

**IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DAN PENGARUH
EKSTRAK ETANOL 70 % DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*)
TERHADAP BERAT TUMOR
SECARA *IN VIVO* PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

Oleh :
QONITAH NURUL ULA
NIM. 10630020



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

**IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DAN PENGARUH EKSTRAK
ETANOL 70 % DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*)
TERHADAP BERAT TUMOR
SECARA *IN VIVO* PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

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

**Oleh:
QONITAH NURUL ULA
NIM. 10630020**

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

**IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DAN PENGARUH EKSTRAK
ETANOL 70 % DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*)
TERHADAP BERAT TUMOR
SECARA *IN VIVO* PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

**Oleh:
QONITAH NURUL ULA
NIM. 10630020**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 11 September 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Ahmad Abtokhi, M.Pd.
NIP. 19761003 200312 1 004

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

**IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DAN PENGARUH EKSTRAK
ETANOL 70 % DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*)
TERHADAP BERAT TUMOR
SECARA *IN VIVO* PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

**Oleh:
QONITAH NURUL ULA
NIM. 10630020**

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

Tanggal: 11 September 2014

Susunan Dewan Penguji		Tanda Tangan
1. Penguji Utama	: A. Ghanaim Fasya, M.Si. NIP. 19820616 200604 1 002	()
2. Ketua Penguji	: Diana Candra Dewi, M.Si. NIP. 19770720 200312 2 001	()
3. Sekretaris Penguji	: Roihatul Muti'ah, M.Kes.Apt. NIP. 19800203 200912 2 003	()
4. Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd. NIP. 19761003 200312 1 004	()

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 rabbi'l'alamiin. Puji syukur kepada **Allah Swt.** atas segala nikmat dan rahmat-Nya sehingga skripsi ini terselesaikan.

Kedua orangtuaku tercinta. Ayahanda **Fatqul Huda** dan Ibunda **Hindun Muyasaroh**. Kasih sayang, kesabaran, do'a, semangat, dukungan dan segala bentuk kebaikan yang ayah ibu selalu berikan, memotivasiku untuk semangat menatap masa depan.

Adik-adikku tersayang. **Zaka Fuady, Rohma Sunani Ulya dan M. Pria Asyhari** yang selalu mendukung, mendoakan serta memberi semangat dan keceriaan di keluarga kecil kita. Kakakku **Nely Hidayati (Almh.)**, nasihat dan canda tawamu akan tetap di hati. Terimakasih telah mengajariku untuk lebih dewasa.

Bu **Roihatul Muti'ah, M.Kes.Apt.**, Bu **Elok Kamilah Hayati, M.Si.** dan Bapak **Ahmad Abtokhi, M.Pd.** yang telah membimbing disela-sela kesibukan dan memberikan saran serta dukungan baik materiil maupun spirituiil.

Seluruh **Laboran** dan **Admin** Kimia dan Biologi UIN Malang yang telah membantu kelancaran selama penyelesaian skripsi.

Teman-teman seperjuangan **Iha, Aminuddin, Muslikha, Andre (Mus musculus Team), Nadhiro dan Fetty**. Terimakasih atas kebersamaan dan kerja keras kalian telah banyak membantu dalam penyelesaian penelitian ini. **Selvi, Fidho, Lilik**, semangat, canda tawa dan kebersamaan kalian tak kan pernah kulupakan. Semua **teman-teman Kimia** yang membuat perjalanan kuliah ini lebih berwarna. Semoga persahabatan kita tetap terjaga. Sukses selalu ..!

Semoga ilmu kita bermanfaat. Aamiin.

Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Thanks For All.

MOTTO

“خير الناس أنفعهم للناس”

“Sebaik-baik manusia adalah
orang yang paling bermanfaat bagi orang lain”

“Do the best”



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Qonitah Nurul Ula

NIM : 10630020

Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Identifikasi Golongan Senyawa dan Pengaruh Ekstrak Etanol
70 % Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) Terhadap Berat
Tumor Secara *In Vivo* Pada Mencit (*Mus musculus*)

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang telah saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 10 September 2014
Yang Membuat Pernyataan,

Qonitah Nurul Ula
NIM. 09630014

KATA PENGANTAR

Bismillaahirrahmaanirrahiim. Puji syukur kehadiran Allah SWT atas Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Identifikasi Golongan Senyawa dan Pengaruh Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) Terhadap Berat Tumor Secara *In Vivo* pada Mencit (*Mus musculus*)”.

Tersusunnya skripsi ini tidak lepas dari dukungan, kebersamaan, saran serta dukungan lahir dan bathin dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. Hj. Bbayyinatul Muchtaromah, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang dan konsultan yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, saran, motivasi serta dukungan kepada penulis.
4. Roihatul Muti'ah, M.Kes. Apt. selaku Pembimbing yang senantiasa memberikan pengarahan, bimbingan, saran, dukungan baik materi maupun do'a yang berarti sampai akhir tersusunnya skripsi ini.
5. Ahmad Abtokhi, M.Pd. selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah memberikan pengarahan, bimbingan serta saran mengenai kajian integrasi keislaman.
6. A. Ghanaim Fasya, M.Si. selaku Dosen Penguji yang memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
7. Diana Candra Dewi, M.Si. selaku Ketua Penguji yang memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
8. Seluruh Dosen Pengajar di Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan dan ilmu kepada penulis selama menempuh pendidikan di UIN Maliki Malang.

9. Seluruh staf Laboratorium dan staf Administrasi Jurusan Kimia dan Biologi atas seluruh bantuan, dukungan dan sumbangan pemikiran selama penyelesaian skripsi ini.
10. Kedua orang tuaku, saudara dan seluruh keluarga besar yang dengan penuh kasih sayang dan keikhlasan telah memberikan segala kebutuhan kepada penulis, memberikan motivasi dan dukungan baik secara materiil maupun spirituil.
11. Teman-teman angkatan 2010 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah semoga tetap terjaga persaudaraan kita.
12. Kakak-kakak dan adik-adik keluarga besar kimia tetap semangat karena sesungguhnya tidak ada kesulitan yang tak dapat diatasi. Semoga ilmu yang kita peroleh dapat memberikan manfaat untuk masyarakat.
13. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi hazanah pengembangan keilmuan, terutama dalam bidang kimia. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Malang, September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Pemanfaatan Tanaman Obat dalam Perspektif Islam.....	7
2.2 Tanaman Widuri (<i>Calotropis gigantea</i>)	9
2.2.1 Morfologi Tanaman Widuri	9
2.2.2 Taksonomi Tanaman Widuri.....	10
2.2.3 Manfaat Farmakologi.....	11
2.2.4 Kandungan Kimia Daun Widuri.....	12
2.3 Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder Daun Widuri	13
2.3.1 Ekstraksi Maserasi	13
2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	14
2.4 Kanker	17
2.4.1 Penyebab Kanker	17
2.4.2 Tahapan Pembentukan Kanker	19
2.4.3 Jenis Kanker	20
2.5 Fibrosarkoma	21
2.5.1 Perbedaan Sel Fibrosarkoma dan Sel Fibroblas.....	25
2.5.2 Hasil Uji Pendahuluan	27
2.6 Induksi Kanker dengan Menggunakan Senyawa 7,12-dimetil benz(α)antrasena (DMBA)	28
2.7 Metotreksat Sebagai Obat Antikanker	30
2.8 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	31
2.9 Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Antikanker	32
2.9.1 Flavonoid	32

2.9.2 Alkaloid.....	35
2.9.3 Tanin	37
2.9.4 Saponin	38
2.9.5 Terpenoid	40
2.9.6 Steroid	42
2.9 Uji <i>One Way</i> ANOVA	44
BAB III METODE PENELITIAN	46
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	46
3.2 Alat dan Bahan	46
3.2.1 Alat	46
3.2.2 Bahan	47
3.3 Rancangan Penelitian	48
3.4 Tahapan Penelitian	48
3.5 Pelaksanaan Penelitian	49
3.5.1 Preparasi Sampel	49
3.5.2 Analisis Kadar Air	49
3.5.3 Ekstraksi Golongan Senyawa dengan Metode Maserasi	50
3.5.4 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder	51
3.5.4.1 Uji Fitokimia dengan Reagen	51
3.5.4.2 Uji Penegasan dengan KLTA	52
3.5.5 Uji Antitumor	55
3.5.5.1 Persiapan Hewan Coba	55
3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba	56
3.5.5.3 Imunohistokimia Kaspase-3	58
3.6 Analisis Data	62
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	64
4.1 Preparasi Sampel	64
4.2 Analisis Kadar Air	64
4.3 Ekstraksi Daun Widuri Dengan Maserasi	65
4.4 Identifikasi Golongan Senyawa dalam Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri	68
4.4.1 Uji Fitokimia	68
4.4.1.1 Triterpenoid	69
4.4.1.2 Tanin	70
4.4.2 Uji Penegasan Dengan KLTA	72
4.4.2.1 Triterpenoid	74
4.4.2.2 Tanin	77
4.5 Pengaruh Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri Terhadap Mencit yang Diinduksi DMBA	80
4.5.1 Berat Badan, Insudensi Tumor dan Berat Tumor	83
4.5.2 Imunohistokimia Kaspase-3	88
4.6 Dugaan Mekanisme Ekstrak Etanol Daun Widuri dalam Menghambat Pertumbuhan Tumor	94
4.7 Pemanfaatan Daun Widuri dalam Perspektif Islam	97

BAB V PENUTUP	102
5.1 Kesimpulan	102
5.2 Saran	102
DAFTAR PUSTAKA	104
LAMPIRAN	115



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Data biologis mencit di laboratorium	32
Tabel 4.1	Hasil maserasi ekstrak etanol 70 % daun widuri	68
Tabel 4.2	Hasil pengamatan uji fitokimia	69
Tabel 4.3	Data penampakan noda golongan senyawa triterpenoid hasil KLTA dengan 5 variasi eluen	74
Tabel 4.4	Hasil KLTA golongan senyawa triterpenoid dengan eluen kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v)	75
Tabel 4.5	Hasil KLTA golongan senyawa tanin dengan 5 variasi eluen	77
Tabel 4.6	Hasil KLTA golongan senyawa tanin dengan eluen butanol : asam asetat : air = 14 : 1: 5 (v/v)	78
Tabel 4.7	Pengaruh ekstrak etanol daun widuri terhadap perubahan berat badan mencit	84
Tabel 4.8	Pengaruh ekstrak etanol daun widuri terhadap insidensi tumor setelah terapi	86
Tabel 4.9	Hasil analisis indeks apoptosis	91
Tabel 4.10	Hasil analisis skor IHK kaspase-3	92
Tabel 4.11	Hasil signifikansi uji Mann-Whitney dari skor IHK	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun widuri (<i>Calotropis gigantea</i>).....	10
Gambar 2.2 Tanaman widuri (<i>Calotropis gigantea</i>).....	10
Gambar 2.3 Skema mekanisme perubahan malignasi/keganasan pada sel normal	21
Gambar 2.4 <i>Grade</i> fibrosarkoma	24
Gambar 2.5 Fibrosarkoma yang menyerang tulang paha	25
Gambar 2.6 Fibrosarkoma dan sel fibroblas	26
Gambar 2.7 Gambaran histologi menggunakan pewarnaan H-E	27
Gambar 2.8 Struktur senyawa 7,12-dimetilbenz(α)antrasena.....	29
Gambar 2.9 Struktur inti senyawa flavonoid	33
Gambar 2.10 Contoh struktur senyawa golongan alkaloid piperidina	35
Gambar 2.11 Contoh struktur senyawa tanin.....	37
Gambar 2.12 Struktur inti saponin (steroid spiroketal)	39
Gambar 2.13 Struktur cincin umum triterpenoid (oleanana).....	41
Gambar 2.14 Struktur inti steroid.....	43
Gambar 3.1 Skoring Allred	62
Gambar 4.1 Kompleks geometri oktahedral kompleks besi-tanin	71
Gambar 4.4 Hasil KLTA golongan senyawa triterpenoid	75
Gambar 4.5 Hasil KLTA golongan senyawa tanin	78
Gambar 4.2 Perubahan berat badan mencit selama perlakuan	84
Gambar 4.3 Hasil imunohistokimia kaspase-3	90
Gambar 4.4 Struktur senyawa kardenolid 15- β -hydroxy-calactinic acid (C ₂₉ H ₄₀ O ₁₁) dalam daun widuri	95

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Tahapan penelitian	115
Lampiran 2 Skema kerja.....	116
Lampiran 3 Pembuatan larutan dan reagen	124
Lampiran 4 Penentuan dan perhitungan dosis	128
Lampiran 5 Perhitungan kadar air.....	132
Lampiran 6 Perhitungan rendemen hasil maserasi	134
Lampiran 7 Perhitungan nilai R_f KLTA.....	135
Lampiran 8 Daftar berat badan mencit dan hasil uji statistika	137
Lampiran 9 Perhitungan insidensi tumor	143
Lampiran 10 Data skor IHK kaspase-3	144
Lampiran 11 Dokumentasi penelitian	151



ABSTRAK

Ula, Q. N. 2014. Identifikasi Golongan Senyawa dan Pengaruh Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) Terhadap Berat Tumor Secara *In Vivo* Pada Mencit (*Mus musculus*). Pembimbing I : Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt.; Pembimbing II : Ahmad Abtokhi, M.Pd.; Konsultan : Elok Kamilah Hayati, M.Si.

Kata kunci: *Calotropis gigantea*, berat tumor, uji fitokimia, KLTA, kaspase-3

Angka kematian akibat kanker di seluruh dunia semakin tinggi. Namun beberapa cara pengobatan yang telah ada seperti kemoterapi, operasi dan radioterapi belum dapat mengatasi kanker dan menimbulkan efek samping yang serius. Pada penelitian sebelumnya, daun widuri (*Calotropis gigantea*) diketahui memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa pada ekstrak daun widuri dan pengaruhnya terhadap berat tumor secara *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*).

Daun widuri dipreparasi dan dianalisis kadar airnya. Serbuk daun widuri diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70 % dan dipekatkan. Ekstrak pekat diidentifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalamnya dengan uji fitokimia dan dilakukan uji penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Kemudian ekstrak dengan variasi dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB diujikan pengaruhnya terhadap berat tumor pada mencit yang telah diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)antrasena (DMBA). Ekstrak diberikan selama 2 minggu dan dibandingkan pengaruhnya terhadap mencit kontrol negatif CMC-Na 0,5 % dan kontrol positif Metotreksat 2,5 mg/KgBB. Berat badan ditimbang selama induksi DMBA dan pemberian terapi. Pada akhir perlakuan berat tumor ditimbang dan dibuat preparat imunohistokimia kaspase-3.

Hasil identifikasi golongan senyawa menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70 % daun widuri mengandung triterpenoid dan tanin. Uji KLTA diperoleh 5 noda triterpenoid dengan Rf 0,33; 0,49; 0,54; 0,78 dan 0,59 menggunakan eluen kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v). Sedangkan tanin diperoleh 1 noda dengan Rf 0,55 menggunakan eluen butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v). Ekstrak daun widuri dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB mampu mengurangi berat tumor pada mencit dan dapat meningkatkan apoptosis sel berturut-turut sebesar 20,9 %; 21,5 % dan 24,6 % serta meningkatkan ekspresi kaspase-3 secara signifikan.

ABSTRACT

Ula, Q. N. 2014. Identification Compound Class and Effect of 70 % Ethanol Extract of Widuri's Leaves (*Calotropis gigantea*) Against Tumor Weight *In Vivo* In Mice (*Mus musculus*). Supervisor I: Roihatul Muti'ah, Kes.Apt.; Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd.; Consultant: Elok Kamilah Hayati, M.Si.

Keywords: *Calotropis gigantea*, tumor weight, phytochemical test, ATLC, caspase-3

Number of cancer deaths in worldwide is increasing. However some treatments as chemotherapy, surgery and radiotherapy not overcome cancer and cause serious side effects. In previous research, leaves of widuri (*Calotropis gigantea*) is known have *in vitro* anticancer activity. This study aims to determine the group of compounds in leaf widuri extract and its effect on tumor weight *in vivo* in mice (*Mus musculus*).

Widuri leaf were prepared and water content were analyzed. Widuri leaf powder was extracted maceration using 70 % ethanol and concentrated. Concentrated extracts identified class of compounds contained in them with phytochemical test and test the assertion by Analytical Thin Layer Chromatography (ATLC). Then extract with a variation dose 50, 100 and 150 mg/KgBW tested its effect on tumor weight in mice that had been induced 7,12-dimetilbenz (α) anthracene (DMBA). Extract is given for 2 weeks and compared to negative control mice influence on CMC-Na 0,5 % and a positive control Methotrexate 2,5 mg/KgBW. Body weight is weighed during DMBA induction and therapy. At the end of the treatment the tumor weight is weighed and made preparations caspase-3 immunohistochemistry.

The results of the identification classes of compounds showed that 70 % ethanol extract of widuri leaves contains triterpenoids and tannins. ATLC obtained 5 stains triterpenoids with R_f 0,33; 0,49; 0,54; 0,78 and 0,59 using the eluent chloroform : methanol = 10 : 1 (v/v). While tannins obtained 1 stain with R_f 0,55 using eluent butanol : acetic acid : water = 14 : 1 5 = (v/v). Widuri leaf extract dose of 50, 100 and 150 mg/KgBW is able to reduce the tumor weight in mice and can increase cell apoptosis, respectively for 20,9 %; 21,5 % and 24,6 % and increased the expression of caspase-3 significantly.

خلاصة البحث

أولى، ق.ن. ٢٠١٤. تحليل مجموعة إتحادية و تأثير خلاصة إيتانول ٧٠% ورقة ويدوري (جالوتروفيس كيكانتيا) على وزن الورم بطريقة إن فيفو في فأر صغير (موس موسكولوس). المشرفة الأولى : رائحة المطيعة الماجستير؛ المشرفة الثانية: أحمد أبطاحي الماجستير؛ مستشارة : إيلوك كاملية الماجستير.

الكلمات المفتوحية : جالوتروفيس كيكانتيا، وزن الورم، إختبار فيتوكيمياء، أ،ت،ل،ج، كسفا-٣

كان عدد الأموات بسبب السرطان في أنحاء العالمزاداد. ولكنكيفيات للمعالجة الموجودة مثل كيموترافي، الجراحة، و راديوترافي، لم يكتفي ليصلح السرطان ويجعل الآثارالسلبية الشديدة. عرفني البحث القاسم، أن ورقة ويدوري (جالوتروفيس كيكانتيا) تملك أنشطة ضد السرطان بطريقة إن فيتوو. يهدفهذا البحثلمعرفة مجموعة إتحادية وتأثير خلاصة إيتانول ٧٠% ورقة ويدوري (جالوتروفيس كيكانتيا) على وزن الورم بطريقة إن فيفو في فأر صغير (موس موسكولوس).

أعدتورقة ويدويو حلّت درجة ماءها. استخلص مسحوق ورقة ويدوري نقعا باستخدام المذيب إيتانول ٧٠% و يتركز. و حلّالمسحوق المتركز بمجموعة إتحادية التي تشتمل فيها بطريقة إختبالية نباتية ويعمل إختبار تأكيد مع (أ،ت،ل،ج). ثم المسحوق مع الجرعة المتعددة من ٥٠، و ١٠٠، و ١٥٠ ميلي غرام/ كيلو غرام وزن البدان يختبار تأثيرها على وزن الورام لفأر صغير الذي يحث ديمتيل بينز(α)أنتراسينا (د،م،ب،أ) يعطى المسحوق في مدة أسبعين و يقارن تأثيره لفأر صغير، السيطرة السلبية ج،م،ج-نا ٠،٥% و السيطرة الإيجابية ميتوتريكسات ٢،٥ ميلي غرام/ كيلو غرام وزن البدان. يوزن وزن البدان في زمان الحث ديمتيل بينز(α)أنتراسينا(د،م،ب،أ) و اعطاء العلاج. و يوزن فيأخيرة تجريبية على وزن الورام و اعداد إيمونوهيستو كيمياء كاسفا-٣.

نتيجةتركيز مجموعة الإتحادية يدلّ أن مسحوق إيتانول ٧٠% من ورقة ويدوري يتكوّن من تريتينويد و تانين. وينتج إختبار أ،ت،ل،ج على ٥ بقع تريتينويدى، معرف ٠.٣٣؛ ٠.٤؛ ٠.٥٤؛ ٠.٧٨ و ٠.٥٩ باستخدام الكلوروفورممشاطف: الميتانول = ١٠ : ١ (ت / ت). بينما تانين حصلت ١ بقع معرف ٠.٥ باستخدام بوتانولمشاطف: حمضالخليك: الماء = ١٤ : ١ : ٥ (ت / ت). يستطيعمسحوق ورقة ويدوري أن ينقص وزن الورام لفأر صغير و يرتفع افوتوسيس الخلايا متتابعا ٢٠،٩%؛ ٢١،٥% و ٢٤،٦% ثم يرتفع وجود كسفا-٣ بشكل كبير.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian terbesar di dunia. Berdasarkan data *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, pada tahun 2008 terhitung sampai 7,6 juta kasus kematian akibat kanker atau sekitar 13 % dari semua kematian. Sekitar 70 % kematian kanker tersebut terjadi di negara miskin dan negara berkembang. Diperkirakan pada tahun 2025 kematian akibat kanker di seluruh dunia akan meningkat sebesar 19,3 juta jiwa (IARC, 2013).

Saat ini banyak cara yang dilakukan untuk mengobati kanker dengan jalan medis maupun tradisional. Secara medis pengobatan dilakukan dengan cara pembedahan (operasi) dan radioterapi dilakukan jika letak kanker masih lokal atau lokoregional. Kemoterapi dilakukan jika kanker telah menyebar luas dan bersifat kemosensitif atau responsif terhadap obat kimia, sehingga sel kanker tersebut musnah. Namun cara 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, peningkatan daya tahan tubuh

(imunoterapi) (Maharani, 2009). Misalnya Metotreksat, dapat menyebabkan gangguan ginjal dan hati (Christian, 2009). Kendala lain yang dihadapi dalam pengobatan kanker adalah mahalanya biaya pengobatan. Hal ini mendorong para peneliti untuk menemukan antikanker baru karena semua penyakit pasti ada obatnya, sebagaimana sabda Nabi Muhammad saw:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً . رواه البخاري .

“Allah tidak akan menurunkan suatu penyakit, melainkan Dia juga menurunkan obat untuk penyakit itu.” (HR. Bukhari, 10/134 No. 5678)

Hadits di atas menunjukkan bahwa Allah Yang Maha Adil menciptakan suatu penyakit beserta obatnya. Obat tersebut tidak akan diketahui manusia jika tidak memikirkannya sehingga manusia dengan ilmu pengetahuannya mampu mensyukuri, mengambil hikmah dan mengetahui kebesaran-Nya sehingga semakin semakin dekatlah kepada-Nya. Inilah yang menuntun manusia, yang diberikan nikmat berupa akal dan fikiran oleh Allah SWT, untuk terus mencari dan menemukan obat dari suatu penyakit.

Salah satunya usaha pencarian obat adalah dengan eksplorasi senyawa aktif dari tanaman ciptaan Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam surat as-Syu'âra 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-Syu'âra: 7).

Tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup, termasuk tumbuhan yang dapat digunakan sebagai pengobatan (Savitri, 2008). Allah menciptakan alam dan isinya mempunyai hikmah yang amat besar. Semua tidak ada yang sia-sia dalam ciptaan-Nya dan manusia diberi kesempatan seluas-luasnya untuk mengambil manfaatnya. Penelitian tentang penggunaan ekstrak kasar tumbuhan sebagai terapi kanker telah dilakukan Kumar *et al.* (2012) yaitu menggunakan ekstrak kasar tumbuhan *Indigofera aspalathoides* dimana ekstrak ini menunjukkan peningkatan berat badan dan penurunan berat tumor yang signifikan pada tikus yang terinduksi fibrosarkoma.

Senyawa yang berasal dari tanaman obat sebagai obat tradisional sudah digunakan sejak zaman dulu. Tanaman obat ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber obat baru. Keuntungan senyawa yang berasal dari tanaman obat untuk perkembangan obat baru adalah senyawa obat ini memiliki afinitas yang tinggi terhadap reseptor biologis yang terdapat dalam tubuh manusia (Ginsburg dan Deharo, 2011), dapat meningkatkan daya tahan tubuh dan tidak toksik sehingga lebih aman digunakan (Maharani, 2009).

Indonesia yang dikenal sebagai *megadiversity country* yang kaya akan keanekaragaman hayati dapat dikembangkan sebagai antikanker. Salah satu jenis tanaman tersebut adalah widuri. Widuri (*Calotropis gigantea*) termasuk dalam famili *Apocynaceae* yang dilaporkan memiliki sejumlah senyawa obat. Secara tradisional daun widuri telah digunakan sebagai tanaman obat untuk beberapa penyakit seperti paralisis, pembengkakan, demam, asma, luka, keringat dingin, gigitan ular beracun, cacingan dan bisul (Kumar *et al.*, 2011). Selain itu famili

Apocynaceae juga digunakan untuk mengobati kanker dan TBC (Ahmed *et al.*, 2005). Bagian tanaman widuri yang paling banyak dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian daunnya. Hal ini dikarenakan jumlah daun lebih banyak dibandingkan dengan bagian tanaman yang lain sehingga lebih mudah didapatkan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini menggunakan bagian daun dari tanaman widuri.

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Wong *et al* (2011) menunjukkan bahwa secara *in vitro* ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) memiliki aktivitas antiproliferatif dalam menghambat sel kanker manusia. Aktivitas antiproliferatif ini diperkirakan karena adanya senyawa golongan tanin, terpenoid dan saponin. Hasil penelitian Singh *et al* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70 % daun widuri memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan Nitrit oksida dengan hasil uji fitokimia menunjukkan adanya karbohidrat, alkaloid, flavonoid, steroid, protein, asam amino dan tanin. Dimana golongan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid dan steroid diketahui bekerja sebagai antikanker (Lisdawati, 2009; Kumar *et al.*, 2012).

Melihat beberapa hasil penelitian yang telah ada maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, terutama pengujian secara *in vivo* untuk mengetahui potensi ekstrak etanol daun widuri sebagai antitumor.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- a) Golongan senyawa apakah yang terkandung dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan hasil uji fitokimia dan KLTA ?
- b) Apakah ekstrak etanol 70 % daun widuri (*Calotropis gigantea*) berpengaruh terhadap berat tumor pada mencit?

1.3 Tujuan

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

- a) Untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan hasil uji fitokimia dan KLTA.
- b) Untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70 % daun widuri (*Calotropis gigantea*) terhadap berat tumor pada mencit.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

- a) Sampel yang digunakan adalah daun widuri (*Calotropis gigantea*) dari Pasuruan Jawa Timur.
- b) Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur Balb/C dengan berat badan 20-30 gram.

- c) Induksi tumor menggunakan senyawa 7,12-dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) 25 μ g/0,1 mL aseton.
- d) Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi.
- e) Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan uji fitokimia menggunakan reagen dan pemisahan golongan senyawa dilakukan dengan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai kemampuan daun widuri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan tumor sehingga dapat dikembangkan sebagai obat antikanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tanaman Obat dalam Perspektif Islam

Sesungguhnya di dalam Alqur'an terdapat ayat-ayat kauniyah Allah pada tumbuh-tumbuhan, yaitu dalam surat an-Nahl ayat 10 – 13.

هُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً لَكُمْ مِنْهُ شَرَابٌ وَمِنْهُ شَجَرٌ فِيهِ تُسِيمُونَ ﴿١٠﴾ يُنبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾ وَسَخَّرَ لَكُمْ الَّيْلَ وَالنَّهَارَ وَالشَّمْسَ وَالْقَمَرَ وَالنُّجُومَ مُسَخَّرَاتٍ بِأَمْرِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿١٢﴾ وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

“Dialah yang telah menurunkan air hujan dari langit untuk kamu, sebahagiannya menjadi minuman dan sebahagiannya (menyuburkan) tumbuh-tumbuhan, yang pada (tempat tumbuhnya) kamu menggembalakan ternakmu (11). 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 (12). Dan dia menundukkan malam dan siang, matahari dan bulan untukmu. dan bintang-bintang itu ditundukkan (untukmu) dengan perintah-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memahami (nya) (13). Dan dia (menundukkan pula) apa yang dia ciptakan untuk kamu di bumi Ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran.” (QS. an-Nahl: 10 – 13).

Ayat ini menjelaskan tentang nikmat yang besar dan ciptaan yang mencengangkan, yang semuanya merupakan ayat-ayat kauniyah yang menunjukkan kekuasaan Allah, kebesaran dan keesaan-Nya. Allah telah mengatur alam semesta ini dengan aturan yang tepat dan menyiapkan untuk manusia segala macam kebutuhan hidup. Dari atas langit Allah menurunkan hujan, lalu menumbuhkan tanaman dan buah-buahan, mengalirkan sungai-sungai, menciptakan matahari dan bulan, malam dan siang (Ash-Shabuny, 2001).

Manfaat hujan yang dianugerahkan kepada manusia terbagi menjadi dua bagian: bagian yang diminum bagi manusia dan hewan, dan bagian yang lain digunakan untuk menyiangi tanaman. Dari tanaman itu keluarlah buah-buahan sebagai makanan bagi anak cucu Adam, yang semua manfaatnya kembali pada manusia (Ash-Shabuny, 2001). Bagian tanaman yang dapat dimanfaatkan oleh manusia bukanlah buahnya saja, melainkan seluruh bagian dari tanaman seperti daun, batang, bunga dan akar. Karena sesungguhnya semua yang diciptakan Allah tidak ada yang sia-sia sebagaimana Allah berfirman dalam Alqur'an surat Ali Imran ayat 191.

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

Allah mengeluarkan tumbuh-tumbuhan dari dalam bumi dengan berbagai macam jenis, rasa, warna, bau dan bentuknya. Diantaranya ada yang manis, asam dan ada yang pahit. Maka dari itu Allah berfirman, *“pada demikian itu ada tanda*

bagi kaum yang memikirkan (mengambil pelajaran).” Ini menjadi bukti yang jelas dan pelajaran yang berharga atas keesaan Allah dan kekuasaan-Nya, bagi orang-orang yang mau berpikir dan menjadikan bukti tentang adanya pencipta yang Maha Bijaksana. Kata “*yang mau memikirkan*” pada akhir ayat adalah untuk bertafakkur dan bertadabbur, sehingga membutuhkan akal sehat dan pengamatan yang jeli (Ash-Shabuny, 2001).

Ulul Albab adalah orang-orang yang mendalam pemahamannya dan berpikiran tajam (Katsier, 1993). Melalui kegiatan berfikir, perenungan, pencernaan akal sehat dan hati yang lapang maka akan dapat mengetahui kebesaran nikmat yang telah Allah berikan kepada manusia. Mahasuci Allah yang menciptakan, membuat hukum alam, memelihara dan memberikan petunjuk kepada segala sesuatu yang diciptakan-Nya (Ash-Shabuny, 2001). Salah satu tanaman yang dapat dipelajari dan dimanfaatkan adalah tanaman widuri (*Calotropis gigantea*).

2.2 Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*)

2.2.1 Morfologi Tanaman Widuri

Tanaman widuri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah dan pantai berpasir (Dalimartha, 2003). Widuri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman perdu, berumur menahun (perennial) dengan tinggi ± 2 m. Tanaman ini memiliki daun tunggal, tidak bertangkai (*sesilis*), tersusun berhadapan (*folia oposita*), warna hijau keputih-putihan, panjang 8 – 20 cm, lebar 4 – 15 cm, helaian daun

agak tebal dan tegar, bentuk bulat telur, ujung tumpul (*obtusus*), pangkal berlekuk (*emarginatus*), tepi rata, pertulangan menyirip (*pinnate*) dan permukaan kasap (*scaber*). Perbanyakkan widuri secara generatif (biji) (Ditjenbun, 2010).



Gambar 2.1 Daun widuri (*Calotropis gigantea*) (IFAS, 2010)

2.2.2 Taksonomi Tanaman Widuri

Taksonomi tanaman widuri adalah sebagai berikut (Ditjenbun, 2010):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Gentianales
Famili	: Asclepiadaceae
Genus	: <i>Calotropis</i>
Spesies	: <i>Calotropis gigantea</i>



Gambar 2.2 Tanaman widuri (*Calotropis gigantea*) (Ditjenbun, 2010)

2.2.3 Manfaat Farmakologi

Khasiat tanaman widuri antara lain, kulit akar widuri berkhasiat sebagai kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alternatif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu widuri berkhasiat sebagai obat muntah (emetik), bunga sebagai tonik dan penambah nafsu makan (stomakik). Daunnya berkhasiat *rubifasien* dan menghilangkan gatal (Dalimartha, 2003), sebagai antipiretik, antioksidan, analgesik, hepatoprotektif, antimikroba, antimalaria dan antikanker (Ahmed *et al.*, 2005). Secara tradisional daun widuri juga digunakan sebagai obat untuk penyakit paralisis, pembengkakan, demam, gigitan ular beracun, cacingan dan bisul (Kumar *et al.*, 2011). Selain itu, family *Apocynaceae* juga digunakan untuk mengobati kanker dan TBC (Suffredini *et al.*, 2002).

Hasil penelitian Singh *et al.* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70 % daun widuri memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH. Dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 µg/ml menunjukkan hambatan DPPH berturut-turut yaitu 52,74 %; 59,15 %; 63,25 %; 68,54 % dan 71,38 %. Sedangkan aktivitas hambatan terhadap Nitrit oksida sebesar 54,55 % pada konsentrasi 100 µg/ml. Selain itu, penelitian aktivitas antioksidan terhadap DPPH juga dilakukan Urmi *et al.* (2012) yang menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun widuri memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi yaitu dengan nilai IC_{50} 0,97 µg/ml daripada ekstrak metanol akar widuri. Dan hasil BSLT menunjukkan bahwa semua fraksi widuri memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai LC_{50} antara 0,56 sampai 2,42 µg/ml. Aktivitas tertinggi adalah ekstrak metanol akar widuri dengan

nilai LC_{50} 0,56 $\mu\text{g/ml}$ diikuti fraksi etil asetat akar widuri (LC_{50} 0,95 $\mu\text{g/ml}$) fraksi n-heksana akar widuri (LC_{50} 1,36 $\mu\text{g/ml}$), fraksi etil asetat daun widuri, ekstrak metanol daun widuri dan paling rendah fraksi n-heksana daun widuri (LC_{50} 2,42 $\mu\text{g/ml}$).

