

BAB III

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman uji dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UMS dengan cara mencocokkan tanaman pada kunci-kunci determinasi menurut C.A. Backer (1986). Tujuan determinasi tanaman adalah untuk memastikan identitas tanaman yang diteliti agar terhindar dari kesalahan dalam pengambilan tanaman dan menjaga kemurnian bahan dari tercampurnya dengan tanaman lain. Hasil determinasi tersebut menyatakan bahwa tanaman yang diteliti adalah benar memiliki ciri-ciri sebagaimana *Annona squamosa* L (Lampiran.1)

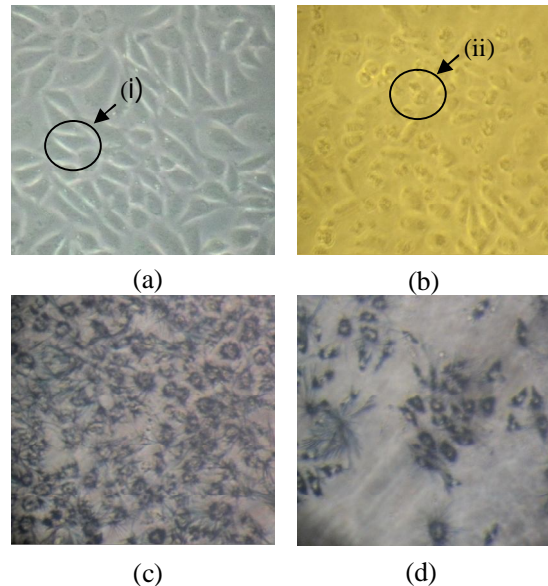
B. Hasil Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Penyarian dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Hal ini bertujuan agar seluruh zat aktif tersari dalam pelarut. Metode maserasi ini dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, mudah dan cocok untuk simplisia yang tidak tahan terhadap suhu tinggi. Hasil ekstraksi dari 2,5 kg simplisia kering daun srikaya diperoleh berat ekstrak etanol daun srikaya sebanyak 260,99 mg, rendemen yang diperoleh sebesar 10,44%.

C. Uji Sitotoksik dengan Metode MTT *assay*

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *assay* dengan mengamati intensitas warna ungu dari kristal formazan yang dibaca menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Semakin tinggi intensitas warna ungu menunjukkan semakin banyak sel yang hidup. Gambaran morfologi kontrol sel T47D dan perlakuan 250 µg/mL ekstrak etanol daun srikaya tersaji pada gambar

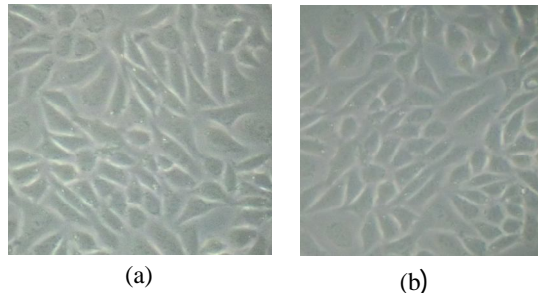
3. Sel yang sehat terlihat berbentuk pipih menyerupai daun memanjang bergerombol, inti sel transparan, berwarna cerah, serta menempel pada dasar sumuran sedangkan sel yang mati berbentuk bulat tak beraturan, tampak gelap pada bagian inti sel serta mengapung pada media. Setelah pemberian MTT, akan terlihat kristal formazan yang berasal dari reaksi MTT dengan sel T47D yang masih hidup. Jika dibandingkan dengan kontrol sel (Gambar 3.c), jumlah kristal formazan yang terbentuk pada perlakuan sel dengan 250 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak etanol daun srikaya tampak berkurang. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol daun srikaya.



