

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian ini dapat tercapai dengan rangkaian penelitian meliputi ekstraksi etanol daun sirsak, uji sitotoksik ekstrak etanol daun sirsak pada sel WiDr menggunakan metode MTT, dan uji antimigrasi dengan metode *scratch wound healing assay*.

A. Hasil Ekstraksi Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Ekstrak kental diperoleh dari 1,7 kg serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% adalah 24,34 gram ekstrak kental.

B. Uji Sitotoksik MTT Assay Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

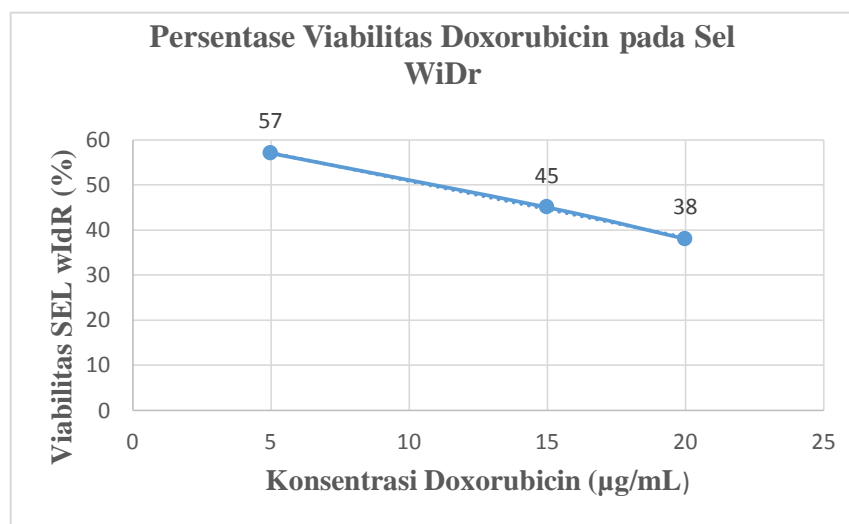
Uji sitotoksitas merupakan uji untuk mengetahui kemampuan suatu ekstrak dalam memberikan efek toksik pada sel dengan konsentrasi tertentu. Salah satu metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksitas secara *in vitro* adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh sistem reduktase, suksinat tetrazolium yang masuk ke dalam rantai respirasi pada mitokondria sel – sel yang hidup dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Tujuan uji sitotoksitas ini akan digunakan sebagai acuan dalam pemberian konsentrasi pada uji antimigrasi. Pada uji sitotoksitas dibuat 2 larutan uji yaitu ekstrak etanol

daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan doxorubicin. Doxorubicin merupakan obat agen antikanker sehingga pada uji sitotoksitas digunakan doxorubicin sebagai kontrol positif. Seri konsentrasi yang digunakan pada doxorubicin yaitu, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, dan 15 $\mu\text{g/mL}$. Persentase viabilitas uji sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr dapat dilihat pada Tabel 2 dan Grafik 1 dibawah ini.

Tabel 2. Persentase rata – rata viabilitas sel kanker kolon WiDr dengan perlakuan doxorubicin.

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata – rata Absorbansi Doxorubicin	Viabilitas sel WiDr (%)
5	0,8814	57
10	0,80635	45
15	0,75565	38

Rata – rata Absorbansi	Kontrol Sel	1,1606
	Kontrol Media	0,5101



Grafik 1. hubungan persentase (%) viabilitas sel WiDr dengan konsentrasi Doxorubicin.

Hasil persentase viabilitas sel kanker kolon WiDr pada perlakuan doxorubicin dengan konsentrasi 5 µg/mL, 10 µg/mL, dan 20 µg/mL di dapatkan hasil berturut – turut sebesar 57%, 45%, dan 38%. Hasil menunjukkan bahwa pada perlakuan doxorubicin terhadap sel kanker kolon WiDr dengan konsentrasi larutan uji 5 µg/mL mempunyai persentase viabilitas paling besar, yaitu mencapai 57% dan pada konsentrasi 20 µg/mL hanya mempunyai persentase viabilitas sebesar 38%.