Hasil uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) memiliki aktivitas antiproliferatif dalam menghambat 6 sel kanker manusia yaitu, MCF-7, MDA-MB-231, Hela, HT-29, SKOV-3 dan HepG2. Aktivitas antiproliferatif ini dimungkinkan karena adanya senyawa golongan tanin, terpenoid dan saponin (Wong *et al.*, 2011). Selain itu, ekstrak kasar bunga widuri juga mempunyai aktivitas antitumor dalam melawan *Ehrlich's ascites carcinoma* (EAC) pada mencit Swiss yang diberikan secara intraperitoneal pada dosis 50, 100 dan 200 mg/Kg BB. Dosis tertinggi adalah yang paling berpotensi sebagai antitumor dibandingkan dengan obat kanker bleomycin (0,3 mg/Kg) (Habib *et al.*, 2010). Ekstrak metanol akar widuri dengan dosis 10 dan 20 mg/Kg dan ekstrak kloroform akar widuri dosis 20 dan 40 mg/Kg juga menunjukkan aktivitas antitumor secara signifikan pada EAC (Habib dan Karim, 2011).

2.2.4 Kandungan Kimia Daun Widuri (*Calotropis gigantea*)

Daun widuri mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat (Dalimartha, 2003). Hasil penelitian Singh *et al.* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70 % daun widuri mengandung karbohidrat, alkaloid, flavonoid, steroid, protein, asam amino dan tanin. Ekstrak ini menunjukkan aktivitas antioksidan. Sedangkan hasil penelitian Yaligar (2010) menunjukkan bahwa kandungan fitokimia ekstrak etanol 80 % daun widuri menunjukkan

adanya alkaloid, *cardiac glycosides*, flavonoid, tanin, triterpenoid, karbohidrat dan saponin.

2.3 Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder Daun Widuri

2.3.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada 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. (Darwis, 2000). Pada penelitian ini menggunakan metode maserasi karena metode perkolasi hanya baik digunakan pada senyawa organik yang mudah larut sedangkan sokletasi dan destilasi uap hanya baik pada senyawa yang tahan panas (Faraouq, 2003).

Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 70 % karena menurut Harborne (1987) untuk ekstraksi serbuk kering jaringan tumbuhan (misalnya dari lembaran herbarium, bila perlu) dapat diekstraksi dengan sedikit etanol 70 % pada suhu kamar selama 8 – 24 jam. Etanol merupakan pelarut golongan alkohol yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder karena memiliki gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat nonpolar. Selain itu Hargono (1986) menyebutkan bahwa etanol dipertimbangkan sebagai pelarut

karena etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur, tidak beracun, netral dan absorpsinya baik. Etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit. Selain itu menurut Faraouq (2003) ekstraksi simplisia tumbuhan untuk tujuan obat herbal terbaik digunakan pelarut etanol. Etanol dapat bercampur dengan air dalam berbagai perbandingan dan mudah dalam penguapan residu yang ada dalam ekstrak. Pelarut metanol, etil asetat atau heksana tidak diperbolehkan karena residu toksik yang dihasilkan. Oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol.

2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prinsip KLT adalah sampel diteteskan pada lapisan tipis kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang berisi fase gerak sehingga sampel tersebut terpisah menjadi komponen-komponennya. Setiap komponen akan bergerak dengan laju tertentu yang dinyatakan dengan faktor retensi (R_f), yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh komponen terhadap jarak yang ditempuh fase gerak (penahanan suatu komponen dalam fase diam). Komponen yang mempunyai afinitas lebih besar terhadap fase akan bergerak lebih cepat daripada komponen yang mempunyai sifat sebaliknya (Gritter *et al.*, 1991). Faktor-faktor yang memengaruhi nilai R_f antara lain struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat penyerap dan aktivitasnya, tebal dan kerataan lapisan penjerap, tingkat kemurnian fase gerak, tingkat kejenuhan uap, jumlah cuplikan yang diinginkan dan suhu (Sastrohamidjojo, 2007).

Sistem KLT meliputi fase gerak (eluen), fase diam (lapisan penjerap) dan deteksi kromatogram. Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel, alumunium dan selulosa (Stahl, 1985). Silika gel adalah penjerap yang sering digunakan karena silika gel mempunyai kekuatan pemisahan yang sangat baik (Nyireddy, 2002). Fase gerak adalah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak dalam fase diam karena adanya gaya kapiler (Stahl, 1985). Fase gerak yang digunakan ini menggunakan eluen terbaik berdasarkan penelitian sebelumnya. Eluen terbaik merupakan jenis eluen yang dapat memisahkan komponen senyawa yang banyak, nodanya bagus tidak berekor dan pemisahan noda-nodanya jelas, sehingga hasil demikian dapat dikatakan sebagai pemisahan senyawa yang baik (Markham, 1988).

Lapisan tipis seperti silika gel ditambahkan indikator fluoresensi untuk membantu penampakan bercak warna pada lapisan yang telah dikembangkan. Indikator fluoresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar, seperti dengan lampu UV. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik berbagai jenis, sinar UV yang mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya adalah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar (Gritter *et al.*, 1991).

Deteksi hasil kromatogram dilakukan di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 atau 366 nm serta dapat dilakukan dengan pereaksi semprot. Pada panjang gelombang UV 366 nm noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya

daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut. 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. Sehingga noda yang tampak pada lampu UV 366 nm terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluoresensi pada lampu UV 366 nm. Sedangkan pada panjang gelombang 254 nm lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi 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 (Sudjadi, 1988).

Kromatografi lapis tipis terdapat harga faktor retensi (R_f). Faktor retensi (R_f) adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Rumus faktor retensi adalah (Sastrohamidjojo, 2007):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik awal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Nilai R_f sangat karakteristik untuk senyawa tertentu pada eluen tertentu. Hal tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel.

2.4 Kanker

Kanker adalah pertumbuhan sel yang tidak normal atau terus menerus dan tak terkendali, dapat merusak jaringan sekitarnya serta dapat menjalar ke tempat jauh dari asalnya yang disebut metastasis. Sel kanker bersifat ganas dan dapat menyebabkan kematian, dapat berasal atau tumbuh dari setiap jenis sel di tubuh manusia (Depkes, 2009).

Perubahan sel-sel kanker dibentuk dari sel-sel normal dalam suatu proses rumit yang disebut transformasi, yang terdiri dari tahap inisiasi dan promosi. Pada tahap inisiasi terjadi suatu perubahan dalam bahan genetik sel, ini disebabkan oleh suatu agen yang disebut karsinogen yang bisa berupa bahan kimia, virus, radiasi atau sinar matahari, tetapi tidak semua sel memiliki kepekaan yang sama terhadap suatu karsinogen. Kelainan genetik dalam sel atau bahan lainnya yang disebut sel promotor, menyebabkan sel rentan terhadap suatu karsinogen. Bahkan gangguan fisik menahun juga bisa membuat sel menjadi lebih peka untuk mengalami suatu keganasan. Pada tahap promosi, suatu sel yang telah mengalami inisiasi akan berubah menjadi ganas. Sel yang belum melewati tahap inisiasi tidak akan terpengaruh promosi (Cotran *et al.*, 1994).

2.4.1 Penyebab Kanker

Mutasi gen pada organisme terjadi akibat adanya faktor yang menyebabkan kerusakan gen:

1. Konstitusi Genetika

Konstitusi genetika berupa kerusakan struktur dan atau kerusakan fungsi dan sistem kerja. Kerusakan fungsi dan sistem kerja yang menentukan

kemampuan tubuh untuk memperbaiki kerusakan gen dalam kromosom, menetralkan karsinogen yang masuk ke dalam tubuh, menjaga imunitas tubuh dan mematikan sel kanker yang baru terbentuk (Robbin, 2007).

2. Karsinogenesis

Zat yang dapat menimbulkan kanker, karsinogen kimiawi seperti basa analog (berpengaruh saat repair DNA), *alkilating agent* (penambahan alkil pada nukleotida sehingga merubah ekspresi DNA), *hidroksilating agent* (menghidroksilasi DNA), *deaminating agent* (pengurangan gugus amin) dan *intercalating agent* (agent yang menyela urutan DNA) (Underwood, 2000).

3. Sinar Ionisasi

Hanya Ultraviolet B (UVB) yang bersifat karsinogen. UVA mempunyai panjang gelombang pendek, tidak menembus kulit. UVC punya daya tembus kulit lebih poten dan lebih bersifat mutagen dibandingkan UVB, tetapi UVC sudah diblok oleh atmosfer (Underwood, 2000).

4. Infeksi Virus

Protein DNA virus setelah menembus membran sel mengadakan fusi dengan protein DNA hospes menimbulkan mutasi gen. Manifestasi timbulnya kanker tergantung sistem imunitas tubuh dan mekanisme penghindaran virus (Robbin, 2007).

5. ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Oksigen dapat menjadi *toxic mutagenic gas* yang dikenal sebagai ROS yang bersifat reaktif. Senyawa ini dikelompokkan menjadi dua, yaitu senyawa oksigen reaktif yang bersifat radikal seperti radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil

(OH), radikal peroksil (RO_2) dan senyawa oksigen reaktif yang bersifat nonradikal seperti H_2O_2 , asam hipoklorat (HOCl) dan ozon (O_3). ROS dapat membentuk radikal hidroksil (OH) yang dapat memutus rantai DNA atau menimbulkan perubahan susunan nukleotida pada DNA yang dikenal sebagai mutasi. Hal ini dapat memicu terjadinya perubahan perilaku sel (keganasan) (Sudiana, 2008).

2.4.2 Tahapan Pembentukan Sel Kanker

Beberapa konsep dasar tentang mekanisme terjadinya kanker telah banyak diajukan. Di antaranya adalah teori *promotion and initiation*. Sel-sel kanker dibentuk dari sel-sel normal dalam suatu proses kompleks yang disebut transformasi, yang terdiri dari tahap inisiasi dan promosi. Teori promosi-inisiasi menyatakan bahwa langkah pertama karsinogenesis adalah mutasi menetap dari DNA sel selama transkripsi DNA (Junaidi, 2007).

a. Fase Inisiasi

Pada tahap inisiasi suatu perubahan dalam bahan genetik sel yang memancing sel menjadi ganas. Perubahan dalam bahan genetik sel ini disebabkan oleh suatu agen yang disebut karsinogen, yang bisa berupa bahan kimia, virus, radiasi (penyinaran) atau sinar matahari. Tetapi tidak semua sel memiliki kepekaan yang sama terhadap suatu karsinogen. Kelainan genetik dalam sel atau bahan lainnya yang disebut promotor, menyebabkan sel lebih rentan terhadap suatu karsinogen. Bahkan gangguan fisik menahun pun bisa membuat sel menjadi lebih peka untuk mengalami suatu keganasan. Pada tahap inisiasi, sel normal yang

terpapaj karsinogen ada 3 hal yang akan terjadi yaitu *Repair DNA* (menjadi normal kembali), sel mati atau menjadi mutasi (Singletary *et al.*,1998).

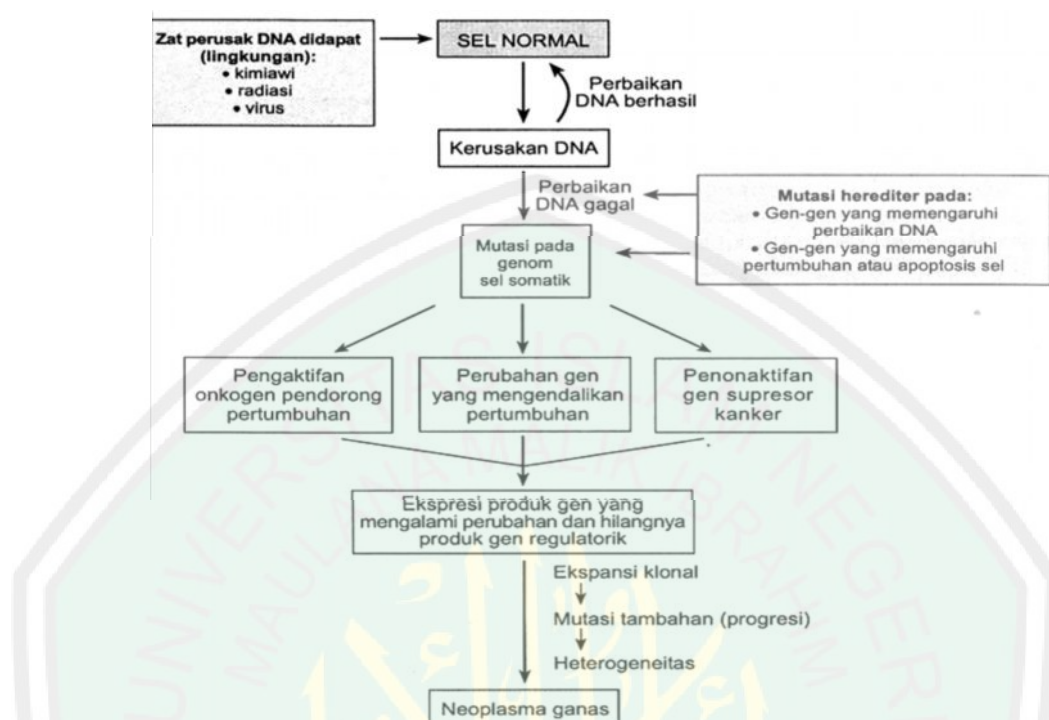
b. Fase Promosi

Pada tahap promosi, suatu sel yang telah mengalami inisiasi akan berubah menjadi ganas. Sel yang belum melewati tahap inisiasi tidak akan terpengaruh oleh promosi. Karena itu diperlukan beberapa faktor untuk terjadinya keganasan (gabungan dari sel yang peka dan suatu karsinogen).

2.4.3 Jenis Kanker

Jenis kanker dapat dikelompokkan menjadi kategori yang lebih besar. Kategori utama dari kanker adalah (*National Cancer Institute*, 2010) :

1. Karsinoma, yaitu kanker yang dimulai dari jaringan kulit atau di dalam jaringan yang berbaris maupun menutupi organ dalam.
2. Sarkoma, yaitu kanker yang dimulai pada tulang, kartilago, lemak, otot, pembuluh darah maupun jaringan penghubung atau pendukung lainnya.
3. Leukimia, yaitu kanker yang dimulai pada jaringan pembentuk darah seperti sumsum tulang dan meyebabkan jumlah produksi sel darah abnormal meningkat dalam jumlah besar dan memasuki sistem sirkulasi darah.
4. Limfoma dan myeloma, yaitu kanker yang terjadi pada sel yang termasuk dalam sistem imun atau kekebalan tubuh.
5. Kanker pada sistem saraf pusat, yaitu kanker yang dimulai pada jaringan otak dan tulang belakang.



Gambar 2.3 Skema mekanisme perubahan *malagnasi*/keganasan pada sel normal (Robbins, 2007)

2.5 Fibrosarkoma

Fibrosarkoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari sel mesenkim, dimana secara histologi sel yang dominan adalah sel fibroblas. Derivatif sel mesenkim, fibroblas, ditemukan di seluruh tubuh dan sel-sel ini bertanggung jawab untuk memproduksi kolagen. Fibroblas juga mensintesis glikoaminoglikan, glikoprotein dan serat *reticular* serta elastis. Pembelahan sel yang tidak terkontrol dapat menginvasi jaringan lokal serta dapat bermetastase jauh ke bagian tubuh lain (Krygjer dan Lewis, 2009).

Gejala pada fibrosarkoma pada awal mulanya sering tidak tampak atau tanpa dirasakan adanya nyeri. Biasanya tumor baru tampak setelah timbul gejala

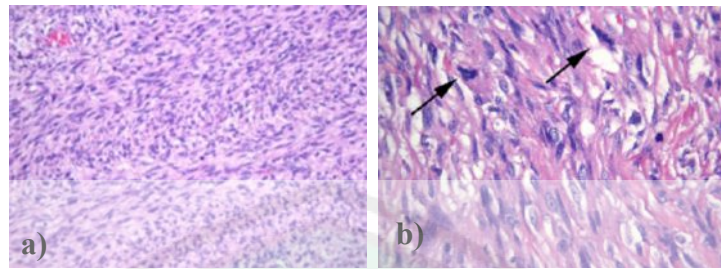
dan teraba suatu benjolan. Pada lesi yang besar terjadi peregangan pada kulit dan nampak mengkilat berwarna keunguan. Pada massa yang sangat besar terjadi pelebaran pembuluh darah vena (Sriwibowo, 2005).

Penderita kanker sering mengalami kaheksi, yaitu suatu sindrom yang ditandai dengan gejala klinis berupa anoreksi (hilang nafsu makan), perubahan ambang rasa acap, penurunan berat badan, anemia, gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Kaheksi merupakan akibat dari kanker, baik lokal maupun sistemis, juga merupakan komplikasi dari obat anti kanker. Anoreksi muncul karena sel kanker menimbulkan zat metabolit, rasa cepat kenyang, perubahan rasa kecap dan stres psikologis. Anoreksia menjadi faktor utama terjadinya penurunan berat badan, namun penderita kanker yang mendapat asupan makanan juga bisa mengalami penurunan berat badan atau hipermetabolisme (Maharani, 2009).

Fibrosarkoma dapat dikenali sebagai massa infiltrasi besar, lunak, putih kelabu mutiara. Pada transeksi, tumor tampak sebagai daging ikan segar yang khas. Area nekrosis atau perdarahan sering terdapat pada tumor ini, yang mencerminkan kecepatan tumbuh di luar kemampuan pembekalan darah. Secara histologi, lesi menunjukkan berbagai derajat anaplasia. Beberapa fibrosarkoma berdiferensiasi baik ditandai oleh fibroblas yang tampak matur dengan beberapa mitosis dan beberapa pleomorfi ringan sel-selnya (Robbins dan Kumar, 1995). Selain itu gambaran secara makroskopis mempunyai ciri-ciri fenotip dengan pertumbuhan yang berlebih, invasi lokal dan mempunyai kemampuan penyebaran yang jauh. Sifat-sifat seperti ini ditemukan saat tahap-tahap penampilan suatu

fenomena yang disebut progresif tumor. 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 (*pleomorphism*), inti sel membesar, kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi, dan basofilik. Anak inti tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis. Bentuk inti bermacam-macam dan kromosomnya aneuploid. Pada sitoplasma terdapat vakuola, bentuk sitoplasma bermacam-macam dan bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi peningkatan pengikatan warna. Dapat pula ditemukan basofil, susunan sel yang tidak teratur dan kadang-kadang tidak dapat dikenali, bentuk selnya bermacam-macam dan kadar enzim selnya sering mengalami penurunan (Cotran *et al.*, 1999).

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).

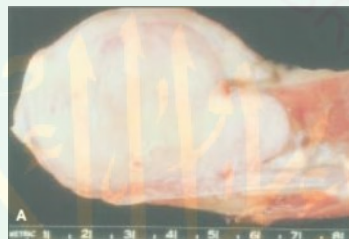


Gambar 2.4 *Grade* fibrosarkoma a) Fibrosarkoma tingkat rendah. Penebalan proliferasi seluler pada sel *spindle* dengan pola pertumbuhan seperti kerangka haring, b) Fibrosarkoma tingkat tinggi. Sel tidak teratur dengan pola pertumbuhan yang tidak jelas. Ketidakteraturan mitosis ditunjukkan dengan anak 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 (Medicastore, 2012). 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).

2.5.1 Perbedaan Sel Fibrosarkoma dan Sel Fibroblas

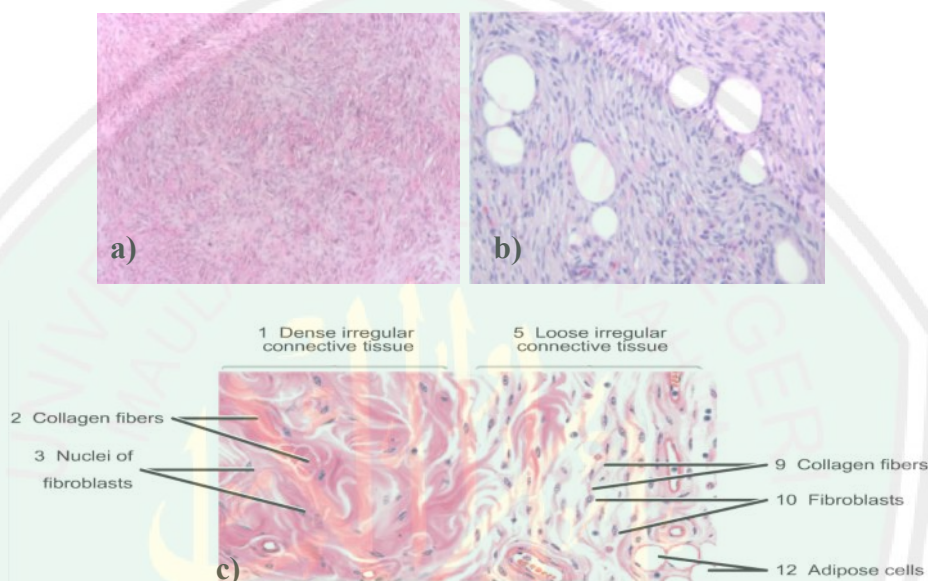
Secara makroskopik ciri-ciri fibrosarkoma adalah lunak, berwarna putih kelabu mutiara, tumor tampak sebagai daging ikan segar yang khas (Robbins dan Kumar, 1995), pertumbuhan yang berlebih, invasi lokal (Cotran *et al.*, 1999), dan mirip dengan tumor desmoid, dimana secara lokal agresif tetapi tidak bermetastasis (Bakotic, 2006).



Gambar 2.5 Fibrosarkoma dari jaringan lunak yang menyerang tulang paha (Mankin dan Francis, 2005)

Secara mikroskopik ciri-ciri fibrosarkoma adalah fibroblas yang tampak matur dengan beberapa mitosis dan beberapa pleomorfi ringan sel-selnya (Robbins dan Kumar, 1995), susunan sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (*pleomorphism*), inti sel membesar, kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi, dan basofilik. Anak inti tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis. Bentuk inti bermacam-macam dan kromosomnya aneuploid. Pada sitoplasma terdapat vakuola, bentuk sitoplasma bermacam-macam dan bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi peningkatan pengikatan warna. Dapat pula ditemukan basofil, susunan sel yang tidak teratur

dan kadang-kadang tidak dapat dikenali, bentuk selnya bermacam-macam dan kadar enzim selnya sering mengalami penurunan (Cotran *et al.*, 1999).

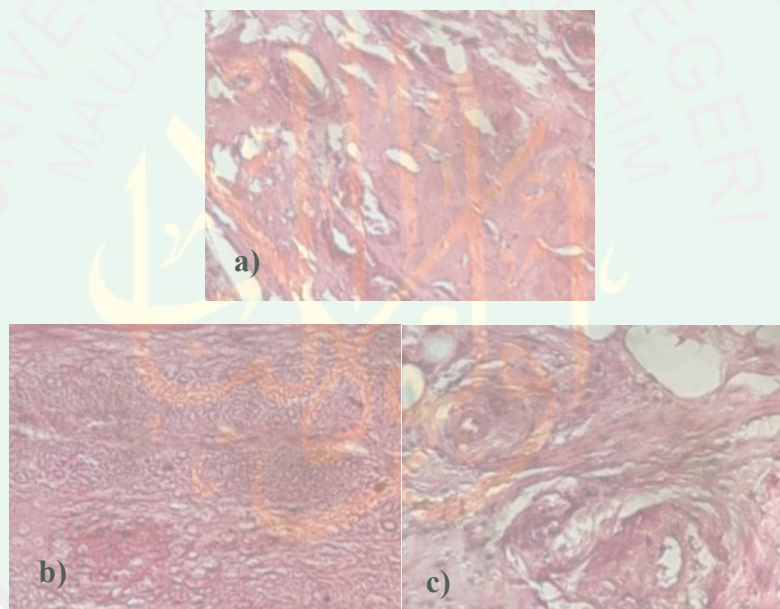


Gambar 2.6 a) Fibrosarkoma tingkat rendah. Sel yang tidak teratur, ukuran bermacam-macam (*pleomorphic*), *giant cell*, *multinucleated*, banyak mitosis yang tak beraturan dan produksi kolagen berkurang (Danciu *et al.*, 2009) b) Fibrosarkoma pada kulit. Sel spindle ganas menyebar masuk ke lemak subkutan (Bakotic, 2006), c) Pada jaringan ikat padat, fibroblas sering ditemukan memadati serat kolagen. Pada jaringan ikat longgar, serat kolagen kurang padat dan fibroblas lebih tampak (Eroschenko, 2000).

Fibroblas sehat biasanya tersebar sepanjang berkas serat kolagen dan tampak dalam sediaan sebagai sel fusiform dengan ujung-ujung meruncing (Fawcett, 2002), memiliki inti berbentuk lonjong panjang mengandung satu atau dua nukleoli. Sel-sel muda lebih basofil dan mempunyai lebih banyak sitoplasma. Bentuk selnya bervariasi tergantung dari banyaknya ruang yang tersedia baginya. Jika dilihat dari samping nukleus fibroblas berbentuk spul dan lebih mudah terlihat (Bevelander, 1988).

2.5.2 Hasil Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan dengan menginduksikan DMBA pada tengkuk mencit jantan selama 6 minggu. Kemudian mencit dibiarkan selama 3 minggu kemudian diambil jaringan tumor lalu dilakukan pemeriksaan histologi. Hasil uji pendahuluan dianalisis secara definitif berdasarkan perubahan gambaran mikroskopis sediaan histologi.



Gambar 2.7 Gambaran histologi menggunakan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dengan perbesaran 400x : a) Jaringan pada tengkuk mencit normal, b) dan c) Jaringan tumor pada mencit yang diinduksi DMBA.

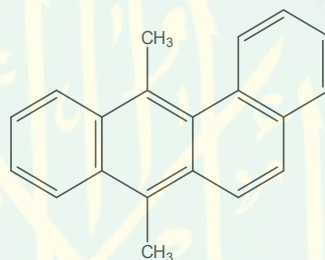
Berdasarkan gambaran histologi pada mencit yang telah diinduksi DMBA, seperti ditunjukkan pada Gambar 2.7 b) dan c), diduga bahwa mencit tersebut menderita fibrosarkoma. Hasil histologi tersebut menunjukkan perkembangan kanker fibrosarkoma dengan ciri-ciri susunan sel yang tidak teratur, selularitas padat, terdapat banyak sel dan ukuran yang berbeda (*pleomorphism*), kasar, tidak

rata dan inti sel membesar (Cotran *et al.*, 1999). Sedangkan jaringan pada mencit normal adalah rata dan tidak terjadi perbesaran inti sel. Hal ini diperkuat oleh penelitian Mitelman dan Levan (1972) yang menyatakan bahwa secara histologi fibrosarkoma dengan berbagai tingkat diferensiasi, berkembang ketika DMBA diinjeksikan secara subkutan. Gambar b) diduga adalah fibrosarkoma tingkat rendah yang ditunjukkan dengan penebalan proliferasi seluler pada sel *spindle* dengan pola pertumbuhan seperti kerangka haring (Bakotic, 2006) yang terjadi pada jaringan ikat longgar dimana serat kolagen kurang padat dan fibroblas lebih tampak (Eroschenko, 2000). Sedangkan Gambar c) diduga adalah fibrosarkoma tingkat tinggi yang ditunjukkan dengan ketidakteraturan sel dengan pola pertumbuhan yang tidak jelas dan ketidakteraturan mitosis (Bakotic, 2006) yang terjadi pada jaringan ikat padat dimana fibroblas sering ditemukan memadati serat kolagen (Eroschenko, 2000).

2.6 Induksi Kanker dengan Menggunakan Senyawa 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA)

Pada hewan coba mencit, karsinogen yang sering digunakan untuk menginduksi kanker adalah DMBA. DMBA dapat menginduksi beberapa tipe kanker yang berbeda. Misalnya, papiloma dan karsinoma sel *squamous* meningkat ketika DMBA diinduksikan ke kulit (Quintanilla *et al.*, 1986). Leukimia terjadi ketika DMBA diinjeksikan secara intravena (Osaka *et al.*, 1997) dan secara oral dapat menyebabkan kanker payudara (Russo dan Russo, 1996). Fibrosarkoma dengan berbagai tingkat diferensiasi, berkembang ketika DMBA diinjeksikan secara subkutan (Mitelman dan Levan, 1972).

Senyawa DMBA merupakan suatu karsinogen dengan rumus empiris $C_{20}H_{16}$, berat molekul 256.34 g/mol, dan titik leleh 122 – 123 °C. Warna bubuk hidrokarbon poliaromatik (*polyaromatic hydrocarbon* disingkat PAH) ini adalah kuning hingga kuning agak kecokelatan dengan sedikit kandungan warna hijau. Senyawa ini dalam metabolisme hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom p-450 untuk membentuk ikatan kovalen dengan DNA pada sel yang aktif membelah sehingga menyebabkan DNA *adduct* (Sigma-Aldrich, 2007).



Gambar 2.8 Struktur senyawa 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena

Metabolit aktif dari DMBA adalah DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxides* yang mampu membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa *epoxide* tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksoguanosin (dG) pada DNA. Interaksi ini (DNA *adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan inisiasi kanker (Hakkak *et al.*, 2005).

2.7 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, limfositik, 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), menyebabkan reaksi dermatologi (tanpa tergantung dosis), kegagalan ginjal dan 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).

2.8 Mencit (*Mus musculus*)

Pertimbangan dalam memilih hewan coba pada awalnya hanya berdasarkan avabilitas, harga, dan kemudahan dalam perawatan. Namun seiring perkembangan zaman tipe metabolisme, farmakokinetik dan perbandingan catatan atau sejarah avabilitas juga ikut dipertimbangkan. Hewan yang sering dipakai adalah mencit dengan mempertimbangkan faktor ukuran, kemudahan perawatan, harga dan hasil yang cukup konsisten dan relevan (Jacobson dan Keller, 2006). Mencit secara umum dapat digunakan sebagai pengganti dari subjek diinginkan, sebagai model dalam penelitian biomedis, sebagai instrumen untuk mengukur suatu besaran kualitas atau kuantitas biologis (uji biologi), dan sebagai penghasil produk-produk biologi (Setijono, 1985).

Klasifikasi mencit adalah sebagai berikut (Astuti, 2007):

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

Data biologis mencit di laboratorium seperti tertera pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Data biologis mencit di laboratorium (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)

Lama hidup	1 – 2 tahun, bisa sampai 3 tahun
Lama bunting	19 – 21 hari
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu (jantan dan betina)
Berat dewasa	20 – 40 gr jantan; 18 – 35 gr betina
Berat lahir	0,5 – 0,1 gram
Jumlah anak	Rata-rata 6 bisa 15
Suhu (rektal)	36 – 39°C (rata-rata 37,9°C)
Volume darah	75 – 80 ml/kg
Sel darah merah	7,7 – 12,5x10 ³ /mm ³
Sel darah putih	6,0 – 12,6x10 ³ /mm ³
Trombosit	150 – 400x10 ³ /mm ³
Hb	13 – 16/100ml
Kecepatan tumbuh	1gr/hari

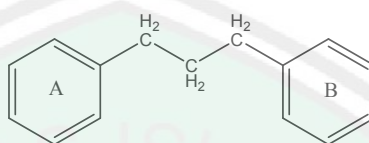
2.9 Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Antikanker

Beberapa senyawa metabolit sekunder telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan kanker, diantaranya flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid (Lisdawati *et al*, 2006) dan saponin (Wong *et al.*, 2011).

2.9.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆ yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai C₃. Sesuai struktur

kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995).



Gambar 2.9 Struktur inti senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988). Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70 % yang bersifat lebih polar.

Pemisahan dengan KLT dikenal fase gerak yang paling populer adalah butanol-asam asetat-air (4 : 1 : 5). Pelarut yang bersifat basa cenderung menguraikan flavonoid, sedangkan pelarut asam dapat menyebabkan asilasi bagian gula sehingga menimbulkan bercak jadian. Beberapa senyawa (flavonol, kalkon) akan berfluorosensi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm sedangkan senyawa lain (glikosida flavonol, antosianin, flavon) menyerap

sinar dan tampak sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluorosensi. Glikosida flavon dan flavonol berfluorosensi kuning, flavonol kelihatan kuning pucat, katekin biru pucat. Selanjutnya di bawah sinar cahaya biasa sambil diuapi uap amoniak flavon kelihatan kuning, antosianin kelabu – biru, kalkon dan aouron merah jingga (Robinson, 1995).

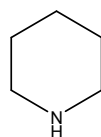
Penelitian yang telah dilakukan Purwaningsih (2003) diperoleh eluen terbaik untuk memisahkan flavonoid dari biji kacang tunggak (*Virga unguiculata* (L.) Walp.) yaitu butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5), kemudian diperiksa di bawah lampu UV akan berwarna biru dan dengan diuapi uap amoniak akan berwarna biru kehijauan dengan 8 noda dengan R_f antara 0,14 – 0,94. Penelitian Akbar (2010) diperoleh eluen terbaik untuk memisahkan senyawa golongan flavonoid dari daun Dandang Gendis menggunakan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), dimana menunjukkan 4 noda dibawah lampu UV 254 nm. Kemudian penelitian yang telah dilakukan Fitriyani (2011) menggunakan eluen kloroform : metanol : air (9,7 : 0,2 : 0,1) didapatkan 2 bercak noda kuning pucat setelah disemprot dengan penampak noda uap amoniak pada nilai R_f 0,5. Selain beberapa eluen di atas identifikasi flavonoid juga dapat menggunakan campuran eluen dari kloroform : etil asetat (60 : 40) dimana dengan penampak noda uap amonia didapatkan noda berwarna kuning (R_f 0,34) dan noda kuning muda (R_f 0,51) (Wonohadi *et al.*, 2006).

Flavonoid, polifenol dan tanin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugus -OH yang terikat pada karbon cincin aromatik. Flavonoid

berfungsi sebagai antioksidan yang efektif dengan memberikan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga terbentuk produk radikal bebas sendiri pada senyawa ini. Produk radikal bebas senyawa-senyawa ini terstabilkan secara resonansi akibat adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan oleh karena itu tidak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain (Fessenden dan Fessenden, 1982). Aktivitas antioksidan ini bekerja inergis dengan antikanker sehingga senyawa-senyawa ini dapat berperan sebagai antikanker.

2.9.2 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung nitrogen yang sering kali terdapat dalam cincin heterosiklik, tetapi ada yang terdapat dalam struktur alifatiknya, bersifat basa (Achmad, 1986). Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya, misalnya piridina, piperidina, indol, isokuinolina dan tropana. Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa organik dan sering ditangani di laboratorium sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat (Robinson, 1995).

