil tersebut membuktikan bahwa DMBA merupakan jenis karsinogen yang cukup potensial pada hewan pengerat, dan secara luas telah digunakan untuk menginduksi terjadinya kanker. Angka terjadinya kanker pada kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB yang lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif dapat diasumsikan bahwa ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona*

muricata) memiliki kemampuan untuk menekan terjadinya kanker pada hewan uji.

Pada penelitian aktivitas antikanker fibrosarkoma ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) secara *in vivo* pada hewan uji mencit jantan ini dilakukan analisis secara klinis berdasarkan ukuran jaringan kanker. Jaringan kanker hewan uji yang sudah diketahui berat kankernya, maka digunakan untuk menghitung persentase hambatan pertumbuhan kanker dengan rumus:

$$\text{Hambatan (\%)} = \left(1 - \frac{BT}{BC}\right) \times 100\%$$

BT = berat jaringan kanker kelompok perlakuan (g)

BC = berat jaringan kanker kelompok kontrol negatif (g)

Tabel 4.7 di bawah menunjukkan besarnya volume kanker, berat kanker dan persentase hambatan pada aktivitas antikanker fibrosarkoma ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*).

Tabel 4.7 Analisis dan persentase hambatan pertumbuhan kanker Fibrosarkoma

Perlakuan	Rata-rata Volume Kanker (mm ³)	Rata-rata Berat Kanker (mg)	Hambatan Pertumbuhan Kanker (%)
Kontrol negative (CMC-Na 0,5%)	0,673	153,19	0
Kontrol positif (Metotreksat 2,5 mg)	0,578	146,45	4,4
Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	0,587	148,49	3,1

Dari Tabel 4.7 di atas diketahui bahwa volume kanker dan berat kanker pada hewan uji setelah dilakukan pembedahan. Pada pengujian aktivitas

antikanker sebagai kemopreventif yang berarti untuk pencegahan tampak dalam data volume dan berat kanker selama perlakuan terapi. Volume dan berat kanker pada kontrol negatif yang hanya diberikan terapi dengan CMC-Na 0,5 % memiliki volume dan berat kanker yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol positif dan dosis 25 mg/kg BB yang cenderung memiliki volume dan berat kanker yang kecil dari kelompok kontrol negatif. Jika dilihat dari data tabel di atas, perkembangan volume dan berat jaringan kanker pada kelompok perlakuan kontrol positif dan dosis 25 mg/kg BB memiliki perbedaan yang cukup jauh dengan perlakuan kontrol negatif, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) memiliki aktivitas sebagai kemopreventif antikanker fibrosarkoma.

Tabel 4.7 di atas juga menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB memiliki persentase hambatan terhadap laju pertumbuhan kanker fibrosarkoma. Persentase hambatan kelompok kontrol positif lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB, hal ini dikarenakan obat yang digunakan pada kelompok kontrol positif adalah Metotreksat yang memiliki kemampuan dalam menghambat laju pertumbuhan kanker dengan baik. Obat ini dapat digunakan untuk penyakit leukemia, limfositik, akut, koriokarsinoma, kanker payudara, kanker leher dan kepala, buli-buli, sarkoma osteogenik, mesotelioma dan kanker paru (Departemen Farmakologi dan Terapeutik, 2007).

Data persentase hambatan pertumbuhan kanker di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) dengan dosis 25 mg/kg

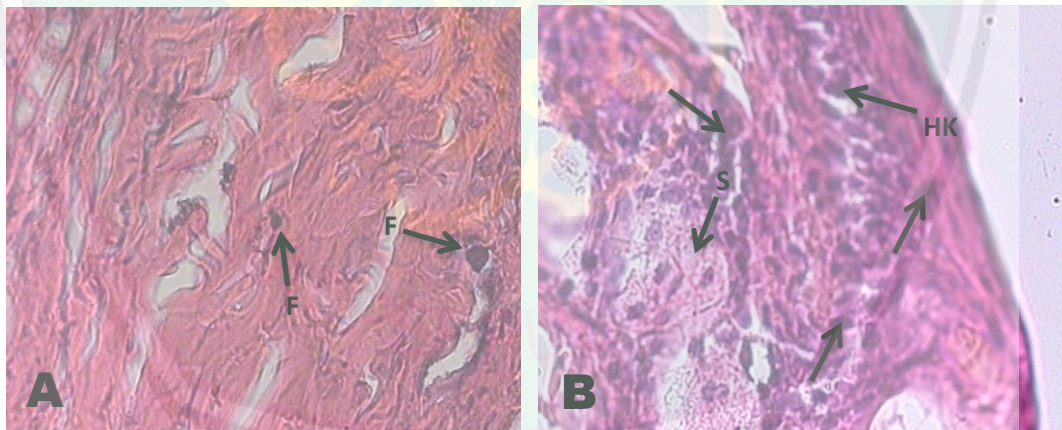
BB memiliki kemampuan kemopreventif terhadap laju pertumbuhan kanker fibrosakoma. Meskipun nilai persentasenya lebih rendah dibandingkan dengan persentase hambatan dari obat Metotreksat pada kelompok perlakuan kontrol positif.

4.4.4 Aktivitas Antikanker Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak (*Annona muricata*) Berdasarkan Gambaran Mikroskopis Sediaan Histopatologi Jaringan Kanker

Pada gambaran secara mikroskopis dapat juga dilihat perkembangan kanker dengan ciri-ciri susunan sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda-beda (*pleomorphism*). Sebelum dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya, dibuat terlebih dahulu preparat histologi agar memudahkan dalam pengamatan. Organ jaringan kanker yang telah diambil dari bagian tubuh hewan uji yang sudah dipotong-potong dimasukkan ke dalam cetakan dengan pinset. Cetakan ini terbuat dari besi yang telah diolesi gliserin dengan tujuan untuk mencegah lekatnya parafin dalam cetakan. Kemudian ditunggu sampai parafin membeku untuk kemudian dilakukan pemotongan blok parafin dengan menggunakan mikrotom. Pemotongan dilakukan secara random, kemudian dicelupkan air dengan suhu 20 °C sampai jaringan mengembang dengan baik kemudian diletakkan pada objek gelas sebelum diolesi dengan albumin telur. Selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan hot plate.

Pengecatan dan pewarnaan merupakan proses mewarnai preparat agar memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Pewarnaan jaringan kanker menggunakan Hematoksilin Eosin (HE). Pewarnaan dilakukan dengan

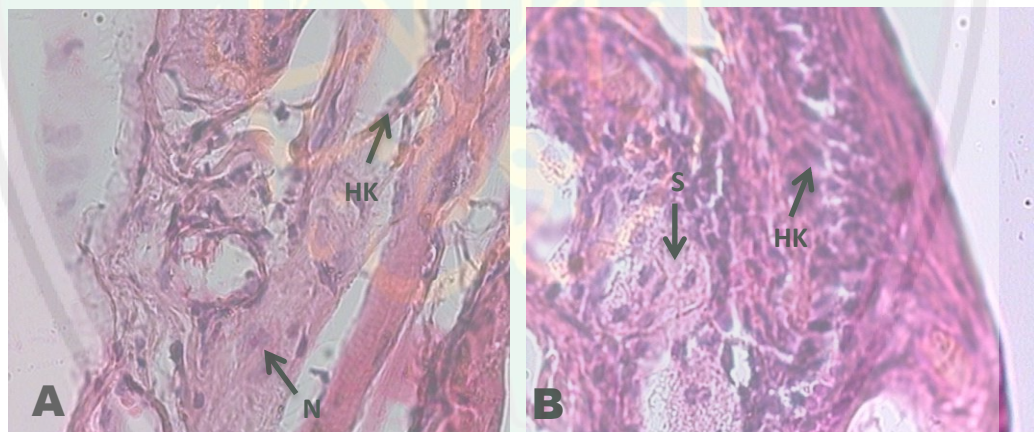
menggunakan metode Harris. Pemeriksaan histopatologi untuk dapat melihat pertumbuhan sel jaringan kanker dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel pada jaringan. Pengamatan secara mikroskopik preparat histopatologi fibrosarkoma hewan uji mencit jantan pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pemeriksaan perubahan pertumbuhan jaringan sel kanker secara histopatologi dilakukan dengan mengamati perubahan struktur/morfologi sel (terjadinya diferensiasi ukuran sel, jumlah sel, dan kerusakan sel). Gambar 4.3 menunjukkan gambaran dari jaringan sel fibrosarkoma kelompok kontrol negatif yang dibandingkan dengan jaringan sel normal.



Gambar 4.3 Gambaran mikroskopis sediaan histopatologi kelompok normal (A) dan kelompok kontrol negatif (B) pada perbesaran 400x
Keterangan: Hiperkromatin (HK), Spindel (S) dan sel normal fibroblas (F)

Gambaran histopatologi jaringan sel kanker fibrosarkoma anatomi kelompok kontrol negatif di atas memperlihatkan adanya sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, dan terdapat banyaknya sel dan ukuran inti sel yang berbeda-beda (*pleomorphism*). Hal ini berbeda dengan sel normal yang terdapat

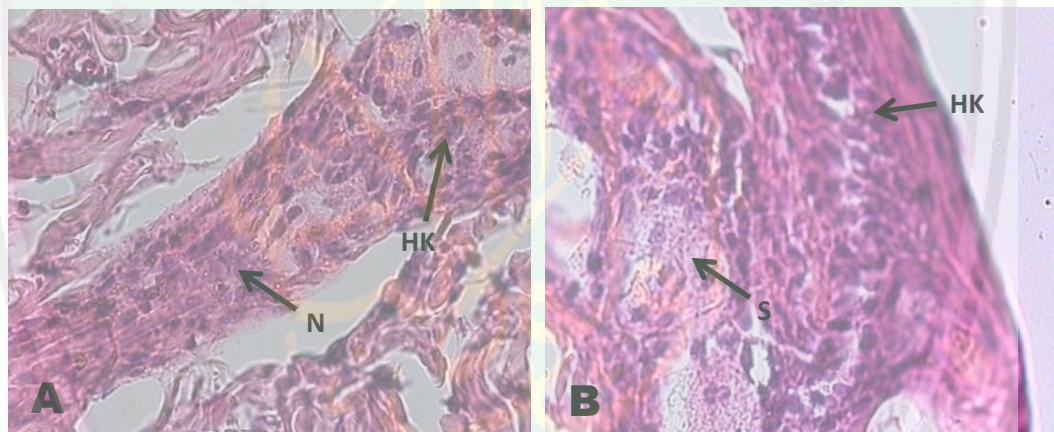
sel fibroblas yang memiliki selularitas yang tidak padat serta memiliki bentuk yang teratur. Menurut Wardhani (2013) adanya bentuk sel yang tidak teratur dan selularitas sel-sel yang padat merupakan ciri dari fibrosarkoma. Sel-sel fibrosarkoma umumnya berbentuk spindel (S) dengan inti sel yang berbeda dimana terdapat inti yang berukuran besar dan kecil yang menandakan tumor tersebut ganas. Inti sel pada fibrosarkoma juga mengalami hiperkromatin (HK) yaitu inti sel yang bertambah padat sehingga tampak terlihat gelap. Berikut adalah Gambar 4.4 jaringan sel kanker fibrosarkoma kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif



Gambar 4.4 Gambaran mikroskopis sediaan histopatologi kelompok kontrol positif (Metotreksat) (A) dan kontrol negatif (B)
Keterangan : Hiperkromatin (HK), spindel (S) dan nekrosis (N)

Gambar 4.4 menunjukkan masih terdapat jaringan sel kanker fibrosarkoma yang tampak terlihat jelas pada kelompok kontrol positif (Metotreksat), yang ditandai dengan pola khas fibrosarkoma seperti selularitas tidak begitu padat. Pada kelompok ini terlihat diferensiasi sel-sel yang buruk yang merupakan ciri-ciri terjadinya kanker. Terdapat pula sel-sel yang mengalami nekrosis (N) yang

terlihat dalam jumlah yang banyak. Hal ini berbeda dengan keadaan pada kontrol negatif yang memiliki selularitas yang padat serta memiliki bentuk sel yang tidak teratur dan mengalami hiperkromatin. Hal ini mengindikasikan bahwa Metotreksat terbukti mampu menghambat pertumbuhan sel kanker dengan cara mematikan sel-sel kanker dalam jumlah relatif cukup banyak. Gambar 4.5 di bawah menunjukkan sel kanker yang terdapat pada kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB dibandingkan dengan kontrol negatif.



Gambar 4.5 Gambaran mikroskopis sediaan histopatologi kelompok kontrol dosis 25 mg/kg BB (A) dan kontrol negatif (B).
Keterangan: Hiperkromatin (HK), spindel (S), dan nekrosis (N)

Gambar 4.5 di atas merupakan gambaran umum sediaan yang diberikan perlakuan terapi ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 25 mg/kg BB menunjukkan masih terdapat jaringan kanker fibrosarkoma meskipun seluleritasnya tidak sepadat kontrol negatif dan sedikit lebih banyak dibandingkan dengan kontrol positif. Jaringan sel nekrosis juga ditemukan pada kelompok perlakuan dosis 25 mg/kg BB ini dalam jumlah yang cukup banyak. Berbeda dengan kontrol negatif yang memiliki bentuk sel yang tidak teratur serta memiliki

inti sel yang berbeda-beda (spindel) dan mengalami hiperkromatin pada gambaran sel-selnya. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kelompok dosis memiliki aktivitas terhadap penghambatan pertumbuhan kanker Fibrosarkoma.

Hasil pengamatan sediaan histopatologi anatomi menunjukkan adanya aktivitas antikanker ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 25 mg/kg BB dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Adanya aktivitas antikanker ditunjukkan oleh tanda-tanda penyembuhan seperti selularitas yang tidak begitu padat, banyaknya sel yang mengalami nekrosis dan sel hiperkromatin yang jumlahnya relative sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif. Mekanisme aktivitas antikanker dikaitkan dengan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut yaitu steroid.

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan tiga cincin sikloheksana terpadu dan satu cincin siklopentena yang bergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 2006). Banyak penelitian yang telah membuktikan bahwa steroid memiliki kemampuan sebagai antikanker. Steroid dapat bertindak sebagai pencegahan aktivasi metabolik dari suatu senyawa karsinogen. Senyawa steroid dalam bunga Sirsak dapat berinteraksi dengan enzim-enzim metabolisme tingkat I seperti sitokrom P450. Steroid menghambat aktivasi isoenzim P450 tertentu seperti CYP1A1 dan CYP1A2 sehingga tampak memiliki perlindungan untuk melawan induksi kerusakan sel akibat aktivasi karsinogen. Perlu diketahui bahwa senyawa karsinogen DMBA adalah senyawa karsinogen yang bersifat polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), sehingga harus

mengalami aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis dengan bantuan enzim sitokrom P450 CYP1B1/CYP1A1 seperti pada Gambar 2.2, yang memiliki fungsi sebagai katalis oksidator pada lintasan metabolisme steroid, asam lemak, obat, racun, dan karsinogen. Sehingga dapat dikatakan pada tahapan tersebut senyawa steroid sudah mampu untuk menghambat pertumbuhan kanker, karena melalui tahapan yang sama dengan tahapan senyawa karsinogen.

Senyawa steroid akan mengaktivasi protein P53 yang berperan sebagai pengatur atau pelindung siklus sel dan secara patologis juga berperan dalam proses apoptosis melalui aktivasi protein Bax yang akan merangsang mitokondria untuk memproduksi sitokrom $-C$. Adanya sitokrom $-C$ bersama *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) menyebabkan aktivasi caspase 9. Caspase 9 akan bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya caspase 3 untuk mengaktivasi DNAase yang selanjutnya akan memecah DNA menjadi fragmen dan terjadi peningkatan apoptosis (Yalon *et al.*, 2004).

Selanjutnya protein P53 akan mengaktifkan transkripsi protein P21, sehingga menyebabkan penekanan atau hambatan terhadap pembentukan semua enzim *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Hal ini akan menyebabkan protein *cyclin* menjadi tidak aktif, akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA, RNA, dan mitosis sel akan terhenti. Keadaan ini akan mengakibatkan sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena terjadi kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Yalon *et al.*, 2004).