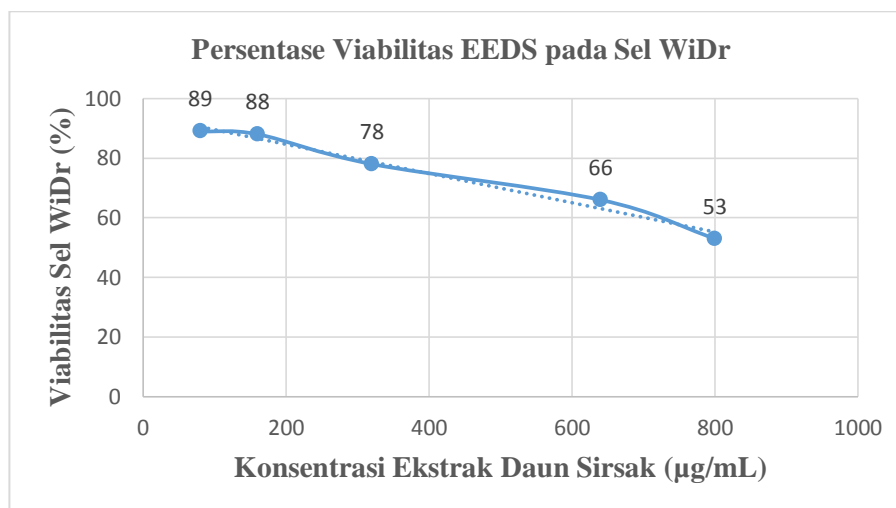
Pada uji sitotoksitas dibuat konsentrasi awal ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebesar 50 mg/mL. Pelarutan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan DMSO dan air dengan perbandingan 1 : 9. Larutan uji yang dibuat kemudian ditambahkan dengan media kultur RPMI untuk membuat seri konsentrasi yang berbeda. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 80 µg/mL, 160 µg/mL, 320 µg/mL, 640 µg/mL, dan 800 µg/mL. Pengenceran larutan ini akan digunakan sebagai bahan uji dengan menambahkan larutan uji sebanyak 100 µL tiap sumuran ke dalam 96- well plate yang bersisi sel kanker kolon WiDr yang selanjutnya akan diinkubasi selama 24 – 48 jam dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi diberikan reagen MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam untuk melihat apakah sudah terbentuk kristal formazan. Jika sudah terbentuk kristal formazan selanjutnya diberikan reagen *stopper* (SDS 10% dalam HCL 0,01N) yang dapat melarutkan kristal formazan dan diamkan dalam ruang tertutup selama semalam. Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya menggunakan *elisa reader* pada panjang gelombang 596 nm.

Persentase viabilitas uji sitotoksik sel kanker kolon WiDr dapat dilihat pada Tabel 3 dan Grafik 2 dibawah ini.

Tabel 3. Persentase rata – rata viabilitas sel kanker kolon WiDr dengan perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Konsentrasi (µg/mL)	Rata – rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel WiDr (%)
80	1,0909 ± 0,07	89
160	1,0850 ± 0,03	88
320	1,0290 ± 0,05	78
640	0,9375 ± 0,12	66
800	0,8531 ± 0,07	53

Rata – rata Absorbansi	Kontrol Sel	1,1606
		Kontrol Media



Grafik 2. Grafik hubungan % viabilitas sel WiDr dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Hasil persentase viabilitas sel kanker kolon WiDr pada perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi 80 µg/mL, 160 µg/mL, 320 µg/mL, 640 µg/mL, dan 800 µg/mL di dapatkan hasil berturut – turut sebesar 89%, 88%, 78%, 66% dan 53%. Hasil menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap sel kanker kolon WiDr dengan konsentrasi larutan uji 80 µg/mL mempunyai

persentase viabilitas paling besar yaitu mencapai 89% dan pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$ hanya mempunyai persentase viabilitas sebesar 53% sehingga didapatkan korelasi antara konsentrasi larutan uji dengan efek sitotoksik yang menunjukkan pola *dose dependent*, yaitu semakin tinggi konsentrasi maka semakin kecil persentase jumlah sel yang hidup. Sebaliknya semakin rendah konsentrasi maka semakin tinggi persentase jumlah sel yang hidup. Hal ini membuktikan bahwa efek sitotoksik dipengaruhi oleh konsentrasi larutan uji dengan adanya senyawa aktif yang terkandung dalam larutan uji sehingga memiliki efek toksik semakin besar.