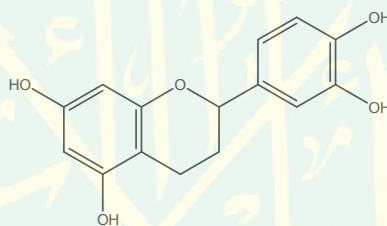


Gambar 2.10 Contoh struktur senyawa golongan alkaloid piperidina (Robinson, 1995)

Pemisahan alkaloid dengan KLT dilakukan oleh Hayati *et al.*, (2012) dari ekstrak etil asetat tanaman Anting-anting diperoleh eluen terbaik yaitu campuran metanol : kloroform (0,5 : 9,5) dengan pereaksi Dragendorff. Hasil pemisahan tersebut dapat menghasilkan 5 noda dengan R_f 0,27 berwarna ungu kecoklatan; 0,32 pink keunguan; 0,58 ungu kecoklatan tengah hijau; 0,78 jingga kecoklatan dan 0,87 jingga kecoklatan tua setelah diberi sinar UV. Penelitian lain yang dilakukan oleh Marlina (2007) diperoleh eluen campuran dari etil asetat : metanol : air (6 : 4 : 2) dapat memberikan noda berwarna coklat pada nilai R_f 0,80 setelah plat KLT disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Selain itu penelitian Ekasari *et al.*, (2005) pada fraksi V daun *Cassia slamea* menggunakan eluen kloroform : etanol (9 : 1), dengan penampak noda Dragendorff memberikan jingga dengan nilai R_f 0,36 dan 0,58. Suryanti *et al.*, (2005) melakukan identifikasi alkaloid dengan KLT adalah metanol : NH_4OH pekat (200 : 3) yang mana pada penampak noda dengan UV 254 nm terdeteksi dengan noda berwarna merah dengan R_f -nya 0,89 dan dengan penampak noda UV 366 nm terdeteksi noda berwarna hijau kekuningan pada R_f 0,89. Pemisahan alkaloid dengan menggunakan KLT juga dilakukan Arifin *et al.*, (2006) menggunakan campuran pelarut etil asetat : metanol : air (100 : 13,5 : 10) didapatkan noda pada R_f 0,83 yang berwarna jingga ketika disemprot dengan penampak noda Dragendorff. Pereaksi yang paling umum digunakan untuk menyemprot kromatogram adalah pereaksi Dragendorf (Robinson, 1995).

2.9.3 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang terdapat pada daun, buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekin dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Robinson, 1995).



Gambar 2.11 Contoh struktur senyawa tanin (Robinson, 1995)

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk identifikasi tanin dengan kromatografi lapis tipis. Pelarut yang dapat digunakan untuk mendeteksi campuran tanin terkondensasi adalah butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5), diikuti dengan asam asetat 6 % yang mana merupakan pelarut yang cukup baik. Bercak noda diperiksa dengan lampu UV lalu disemprot dengan penyemprot FeCl_3 menghasilkan warna lembayung (Harborne, 1987). Hal ini juga dilakukan oleh Sriwahyuni (2010) dalam pemisahan senyawa tanin pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting dengan menggunakan eluen butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5) yang diperoleh 2 noda pada R_f 0,61 dan 0,8 dengan warna hijau kekuningan dan tidak berwarna setelah disemprot FeCl_3 kemudian berwarna warna ungu

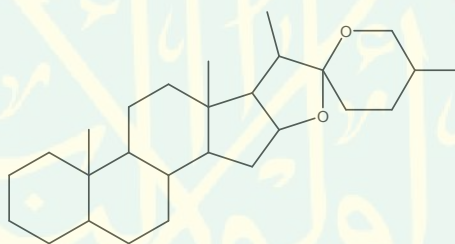
kehitaman dan ungu setelah disinari UV 366. Selain itu penelitian yang telah dilakukan oleh Hayati *et al.*, (2010) menggunakan eluen butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) diperoleh noda yang diduga tanin pada R_f 0,61 yang berwarna lembayung saat disinari lampu UV 366 nm. Kemudian dalam penelitian Yulia (2006) untuk identifikasi senyawa tanin pada teh varietas *Assamica* klon Gambung menggunakan eluen butanol : asam asetat : air (2 : 0,5 : 1,5) menghasilkan noda pada panjang gelombang 254 nm berupa bercak lembayung. Penelitian lain dilakukan Fitriyani (2011) menggunakan eluen kloroform : metanol : air (7 : 3 : 0,4) menghasilkan noda pada R_f 0,2 yang berwarna hitam setelah diberi penampak noda $FeCl_3$. Identifikasi lain yang menyatakan positif tanin dengan KLT adalah menggunakan campuran eluen asam asetat glasial : air : HCl pekat (forestal) (30 : 10 : 3) dengan pereaksi $FeCl_3$ menghasilkan noda pada R_f 0,4 dan 0,489 dengan warna ungu kehitaman dan ungu setelah noda disinari UV (Hayati *et al.*, 2012).

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang bersifat antioksidan. Seperti kandungan tanin yang tinggi dalam teh diketahui menjadi antikarsinogenik dan antimutagenik yang dapat dihubungkan dengan sifat oksidatifnya dalam melindungi kerusakan oksidatif sel melawan peroksida lemak dan radikal superoksida (Wong *et al.*, 2011).

2.9.4 Saponin

Saponin berasal dari bahasa latin *sapo* yang berarti sabun, karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi yang rendah

sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin dalam larutan yang sangat encer dapat sebagai racun ikan, selain itu saponin juga berpotensi sebagai antimikroba dan dapat digunakan sebagai bahan baku sintesis hormon steroid. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam asam atau menggunakan enzim (Robinson, 1995).



Gambar 2.12 Struktur inti saponin (steroid spiroketal) (Robinson, 1995)

Pemisahan saponin dengan KLT dapat dilakukan menggunakan larutan pengembang butanol yang dijenuhkan dengan air atau kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2) (Harborne, 1987). Selain itu hasil penelitian Kristianingsih (2005) diperoleh pengembang terbaik pada KLT untuk senyawa saponin dari akar tanaman kedondong laut adalah kloroform : metanol : air (20 : 60 : 10) yang menghasilkan 3 noda berwarna ungu dengan Rf antara 0,55 – 0,73 dan menimbulkan warna ungu sampai ungu gelap ketika ditambah H₂SO₄. Sedangkan penelitian Wonohadi *et al* (2006) menggunakan campuran eluen dari kloroform : metanol : air (64 : 50 : 10) memberikan hasil dengan penampakan noda berwarna

biru dengan R_f 0,17 ketika disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard. Identifikasi saponin menggunakan KLT lainnya juga dilakukan oleh Suryanti (2005) dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1) menghasilkan noda berwarna merah jambu pada pengamatan sinar tampak dengan nilai R_f 0,77 dan noda berwarna kuning pada UV 366 nm dengan nilai R_f 0,77. Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Windriyati *et al* (2011) menggunakan eluen dari kloroform : metanol (95 : 5) dapat memisahkan senyawa saponin dengan menghasilkan noda berwarna biru oleh reagen Lieberman-Burchard pada nilai R_f 0,65.

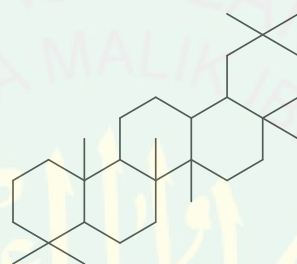
Saponin dapat mempengaruhi sistem imun dengan cara membantu melindungi tubuh manusia melawan kanker dan juga menurunkan kadar kolesterol. Saponin dapat menurunkan lipid darah, menurunkan resiko kanker dan menurunkan reaksi glukosa darah (Wong *et al.*, 2011).

2.9.5 Terpenoid

Kata terpenoid mencakup sejumlah besar senyawa tumbuhan, dan istilah ini digunakan untuk menunjukkan bahwa secara biosintesis terpenoid diperoleh dari molekul isoprena, yaitu senyawa yang memang terdapat sebagai bahan alam (Wahyuono, 2003). Terpenoid terdiri dari beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpena dan seskuiterpena yang mudah menguap, diterpena yang lebih sukar menguap, sampai kesenyawa yang tidak menguap yaitu triterpenoid dan sterol serta karotenoid (Wahyuono, 2003).

Perbandingan banyaknya atom karbon dan atom hidrogen dalam terpen adalah 5 : 8. Terpen tersusun dari senyawa-senyawa yang mengandung gabungan kepala ke ekor dari satuan kerangka isoprene (kepala adalah ujung yang terdekat

ke cabang metil). Untuk menekankan hubungan dengan isoprene ini maka terpen juga disebut isoprenoid. Terpen mengandung 2,3 atau lebih satuan isopren. Secara umum terpenoid terdiri dari unsur-unsur C dan H dengan rumus molekul umum $(C_5H_8)_n$ (Wahyuono, 2003).



Gambar 2.13 Struktur cincin umum triterpenoid (oleanana) (Robinson, 1995)

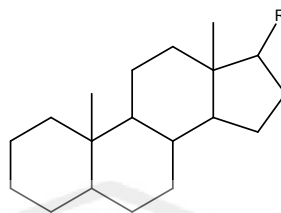
Terpenoid dapat dipisahkan dengan KLT memakai fase gerak seperti heksana : etil asetat (1 : 1) dan kloroform : metanol (10 : 1) dengan pereaksi antimon klorida dalam kloroform. Pereaksi Lieberman-burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi terpenoid menghasilkan warna violet (Harborne, 1987). Identifikasi terpenoid dengan KLT juga dilakukan oleh Listiani *et al* (2005) dari ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L., Liliaceae) dengan eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8). Selain itu pemisahan yang dilakukan Widyowati *et al.*, (2010) diperoleh eluen terbaik dari ekstrak metanol yaitu kloroform : asam asetat (4 : 1) dengan penampak noda anisaldehyd diperoleh warna merah muda – ungu dengan nilai R_f 0,65; 0,73 dan 0,83. Sriwahyuni (2010) menggunakan pengembang benzena : kloroform (3 : 7) dan n-heksana : etil asetat (1 : 1) untuk memisahkan senyawa terpenoid dari tanaman anting-anting.

Diperoleh eluen terbaik n-heksana : etil asetat (1 : 1) yang menunjukkan warna ungu dan merah keunguan dengan reagen penyemprot Lieberman-Burchard. Penelitian Fitriyani (2011) menggunakan eluen toluena : etil asetat (7 : 3) pada ekstrak metanol daun sirih merah menghasilkan tiga noda berwarna ungu dengan R_f 0,375; 0,75 dan 0,875 setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat. Selain itu identifikasi senyawa terpenoid dengan KLT oleh Kartikasari (2010) menggunakan eluen kloroform : aseton (5 : 1) diperoleh nilai R_f 0,7 yang ditandai dengan adanya perubahan warna ungu pada reagen anisaldehyd.

Terpenoid dapat digunakan untuk mengobati kanker dan malaria dan penyakit infeksi yang disebabkan virus dan bakteri (Wang *et al.*, 2005) dan dapat menghambat pertumbuhan atau menginduksi apoptosis sel kanker payudara seperti MCF-7, MDA-MB-231 dan T47D (Rabi dan Bishayee, 2009).

2.9.6 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang bergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Poedjiadi, 1994).



Gambar 2.14 Struktur ini steroid (Poedjiadi, 1994)

Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus -OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolestrol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, 1995).

Pemisahan steroid dengan KLT telah dilakukan oleh Sriwahyuni (2010) dari ekstrak etil asetat tanaman Anting-anting menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3) diperoleh 9 noda dengan R_f antara 0,06 – 0,8 yang menunjukkan steroid. Dimana noda 1,2, dan 8 berwarna hijau kebiruan, noda 4 berwarna hijau, noda 6 berwarna ungu tengahnya berwarna biru kehijauan dan noda 9 berwarna kebiruan muda. Penelitian lain dilakukan oleh Handayani *et al.*, (2008) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3) menunjukkan terbentuknya warna hijau. Dan berwarna biru ungu sampai coklat setelah dideteksi di bawah lampu UV 366 nm (Syamsudin, 2007). Penelitian lain juga dilakukan oleh

Kustiariyah (2006) menyebutkan bahwa pemisahan steroid dengan KLT menggunakan eluen etanol : kloroform (3 : 7) diperoleh 6 noda dengan R_f berturut-turut 0,61; 0,68; 0,71; 0,83; 0,9 dan 0,96. Dimana noda 0,91 dan 0,96 ini menunjukkan steroid (testosteron dan kolestrol). Rao (2010) menggunakan variasi pelarut etil asetat : metanol : air (100 : 13,3 : 10) untuk pemisahan ekstrak petroleum eter, benzena, aseton, kloroform, etanol dan air *Amaranthus tricolor* Linn. terhadap senyawa steroid. Pemisahan tersebut menunjukkan bercak noda pada R_f 0,05 dan 0,04 pada ekstrak petroleum eter dan benzena. Sedangkan Bayyinah (2013) melakukan pemisahan steroid dalam ekstrak diklorometana daun bunga Matahari dengan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1) mendapatkan 5 noda dengan warna merah sampai ungu.

2.9 Uji *One Way* ANOVA

Anova adalah anonim dari analisis varian terjemahan dari *analysis of variance*, sehingga banyak orang menyebutnya dengan anova. Anova merupakan bagian dari metode analisis statistika yang tergolong analisis komparatif (perbandingan) lebih dari dua rata-rata. Tujuan dari uji *One Way* Anova adalah untuk membandingkan lebih dari dua rata-rata. 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*. Apabila data tidak memenuhi normalitas atau distribusi data tidak normal, maka dilakukan uji non-parametrik *Kruskall-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juli 2014 di Laboratorium Kimia Organik dan Bioteknologi Jurusan Kimia, Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Biosistemik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk perlakuan preparasi bahan dan ekstraksi dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, oven, blender, ayakan 60 mesh, neraca analitik, cawan porselen, desikator, kertas saring whatman, *shaker*, penyaring *Buchner*, *rotary evaporator* dan gelas vial.

Alat yang digunakan dalam uji fitokimia dan identifikasi golongan senyawa dengan KLTA adalah gelas beker 100 ml, pipet ukur, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung reaksi, lampu UV, lemari asam, *vortexs*, lampu UV, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, pipa kapiler, cawan petri, pinset, plat tetes dan bejana pengembang.

Alat yang digunakan dalam uji antitumor adalah kandang hewan coba yang terbuat dari bak plastik, kawat, botol minum, tempat makan mencit, gunting, jarum insulin, syringe 1 cc, sonde lambung, jangka sorong, pinset, masker dan sarung tangan.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun widuri (*Calotropis gigantea*) yang diambil dari Pasuruan Jawa Timur. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah etanol 70 %. Bahan yang digunakan dalam uji fitokimia diantaranya adalah reagen Dragendorff, reagen Mayer, reagen FeCl_3 1 %, dan reagen Lieberman-Burchard, HCl pekat, HCl 2 %, metanol 50 %, logam Mg, akuades, larutan FeCl_3 1 %, HCl 1N, kloroform, asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Bahan yang digunakan untuk identifikasi golongan senyawa dengan KLTA diantaranya adalah metanol (p.a), kloroform (p.a), etil asetat(p.a), etanol (p.a), amoniak pekat, butanol (p.a), asam asetat (p.a), akuades, n-heksana (p.a), dan aseton.

Hewan uji yang digunakan untuk uji antitumor adalah mencit (*Mus musculus*) putih jantan galur Balb/C dengan berat badan 20 – 30 g. Induksi tumor dilakukan dengan menggunakan bahan 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) yang dilarutkan dengan aseton. Bahan-bahan lain yang digunakan dalam uji antitumor adalah CMC-Na (*carboxymethylcellulose natrium*), Metotreksat, alkohol 70 %, aquades, serbuk kayu, ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*), pakan mencit dan air.

Bahan-bahan yang digunakan dalam imunohistokimia adalah paraffin, gliserin, kaca *polysine*, etanol p.a bertingkat (100 %, 90 %, 80 %, 70 %), *xylol*, PBST, PBS, H_2O_2 , antibodi primer kaspase-3, antibodi sekunder *Antirabbit IgG* Biotin, SA-HRP (Sterp Avidin – Horseradish Peroxidase) (Daco), DAB substrate

(Amresco), Meyers Hematoxylin (IHC World), air, aquades dan cover glass (Assistant).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di laboratorium. Sampel daun Widuri (*Calotropis gigantea*) dikeringkan kemudian digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh dianalisis kadar airnya kemudian diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70 % sampai diperoleh filtrat yang bening. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian diuji kandungan senyawanya dengan uji fitokimia dan dilanjutkan dengan identifikasi golongan senyawa menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) untuk golongan senyawa yang positif berdasarkan hasil uji fitokimia. Selanjutnya diuji aktivitas antitumor secara *in vivo*.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel.
2. Analisis kadar air.
3. Ekstraksi golongan senyawa dalam daun widuri (*Calotropis gigantea*) dengan cara maserasi.
4. Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder
 - a. Uji fitokimia

- b. Uji penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)
5. Uji antitumor.
6. Imunohistokimia (IHK) Kaspase-3
7. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Sampel daun widuri (*Calotropis gigantea*) dari seluruh bagian daun diambil sebanyak 1,5 Kg kemudian dicuci. Selanjutnya dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 30 – 37 °C selama ± 24 jam. Kemudian daun digiling dengan ukuran serbuk 90 mesh sehingga terbentuk serbuk halus. Selanjutnya serbuk halus yang diperoleh dianalisis kadar airnya.

3.5.2 Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering yang telah dipreparasi. Analisis kadar air ini dilakukan dengan metode Termografi yaitu dengan pemanasan. Cawan dipersiapkan terlebih dahulu dengan dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama ±15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 10 menit. Kemudian cawan ditimbang dan diulangi perlakuan sampai diperoleh berat konstan. Sampel ditimbang sebanyak 5 g selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 15 menit. Sampel kering didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit dan ditimbang

kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong
b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan
c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

Analisis kadar air dilanjutkan dengan sampel kering yang telah dipreparasi. Diharapkan kadar air sampel kering tidak melebihi 10 % untuk menghindari tumbuhnya mikroba dan jamur yang dapat merusak senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam daun widuri (*Calotropis gigantea*) dan tidak mempengaruhi kepolaran pelarut.

3.5.3 Ekstraksi Golongan Senyawa dengan Metode Maserasi

Ekstraksi golongan senyawa aktif dilakukan dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 70 %. Sebanyak 200 g serbuk daun widuri (*Calotropis gigantea*) dimaserasi menggunakan etanol 70 %. Perlakuan maserasi dibagi menjadi dua masing-masing 100 gram serbuk. Lalu diekstraksi dengan perendaman masing-masing menggunakan 250 mL pelarut etanol 70 % selama 24 jam dan pengadukannya dibantu dengan shaker selama 3 jam, kemudian disaring. Diulangi perlakuan pada ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang bening. Filtrat ekstrak kemudian digabungkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut dioven pada suhu 37 °C untuk menghilangkan residu pelarut. Kemudian ekstrak pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk

meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama \pm 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi. Lalu ekstrak pekat diuji fitokimia, dipisahkan golongan senyawa menggunakan KLTA dan diuji aktivitas antitumor secara *in vivo*.

3.5.4 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder

3.5.4.1 Uji Fitokimia dengan Reagen

Uji fitokimia merupakan metode analisis kualitatif yang digunakan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam suatu bahan. Uji ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Indrayani (2006) yaitu meliputi uji flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan terpenoid.

a. Uji Flavonoid

Ekstrak daun Widuri 1 % (b/v) sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1 mL metanol panas 50 %. Selanjutnya ditambahkan sedikit logam Mg dan 4 – 5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

b. Uji Alkaloid

Ekstrak daun Widuri 1 % (b/v) sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2 % dan larutan dibagi dalam tiga tabung. Tabung 1 larutan ditambah 0,5 mL larutan asam encer (HCl 2 %) sebagai pembanding, tabung 2 ditambah 2 – 3 tetes reagen Dragendorff, dan tabung 3 ditambah 2 – 3 tetes reagen Mayer. Jika tabung 2 terbentuk endapan jingga dan pada tabung 3 terbentuk endapan kekuningan menunjukkan adanya alkaloid.

c. Uji Tanin

Ekstrak daun Widuri 1 % (b/v) sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1 – 2 mL air dan ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 , timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol.

d. Uji Saponin

Ekstrak daun Widuri 1 % (b/v) sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit. Apabila timbul busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N dan apabila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin.

e. Uji Terpenoid

Ekstrak daun Widuri 1 % (b/v) sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat lalu ditetesi dengan 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

3.5.4.2 Uji Penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Golongan senyawa yang dipisahkan dengan KLTA adalah golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif pada uji fitokimia menggunakan reagen. Proses identifikasi ini merujuk pada literatur Harbone (1987). Ekstrak pekat daun widuri (*Calotropis gigantea*) sebanyak 1 g diencerkan dalam 1 mL etanol 70 %.

Kemudian, disiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen/fase gerak selama proses pemisahan dilakukan. Kemudian dilakukan penjuhan bejana dengan dimasukkan campuran eluen sebanyak 5 mL ke dalam bejana pengembang dan ditutup bejana pengembang selama 1 jam untuk menjenuhkan uap eluennya.

Pemisahan dengan KLTA dilakukan menggunakan plat silika gel F₂₅₄ berukuran 1x10 cm² yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 105 °C selama 20 menit. Ekstrak etanol daun widuri (*Calotropis gigantea*) yang telah diencerkan dengan etanol 70 % ditotolkan sebanyak 5 – 10 totolan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler. Kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Proses elusi dilakukan setelah bejana pengembang dijenuhkan sehingga proses elusi bisa lebih cepat dan eluen bisa naik secara merata atau serentak. Setelah fase gerak sampai pada garis batas atas (± 1 cm dari tepi atas plat) maka elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian disemprot dengan reagen penampak noda. Selanjutnya di oven pada suhu 60 °C selama 2 menit dan diamati masing-masing hasil nodanya di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm kemudian dihitung nilai R_F-nya.

Adapun fase gerak dan reagen uji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

1. Golongan senyawa flavonoid

Menggunakan fase gerak butanol : asam asetat : air = 4 : 1 : 5 (v/v)

(Purwaningsih, 2003), butanol : asam asetat : air = 3 : 1 : 1 (v/v) (Marliana *et al.*, 2003), kloroform : metanol = 9 : 1 (v/v) (Akbar, 2010), kloroform : metanol : air = 9,7 : 0,2 : 0,1 (v/v) (Fitriyani, 2011) dan kloroform : etil asetat = 6 : 4 (v/v) (Wonohadi *et al.*, 2006) dimana dari semua eluen tersebut menunjukkan perubahan warna menjadi kuning setelah diuapi dengan amoniak dan berwarna biru kehijauan ketika disinari UV 366.

2. Golongan senyawa alkaloid

Menggunakan fase gerak campuran metanol : kloroform = 0,5 : 9,5 (v/v) (Hayati *et al.*, 2012), etil asetat : metanol : air = 6 : 4 : 2 (v/v) (Marlina, 2007), kloroform : etanol = 9 : 1 (v/v) (Ekasari *et al.*, 2005), etil asetat : metanol : air = 100 : 13,5 : 10 (v/v) (Arifin *et al.*, 2006) dan metanol : NH₄OH pekat = 200 : 3 (v/v) (Suryanti *et al.*, 2005) dimana dengan menggunakan pereaksi Dragendroff menunjukkan bercak coklat jingga.

3. Golongan senyawa tanin

Menggunakan fase gerak campuran butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v) (Sriwahyuni, 2010), butanol : asam asetat : air = 4 : 1 : 5 (v/v) (Hayati *et al.*, 2010), butanol : asam asetat : air = 2 : 5 : 1,5 (v/v) (Yulia, 2006), kloroform : metanol : air = 7 : 3 : 0,4 (v/v) (Fitriyani, 2011) dan asam asetat glasial : air : HCl pekat = 30 : 10 : 3 (v/v) (Hayati *et al.*, 2012) yang kemudian disemprot dengan FeCl₃ dan disinari lampu UV 366 menghasilkan warna ungu.

4. Golongan senyawa saponin

Menggunakan fase gerak campuran kloroform : metanol : air = 13 : 7 : 2 (v/v) (Harborne, 1987), kloroform : metanol : air = 20 : 60 : 10 (v/v) yang ketika

ditambahkan H_2SO_4 0,1 M akan menimbulkan warna ungu gelap (Kristianingsih, 2005), kloroform : metanol : air = 64 : 50 : 10 (v/v) (Wonohadi *et al.*, 2006), kloroform : aseton = 4 : 1 (v/v) (Suryanti, 2005) dan kloroform : metanol = 95 : 5 (v/v) yang kemudian dideteksi dengan reagen Lieberman-Burchard akan menghasilkan warna biru (Windriyati *et al.*, 2011).

5. Golongan senyawa triterpenoid

Menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat = 2 : 8 (v/v) (Listiani *et al.*, 2005), toluena : etil asetat = 7 : 3 (v/v) (Fitriyani, 2011) dan n-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v) (Ekasari *et al.*, 2005) dan kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v) (Harborne, 1987) yang mana dengan menggunakan reagen Lieberman-Burchard menunjukkan warna merah muda-ungu ketika disinari lampu UV 366.

6. Golongan senyawa steroid

Menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat = 7 : 3 (v/v) (Sriwahyuni, 2010), etil asetat : metanol : air = 100 : 13,3 : 10 (v/v) (Rao, 2010), etanol : kloroform = 3 : 7 (v/v) (Kustiariyah, 2006), n-butanol : asam asetat : air = 12 : 3 : 5 (v/v) (Murray, 2001) dan n-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v) (Bayyinah, 2013) yang mana dengan menggunakan reagen Lieberman-Burchard menunjukkan warna hijau. Dan berwarna biru, ungu sampai coklat setelah disinari lampu UV 366.

3.5.5 Uji Antitumor

3.5.5.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan galur Balb/C dengan berat badan 20 – 30 g. Sebelum perlakuan, mencit

dipelihara dalam kandang yang diberi alas serbuk kayu dan anyaman kawat sebagai penutup. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum* yaitu tidak dibatasi dan terus menerus sampai mencit berhenti sesuai keinginannya. Mencit diadaptasi selama ± 5 hari.

3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Setelah diadaptasi mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan. Jumlah pengulangan sampel setiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer (Felicia, 2009):

Rumus Federer: $(n-1)(t-1) \geq 15$ dengan $t = \text{jumlah kelompok} = 5$
 $n = \text{jumlah pengulangan tiap sampel}$

$$(n-1)(5-1) \geq 15 \rightarrow 4(n-1) \geq 15 \rightarrow n \geq 4,75 \rightarrow n \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 5 mencit untuk setiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini setiap kelompok perlakuan diletakkan 2 mencit sehingga jumlah seluruh sampel yang digunakan adalah 35 ekor mencit. Selanjutnya dilakukan induksi kanker dengan disuntikkan 0,1 mL DMBA 25 μg /0,1 mL aseton secara subkutan di tengkuk mencit sebanyak dua kali seminggu selama 6 minggu (Manoharan *et al.*, 2010) dan sebelum diinduksi berat badan mencit ditimbang. Kemudian diberikan terapi sesuai dengan kelompok perlakuan secara per oral sebanyak 0,5 mL dengan sonde lambung selama 14 hari. Kelompok perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang diinduksi DMBA dan diberikan CMC-Na 0,5% tanpa terapi ekstrak etanol daun widuri sehari sekali.

- b. Kelompok kontrol positif adalah kelompok yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan obat kanker Metotreksat 2,5 mg/Kg BB seminggu sekali.
- c. Kelompok Dosis 1 adalah kelompok mencit yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak etanol daun widuri dosis 50 mg/Kg BB sekali sehari.
- d. Kelompok Dosis 2 adalah kelompok mencit yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak etanol daun widuri dosis 100 mg/Kg BB sekali sehari.
- e. Kelompok Dosis 3 adalah kelompok mencit yang diinduksi DMBA dan selanjutnya diberikan terapi ekstrak etanol daun widuri dosis 150 mg/Kg BB sekali sehari.

Setelah itu mencit dikorbankan dengan metode euthanasia berdasarkan AVMA *Guidline for the Euthanasia of Animals* (2013) yaitu dengan inhalasi eter atau kloroform. Inhalasi eter atau kloroform dapat mendepresi langsung korteks selebral, struktur subkortikal dan otot jantung yang kemudian menyebabkan hipoksia. Caranya yaitu mencit dimasukkan dalam *chamber* tertutup yang telah berisi kapas yang diberi kloroform. Mencit yang telah dieuthanasia diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan jarum pentul. Kemudian pada daerah timbulnya nodul dicukur bulunya. Selanjutnya dibedah menggunakan gunting dan diambil nodulnya. Nodul yang diambil adalah jaringan yang berwarna putih kelabu mutiara seperti daging ikan segar yang khas (Robbins dan Kumar, 1995). Nodul dicuci dengan PBS hingga bersih dari darah kemudian ditiriskan di atas

kertas saring. Selanjutnya nodul ditempatkan pada cawan petri kering dan ditimbang beratnya menggunakan neraca analitik. Masing-masing berat nodul dicatat kemudian nodul disimpan dalam formalin untuk kemudian dibuat preparat imunohistokimia Kaspase-3.

3.5.5.3 Imunohistokimia Kaspase-3

3.5.5.3.1 Pembuatan Preparat Histologi (Panigoro *et al.*, 2007)

a) Dehidrasi

Dehidrasi adalah pengambilan air dari dalam jaringan secara perlahan-lahan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat. Sampel dimasukkan dalam alkohol 70, 80, 90 dan 95 % masing-masing selama 1 jam. Sampel dimasukkan dalam alkohol absolut (absolut I, II, III) selama 20 menit. Sampel dijernihkan dengan menginkubasi dalam larutan *xylol* I, II dan III masing-masing selama 20 menit. Pada *xylol* III sampel dihangatkan pada suhu paraffin cair. Sampel diinfiltrasi dengan paraffin I, II dan II pada suhu 65 – 70 °C dalam inkubator masing-masing selama 1 jam.

b) Pembuatan blok *embedding*

Embedding adalah proses pembuatan blok jaringan dengan menggunakan paraffin. Disiapkan cetakan yang ukurannya sesuai dengan sampel jaringan. Cetakan diisi dengan paraffin dari larutan *tissue embedding control*. Jaringan dari paraffin III diambil dan dimasukkan pada cetakan dengan posisi bagian yang akan dipotong pada bagian bawah (permukaan bagian dalam cetakan paraffin diberi gliserin untuk mempermudah melepas paraffin). Cetakan didinginkan pada *coldplate* untuk mencegah terjadinya pembekuan paraffin bagian atas dulu.

Cetakan diinkubasi dalam air dingin, setelah paraffin membeku blok paraffin dapat dikeluarkan dari cetakan.

c) Pembuatan irisan preparat pada gelas objek (*Sectioning*)

Blok embedding ditempatkan pada *holder microtom rotary*. Dipasang pisau pemotong dan ditentukan ketebalan sayatan yaitu $\pm 3 \mu\text{m}$. Kemudian dilakukan *trimming* atau penipisan sayatan. Kemudian dilanjutkan dengan penempelan (*afixing*).

d) Penempelan irisan preparat pada gelas objek (*Afixing*)

Sampel sayatan dimasukkan dalam air dingin untuk meregangkan jaringan dan mempermudah afiksasi. Sampel dilekatkan pada gelas objek yang telah dilapisi *polysine* dan disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam agar jaringan benar-benar menempel. Selanjutnya diberikan perwarnaan IHK Kaspase-3.

3.5.5.3.2 Pewarnaan IHK (*Cell Signaling Technology*, 2007)

a) Deparaffinisasi dan rehidrasi

Jaringan pada gelas objek diinkubasi dalam larutan xylol I kemudian xylol II, etanol p.a bertingkat (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) dan terakhir akuades masing-masing selama 3 menit. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan.

b) *Antigen unmasking*

Antigen unmasking bertujuan untuk membuka epitop antigen, sehingga antigen dapat berikatan dengan antibodi. Jaringan diinkubasi dalam larutan 10 mM PBST (buffer natrium sitrat) selama 30 menit suhu ruang. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan.

c) Pewarnaan (*Staining*)

Jaringan pada gelas objek diinkubasi dengan aquades untuk mempermudah proses selanjutnya dan agar jaringan tidak kering. Selanjutnya jaringan diinkubasi dengan larutan 3 % H₂O₂ dengan cara diteteskan melalui pipet tetes tepat di atas jaringan selama 20 menit. Kemudian jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan untuk melarutkan larutan yang telah direaksikan.

Selanjutnya jaringan ditetesi larutan antibodi primer kaspase-3 (1:1000) menggunakan mikropipet dan diinkubasi pada suhu 4 °C (suhu kulkas) selama semalam. Inkubasi bertujuan mengefektifkan reaksi antara antigen yang terdapat pada jaringan dengan antibodi primer (reaksi Ag-Ab). Kemudian jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan.

Selanjutnya jaringan ditetesi larutan antibodi sekunder (1:1000) menggunakan mikropipet diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Inkubasi ini bertujuan untuk mengefektifkan reaksi antara antibodi primer dan antibodi sekunder (reaksi Ag-Ab). Pada penelitian ini antibodi sekunder yang digunakan adalah *Antirabbit* IgG Biotin yang dilabel dengan enzim HRP. Kemudian jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan.

Diinkubasi jaringan dalam larutan SA-HRP (Sterp Avidin – Horseradish Peroxidase) (1:1500) selama 60 menit pada suhu ruang. Kemudian jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit pada suhu ruang sebanyak 3 kali pengulangan.

Diinkubasi jaringan dengan larutan DAB (diaminobenzidin) (1:10) sebagai substrat enzim HRP selama 20 menit pada suhu ruang. Reaksi antara DAB dan enzim HRP menghasilkan warna coklat. Kemudian diinkubasi dengan aquades selama 5 menit pada suhu ruang untuk melarutkan DAB. Setelah itu, jaringan diinkubasi dalam larutan hematoksin (biru/ungu) selama 10 menit pada suhu ruang untuk mewarnai nukleus dan jaringan terkalsifikasi. Selanjutnya jaringan diinkubasi dalam aquades sebanyak 2 kali masing-masing 5 menit. Kemudian dilakukan dehidrasi.