4.5 Pemisahan Senyawa Aktif Metode Kromatografi Lapis Tipis

Pada umumnya tumbuhan mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, tannin, saponin, terpenoid, dan lain sebagainya. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang pada umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan suatu penyakit untuk tumbuhan itu sendiri dan lingkungannya. Pemisahan suatu senyawa metabolit sekunder steroid yang terdapat pada bunga Sirsak (*Annona muricata*) dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan dari suatu senyawa yang terdapat dalam pelarut berdasarkan perbedaan distribusi dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak dalam kromatografi lapis tipis adalah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Pada penelitian ini, fase gerak yang digunakan adalah eluen terbaik dari penelitian Putri (2013) yaitu n-heksana-etil asetat (6:4). Pelarut sebagai fase gerak atau eluen merupakan faktor yang menentukan gerakan komponen-komponen dalam campuran. Pemilihan pelarut tergantung pada sifat kelarutan komponen tersebut terhadap pelarut yang digunakan. Sedangkan fase diam dalam hal ini adalah plat silika gel G60 F₂₅₄. Plat tersebut terbuat dari gypsum dengan ukuran pori-pori 60 Å dengan kemampuan berfluorosensi (senyawa yang dapat memancarkan sinar) pada panjang gelombang minimal 254 nm. Bahan silika yang terdapat dalam plat pada dasarnya digunakan untuk memisahkan senyawa asam-asam amino, fenol, alkaloid, asam lemak,

sterol, dan terpenoid. Prinsip dari kromatografi lapis tipis adalah adanya absorpsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (absorben) dan fase gerak (eluen), komponen kimia akan bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap absorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama, sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hal inilah yang mengakibatkan terjadinya pemisahan (Gandjar dan Rohman, 2007).

4.5.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) pada umumnya digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang terbaik dalam suatu pemisahan. Menurut Harborne (1987) eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya banyak noda pada plat. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas dan mudah diamati. Pada penelitian ini, kromatografi lapis tipis analitik digunakan untuk membuktikan bahwa eluen yang digunakan pada penelitian Putri (2013) yaitu n-heksana-etil asetat (6:4) merupakan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa steroid yang terdapat pada bunga Sirsak (*Annona muricata*).

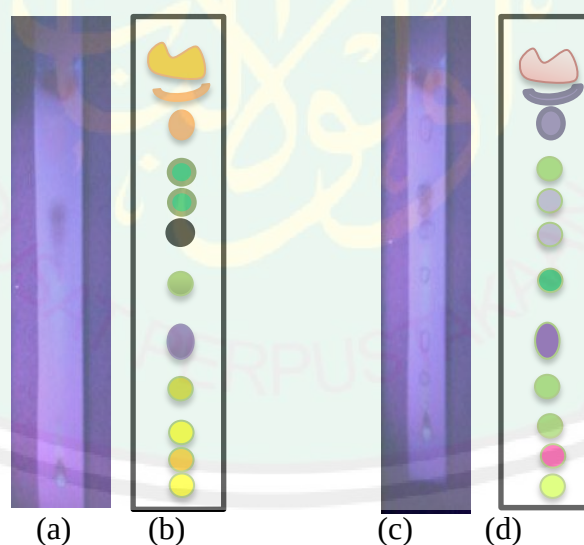
Plat KLT silika G60 F₂₅₄ diaktifasi pada suhu 105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat silika dalam oven sebelum digunakan proses pemisahan (Sastroamidjojo, 1991). Sebelumnya plat silika tersebut dipotong-potong dengan ukuran 1x10 cm yang sudah diberikan garis sebagai

batas atas dan batas bawah. Ekstrak pekat hasil ekstraksi maserasi yang didapat diambil sedikit dan dilarutkan dalam pelarut awal yang digunakan pada saat proses maserasi, yaitu kloroform. Ekstrak pekat yang sudah dilarutkan dalam kloroform, kemudian ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada plat silika G60 F₂₅₄ yang sudah diaktifasi. Plat silika yang sudah terdapat totolan ekstrak pekat dimasukkan pada *chamber* yang berisi eluen terbaik dari penelitian Putri (2013) yaitu n-heksana-etil asetat (6:4). Menurut Isnaini (2011) fase gerak yang bersifat lebih polar digunakan untuk mengelusi senyawa-senyawa yang absorpsinya kuat, sedangkan fase gerak yang kurang polar digunakan untuk mengelusi senyawa-senyawa yang absorpsinya lemah. Plat silika yang dielusi dengan pelarut terbaik n-heksana-etil asetat (6:4) mampu memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya banyak noda yang terdapat dalam plat silika. Noda yang dihasilkan plat silika diamati warna yang terbentuk dengan menggunakan lampu UV 366 nm tidak dengan UV 254 nm.

Selanjutnya, plat silika yang telah diamati disemprot dengan pereaksi Lieberman-Buchard yang berfungsi untuk menambah kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang terkait dengan struktur senyawa yang bersangkutan. Lieberman- Bruchard merupakan campuran antara H₂SO₄ dengan asam asetat anhidrat. Penggunaan asam asetat anhidrat adalah untuk membentuk turunan asetil dari steroid. Sedangkan H₂SO₄ berfungsi sebagai katalis memutus ikatan karbonil pada asam asetat anhidrat sehingga menghasilkan hasil samping reaksi berupa CH₃COOH. Secara spesifik pereaksi Lieberman-Burchard hanya dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan senyawa terpenoid dan turunannya

saja dan tidak dapat digunakan untuk uji senyawa bahan alam lainnya seperti alkaloid, flavonoid maupun senyawa fenolik lainnya (Harborne, 1987).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga R_f. Harga R_f dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda pada plat KLT diantaranya adalah struktur kimia senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, jenis eluen yang digunakan, serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan. Hasil KLT analitik eluen terbaik dari penelitian Putri (2013) yaitu n-heksana-etil asetat (6:4) disajikan dalam Gambar 4.6 dan Tabel 4.7 berikut:



Gambar 4.6 Hasil KLTA senyawa steroid ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan eluen terbaik n-heksana-etil asetat (6:4), (a) sebelum disemprot reagen Liberman-Buchard pada lampu UV λ 366 nm, (b) Ilustrasi gambar, (c) sesudah disemprot reagen Liberman-Buchard pada lampu UV λ 366 nm, (d) Ilustrasi gambar

Dari Gambar 4.6 dapat diamati bahwa hasil KLT dengan fase gerak berupa campuran n-heksana-etil asetat (6:4) (Putri, 2013) dengan visualisasi sinar UV 366 nm memiliki 12 spot noda. Noda yang memiliki harga R_f yang rendah 0,02 dengan pemisahan senyawa aktif dengan KLT analitik cenderung memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan noda yang memiliki harga R_f yang lebih besar 0,93. Hal ini dapat dilihat dari sampel dan eluen yang digunakan pada saat pemisahan senyawa aktif menggunakan KLT analitik. Sampel yang terdapat dalam ekstrak kloroform merupakan senyawa nonpolar dan eluen yang digunakan dalam pemisahan merupakan senyawa yang bersifat nonpolar yaitu n-heksana-etil asetat (6:4).

Tabel 4.8 Hasil KLT senyawa steroid ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan eluen n-heksana-etil asetat (6:4) pada λ 366 nm

R _f noda	Warna noda dibawah lampu UV pada λ 366 nm		Dugaan positif steroid
	Sebelum disemprot Liberman-Buchard	Sesudah disemprot Liberman-Buchard	
0,02	Kuning	Hijau kekuningan	Negatif
0,05	Jingga	Merah muda	Negatif
0,07	Kuning	Hijau kekuningan	Negatif
0,15	Kuning kehitaman	Hijau kekuningan	Negatif
0,25	Ungu	Ungu	Positif
0,43	Hijau	Hijau	Negatif
0,55	Hitam	Ungu muda	Positif
0,60	Hijau kehitaman	Ungu muda	Positif
0,63	Hijau kehitaman	Hijau kekuningan	Negatif
0,81	Jingga	Ungu	Positif
0,86	Jingga	Ungu	Positif
0,93	Jingga	Merah muda	Negatif

Dapat dilihat dari Tabel 4.8 di atas, bahwa eluen terbaik n-heksana-etil aasetat (6:4) mampu memisahkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar dapat dipisahkan dengan adanya beberapa noda yang terbentuk. Menurut Zahro (2011) noda yang mempunyai harga Rf lebih rendah cenderung memiliki sifat kepolaran yang lebih tinggi, karena lebih terdistribusi ke fase diam yang bersifat polar jika dibandingkan dengan noda yang memiliki harga Rf yang lebih besar dan cenderung terdistribusi ke dalam fase gerak atau yang bersifat nonpolar. Komposisi n-heksana lebih banyak dibandingkan dengan etil aasetat mempengaruhi pada sifat kepolaran suatu senyawa, dalam hal ini sifatnya cenderung lebih nonpolar.

Senyawa yang diduga steroid pada penelitian Reveny (2011) dan Putri (2013) menyebutkan bahwa senyawa golongan steroid apabila direaksikan dengan pereaksi Liberman-Buchard menunjukkan terbentuknya warna ungu. Penelitian Hanani (2005) juga menyebutkan bahwa senyawa steroid dengan pereaksi Liberman-Buchard akan menimbulkan warna biru keunguan. Pada penelitian ini, noda hasil KLT analitik ekstrak kloroform menunjukkan terbentuknya warna keunguan, sehingga dapat diasumsikan bahwa dalam ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) positif terdapat senyawa golongan steroid. Berdasarkan pemisahan yang terbentuk diasumsikan pemisahan senyawanya sudah cukup baik dan eluen yang digunakan sudah sesuai dengan terbentuknya noda yang menunjukkan senyawa golongan steroid cukup banyak.

Hasil KLTA senyawa steroid ekstrak kloroform bunga Sirsak pada pemisahan ini dihasilkan 12 spot noda, namun hanya 5 noda yang dapat

diasumsikan mengandung senyawa golongan steroid, yaitu pada R_f 0,25; 0,55; 0,60; 0,81; dan 0,86. Senyawa steroid pada R_f 0,25 lebih terdistribusi pada fase diamnya, sehingga senyawa steroid yang terelusi tersebut memiliki sifat yang lebih polar daripada fase geraknya, dan memiliki koefisien distribusi yang besar. Sedangkan senyawa steroid pada R_f 0,55; 0,60; 0,81; dan 0,86 lebih terdistribusi pada fase geraknya, sehingga senyawa steroid yang terkandung memiliki sifat yang lebih nonpolar daripada fase diamnya dan memiliki koefisien distribusi yang kecil. Menurut Gandjar dan Rohman (2007) nilai distribusi dapat didefinisikan sebagai perbandingan konsentrasi solut dalam fase diam (C_s) dan dalam fase gerak (C_m). Apabila semakin besar nilai distribusi, maka migrasi solut semakin lambat dan apabila semakin kecil nilai distribusi, maka migrasi solut semakin cepat.

Nilai distribusi dan R_f tergantung dengan eluen yang digunakan. Dengan eluen yang digunakan cenderung bersifat nonpolar dengan noda-noda yang diasumsikan sebagai senyawa steroid terdistribusi pada fase geraknya. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bersifat nonpolar dan memiliki koefisien distribusi yang kecil. Dari sinilah dapat diasumsikan bahwa bercak noda yang dihasilkan dalam KLTA ini mengandung senyawa steroid yang bersifat nonpolar. Menurut Putri (2013) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa pemisahan dikatakan baik apabila nilai koefisien distribusinya kecil.

Pemisahan noda yang dihasilkan dari analisis menggunakan KLTA sudah cukup untuk memenuhi syarat pemisahan noda yang baik dengan eluen yang digunakan juga sesuai dengan jenis ekstrak senyawanya yaitu bersifat nonpolar.

Hasil yang diperoleh dari KLTA ini yang berupa eluen terbaik dari pemisahan senyawa steroid selanjutnya dapat digunakan untuk analisa lebih lanjut, yaitu dengan Kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) yang nantinya akan dilanjutkan analisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer Infra Merah.

4.5.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) merupakan salah satu metode pemisahan senyawa dalam jumlah yang relatif besar. Seperti halnya KLT secara umum, KLTP juga melibatkan fase diam dan fase gerak. Dimana fase diamnya adalah sebuah plat dengan ukuran dan ketebalan yang bervariasi serta fase geraknya berupa eluen terbaik pada KLTA yang telah dilakukan yaitu n-heksana-etil asetat (6:4). Sastrohamidjojo (1991) mengatakan bahwa kekuatan elusi dari deret-deret pelarut untuk senyawa-senyawa dalam KLT dengan menggunakan silika gel akan turun dengan urutan sebagai berikut : air murni > methanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluena > trikloroetilena > tetraklorida > sikloheksana > heksana.

Hasil pemisahan dengan KLT preparatif hampir sama dengan KLTA, hanya saja berbeda pada jumlah ekstrak yang ditotolkan pada plat dan ukuran plat yang digunakan. Pada pemisahan dengan KLT preparatif ini, fase diamnya adalah plat silika G60 F₂₅₄ yang juga digunakan pada pemisahan KLTA dengan ukuran 10x10 cm dan fase geraknya adalah eluen terbaik yang diuji pada pemisahan KLTA yaitu n-heksana-etil asetat (6:4). Dipersiapkan plat KLT preparatif 10x10

cm yang sebelumnya telah diaktivasi pada suhu 100-105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan kandungan air yang masih terdapat dalam plat KLT preparatif. Kemudian ekstrak pekat ditotolkan pada plat KLT preparatif dengan jarak penotolan yang relatif lebih dekat agar spot yang dihasilkan dapat membentuk garis yang sejajar. Selanjutnya, plat yang sudah terdapat totolan ekstrak pekat dielusi dengan menggunakan eluen terbaik pada KLTA, yaitu n-heksana-etil asetat (6:4) yang sudah terdapat dalam *chamber*. Noda yang dihasilkan pada plat KLT preparatif berjumlah 3 spot noda. Ketika diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm terdapat 6 spot noda. Berikut adalah hasil dari pemisahan senyawa dengan KLT preparatif yang disajikan dalam Tabel 4.9 di bawah:

Tabel 4.9 Hasil pemisahan dengan KLT preparatif

Noda	Rf Noda	Warna Noda	
		Tanpa Lampu UV 366 nm	Lampu UV 366 nm
1	0,08	Kuning pudar	Kuning
2	0,31	Tak terlihat warna	Biru
3	0,53	Hijau	Merah
4	0,81	Ungu	Ungu
5	0,86	Tak terlihat warna	Biru
6	0,96	Tak terlihat warna	Kuning

Dari Tabel 4.9 di atas, ekstrak kasar bunga Sirsak (*Annona muricata*) yang di elusi dengan menggunakan eluen terbaik n-heksan-etil asetat (6:4) dapat menghasilkan 6 noda yang dapat terpisah. Noda yang dihasilkan pada KLT preparatif memiliki perbedaan dengan noda yang dihasilkan oleh KLT analitik. Noda yang dihasilkan oleh KLT analitik berjumlah 12 noda, sedangkan noda yang

dihasilkan pada KLT preparatif berjumlah 6 noda. Hal ini dimungkinkan karena pola pemisahan senyawa pada KLT preparatif terdapat senyawa yang tertumpuk akibat selisih dari nilai R_f yang sangat kecil pada KLT analitik. Sehingga, noda yang dihasilkan memiliki bentuk yang lonjong/memanjang. Dari Tabel 4.8 di atas maka dapat diasumsikan senyawa yang memiliki nilai R_f 0,81 dengan pengamatan noda berwarna ungu merupakan senyawa steroid. Hal ini didukung oleh penelitian Reveny (2011), Putri (2013), dan Hanani *et al* (2005) yang menyatakan bahwa senyawa steroid dapat diamati di bawah sinar UV dengan pembentukan noda berwarna biru-keunguan.

Semua noda yang dihasilkan dari pemisahan KLT preparatif ini kemudian dikerok. Hasil setiap kerokkan kemudian dilarutkan dengan pelarut kloroform dalam tabung reaksi untuk selanjutnya dilakukan sentrifugasi yang bertujuan untuk mengendapkan silika yang ikut tercampur, agar didapatkan senyawa murni hasil KLT preparatif. Setelah dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dan silika yang terdapat dalam campuran mengendap, disaring dengan kertas saring untuk memisahkan isolat murni dengan silika gel dari plat KLT yang ikut tercampur. Isolat murni yang dihasilkan dari proses pemisahan dengan KLT preparatif tersebut dapat diidentifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Infra Merah.

4.6 Identifikasi Senyawa Aktif Dengan Metode Spektroskopi

Setelah diperoleh hasil dari isolat dan pemurnian senyawa, selanjutnya dilakukan analisa dengan metode spektroskopi. Metode spektroskopi memiliki

banyak keuntungan, salah satunya adalah sampel yang dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk proses analisis, dan kadang-kadang jumlah tersebut dapat diperoleh kembali. Pada penelitian ini, proses identifikasi untuk menentukan jenis senyawa kimia hasil isolasi dan pemurnian dilakukan dengan elucidasi struktur menggunakan spektroskopi UV-Vis dan FTIR.

4.6.1 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis adalah pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik suatu senyawa di daerah ultraviolet yang terentang dari panjang gelombang 100-400 nm dan sinar tampak yang terentang dari 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah) (Isnaini, 2011). Spektrofotometer UV-Vis merupakan suatu analisis berdasarkan atas pengukuran serapan suatu larutan yang dilalui radiasi monokromatis. Penyerapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet bergantung pada struktur elektronik dari molekul. Gandjar dan Rohman (2007) menyatakan bahwa radiasi elektromagnetik, yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan salah satu energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menentukan secara deskriptif senyawa yang didapat dari hasil pemisahan senyawa dengan KLT preparatif, selain itu juga dapat memberikan informasi adanya kromofor dari senyawa organik dan membedakan senyawa aromatik atau senyawa ikatan rangkap yang terkonjugasi dan senyawa alifatik rantai jenuh.