Gambar 3. Pengaruh ekstrak etanol daun srikaya terhadap morfologi sel T47D dan pembentukan formazan. (a) Kontrol sel T47D, (b) Sel T47D dengan ekstrak etanol daun srikaya 250 $\mu\text{g/mL}$, (c) Formazan pada Kontrol sel T47D, (d) Formazan pada ekstrak etanol daun srikaya 250 $\mu\text{g/mL}$ setelah MTT (i) sel yang hidup (ii) sel yang mati.

Uji dilakukan dengan menggunakan pelarut DMSO. Namun, konsentrasi DMSO yang tinggi kemungkinan dapat menjadi penyebab kematian sel. Menurut Maryati (2006) penggunaan DMSO sampai konsentrasi 1,67% v/v tidak mempengaruhi viabilitas sel T47D. Konsentrasi DMSO tertinggi dalam ekstrak etanol daun srikaya pada penelitian ini adalah 1,25%. Gambar 4 memperlihatkan

morfologi kontrol sel dan kontrol sel dengan perlakuan DMSO 1,25% yang tidak memperlihatkan perbedaan.

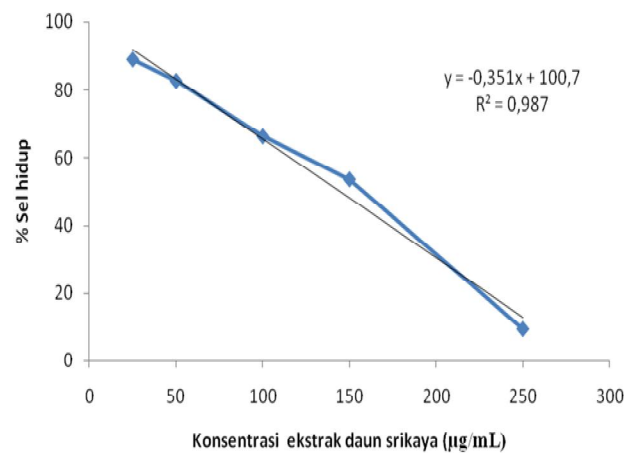


Gambar 4. Morfologi sel T47D pada kontrol sel (a) dan kontrol DMSO 1,25% (b) tidak memperlihatkan perbedaan.

Gambar 5 dan Tabel 1 menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan presentase sel hidup yang memperlihatkan fenomena *dose dependent*. Semakin kecil konsentrasi ekstrak etanol daun srikaya maka persen sel hidup T47D semakin besar. Parameter yang digunakan pada uji sitotoksik ini adalah IC_{50} (*inhibitor concentration 50*) yang merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang mampu menghambat pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasinya yang diperoleh dari regresi linier grafik konsentrasi ekstrak versus rata-rata % sel hidup. Persamaan regresi linier yang diperoleh yaitu $y = -0,351x + 100,7$ dan nilai $r = 0,987$. Nilai IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai y sebesar 50% sehingga diperoleh nilai x sebagai IC_{50} yaitu $144,44 \mu\text{g/mL}$. Semakin kecil IC_{50} menunjukkan bahwa senyawa semakin toksik. Suatu ekstrak dikatakan kurang berefek sitotoksik terhadap sel kanker bila nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Untung, *et al.*, 2008). Ekstrak etanol daun srikaya kurang berefek sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} sebesar $144,44 \mu\text{g/mL}$. Skrining fitokimia perlu dilakukan untuk mengetahui komponen-komponen yang terkandung dalam ekstrak etanol daun srikaya.

Tabel 1. Presentase sel hidup pada ekstrak etanol daun srikaya

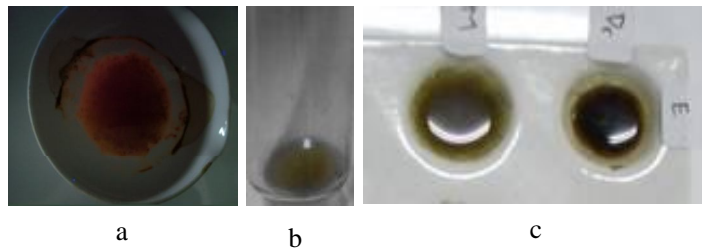
Konsentrasi µg/mL	Absorbansi			% Sel hidup			Rata2 % Sel Hidup
250	0,274	0,289	0,294	6,241	10,372	11,749	9,454
150	0,413	0,435	0,489	44,628	50,689	65,565	53,627
100	0,439	0,515	0,523	51,791	72,727	74,931	66,483
50	0,548	0,585	0,521	81,818	92,011	74,380	82,736
25	0,542	0,612	0,570	80,165	99,449	87,879	89,164