Pada uji sitotoksitas dibutuhkan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration*). Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr sebesar 50% dari total populasi. Penentuan nilai IC_{50} dihitung dengan *regresi liner* menggunakan software SPSS sehingga di dapatkan persamaan linear ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) $y = -0,049 x + 94,383$ dan diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebesar 905,77 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan persamaan linear doxorubicin $y = -0,126 x + 63,429$ dan diperoleh nilai IC_{50} Doxorubicin sebesar 10,73 $\mu\text{g/mL}$. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi nilai aktivitas sitotoksiknya (Winarno, *et al.*, 2010). Didapatkan perbandingan hasil nilai IC_{50} doxorubicin lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) Hasil tersebut bukan berarti ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Suatu larutan uji dikatakan sangat poten memiliki potensi agen sitotoksik apabila nilai IC_{50} yang diperoleh 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ dan dikatakan

memiliki potensi sebagai agen sitotoksik moderate jika nilai IC_{50} yang diperoleh kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$. (Prayong, *et al.*, 2008).

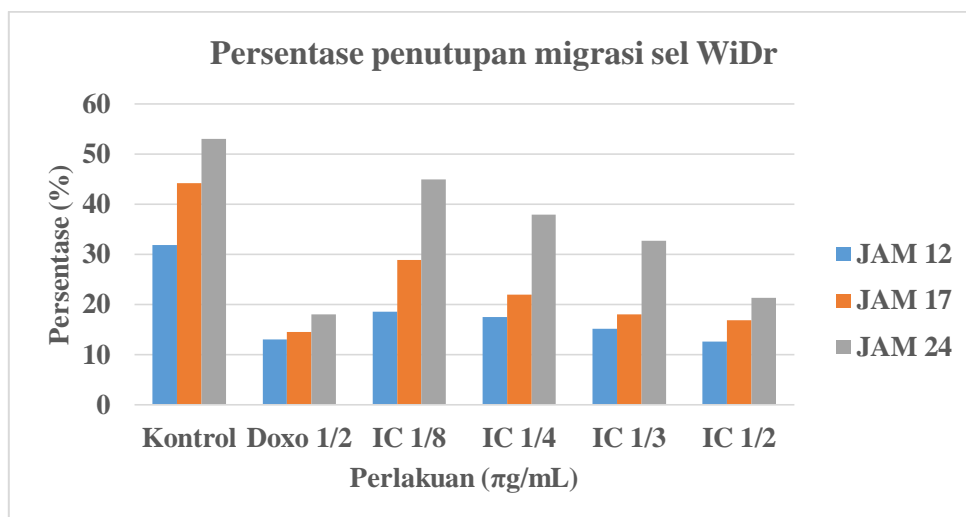
Hasil uji sitotoksitas ini dapat diketahui bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki potensi sebagai agen sitotoksik *moderate* karena didapatkan nilai IC_{50} sebesar 905,77 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini membuktikan bahwa efek sitotoksik dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) disebabkan oleh komponen yang terdapat dalam daun sirsak. Daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki berbagai kandungan senyawa antara lain flavonoid, alkaloid, minyak esensial dan *acetogenin*.

C. Uji Antimigrasi Scratch Wound Healing

Metode *scratch wound healing* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mempelajari kemampuan sel bermigrasi secara *in vitro*. Prinsip dari metode ini dilakukan dengan cara menggores (*scratch*) pada sel monolayer yang konfluen menggunakan *yellow tip steril* hingga terbentuk goresan dengan ukuran tertentu. Sel akan berkomunikasi satu sama lain sehingga pada waktu tertentu akan menutup goresan (*scratch*) yang telah dibuat (Wang, *et al.*, 2012). Kemudian selama proses migrasi berlangsung dilakukan pengamatan dengan pengambilan gambar menggunakan mikroskop *inverted* secara berkala dan membandingkan gambar untuk menentukan nilai presentasi penutupan migrasi sel (Haryati, *et al.*, 2017)