Spektrum UV-Vis merupakan suatu gambaran antaran panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmisi atau absorbansi).

Panjang gelombang cahaya ultraviolet bergantung pada mudahnya promosi elektron dimana molekul-molekul yang memerlukan banyak energi untuk promosi elektron yang menyerap radiasi ultraviolet pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi yang lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menentukan secara deskriptif senyawa steroid yang didapat dari hasil pemisahan senyawa dengan KLT preparatif. Metode ini digunakan untuk membantu mengidentifikasi senyawa steroid. Isolat-isolat inilah yang nantinya dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 200-800 nm. Blanko yang digunakan dalam identifikasi ini adalah kloroform.

Berdasarkan data spektra UV-Vis yang ditunjukkan pada Lampiran 15, maka dapat diambil kesimpulan bahwa dari semua isolat memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 274 dan 321 nm. Hal ini dimungkinkan disebabkan karena adanya senyawa steroid yang saling tumpang tindih dengan senyawa lainnya pada saat KLT preparatif, sehingga panjang gelombang yang dihasilkan mengalami kesamaan. Namun, terdapat pula puncak yang muncul pada panjang gelombang yang lebih besar yang mengidentifikasi adanya atom O. Serapan-serapan tersebut memungkinkan isolat ini termasuk dalam senyawa golongan steroid, begitu juga dengan hasil penampakan noda pada kromatogram juga mendukung hal tersebut. Hasil secara instrumentasi dari setiap isolat disajikan dalam Tabel 4.10 sebagai berikut:

Tabel 4.10 Hasil serapan UV-Vis isolat-isolat eluen n-heksana : etil asetat (6:4)

Isolat	Panjang gelombang (λ)	Absorbansi
1	274 321	0,504 0,087
2	274 321,4	0,474 0,071
3	274 321,4	0,468 0,068
4	274 321,1	0,486 0,075
5	274 320,3	0,480 0,072
6	274 321,4	0,585 0,099

Norman (1998) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa senyawa golongan steroid 7-Dehidrokolesterol memiliki panjang gelombang 270-290 nm yang paling optimum untuk memproduksi vitamin D3. Selain itu, Kolak *et al* (2005) dalam penelitiannya mengisolasi senyawa terpenoid dan steroid dari akar *Salvia blepharochlaena* menghasilkan senyawa golongan steroid *Cryptanol* yang dapat diserap dengan panjang gelombang 274 dan 332 nm. Sastrohamidjojo (1991) menyatakan bahwa senyawa yang berada pada panjang gelombang 270-300 nm menunjukkan adanya serapan maksimum dari suatu cincin aromatik.

Berdasarkan data spektra UV-Vis, adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 274 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi-\pi^*$, yang disebabkan adanya golongan senyawa yang memiliki cincin aromatis seperti ikatan C=C terkonjugasi. Serapan pada panjang gelombang 320-400 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $n-\pi^*$ berupa kromofor tunggal seperti ikatan C=O. Menurut Supratman (2010) letak dan intensitas suatu serapan

dapat bergeser jika digunakan pelarut yang berbeda yang dapat berpengaruh langsung dengan transisi $\eta-\pi^*$ dan $\pi-\pi^*$. Ikatan $\eta-\pi^*$ merupakan transisi *forbidden* sehingga intensitasnya selalu lebih kecil.

Pada spektrum intensitas terlihat hampir sama, hal ini dimungkinkan adanya glukosa yang terikat pada senyawa, karena pada proses ekstraksi tidak dilakukan proses hidrolisis sehingga dapat meningkatkan intensitas $\eta-\pi^*$. Metode hidrolisis tidak dilakukan, jika ekstrak dihidrolisis dengan suatu asam atau basa maka dikhawatirkan jenis senyawa steroid yang diduga terdapat dalam ekstrak akan hilang. Puncak serapan yang dimungkinkan terjadi karena transisi $\eta-\pi^*$ dan $\pi-\pi^*$ disebabkan oleh atom O pada gugus hidroksil yang terikat pada cincin benzena, selain memberikan transisi $\eta-\pi^*$ dan $\pi-\pi^*$ bisa disebabkan pula karena adanya resonansi.

4.6.2 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Spektrofotometer Infra Merah

Spektrofotometer Infra Merah merupakan suatu metode identifikasi gugus fungsi dari suatu senyawa berdasarkan perbedaan momen dipol. Molekul yang memiliki perbedaan momen dipol yang dapat bervibrasi dan dapat terbaca oleh sinar infra merah. Sinar infra merah apabila dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi akan diserap sedangkan frekuensi yang lain diteruskan tanpa diserap. Spektrofotometri infra merah memungkinkan identifikasi gugus fungsional yang ditunjukkan serapan yang spesifik pada daerah infra merah. Sastrohamidjojo (1991) menyatakan spektrofotometri infra merah merupakan metode yang tepat untuk menentukan struktur senyawa yang belum

dikenal yaitu dengan cara membandingkannya terhadap senyawa yang sudah diketahui. Sangat jarang sekali dua senyawa organik memiliki spektrum infra merah yang identik, baik dalam posisi maupun intensitas puncak-puncaknya. Bilangan gelombang yang sering digunakan dalam analisis senyawa bahan alam yaitu pada daerah infra merah tengah ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$).

Isolat terbaik yang digunakan untuk identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer infra merah adalah isolat ke-4 dari ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) yang diduga mengandung senyawa steroid. Hal ini didukung oleh data penelitian sebelumnya yang menunjukkan adanya warna ungu pada hasil KLT preparatif. Analisis hasil KLT preparatif tersebut kemudian didukung dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah. Hayati (2007) menyebutkan terdapat tiga cara yang dapat dilakukan untuk mengolah cuplikan yang berupa padatan, yaitu lempeng KBr, “mull”, dan lapisan tipis.

Pada penelitian ini dipilih lempeng (pelet) KBr, yaitu dengan cara menghaluskan kalium bromida (KBr) dalam mortar *agate* untuk mengurangi kontaminasi yang dapat mempengaruhi penyerapan radiasi sinar infra merah, kemudian dipres beberapa saat (± 5 menit) pada tekanan 80 Torr (8 hingga 20 ton per satuan luas). Kalium bromida yang digunakan lempeng (pelet) harus dalam keadaan kering. Setelah pelet KBr sudah jadi, ditetaskan isolat ke-4 untuk kemudian dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer infra merah pada bilangan gelombang $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Isolat ke-4 dilanjutkan untuk proses identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer infra merah karena pada saat pemisahan dengan KLT preparatif membentuk noda dengan warna ungu

yang merupakan warna khas dari senyawa steroid. Hasil spektra spektrofotometer infra merah dari ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) dapat dilihat pada Gambar 4.7 di bawah:



Gambar 4.7 Spektra Infra Merah pemisahan dengan KLT preparatif isolat ke-4

Spektra infra merah mempunyai sifat fisik dan karakteristik yang khas, artinya senyawa yang berbeda akan mempunyai spektra yang berbeda pula dan kemungkinan dua senyawa mempunyai spektra sama adalah sangat kecil (Hayati, 2007). Berdasarkan spektra infra merah dari hasil pemisahan KLT preparatif pada Gambar 4.7 dapat dilihat bahwa isolat ke-4 menunjukkan adanya vibrasi ulur yang mengandung gugus fungsi O-H dari gugus alkohol dan N-H dari gugus amina yang terikat pada gugus alifatik dan aromatik dari ikatan hidrogen intramolekuler.

Hasil analisis dari Gambar 4.7 dijelaskan dengan Tabel 4.11 yang merupakan interpretasi spektra hasil infra merah yang diduga gugus fungsi dari senyawa steroid pada isolat ke-4 hasil KLT Preparatif.

Tabel 4.11 Interpretasi spektra infra merah isolat ke-4

Puncak	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Range (cm^{-1})	Jenis Vibrasi	Intensitas
1	3445,61	3950-3000	Uluran asimetri OH	m-s
2	2924,77	3000-2850	Uluran CH alifatik	Vs
3	2854,19	2900-2750	Uluran CH simetri	vs-s
4	1741,06	1745-1715	Uluran C=O	m-s
5	1651,48	1715-1650	Uluran C=C cincin aromatik	M
6	1460,16	1480-1440	Guntingan CH_2	M
7	1376,47	1440-1325	Tekukan C-H dalam bidang	w-m
8	1173,69	1310-1085	Uluran R-O	W
9	1076,81	1085-1030	Uluran C-O dan alkohol sekunder	w-m
10	770,84	780-760	Tekukan C-O aromatik	W

Keterangan: vs = *very strong*; s = *strong*; m = *medium*; w = *weak*

Dari tabel 4.11 merupakan serapan yang dihasilkan dari analisis isolat ke-4. Puncak serapan sangat lebar terbentuk pada bilangan gelombang $3445,61 \text{ cm}^{-1}$, pada panjang gelombang tersebut terdapat serapan uluran simetri gugus O-H juga uluran NH. Vibrasi ulur C-H asimetris dari gugus alkana memberikan serapan pada bilangan gelombang $2924,77$ dan $2854,19 \text{ cm}^{-1}$. Menurut Masroh (2010) serapan yang timbul karena uluran C-H pada alkana terletak pada daerah $2850\text{-}2950 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan pada bilangan gelombang $2362,95 \text{ cm}^{-1}$ merupakan suatu akibat dari vibrasi uluran dari gugus $\text{C}\equiv\text{N}$. Serapan pada bilangan gelombang $1741,06 \text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi uluran C=O dari keton alifatik dan aldehida,

sedangkan pada bilangan gelombang $1651,48\text{ cm}^{-1}$ merupakan akibat vibrasi uluran C=C pada cincin aromatik. Vibrasi tekuk C-H dalam bidang dari aldehida alifatik memberikan serapan pada bilangan gelombang $1460,16$ dan $1376,47\text{ cm}^{-1}$. Pita serapan pada bilangan gelombang $1173,69$ dan $1076,81\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi uluran C-O aromatik dan alkohol sekunder. Vibrasi tekukan C-O aromatik di luar bidang terjadi pada bilangan gelombang $770,84\text{ cm}^{-1}$. Pita serapan pada bilangan gelombang $519,73\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi tekukan C-O-C.

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer infra merah ini didukung dengan penelitian Kolak *et al* (2005) yang menyebutkan bahwa senyawa steroid pada akar *Salvia blepharochlaena* yang berada panjang gelombang 274 nm apabila diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer infra merah dengan menggunakan pelarut kloroform memiliki serapan pada bilangan gelombang antara $3350, 2970, 2920, 2840, 1635, 1600, 1550, 1535, 1456, 1435, 1407, 1388, 1376, 1328, 1272, 1252, 1163, 1128, 1105, 958, 902, 879, 802\text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan hasil pengamatan spektra infra merah dapat diketahui bahwa pada isolat ke-4 ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) terdapat gugus O-H, C=O, C=C, C-H, dan C-O yang didukung adanya cincin aromatik tersubstitusi dari alkohol sekunder, sehingga diperkirakan bahwa golongan senyawa aktif pada isolat ke-4 ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) merupakan senyawa aromatik atau fenolik dari golongan senyawa steroid. Menurut Sukadana (2011), Saleh (2010), dan Susilawati (2014) senyawa steroid memiliki gugus fungsi karakteristik seperti O-H, C-H, C=C, dan C=O.

4.7 Pemanfaatan Bunga Sirsak (*Annona muricata*) dalam Perspektif Islam

Alam semesta disekitar kita ini diciptakan Allah SWT sebagai bentuk kasih sayang-Nya kepada kita sebagai makhluk-Nya yang termulia diantara segala makhluk yang ditugasi untuk menjaga dan melestarikan alam. Alam semesta ini tidak diciptakan dengan tujuan yang sia-sia, tetapi diciptakan dengan sungguh-sungguh untuk tujuan yang agung, yaitu mengetahui dan mengenal Allah SWT dengan tanda-tanda kekuasaan, asma dan sifat Allah SWT. Untuk itu, kita diwajibkan untuk bersyukur kepada Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوْسًا أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ ۖ وَبَثَّ فِيهَا
مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۖ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu, dan memperkembangbiakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”. (QS. Luqman : 10)

Allah SWT menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang indah, hijau, dan banyak memberikan manfaat serta kenikmatan kepada manusia. Manusia diberikan kesempatan yang luas untuk mengambil manfaat dari alam, salah satunya adalah dengan memanfaatkan tumbuh-tumbuhan sebagai tanaman obat. Salah satu jenis tanaman yang digunakan sebagai obat adalah tanaman Sirsak (*Annona muricata*). Tanaman Sirsak telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat

sebagai tanaman obat mulai dari akar, daun, kulit batang, bunga, dan buah. Allah mengajak manusia untuk berfikir tentang rahasia dibalik tumbuh-tumbuhan agar mendapat manfaat yang lebih banyak dalam al Quran surat an Nahl ayat 11:

يُنَبِّتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

“Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.” (QS. an Nahl 11)

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah yang memiliki kekuasaan untuk menumbuhkan tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan dengan air yang diturunkan dari langit sebagai rezeki dan makanan pokok bagi manusia. Allah menumbuhkan semua itu dengan maksud agar menjadi nikmat dan tanda kekuasaan-Nya bagi kaum yang mau mengambil pelajaran dan memikirkannya. Orang yang berfikir tentang hal ini, akan mengetahui bahwa Allah yang memiliki kekuasaan seperti ini tidak mungkin ada sesuatu pun yang menyerupai dan menyekutukan-Nya.

Rasulullah SAW telah memberikan petunjuk tentang cara mengobati diri beliau sendiri, keluarga, dan para sahabat yaitu dengan menggunakan jenis obat yang berasal dari alam (alamiah). Pengobatan tersebut berdasarkan wahyu yang Allah SWT turunkan dalam al Quran tentang apa yang dapat dimanfaatkan dari alam, misalnya melakukan pengobatan dengan menggunakan berbagai jenis

tumbuh-tumbuhan. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat merupakan salah satu sarana untuk mengambil pelajaran dan memikirkan tentang kekuasaan dan kebesaran Allah SWT.

Sirsak (*Annona muricata*) merupakan salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif. Bagian yang dapat digunakan sebagai obat salah satunya adalah bunga Sirsak. Hal ini telah dibuktikan dengan hasil penelitian sebelumnya tentang identifikasi senyawa dan uji efektifitas senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker pada bunga Sirsak. Potensi bioaktivitas yang dimiliki tumbuhan Sirsak ini dapat digunakan sebagai obat alternatif, meskipun tidak tersurat didalam al Quran maupun dalam Hadits bahwa tumbuhan Sirsak mempunyai potensi sebagai obat alternatif, tetapi pemanfaatannya diqiyaskan dengan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai pengobatan. Pemanfaatan bunga Sirsak sebagai tumbuhan obat bukanlah sesuatu hal yang melanggar syariat Islam, bahkan hal tersebut merupakan suatu upaya untuk mengikuti sunnah Nabi untuk mencari obat dengan memanfaatkan apa saja asalkan tidak melanggar syariat agama. Seperti halnya dengan sabda Nabi yang diriwayatkan oleh Ibnu Mas'ud:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عَلِمَهُ مَنْ عَلِمَهُ وَجَهْلَهُ مَنْ جَهْلَهُ

“Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya.” (HR. Ahmad, Baihaqi, dan Al-Hakim).

Hadits shahih tersebut memerintahkan umat muslim untuk berusaha dalam mencari obat sebagai usaha untuk menyembuhkan suatu penyakit dan cara memperolehnya tersebut tidak bertentangan dengan kodrat ketergantungan manusia (tawakal) kepada Allah SWT (Al-Jauziyah, 2008). Dari terjemahan hadits shahih di atas menunjukkan bahwa Rasulullah SAW mengajarkan kepada kita bahwa Allah SWT adalah Dzat Yang Maha Penyembuh. Allah SWT menurunkan suatu penyakit pasti disertai dengan obatnya. Hadits tersebut menunjukkan bahwa untuk mendapatkan obat untuk menyembuhkan suatu penyakit, maka kita harus berusaha dan berihktiar kepada Allah SWT dan Rasulullah tidak menganjurkan kita untuk berputus asa dan patah harapan (Departemen Agama, 2007).