Gambar 5. Hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L) dengan persen sel hidup T47D yang memperlihatkan bahwa meningkatnya konsentrasi ekstrak berkorelasi dengan penurunan persen sel hidup.

D. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak etanol daun srikaya, didahului dengan pengujian menggunakan uji tabung yang bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung secara umum. Ekstrak etanol daun srikaya mengandung alkaloid, polifenol dan flavonoid (Gambar 6 dan Tabel 2). Kandungan alkaloid pada ekstrak etanol daun srikaya ditandai dengan terbentuknya endapan coklat dengan pereaksi mayer dan terbentuk endapan coklat dengan reagen Dragendorff. Terbentuknya warna ungu atau abu-abu kelabu pada penambahan FeCl_3 menunjukkan kandungan polifenol. Adanya kandungan flavonoid, diketahui dengan fluoresensi kuning orange pada UV 366 nm setelah ditambah sitoborat.



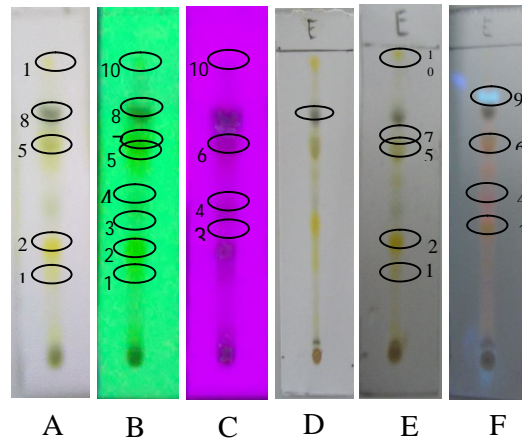
Gambar 6. Hasil Uji Tabung Senyawa Kimia Ekstrak Daun Srikaya.

- Keterangan:**
- Hasil uji flavonoid di bawah UV 366 nm dengan penambahan sitoborat. Positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya fluoresensi kuning oranye.
 - Hasil uji polifenol dengan reagen FeCl_3 . Positif polifenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna abu-abu.
 - Hasil uji alkaloid dengan reagen Dragendorff dan Mayer LP. Terbentuknya endapan coklat menunjukkan adanya alkaloid.

Tabel 2. Hasil Uji Tabung Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Srikaya

No.	Uji Tabung	Reagen	Hasil
1	Alkaloid	Dragendorff (terbentuk endapan coklat)	+
		Mayer LP (terbentuk endapan coklat)	+
2	Flavonoid	Sitoborat(Fluoresensi kuning orange pada UV 366 nm)	+
3	Polifenol	FeCl_3 (abu-abu)	+

Skrinning fitokimia dilanjutkan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Senyawa polifenol dideteksi dengan FeCl_3 . Suatu polifenol bila disemprot dengan FeCl_3 akan memberikan warna hijau, merah ungu, biru, kelabu atau hitam (Harborne, 1996). Terbentuknya bercak berwarna abu-abu atau abu-abu kehitaman pada R_f 0,77 pada pengamatan visual, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya mengandung polifenol. Adanya kandungan alkaloid pada daun srikaya ditandai dengan terbentuknya bercak kuning muda secara visual dan kuning kecoklatan setelah disemprot dengan reagen Dragendorff (Wagner, 1984) pada R_f 0,26; 0,33; 0,60; 0,64; dan 0,84. Flavonoid akan membentuk kompleks dengan asam borat dan jika dilihat di bawah lampu UV366 nm akan berfluoresensi kuning orange (Wagner, 1984). Hasil uji ekstrak etanol daun srikaya menunjukkan adanya kandungan flavonoid ditandai dengan terbentuknya fluoresensi kuning orange pada UV 366 nm yaitu pada R_f 0,42; 0,49; 0,62 dan 0,82 (Gambar 7, Tabel 3).