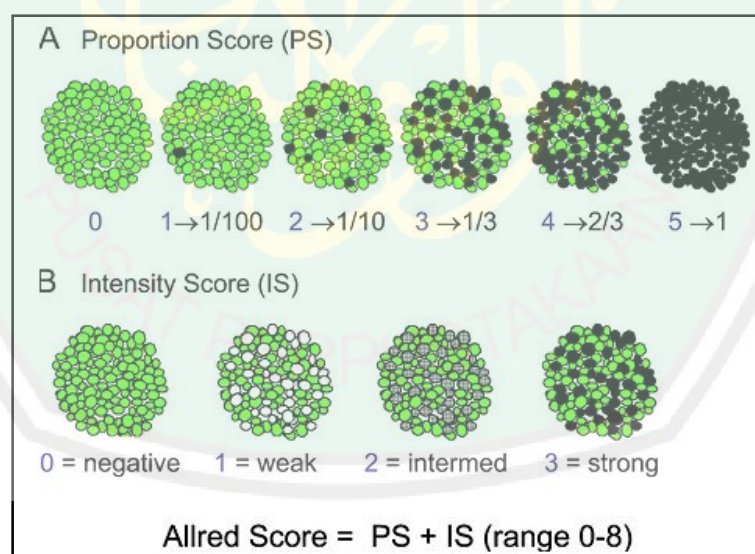
Proses dehidrasi dilakukan dengan inkubasi jaringan dalam larutan etanol p.a 70 %, 80 %, 96 % dan 100 % masing-masing selama 3 menit. Kemudian diinkubasi dalam *xylol* selama 3 menit. Selanjutnya jaringan ditutup dengan media penutup dan gelas penutup. Ditetaskan media penutup pada jaringan sebelum *xylol* menguap. Kemudian diletakkan gelas penutup di atas jaringan dan ditekan perlahan-lahan untuk mengeluarkan gelembung udara. Media penutup akan mengeras sehingga gelas objek dapat disimpan pada kotak preparat. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan diambil gambar menggunakan mikroskop sebanyak 10 lapang pandang.

Selanjutnya ditentukan indeks apoptosisnya sebagai ukuran tingkat apoptosis sel menggunakan persamaan (Allred, 1998 dalam Hartono, 2009):

$$\text{Indeks apoptosis (IA)} = \frac{\text{sel apoptosis}}{\text{total sel}} \times 100 \%$$

Indeks apoptosis adalah persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dari 10 lapang pandang. Sel yang apoptosis adalah sel yang menunjukkan warna coklat. Selain itu juga dilakukan analisis semikuantitatif dengan metode skoring Allred.

Pada analisis skoring Allred, dilakukan penilaian terhadap dua macam kategori, yaitu jumlah atau persentase sel yang terekspresi positif dan intensitas warnanya. Nilai IS menunjukkan skor intensitas, yaitu 0 (negatif atau tak terpulas warna coklat), 1 (warna coklat lemah), 2 (warna coklat sedang) dan 3 (warna coklat kuat). Nilai IP menunjukkan persentase warna coklat, yaitu 0 (tidak ada yang terpulas), 1 ($\leq 1/100$ sel terpulas), 2 ($\leq 1/10$ sel terpulas), 3 ($\leq 1/3$ sel terpulas), 4 ($\leq 2/3$ sel terpulas) dan 5 (seluruh sel terpulas). Penjumlahan IS dan IP adalah skor total IHK, sehingga skor IHK dapat bervariasi antara 0 sampai 8 (Allred, 1998 dalam Hartono, 2009).



Gambar 3.1 Skoring Allred (Allred, 1998 dalam Hartono, 2009)

3.6 Analisis Data

Analisis secara definitif dilakukan dengan uji *One Way* ANOVA untuk mengetahui signifikansi rata-rata pengaruh perlakuan terhadap berat badan (Kumar

et al., 2012). Nilai p bermakna apabila $p < 0,05$. Selanjutnya untuk mengetahui signifikansi perbedaan setiap kelompok perlakuan dilakukan uji perbandingan berganda *Post Hoc-Tukey*. Nilai p bermakna apabila $p < 0,05$. Apabila distribusi data tidak normal, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

Penggolongan senyawa aktif dapat dilakukan dengan identifikasi hasil uji warna dengan kepekatan warna yang dihasilkan pada masing-masing ekstrak dengan tanda berikut:

- a. ++ : terkandung senyawa lebih banyak/warna pekat
- b. + : terkandung senyawa/warna muda
- c. - : tidak terkandung senyawa/tidak terbentuk warna

Golongan senyawa aktif yang menunjukkan hasil positif pada uji fitokimia dilanjutkan dengan uji penegasan menggunakan KLTA. Data dari pemisahan golongan senyawa dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan memperlihatkan pola pemisahan dan kenampakan noda pada plat KLT dengan berbagai eluen yang digunakan. Dari hasil KLTA akan diperoleh eluen terbaik yang dapat memisahkan golongan senyawa-senyawa metabolit sekunder. Eluen terbaik merupakan jenis eluen yang dapat memisahkan banyak komponen senyawa, nodanya bagus tidak mengekor dan pemisahan nodanya jelas tidak berhimpitan satu sama lain.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel yang dilakukan meliputi pencucian, pengeringan dan penggilingan sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian daun dari tanaman widuri (*Calotropis gigantea*) sebanyak $\pm 1,5$ Kg. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun widuri. Sampel yang telah dicuci dikering-anginkan kemudian dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven dengan suhu $30-37^{\circ}\text{C}$ selama ± 24 jam. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kandungan air, meminimalkan kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme atau tumbuhnya jamur sehingga sampel dapat disimpan dalam jangka waktu lama dan agar diperoleh rendemen ekstrak yang semakin banyak (Baraja, 2008). Penggilingan dilakukan di Balai Materia Medika Batu dengan ukuran 90 mesh untuk memperluas permukaan sampel dan untuk menyeragamkan ukuran serbuk. Kumala (2007) menjelaskan bahwa pada ukuran ≥ 60 mesh dinding sel sudah mulai terbuka sehingga dapat memaksimalkan kontak antara pelarut dan sampel saat maserasi sehingga senyawa dapat terekstrak dengan maksimal.

4.2 Analisis Kadar Air

Sampel kering yang telah dipreparasi kemudian dianalisis kadar airnya karena kadar air ini dapat mempengaruhi daya tahan suatu sampel. Prinsip analisis

kadar air yaitu penghilangan air yang terkandung dalam sampel dengan cara pemanasan menggunakan oven pada suhu di atas titik didih air yaitu 105 °C (Winarno, 2002).

Pertama, cawan porselin dipanaskan pada suhu 105 °C selama 15 menit untuk menguapkan air dalam cawan, kemudian cawan dimasukkan dalam desikator yang berisi silika gel yang telah diaktivasi selama 10 menit dan ditimbang beratnya. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Selanjutnya ditimbang 5 g sampel yang telah dipreparasi dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 15 menit. Kemudian sampel kering didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan.

Hasil analisis kadar air sampel kering daun widuri diperoleh kadar air yang cukup baik yaitu sebesar 5,329 %. Perhitungan analisis kadar air terdapat pada Lampiran 5. Menurut Puspita (2009), kadar air yang kurang dari 10 % maka kestabilan optimum bahan akan dapat dicapai, pertumbuhan mikroba dapat dikurangi dan proses ekstraksi dapat berjalan lancar. Selain itu dengan kadar air yang kecil ini diharapkan tidak akan mempengaruhi konsentrasi atau pelarut saat ekstraksi maserasi. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi maserasi adalah etanol 70 % yang bersifat polar, sehingga dengan kadar air yang kecil diharapkan tidak akan berpengaruh terhadap kepolaran etanol.

4.3 Ekstraksi Golongan Senyawa Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) dengan Maserasi

Ekstraksi daun widuri dilakukan dengan maserasi, yaitu proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan.

Dilakukan metode maserasi karena metode perkolasi hanya baik digunakan pada senyawa organik yang mudah larut sedangkan sokletasi dan destilasi uap hanya baik pada senyawa yang tahan panas (Faraouq, 2003). Selain itu maserasi 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 (Darwis, 2000). Adapun prinsip utama maserasi adalah mengekstrak senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarutnya (*like dissolves like*) (Khopkar, 2008).

Serbuk daun widuri dimaserasi menggunakan etanol 70 % karena dalam Farmakope Herbal Indonesia, pelarut yang digunakan untuk mengekstrak simplisia yang akan digunakan untuk obat herbal adalah etanol 70 % (Depkes, 2008). Selain itu, etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur, tidak beracun, netral, absorpsinya baik dan dapat bercampur dengan segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit (Hargono, 1986). Faraouq (2003) juga menjelaskan bahwa ekstraksi simplisia tumbuhan untuk tujuan obat herbal terbaik digunakan pelarut etanol. Etanol dapat bercampur dengan air dalam berbagai perbandingan dan mudah dalam penguapan residu yang ada dalam ekstrak. Pelarut metanol, etil asetat atau heksana tidak diperbolehkan karena residu toksik yang dihasilkan.

Sebanyak 200 g serbuk daun widuri dimaserasi menggunakan etanol 70 %. Perlakuan maserasi dibagi menjadi dua masing-masing 100 gram serbuk dengan

perendaman masing-masing menggunakan 500 mL pelarut. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dan dilakukan pengadukan dengan bantuan *shaker* selama 3 jam. Pengadukan ini dilakukan untuk membantu meratakan dan mempercepat kontak antara pelarut dan sampel sehingga ekstrak yang diperoleh lebih homogen dan lebih cepat jenuh. Filtrat dipisahkan dari residunya dengan cara disaring menggunakan corong Buchner. Penyaringan ini dibantu dengan pompa *vacum* untuk menurunkan tekanan dalam erlenmeyer *vacum* sehingga pelarut lebih cepat turun ke dalam erlenmeyer *vacum*. Diperoleh filtrat berwarna hijau pekat. Kemudian dilakukan maserasi lagi sebanyak 4 kali pengulangan masing-masing menggunakan pelarut sebanyak 250 mL, 250 mL, 200 mL dan 200 mL. Sehingga maserasi ini dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan sampai diperoleh filtrat hijau bening yang menunjukkan bahwa senyawa telah terekstrak secara maksimal.

Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menguapkan pelarutnya menggunakan *vacum rotary evaporator*. Prinsip utama *rotary evaporator* adalah adanya penurunan tekanan menyebabkan pelarut menguap 5 – 10 °C di bawah titik didih pelarut (Vogel, 1978). Proses ini dihentikan ketika sudah tidak ada pelarut yang menetes pada labu alas bulat yang mengindikasikan bahwa pelarut telah menguap semua. Kemudian untuk meyakinkan bahwa residu dari pelarut telah hilang dilakukan pengeringan dalam oven pada suhu 37 °C selama 1 hari. Diperoleh ekstrak pekat berwarna hijau kehitaman dengan rendemen sebesar 19,879 %, seperti ditunjukkan pada Tabel 4.1. Perhitungan rendemen terdapat pada Lampiran 6.

Tabel 4.1 Hasil maserasi ekstrak etanol 70 % daun widuri

Pelarut	Berat serbuk + volume pelarut	Perubahan warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 70 %	200,489 g + 2800 mL	Hijau tua sampai hijau muda	Hijau kehitaman	39,856	19,879

Ekstrak pekat yang diperoleh diidentifikasi golongan senyawa yang mungkin terkandung di dalamnya melalui uji fitokimia dan dilanjutkan dengan uji penegasan dengan KLTA untuk golongan senyawa yang positif uji fitokimia. Selanjutnya diuji aktivitas antitumor secara *in vivo*.

4.4 Identifikasi Golongan Senyawa dalam Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri (*Calotropis gigantea*)

4.4.1 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri secara kualitatif. Golongan senyawa yang diujikan adalah alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan steroid. Terlebih dahulu dibuat ekstrak daun widuri 1 % (b/v) dengan menimbang 100 mg ekstrak pekat dan dilarutkan dalam 10 mL etanol. Kemudian sebanyak 0,5 mL ekstrak daun widuri 1 % (b/v) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan reagen masing-masing golongan senyawa. Diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji fitokimia

Golongan Senyawa	Reagen	Hasil Reaksi Warna	Keterangan
Alkaloid	Dragendroff	Jingga	Negatif (-)
	Mayer	Hijau	Negatif (-)
Flavonoid	Logam Mg	Hijau kekuningan	Negatif (-)
Tanin	FeCl ₃	Hijau kehitaman	Positif (+)
Triterpenoid/Steroid	Lieberman-Burchad	Cincin kecoklatan	Positif (++) triterpenoid

Keterangan :

Tanda (+) : terkandung senyawa (berwarna)

Tanda (++) : terkandung senyawa lebih banyak (warna pekat)

Tanda (-) : tidak terkandung senyawa (tidak terbentuk warna)

Berdasarkan hasil uji fitokimia diketahui bahwa di dalam ekstrak etanol daun widuri mengandung golongan senyawa tanin dan triterpenoid.

4.4.1.1 Triterpenoid

Golongan senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan reaksi terbentuknya cincin kecoklatan ketika ditambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi (Indrayani *et al.*, 2006). Senyawa triterpenoid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Penambahan kloroform dilakukan untuk melarutkan senyawa ini karena senyawa ini larut baik dalam kloroform dan tidak mengandung molekul air. Asam asetat anhidrat digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Jika dalam larutan uji terdapat molekul air, maka asam asetat anhidrat akan berubah menjadi asam asetat sebelum reaksi berjalan dan turunan asetil tidak akan terbentuk (Harborne, 1987).

Prinsip reaksi dalam mekanisme reaksi uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan H₂O dan penggabungan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan anhidrida asetat. Gugus asetil yang

terbentuk merupakan gugus pergi yang baik, sehingga akan lepas dan membentuk ikatan rangkap. Kemudian terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya menyebabkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik dan diikuti pelepasan hidrogen beserta elektronnya. Akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna (Siadi, 2012).

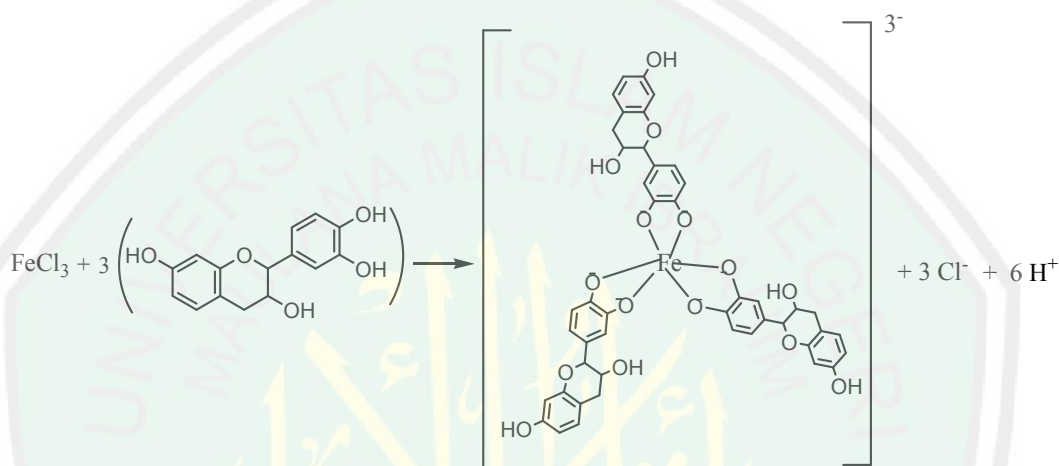
4.4.1.2 Tanin

Golongan senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (tanin katekol/tanin terkondensasi) ketika ditambahkan FeCl_3 (Indrayani, 2006). Terbentuknya warna hijau kehitaman ini karena terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dengan ion logam Fe^{3+} .

Senyawa kompleks memiliki sensitifitas yang tinggi, dalam artian senyawa tersebut mudah dideteksi. Senyawa kompleks menunjukkan serapan yang disebabkan oleh perpindahan muatan, karenanya kompleks ini disebut kompleks perpindahan muatan (*charge-transfer complexes*). Perpindahan muatan ini terjadi karena kompleks memiliki komponen yang bersifat donor elektron dan komponen yang lain bersifat akseptor elektron. Atom donor dalam kompleks ini adalah tanin sedangkan akseptornya adalah ion Fe^{3+} . Penyerapan radiasi melibatkan perpindahan elektron dari donor ke akseptor dan menyebabkan keadaan tereksitasi yang merupakan hasil dari reaksi oksidasi-reduksi kemudian elektron kembali ke keadaan semula dalam waktu singkat. Karena kecenderungan perpindahan elektron meningkat, maka hanya sedikit energi radiasi yang dibutuhkan untuk

terjadinya perpindahan muatan, dan kompleks yang dihasilkan akan menyerap di panjang gelombang yang lebih panjang (Gandjar dan Rohman, 2010).

Reaksi dugaan yang terjadi adalah sebagai berikut :



Gambar 4.1 Kompleks geometri oktahedral pada kompleks besi-tanin

Tanin katekol merupakan golongan senyawa polifenol yang memiliki gugus OH. Atom O pada gugus OH tersebut bertindak sebagai basa lewis (ligan) yang terkoordinasi pada Fe^{3+} . Karena OH lebih dari satu memungkinkan untuk mendonorkan PEB dari kedua atom O-nya pada Fe^{3+} sehingga akan terbentuk kompleks sepi/kelat dengan ligan bidentat (Perron dan Brumaghim, 2009).

4.4.2 Uji Penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Uji KLTA ini dilakukan untuk golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif pada uji fitokimia, yaitu tanin dan triterpenoid. Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam dari plat adalah silika gel F_{254} , sedangkan fasa gerak terdiri atas beberapa pelarut (eluen). Fase gerak bergerak

dalam fase diam karena adanya gaya kapiler (Stahl, 1985). Pertama dilakukan penjuanan bejana pengembang dengan eluen masing-masing golongan senyawa sebanyak 5 mL selama 1 jam. Hal ini dilakukan agar proses elusi berjalan lebih cepat dan eluen dapat naik dengan serempak. Kemudian plat silika gel F₂₅₄ diaktivasi dengan cara pemanasan dalam oven suhu 105 °C untuk menguapkan airnya. Selanjutnya ekstrak etanol daun widuri yang telah diencerkan dengan etanol 70 % yaitu konsentrasi 100 % (b/v) ditotolkan pada plat dengan jarak tepi bawah 1 cm menggunakan pipa kapiler dan dikeringkan menggunakan *hairdryer*. Apabila ekstrak yang ditotolkan telah kering, dimasukkan plat dalam bejana pengembang dengan posisi vertikal, agak miring dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan. Pemisahan yang bagus adalah pemisahan yang menghasilkan komponen senyawa yang banyak, nodanya tidak berekor, dan pemisahan nodanya jelas (Markham, 1988). Proses elusi dihentikan ketika pelarut mencapai batas atas plat. Noda yang dihasilkan diperiksa di bawah sinar UV. Kemudian dipertegas dengan pereaksi sesuai golongan senyawanya dan diamati di bawah lampu UV kembali. Pereaksi ini digunakan untuk menambah kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang berhubungan dengan struktur senyawa tersebut.

Identifikasi noda pada plat KLT F₂₅₄ menggunakan lampu UV karena plat mengandung indikator fluoresensi yang memungkinkan pendeteksian semua senyawa yang memadamkan fluoresensi bila plat disinari dengan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm. Sudjadi (1986) menjelaskan panjang sinar UV yang dapat digunakan adalah 254 nm dan 366 nm.

Penampakan noda pada lampu UV 254 nm dikarenakan adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada plat KLT. Jika senyawa pada bercak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik jenis apa saja, sinar UV yang mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya adalah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar (Gritter *et al.*, 1991). Sedangkan pada sinar UV 366 nm noda akan nampak berfluoresensi. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali semula sambil melepaskan energi (Sudjadi, 1986).

Munculnya beberapa noda pada plat karena setiap komponen senyawa memiliki kemampuan distribusi yang berbeda terhadap fasa gerak dan fasa diam, sehingga komponen senyawa tersebut akan terpisah saat dielusi. Gritter *et al* (1991) menyebutkan bahwa setiap komponen akan bergerak dengan laju tertentu yang dinyatakan dengan faktor retensi (R_f), yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh komponen terhadap jarak yang ditempuh fase gerak (penahanan suatu komponen dalam fase diam).

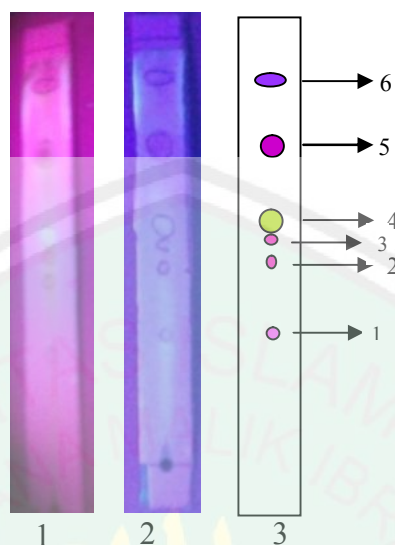
4.4.2.1 Triterpenoid

Hasil uji penegasan KLTA golongan senyawa triterpenoid dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen Lieberman-Burchard (LB) tertera pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Data penampakan noda golongan senyawa triterpenoid hasil KLTA dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen Lieberman-Burchard dan lampu UV 366 nm

No.	Eluen	Jumlah Noda	Keterangan	R _f
1.	Toluena : etil asetat = 7 : 3 (v/v)	3	Terpisah	0,06; 0,31; 0,64
2.	N-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v)	2	Terpisah	0,02; 0,19
3.	N-heksana : etil asetat = 7 : 3 (v/v)	3	Terpisah	0,12; 0,4; 0,52
4.	N-heksana : etil asetat = 2 : 8 (v/v)	3	Terpisah	0,24; 0,85; 0,91
5.	Kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v)	6	Terpisah baik	0,33; 0,49; 0,54; 0,58; 0,78; 0,95

Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa eluen terbaik yang dapat memisahkan golongan senyawa terpenoid adalah kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v) yang menghasilkan 6 noda dengan R_f tertera pada Tabel 4.4. Perhitungan R_f terdapat pada Lampiran 7. Munculnya noda pada plat dikarenakan adanya perbedaan distribusi senyawa-senyawa tersebut di dalam fasa gerak dan fasa diam, sehingga akan muncul noda pada saat dielusi.



Gambar 4.4 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid

Keterangan :

1. Hasil elusi sebelum disemprot reagen LB (saat disinari lampu UV 366 nm)
2. Hasil elusi setelah disemprot reagen LB (saat disinari lampu UV 366 nm)
3. Ilustrasi hasil elusi setelah disemprot reagen LB (saat disinari lampu UV 366 nm)

Tabel 4.4 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan eluen kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v)

No.	R _f tiap noda	Warna noda ketika disinari UV 366 nm		Dugaan senyawa triterpenoid
		Sebelum disemprot Lieberman-Burchard	Setelah disemprot Lieberman-Burchard	
1.	0,33	Tidak ada noda	Merah muda	Positif
2.	0,49	Merah muda	Merah muda	Positif
3.	0,54	Merah muda	Merah muda	Positif
4.	0,58	Hijau	Hijau	Negatif
5.	0,78	Merah muda	Merah muda	Positif
6.	0,95	Ungu	Ungu	Positif

Diantara 6 noda yang dihasilkan, maka noda yang diduga sebagai triterpenoid adalah noda ke-1, 2, 3, 5 dan 6 dengan nilai R_f 0,33; 0,49; 0,54; 0,78 dan 0,95 dimana noda-noda ini setelah disemprot reagen Lieberman-Burchard dan disinari lampu UV 366 berwarna merah muda dan ungu. Hal ini sesuai dengan Harborne (1987) yang menyatakan bahwa reagen Lieberman-Burchard secara

umum digunakan untuk mendeteksi terpenoid menghasilkan warna violet. Hasil ini juga didukung oleh penelitian Mora *et al* (2012) yang melakukan identifikasi triterpenoid dalam ekstrak pegagan dengan eluen yang sama yaitu kloroform dan metanol namun dengan perbandingan 4 : 1 menghasilkan warna merah muda.

Eluen yang digunakan, yaitu kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v), lebih bersifat nonpolar. Sedangkan fasa diamnya bersifat polar. Munculnya beberapa noda setelah proses elusi disebabkan karena golongan senyawa triterpenoid dalam ekstrak kasar memiliki banyak jenis senyawa yang memiliki kepolaran dan nilai distribusi yang berbeda-beda. Nilai distribusi (D) adalah perbandingan konsentrasi solut (zat terlarut) dalam fase diam (C_s) dan fase gerak (C_m), $D = C_s/C_m$ (Gandjar dan Rohman, 2010).

Senyawa pada noda dengan R_f rendah seperti 0,33 dan 0,49 memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa yang memiliki R_f tinggi seperti 0,54; 0,78 dan 0,95. Senyawa yang memiliki R_f rendah diduga adalah triterpenoid yang memiliki gugus $-OH$ yang bersifat polar, sehingga senyawa tersebut lebih terdistribusi pada fasa diam yang juga bersifat polar. Senyawa ini memiliki nilai distribusi (D): $C_{stationary} > C_{mobile}$ lebih besar. Senyawa tersebut bermigrasi secara lambat karena senyawa lebih terdistribusi pada fase diam yang bersifat polar sehingga tertahan dalam fase diam. Sedangkan senyawa pada noda dengan R_f yang lebih tinggi, yaitu 0,54; 0,78 dan 0,95 lebih terdistribusi pada fasa gerak yang lebih bersifat nonpolar. Senyawa ini memiliki nilai distribusi (D): $C_{stationary} < C_{mobile}$ yang lebih kecil. Senyawa tersebut bermigrasi lebih cepat karena senyawa lebih terdistribusi pada fase gerak. Menurut Gandjar

dan Rohman (2010) semakin besar nilai distribusi (D) maka migrasi solut semakin lambat, dan sebaliknya semakin kecil nilai D maka migrasi solut semakin cepat. Hal ini terjadi karena solut akan terelusi menurut perbandingan distribusinya. Jika perbedaan distribusi solut cukup besar maka campuran-campuran solut akan mudah dan cepat dipisahkan.

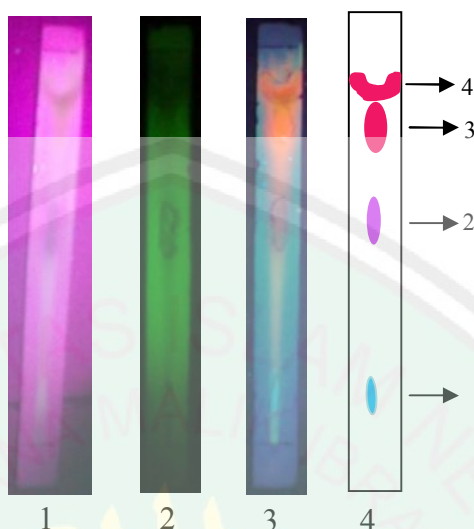
4.4.2.2 Tanin

Hasil KLTA golongan senyawa tanin dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen FeCl_3 seperti ditunjukkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil KLTA golongan senyawa tanin dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen FeCl_3 dan lampu UV 254 dan 366 nm

No.	Eluen	Jumlah Noda	Keterangan	R_f
1.	Butanol : asam asetat : air = 4 : 1 : 5 (v/v)	3	Terpisah	0,12; 0,45; 0,67
2.	Kloroform : metanol : air = 7 : 3 : 0,4 (v/v)	3	Terpisah	0,76; 0,85; 0,94
3.	Asam asetat glasial : air : HCl = 30 : 10 : 3 (v/v)	2	Terpisah	0,49; 0,68
4.	Butanol : asam asetat : air = 2 : 0,5 : 1,1 (v/v)	1	Tidak terpisah	0,69
5.	Butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v)	4	Terpisah	0,12; 0,55; 0,8; 0,92

Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa eluen terbaik yang dapat memisahkan golongan senyawa tanin adalah butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v) yang menghasilkan 4 noda dengan R_f masing-masing noda tertera pada Tabel 4.6. Perhitungan R_f terdapat pada Lampiran 7.



Gambar 4.5 Hasil KLT golongan senyawa tanin

Keterangan :

1. Hasil elusi sebelum disemprot reagen FeCl_3 (saat disinari lampu UV 366 nm)
2. Hasil elusi setelah disemprot reagen FeCl_3 (saat disinari lampu UV 256 nm)
3. Hasil elusi setelah disemprot reagen FeCl_3 (saat disinari lampu UV 366 nm)
4. Ilustrasi hasil elusi setelah disemprot reagen FeCl_3 (saat disinari lampu UV 366 nm)

Tabel 4.6 Hasil KLT golongan senyawa tanin dengan eluen butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v)

No.	Rf tiap noda	Warna noda ketika disinari UV 366 nm		Warna noda dengan sinar UV 254 nm setelah disemprot FeCl_3	Dugaan senyawa tanin
		Sebelum disemprot FeCl_3	Setelah disemprot FeCl_3		
1.	0,12	-	Biru	Hijau kehitaman	Negatif
2.	0,55	Ungu	Ungu	Hijau kehitaman	Positif
3.	0,8	Merah muda	Merah muda	Hijau	Negatif
4.	0,92	Merah muda	Merah muda	Hijau kehitaman	Negatif

Noda yang diduga sebagai senyawa tanin adalah noda ke-2 dengan R_f 0,55 yang memberikan warna ungu setelah disemprot FeCl_3 dan disinari UV 366 nm. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Sriwahyuni (2010) yang mengidentifikasi tanin pada ekstrak tanaman anting-anting dengan menggunakan variasi eluen yang sama yaitu butanol : asam asetat : air = (14 : 1 : 5) (v/v) yang menghasilkan 2 noda dengan warna hijau kecoklatan ketika disemprot FeCl_3 kemudian berwarna

ungu dan ungu kehitaman setelah disinari UV 366 nm. Hasil ini juga diperkuat oleh Harborne (1987) yang menyatakan bahwa tanin dapat dideteksi dengan sinar UV berupa bercak lembayung.

Eluen yang digunakan, yaitu butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v), bersifat sangat polar. Fase gerak ini lebih polar dibandingkan dengan fase diamnya yang juga bersifat polar. Sehingga senyawa pada noda yang memiliki R_f lebih tinggi cenderung bersifat lebih polar dibandingkan dengan senyawa pada noda yang memiliki R_f lebih rendah karena senyawa dengan R_f lebih tinggi, lebih terdistribusi pada fase gerak dibandingkan dengan fase diamnya. Begitu juga sebaliknya. Noda dengan R_f 0,55; 0,8 dan 0,92 memiliki senyawa yang lebih polar dibandingkan dengan senyawa pada R_f 0,12.

Dugaan senyawa tanin yaitu noda ke-2, memiliki R_f yang cukup tinggi. Hal ini dimungkinkan karena tanin memiliki gugus $-OH$ yang bersifat polar sehingga lebih terdistribusi pada fase geraknya yang bersifat lebih polar. Senyawa dengan R_f tinggi memiliki nilai distribusi (D): $C_s < C_m$. Menurut Gandjar dan Rohman (2010), semakin kecil nilai D maka migrasi solut semakin cepat. Hal ini dikarenakan solut tidak tertahan dalam fase diam dan lebih terdistribusi dalam fase gerak.

Munculnya beberapa noda dikarenakan sampel yang digunakan adalah ekstrak kasar yang memiliki banyak golongan senyawa yang memiliki nilai distribusi yang berbeda-beda. Senyawa pada noda dengan R_f lebih rendah dari tanin, yaitu 0,12 adalah senyawa yang memiliki kepolaran lebih rendah dibandingkan tanin. Sedangkan senyawa pada noda dengan R_f yang lebih tinggi

dari tanin yaitu 0,8 dan 0,92 adalah senyawa dengan kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan tanin. Senyawa dengan R_f rendah memiliki nilai distribusi (D): $C_s > C_m$. Menurut Gandjar dan Rohman (2010), semakin tinggi nilai D maka migrasi solut semakin lambat. Hal ini dikarenakan solut lebih terdistribusi dalam dan tertahan dalam fase diam. Begitu juga sebaliknya, senyawa dengan R_f tinggi memiliki nilai D: $C_s < C_m$. Semakin rendah nilai D, maka migrasi solut semakin cepat karena solut lebih terdistribusi dalam fase gerak.

4.5 Pengaruh Ekstrak Etanol 70 % Daun Widuri terhadap Mencit yang Diinduksi DMBA

Penelitian dilakukan dengan metode *in vivo* yaitu dengan menggunakan keseluruhan hidup organisme. Kelebihan metode ini adalah lebih cocok untuk mengamati efek ekstrak etanol daun widuri terhadap keseluruhan percobaan pada subjek hidup. Hewan coba yang digunakan adalah mencit karena mencit memiliki kesetaraan taksonomi dengan manusia, seperti reaksi terhadap penyakit maupun pengobatan, serta mempunyai kemiripan dalam hal fisiologi manusia (Coutrier, 2008). Mencit yang digunakan adalah mencit jantan karena kondisi biologisnya stabil dibandingkan mencit betina dimana kondisi biologisnya dipengaruhi siklus estrus (Tuhu, 2008).

Pada awal perlakuan mencit diaklimatisasi selama satu minggu untuk membiasakan terhadap lingkungan dan pakan yang baru. Aklimatisasi ini juga untuk melihat kondisi kesehatan mencit sebelum diberikan perlakuan. Pakan diganti setiap hari agar mencit selalu mendapat makanan yang baru. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum* yaitu tidak dibatasi dan

terus menerus sampai mencit berhenti sesuai keinginannya. Mencit diaklimatisasi dalam kandang beralaskan serbuk kayu dan ditutup dengan kawat. Serbuk kayu diganti 2 kali seminggu untuk menjaga kebersihan kandang untuk menghindari stres pada mencit.

Setelah diaklimatisasi, mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan. Pengelompokan ini dilakukan secara acak untuk menyamakan sampel pada setiap kelompok. Kelompok perlakuan tersebut adalah kelompok dosis 50 mg/Kg BB, 100 mg/Kg BB, 150 mg/Kg BB, kontrol positif dan kontrol negatif. Mencit kelompok kontrol negatif adalah mencit yang diinduksi DMBA dan diberikan pelarut ekstrak CMC-Na 0,5 %. Kelompok ini digunakan untuk mengetahui apakah pelarut memiliki aktivitas antitumor. Mencit kontrol positif adalah mencit yang diinduksi dengan DMBA dan diberikan obat kemoterapi Metotreksat 2,5 mg/Kg BB. Kontrol positif ini digunakan sebagai perbandingan dengan ekstrak daun widuri. Selanjutnya dilakukan induksi tumor dengan disuntikkan 0,1 mL DMBA 25 µg/0,1 mL aseton secara subkutan di tengkuk mencit sebanyak dua kali seminggu selama 6 minggu (Manoharan *et al.*, 2010) dan sebelum diinduksi berat badan mencit ditimbang untuk mengetahui perkembangan mencit. DMBA merupakan karsinogen yang dapat memicu terjadinya kanker. Senyawa ini dalam metabolisme hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom p-450 untuk membentuk ikatan kovalen dengan DNA pada sel yang aktif membelah sehingga menyebabkan DNA *adduct* (Sigma-Aldrich, 2007). Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga

mendorong pembelahan sel kanker (Hakkak *et al.*, 2005). Setelah mencit diinduksi DMBA, pada semua mencit terbentuk tumor yang ditandai dengan munculnya benjolan abnormal.