Pemanfaatan bunga Sirsak (*Annona muricata*) sebagai obat merupakan salah satu cara dalam berikhtiar untuk memperoleh kesembuhan dari Allah Yang Maha Penyembuh, karena merupakan suatu kewajiban kita sebagai hamba untuk berikhtiar dalam hal mengobati penyakit. Berikhtiar merupakan salah satu jalan untuk seorang hamba untuk mendekatkan diri kepada Allah baik lahir maupun batin. Sungguh tidak ada yang dapat memberikan suatu kesembuhan kecuali Allah SWT semata. Allah berfirman dalam surat asy Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS. asy Syuara : 80).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) memiliki aktivitas antikanker fibrosarkoma yang diakibatkan oleh senyawa karsinogen pada dosis 25 mg/kg BB dengan persentase hambatan sebesar 3,1%.
2. Golongan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) berdasarkan pemisahan Kromatografi Lapis Tipis dengan eluen n-heksana-etil asetat (6:4) adalah senyawa steroid. Hasil analisis spektroskopi UV-Vis diperoleh puncak-puncak pada panjang gelombang 274 nm terdapat ikatan rangkap terkonjugasi, sedangkan pada 321 terdapat serapan atom O. Hasil spektroskopi Infra Merah, menunjukkan adanya gugus O-H, C=O, C=C, C-H, dan C-O

5.2 Saran

1. Ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) bersifat sangat toksik, sehingga perlu dilakukan pengujian terhadap efektivitas dosis.
2. Perlu dilakukan identifikasi senyawa dalam ekstrak kloroform bunga Sirsak (*Annona muricata*) lebih lanjut dengan menggunakan instrumen lain seperti GC-MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah bin Muhammad. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 5*. Jakarta: Pustaka Imam Syafi'i
- Adwole, S. 2010. *Immunohistochemical and biochemical effects of annona Muricatalinn. (annonaceae) leaf aqueous extract on Pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats*. Department of Pharmacology, Faculty of Health Sciences, University of KwaZulu-Natal
- Al-Hilali, I. S. 2010. *Syarah Riyadhus Shalihin*. Jakarta: Pustaka Imam Syafi'i
- Al-Jauziyah, I. Q. 2008. *Praktek Kedokteran Nabi: Penyembuhan di Bawah Bimbingan Wahyu*. Jakarta: Hikam Pustaka
- American Cancer Society. 2011. *Global Cancer Facts and Figures 2nd Edition*. Atlanta: American Cancer Society. Inc
- Annonymous. 2013. *Biotransformasi pada DMBA (image.google.com)*. diakses pada 23 Desember 2013
- Annonymous. 2013. *Mus musculus (image.google.com)*. diakses pada 23 Desember 2013
- Annonymous. 2014. *Bunga Sirsak (image.google.com)*. diakses pada 5 Februari 2014
- Arthur, K. N., Woode, E., Terlabi, E. O., Larbie, C. 2012. *Bilirubin Lowering Potential of Annona muricata (Linn.) in Temporary Jaundiced Rats*. Kumasi: Ghana. American Journal of Pharmacology and Toxicology 7(2): 33-40, 2012 ISSN 1557-4962
- Artini, N. P., Wahjuni, S., Sulihingtyas, W. D. 2012. *Eketrak Daun Sirsak (Annona muricata. L) Sebagai Antioksidan Pada Penurunan Kadar Asam Urat Tikus Wistar*. Jimbaran: Bali. Jurnal Kimia 6 (2), Juli 2012: 127-137

- Bakotic, B.W. 2006. Tumor of the Soft Tissue of the Lower Extremity. *Artikel*. http://www.datatrace.com/downloads/dl/file/id/25/exclusive_look_inside.pdf. (diakses tanggal 6 Maret 2014)
- Biva, I., Vhuiyan, I., Saha, M., Islam, M., Sarwar, S. 2009. *In-Vitro Antioxidant and Cytotoxicity Studies of Annona squamosal Linn*. Dhaka, Bangladesh: Departement of Pharmacy, North South University
- Cance, L. Mc. Kathrya, Sue E. Huether, Valentina L. Brashers. 2010. Fibrosarcoma. *Pathophysiology The Biologic for Disease in Adultd and Children*. 6th Edition. Canada: Mosby Elsevier. pp : 1591
- Coutrier, F. 2008. *Propagasi Malaria In Vivo: Penggunaan Hewan Coba dalam Penelitian Malaria*. Eijkman: Lembaga Biologi Molekul
- Christian, P. 2009. *Mechanism of Action, Metabolism, and Pharmacology of Methotrexate*. http://www.medscape.org/viewarticle/712891_2 (diakses pada 27 Februari 2014)
- Dandekar, S; Sukumar S, Zarbl H, Young L, Cardiff R. 1986. *Specific Activation of Cellular Harvey-Ras Oncogene in Dimethylbenzanthracene-Induced Mouse Mammary Tumors*. Mol Cell Biol 6:4104-4108.
- Departemen Agama. 2007. *Al-Quran dan Tafsirnya*. Jakarta:Departemen Agama Republik Indonesia
- Departemen Farmakologi dan Terapeutik. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V-VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Elya, B., Amin, J., Emiyanah. 2010. *Toksisitas Akut Daun Justicia gendarussa Burm*. Jakarta : Makara, Sains, vol. 14, No 2 November 2010: 129-134
- Frenkel, K., L. Wei., dan H. Wei. 7,12-dimetilbenz [a] antrasena menginduksi modifikasi DNA oksidatif in vivo. Biol Radikal Bebas. Med., 19:373-380, 1995

- Gan, G. S. 2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Teupatik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Gandjar, I. B., dan Rohman. A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Giawa, P. N., Yuharmen, Teruna, H. Y. 2013. *Identifikasi dan Uji Toksisitas Ekstrak n-heksana dari Kulit Biji Tanaman Sirsak (Annona muricata L. Riau: Universitas Riau*
- Gleye, C., Raynaud, S., Fourneau, C., Laurens, A., Laprevote, O., Serani, L., Fournet, A., Hocquemiller, R. 2000. *Cohibins C and D, Two Important Metabolites in the Biogenesis of Acetogenins from Annona muricata and Annona nutans*. Paris: Perancis. Journal National Product 2000, 63, 1192-1196
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri Jilid 1*, Penj. Ketaren. S. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Habib. 2008. Antikanker pada Siklus Sel. www.habib.blog.ugm.ac.id.htm. (diakses tanggal 7 Desember 2013)
- Hakkak et, al., 2005. *Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-Induced mammary Tumor Development in Female Zucker Rats*. Breast Canc Res 7: 627-633.
- Hakim, Syaifuddin. M. 2010. *Kemana Seharusnya Anda Berobat?*. Jakarta: Wacana Ilmiah Press
- Harinta,Y.W dan Astuti, I.T. 2011. *Pengabdian Masyarakat Kelompok Warga Riskan Penderita Kanker dengan Pengobatan Herbal Daun Sirsak Desa Makamhaji*. Sukoharjo:Universitas Veteran Bangun Nusantara
- Hatim, Bin Nina. 2012. *Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Surian (Toona Sinensis) Pada Tikus Betina Sprague Dawley Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(A)Antrasena*. Bogor : Institut Pertanian Bogor Press
- Hayati, E. K. 2007. *Dasar-Dasar Analisis Spektroskopi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, hal 35-41

- Hayati, E. K., Jannah, A., Ningsih, R. 2012. *Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-anting (Acalypha indica L)*. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim. Molekul, Vol 7. No 1. Mei 2012: 20-32
- Hendana, W. 2012. *Toksistas Akut Ekstrak Daun Sirsak Ratu dan Sirsak Hutan Sebagai Potensi Antikanker*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif*. Bandung: ITB Press
- Hutomo, R., Sutarno., Winarno, W., Kusmardi. 2005. *Uji Antimalaria Ekstrak Buah Morinda citrifolia dan Aktivitas Makrofag pada Mencit Setelah Diinduksi Plasmodium Berghei*. Surakarta : Biofarmasi 3(2): 61-69
- Ibrahim, M., Anwar, A., Yusuf, N. I. 2012. *Lethal Dose 50% (LD50) Tests of Poliherbal (Curcuma Xanthorriza, Kleinhovia hospita, Nigella sativa, Arcangelisia flava and Ophiocephalus striatus) on Heparmin in Mice (Mus musculus)*. Research & Developmentpt Royal Medicalink Pharmalab
- Iriawan, N dan Astuti, S. P. 2006. *Mengolah Data Statistika dengan Mudah menggunakan MINITAB 14*. Yogyakarta : CV Andi Offset
- Isbagio, D. W. 1992. *Euthanasia pada Hewan Percobaan*. Media Litbangkes Vol II No 01/1992.
- Isnaini, Dian N. 2011. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Turunan Terpenoid dari Kulit Batang Slati*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Jacobson, K and Keller, K. A. 2006. *Toxicology Testing Handbook*. Washington DC: Ork Basel
- Kasal, A., Budesinsky, M., Griffiths, W. 2010. *Spectroscopic Methods of Steroid Analysis*. Swansea: Springe Science and Business Media
- Kim, G. S., Zeng, L., Alali, F., Rogers, L., Wu, F. E., McLaughlin, J. L., Sastrodihardjo, S. 1997. *Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring*

Acetogenins, Annonamuricine E and Muricapentocin, from the Leaves of Annona muricata. Journal National Product 61: 432-436

- Khopkar, S. M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik* Penj. A. Saptorahardjo. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Kolak, U., Topcu, G., Birtoksoz, S., Otuk, G., Ulubelen, A. 2005. *Terpenoids and Steroids from the Roots of Salvia Blepharochlaena*. Istanbul : Turk Journal Chemistry 29 (2005), 177-186
- Krygier., Jeffrey. E., Valerae. L. 2009. *Fibrosarcoma of Bone: Review of A Rare Primary Malignancy of Bone*. San Jose: American Cancer Society
- Kurnianto, E., Sutopo., Setiatin, E. 2001. *Perkembangan dan Penampilan Mencit sebagai Hewan Percobaan*. Semarang: Universitas Diponegoro Press
- Maharani, S. 2009. *Kanker: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*. Yogyakarta: Katahati
- Mangan, Y. 2010. *Cara Bijak Menaklukkan Kanker*. Depok: Agromedia Pustaka.
- Mardiana, L. 2004. *Kanker pada Wanita, Pencegahan dan Pengobatan dengan Tanaman Obat*. Bogor: Penebar Swadaya
- Masroh, L. F. 2010. *Isolasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (Stachytarpheta jamaicensis L)*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Melot, A., Fall, D., Gleye, C., Champy, P. 2009. *Apolar Annonaceous Acetogenins from the Fruit Pulp of Annona muricata*. France: Open Acces Molecules 2009, 14, 4387-4395
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nicholas, D. N., McLaughlin, J. L. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. Journal of Medical Plant Reserch vol. 45, pp. 31-34
- Mitelman, F and Levan, G. 1972. *The Cromosomes of Primary 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-Induced Rat Sarcoma*. Hereditas 71 (2): 325-333

- Muliani, H. 2011. *Pertumbuhan Mencit (Mus musculus) setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas)*. Semarang: Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol XIX No 1, Maret 2011
- Muliyah, E. 2013. *Struktur Sekretori Beberapa Tanaman Obat Antikanker*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press
- Mulyadi. 1998. *Karsinogen Karsinogenesis dan Antikanker*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Mulyawati, A. P., Hayati, E. K., Nashihuddin. A., Tukimin. 2010. *Uji Efektifitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Biji Sirsak (Annona muricata. L) yang Bersifat Bioaktif Insektisida Nabati Terhadap Hama Thrips*. Malang: Alchemy, vol. 2 No. 1 Oktober 2010, hal 104-157
- Mun'im, A., Andrajati, R., Susilowati, H. 2006. *Uji Hambatan Tumorigenesis Sari Buah Merah Terhadap Tikus Betina Yang Diinduksi DMBA*. Jakarta : Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. III, No. 3, Desember 2006, 153 - 161
- Muti'ah, Roihatul. 2010. *Aktivitas Antimalaria Ekstrak Batang Talikuning (Anamirta cocculus) Dan Kombinasinya Dengan Artemisin Pada Mencit Yang Diinfeksi Plasmodium berghei*. Malang : Universitas Brawijaya Press
- Myers, Richard L.; Myers, Rusty L. (2007). *The 100 most important chemical compounds: a reference guide*. Westport, Conn.: Greenwood Press. hlm. 122. ISBN 0313337586
- Norman, Anthony. W. 1998. *Sunlight, Season, Skin Pigmentation, Vitamin D, And 25-Hydroxyvitamin D : Integral Components Of The Vitamin D Endocrine System^{1,2}*. USA : American Society for Clinical Nutrition
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F. M. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Purwatresna, E. 2012. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Air dan Etanol Daun Sirsak Secara In Vitro Melalui Inhibisi Enzim Glukosidase*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press

- Putri, I. P. 2013. *Uji Toksisitas Ekstrak Bunga Sirsak (Annona muricata. Linn) dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya*. Malang: Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang Press
- Putri, W. E., Hidajati, N. 2012. *Senyawa Kolesterol dari ekstrak Kloroform Kulit Batang Tumbuhan Toona sinensis dan Uji Bioinsektisida*. Surabaya: Jurusan Kimia Universitas Negeri Surabaya. *UNESA Journal of Chemistry* vol. 1, no. 1, Mei 2012
- Pranoto, E. K., Ma'ruf, W., Pringgenies, D. 2012. *Kajian Aktivitas Bioaktif Ekstrak Teripang Pasir (Holothuria scabra) Terhadap Jamur Candida albicans*. Semarang: Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan Vol 1, No 1, Hal 1-8
- Profil Kesehatan Indonesia. 2008. *Data statistik Penderita Penyakit Menular*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Rachmawati, E., Karyono, S., Suyuti, H. 2012. *Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel Hela yang Dimediasi oleh p53*. Lampung: Jurusan Kedokteran Universitas Bandar Lampung
- Retnani, V. 2011. *Pengaruh Suplementasi Ekstrak Daun Annona muricata Terhadap Kejadian Displasia Epitel Kelenjar Payudara Tikus Sprague Dawley yang Diinduksi 7, 12 Dimethylbenzena Anthracene*. Semarang: UNDIP Press
- Reveny, Julia. 2011. *Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (Piper betle Linn.)*. Medan : Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara
- Riduwan. 2009. *Dasar-Dasar Statistika*. Bandung: Alfa Beta
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Penj. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB
- Santi, S. R. 2011. *Penelusuran Senyawa Sitotoksik Pada Kulit Biji Nyamplung (Calophyllum inophyllum l.) dan Kemungkinan Korelasinya sebagai*

Antikanker. Jimbaran: Universitas Udayana. Jurnal Kimia 3(2), Juli 2009 : 101-108

Sastrohamidjojo. H. 1991. *Kromatografi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press

Savitri, E. S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN-Malang Press

Septyaningsih, D. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk)*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Press

Setyaningsih, D., Nurmillah, O. Y., Windarwati, S. 2013. *Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang, dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Smookler, B., Jacob B., James J., Paul S. and Martin M.M. 2001. *Bone and Soft-tissue Sarcomas: Epidemiology, Radiology, Pathology and Fundamentals of Surgical Treatment*. {Ebook}. Malawer.

Sousa, O. V., Vieira, G., Pinho, J., Yammamoto, H., Alves, M. S. 2010. *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of Annona muricata L. Leaves in Animal Models*. Brazil: International Journal of Molecular Science 2010, 11, 2067-2078

Sofia, L. 2006. *Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metoda Uji Brine Shrimp*. Medan: Universitas Sumatra Utara Press.