Pengujian migrasi sel dilakukan dengan menggunakan metode *in vitro scratch wound healing* yang diamati pada jam ke- 0, ke- 12, ke- 17 dan ke- 24 setelah pemberian perlakuan. Pada uji antimigrasi diberikan 2 perlakuan yaitu

doxorubicin sebagai kontrol positif dan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.). Seri konsentrasi doxorubicin yang digunakan untuk uji antimigrasi adalah $\frac{1}{2}$ IC₅₀ sedangkan seri konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang digunakan untuk uji antimigrasi adalah $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, dan $\frac{1}{2}$ IC₅₀. Analisis persentase migrasi dilakukan dengan menggunakan *software ImageJ* berdasarkan besar penutupan area migrasi sel kanker WiDr. Persentase penutupan tiap perlakuan pada jam ke- 0, ke- 12, ke- 17 dan ke- 24 kemudian dibandingkan dengan kontrol sel. Data hasil rerata persentase migrasi ditampilkan dalam bentuk diagram batang pada Grafik 3 berikut.



Grafik 3. Diagram batang rerata persentase migrasi (%) jam 12, 17, dan 24 pada sel WiDr.

Pada grafik diatas didapatkan hasil persentase penutupan migrasi sel kanker pada kontrol lebih besar dibandingkan dengan perlakuan. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol sel tidak diberikan perlakuan apapun. Persentase penutupan migrasi terkecil ditunjukkan pada perlakuan $\frac{1}{2}$ IC₅₀ yang berarti memiliki efek menghambat penutupan migrasi sel kanker WiDr paling tinggi

diantara konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang lain. Semakin kecil hasil persentase maka aktivitas menghambat dalam migrasi sel kanker semakin besar.

Tabel 4. Hasil analisis menggunakan *One way annova* penutupan migrasi sel kanker WiDr pada jam ke 12, 17, dan 24.

Perlakuan	Persentase migrasi (%)		
	Jam Ke-12	Jam Ke- 17	Jam Ke- 24
Kontrol Sel	31,90 ± 1,31	44,24 ± 1,76	53 ± 1,80
Doxorubicin $\frac{1}{2}$ IC ₅₀	13,03 ± 3,47	14,56 ± 4,84	18,04 ± 7,90
Ekstrak $\frac{1}{8}$ IC ₅₀	18,55 ± 3,46	28,88 ± 11,72	44,98 ± 6,88
Ekstrak $\frac{1}{4}$ IC ₅₀	17,48 ± 3,30	21,95 ± 2,06	37,87 ± 4,34
Ekstrak $\frac{1}{3}$ IC ₅₀	15,17 ± 3,87	18,08 ± 3,78	32,70 ± 10,58
Ekstrak $\frac{1}{2}$ IC ₅₀	12,57 ± 1,99	16,84 ± 1,32	21,28 ± 3,99
Signifikansi	0,000	0,000	0,000

Pada tabel 4 diatas menunjukkan hasil pengamatan persentase penutupan area migrasi sel kanker WiDr yang dianalisis dengan SPSS menggunakan *uji one way annova* untuk mengetahui tingkat signifikansi pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kemampuan menghambat migrasi pada sel kanker kolon WiDr. Dari tabel diatas didapatkan nilai signifikansi pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada jam ke- 12, ke- 17 dan ke- 24 secara berturut – turut adalah 0,000. Nilai signifikansi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki perbedaan yang bermakna sehingga memiliki efek dalam menghambat aktivitas migrasi pada sel kanker kolon WiDr.

Pada pengamatan migrasi jam ke- 12 besar persentase penutupan pada sel kanker kolon WiDr yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$ IC₅₀ secara berturut – turut adalah 18,55 ± 3,46 %, 17,48 ± 3,30 %, 15,17 ± 3,87 %, dan 12,57 ± 1,99 %.