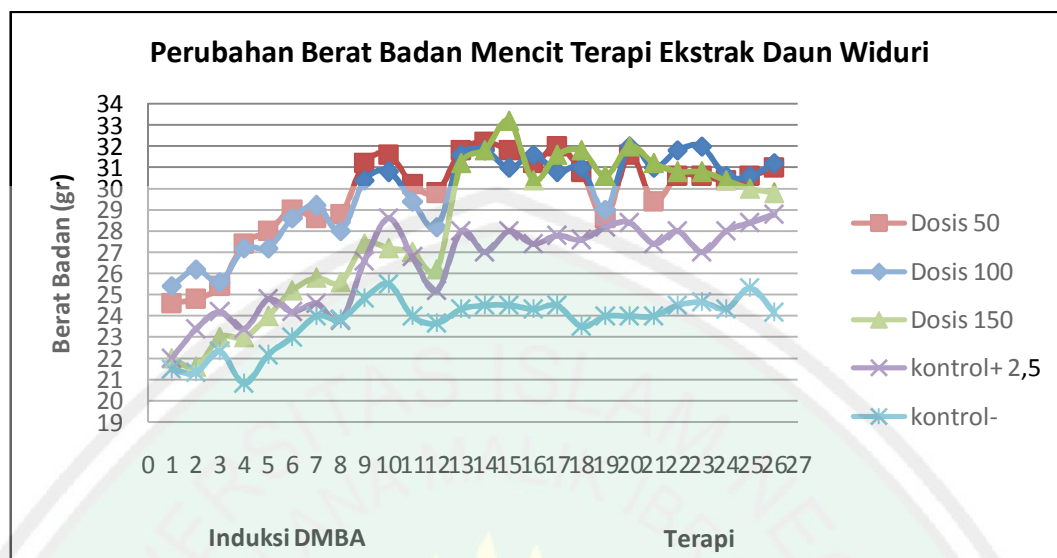
Mencit yang telah terbentuk tumor, selanjutnya diberikan terapi sesuai kelompok perlakuan. Perhitungan dosis dan pembuatan larutan telah tercantum pada Lampiran 4. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak adalah CMC-Na 0,5 % karena berupa gel, sehingga lebih stabil dan di dalam tubuh ekstrak dapat berinteraksi lebih lama. Terapi diberikan secara per oral sebanyak 0,5 mL dengan sonde lambung. Sonde lambung dimasukkan ke dalam mulut melalui langit-langit sampai esofagus untuk menghindari keluarnya ekstrak. Terapi ini dilakukan selama 14 hari, diharapkan dalam waktu tersebut ekstrak sudah dapat memberikan pengaruh hambatan pertumbuhan tumor. Selama terapi, berat badan mencit ditimbang setiap hari untuk mengetahui perkembangan dan respon pemberian terapi pada mencit. Selanjutnya mencit dikorbankan dengan inhalasi kloroform dalam *chamber* yang berisi kapas yang telah diberi kloroform. Kemudian mencit diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan jarum pentul. Kemudian pada daerah timbulnya nodul dicukur bulunya. Selanjutnya dibedah menggunakan gunting dan diambil nodulnya. Nodul yang diambil adalah jaringan yang berwarna putih kelabu mutiara seperti daging ikan segar yang khas (Robbins dan Kumar, 1995). Nodul dicuci dengan PBS hingga bersih dari darah kemudian ditiriskan di atas kertas saring. Selanjutnya nodul ditempatkan pada cawan petri kering dan ditimbang beratnya menggunakan neraca analitik. Masing-

masing berat nodul dicatat kemudian nodul disimpan dalam formalin 10 % untuk kemudian dibuat preparat imunohistokimia.

4.5.1 Berat Badan, Insidensi Tumor dan Berat Tumor

Berat badan mencit ditimbang dua kali seminggu sebelum induksi DMBA dan selama terapi berat badan mencit ditimbang setiap hari. Menurut Hatim (2012) berat badan adalah salah satu respon yang menggambarkan perkembangan mencit. Sehingga pengukuran berat badan dilakukan untuk mengetahui apakah ada respon pemberian terapi terhadap perkembangan mencit. Perubahan berat badan mencit selama perlakuan ditunjukkan pada Gambar 4.2. Data berat badan mencit terdapat pada Lampiran 8.

Selama induksi DMBA, yaitu pengukuran berat badan ke-1 sampai ke-12, berat badan mencit mengalami kenaikan dan penurunan yang tidak stabil. Pada induksi DMBA ke-4, 8, 11 dan 12, rata-rata berat badan mencit pada semua kelompok perlakuan mengalami penurunan. Hal ini dapat dipengaruhi oleh stres dan rasa sakit akibat induksi DMBA. Menurut Hatim (2012) stres dapat menyebabkan penurunan nafsu makan yang berakibat lebih lanjut terhadap ketidakstabilan berat badan. Sedangkan saat diberikan terapi yaitu pada pengukuran ke-13 sampai ke-26, berat badan mencit cenderung lebih stabil. Hal ini dapat dipengaruhi oleh hilangnya rasa sakit karena tidak dilakukan induksi DMBA lagi, sehingga stres pun menurun dan berat badan menjadi lebih stabil.



Gambar 4.2 Perubahan berat badan mencit saat induksi DMBA (1-12) dan terapi (13-26)

Tabel 4.7 Pengaruh ekstrak etanol daun widuri terhadap perubahan berat badan mencit

Kelompok	Berat Badan (g) ¹		% Kenaikan Berat Badan
	Awal	Akhir	
Dosis 50 mg/Kg BB	29,80 ± 2,49	31,00 ± 2,00	30,00 ± 2,00
Dosis 100 mg/Kg BB	28,20 ± 2,48	31,20 ± 2,17	30,20 ± 2,16
Dosis 150 mg/Kg BB	26,20 ± 3,27	29,80 ± 1,79	28,80 ± 1,78
Kontrol positif (Metotreksat 2,5 mg/KgBB)	25,20 ± 5,45	28,40 ± 6,14	27,80 ± 6,14
Kontrol negatif (CMC-Na 0,5%)	22,80 ± 6,72	23,40 ± 4,88	22,40 ± 4,88

¹ Nilai menunjukkan rata-rata berat badan ± standar deviasi

Selama awal terapi sampai akhir terapi, berat badan mencit mengalami kenaikan seperti tertera pada Tabel 4.7. Kenaikan berat badan ini dipengaruhi oleh pemberian terapi. Pengaruh ini dapat diketahui dari hasil uji statistik. Tabel hasil uji statistika terdapat pada Lampiran 8. Sebelumnya dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal. Hasil uji Shapiro-Wilk adalah $p > 0,05$ yang menunjukkan bahwa data memiliki distribusi

yang normal. Kemudian analisis dilanjutkan dengan uji One Way ANOVA. Hasil uji One Way ANOVA adalah $p = 0,026$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda.

Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dosis 50 mg/KgBB dengan kontrol negatif dengan $p = 0,37$ ($p < 0,05$) dan kelompok dosis 100 mg/KgBB dengan kontrol negatif dengan $p = 0,31$ ($p < 0,05$). Rata-rata kenaikan berat badan mencit kontrol negatif adalah 22,40 %. Rata-rata kenaikan berat badan terbesar adalah mencit kelompok dosis 100 mg/KgBB yaitu 30,20 %, diikuti dengan mencit kelompok dosis 50 mg/KgBB sebesar 30,00%. Kenaikan berat badan ini dapat terjadi karena kandungan senyawa dalam ekstrak dapat meningkatkan sistem imun mencit sehingga nafsu makan dan minum menjadi bertambah. Selain itu juga terdapat nutrisi lain dalam ekstrak yang dapat menaikkan berat badan mencit. Daun widuri juga memiliki aktivitas *wound healing* (Nalwaya *et al.*, 2009) atau penyembuh luka sehingga rasa sakit dan stres dapat berkurang. Ini terbukti dengan mengeringnya luka bekas induksi DMBA pada semua kelompok mencit yang diberikan terapi ekstrak daun widuri, sedangkan luka pada mencit kontrol negatif tetap basah sampai akhir perlakuan.

Sedangkan mencit kelompok dosis 150 mg/Kg BB dan kontrol positif menunjukkan tidak terdapat perbedaan rata-rata kenaikan berat badan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif. Kenaikan berat badan mencit kelompok dosis 150 mg/KgBB adalah 28,80 %, sedangkan mencit kelompok

kontrol positif adalah 27,80 %. Hal ini dapat dipengaruhi oleh sistem imun mencit yang berbeda-beda, nafsu makan serta stres yang dialami mencit kelompok dosis 150 dan kontrol negatif lebih tinggi, sehingga pemberian terapi belum mampu menaikkan berat badan yang signifikan.

Rata-rata kenaikan berat badan terkecil adalah pada mencit kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan pelarut ekstrak saja yaitu CMC-Na 0,5 %. Hal ini dapat dimungkinkan karena mencit sudah menderita kanker. Menurut Kumar *et al* (2012) penurunan berat badan terjadi karena penurunan asupan makanan dan atau absorpsi yang dihubungkan dengan kaheksi tumor. Kaheksi adalah suatu sindrom yang ditandai dengan gejala klinis berupa anoreksi (hilang nafsu makan), perubahan ambang rasa acap, penurunan berat badan, anemia, gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak (Maharani, 2009).

Hasil analisis insidensi tumor ditunjukkan dalam Tabel 4.8. Perhitungan insidensi tumor terdapat pada Lampiran 9.

Tabel 4.8 Pengaruh ekstrak etanol daun widuri terhadap insidensi tumor setelah terapi

Kelompok	Insidensi Tumor
Dosis 50 mg/Kg BB	40 % (2/5)
Dosis 100 mg/Kg BB	20 % (1/5)
Dosis 150 mg/Kg BB	20 % (1/5)
Kontrol positif Metotreksat 2,5 mg/KgBB	40 % (2/5)
Kontrol negatif CMC-Na 0,5%	40 % (2/5)

Setelah mencit diinduksi DMBA, pada semua tengkuk mencit terbentuk tumor (100 %). Pemberian ekstrak daun widuri secara per oral untuk dosis 100 dan 150 mg/Kg BB menunjukkan insidensi tumor lebih rendah dibandingkan

dengan kontrol negatif yaitu sebesar 20 %. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri dosis 100 dan 150 mg/KgBB mampu mengurangi insidensi tumor karena dapat menghambat terbentuknya tumor lebih lanjut.

Sedangkan pemberian dosis 50 mg/Kg BB menunjukkan insidensi tumor yang lebih tinggi dibandingkan dengan dosis 100 dan 150 mg/KgBb. Insidensi tumor mencit dosis 50 mg/KgBB sama dengan mencit kontrol negatif dan positif yaitu sebesar 40 %. Hal ini dapat terjadi karena dosis 50 mg/KgBB adalah dosis yang rendah sehingga hambatan terhadap pertumbuhan tumor pun rendah yang menyebabkan insidensi tumornya tinggi. Sedangkan kelompok kontrol positif memiliki insidensi tumor yang sama dengan kontrol negatif dan memiliki insidensi tumor yang lebih tinggi dibandingkan kelompok dosis 100 dan 150 mg/KgBB. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun widuri mampu menghambat pertumbuhan tumor yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol obat. Hal ini juga sebanding dengan berat tumor yang terbentuk setelah pemberian terapi.

Berat tumor pada mencit yang diberikan terapi lebih kecil dibandingkan dengan berat tumor pada mencit kontrol negatif. Data berat tumor terdapat pada Lampiran 8. Berat tumor pada mencit kontrol negatif adalah 148,6 mg dan 144,2 mg. Sedangkan berat tumor pada mencit dosis 50 mg/KgBB ada yang lebih kecil dari kontrol negatif yaitu 49,1 mg dan ada yang lebih besar yaitu 160,1 mg. Hal ini dapat dikarenakan sistem imun mencit yang berbeda-beda, sehingga pertumbuhan ataupun penghambatan tumor juga berbeda-beda. Namun rata-rata berat tumor mencit dosis 50 mg/KgBB lebih kecil (104,6 mg) dibandingkan

dengan mencit kontrol negatif (146,4 mg). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi dosis 50 mg/KgBB mampu mengurangi berat tumor pada mencit. Berat tumor mencit dosis 50 mg/KgBB juga lebih kecil dibandingkan dengan mencit kontrol positif Metotreksat 2,5 mg/KgBB yang mempunyai berat tumor 103,4 dan 140,7 mg. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri dosis 50 mg/KgBB mampu menurunkan berat tumor yang lebih baik daripada kontrol positif.

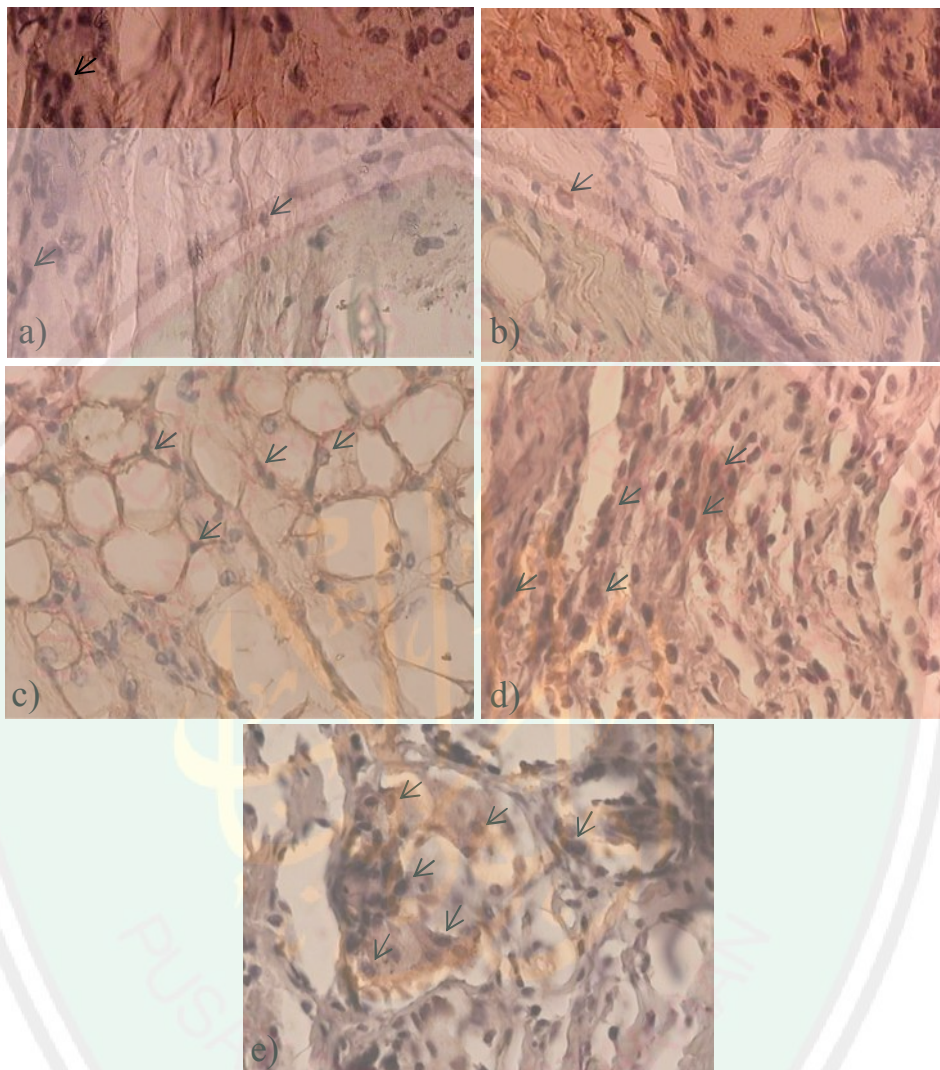
Berat tumor pada mencit dosis 100 dan 150 mg/KgBB juga lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu berturut-turut sebesar 83,3 mg dan 45,1 mg. Berat tumor ini juga lebih kecil dibandingkan dengan mencit dosis 50 mg/KgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak daun widuri yang diberikan, semakin rendah berat tumornya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak daun widuri mampu menunjukkan penurunan berat tumor yang semakin besar seiring dengan kenaikan dosis. Penurunan berat tumor ini menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri memiliki efek hambatan pertumbuhan tumor. Aktivitas hambatan pertumbuhan tumor ini diduga karena adanya senyawa sitotoksik atau senyawa lain dalam daun widuri yang bekerja sinergis dalam menghambat pertumbuhan tumor.

4.5.2 Imunohistokimia (IHK) Kaspase-3

Untuk memperkuat hasil berat tumor, dilakukan analisis secara mikroskopis yaitu imunohistokimia kaspase-3. Analisis ini digunakan untuk mengetahui sel yang mengalami apoptosis sebagai reaksi dari sistem imun tubuh dalam menghambat pertumbuhan tumor. Menurut Hastuti (2011) tiap tumor mengandung protein atau antigen tertentu yang dapat digunakan untuk membantu

mendiagnosis tumor tersebut. Imunohistokimia (IHK) adalah suatu metode untuk menetapkan lokasi dan jenis protein (antigen) di dalam sel-sel jaringan. Prinsip IHK adalah antibodi akan berikatan secara spesifik dengan antigen. Ikatan antibodi-antigen dilihat dengan mengkonjugasi antibodi dengan enzim peroksidase yang dapat mengkatalisa dan memberikan warna. Selain itu juga menggunakan kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidin) yang memberikan warna coklat. Ikatan antibodi-antigen ini dapat berlokasi pada sitoplasma atau inti sel yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pada penelitian ini jenis protein yang dideteksi adalah kaspase-3. Kaspase-3 (*Cytosolic Aspartate-Specific Cystein Protease*) merupakan kelompok protease yang berperan sebagai eksekutor untuk menginisiasi proses apoptosis baik jalur intrinsik maupun ekstrinsik. Kothakota *et al* (1997) menyebutkan bahwa kaspase-3 terbukti sebagai mediator kunci proses apoptosis pada sel mamalia.

Jaringan dibuat slide jaringan dan diwarnai dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi kaspase-3 untuk melihat sel tumor yang mengekspresikan kaspase-3 pada sitoplasmanya. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x sebanyak 10 lapang pandang. Sel yang positif mengekspresikan kaspase-3 akan memiliki sitoplasma yang berwarna coklat karena reaksi antibodi antikaspase-3 yang divisualisasi oleh kromogen DAB. Hasil pengamatan mikroskopis imunohistokimia kaspase-3 dari kelima kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Lampiran 11. Selanjutnya ditentukan indeks apoptosisnya sebagai ukuran tingkat apoptosis sel.



Gambar 4.3 Hasil imunohistokimia kaspase-3, perbesaran 400x, a) mencit kontrol negatif, CMC-Na 0,5 %, b) mencit kontrol positif, Metotrexat 2,5 mg/kgBB, c) mencit dosis 50 mg/KgBB, d) mencit dosis 100 mg/KgBB, e) mencit dosis 150 mg/KgBB. Tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresikan kaspase-3 (apoptosis).

Indeks apoptosis dari masing-masing kelompok dihitung menggunakan persamaan (Allred, 1998 dalam Hartono, 2009):

$$\text{Indeks apoptosis (IA)} = \frac{\text{sel apoptosis}}{\text{total sel}} \times 100 \%$$

Indeks apoptosis adalah persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dari 10 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak (Hartono, 2009). Hasil analisis indeks apoptosis tertera pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil analisis indeks apoptosis

Kelompok	Sel hidup	Sel mati	Indeks Apoptosis (IA) (%)	Kenaikan IA (%)
Kontrol negatif	921	79	7,9	0
Kontrol positif	819	181	18,1	10,2
Dosis 50 mg/KgBB	712	288	28,8	20,9
Dosis 100 mg/KgBB	707	294	29,4	21,5
Dosis 150 mg/KgBB	675	325	32,5	24,6

Indeks apoptosis terbesar adalah mencit kelompok dosis 150 mg/KgBB yaitu 32,5 %, diikuti kelompok dosis 100 mg/KgBB sebesar 29,4 %, kemudian kelompok dosis 50 mg/KgBB sebesar 28,8 %, kelompok kontrol positif sebesar 18,1 % dan terendah adalah kelompok kontrol negatif dengan indeks apoptosis sebesar 7,9 %. Semakin tinggi dosis daun widuri yang diberikan, indeks apoptosis juga semakin besar. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun widuri mampu mengurangi pertumbuhan sel tumor yang ditunjukkan dengan indeks apoptosis yang lebih besar dibandingkan dengan mencit kontrol negatif. Hal ini dapat dikarenakan di dalam ekstrak daun widuri mengandung senyawa sitotoksik maupun antioksidan yang mampu menghambat pertumbuhan tumor. Mencit kontrol positif juga mampu mengurangi pertumbuhan sel tumor, yang ditunjukkan dengan kenaikan indeks apoptosis sebesar 10,2 %. Namun kemampuannya masih lebih rendah dibandingkan dengan mencit yang diberikan ekstrak daun widuri

dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB. Hasil indeks apoptosis ini sebanding dengan hasil analisis berat tumor dimana mencit kelompok negatif memiliki berat tumor terbesar, diikuti dengan mencit kontrol positif dan mencit yang diberikan ekstrak daun widuri.

Selain perhitungan indeks apoptosis, analisis imunohistokimia juga dilakukan secara semikuantitatif menggunakan skoring metode Allred. Pada analisis skoring Allred, dilakukan penilaian terhadap dua macam kategori, yaitu jumlah atau persentase sel yang terekspresi positif dan intensitas warnanya. Nilai IS menunjukkan skor intensitas, yaitu 0 (negatif atau tak terpulas warna coklat), 1 (warna coklat lemah), 2 (warna coklat sedang) dan 3 (warna coklat kuat). Nilai IP menunjukkan persentase warna coklat, yaitu 0 (tidak ada yang terpulas, 1 ($\leq 1/100$ sel terpulas), 2 ($\leq 1/10$ sel terpulas), 3 ($\leq 1/3$ sel terpulas), 4 ($\leq 2/3$ sel terpulas) dan 5 (seluruh sel terpulas). Penjumlahan IS dan IP adalah skor total IHK, sehingga skor IHK dapat bervariasi antara 0 sampai 8 (Allred, 1998 dalam Hartono, 2009). Hasil skor IHK kaspase-3 tertera pada Tabel 4.10. Data skor IHK Kaspase-3 tertera pada Lampiran 10.

Tabel 4.10 Hasil analisis skor IHK kaspase-3

Kelompok	Skor IHK Kaspase-3 ¹
Kontrol negatif	3,90 ± 0,57
Kontrol positif	4,00 ± 0,47
Dosis 50 mg/KgBB	4,70 ± 1,06
Dosis 100 mg/KgBB	5,30 ± 0,82
Dosis 150 mg/KgBB	5,50 ± 0,53

¹ Nilai menunjukkan rata-rata skor IHK kaspase-3 ± standar deviasi

Analisis skor IHK kaspase-3 dilakukan dengan uji Kruskal-Wallis dikarenakan data tidak memiliki distribusi yang normal. Hasil uji statistika Kruskal-Wallis diperoleh $p=0,000$ ($p<0,05$) yang menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian analisis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan. Hasil uji Mann-Whitney ditunjukkan pada Tabel 4.11.

Tabel 4.11 Hasil signifikansi (p) uji Mann-Whitney dari skor IHK

Kelompok	Kontrol negatif	Kontrol positif
Kontrol negatif	-	0,654
Kontrol positif	0,654	-
Dosis 50 mg/KgBB	0,047	0,058
Dosis 100 mg/KgBB	0,001	0,001
Dosis 150 mg/KgBB	0,000	0,000

Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa kelompok yang menunjukkan skor IHK yang berbeda signifikan adalah mencit kelompok kontrol negatif dengan kelompok terapi dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB (nilai $p<0,05$) Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri mampu meningkatkan ekspresi kaspase-3 pada mencit yang diinduksi DMBA. Menurut (Mantha *et al.*, 2006) karena kaspase-3 diketahui mengakibatkan apoptosis, maka peningkatan kaspase-3 dapat berarti juga peningkatan apoptosis, sehingga jumlah sel tumor juga akan menurun.

Hasil skor kaspase-3 ini sebanding dengan indeks apoptosis dan berat tumor dimana semakin tinggi skor kaspase-3 dan indeks apoptosis, berat tumor semakin

kecil. Sedangkan mencit kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol positif ($p=0,654$; $p>0,05$). Hal ini dimungkinkan karena pemberian obat Metotreksat selama 2 minggu belum mampu meningkatkan ekspresi kaspase-3 secara efektif dibandingkan dengan pemberian terapi ekstrak daun widuri.

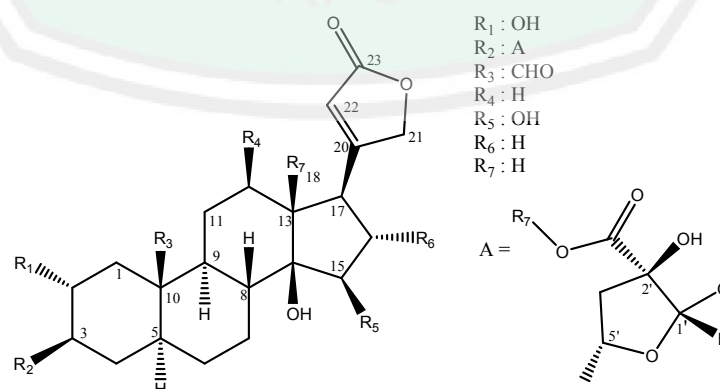
Mencit kelompok terapi dosis 100 dan 150 mg/KgBB juga menunjukkan perbedaan skor IHK yang signifikan dengan kelompok kontrol positif ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa mencit yang diberikan ekstrak daun widuri dosis 100 dan 150 mg/KgBB dapat meningkatkan ekspresi kaspase-3 yang lebih tinggi dibandingkan dengan mencit kontrol positif yang diberikan obat kemoterapi Metotreksat. Sedangkan mencit dosis 50 mg/KgBB tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol positif ($p=0,058$, $p>0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak widuri dosis 50 mg/KgBB dan obat Metotreksat memberikan pengaruh yang sama terhadap peningkatan ekspresi kaspase-3.

4.6 Dugaan Mekanisme Ekstrak Etanol Daun Widuri dalam Menghambat Pertumbuhan Tumor

Ekstrak daun widuri dosis 50, 100 dan 150 mg/Kg BB mampu menghambat pertumbuhan tumor dengan persentase hambatan berturut-turut sebesar 28,42 %; 71,55 % dan 78,22 %. Ekstrak daun widuri juga dapat meningkatkan apoptosis sel dan ekspresi kaspase-3 secara signifikan. Aktivitas ini diduga karena daun widuri mengandung senyawa yang bersifat sitotoksik ataupun senyawa yang bekerja sinergis dalam menghambat pertumbuhan tumor seperti antioksidan tanin.

4.6.1 Terpenoid

Hasil IHK kaspase-3 menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri mampu menghambat pertumbuhan tumor yang dibuktikan dengan meningkatnya indeks apoptosis dan ekspresi kaspase-3. Diduga aktivitas ini dipengaruhi oleh senyawa terpenoid dalam daun widuri. Terpenoid dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan meningkatkan apoptosis sel melalui peningkatan ekspresi kaspase-3. Menurut Kothakota *et al* (1997) kaspase-3 terbukti sebagai mediator kunci proses apoptosis pada sel mamalia. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wong *et al* (2011) bahwa terpenoid dalam daun widuri mampu menghambat pertumbuhan atau menginduksi apoptosis (kematian) sel kanker. Seperti senyawa antikanker *taxane* dari tanaman *Taxus brevifolia* yang juga merupakan senyawa terpenoid. Seeka *et al* (2010) menyatakan bahwa salah satu senyawa golongan terpenoid dalam daun widuri yang diketahui mempunyai aktivitas sitotoksik adalah kardenolid. Misalnya *15-β-hydroxy-calactinic acid* telah teruji memiliki efek hambatan melawan sel kanker.



Gambar 4.4 Struktur senyawa kardenolid *15-β-hydroxy-calactinic acid* ($\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{11}$) dalam daun widuri (Seeka *et al.*, 2010)

Yalon *et al* (2004) menjelaskan bahwa senyawa akan mengaktifasi protein p53 yang berfungsi sebagai pengatur atau pelindung sel. DNA yang rusak atau termutasi akibat DMBA, akan menginduksi protein p53 yang kemudian akan mengaktifkan transkripsi protein p21, sehingga menyebabkan penekanan atau hambatan pada pembentukan semua enzim *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Hal ini akan menyebabkan protein *cyclin* menjadi inaktif, akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S, proses sintesis RNA pada fase G1 dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti. Keadaan ini akan mengakibatkan sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena terjadi kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis. Protein p53 selain sebagai pengatur atau pelindung siklus sel, secara patologis juga berperan dalam proses apoptosis melalui aktivasi protein Bax yang akan merangsang mitokondria untuk memproduksi sitokrom-C. Adanya sitokrom-C bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) menyebabkan aktivasi *caspase inisiator* (caspase 9). Caspase 9 ini bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya *caspase executor* (caspase-3). Kemudian caspase-3 mengaktifasi DNAase yang selanjutnya akan memecah DNA menjadi fragmen dan terjadi peningkatan apoptosis sehingga terjadi hambatan pertumbuhan tumor.

4.6.2 Tanin

Wong *et al* (2011) menyatakan bahwa daun widuri mengandung senyawa tanin dimana merupakan senyawa polifenol yang bekerja sebagai antioksidan yang dapat melindungi kerusakan oksidatif sel dari radikal superoksida dan lemak

peroksida sehingga mampu menghambat pertumbuhan tumor. Lebih lanjut Fresco *et al* (2006) menjelaskan bahwa salah satu mekanisme senyawa fenolik seperti tanin adalah berhubungan dengan kandungan senyawa antiradikalnya dalam menetralkan spesies reaktif seperti anion superoksida, radikal hidroksil, radikal oksigen, nitrit oksida dan peroksida nitrit. Senyawa polifenol dapat mengaktifkan signal kematian sel dan menginduksi apoptosis pada prekanker ataupun sel *malignat* (ganas) sehingga dapat menghambat perkembangan ataupun progresi kanker.

4.7 Pemanfaatan Daun Widuri dalam Perspektif Islam

Pemanfaatan tanaman telah dijelaskan dalam Alqur'an bahwa alam raya beserta isinya diciptakan dan ditundukkan Allah untuk manusia (Shihab, 2002). Sebagaimana Allah berfirman dalam surat al-Jatsiyah ayat 13:

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ



“Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir.” (QS. Al-Jatsiyah: 13).

Ash-Shiddieqy (2000) menjelaskan bahwa Allah menundukkan segala yang di langit dan di bumi untuk kemaslahatan manusia. Manusia dengan kekuatan akal dan pikiran yang diberikan kepada Allah dapatlah memanfaatkan alam untuk mencapai tujuan-tujuannya. Sesungguhnya yang demikian itu terdapat

tanda-tanda kekuasaan Allah bagi orang yang suka berfikir. Sehingga kita yang menuju insan Ulul albab hendaknya memiliki pemahaman yang mendalam serta berfikiran tajam terhadap apa yang telah Allah anugerahkan. Penundukan tersebut secara potensial terlaksana melalui hukum-hukum alam yang ditetapkan Allah dan kemampuan yang dianugerahkan-Nya kepada manusia. Ini berarti manusia berpotensi mengetahui rahasia alam raya dan mengantarkan manusia untuk memanfaatkan alam yang telah ditundukkan oleh Allah (Shihab, 2002). Salah satu yang dapat dimanfaatkan dari alam adalah tumbuh-tumbuhan. Pemanfaatan tumbuhan juga dijelaskan dalam Alqur'an surat Luqman ayat 10.

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَٰ 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 memperkembang biakkan 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).

Kata (كريم) *karim* pada ayat di atas digunakan untuk mensifati segala sesuatu yang baik sesuai objeknya. Rizqi yang *karim* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Sehingga pasangan kata tumbuhan yang *karim* adalah tumbuhan yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan dari penanamnya (Shihab, 2002). Salah satu hal yang diharapkan dari tanaman adalah manfaatnya sebagai tanaman obat. Tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dapat

digunakan sebagai obat berbagai penyakit. Ini merupakan anugerah Allah yang harus dipelajari dan dimanfaatkan karena Allah memerintahkan kepada kita untuk memperhatikan segala ciptaan-Nya dengan cara melakukan studi eksperimen alam. Tujuannya untuk menunjukkan pentingnya penalaran dan perenungan serta mengajari kita untuk tidak puas hanya dengan mengamati apa yang ada di alam (Pasya, 2004). Dengan ilmu pengetahuan yang didukung keimanan untuk menemukan manfaat dari tanaman ciptaan Allah maka kita akan mengetahui salah satu tanda kekuasaan Allah sehingga semakin bertambahlah rasa syukur dan iman kita.

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman widuri (*Calotropis gigantea*). Kebaikan tanaman widuri dapat dilihat dari hasil penelitian ini bahwa daun widuri berpotensi sebagai obat antikanker. Ekstrak daun widuri dosis 50 mg/Kg BB, 100 mg/Kg BB, 150 mg/Kg BB menunjukkan berat tumor yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif. Semakin tinggi dosis daun widuri yang diberikan, semakin rendah berat tumornya. Hal ini menunjukkan bahwa daun widuri memiliki aktivitas hambatan pertumbuhan tumor ini. Hasil ini diperkuat dengan hasil analisis imunohistokimia kaspase-3 untuk melihat respon imun tubuh dalam menghambat pertumbuhan tumor setelah pemberian terapi dengan menghitung sel yang mengalami apoptosis (kematian). Ekstrak daun widuri dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB mampu meningkatkan ekspresi kaspase-3 secara signifikan ($p < 0,05$) sehingga meningkatkan indeks apoptosis berturut-turut sebesar 20,9 %; 21,5 % dan 24,6 %. Hasil ini

menunjukkan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dengan ukuran-ukuran tertentu, sebagaimana firman-Nya dalam surat al-Qamar ayat 49.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

“*Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.*” (QS. Al-Qamar: 49)

Menurut bahasa, kata (قدر) *qadar* pada ayat di atas berarti kadar tertentu yang tidak bertambah atau berkurang, atau berarti kuasa. Atau berarti ketentuan dan sistem yang ditetapkan terhadap segala sesuatu. Ayat ini menyangkut pengaturan Allah serta keseimbangan yang dilakukan-Nya antar makhluk. (Shihab, 2002). Berdasarkan hasil penelitian diketahui dosis efektif dari ekstrak daun widuri dalam menghambat pertumbuhan tumor adalah dosis 150 mg/KgBB. Aktivitas penghambatan tumor dalam daun widuri dimungkinkan karena kandungan senyawa aktif seperti terpenoid dan tanin. Dimana terpenoid mampu menghambat pertumbuhan dan menginduksi apoptosis (kematian) sel kanker, sedangkan tanin merupakan senyawa polifenol yang bekerja sebagai antioksidan (Wong *et al.*, 2011). Daun widuri yang merupakan tanaman perdu ternyata memiliki manfaat sebagai tanaman obat. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada satu pun yang Allah ciptakan sia-sia dan semuanya diberi potensi yang sesuai dan dengan kadar yang cukup untuk melaksanakan fungsinya (Shihab, 2002). Allah menciptakan alam dengan sempurna dan dengan ukuran-ukuran tertentu. Tumbuh-tumbuhan memiliki kelas dan spesies yang berbeda serta kandungan

senyawa dan fungsi yang berbeda-beda pula. Semua berjalan sesuai aturan dan sistem yang teliti, sehingga manusia dapat memanfaatkannya untuk melengkapi keperluan dan tercapailah tujuannya.