Sriwibowo, K. 2005. *Akurasi Biopsi Aspirasi Jarum Halus sebagai Sarana dalam Menegakkan diagnosa Neoplasma Ganas Jaringan Lunak*. Semarang: Universitas Diponegoro

Steenis, C.G.G.J. 2006. *Flora*. Jakarta: PT. Pradnya Paramita

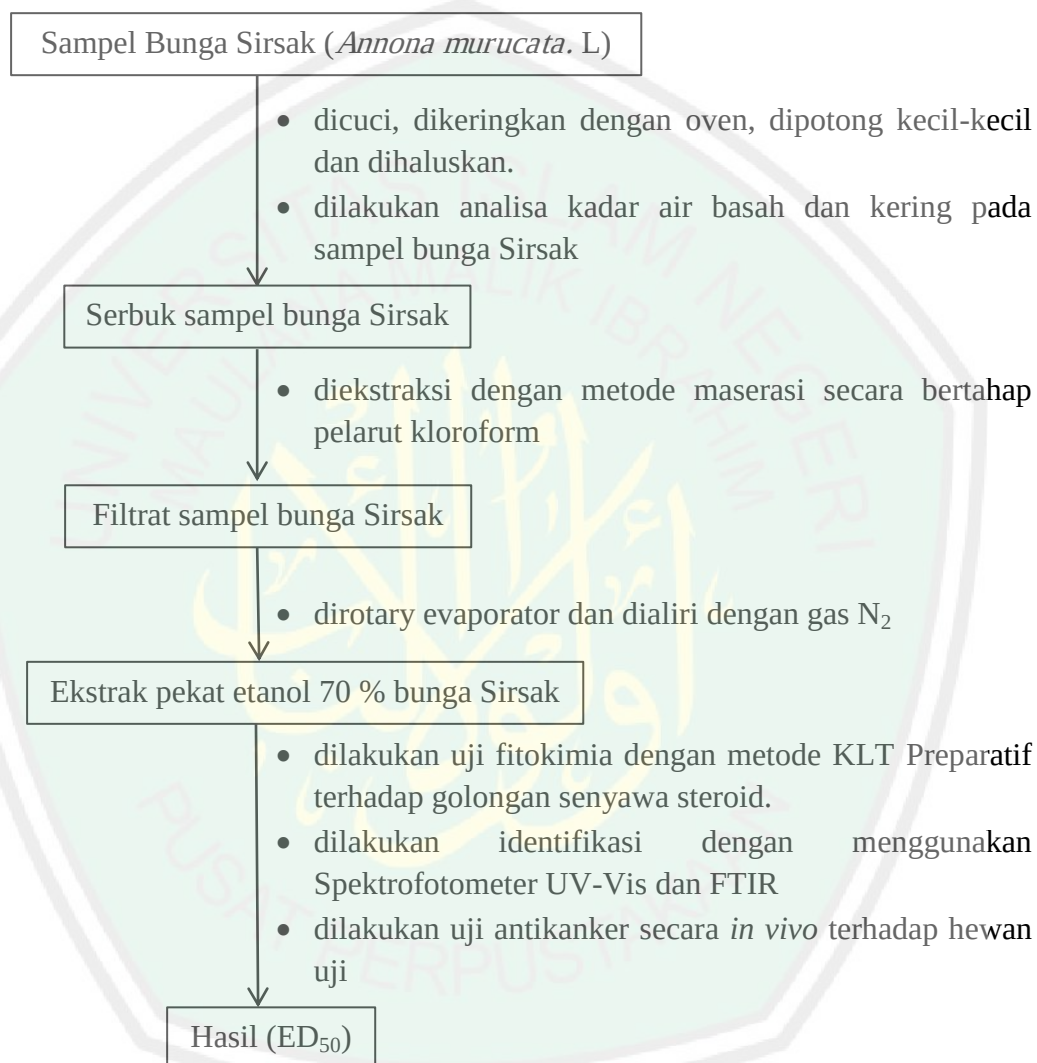
Sudiana, I. K. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika.

Sudjijo. 2008. *Petunjuk Teknik Perbaikan Mutu Sirsak*. Solok: Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika Solok.

- Sukardiman. 2007. *Mekanisme Induksi Apoptosis Pinostrobin dari Kaemferia Pandurata Roxb dan Andragrafolida dari Androgaphis Paniculata Nees Terhadap Sel Kanker Manusia Secara In Vitro dan Implikasi Penggunaan Secara In Vivo*. Surabaya: Universitas Airlangga Press
- Sunarjono, H. 2005. *Sirsak Srikaya*. Bogor: Penebar Swadaya
- Supratman, U. 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya Padjajaran
- Syuyuti, J. 2010. *Jamiul al-Hadist Maktabah Syamilah Ihdhar Tsalist*. Bairut : Lebanon
- Wardhani, R. K. 2013. *Skrining Fitokimia dan Uji Antikanker Ekstrak Diklorometana Umbi Keladi Tikus Pada Sel Kanker Fibrosarkoma Mencit Jantan*. Jember : Universitas Jember Press
- Widhiarso, W. 2012. *Berkenalan dengan Regresi Probit*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press
- Widiana.R, Indrianti.G, dan Andika.I. 2010. *Daya Hambat Sari Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri*. Padang: STKIP PGRI Press
- Wong, S. L. 2008. Diagnosis and Management of Desmoid Tumors and Fibrosarcoma. *Journal of Surgical Oncology*. Vol 97. University of Michigan. pp : 554-558.
- Yalon M, Gal S, Segev Y, Selig S, Skorecki KL. *Sister chromatid separation at human telomeric regions*. J Cell Sci. 2004;117:1961–1970.
- Zahro, Mauliyatul. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak N-Heksana Tanaman Anting-anting (Acalypha indica L) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Zuhud, E. 2011. *Kanker Lenyap Berkat Sirsak*. Jakarta: PT. Agro Media Pustaka

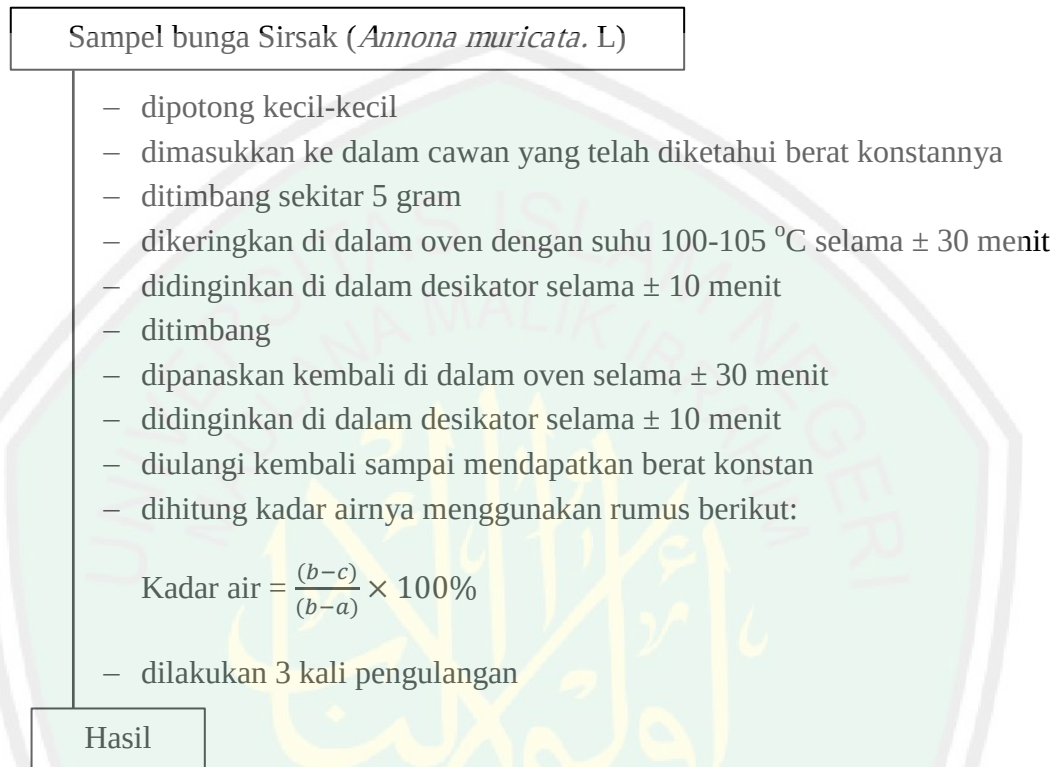
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

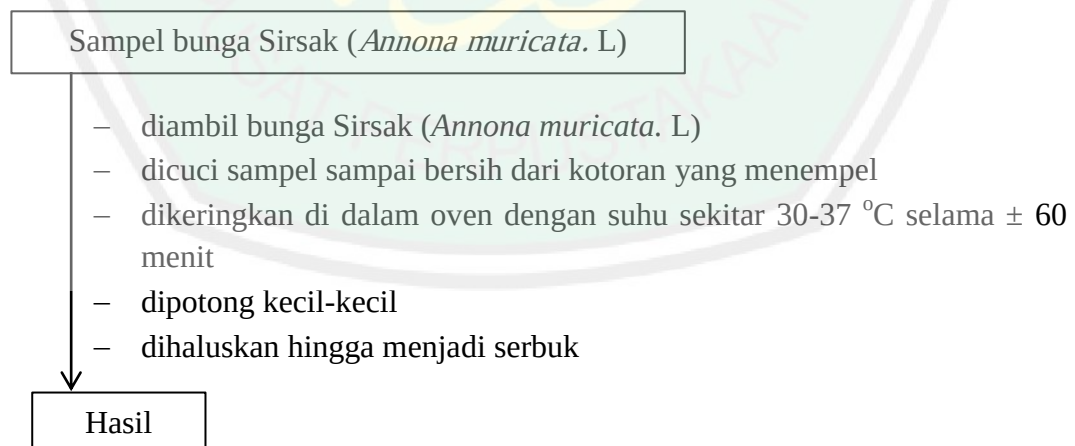


Lampiran 2. Skema Kerja

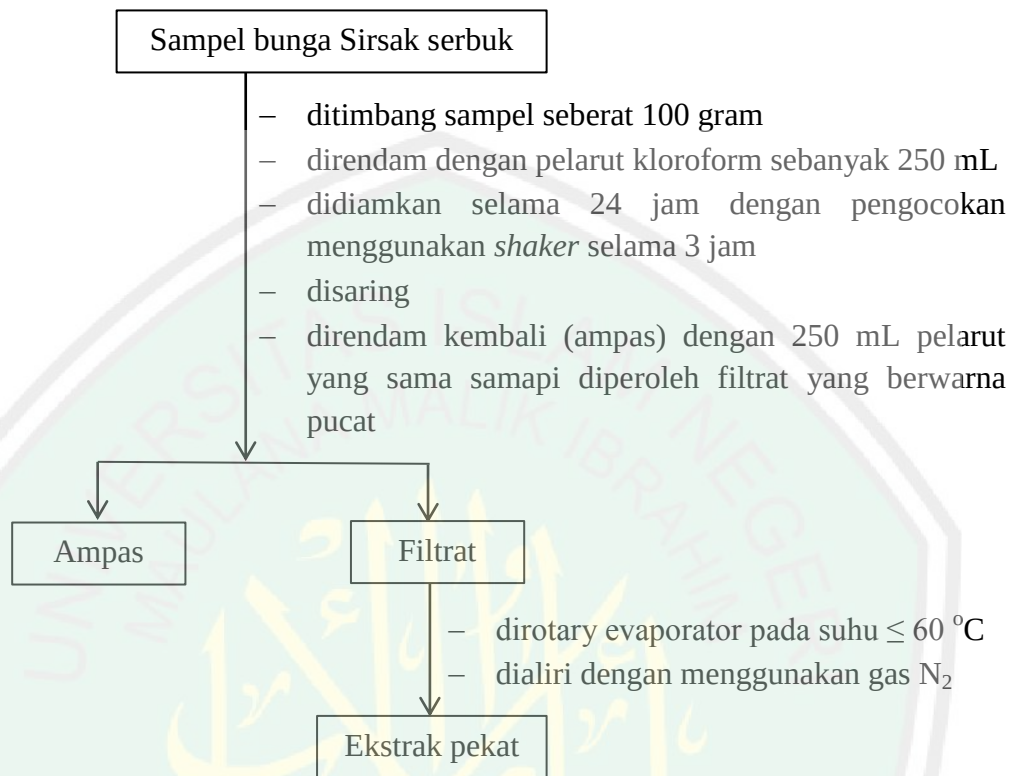
L.2.1 Analisis Kadar Air



L.2.2 Preparasi Sampel

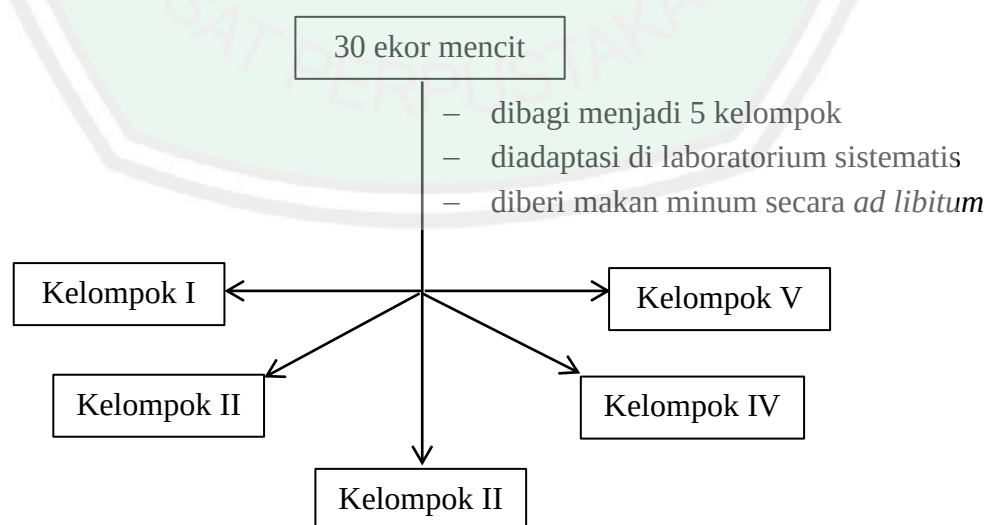


L.2.3 Ekstraksi dengan Metode Maserasi Menggunakan Pelarut Kloroform

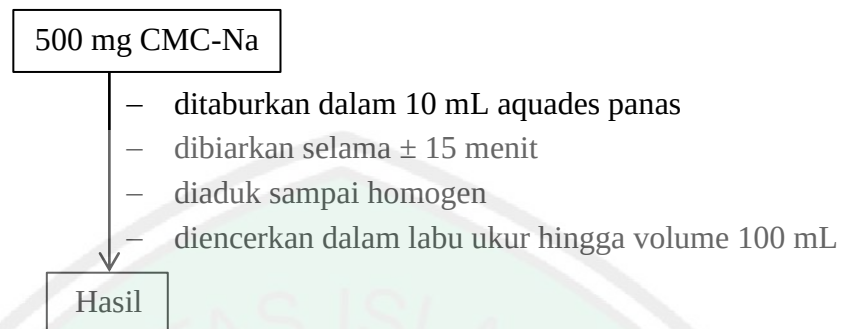


L.2.4 Uji Antikanker dengan Hewan Uji

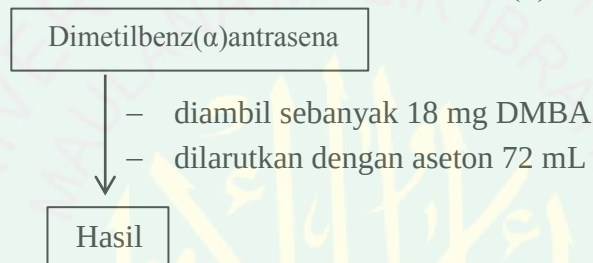
L.2.4.1 Persiapan Hewan Uji



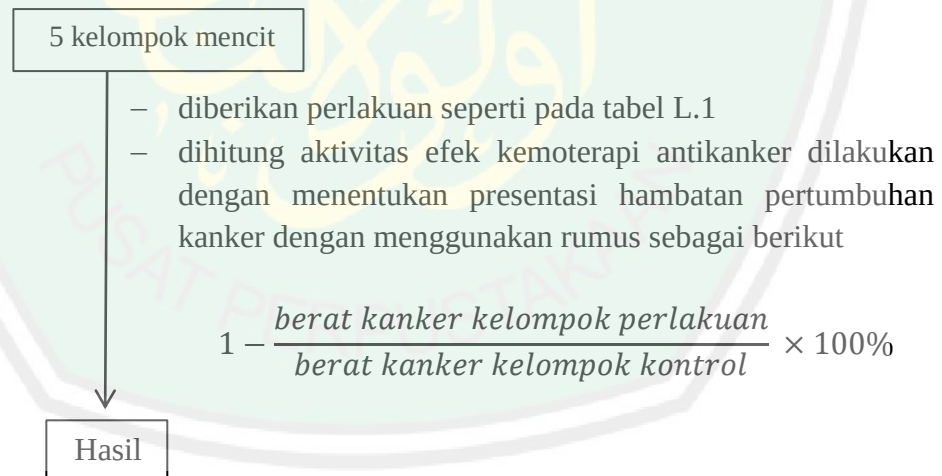
L.2.4.2 Pembuatan Persediaan Larutan CMC-Na 0,5 %



L.2.4.3 Pembuatan Persediaan 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena