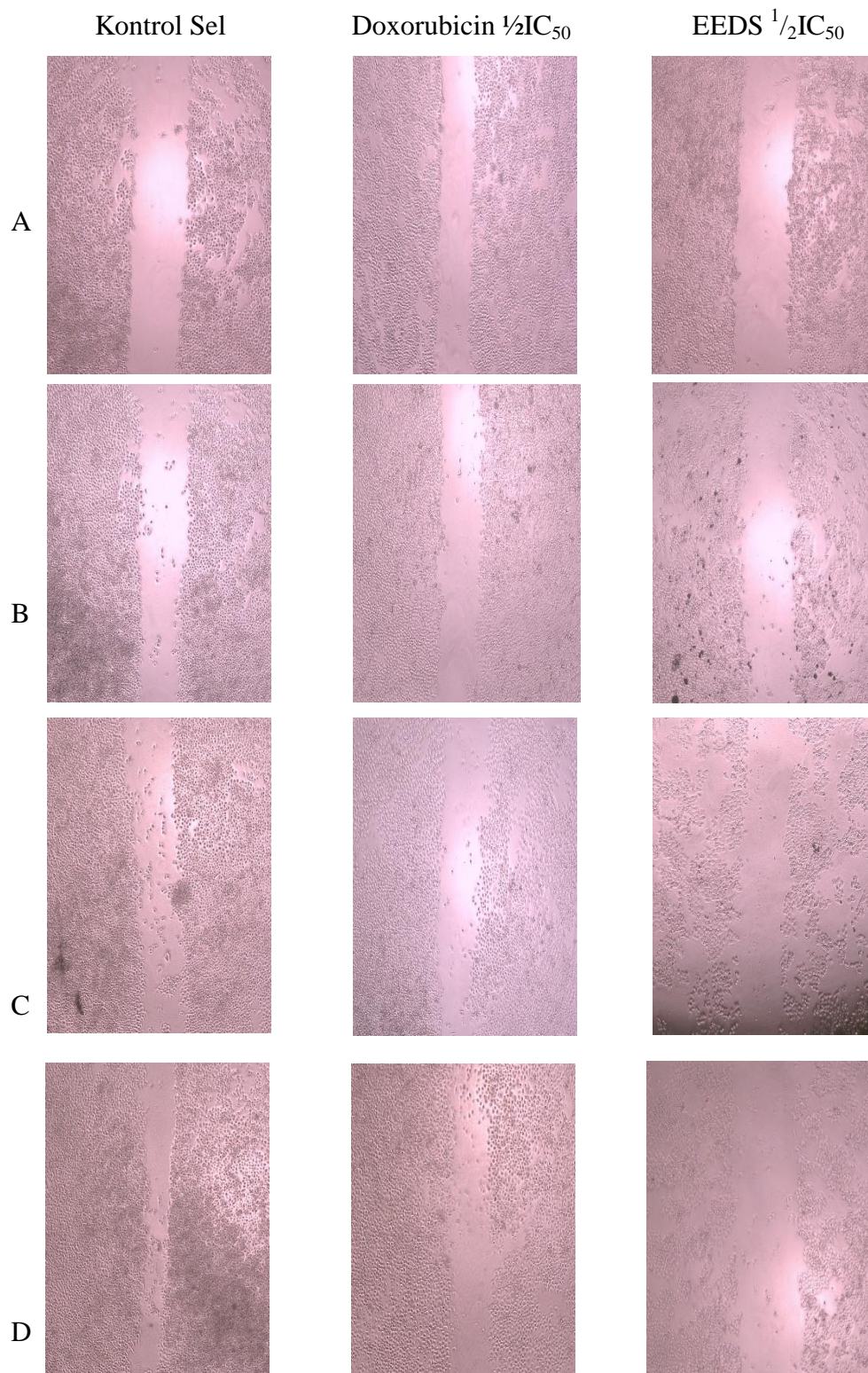
Sedangkan besar persentase penutupan migrasi sel pada pemberian doxorubicin dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ adalah $13,03 \pm 3,47$ %.