Gambar 7. Hasil KLT Ekstrak Etanol daun srikaya dengan Fase Gerak hexan : etil asetat (6 : 4) dengan fase diam Silika gel GF₂₅₄ yang menunjukkan terdapat 10 senyawa dalam ekstrak etanol daun srikaya yaitu dari golongan alkaloid, flavonoid dan polifenol.

Keterangan:

A : visual

B : deteksi UV 254 nm

C : deteksi UV 366 nm

D : deteksi pereaksi semprot FeCl₃ secara visual

E : deteksi pereaksi semprot Dragendorff secara visual

F : deteksi pereaksi semprot sitoborat

Tabel 3. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Srikaya

Bercak	Rf	UV 254 nm	UV 366 nm	visual	FeCl ₃ Secara visual	Dragendorff	Sitroborat UV 366nm	Perkiraan Senyawa
1	0,26	Pmd	-	Kuning muda	-	Kuning	-	alkaloid
2	0,33	Pmd	-	Kuning muda	-	Kuning kecoklatan	-	alkaloid
3	0,42	Pmd	F.Merah jingga	-	-	-	Kuning orange	flavonoid
4	0,49	Pmd	F.Merah jingga	-	-	-	Kuning orange	flavonoid
5	0,60	Pmd	-	Kuning muda	-	Kuning kecoklatan	-	alkaloid
6	0,62	-	F.Kuning orange	-	-	-	kuning orange	Flavonoid
7	0,64	Pmd	-	-	-	Kuning kecoklatan	-	Alkaloid
8	0,77	Pmd	-	keabuan	Abu	-	-	Polifenol (tanin)
9	0,82	-	-	-	-	-	Hijau kebiruan	flavonoid
10	0,84	Pmd	Biru gelap	Kuning muda	-	Kuning coklat	-	alkaloid

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya memiliki efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel T47D dengan IC_{50} 144,44 $\mu\text{g/mL}$. Sementara hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid, flavonoid dan polifenol. Hasil-hasil tersebut mengindikasikan ekstrak etanol daun srikaya kurang berefek sitotoksik terhadap sel T47D karena kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor antara lain rendahnya senyawa-senyawa dalam ekstrak etanol daun srikaya yang memiliki aktivitas antikanker termasuk senyawa asetogenin dan golongan alkaloid atau kemungkinan ekstrak etanol daun srikaya mempunyai efek toksik yang spesifik terhadap jenis sel kanker tertentu.

Alkaloid merupakan salah satu senyawa kimia dalam daun srikaya yang dikenal memiliki aktivitas antikanker. Menurut Ahmad (2007) daun dan kayu tumbuhan srikaya merupakan sumber yang kaya akan alkaloid *aporphine*. Salah satu alkaloid golongan *aporphine* yang menunjukkan potensi antikanker adalah *oksopurpureine* yang diisolasi dari ekstrak etanol *Annona purpurea* (Annonaceae) dan aktif melawan tumor 9-KB (IC_{50} 15,2 μM) (Stevigny *et al.*, 2005). Alkaloid lain dalam tanaman srikaya yang disebutkan mempunyai aktivitas antikanker yaitu *Liriodenine* (Rahayu *et al.*, 1993). *Liriodenine* yang diisolasi dari daun *Michelia compressa* dapat menginduksi ekspresi p53 pada sel kanker hepar (Hep G2 and SK-Hep-1) sehingga menghambat proliferasi sel (TJ Hsieh *et al.*). Lebrini *et al.*, (2010) menunjukkan kandungan alkaloid mayor *liriodenine* dan *oxoanalobine* tersari pada ekstrak HCl daun dan biji *Annona squamosa* yang dipurifikasi dengan CHCl_3 . Namun, rendahnya aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun srikaya terhadap sel T47D ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya kadar alkaloid pada daun srikaya yang berefek sitotoksik atau kekurangoptimalan dalam penyarian alkaloid.