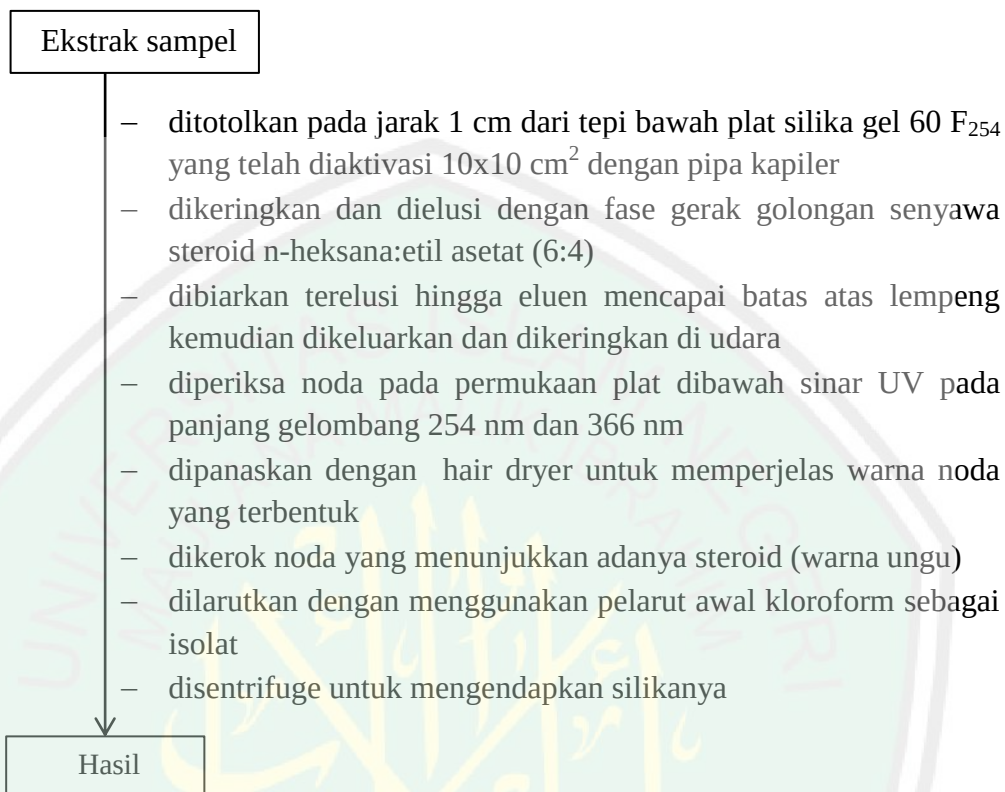
L.2.4.4 Perlakuan Hewan Uji



Tabel L.1 Perlakuan masing-masing kelompok

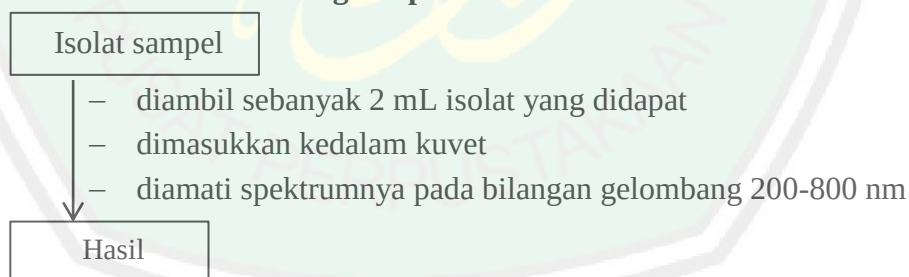
Kelompok	Perlakuan
1	Kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang diinduksi DMBA dan pemberian CMCNa 0,5% tanpa terapi ekstrak kloroform bunga Sirsak.
2	Kelompok kontrol positif. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok yang diinduksi DMBA dan pemberian obat Metotreksat 2,5 mg/kg BB.
3	Kelompok Dosis 1 adalah kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 25 mg/kg BB
4	Kelompok Dosis 2 adalah kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 50 mg/kg BB
5	Kelompok Dosis 3 adalah kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak kloroform bunga Sirsak dengan dosis 100 mg/kg BB

L.2.6 Uji Steroid dengan KLT Preparatif

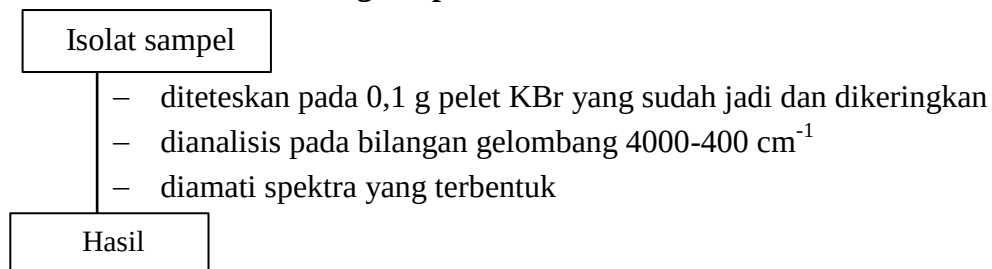


L.2.7 Identifikasi Senyawa Steroid

L.2.7.1 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis



L.2.7.2 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer Infra Merah



Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen

L.3.1 Pembuatan Persediaan Larutan CMC-Na 0,5 %

Persediaan larutan CMC-Na dibuat dengan cara menaburkan 500 mg CMC-Na ke dalam 10 mL aquades yang sudah dipanaskan. Kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume menjadi 100 mL.

L.3.2 Pembuatan Persediaan 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena

Persediaan 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena diberikan pada konsentrasi 18 mg/g BB yang telah dihomogenkan dengan 72 mL aseton. Larutan Dimetilbenz(α)antrasena disetiap pemberian memiliki konsentrasi 0,025 mg Dimetilbenz(α)antrasena/mL.

L.3.3 Pembuatan Reagen Lieberman-Buchard

5 mL asam asetat anhidrat dan 5 mL asam sulfat konsentrat ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam 50 mL etanol absolut saat dingin dalam es (Wagner, 2001)

Lampiran 4. Penentuan dan Perhitungan Dosis

L.4.1 Dosis Ekstrak Kloroform Bunga Sirsak

Penentuan dosis ekstrak kloroform bunga Sirsak untuk mencit adalah sebagai berikut:

Misalnya berat badan manusia adalah 70 kg, maka dosis mencit adalah:

$$\begin{aligned}\text{Dosis Metotreksat} &= 2,5 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0065 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 0,00033 \text{ mg/g BB}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 1} &= 25 \text{ mg/kg BB} \times 70 \text{ kg} = 1750 \text{ mg} \\ 1750 \text{ mg} \times 0,0026 &= 4,55 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 0,2275 \text{ mg/g BB} = 0,23 \text{ mg/g BB}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 2} &= 50 \text{ mg/kg BB} \times 70 \text{ kg} = 3500 \text{ mg} \\ 3500 \text{ mg} \times 0,0026 &= 9,1 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 0,455 \text{ mg/g BB} = 0,46 \text{ mg/g BB}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 3} &= 100 \text{ mg/kg BB} \times 70 \text{ kg} = 7000 \text{ mg} \\ 7000 \text{ mg} \times 0,0026 &= 18,2 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 0,91 \text{ mg/g BB} = 1 \text{ mg/g BB}\end{aligned}$$

L.4.2 Perhitungan Dosis Metotreksat

Penentuan dosis Metotreksat adalah sebagai berikut:

Dosis Metotreksat untuk manusia adalah 2,5 mg/kg BB maka:

$$2,5 \text{ mg} \times 70 \text{ kg} = 175 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis untuk mencit} &= 175 \text{ mg} \times 0,0026 \\ &= 0,455 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 0,02275 = 0,023 \text{ mg/g BB}\end{aligned}$$

Keterangan:

0,0026 diperoleh dari tabel perbandingan luas permukaan antara manusia dengan berat badan 70 kg dan mencit dengan berat badan 20 g.

L.4.3 Perhitungan Dosis Larutan Uji

Rumus : Dosis x berat badan mencit

Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan x Dosis x 14 hari

Keterangan : Berat badan mencit = 20 g

Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan = 6

Volume maksimal pemberian per oral pada mencit adalah 1 mL

Sehingga jumlah pelarut yang dibutuhkan adalah $6 \times 14 = 84$ mL

Pada penelitian ini volume yang diberikan pada hewan uji adalah 0,5 mL, maka pelarut yang dibutuhkan adalah 42 mL.

Dosis 1 = 0,23 mg/g BB

$$= 0,23 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} = 4,6 \text{ mg}$$

$$= 6 \text{ ekor} \times 4,6 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} = 386,4 \text{ mg}$$

Jadi, penggunaan konsentrasi obat pada dosis 1 adalah ekstrak ditimbang sebanyak 386,4 mg kemudian dilarutkan dalam 42 mL CMC-Na 0,5 %

Dosis 2 = 0,46 mg/g BB

$$= 0,46 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} = 9,2 \text{ mg}$$

$$= 6 \text{ ekor} \times 9,2 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} = 772,8 \text{ mg}$$

Jadi, penggunaan konsentrasi obat pada dosis 2 adalah ekstrak ditimbang sebanyak 772,8 mg kemudian dilarutkan dalam 42 mL CMC-Na 0,5 %

Dosis 3 = 1 mg/g BB

$$= 1 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} = 20 \text{ mg}$$

$$= 6 \text{ ekor} \times 20 \text{ mg} \times 14 \text{ hari} = 1680 \text{ mg}$$

Jadi, penggunaan konsentrasi obat pada dosis 3 adalah ekstrak ditimbang sebanyak 1680 mg kemudian dilarutkan dalam 42 mL CMC-Na 0,5 %

Jadi total sampel yang digunakan adalah 2839,2 mg

$$= 2,8392 \text{ g}$$

Lampiran 5. Perhitungan Analisis Kadar Air

L.5.1 Analisis Kadar Air Basah

A. Berat Cawan Konstan

Cawan	Pengulangan			Berat Rata-rata
	I	II	III	
1	57,029	57,028	57,027	57,028
2	56,421	56,418	56,417	56,418
3	54,302	54,284	54,280	54,292

B. Kadar Air Basah Sampel

No	Cawan konstan	Cawan sampel	Pengulangan			Rata-rata
			I	II	III	
1	57,028	62,031	59,844	58,516	58,502	58,509
2	56,418	61,425	59,409	58,032	58,025	58,028
3	54,292	59,292	55,759	55,321	55,312	55,646

C. Perhitungan Kadar Air Basah

$$\begin{aligned}\text{Cawan I Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(62,031-58,509)}{(62,031-57,027)} \times 100 \% = 70,38 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-70,38 \%)} = 3,376 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi} \\ &= 70,38 \% - 3,376 \% \\ &= 67,004 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Cawan II Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(61,425-58,028)}{(61,425-56,418)} \times 100 \% = 67,84 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-67,84 \%)} = 3,108 \%\end{aligned}$$

$$\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} = \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi}$$

$$= 67,84 \% - 3,108 \%$$

$$= 64,732 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Cawan III Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(59,292-55,646)}{(59,292-54,292)} \times 100 \% = 72,92 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-72,92 \%)} = 3,692 \% \end{aligned}$$

$$\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} = \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi}$$

$$= 72,92 \% - 3,692 \%$$

$$= 69,228 \%$$

$$\text{Rata-rata Kadar Air} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{72,92+70,38+67,84}{3} = 70,38 \%$$

$$\text{Rata-rata Faktor Koreksi} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{3,692+3,376+3,108}{3} = 3,392 \%$$

$$\text{Rata-rata Kadar Air Koreksi} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{67,004+69,228+64,732}{3} = 66,988 \%$$

L.5.2 Analisis Kadar Air Kering

A. Berat Cawan Konstan

Cawan	Pengulangan			Berat Rata-rata
	I	II	III	
1	59,477	59,474	59,473	59,475
2	54,664	54,660	54,659	54,661
3	54,540	54,535	54,530	54,535

B. Kadar Air Kering Sampel

No	Cawan konstan	Cawan sampel	Pengulangan			Rata-rata
			I	II	III	
1	59,475	64,475	64,181	64,082	64,062	64,108
2	54,661	59,679	59,370	59,277	59,264	59,303
3	54,535	59,551	59,242	59,135	59,131	59,169

C. Perhitungan Kadar Air Basah

$$\begin{aligned}\text{Cawan I Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(64,475-64,108)}{(64,475-64,475)} \times 100 \% = 7,34 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-7,34 \%)} = 1,079 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi} \\ &= 7,34 \% - 1,079 \% \\ &= 6,261 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Cawan II Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(59,679-59,303)}{(59,679-54,661)} \times 100 \% = 7,49 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-7,49 \%)} = 1,080 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi} \\ &= 7,49 \% - 1,08 \% \\ &= 6,41 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Cawan III Kadar Air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\ &= \frac{(59,551-59,169)}{(59,551-54,535)} \times 100 \% = 7,61 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{(100-\% \text{ kadar air})} \\ &= \frac{100}{(100-7,61 \%)} = 1,082 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi} \\ &= 7,61 \% - 1,082 \% \\ &= 6,528 \%\end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata Kadar Air} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{7,34+7,49+7,61}{3} = 7,48 \%$$

$$\text{Rata-rata Faktor Koreksi} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{1,079+1,082+1,08}{3} = 1,08 \%$$

$$\text{Rata-rata Kadar Air Koreksi} = \frac{I+II+III}{3} = \frac{6,261+6,41+6,528}{3} = 6,399 \%$$

Lampiran 6. Perhitungan Rendemen Ekstrak

L.6.1 Penimbangan Konstan

Berat Labu Alas Bulat Kosong = 319,719 gram

Berat Labu Alas Bulat dengan Ekstrak Pekat

I	II	III	IV	V	VI
325,8972	324,8965	324,8832	324,8822	324,8821	324,8820

L.6.2 Rendemen Ekstrak Pekat

Berat Sampel Awal = 200,020 gram

Berat Gelas Kosong = 82,0728 gram

Berat Gelas + Ekstrak Pekat sebelum dialiri gas N₂ = 86,8921 gram

I	II	III	IV	V	VI	VII
86,8908	86,8856	86,8837	86,8822	86,8821	86,8820	86,8820

Berat Gelas + Ekstrak dialiri gas N₂ = 86,8820 gram

Berat Ekstrak = (berat gelas + ekstrak) – berat gelas

$$= 86,8820 - 82,0728$$

$$= 4,8092 \text{ gram}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{4,8092}{200,020} \times 100 \%$$

$$= 2,4043 \%$$

Lampiran 7. Perhitungan Rf Noda Hasil Elusi KLT**L.7.1 Nilai Rf Noda Hasil Elusi KLT Analitik**

Eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat (6:4)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 1} &= \frac{0,2}{8} \\ &= 0,025\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 2} &= \frac{0,4}{8} \\ &= 0,050\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 3} &= \frac{0,6}{8} \\ &= 0,075\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 4} &= \frac{1,2}{8} \\ &= 0,150\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 5} &= \frac{2}{8} \\ &= 0,250\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 6} &= \frac{3,4}{8} \\ &= 0,425\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 7} &= \frac{4,4}{8} \\ &= 0,550\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 8} &= \frac{4,8}{8} \\ &= 0,600\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 9} &= \frac{5,1}{8} \\ &= 0,6375\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 10} &= \frac{6,5}{8} \\ &= 0,8125\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 11} &= \frac{6,9}{8} \\ &= 0,8625\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 12} &= \frac{7,5}{8} \\ &= 0,9375\end{aligned}$$

L.7.2 Nilai Rf Noda Hasil Elusi KLT Preparatif

Eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat (6:4)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 1} &= \frac{0,7}{8} \\ &= 0,0875\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 2} &= \frac{2,5}{8} \\ &= 0,3125\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 3} &= \frac{4,3}{8} \\ &= 0,5375\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 4} &= \frac{6,5}{8} \\ &= 0,8125\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 5} &= \frac{6,9}{8} \\ &= 0,8625\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Harga Rf noda 6} &= \frac{7,7}{8} \\ &= 0,9625\end{aligned}$$

Lampiran 8. Data Berat Badan Perlakuan Hewan Uji

L.8.1 Data Perlakuan

Data Berat Badan Pada Saat Adaptasi

Perlakuan		Penimbangan hari ke-							Rata-rata
		1	2	3	4	5	6	7	
Kontrol Negatif	1	29	29	30	29	29	29	29	29,14
	2	22	21	22	21	22	22	22	21,17
	3	35	35	35	34	34	34	34	34,42
	4	28	27	27	26	25	23	23	25,33
	5	30	29	30	31	31	31	30	30,28
	6	32	32	32	32	32	30	30	31,42
Kontrol Positif	1	34	32	32	33	34	34	34	33,57
	2	30	30	29	29	29	29	30	29,42
	3	32	30	30	32	32	32	32	31,42
	4	30	29	29	28	28	28	29	28,71
	5	30	30	27	28	28	29	30	28,85
	6	25	25	26	25	25	25	26	25,28
Dosis 25 mg/kg	1	28	29	29	29	29	29	30	29
	2	32	30	30	30	31	30	30	30,42
	3	29	28	28	28	29	29	29	28,57
	4	30	30	32	32	30	30	30	30,57
	5	22	21	22	23	23	23	23	22,42
	6	30	30	30	30	30	30	30	30
Dosis 50 mg/kg	1	33	30	30	32	32	32	30	31,28
	2	27	28	28	28	28	29	29	28,14
	3	25	26	26	27	27	27	28	26,57
	4	30	30	30	30	30	30	30	30
	5	30	30	30	30	32	32	32	30,85
	6	27	28	27	27	26	27	27	27
Dosis 100 mg/kg	1	26	26	25	25	26	26	27	25,85
	2	32	31	30	31	31	30	30	30,71
	3	34	34	35	35	35	34	34	34,42
	4	23	23	23	23	23	24	23	23,14
	5	30	30	30	30	31	31	32	30,57
	6	32	31	31	32	32	32	32	31,71

Keterangan: Penimbangan berat badan mencit dilakukan setiap hari bertujuan untuk mengetahui perkembangan tingkat stres hewan uji dilihat dari berat badan yang relatif stabil dengan lingkungan barunya.