Aktivitas yang dimiliki tanaman widuri ini dapat digunakan sebagai acuan di bidang farmakologi bahwa tanaman ini berpotensi sebagai tanaman obat. Sebagaimana sabda Nabi Muhammad saw yang artinya :

“Diriwayatkan dari Jabir r.a, dari Rasulullah SAW bersabda; “Setiap penyakit itu ada obatnya. Apabila obat suatu penyakit telah tepat sembuhlah ia dengan izin Allah” (HR. Muslim).

Hadits di atas menunjukkan bahwa Allah memberikan obat bagi semua penyakit, termasuk kanker. Apabila obat suatu penyakit telah tepat, maka dengan izin Allah sembuhlah penyakit tersebut.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri (*Calotropis gigantea*) menunjukkan adanya triterpenoid dan tanin. Uji penegasan dengan KLTA diperoleh 5 noda triterpenoid dengan R_f 0,33; 0,49; 0,54; 0,78 dan 0,95 menggunakan eluen terbaiknya kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v). Sedangkan tanin diperoleh 1 noda tanin dengan R_f 0,55 menggunakan eluen terbaiknya butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v).
2. Ekstrak etanol 70 % daun widuri dosis 50, 100 dan 150 mg/KgBB mampu mengurangi berat tumor pada mencit dan dapat meningkatkan indeks apoptosis sel berturut-turut sebesar 20,9 %; 21,5 % dan 24,6 % serta dapat meningkatkan ekspresi kaspase-3 secara signifikan.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan elusidasi senyawa aktif dalam ekstrak daun widuri terutama golongan senyawa terpenoid dan tanin.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai toksisitas akut dan subkronis untuk mengetahui keamanan dan ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) terhadap organ.

3. Perlu penambahan jumlah pengulangan mencit sehingga dapat diperoleh data yang lebih baik.



DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam. Buku Materi Pokok, Modul 4 – 6*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Ahmed, M.K.K., Rana A.C. and Dixit V.K. 2005. Calotropis Spesies (Asclepiadaceae)-A Comprehensive Review. *Pharmacognosy Magazine*, Vol 1, Issue 2.
- Akbar, H.R. 2010. Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*) Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Allred, D.C., Harvey J.M., Berardo M., and Clark G.M. 1998. Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer by Immunohistochemical Analysis. *Mod Pahol*, 11: 155-168.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1984. *Official Methods of Analysis of the Associatin of Official Analytical Chemist*. Edited by Helrich, K. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist Inc.
- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani, D dan Rasyid, R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia Cumini* Merr. *Jurnal Sains Teknologi Farmasi*, 11 (2): 89 – 93.
- Aryudhani, N. 2011. Mekanisme Aktivitas Antitumor Bubuk Daun Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) Pada Mencit C3H yang Ditransplantasi Sel Tumor Payudara. *Tesis* Tidak Diterbitkan. Program Mayor Ilmu Pangan IPB.
- Ash-Shabuni, M.A. 2001. *Cahaya Al-Quran: Tafsir Tematik Surat Huud – Al-Isra'*. Jakarta: Pustaka Al-Kautsar.
- Ash-Shiddieqy, M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Astuti, L.S. 2007. *Klasifikasi Hewan*. Jakarta: Kawan Pustaka.
- AVMA (American Veterinary Medical Association). 2013. *AVMA Guidline for the Euthanasia of Animals: AVMA*.
- Bakotic, B.W. 2006. Tumor of the Soft Tissue of the Lower Extremitiy. *Artikel*. http://www.datatrace.com/downloads/dl/file/id/25/exclusive_look_inside.pdf. (diakses tanggal 6 Maret 2014).

- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica nois ex lume* terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Bayyinah, I. 2013. Identifikasi dan Uji Aktivitas Ekstrak Diklorometana Daun Bunga Matahari Sebagai Antimalaria Secara *In-vivo* Pada Mencit Jantan. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bevelander, G. and Ramaley, J.A. 1988. *Dasar-Dasar Histologi Edisi Kedelapan*. Jakarta: Erlangga.
- Branata, B. 2013. Fibrosarkoma. www.Fibrosarcoma.htm. (diakses tanggal 7 Desember 2013).
- Burningham, Z; Mia H.; Logan S., and Joshua D.S. The Epidemiology of Sarcoma. *Clinical Sarcoma Research*, 2: 14.
- Cance, L.M.K., et al. 2010. Fibrosarcoma. *Pathophysiology The Biologic for Disease in Adult and Children 6th Edition*. Canada: Mosby Elsevier. pp: 1591.
- Cance, L.M.K., et al. 2010. Ionizing Radiation. *Pathophysiology The Biologic for Disease in Adult and Children 6th Edition*. Canada: Mosby Elsevier. pp: 73 – 75.
- Cotran, R.S., Kumar V. and Robbins S.L. 1994. *Pathologic Basic of Desease 6th Edition*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Cotran, R.S., Kumar V. and Collins, T. 1999. *Pathologic Basic of Desease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Coutrier, F. 2008. *Propagasi Malaria In Vivo Penggunaan hewan Coba dalam Penelitian Malaria*. Jakarta: Pelatihan Propagasi Malaria-Lembaga Biologi Molekul Eijkman.
- Christian, P. 2009. Mechanism of Action, Metabolism, and Pharmacology of Methotrexate. http://www.medscape.org/viewarticle/712891_2 (diakses tanggal 27 Februari 2014).
- Danciu, M., Maria S.M. and Andreea D. 2009. *Atlas of Pathology 3rd Edition*. Romania: University of Medicine and Pharmacy.
- Dandekar, S., Sukumar S., Zarbl H., Young L. and Cardiff R. 1986. Specific Activation of Cellular Harvey-Ras Oncogene in

Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Mouse Mammary Tumors. *Mol cell Biol*, 6: 4104 – 4108.

Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati. *Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*: FMIPA Universitas Andalas Padang.

Departemen Farmakologi dan Terapeutik. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI.

Dalimartha, S. 2003. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Mengungkap Kekayaan Tumbuhan Obat {book on-line}. Jakarta: Niaga Swadaya <http://books.google.co.id/books?id=vmrbQE4jfYcC>. (diakses tanggal 10 Juni 2013).

Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1*. Jakarta: Depkes RI.

Ditjenbun (Direktorat Jenderal Perkebunan). 2010. Tanaman Perkebunan. <http://ditjenbun.deptan.go.id/budtanreyar>. (diakses tanggal 10 Juni 2013).

Ekasari, W., Widyawaruyanti A. dan Hafid A.F. 2005. Uji Antimalaria Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun Cassia Siamea pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Laporan Penelitian* Tidak Diterbitkan. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Eroschenko, V.P. 2000. *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations 10th Edition*. Philadelphia, Pennsylvania : Lippincott Willian and Wilkins, Inc.

Faraouq. 2003. Ekstrak Sebagai Salah Satu Pengembangan Bentuk Obat Tradisional. *Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXIII*. Jakarta. 45 – 52.

Fawcet, Don W. 2002. *Buku Ajar Histologi Edisi 12*. Jakarta: EGC.

Felicia. 2009. Efek Neuroterapi Ekstrak Air Akar *Acalyphaindica* Linn. (Akar Kucing) Dosis 20 mg dan 25 mg secara *Eks Vivo* Pada Saraf Otot Gastroknemius Katak. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Fessenden R. J dan J. S. Fessenden. 1982. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1*. Terjemahan Aloysius Hadyana Pudjatmaka. Jakarta: Erlangga.

- Fitriyani, A., Winarti L., Muslichah S. dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Pada Tikus Putih. *Majalah Obat Tradisional*, 16 (1): 34 – 42.
- Fresco, P., Borges F., Diniz C. and Marques M.P.P. 2006. New Insight on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Medical Research Reviews*, 26 (6): 747-766.
- Ginsburg, H. and Deharo E. 2011. A Call for Using Natural Compounds in The Development of New Antimalarial Treatment- An Introduction, *Malar J.* 10, Suppl. 1. pp S1.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi, Edisi Kedua*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Habib. 2008. Antikanker pada Siklus Sel. www.habib.blog.ugm.ac.id/htm. (diakses tanggal 7 Desember 2013).
- Habib, M.H., Aziz M.A. and Karim M.R. 2010. Inhibition of Ehrlich ascites Carcinoma by Ethyl Acetate Extract from The Flower of *Calotropis gigantea* L. in Mice. *J. Appl Biomed*, 8: 47 – 54.
- Habib, M.H. and Karim M.R. 2011. Evaluation of Antitumour Activity of *Calotropis gigantea* L. Root Bark Against Ehrlich Ascites Carcinoma In Swiss Albino Mice. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*: 786– 790.
- Hakkak, R., Andy W.H., Stewart L.M., Pippa M.S., George J.F., Chan H.J., Thomas K.E. and Soheila K. 2005. Obesity Promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-Induced Mammary Tumor Development in Female Zucker Rats. *Breast Canc Res*, 7: 627 – 633.
- Haque, M., *et al.* 2012. Evaluation of Antihyperglycemic and Antinonicetive Properties of Leaves of *Calotropis gigantea* R. BR. (Asclepiadaceae)-A Medical Plant of Bangladesh. *Original Article Advances in Natural and Applied Sciences*, 6 (8): 1508 – 1514.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Hargono, D. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Depkes RI.
- Hartono, N.W.D. 2009. Pengaruh *Alpinia galanga* (Lengkuas) Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dan Indeks Apoptosis pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H. *Tesis* Tidak diterbitkan. Program Magister Ilmu Biomedik Patologi Anatomi Undip.

- Hastuti, N.W. dan Humairah M.L. 2011. Manfaat Pemeriksaan Imunohisto(sito)kimia. *CDK* 186, 38 (5): 384 – 386.
- Hatim, N.B. 2012. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Surian (*Toon sinensis*) pada Tikus Betina *Sprague Dawley* yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)antrasena. *Skripsi* Tidak diterbitkan. Bogor: Departemen Biokomia IPB.
- Hayati, E.K., Ghanaim F., dan Lilik S. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*, 4 (2): 193-200.
- Hayati, E.K., Akyunul J. dan Rahmawati N. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.). *Molekul*, 7 (1): 20 – 32.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2010. GLOBOCAN 2008 Fast Stats. France: GLOBOCAN (IARC) Section of Cancer Information (1/6/2013). <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. (diakses tanggal 1 Juni 2013).
- IFAS (The Institute of Food and Agricultural Sciences). 2010. *Calotropis gigantea*. Florida: University of Florida.
- Indrayani, L., Hartati S. dan Lydia S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana*.
- Jacobson, K and Keller K.A. 2006. *Toxicology Testing Handbook*. Washington DC: Ork Basel.
- Jagtap, Rageeb, Usman, Salunkhe P.S. and Gagrani M.B. 2010. Anti-Inflammatory Activity of *Calotropis gigantea* Linn. Leaves Extract on *In-vitro* Models. *International Journal of Pharmaceutical Review and Research*, Vol I, Issue 2.
- Jayakumar, D., Mary S.J. and Santhi R. J. 2010. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activity of *Calotropis gigantea* and *Vinca rosea* Using *In vitro* Models. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol.3 No. 7.
- Junaidi, I. 2007. *Kanker*. Jakarta: PT Buana Ilmu Populer.
- Kartikasari, F.G. 2010. Uji Toksisitas Fraksi dari Spons Laut Xestospongia dengan Metode Brine Shrimp Test (BST). *Tugas akhir/Skripsi* Tidak diterbitkan. Surabaya: Program Studi Biologi Fakultas MIPA ITS.

- Katsier, I. 1993. Tafsir Ibnu Katsier Jilid 7. Diterjemahkan oleh Salim B dan Said B. Kuala Lumpur: Victory Agencie.
- Katsir, I. 2004. Diterjemahkan oleh M. Abdul Ghoffar et al. Tafsir Ibnu Katsir. Bogor: Pustaka Imam Ass-Syafi'i.
- Kothakota, S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Koths K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T. 1997. Caspase-3 Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *J. Science*, 278 (5336): 294 – 298.
- Krygier, J.E and Valerae L. 2009. Fibrosarcoma of Bone: Review of A Rare Primary Malignancy of Bone. San Jose. <http://terryhealey.com/wp-content/Fibrosarkoma.pdf>. (diakses tanggal 7 Desember 2013).
- Kumar, G., Karthik, L. and Rao, K.V.B. 2010. Antibacterial Activity of Aqueous Extract of *Calotropis Gigantea* Leaves- An *In Vitro* Study. *Article 024* Vol.4 Issue 2.
- Kumar, G., Karthik L. and Rao K.V.B. 2011. A Review on Pharmacological and Phytochemical Profile of *Calotropis gigantea* Linn. *Pharmacologyonline*, 1: 1 – 8.
- Kumar, S.S, Mudiganti R.K.R. and Maruthaiveeran P.B. 2012. Antiproliferative Role of *Indigofera aspalathoides* on Methylcholanthrene Induced Fibrosarcoma in Rats. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (12): 966 – 974.
- Kustiariyah. 2006. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivasi Biologis Senyawa Steroid dari Teripang Sebagai Aprodisiaka Alami. *Tesis Tidak Diterbitkan*. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Lisdawati, V. 2009. Kajian Terhadap Prospek Pengembangan Bahan Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*P macrocarpa*) sebagai Kandidat *New Chemical entity* (NCE) untuk Pengobatan Kanker (Sitostatika). *Bul Penel. Kesehatan*, (37): 23 – 32.
- Listiani, L., Fidriannyi I. dan Sukrasno. 2005. Telaah Kandungan Kimia Daun Kucai (*Allium schoenoprasum* L., Liliaceae). Bandung: *Jurnal Sekolah Farmasi ITB*. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>. (diakses tanggal 6 Januari 2014).
- Maharani, S. 2009. *Kanker: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*. Yogyakarta: Kata Hati.

- Mangan, Y. 2003. Cara Bijak Menaklukan Kanker. {googlebook} Jakarta: AgroMedia.
http://books.google.co.id/books?id=j5aJlun605QC&pg=PP1&lpg=PA2&ots=duAEOUWi_p&dq=cara+pengobatan+kanker&lr= (diakses tanggal 2 Juni 2013).
- Mankin, H.J. dan Francis J.H. 2005. Diagnosis, Classification and Management of Soft Tissue Sarcoma. *J. Cancer Control*, 12 (1): 5 – 21.
- Manoharan, S., Mookkan M. and Nagarethinam B. 2010. Chemopreventive Efficacy of Berberine in 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *J. Res. Pharm. Sci*, 1 (4): 521 – 529.
- Mantha, I.D., Supranowo dan Diana L. 2006. Expression of Cytosolic Aspartate-Specific Cysteine Protease-3 (Caspase-3) pada Jaringan Hati *Rattus norvegicus* (Wistar) Setelah Pemberian Subkronik Aflatoksin B1 (AFB1). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23(3): 107 – 112.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Marliana, S.D., Suryanti V. dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq. Swartz.*) Dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3 (1): 26 – 31.
- Mitelman F. and Levan G. 1972. The Chromosomes of Primary 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-Induced Rat Sarcoma. *Hereditas*, 71 (2): 325 – 333.
- Mora, E. dan Armon F. 2012. Optimasi Ekstraksi Triterpenoid Total Pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) yang Tumbuh di Riau. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 1(1): 11 – 16.
- National Cancer Institute, 2010. Tamoxifen: question and answer. <http://www.cancer.gov/cancer>. (diakses tanggal 6 Desember 2013).
- Nyiredy, Sz. 2002. Planar Acetate as A Film Forming Excipient in Controlled Drug Delivery. *Disertasi Tidak Diterbitkan*. Texas: Program Pascasarjana, University Health Science Center.
- Osaka, M., *et al.* Loss of Heterozygosity at The N-ras locus in 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-Induced Rat Leukimia. *Molecular Carcinogenesis*, 18: 206 – 212.

- Panigoro, N., Astuti I., Bahnan M., Prayudha D.C., Salfira, Wakita K. 2007. *Teknik Dasar Histologi dan Atlas Dasar-Dasar Histopatologi Ikan*. Jambi: Balai Budidaya Air Tawar Jambi. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Departemen Perikanan dan Ilmu Kelautan.
- Pasya, A. F. 2004. *Dimensi Sains al-Qur'an Menggali Ilmu Pengetahuan dari al-Qur'an*. Solo: Tiga Serangkai.
- Perron, N.R. Dan Brumahim, J.L. 2009. A Riview of The Antioxidant Mechanisms of Polyphenols Compounds Realated To Iron Binding: *Cell Biochem Biophys*, 53: 75 – 100.
- Purwaningsih, Y. 2003. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Biji Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Tugas akhir/Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Puspita, M.D.A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus ninuri*). *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas MIPA IPB.
- Rabi, T. and Bishayee A. 2009. Terpenoid and Breast Cancer Chemoprevention. *Breast Cancer Res. Treat*, 115: 223 – 239.
- Rao, K.N.V. 2010. *Study of Pharmacognostic, Phytochemical, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Amaranthus tricolor Linn. Leavs Extract*. India: Nalanda College of Pharmacy.
- Ren, W, Qiao Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medical Research Review*, 23 (4): 519 – 534.
- Riduwan. 2009. *Dasar-Dasar Statistika*. Bandung: Alfa Beta.
- Robbin. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins Ed 7*. Jakarta: EGC.
- Robbins, S.L. and Kumar V. 1995. *Buku Ajar Patologi 1 Edisi 4*. Jakarta: EGC.
- Russo J. and Russo I.H. 1996. Experimentally Induced Mammary Tumors In Rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39: 7 – 20.
- Sastrohamidjojo. 2007. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberti.
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Malang Press.

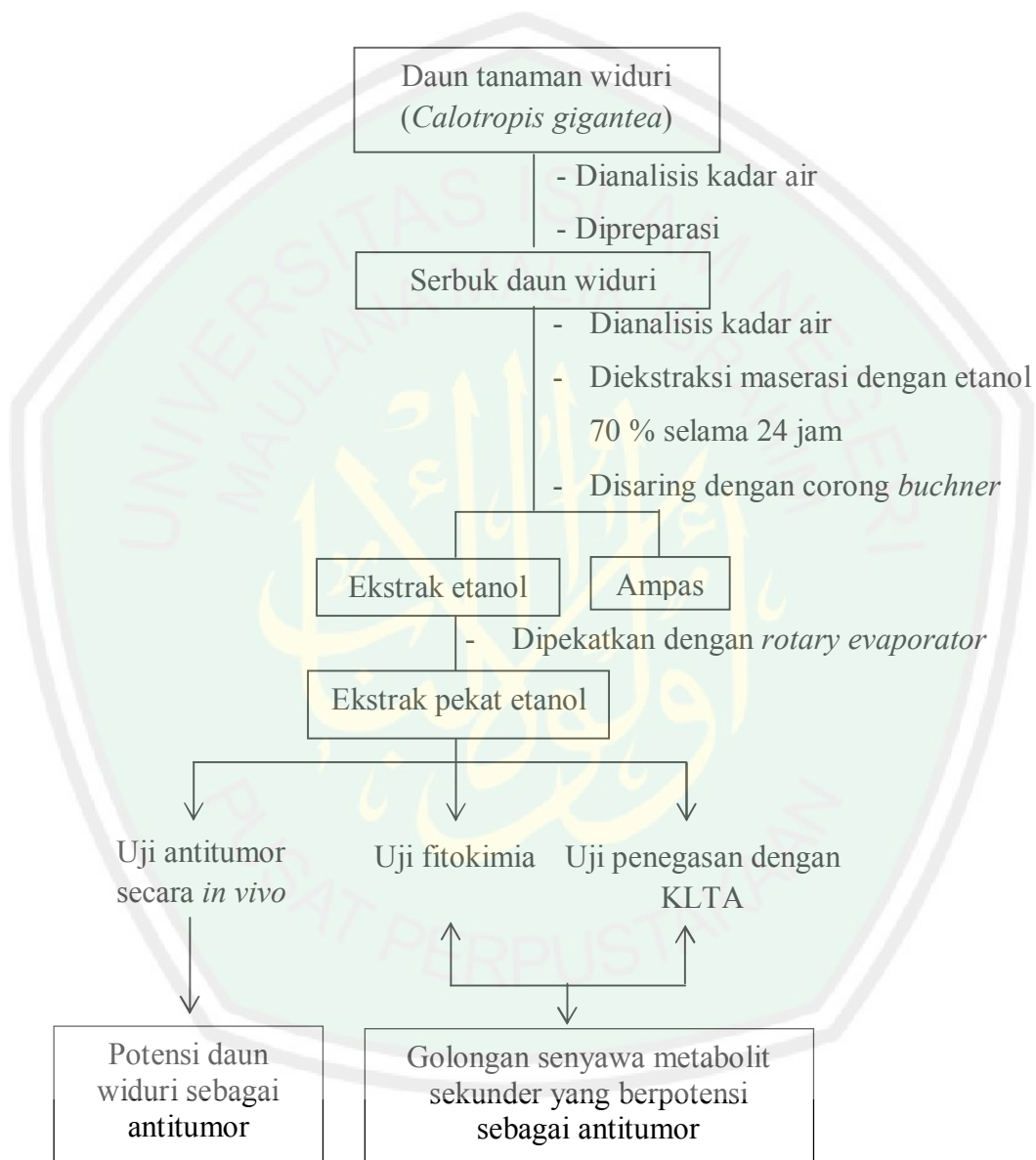
- Seeka, C. and Somyote S. 2010. Cytotoxic Cardenolides from the Leaves of *Calotropis gigantea*. *Chem. Pharm. Bull*, 58(5): 725-728.
- Setijono, M.M. 1985. Mencit (*Mus musculus*) sebagai Hewan Coba. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Fak. Kedokteran Hewan IPB.
- Shihab, Q. 2002. Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*, 35(1): 77 – 83.
- Sigma-Aldrich. 2007. 7,12-Dimethylbenz(α)antracena. Sigma. 1 – 6. <http://www.sigmaaldrich.com>. (diakses tanggal 2 Juni 2013).
- Singh, N, Neetesh K.J, Pushendra K, Navneet G, Pathak, Anupam K. and Swaroop C.M. 2010. *In Vitro* Antioxidant of *Calotropis gigantea* Hydroalcoholic Leaves Extract. *Der Pharmacia Lettre*, 2(3): 95 – 100.
- Singletary, K., MacDonald, Iovinelli M., Fisher C. and Walling M. 1998. Effect of The Betadiketones Diferuloylmethane (Curcumin) and Dibenzoylmethane on Rat Mammary DNA Adduct and Tumor Induced by 7,12-dimethylbenz(α)anthrazene. *Carcinogenesis*, 19: 1039 – 1043.
- Smith, J.B. dan Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- 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.
- Sriwahyuni. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas dengan Menggunakan Brine Shrimp. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.
- Sriwibowo, K. 2005. Akurasi Biopsi Aspirasi Jarum Halus sebagai Sarana dalam Menegakkan diagnosa Neoplasma Ganas Jaringan Lunak. *Bagian Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro*. Semarang. pp: 5 – 10 <http://eprints.undip.ac.id/12551/1/2005PPDS3637.pdf>. (diakses tanggal 8 Juni 2013).

- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Makroskopi*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Sudiana, I.K. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Suffredini, I.B., Bacchi E.M., Sakuda T.M.K., Ohara M.T., Younes R.N. and Varella A.D. 2002. Antibacterial Activity of Apocynaceae Extract and MIC of *Tabernaemontana angulata* Stem Organic Extract. *Braz J Pharm Sci*, 38(1): 89 – 94.
- Surveillance Epidemiology and End Result (SEER) Program. Stat Database: Incidence – SEER 9 Research Data. www.seer.cancer.gov. (diakses tanggal 30 November 2013).
- Suryanti, V., Dewi M, S. dan Kristinawati, D. 2005. Komponen Kimia Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.). *Jurnal Alchemy*, 4 (2): 28 – 34.
- Swapna, P., Stella R., Elumalai A., Chinna E. and Nirmala K. 2011. Evaluation of Antiulcer Activity of *Calotropis gigantea* R. Br Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 2 No. 11.
- Taqwim, A. 2011. Peran Fibroblas pada Proses Pennyembuh Luka. *Artikel.dentosca.wordpress.com*. (diakses tanggal 8 Februari 2014).
- Tuhu, P.F.S. 2008. *Efek Analgetika Ekstrak Etanol Daun Kayu Putih (Melaleuca leucadendron) Pada Mencit Jantan*. Jurnal Penelitian. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Underwood, J.C.E. 2000. *Patologi Umum dan Sistemik Edisi 2 Vol 2*. Diterjemahkan oleh Sarjadi. Jakarta: Penerbit Kedokteran EGC.
- Urmı, K.F, Mahboob S., Hossain K., Bhusal P. and Hamid K. 2012. Antioxidant Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of Different Parts of the Plant *Calotropis gigantea* R.Br. *J. Pharm. Sci&Res*, Vol. 4 (12).
- Wahyuono, Subagus. 2003. *Majalah Obat Tradisional*. Yogyakarta: PSOT dan UGM.
- Wang, G., Weiping T. and Robert R.B. 2005. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. *Nat Prod: Drug Discovery and Therapeutic Medicine* Edited by Lixin Zhang and A. L Demain. Totawa NJ: Humana Press Inc.

- Widyowati, R dan Rahman, A. 2010. Kandungan Kimia dan Aktivitas Ekstrak *Garcinia Celebica l.* Terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Shigella Dysentriae* dan *Candida Albicans*. *Majalah Farmasi Airlangga*, 8 (2): 23 – 27.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Buku. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Windriyati, Y.N., Budiarti, A. dan Azmi S.I. 2011. Aktivitas Mukolitik In Vitro Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocotum Ruiz dan Pav.*) Pada Mukosa Usus Sapi dan Identifikasi Kandungan Kimianya. *Prosiding Seminar Nasional*. Semarang: Publikasi Ilmiah Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
- Wong, S. L. 2008. Diagnosis and Management of Desmoid Tumors and Fibrosarcoma. *Journal of Surgical Oncology*, Vol. 97: 554 – 558.
- Wong, S.K, Yau Y.L., Noor R.A. and Fariza J.N. 2011. Assesment of Antiproliferatif and Antiplasmodial Activities of Five Selected Apocynaceae Species. *Research Article BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 11: 3.
- Wonohadi, E., Ayu P.D., Agustin B.D., Liasthirani S. dan Melani. 2006. Identifikasi Senyawa Anti Mikroba Rimpang Temu Girang (*Curcuma Heyneana Val & Van Zijp*) Secara Bioautografi. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 3 (2): 89 – 96.
- Yaligar, K. 2010. Premierly Phytochemical Investigation dan Screening of Anticonvulsant Activity of Leaves of *Calotropis gigantea* Linn. *Disertation* Not Published. Karnataka: Departmen of Pharmacognosy Rajiv Gandhi University of Health Science.
- Yalon, M., Shoshana G., Yardena S., Sara S. and Karl L.S. 2004. Suster Chromatid Separation at Human Telomeric Regions. *Journal of Cell Science*, 117 (10): 1961 – 1970.
- Yogesh, M., Singh A.P. and Pathak D. 2012. Comparison of Antidiarheal Activity of Hydroethanolic Extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* Leaves. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, (4): 32 – 33.
- Yulia, R. 2006. Kandungan Tanin dan Potensi Anti *Streptococcus mutans* Daun Teh *Var. Assamica* Pada Berbagai Tahap Pengolahan. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Tahapan Penelitian



Lampiran 2 Skema Kerja

L.2.1 Analisis Kadar Air

Daun dan Sampel kering

- Dipotong kecil-kecil daun
- Dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya
- Ditimbang sekitar 5 g
- Dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam
- Didinginkan dalam desikator selama ± 15 menit
- Ditimbang
- Diulangi perlakuan sampai diperoleh berat konstan
- Dihitung kadar air

Hasil

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

Ket: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan dengan oven pada suhu 30 – 37 °C

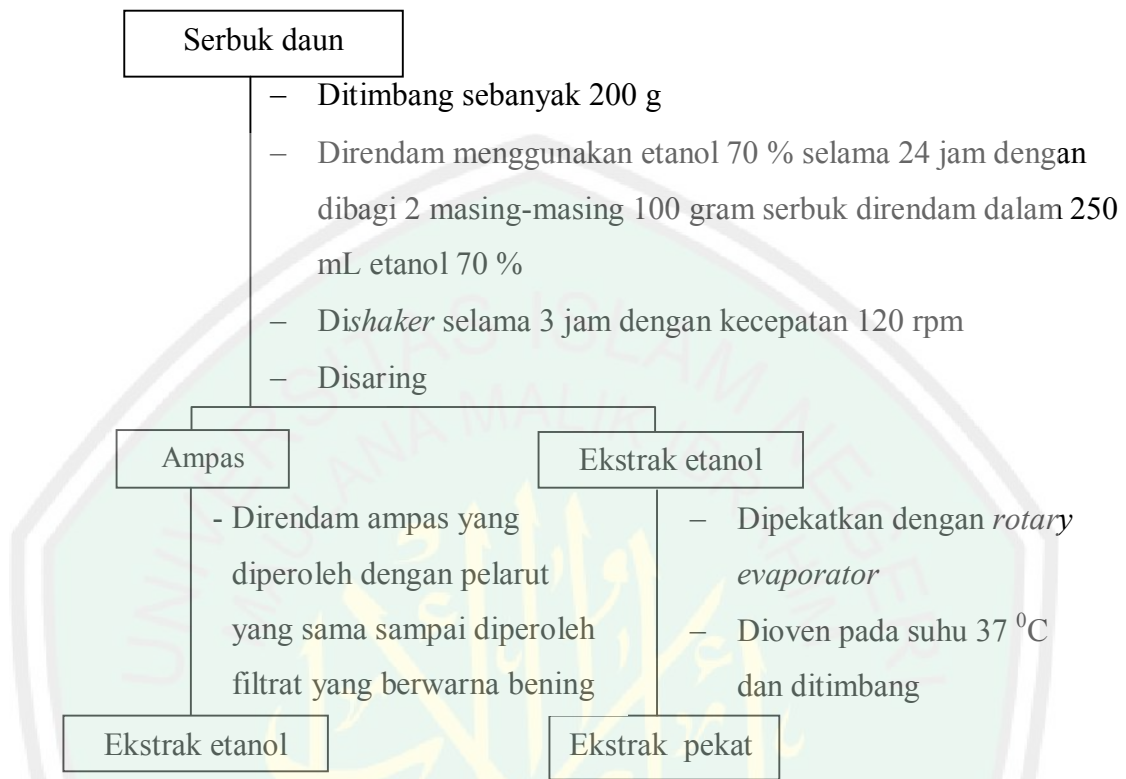
L.2.2 Preparasi Sampel

Sampel

- Diambil bagian daun tanaman widuri
- Dicuci bersih daunnya
- Dipotong kecil-kecil
- Dikeringkan dengan oven pada suhu 30 – 37 °C selama ± 5 jam
- Diserbukkan dengan ukuran 90 mesh

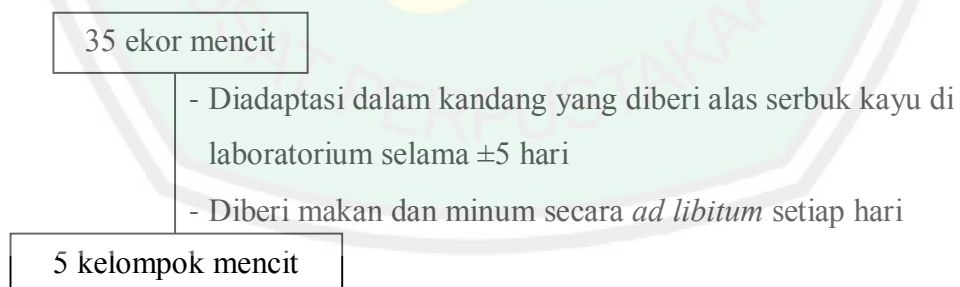
Serbuk daun widuri

L.2.3 Ekstraksi Golongan Senyawa dengan Metode Maserasi



L.2.4 Uji Antitumor

L.2.4.1 Persiapan Hewan Coba



L.2.4.2 Perlakuan Hewan Coba

5 kelompok mencit

- Diinduksi dengan 0,1 ml DMBA secara subkutan di tengkuk mencit menggunakan selama 6 minggu
- Diberi perlakuan seperti pada table L.2.4.2 sebanyak sekali sehari secara per oral menggunakan sonde lambung selama 14 hari
- Dikorbankan mencit menggunakan kloroform
- Diambil tumor
- Ditimbang

tumor

Tabel L.2.1 Perlakuan masing-masing kelompok

Kelompok	Perlakuan
Kontrol negatif	Diberikan CMCNa 0,5 %
Kontrol positif	Diberikan Metotreksat dosis 2,5 mg/kg BB
Dosis 1	Diterapi ekstrak etanol daun widuri dosis 50 mg/Kg BB
Dosis 2	Diterapi ekstrak etanol daun widuri dosis 100 mg/Kg BB
Dosis 3	Diterapi ekstrak etanol daun widuri dosis 150 mg/Kg BB