Asetogenin yang terkandung dalam bangsa *Annona* terbukti mempunyai aktivitas sitotoksik melalui mekanisme penghambatan produksi ATP dengan mengganggu kompleks I mitokondria (Pardhasaradi *et al.* (2004). Penelitian asetogenin telah banyak dilakukan pada biji tanaman srikaya. Ekstrak air dan ekstrak diklorometan biji srikaya mempunyai efek toksik pada sel tumor BC-8

yang menyebabkan apoptosis sel tumor secara signifikan melalui mekanisme peningkatan aktivitas caspase-3, penurunan ekspresi gen antiapoptosis Bcl-2 dan Bcl_{XL} dan peningkatan intraseluler *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang berkorelasi dengan penurunan GSH (Phardhasaradhi *et al.*, 2004). Penelitian ini belum dapat mendeteksi adanya kandungan asetogenin dalam ekstrak etanol daun srikaya sehingga belum dapat menunjukkan pengaruh asetogenin pada aktivitas sitotoksiknya.

Dugaan spesifisitas efek toksik ekstrak etanol daun srikaya pada sel kanker ditunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya lebih poten pada sel HeLa dengan nilai LC₅₀ 4,5467 (Djajanegara dan Wahyudi, 2009) dibandingkan pada sel T47D pada penelitian ini. Pernyataan ini diperkuat oleh Pardhasaradhi *et al.* (2005) yang menyebutkan bahwa ekstrak air dan ekstrak diklorometan dari biji srikaya menginduksi apoptosis pada sel kanker MCF-7 dan K-562 tetapi tidak pada sel COLO-205. Penelitian ini menunjukkan bahwa induksi apoptosis oleh ekstrak *Annona squamosa* bersifat selektif pada sel kanker tertentu (Pardhasaradhi *et al.*, 2005).

Fraksinasi pada ekstrak etanol daun srikaya bertujuan untuk menyederhanakan senyawa dalam ekstrak dan meningkatkan aktivitasnya. Uji sitotoksik fraksi nonpolar, semipolar dan polar ekstrak etanol daun srikaya pada sel T47D menunjukkan nilai IC₅₀ yang tidak jauh berbeda dari IC₅₀ ekstrak etanolnya. Fraksi nonpolar menunjukkan IC₅₀ sebesar 204,04 µg/mL (Christanto, 2012), fraksi semipolar sebesar 184,49 µg/mL (Nugroho, 2012), dan fraksi polar dengan IC₅₀ 110,30 µg/mL (Meiningrum, 2012). Ekstrak etanol daun srikaya maupun hasil fraksinya menunjukkan kurang berefek toksik terhadap sel T47D dengan IC₅₀ > 100 µg/mL. Uji aktivitas sitotoksik pada sel T47D juga dilakukan pada bagian biji dan kulit batang srikaya. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji srikaya yang paling poten terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ 60,79 µg/mL (Erlinaningrum, 2012). Hal ini diduga senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas sitotoksik banyak terdistribusi ke bagian biji srikaya.

Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya kurang berefek toksik terhadap sel T47D. Kekurangtoksikan ini dapat

disebabkan karena rendahnya kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun srikaya yang berefek toksik seperti asetogenin dan alkaloid atau karena spesifisitas ketoksikan terhadap sel kanker. Oleh karena itu, isolasi senyawa aktif terutama golongan alkaloid dan pengujian aktivitas sitotoksik pada jenis sel kanker perlu dilakukan.