Data Berat Badan Pada Saat Induksi DMBA

Perlakuan		Hari perlakuan ke-												Rata-rata
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kontrol Negatif	1	29	28	27	29	27	26	25	23	23	22	21	22	25,16
	2	22	21	20	21	19	20	20	18	18	19	20	21	19,91
	3	34	34	29	31	29	30	30	30	30	30	29	27	30,25
	4	28	27	27	26	25	23	23	25	25	24	25	26	25,33
Kontrol Positif	1	34	34	30	31	28	28	26	23	23	22	23	20	26,83
	2	30	30	29	30	28	30	27	28	28	26	26	24	28
	3	32	33	31	26	25	25	25	22	21	21	21	21	25,25
	4	30	30	27	27	29	27	27	26	25	24	23	20	26,25
Dosis 25 mg/kg BB	1	29	26	26	25	25	24	24	24	23	23	22	21	24,33
	2	32	32	31	29	27	26	25	24	23	23	23	23	26,5
	3	29	30	28	30	29	28	27	26	25	21	19	20	26
	4	32	32	29	33	29	29	29	26	25	24	23	23	27,83

Keterangan : Warna Merah menunjukkan kematian hewan uji. Pada saat perlakuan induksi senyawa DMBA dilakukan selama 6 minggu dengan waktu induksi seminggu 2 kali.

Data Berat Badan Pada Saat Terapi

Perlakuan		Hari ke-														Rata-rata
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Kontrol Negatif	1	23	24	24	24	24	24	25	26	26	25	26	25	25	25	24,71
	2	22	21	21	21	21	21	21	21	22	23	21	22	21	21	21,35
	3	27	26	26	27	26	27	28	28	29	30	29	29	29	29	27,85
	4	26	24	24	23	25	26	25	26	26	27	26	27	26	26	27,35
Kontrol Positif	1	21	22	21	22	21	22	23	23	23	24	23	22	23	23	22,35
	2	25	24	24	25	26	26	27	27	28	29	28	30	29	29	26,92
	3	22	22	22	24	23	23	24	24	25	26	26	26	26	26	24,21
	4	23	22	22	22	22	24	24	26	26	27	26	28	28	28	24,85
Dosis 25 mg/kg BB	1	22	22	22	22	23	23	24	24	24	25	25	25	25	25	23,64
	2	23	23	24	24	23	24	25	24	24	24	24	23	24	24	23,78
	3	22	21	20	20	22	23	23	24	25	24	23	24	24	24	22,78
	4	24	25	23	24	25	25	25	24	25	25	26	26	25	26	24,85

Keterangan : Warna Merah menunjukkan kematian hewan uji. Pada saat perlakuan terapi dilakukan selama 2 minggu dengan waktu terapi sehari sekali.

Lampiran 9. Uji Normalitas Berat Badan Hewan Uji

L.9.1 Uji Normalitas Berat Badan Pada Saat Adaptasi

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Awal	.189	30	.008	.940	30	.091
Akhir	.213	30	.001	.890	30	.005

a. Lilliefors Significance Correction

L.9.2 Uji Normalitas Berat Badan Pada Saat Induksi DMBA

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Awal	.184	30	.011	.901	30	.009
Akhir	.371	30	.000	.694	30	.000

a. Lilliefors Significance Correction

L.9.3 Uji Normalitas Berat Badan Pada Saat Terapi

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Awal	.171	12	.200*	.904	12	.179
Akhir	.158	12	.200*	.960	12	.788

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 10. Perhitungan Anova Berat Badan Hewan Uji

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
Adaptasi	Negative	4	27.5150	5.63776	2.81888	18.5441	36.4859	21.17	34.42
	Positif	4	30.8150	2.14191	1.07095	27.4067	34.2233	28.85	33.57
	dosis 25mg	4	29.6400	1.00462	.50231	28.0414	31.2386	28.57	30.57
	Total	12	29.3233	3.49709	1.00952	27.1014	31.5453	21.17	34.42
Induksi	Negative	4	25.1625	4.22293	2.11147	18.4429	31.8821	19.91	30.25
	Positif	4	26.5825	1.14843	.57422	24.7551	28.4099	25.25	28.00
	dosis 25mg	4	26.1650	1.44671	.72335	23.8630	28.4670	24.33	27.83
	Total	12	25.9700	2.48625	.71772	24.3903	27.5497	19.91	30.25
Terapi	Negative	4	25.3150	2.98075	1.49038	20.5720	30.0580	21.35	27.85
	Positif	4	24.5825	1.88488	.94244	21.5832	27.5818	22.35	26.92
	dosis 25mg	4	23.7675	2.43768	1.21884	26.9386	34.6964	27.92	33.64
	Total	12	26.9050	3.66877	1.05908	24.5740	29.2360	21.35	33.64

Perhitungan Anova SPSS 16.00 Berat rata-rata setiap tahapan perlakuan terhadap hewan uji

No	Perlakuan	Berat badan rata-rata ± Standar deviasi		
		Adaptasi	Induksi	Terapi
1	Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	27,515 ± 5,637	25,162 ± 4,222	25,315 ± 2,980
2	Kontrol Positif (Metotreksat)	30,815 ± 2,141	26,582 ± 1,148	24,582 ± 1,884
3	Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	29,640 ± 1,004	26,165 ± 1,446	23,767 ± 2,437

Perhitungan Anova SPSS 16.00 Perbandingan dari Setiap Perlakuan dengan Uji Post Hoc Tuckey

Multiple Comparisons

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negatif	positif	-19.64977*	6.66820	.039	-38.2674	-1.0321
	dosis 25 mg	-28.34931*	6.66820	.005	-46.9670	-9.7316
positif	negatif	19.64977*	6.66820	.039	1.0321	38.2674
	dosis 25 mg	-8.69953	6.66820	.428	-27.3172	9.9181
dosis 25 mg	negatif	28.34931*	6.66820	.005	9.7316	46.9670
	positif	8.69953	6.66820	.428	-9.9181	27.3172

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Perhitungan Persentase perubahan berat badan hewan uji pada saat induksi DMBA dan terapi

Perlakuan	Berat badan rata-rata ± Standar deviasi		
	Berat awal	Berat akhir	Perubahan berat badan (%)
Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	25,162 ± 4,222	25,315 ± 2,943	+ 0,15
Kontrol Positif (Metotreksat)	26,582 ± 1,148	24,582 ± 1,892	- 2
Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	26,165 ± 1,446	23,767 ± 1,500	- 2,4

Keterangan : (-) mengalami penurunan BB, (+) mengalami kenaikan BB

Lampiran 11. Perhitungan Persentase Kematian Hewan Uji

No	Perlakuan	Angka kematian hewan uji		Persentase (%)
		Induksi	Terapi	
1	Kontrol Positif (Metotreksat)	2	0	33,333
2	Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	2	0	33,333
3	Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/kg BB	0	2	33,333
4	Ekstrak bunga Sirsak Dosis 50 mg/kg BB	1	5	100
5	Ekstrak bunga Sirsak Dosis 100 mg/kg BB	2	4	100

$$\text{Perhitungan} = \frac{\text{Jumlah hewan uji yang mati}}{\text{Jumlah hewan uji kelompok}} \times 100\%$$

$$\text{Kontrol Positif} = \frac{2}{6} \times 100\% = 33,333$$

$$\text{Kontrol Negatif} = \frac{2}{6} \times 100\% = 33,333$$

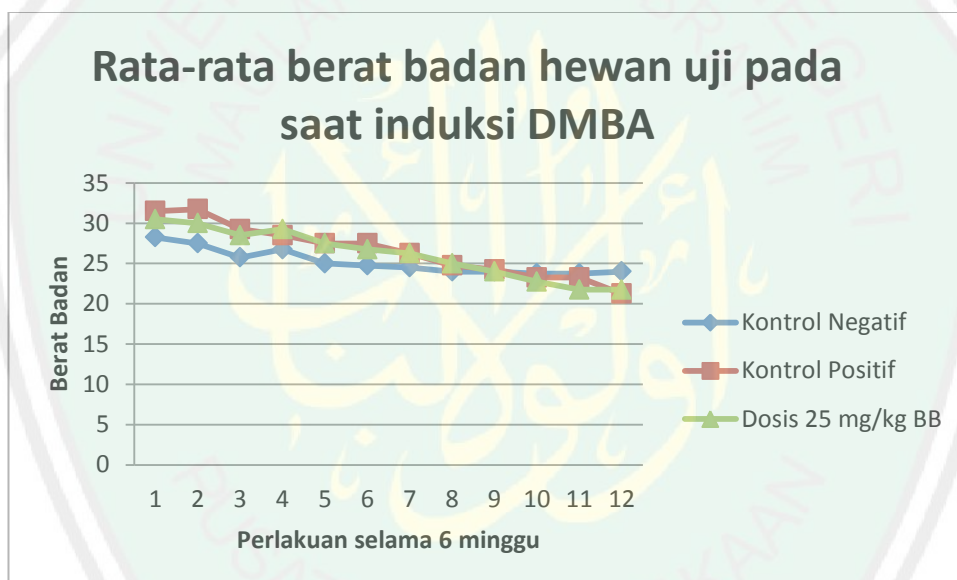
$$\text{Dosis 25 mg/kg BB} = \frac{2}{6} \times 100\% = 33,333$$

$$\text{Dosis 50 mg/kg BB} = \frac{6}{6} \times 100\% = 100$$

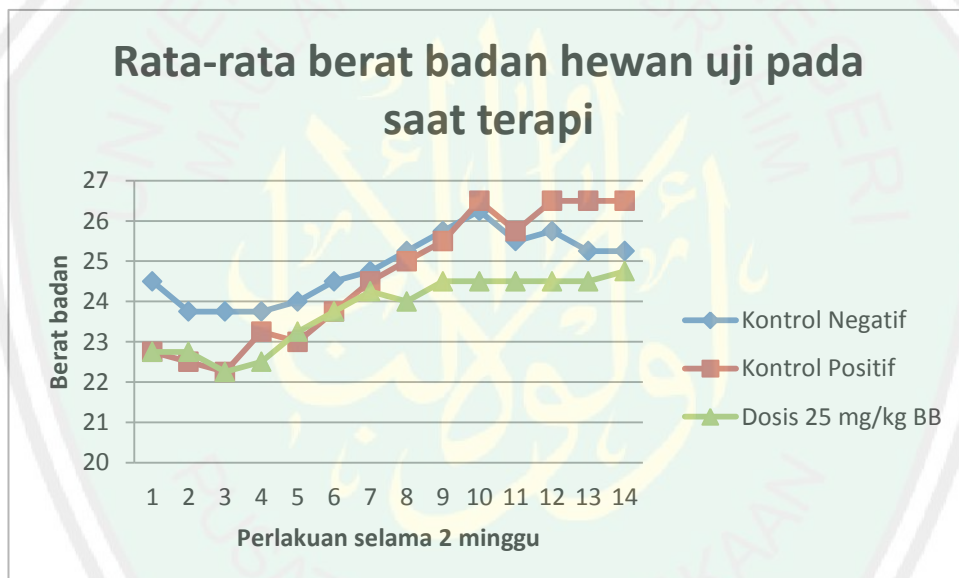
$$\text{Dosis 100 mg/kg BB} = \frac{6}{6} \times 100\% = 100$$

Lampiran 12. Grafik Perhitungan Rerata Berat Badan Hewan Uji

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol Negatif	28.25	27.5	25.75	26.75	25	24.75	24.5	24	24	23.75	23.75	24
Kontrol Positif	31.5	31.75	29.25	28.5	27.5	27.5	26.25	24.75	24.25	23.25	23.25	21.25
Dosis 25 mg	30.5	30	28.5	29.25	27.5	26.75	26.25	25	24	22.75	21.75	21.75



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Kontrol Negatif	24.5	23.75	23.75	23.75	24	24.5	24.75	25.25	25.75	26.25	25.5	25.75	25.25	25.25
Kontrol Positif	22.75	22.5	22.25	23.25	23	23.75	24.5	25	25.5	26.5	25.75	26.5	26.5	26.5
Dosis 25 mg	22.75	22.75	22.25	22.5	23.25	23.75	24.25	24	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.75



Lampiran 13 Perhitungan Persentase Kejadian Kanker

No	Perlakuan	Hewan uji yang mengalami kanker		Lokasi
		Jumlah hewan uji	Persentase (%)	
1	Kontrol Positif (Metotreksat)	2	50	Subkutan pada tengkuk
2	Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5 %)	3	75	Subkutan pada tengkuk
3	Ekstrak bunga Sirsak Dosis 25 mg/g BB	2	50	Subkutan pada tengkuk

$$\text{Presentase kejadian kanker} = \frac{\text{Jumlah hewan uji terkena kanker}}{\text{Jumlah hewan uji kelompok}} \times 100\%$$

$$\text{Kontrol Positif} = \frac{2}{4} \times 100\% = 50$$

$$\text{Kontrol Negatif} = \frac{3}{4} \times 100\% = 75$$

$$\text{Dosis 25 mg/kg BB} = \frac{2}{4} \times 100\% = 50$$

L 13.1 Data dan Perhitungan Volume dan Berat Jaringan Kanker

Perlakuan		Volume Kanker (mm ³)	Rata-rata Volume Kanker (mm ³)	Berat Kanker (mg)	Rata-rata Berat Kanker (mg)
Kontrol Negatif (CMC-Na 0,5%)	1	0,498	0,673	103,48	153,19
	3	0,649		140,75	
	4	0,872		215,36	
Kontrol Positif (Metotreksat)	1	0,338	0,578	148,67	146,45
	5	0,818		144,23	
Dosis I 25 mg/kg BB	2	0,521	0,587	142,62	148,49
	4	0,654		154,36	

L.13.2 Perhitungan Volume Jaringan Kanker

$$\text{Volume Kanker (CV)} = 0,52 \times a \times b^2$$

a = diameter terpendek jaringan kanker (mm)

b = diameter terpanjang jaringan kanker (mm)

Kontrol Positif 1

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,82 \times 0,89^2 \\ &= 0,338 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Positif 5

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 1,04 \times 1,23^2 \\ &= 0,818 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Negatif 1

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,75 \times 1,13^2 \\ &= 0,498 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Negatif 3

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,96 \times 1,14^2 \\ &= 0,649 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Negatif 4

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,68 \times 1,57^2 \\ &= 0,872 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Dosis 25 mg/kg BB 2

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,72 \times 1,18^2 \\ &= 0,521 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

Kontrol Dosis 25 mg/kg BB 4

$$\begin{aligned}\text{Volume Kanker (CV)} &= 0,52 \times a \times b^2 \\ &= 0,52 \times 0,86 \times 1,21^2 \\ &= 0,654 \text{ mm}^3\end{aligned}$$

L.13.3 Perhitungan Hambatan Kanker

$$\text{Hambatan (\%)} = \left(1 - \frac{BT}{BC}\right) \times 100\%$$

BT = berat jaringan kanker kelompok perlakuan (g)

BC = berat jaringan kanker kelompok kontrol negatif (g)

Kontrol Positif Terhadap Kontrol Negatif

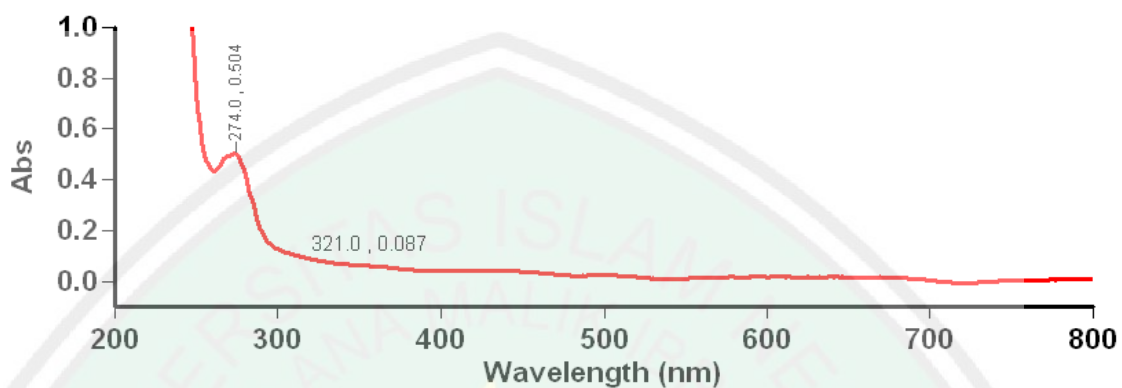
$$\begin{aligned}\text{Hambatan (\%)} &= \left(1 - \frac{BT}{BC}\right) \times 100\% \\ &= \left(1 - \frac{0,14645}{0,15319}\right) \times 100\% \\ &= 4,4 \%\end{aligned}$$

Dosis 25 mg/kg BB Terhadap Kontrol Negatif

$$\begin{aligned}\text{Hambatan (\%)} &= \left(1 - \frac{BT}{BC}\right) \times 100\% \\ &= \left(1 - \frac{0,14849}{0,15319}\right) \times 100\% \\ &= 3,1 \%\end{aligned}$$