L.2.5 Uji Fitokimia dengan Reagen

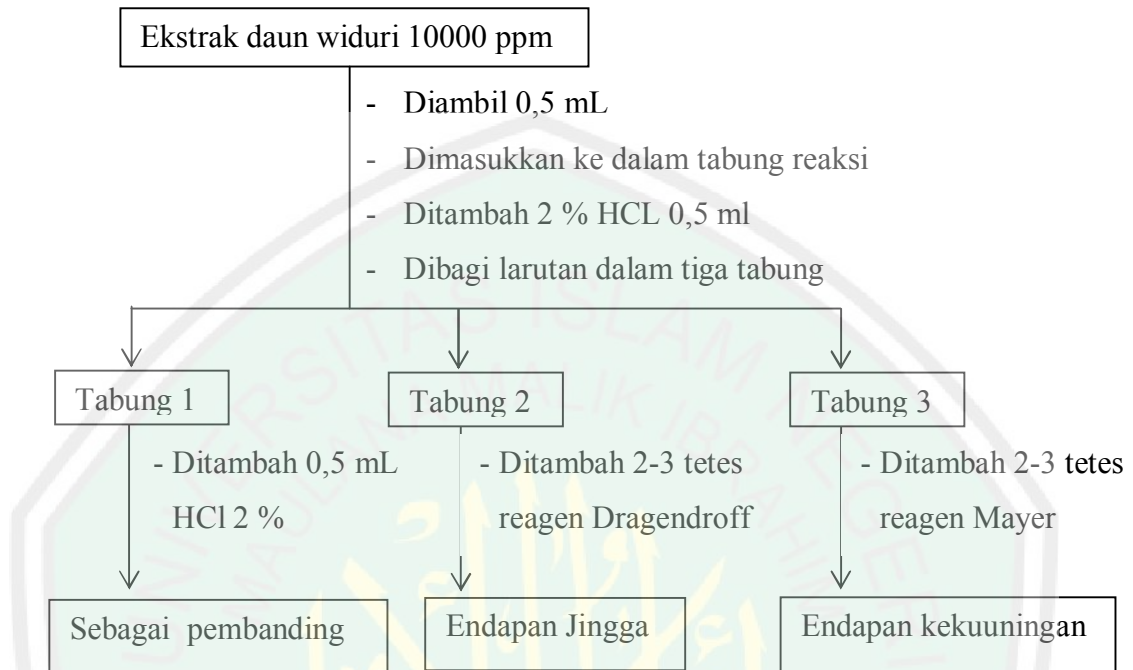
L.2.5.1 Flavonoid

Ekstrak daun widuri 10000 ppm

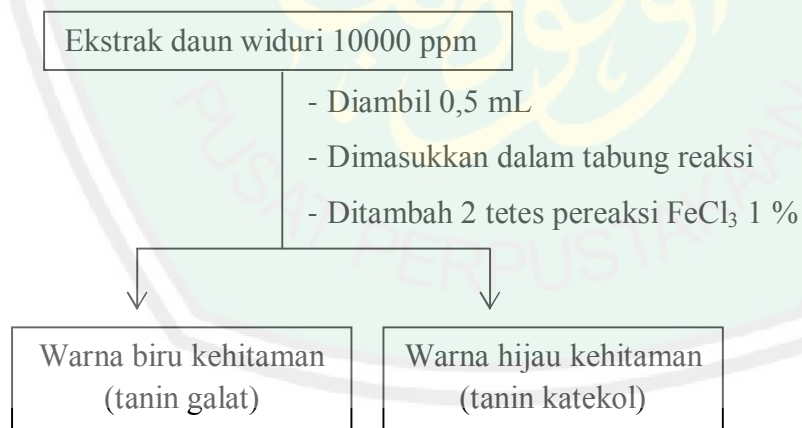
- Diambil 0,5 mL
- Dimasukkan dalam tabung reaksi
- Dilarutkan dalam 1 mL metanol 50 % panas
- Ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat

Merah/jingga

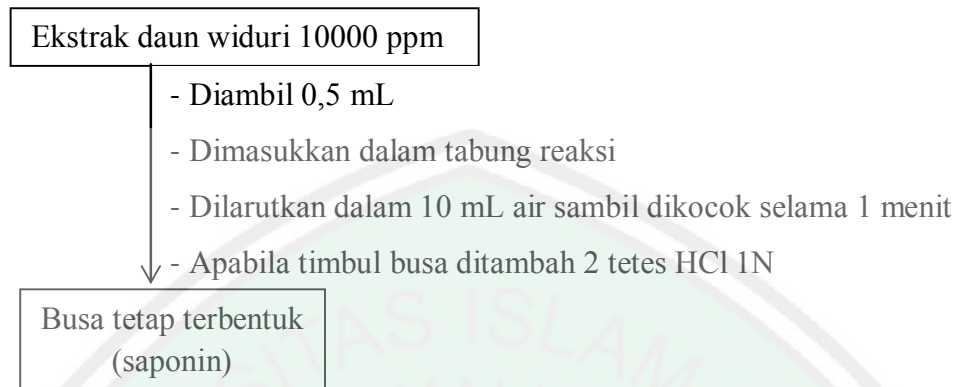
L.2.5.2 Alkaloid



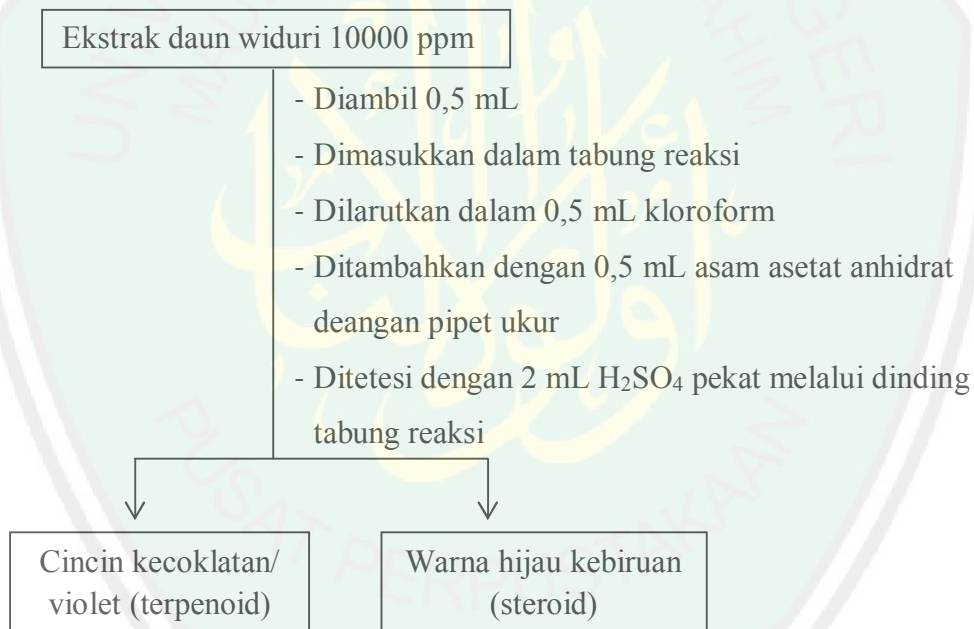
L.2.5.3 Tanin



L.2.5.4 Saponin

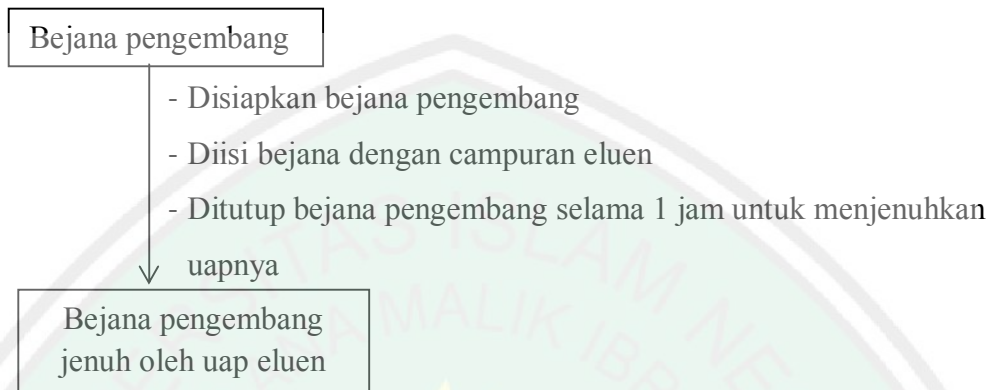


L.2.5.5 Terpenoid/Steroid

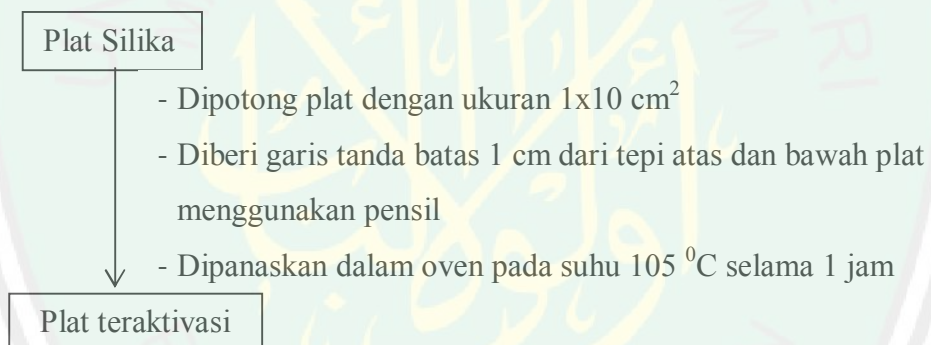


L.2.6 Uji Penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik

L.2.6.1 Penjenuhan Bejana Pengembang



L.2.6.2 Aktivasi Plat Silika



L.2.6.3 Pemisahan Golongan Senyawa dengan KLT

Ekstrak daun widuri 1.000.0000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> – Ditotolkan sebanyak 5-10 totolan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika gel F₂₅₄ 1x10 cm² dengan pipa kapiler – Dikering anginkan – Dielusi dengan masing-masing fasa gerak golongan senyawa seperti pada tabel L.2.2 – Diperiksa noda pada permukaan plat di bawah sinar UV λ 366 nm – Disemprot dengan pendeteksi masing-masing golongan senyawa seperti pada tabel L.2.2 – Dioven pada suhu 60 °C selama 10 menit – Diamati masing-masing noda pada permukaan plat di bawah sinar UV λ 366 nm – Dihitung nilai Rf
Noda dan Nilai Rf	

Tabel L.2.2 Jenis fasa gerak dan pendeteksi pada uji KLT untuk golongan senyawa metabolit sekunder

Golongan Senyawa	Fasa Gerak	Pendeteksi	Hasil Warna Noda
Flavonoid	Butanol:asam asetat:air (4:1:5) (Purwaningsih, 2003), butanol:asam asetat:air (3:1:1) (Marliana <i>et al.</i> ,2003), kloroform:metanol (9:1) (Akbar, 2010), kloroform:metanol:air (9,7:0,2:0,1) (Fitriyani, 2011) dan kloroform:etil asetat (60:40) (Wonohadi, <i>et al.</i> , 2006)	Uap amoniak	Biru kehijauan dan kuning
Alkaloid	Metanol:kloroform (0,5:9,5) (Hayati, <i>et al.</i> , 2012), etil asetat:metanol:air (6:4:2) (Marlina, 2007),	Pereaksi Dragendorf	Coklat jingga

Lanjutan Tabel L.2.2

	kloroform:etanol (9:1) (Ekasari, <i>et al.</i> , 2005), etil asetat:metanol:air (100:13,5:10) (Arifin, <i>et al.</i> , 2006) dan metanol:NH ₄ OH pekat (200:3) (Suryanti, <i>et al.</i> , 2005)		
Tanin	butanol:asam asetat:air (14:1:5) (Sriwahyuni, 2010), butanol:asamasetat:air (4:1:5) (Hayati, <i>et al.</i> , 2010), butanol:asam asetat:air (2:5:1,5) (Yulia,2006), kloroform:metanol:air (7:3:0,4) (Fitriyani, 2011) dan asam asetat glasial:air:HCl pekat (30:10:3) (Hayati, <i>et al.</i> , 2012)	FeCl ₃ 1%	Ungu
Saponin	kloroform:metanol:air (13:7:2) (Harborne, 1987), kloroform:metanol:air (64:50:10) (Wonohadi, <i>et al.</i> , 2006), kloroform:aseton (4:1) (Suryanti, 2005) dan kloroform:metanol (95:5) (Windriyati, <i>et al.</i> , 2011), kloroform:metanol:air (20:60:10) (Kristianingsih, 2005),	Lieberman-Burchard H ₂ SO ₄ 0,1 M	Biru Ungu gelap
Terpenoid	n-heksana : etil asetat (2 : 8) (Listiani, <i>et al.</i> , 2005), kloroform:asam asetat (4:1) (Widyowati dan Rahman, 2010), n-heksana:etilasetat (1:1) (Sriwahyuni, 2010), toluena: etil asetat (7: 3) (Fitriyani, 2011) dan kloroform:aseton (5:1) (Kartikasari, 2010)	Pereaksi Lieberman-Burchad	Merah muda-ungu
Steroid	n-heksana : etil asetat = 7 : 3 (v/v) (Sriwahyuni, 2010), etil asetat : metanol : air = 100 : 13,3 : 10 (v/v) (Rao, 2010), etanol : kloroform = 3 : 7 (v/v) (Kustiariyah, 2006) n-butanol : asam asetat : air = 12 : 3 : 5 (v/v) (Murray, 2001) dan n-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v) (Bayyinah, 2013).	Pereaksi Lieberman-Burchad	Merah-kebiruan-ungu

Lampiran 3 Pembuatan Larutan dan Reagen

L.3.1 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard (Wagner, 2001)

Asam sulfat pekat : 5 mL

Anhidrida asetat : 5 mL

Metanol absolute : 50 mL

Cara pembuatannya adalah diambil sebanyak 50 mL metanol absolut dengan pipet volume 50 mL ke dalam gelas beaker 100 mL, kemudian ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat menggunakan pipet volume 5 mL sedikit demi sedikit melalui dinding gelas beaker dan anhidrida asetat sebanyak 5 mL dengan pipet volume 5 mL, dicampur ke dalam methanol absolute 50 mL yang sudah diambil sebelumnya kemudian didinginkan dalam lemari pendingin.

L.3.2 Pembuatan Reagen Dragendorff (Wagner, 2001)

Larutan I. 0,6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H_2O .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL H_2O .

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat 10 mL aquades. Larutan II dibuat dengan 6 g KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kemudian kedua larutan larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H_2O

L.3.3 Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,5 %

Ditimbang 0,5 gram CMC-Na kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL. Selanjutnya dilarutkan dengan 50 mL aquades hangat sambil terus diaduk. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

L.3.4 Pembuatan Larutan Metanol 50 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 50 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8 % sebanyak 5 mL dengan pipet volum 5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.5 Pembuatan Reagen FeCl₃ 1 %

$$\text{BM FeCl}_3 = 162,2 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = \frac{1\% \times \text{BM FeCl}_3 \times V}{22,4}$$

$$= \frac{1\% \times 162,2 \frac{\text{gr}}{\text{mol}} \times 0,01 \text{ L}}{22,4} = 0,072 \text{ gr} = 72 \text{ gr}$$

Untuk membuat larutan FeCl₃ 1% adalah ditimbang sebanyak 72 mg serbuk FeCl₃ dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL kemudian dilarutkan dengan ± 3 mL aquades. Setelah larut, dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan di tanda bataskan dengan aquades.

L.3.6 Pembuatan Larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\% \text{ Volume} = 37 \% (0,37)$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$\text{ekivalen} = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

Molaritas HCl (M) :

$$\text{Massa HCl} = \text{BJ HCl pekat} \times \% \text{ volume}$$

$$= 1190 \text{ g/L} \times 0,37$$

$$= 440,3 \text{ gr}$$

$$\text{Mol HCl} = \frac{\text{Massa HCl}}{\text{BM HCl}} = \frac{440,3 \text{ gr}}{36,42 \text{ gr/mol}} = 12,09 \text{ mol}$$

$$\text{Konsentrasi HCl (M)} = \frac{\text{Mol HCl}}{\text{Volume HCl}} = \frac{12,09 \text{ mol}}{1 \text{ L}} = 12,09 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas HCl} = \text{ekivalen} \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times 12,09 \text{ M}$$

$$= 12,09 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,27 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}$$

Cara membuat 100 mL HCl 1 N adalah diambil larutan HCl pekat sebanyak 8,3 mL dengan pipet ukur 10 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang berisi ± 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan Larutan HCl 2 %

$$\% \text{ Volume HCl pekat} = 37 \% (0,37)$$

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$37 \% \times V_1 = 2 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,54 \text{ mL}$$

Cara membuat 10 mL HCl 1 N adalah diambil larutan HCl pekat sebanyak 0,54 mL dengan pipet ukur 1 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.8 Pembuatan Larutan NH₃ 10 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \% \times V_1 = 10 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan NH₃ 10 % adalah diambil sebanyak 2 mL larutan NH₃ 50 % dengan pipet volume 2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabatkan dengan pelarut aquades.

L.3.9 Pembuatan Reagen Mayer (Manan, 2006)

Larutan I. HgCl₂ 1,358 gr dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 gr dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang HgCl₂ 1,358 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukkan dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan menimbang KI 5 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukan dalam beaker glass 250 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 10 mL. Masing-masing dilakukan pengadukan dengan spatula sampai larut sempurna. Selanjutnya larutan I dituangkan ke dalam larutan II dan dihomogenkan dengan pengadukan dengan menggunakan pengaduk gelas. Setelah kedua larutan homogen, campuran larutan tersebut dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

Lampiran 4 Penentuan dan Perhitungan Dosis

L.4.1 Dosis Ekstrak Etanol Daun Widuri

Penentuan dosis ekstrak etanol daun widuri untuk mencit adalah sebagai berikut:

Misalnya berat badan manusia = 70 Kg maka dosis mencit adalah

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

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

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3} &= 150 \text{ mg/Kg BB} \times 70 \text{ kg} \times 0,0026 = 27,3 \text{ mg/20 g BB} \\ &= 1,365 \text{ mg/g BB} \end{aligned}$$

L.4.2 Dosis Metotreksat

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

$$\text{Maka : } 2,5 \text{ mg/Kg} \times 70 \text{ Kg} = 175 \text{ mg}$$

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

Jumlah Metotreksat yang dibutuhkan = Dosis x jumlah mencit x 14 hari

$$\begin{aligned} &= 0,455 \text{ mg/mencit} \times 7 \times 14 \\ &= 44,59 \text{ mg} \end{aligned}$$

¹ Keterangan 0,0026 diperoleh dari tabel perbandingan luas permukaan antar manusia dengan berat badan 70 kg dan mencit dengan berat badan 20 g

L.4.3 Perhitungan Dosis dan Jumlah Ekstrak Larutan Uji

L.4.3.1 Ekstrak Daun Widuri untuk Terapi

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 = 7 ekor

Sehingga perhitungan tiap dosis adalah

$$\begin{aligned} \text{Dosis 1} &= 0,455 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} &&= 9,1 \text{ mg} \\ &= 7 \times 9,1 \text{ mg/mL} \times 14 &&= 891,8 \text{ mg/49 mL}^2 \end{aligned}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 891,8 mg dan dilarutkan ke dalam 49 mL

CMC-Na 0,5 %.

$$\begin{aligned} \text{Dosis 2} &= 0,91 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} &&= 18,2 \text{ mg} \\ &= 7 \times 18,2 \text{ mg/mL} \times 14 &&= 1783,6 \text{ mg/49 mL} \end{aligned}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 1783,6 mg dan dilarutkan ke dalam 49 mL

CMC-Na 0,5 %.

$$\begin{aligned} \text{Dosis 3} &= 1,365 \text{ mg/g BB} \times 20 \text{ g} &&= 27,3 \text{ mg} \\ &= 7 \times 27,3 \text{ mg/mL} \times 14 &&= 2675,4 \text{ mg/49 mL} \end{aligned}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 2675,4 mg dan dilarutkan ke dalam 49 mL

CMC-Na 0,5 %.

Sehingga total ekstrak daun widuri yang dibutuhkan adalah 5350,8 mg = 5351 g. Dan total CMCNa 0,5 % yang dibutuhkan adalah 147 mL.

² 42 mL adalah jumlah pengulangan x jumlah hari terapi x 0,5 mL = 7 x 14 x 0,5 mL = 49 mL

L.4.3.2 Ekstrak Daun Widuri 10.000 ppm untuk Uji Fitokimia

$$10.000 \text{ ppm} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang sebanyak 100 mg kemudian diencerkan dengan 10 mL pelarut etanol 70 %. Kemudian dihomogenkan dengan pengadukan menggunakan pengaduk gelas, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm. Diperoleh ekstrak yang lebih encer sehingga mempermudah dalam identifikasi kualitatif dengan reagen.

1. Uji Alkaloid = 0,5 mL
2. Uji Flavonoid = 0,5 mL
3. Uji Tanin = 0,5 mL
4. Uji Saponin = 0,5 mL
5. Uji Triterpenoid = 0,5 mL

Jadi, jumlah total ekstrak yang dibutuhkan untuk uji fitokimia adalah 100 mg.

L.4.3.2 Ekstrak Daun Widuri 1.000.000 ppm untuk KLTA

$$1.000.000 \text{ ppm} = \frac{1.000.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{1.000.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ mL}}$$

Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang sebanyak 1000 mg kemudian diencerkan dengan 1 mL pelarut etanol 70 %. Kemudian dihomogenkan dengan pengadukan menggunakan penhaduk gelas, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 1.000.000 ppm. Diperoleh ekstrak yang lebih encer sehingga mempermudah dalam penotolan.

Jadi, jumlah total ekstrak yang dibutuhkan untuk KLTA adalah 1000 mg.

Dapat diperkirakan jumlah keseluruhan ekstrak yang dibutuhkan adalah:
 $5351\text{mg} + 100\text{ mg} + 1000\text{ mg} = 6451\text{ mg} = 6,451\text{ gr} = 6,5\text{ gr}$. Sehingga disiapkan serbuk daun widuri kering sebanyak 150 gr.

L.4.2 DMBA sebagai Karsinogen Mencit (*Mus musculus*)

Dosis pemberian DMBA = $25\ \mu\text{g DMBA}/0,1\ \text{mL aseton}/\text{mencit}$.

Banyak mencit = Jumlah kelompok perlakuan x pengulangan
 $= 5 \times 7 = 35\ \text{mencit}$

DMBA yang dibutuhkan = dosis x banyak mencit x banyak induksi
 $= 25\ \mu\text{g DMBA}/0,1\ \text{mL aseton} \times 35 \times 12$
 $= 10500\ \mu\text{g DMBA}/42\ \text{mL aseton}$
 $= 10,5\ \text{mg DMBA}/42\ \text{mL aseton}$

Maka DMBA ditimbang sebanyak 10.5 mg DMBA dan dilarutkan dalam 42 mL aseton.

Lampiran 5 Perhitungan Kadar Air

Data pengukuran kadar air sampel kering daun widuri

Ulangan cawan	Berat cawan setelah di oven (g)				Rata-rata berat cawan (g)
	P1	P2	P3	P4	
1	55,357	55,357	55,357	55,355	55,357
2	58,153	58,154	58,153	58,152	58,153
3	51,702	51,703	51,703	51,703	51,703

Ulangan cawan	Berat cawan + sampel sebelum di oven (g)	Berat cawan + sampel setelah di oven (g)						Rata-rata berat konstan (g)
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	
1	60,330	60,076	60,066	60,063	60,063	60,061	60,069	60,064
2	63,134	62,880	62,877	62,877	62,874	62,869	62,868	62,868
3	56,761	56,516	56,507	56,502	56,496	56,492	56,491	56,493

Keterangan : P = pengulangan

Angka bercetak tebal menunjukkan angka yang sudah konstan (2 angka di belakang koma sama)

Adapun rumus perhitungan kadar air adalah :

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong
 b = berat cawan + sampel sebelum dioven
 c = berat konstan cawan + sampel setelah dioven

a. Ulangan 1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(60,330 - 60,064)}{(60,033 - 55,357)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(0,266)}{(4,973)} \times 100 \% \\
 &= 5,348 \%
 \end{aligned}$$

b. Ulangan 2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(63,134 - 62,868)}{(63,134 - 58,153)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(0,266)}{(4,981)} \times 100 \% \\
 &= 5,340 \%
 \end{aligned}$$

c. Ulangan 3

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(56,761 - 56,493)}{(56,761 - 51,703)} \times 100 \% \\
 &= \frac{(0,268)}{(5,058)} \times 100 \% \\
 &= 5,298 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rata - rata kadar air (\%)} &= \frac{5,348 \% + 5,340 \% + 5,298 \%}{3} \\
 &= \frac{15,968 \%}{3} = 5,329 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 6 Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

$$\begin{aligned}
 \text{Berat sampel} &= 200,489 \text{ g} \\
 \text{Berat gelas vial kosong} &= 70,357 \text{ g} \\
 \text{Berat gelas vial kosong + ekstrak pekat} &= 110,213 \text{ g} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{Berat gelas vial kosong + ekstrak} \\
 &\quad \text{pekat}) - \text{Berat gelas vial kosong} \\
 &= 110,213 \text{ g} - 70,357 \text{ g} \\
 &= 39,856 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% = \frac{39,856 \text{ g}}{200,489 \text{ g}} \times 100 \% = 19,879 \%$$

Berat serbuk (g)	Maserasi ke-	Volume pelarut (mL)	Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
200,489	1	1000	Hijau pekat	Hijau kehitaman	39,856	19,879
	2	500	Hijau pekat			
	3	500	Hijau			
	4	400	Hijau			
	5	400	Hijau muda			

Lampiran 7 Perhitungan Nilai R_f KLTA

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh noda}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

L.7.1 Triterpenoid

1. Toluena : etil asetat = 7 : 3 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{0,5}{8,5 \text{ cm}} = 0,06$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{2,75}{8,5 \text{ cm}} = 0,31$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{5,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,64$$

2. N-heksana : etil asetat = 4 : 1 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{0,2}{8,5 \text{ cm}} = 0,02$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{1,55}{8,5 \text{ cm}} = 0,19$$

3. N-heksana : etil asetat = 7 : 3 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{1}{8,5 \text{ cm}} = 0,12$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{3,2}{8,5 \text{ cm}} = 0,4$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{4,2}{8,5 \text{ cm}} = 0,52$$

4. N-heksana : etil asetat = 2 : 8 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{1,95}{8,5 \text{ cm}} = 0,24$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{6,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,85$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{7,3}{8,5 \text{ cm}} = 0,91$$

5. Kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{2,7}{8,2 \text{ cm}} = 0,33$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{4}{8,2 \text{ cm}} = 0,49$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{4,4}{8,2 \text{ cm}} = 0,54$$

$$\text{Noda ke-4 } R_f = \frac{4,8}{8,2 \text{ cm}} = 0,58$$

$$\text{Noda ke-5 } R_f = \frac{6,4}{8,2 \text{ cm}} = 0,78$$

$$\text{Noda ke-6 } R_f = \frac{7,8}{8,2 \text{ cm}} = 0,95$$

L.7.2 Tanin

1. Butanol : asam asetat : air = 4 : 1 : 5 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{1}{8,5 \text{ cm}} = 0,12$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{3,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,45$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{5,7}{8,5 \text{ cm}} = 0,67$$

2. Kloroform : metanol : air = 7 : 3 : 0,4 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{6,5}{8,5 \text{ cm}} = 0,76$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{7,2}{8,5 \text{ cm}} = 0,85$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{8}{8,5 \text{ cm}} = 0,94$$

3. Asam asetat glasial : air : HCl = 30 : 10 : 3 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{4,2}{8,5 \text{ cm}} = 0,49$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{5,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,68$$

4. Butanol : asam asetat : air = 2 : 0,5 : 1,1 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{5,9}{8,5 \text{ cm}} = 0,69$$

5. Butanol : asam asetat : air = 14 : 1 : 5 (v/v)

$$\text{Noda ke-1 } R_f = \frac{1}{8,5 \text{ cm}} = 0,12$$

$$\text{Noda ke-2 } R_f = \frac{4,7}{8,5 \text{ cm}} = 0,55$$

$$\text{Noda ke-3 } R_f = \frac{6,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,8$$

$$\text{Noda ke-4 } R_f = \frac{7,8}{8,5 \text{ cm}} = 0,92$$

Lampiran 8 Data Berat Badan Mencit dan Hasil Uji Statistika
L.8.1 Daftar Berat Badan Mencit

Mencit		Induksi ke-												Rata-rata
Kelompok	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Dosis 50 mg/K gBB	1	20	19	21	25	26	27	28	29	30	31	30	28	26,167
	2	30	30	30	32	32	34	32	36	36	33	35	34	32,83
	3	22	23	23	24	23	25	24	22	27	29	29	29	25
	4	26	27	28	29	30	31	31	29	32	32	25	28	29
	5	25	25	25	27	29	28	28	28	31	33	32	30	28,583
Dosis 100 mg/K gBB	1	25	26	23	24	21	24	25	24	28	30	28	28	25,5
	2	26	28	28	29	30	29	30	29	31	32	30	30	29,333
	3	22	24	25	27	28	30	30	30	32	32	30	30	28,333
	4	26	26	25	27	28	31	31	30	32	31	34	29	29,167
	5	28	27	27	29	29	29	30	27	29	29	25	24	27,75
Dosis 150 mg/K gBB	1	20	21	21	23	23	25	25	25	28	19	27	25	23,5
	2	24	22	25	27	26	27	29	29	30	30	29	29	27,25
	3	24	24	24	27	28	29	29	29	30	29	29	30	27,667
	4	21	21	22	16	21	23	24	22	22	28	26	22	22,333
	5	21	20	23	22	22	22	22	23	27	30	24	25	23,417
Kontr ol +	1	23	23	23	27	26	27	28	27	34	34	32	30	27,833
	2	23	26	27	27	28	29	29	29	31	32	32	30	28,583
	3	18	20	21	17	17	19	14	16	17	20	20	18	18,083
	4	25	25	27	25	23	21	29	27	27	23	23	21	24,667
	5	21	23	23	21	30	25	23	20	24	34	27	27	24,833
Kontr ol -	1	21	20	19	18	18	20	19	20	21	19	20	20	19,583
	2	25	24	26	27	28	30	31	32	34	34	34	34	29,917
	3	22	22	24	18	22	27	27	27	30	29	26	24	25
	4	21	21	22	16	21	20	21	21	18	21	20	18	20
	5	20	21	22	23	27	29	22	18	19	21	20	18	21,667

Mencit		Terapi ke-														Rata-rata	Berat Tumor (mg)
Kelompok	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Dosis 50 mg/Kg BB	1	29	29	30	29	31	30	24	30	28	30	29	29	29	30	29,143	0
	2	38	37	36	36	37	35	28	34	32	33	34	33	34	34	34,357	0
	3	32	32	32	32	30	30	25	30	29	29	29	29	28	29	29,714	0
	4	29	30	28	27	30	29	25	32	28	29	29	29	30	30	29,143	49,1
	5	31	33	33	32	32	30	27	32	30	32	32	32	30	32	31,714	160,5
Dosis 100 mg/Kg BB	1	30	31	30	31	30	30	28	30	29	30	30	27	29	29	29,571	0
	2	33	34	32	32	32	34	30	34	34	35	34	32	33	34	33,071	0
	3	33	32	33	32	29	30	29	32	29	30	30	30	28	29	30,428	0
	4	32	32	30	33	32	31	29	33	33	33	34	32	32	32	32	0
	5	30	30	30	30	31	30	29	31	30	31	32	32	31	32	30,643	83,3
Dosis 150 mg/Kg BB	1	30	30	32	30	32	31	30	32	30	31	30	30	30	31	30,643	0
	2	32	35	36	32	33	33	32	33	32	33	32	32	32	32	32,786	0
	3	34	34	35	36	35	36	34	35	34	34	34	33	30	30	33,857	0
	4	30	30	31	24	29	29	28	30	30	27	29	28	29	28	28,714	0
	5	30	30	32	30	29	30	29	30	30	29	29	29	29	28	29,571	45,1
Kontrol +	1	36	35	36	35	36	35	35	35	35	35	34	35	35	35	35,143	103,4
	2	35	32	32	32	32	33	34	34	32	32	31	31	32	32	32,428	140,7
	3	19	19	19	19	19	18	19	19	19	19	18	19	20	20	19	0
	4	22	22	23	22	22	22	23	22	21	22	21	23	23	25	22,143	0
	5	28	27	30	29	30	30	30	32	30	32	31	32	32	32	30,357	0
Kontrol -	1	20	21	21	21	21	21	21	22	21	21	22	21	22	21	21,143	0
	2	32	33	32	32	32	30	32	32	32	32	32	32	33	32	32	0
	3	23	22	23	21	20	18	19	20	21	23	22	22	24	22	21,428	148,6
	4	22	21	22	23	24	23	22	21	22	23	21	23	23	22	22,286	0
	5	19	20	19	19	20	19	20	19	19	19	21	20	21	20	19,643	144,2

Data Kenaikan Berat Badan

Kelompok	Berat awal	Berat akhir	% Kenaikan
Dosis 50 mg/KgBB	28	30	29
	34	34	33
	29	29	28
	28	30	29
	30	32	31
Dosis 100 mg/KgBB	28	29	28
	30	34	33
	30	29	28
	29	32	31
Dosis 150 mg/KgBB	24	32	31
	25	31	30
	29	32	31
	30	30	29
Kontrol +	22	28	27
	25	28	27
	30	35	34
	30	32	31
Kontrol -	18	20	19
	21	25	24
	27	32	31
	20	21	20
	34	32	31
	24	22	21
	18	22	21
	18	20	19

Report			
Kelompok		BBawal	BBakhir
dosis50	Mean	29.8000	31.0000
	N	5	5
	Std. Deviation	2.48998	2.00000
	Std. Error of Mean	1.11355	.89443
dosis100	Mean	28.2000	31.2000
	N	5	5
	Std. Deviation	2.48998	2.16795
	Std. Error of Mean	1.11355	.96954
dosis150	Mean	26.2000	29.8000
	N	5	5
	Std. Deviation	3.27109	1.78885
	Std. Error of Mean	1.46287	.80000
kontrol+	Mean	25.2000	28.8000
	N	5	5
	Std. Deviation	5.44977	6.14003
	Std. Error of Mean	2.43721	2.74591
kontrol-	Mean	22.8000	23.4000
	N	5	5
	Std. Deviation	6.72309	4.87852
	Std. Error of Mean	3.00666	2.18174
Total	Mean	26.4400	28.8400
	N	25	25
	Std. Deviation	4.73533	4.55229
	Std. Error of Mean	.94707	.91046

Report

KenaikanBB

Kelompok	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean
dosis50	30.0000	5	2.00000	.89443
dosis100	30.2000	5	2.16795	.96954
dosis150	28.8000	5	1.78885	.80000
kontrol+	27.8000	5	6.14003	2.74591
kontrol-	22.4000	5	4.87852	2.18174
Total	27.8400	25	4.55229	.91046

L.8.1.1 Uji Normalitas Kenaikan Berat Badan

Descriptives

KenaikanBB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
dosis50	5	30.0000	2.00000	.89443	27.5167	32.4833	28.00	33.00
dosis100	5	30.2000	2.16795	.96954	27.5081	32.8919	28.00	33.00
dosis150	5	28.8000	1.78885	.80000	26.5788	31.0212	27.00	31.00
kontrol+	5	27.8000	6.14003	2.74591	20.1761	35.4239	19.00	34.00
kontrol-	5	22.4000	4.87852	2.18174	16.3425	28.4575	19.00	31.00
Total	25	27.8400	4.55229	.91046	25.9609	29.7191	19.00	34.00

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KenaikanBB	dosis50	.291	5	.191	.905	5	.440
	dosis100	.245	5	.200*	.871	5	.272
	dosis150	.243	5	.200*	.894	5	.377
	kontrol+	.299	5	.165	.901	5	.418

a. Lilliefors Significance Correction

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

Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk adalah $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data memiliki distribusi normal.