Pada pengamatan migrasi jam ke- 17 besar persentase penutupan pada sel kanker kolon WiDr yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$ IC₅₀ secara berturut – turut adalah $28,88 \pm 11,72$ %, $21,95 \pm 2,06$ %, $18,08 \pm 2,06$ % dan $16,84 \pm 1,32$ %. Sedangkan besar persentase penutupan migrasi sel pada pemberian doxorubicin dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ adalah $14,56 \pm 4,84$ %.

Pada pengamatan migrasi jam ke- 24 besar persentase penutupan pada sel kanker kolon WiDr yang diberikan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$ IC₅₀ secara berturut – turut adalah $44,98 \pm 6,88$ %, $37,87 \pm 4,34$ %, $32,70 \pm 10,58$ %, dan $21,28 \pm 3,99$ %. Sedangkan besar persentase penutupan migrasi sel pada pemberian doxorubicin dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ adalah $18,04 \pm 7,90$ %.

Pemberian konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ekstrak etanol daun sirsak menunjukkan persentase penutupan area migrasi paling kecil dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) lainnya. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ memiliki efek penghambatan yang paling tinggi pada migrasi sel kanker kolon WiDr.

Efek migrasi sel kanker kolon WiDr setelah diberikan perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat dilihat dengan mikroskop *inverted* dari area goresan seperti pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 5. A, B, C, D berturut – turut adalah migrasi sel kanker kolon WiDr jam ke- 0, ke- 12, ke- 17, dan ke- 24 setelah pemberian perlakuan.

Pada gambar 4 diatas dapat dilihat terjadi penutupan area goresan pada kontrol sel lebih cepat dibandingkan dengan penutupan area goresan pada doxorubicin dan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dikarenakan pada kontrol sel tidak diberikan perlakuan apapun. Pada jam ke- 12 setelah pemberian perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) menunjukkan efek penghambatan terhadap area migrasi sel yang dapat dilihat dari penurunan jumlah persentase area migrasi dibandingkan dengan kontrol sel. Hal tersebut dapat dilihat dari gambar 4 pada area migrasi kontrol sel terjadi penutupan yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.). Pada jam ke- 17 setelah pemberian perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terlihat peningkatan penghambatan area migrasi sel yang dilihat dari penurunan jumlah persentase migrasi sel. Pada jam ke- 24 setelah pemberian perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) menunjukkan bahwa ekstrak mampu menghambat migrasi sel yang ditunjukkan dengan nilai persentase penutupan yang semakin kecil sedangkan pada kontrol sel aktivitas migrasi semakin meningkat terbukti dengan penutupan yang sangat konfluen dibanding perlakuan lainnya. Pemberian perlakuan doxorubicin sebagai kontrol positif menunjukkan efek penghambatan pada migrasi sel.

Pada uji antimigrasi ini dapat diketahui bahwa pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki persentase aktivitas menghambat migrasi paling besar yaitu 21,28% pada sel kanker kolon WiDr. Hal tersebut dapat membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona*

muricata L.) memiliki efek dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr. Daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki berbagai kandungan senyawa yaitu flavonoid, alkaloid, minyak esensial dan *acetogenin*. Senyawa *acetogenin* yang terdapat dalam daun sirsak (*Annona muricata* L.) sendiri memiliki aktivitas antikanker sehingga mempunyai kemampuan dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr. Senyawa *acetogenin* dapat menghambat sumber energi untuk pertumbuhan sel kanker kolon WiDr. Penghambatan pada kekuatan energi menyebabkan sel kanker tidak bisa membelah dengan baik. *Acetogenin* yang ikut masuk ke dalam tubuh akan menempel pada reseptor dinding sel dan berfungsi merusak ATP di dinding mitokondria sehingga mengakibatkan produksi energi dalam sel kanker terhenti sehingga menghambat proses migrasi sel (Utari, *et al.*, 2013).

Dalam penelitian ini digunakan doxorubicin sebagai kontrol positif yang digunakan sebagai obat kanker. Mekanisme doxorubicin sebagai agen kemoterapi dalam pengobatan kanker yaitu interkalasi DNA sehingga mengakibatkan penghambatan sintesis DNA dan RNA (Utari, *et al.*, 2013).