Lampiran 14. Hasil Analisis Spektra UV-Vis

Sampel 1



Scan Analysis Report

Report Time : Fri 11 Apr 01:48:25 AM 2014

Method:

Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 1 (11-04-2014).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: susi

Sample Name: sampel 1

Collection Time 4/11/2014 1:48:31 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

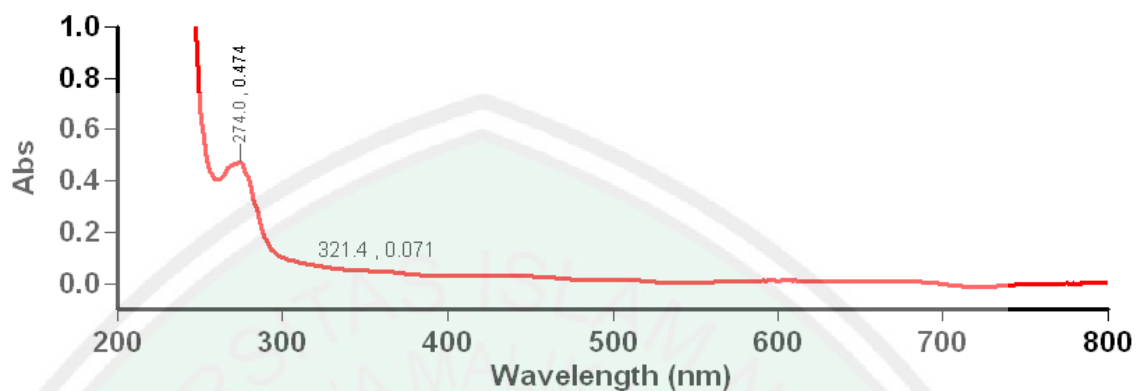
Range

Peaks

0.0100

800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
321.0	0.087
274.0	0.504
241.0	10.000
238.0	10.000
233.0	10.000
230.0	10.000
226.0	4.457
224.1	10.000
220.9	10.000
217.0	3.993
212.9	10.000
209.9	10.000
207.0	4.007
204.0	10.000
201.0	10.000

Sampel 2**Scan Analysis Report**

Report Time : Fri 11 Apr 01:52:51 AM 2014

Method:

Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 2 (11-04-2014).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: susi

Sample Name: sampel 2

Collection Time

4/11/2014 1:52:55 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

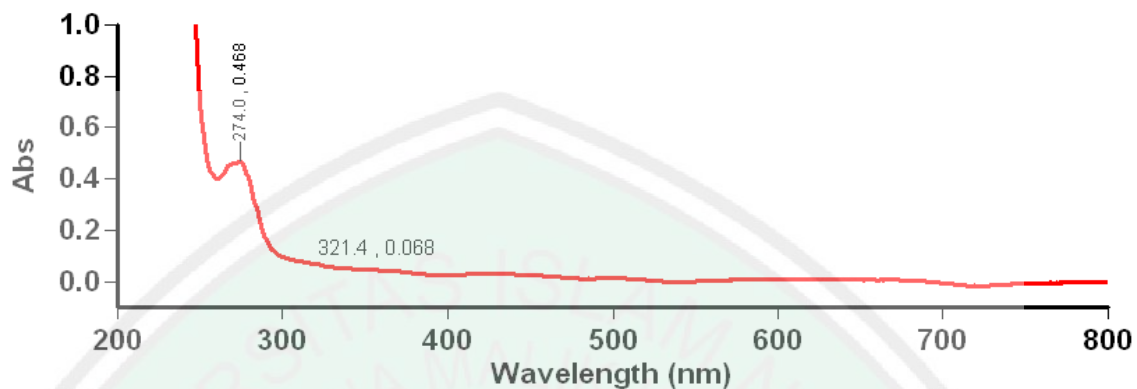
Peak Threshold

0.0100

Range

800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
603.0	0.012
321.4	0.071
274.0	0.474
236.9	2.282
232.1	2.504
228.9	10.000
224.1	3.308
222.0	3.232
212.9	3.029
209.0	3.142
206.0	3.158
203.0	2.980
201.0	2.937

Sampel 3**Scan Analysis Report**

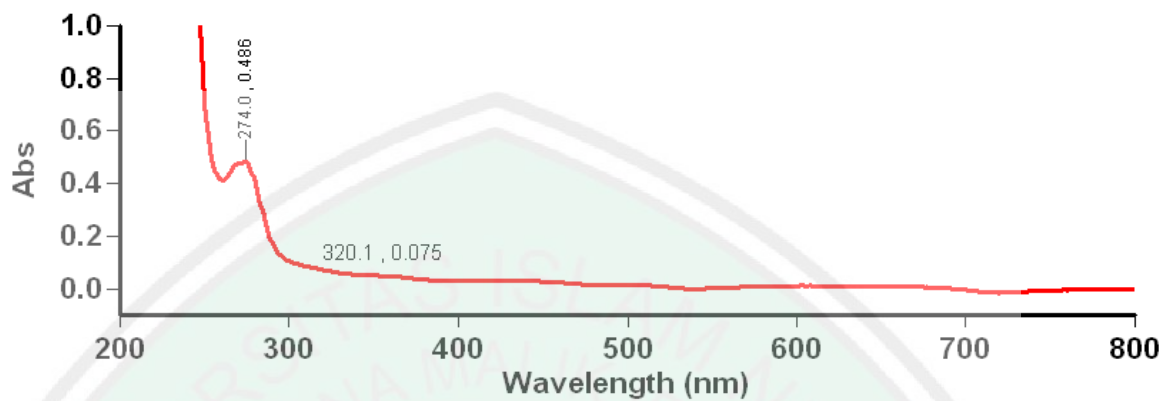
Report Time : Fri 11 Apr 01:56:55 AM 2014
 Method:
 Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 3 (11-04-2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: susi

Sample Name: sample1

Collection Time 4/11/2014 1:57:02 AM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
604.0	0.009
321.4	0.068
274.0	0.468
241.9	2.754
239.0	2.343
236.9	10.000
228.9	10.000
223.0	10.000
212.9	10.000

Sampel 4**Scan Analysis Report**

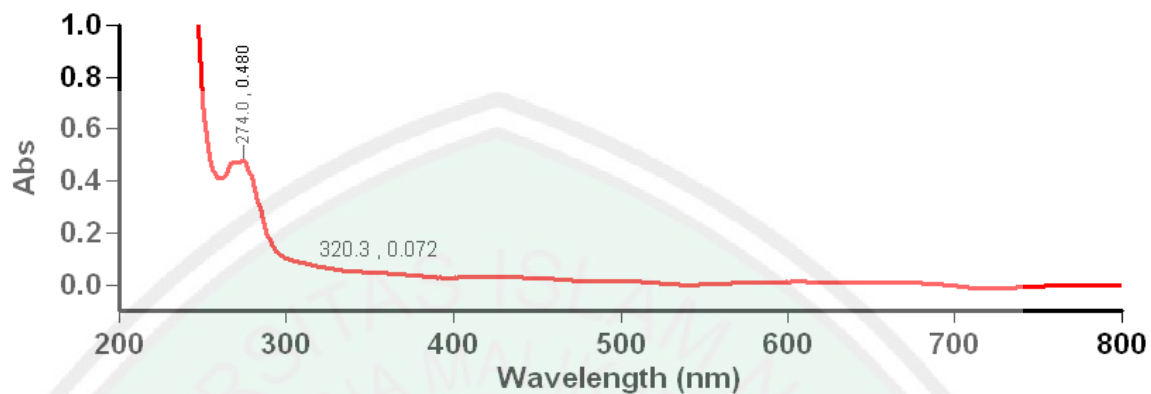
Report Time : Fri 11 Apr 02:01:12 AM 2014
 Method:
 Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 4 (11-04-2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: susi

Sample Name: sample2

Collection Time 4/11/2014 2:01:14 AM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
608.0	0.012
320.1	0.075
274.0	0.486
240.1	3.142
236.9	2.962
235.0	10.000
233.0	10.000
228.9	10.000
224.1	3.856
220.9	3.642
217.0	3.659
215.0	3.385
212.9	3.680
206.0	3.526
201.0	3.429

Sampel 5**Scan Analysis Report**

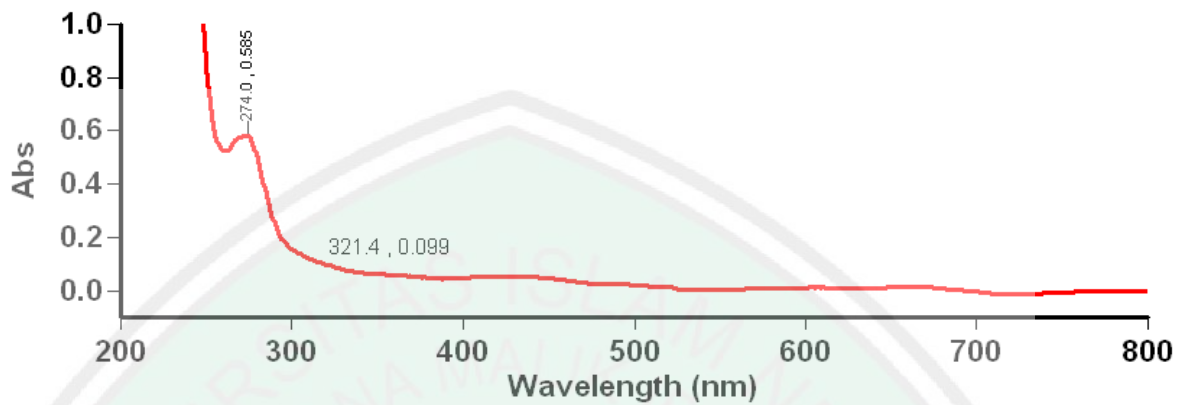
Report Time : Fri 11 Apr 02:05:01 AM 2014
 Method:
 Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 5 (11-04-2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: susi

Sample Name: sample3

Collection Time 4/11/2014 2:05:03 AM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
610.0	0.013
320.3	0.072
274.0	0.480
240.1	2.535
236.0	2.831
233.9	2.599
232.1	3.371
228.9	10.000
225.0	3.815
223.0	3.740
217.0	3.290
214.0	3.360
212.0	3.356
207.0	3.501
203.0	3.374

Sampel 6**Scan Analysis Report**

Report Time : Fri 11 Apr 02:08:47 AM 2014
 Method:
 Batch: D:\A. Aminnudin\Sampel 6 (11-04-2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: susi

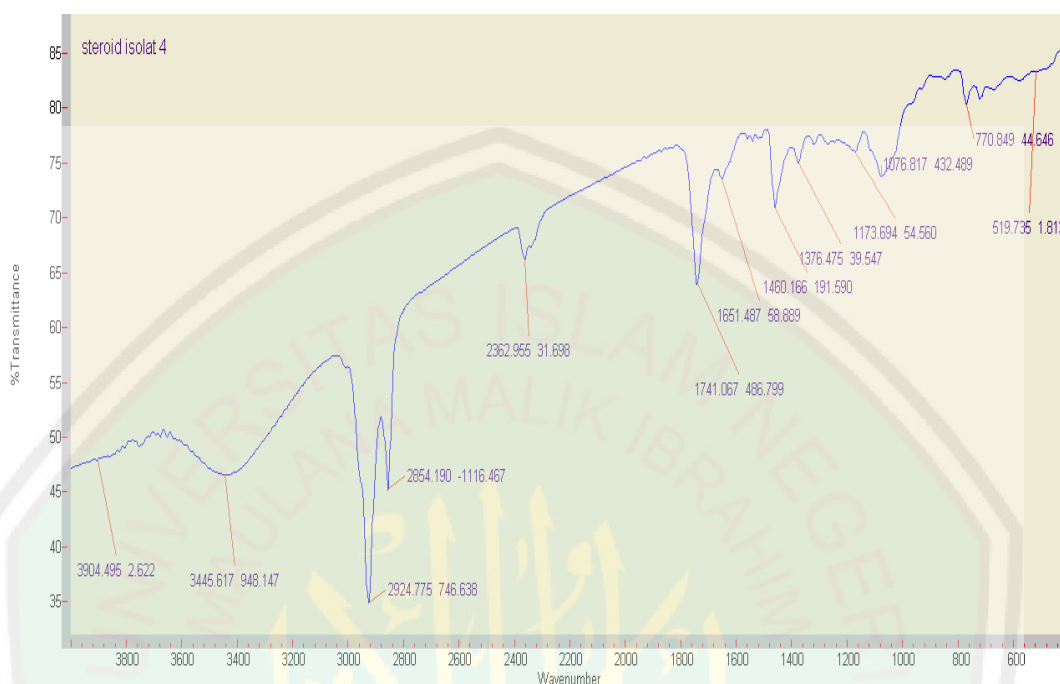
Sample Name: sample4

Collection Time 4/11/2014 2:08:49 AM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
664.0	0.016
418.9	0.054
321.4	0.099
274.0	0.585
239.0	10.000
236.0	10.000
232.1	3.234
230.0	10.000
225.0	3.993
220.9	4.025
219.1	3.920
216.1	3.562
214.0	3.813
211.0	3.999
209.0	4.459
204.9	10.000
201.9	4.216

Lampiran 15. Hasil Analisis Spektra Infra Merah Isolat 4



Puncak	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range (cm ⁻¹)	Jenis Vibrasi	Intensitas
1	3904, 49	3950-3000	Uluran asimetri OH dan NH	w-m
2	3445,61	3950-3000	Uluran asimetri OH dan NH	m-s
3	2924,77	3000-2850	Uluran CH alifatik	Vs
4	2854,19	2900-2850	Uluran CH simetri	vs-s
5	2362,95	2500-2100	Uluran C≡N	W
6	1741,06	1745-1715	Uluran C=O	m-s
7	1651,48	1715-1650	Uluran C=C cincin aromatic	M
8	1460,16	1480-1440	Guntingan CH ₂	M
9	1376,47	1440-1325	Tekukan C-H dalam bidang	w-m
10	1173,69	1310-1085	Uluran R-O aromatic	W

Lampiran 16. Dokumentasi Penelitian



Gambar Sampel bunga Sirsak yang sudah dibersihkan dan dipotong kecil



Gambar Pengeringan sampel dalam oven



Gambar Proses ekstraksi maserasi dengan kloroform



Gambar Proses pemisahan ekstrak dengan pelarut yang digunakan



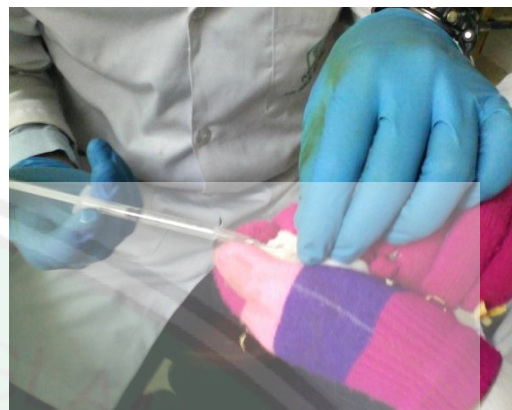
Gambar Ekstrak pekat kloroform bunga Sirsak



Gambar Perlakuan hewan uji pada saat injeksi DMBA



Hewan uji yang menderita kanker Fibrosarkoma



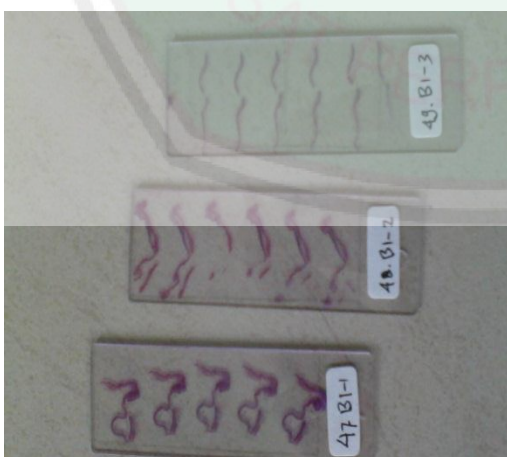
Pemberian terapi pada hewan uji penderita kanker Fibrosarkoma



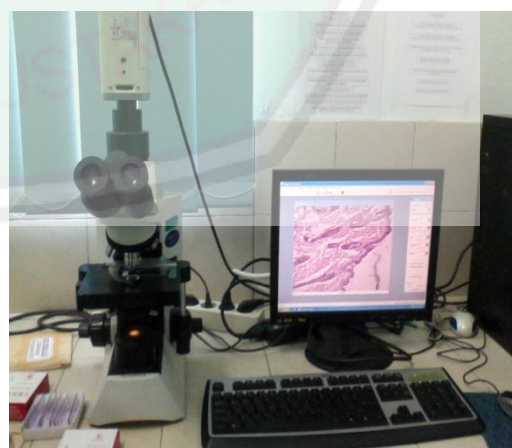
Proses pemisahan senyawa pada plat KLTA dan KLTP



Pengamatan spot noda dengan lampu UV 366 nm



Preparat Histopatologi



Mikroskop cahaya perbesaran 400x