L.8.1.2 Uji One Way ANOVA

ANOVA					
KenaikanBB	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	203.760	4	50.940	3.470	.026
Within Groups	293.600	20	14.680		
Total	497.360	24			

Hasil uji One Way ANOVA adalah $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa ada perbedaan berat badan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan.

L.8.1.3 Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KenaikanBB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	dosis50	dosis100	-.20000	2.42322	1.000	-7.4512	7.0512
		dosis150	1.20000	2.42322	.987	-6.0512	8.4512
		kontrol+	2.20000	2.42322	.891	-5.0512	9.4512
		kontrol-	7.60000*	2.42322	.037	.3488	14.8512
	dosis100	dosis50	.20000	2.42322	1.000	-7.0512	7.4512
		dosis150	1.40000	2.42322	.977	-5.8512	8.6512
		kontrol+	2.40000	2.42322	.857	-4.8512	9.6512
		kontrol-	7.80000*	2.42322	.031	.5488	15.0512
	dosis150	dosis50	-1.20000	2.42322	.987	-8.4512	6.0512

	dosis100	-1.40000	2.42322	.977	-8.6512	5.8512
	kontrol+	1.00000	2.42322	.993	-6.2512	8.2512
	kontrol-	6.40000	2.42322	.100	-.8512	13.6512
kontrol+	dosis50	-2.20000	2.42322	.891	-9.4512	5.0512
	dosis100	-2.40000	2.42322	.857	-9.6512	4.8512
	dosis150	-1.00000	2.42322	.993	-8.2512	6.2512
	kontrol-	5.40000	2.42322	.210	-1.8512	12.6512
kontrol-	dosis50	-7.60000*	2.42322	.037	-14.8512	-.3488
	dosis100	-7.80000*	2.42322	.031	-15.0512	-.5488
	dosis150	-6.40000	2.42322	.100	-13.6512	.8512
	kontrol+	-5.40000	2.42322	.210	-12.6512	1.8512

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

Hasil uji Post Hoc Tukey menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dosis 50 mg/KgBB dengan kontrol negatif dan kelompok dosis 100 mg/KgBB dengan kontrol negatif.

Lampiran 9 Perhitungan Insidensi Tumor

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{\text{Jumlah mencit terkena tumor}}{\text{Jumlah mencit dalam kelompok uji}} \times 100 \%$$

Jumlah mencit dalam kelompok uji = 5

a. Kelompok dosis 50 mg/KgBB

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{2}{5} \times 100 \% = 40 \%$$

b. Kelompok dosis 100 mg/KgB

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{1}{5} \times 100 \% = 20 \%$$

c. Kelompok dosis 150 mg/KgBB

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{1}{5} \times 100 \% = 20 \%$$

d. Kelompok kontrol Metotreksat

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{2}{5} \times 100 \% = 40 \%$$

e. Kelompok kontrol CMC-Na

$$\text{Insidensi tumor} = \frac{2}{5} \times 100 \% = 40 \%$$

Lampiran 10 Data Skor IHK Kaspase-3

Kelompok	IS (Intensity score)	PS (Percentage score)	Skor Allred = IS + PS
Kontrol negatif	3	2	5
	1	2	3
	2	1	3
	2	2	4
	2	2	4
	2	2	4
	3	1	4
	2	2	4
	2	2	4
	2	2	4
Kontrol positif	2	2	4
	1	3	4
	2	2	4
	2	2	4
	2	2	4
	2	2	4
	2	1	3
	2	3	5
	1	3	4
Dosis 50 mg/KgBB	2	3	5
	3	2	5
	2	3	5
	2	3	5
	3	1	4
	1	2	3
	3	3	6
	3	3	6
	1	2	3
	2	3	5
Dosis 100 mg/KgBB	2	3	5
	3	2	5
	3	3	6
	2	3	5
	2	2	4
	2	3	5
	2	3	5
	3	3	6
	2	3	5
	3	4	7
Dosis 150	3	3	6

mg/KgBB	3	2	5
	2	3	5
	3	3	6
	2	3	5
	3	3	6
	2	3	5
	2	3	5
	3	3	6
	3	3	6

Report

SkorIHK

Kelompok	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean	Median
kontrol-	3.9000	10	.56765	.17951	4.0000
kontrol+	4.0000	10	.47140	.14907	4.0000
dosis50	4.7000	10	1.05935	.33500	5.0000
dosis100	5.3000	10	.82327	.26034	5.0000
dosis150	5.5000	10	.52705	.16667	5.5000
Total	4.6800	50	.95704	.13535	5.0000

L.10.1 Uji Normalitas Data Skor IHK Kaspase-3

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SkorIHK kontrol-	.370	10	.000	.752	10	.004
kontrol+	.400	10	.000	.658	10	.000
dosis50	.311	10	.007	.846	10	.051
dosis100	.342	10	.002	.841	10	.045
dosis150	.329	10	.003	.655	10	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil uji normalitas untuk kelompok kontrol negatif, positif, dosis 100 dan 150 adalah $p < 0,05$ yang menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal. Sehingga dilakukan analisis non-parametrik Kruskal-Wallis.

L.10.2 Uji Kruskal-Wallis

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
SkorIHK	kontrol-	10	13.55
	kontrol+	10	14.65
	dosis50	10	26.75
	dosis100	10	34.30
	dosis150	10	38.25
	Total	50	

Test Statistics^{a,b}

	SkorIHK
Chi-Square	26.034
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Kelompok

Hasil uji Kruskal-Wallis adalah $p=0,000$ ($p<0,05$) yang menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan.

L.10.3 Uji Mann-Whitney

1. Kontrol negatif dengan kontrol positif

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol-	10	10.05	100.50
	kontrol+	10	10.95	109.50
	Total	20		

Test Statistics^b

	SkorIHK
Mann-Whitney U	45.500
Wilcoxon W	100.500
Z	-.449
Asymp. Sig. (2-tailed)	.654
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.739 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

2. Kontrol negatif dengan dosis 50 mg/KgBB

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol-	10	8.00	80.00
	dosis50	10	13.00	130.00
	Total	20		

Test Statistics^b

	SkorIHK
Mann-Whitney U	25.000
Wilcoxon W	80.000
Z	-1.990
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.063 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

3. Kontrol negatif dengan dosis 100 mg/KgBB

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol-	10	6.25	62.50
	dosis100	10	14.75	147.50
	Total	20		

Test Statistics^b

	SkorIHK
Mann-Whitney U	7.500
Wilcoxon W	62.500
Z	-3.399
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

4. Kontrol negatif dengan dosis 150 mg/KgBB

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol-	10	5.75	57.50
	dosis150	10	15.25	152.50
	Total	20		

Test Statistics^b

	SkorIHK
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	57.500
Z	-3.752
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

5. Kontrol positif dengan dosis 50 mg/KgBB

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol+	10	5.75	57.50
	dosis150	10	15.25	152.50
	Total	20		

Test Statistics ^b	
	SkorIHK
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	57.500
Z	-3.794
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

6. Kontrol positif dengan dosis 100 mg/KgBB

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol+	10	6.30	63.00
	dosis100	10	14.70	147.00
	Total	20		

Test Statistics ^b	
	SkorIHK
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	63.000
Z	-3.410

Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

7. Kontrol positif dengan dosis 150 mg/KgBB

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorIHK	kontrol+	10	8.15	81.50
	dosis50	10	12.85	128.50
	Total	20		

	SkorIHK
Mann-Whitney U	26.500
Wilcoxon W	81.500
Z	-1.894
Asymp. Sig. (2-tailed)	.058
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.075 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Lampiran 11 Dokumentasi Penelitian

L.11.1 Analisis Kadar Air



Pengeringan cawan kosong

L.11.2 Ekstraksi Maserasi Menggunakan Etanol 70 %



Maserasi menggunakan pelarut etanol 70 %



Ekstrak etanol daun widuri



Pengadukan ekstrak menggunakan *shaker*

L.11.3 Penguapan Pelarut Menggunakan *Rotary Evaporator*



Penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*



Ekstrak pekat daun widuri

L.11.4 Uji Fitokimia



Flavonoid :
Hijau kekuningan (-)

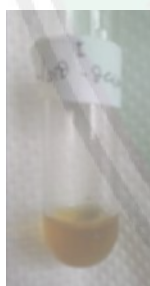


Tanin :
Hijau kehitaman (+)



Saponin :
Busa menghilang

Alkaloid



Pembanding



Dragendrof : (-)



Mayer : (-)



Triterpenoid :
Cincin kecoklatan

L.11.5 KLTA

Penjenuhan eluen



Plat KLT setelah diaktivasi

L.10.5.1 Terpenoid

1. Toluena:etil asetat = 7:3 (v/v)

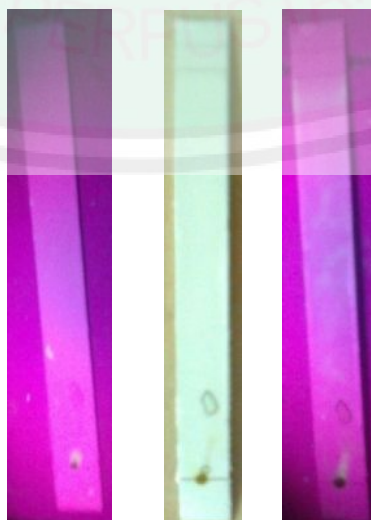


1

2

3

2. N-heksana:etil asetat = 4:1 (v/v)

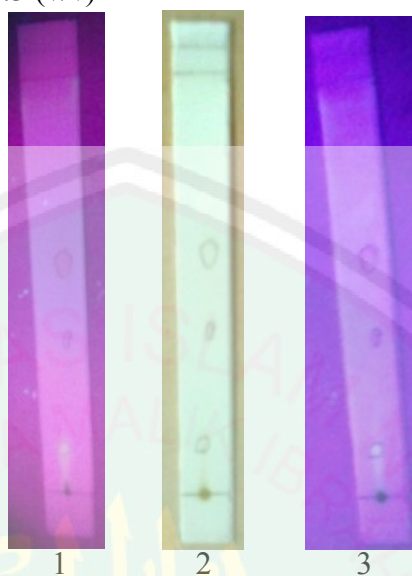


1

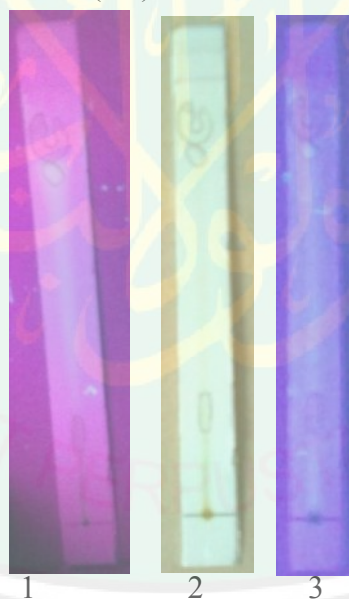
2

3

3. N-heksana:etil asetat = 7:3 (v/v)



4. N-heksana:etil asetat = 2:8 (v/v)

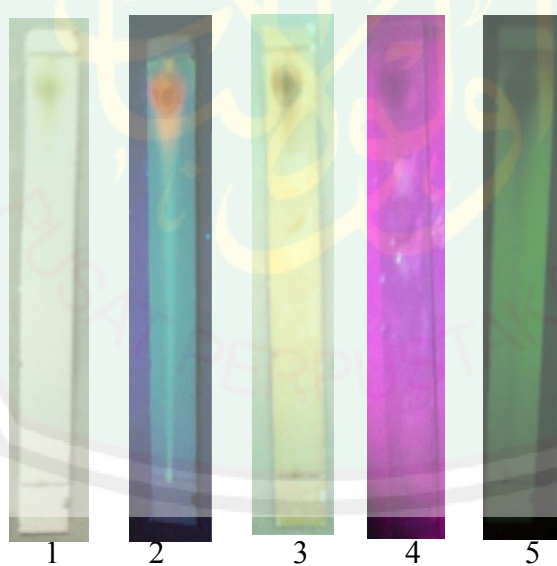


L.11.5.2 Tanin

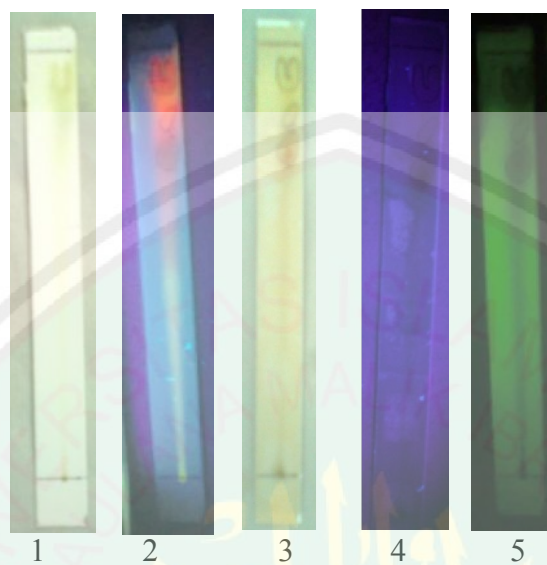
1. Butanol:asam asetat:air = 4:1:5 (v/v)



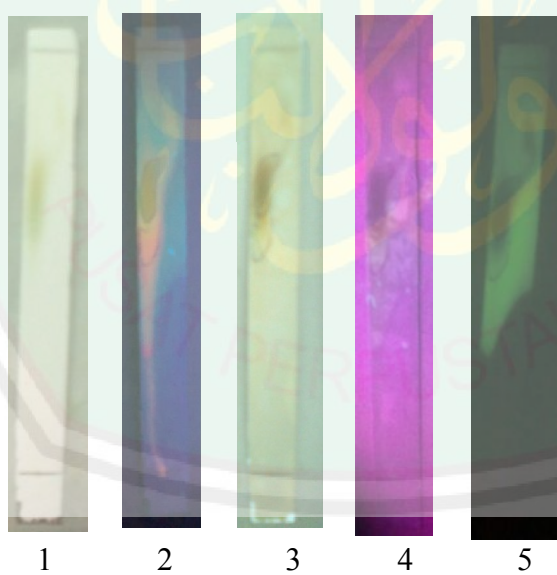
2. Etil asetat:metanol:asam asetat = 6:14:1 (v/v)



3. Kloroform:metanol:air = 7:3:0,4 (v/v)



4. Asam asetat glasial:air:HCl = 30:10:3 (v/v)



L.11.6 Uji Antitumor



Aklimatisasi



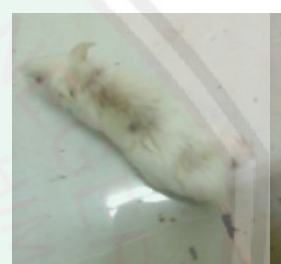
Induksi DMBA



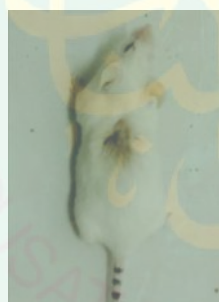
Mencit kontrol negatif



Mencit kontrol positif



Mencit dosis 50 mg/Kg BB



Mencit dosis 100 mg/Kg



Mencit dosis 150 mg/Kg



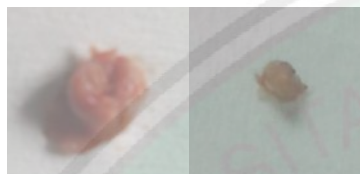
Pemberian terapi ekstrak
daun widuri dengan sonde
lambung



Tumor kontrol negatif



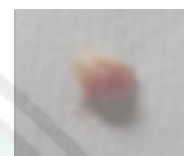
Tumor kontrol positif



Tumor dosis 50 mg/Kg BB



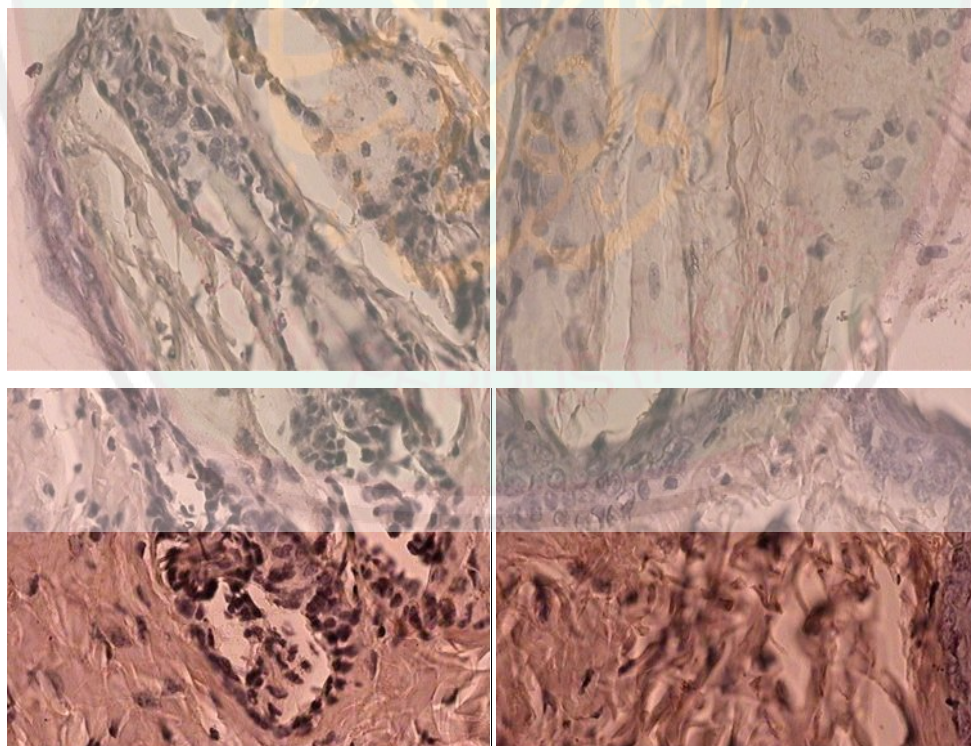
Tumor dosis 100 mg/Kg BB



Tumor dosis 150 mg/Kg BB

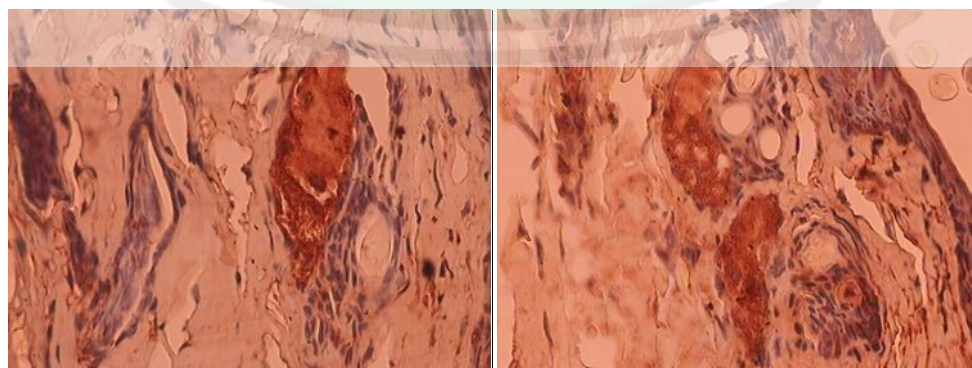
L.11.7 Imunohistokimia Kaspase-3

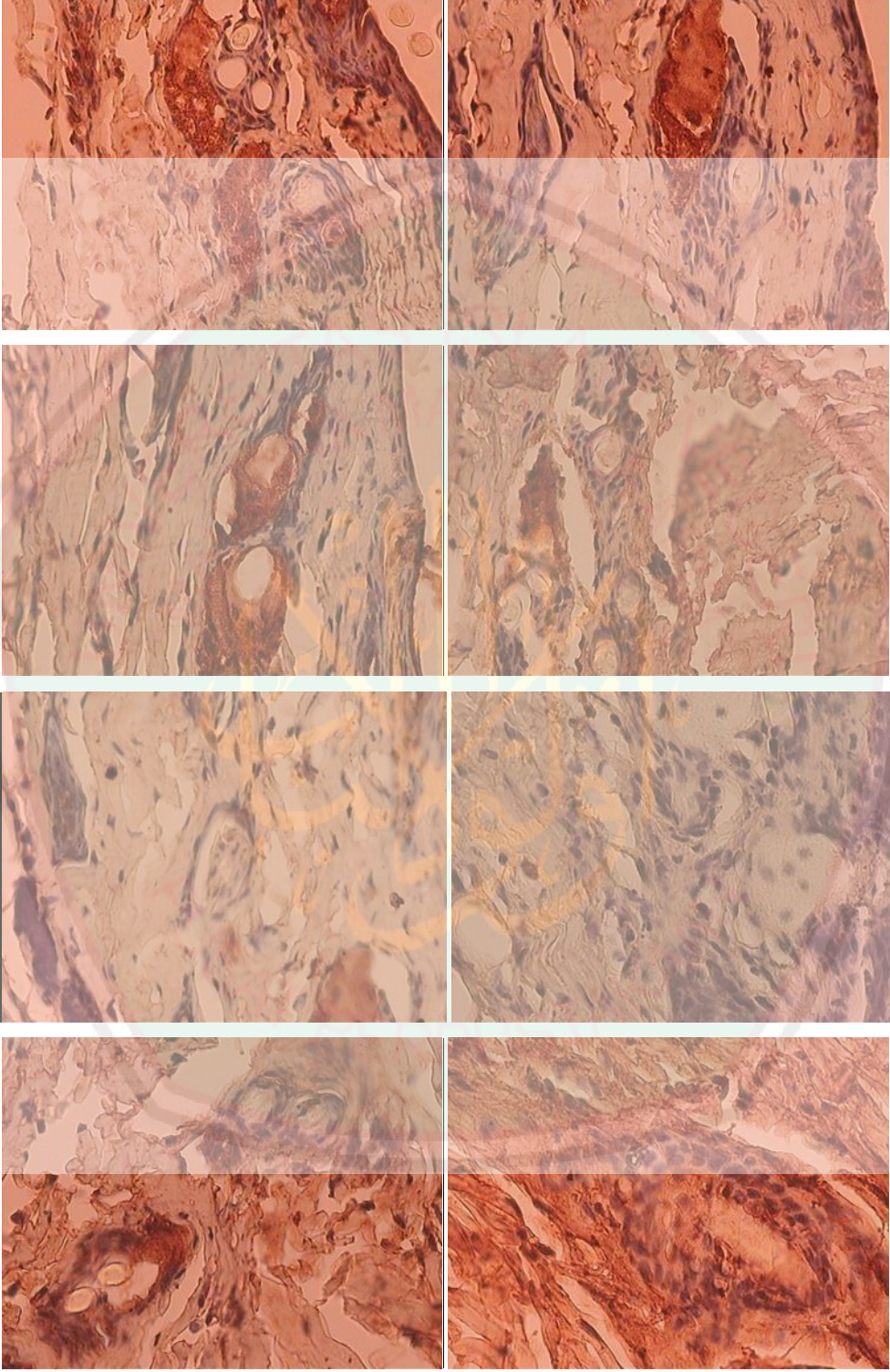
1. Kontrol Negatif



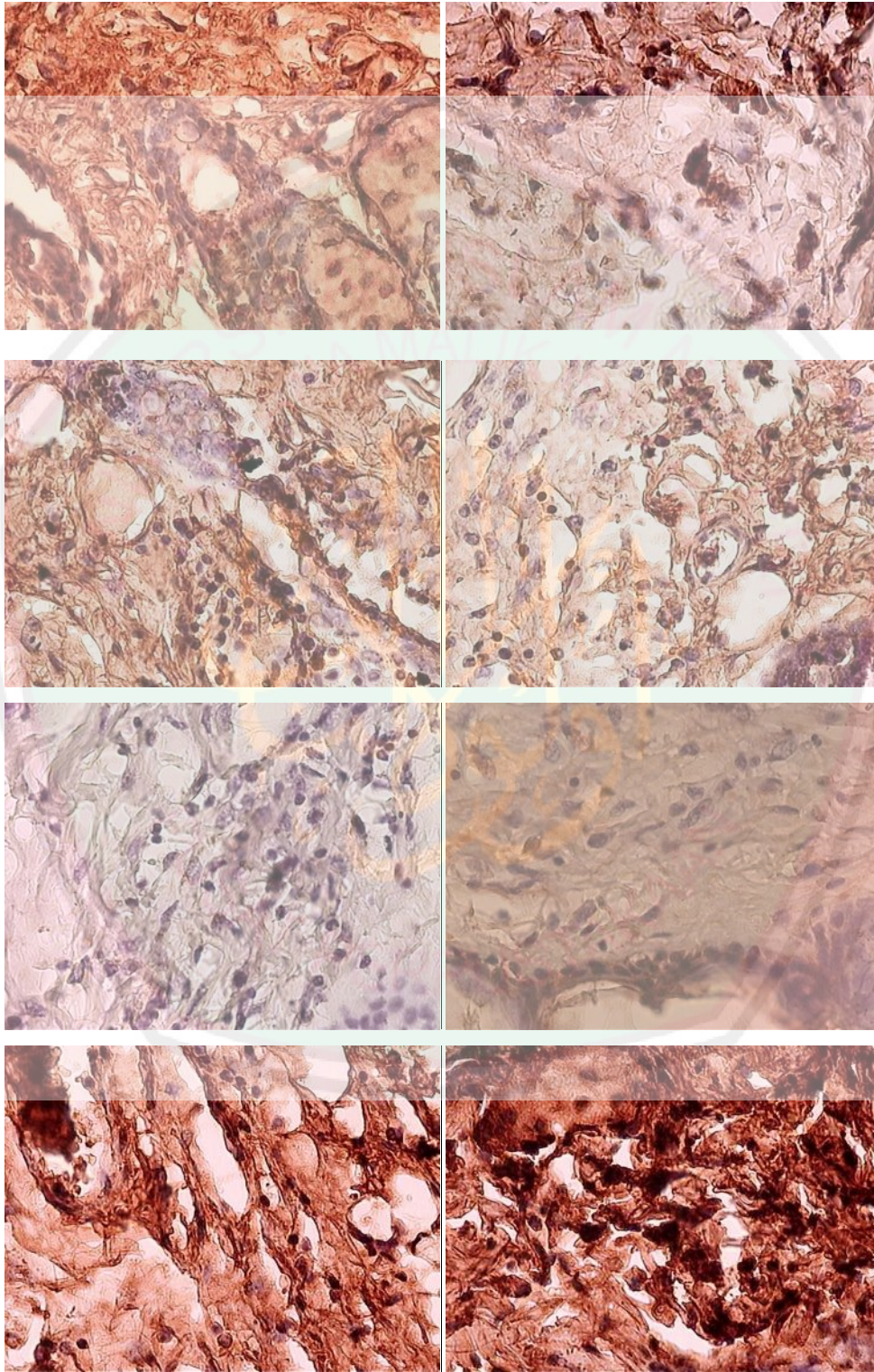


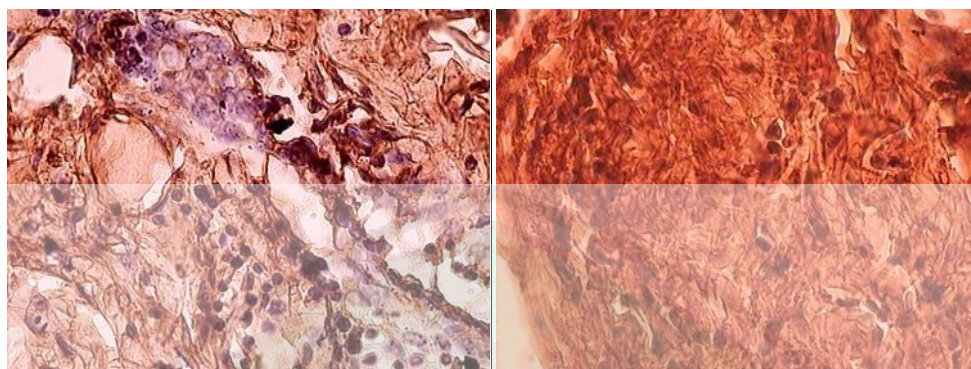
2. Kontrol Positif



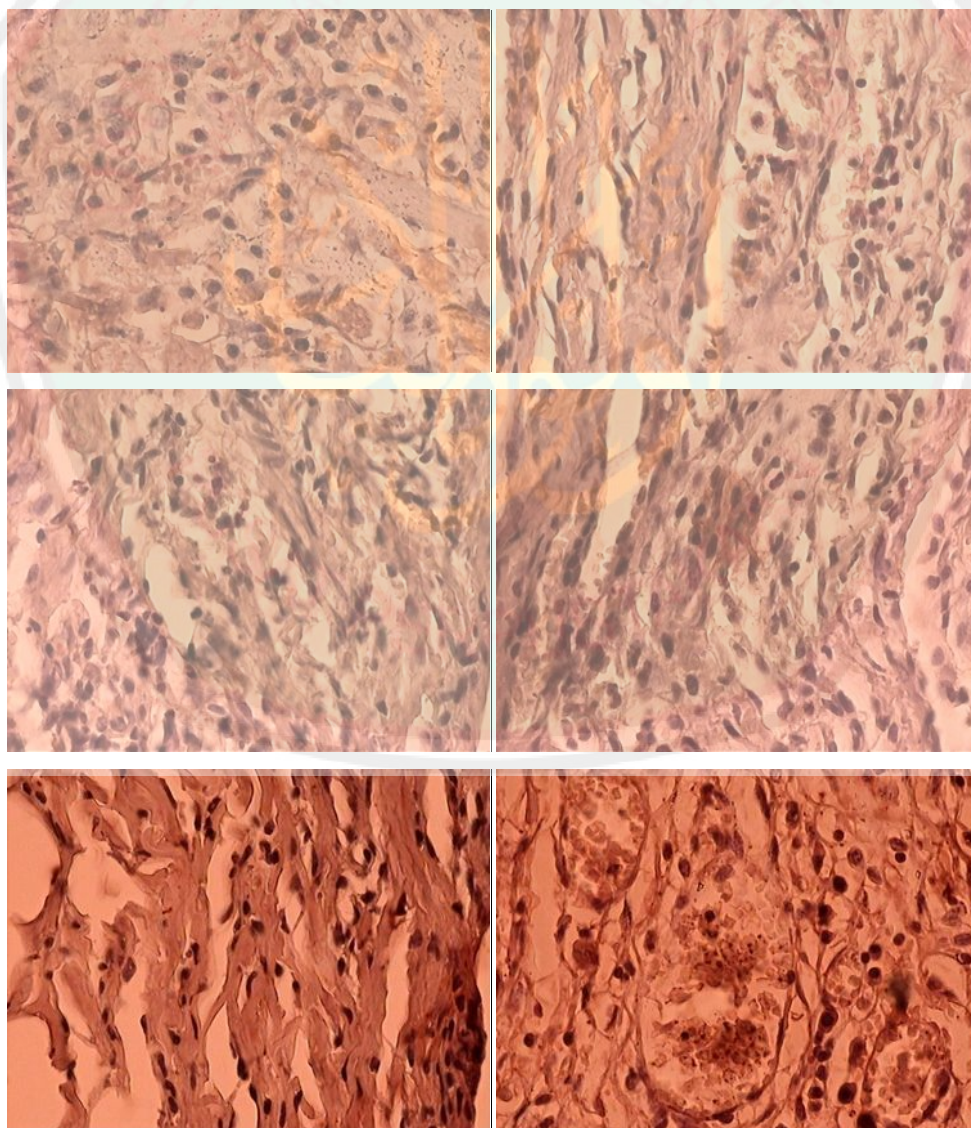


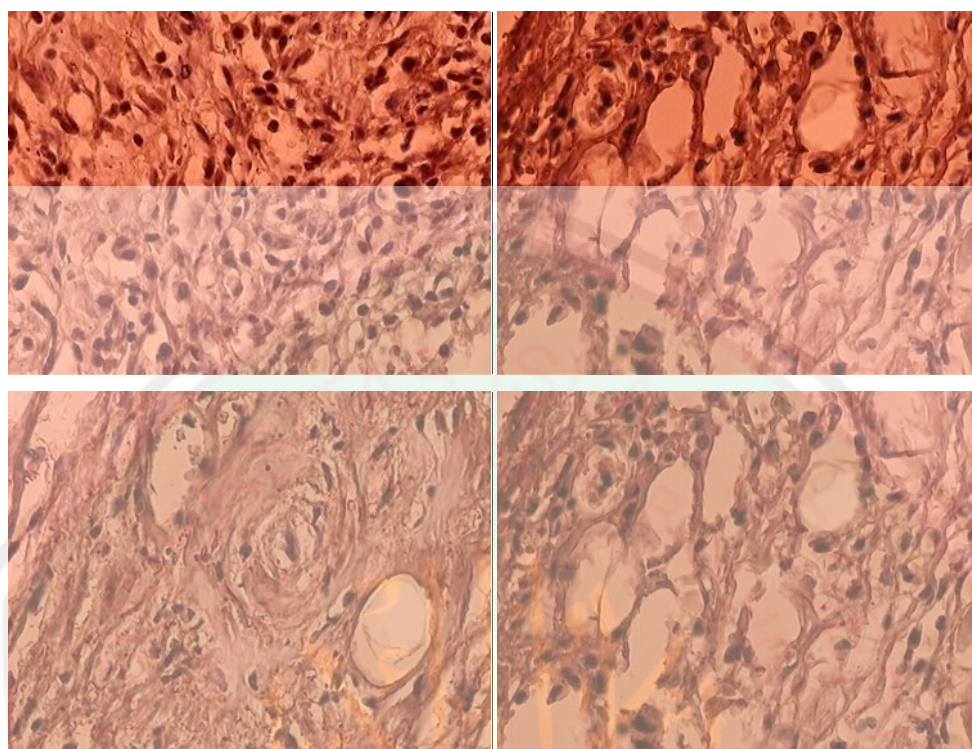
3. Dosis 50 mg/KgBB





4. Dosis 100 mg/KgBB





5. Dosis 150 mg/KgBB

