

Nomer Reg. PST/39/2015

LAPORAN PENELITIAN

BANTUAN PENELITIAN KOMPETITIF KOLEKTIF
DIREKTORAT PENDIDIKAN TINGGI ISLAM
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN ISLAM
KEMENTERIAN AGAMA RI

TAHUN 2015



PENGEMBANGAN PRODUK FITOFARMAKA DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*) SEBAGAI OBAT KANKER PAYUDARA

Oleh:

Rohatul Muti'ah, S.F, M.Kes, Apt	UIN MALIKI MALANG
dr. Tias Pramesti Griana	UIN MALIKI MALANG
Yanu Andhiarto, M.Farm, Apt	UIN MALIKI MALANG

PENGEMBANGAN PRODUK FITOFARMAKA DARI FRAKSI ETIL

ASETAT DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*) SEBAGAI OBAT

KANKER PAYUDARA

ABSTRAK

Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekwensi pada semakin meningkatnya dosis terapi (Conze *et al*, 2001). Oleh karena hal itu sampai saat ini masih perlu dikembangkan obat kemoterapi baru dalam mengatasi permasalahan tersebut di atas. Salah satu alternatif bahan obat yang bisa digunakan adalah dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang menarik untuk diteliti adalah tanaman widuri (*Calotrophis gigantea*). Berdasar data peneitian sebelumnya didapatkan bahwa Fraksi etylasetat daun widuri mempunyai aktivitas antikanker paling kuat (IC_{50} : 33.08 μ g/mL) dan dosis yang berefek antikanker tersebut masih dalam batas aman terhadap pertumbuhan sel normal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mekanisme kerja fraksi etil asetat daun widuri dan mengembangkan menjadi produk fitofarmaka pendekatan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) yaitu suatu metode pendekatan mekanisme kerja obat antikanker yang diharapkan memiliki aktifitas antikanker yang selektif hanya membunuh sel kanker tanpa membunuh sel normal yaitu melalui mekanisme apoptosis sel. Dari hasil uji mekanisme apoptosis sel melalui ekspresi caspase-3 diketahui bahwa Ekstrak daun widuri pada 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 caspase-3 secara signifikan. Oleh karena itu ekstrak daun widuri sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat fitofarmaka. Selanjutnya berdasarkan hasil uji keamanan ekstrak melalui uji toksisitas akut didapatkan hasil bahwa *Lethal Dose Concentration* (LD_{50}) dari ekstrak daun widuri adalah sebesar 4000 mg/kgBB. Berdasarkan tabel yang diambil dari metode Loomis (1978) dalam Jenova (2009) dosis tersebut masuk kategori cukup toksik (500-5000 mg/Kg BB)

Kata Kunci : Fitoframaka, *Calotropis gigantea*, antikanker payudara

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Kanker Payudara termasuk dalam kelompok lima kanker penyebab kematian terbanyak di dunia selain kanker paru-paru, lambung, kolon dan hati. Kanker ini menyebabkan 519.000 kematian per tahun (WHO, 2013). Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker tersebut, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekwensi pada semakin meningkatnya dosis terapi (Conze *et al*, 2001). Sehingga sampai saat ini masih perlu dikembangkan obat kemoterapi baru untuk mengatasi permasalahan tersebut di atas. Salah satu alternatif bahan obat yang bisa digunakan adalah dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang menarik untuk diteliti adalah tanaman widuri (*Calotropis gigantea*).

Bahan alam terutama yang berasal dari tanaman ditumbuhkan Allah SWT untuk dapat memberikan manfaat kepada mahlukNya. Salah satu manfaat tersebut adalah dapat digunakan sebagai obat. Begitu pula dengan tanaman widuri ditumbuhkan dengan tujuan untuk dapat memberikan hikmah atau manfaat kepada manusia. Salah satu manfaat yang dapat diambil dari tanaman widuri khususnya pada daunnya adalah dapat digunakan sebagai obat kanker. Hal ini tidak akan mungkin dapat diketahui tanpa memikirkan akan kekuasaan yang telah diberikan Allah SWT kepada manusia untuk kemaslahatan kehidupan manusia di dunia. Di dalam Al Quran surat asy Syu'araa' ayat 7 Allah berfirman:

أَوْلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٌ

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

Beberapa penelitian terbaru terkait kemampuan tanaman *Calotropis gigantea* sebagai antikanker yaitu potensi sitotoksik senyawa cardenolid dari bagian daun terhadap sel kanker MCF-7, sel kanker kulit KB, sel kanker paru NCL-H18 (Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010), potensi sitotoksik ekstrak diklorometan dari daun terhadap selkanker MCF-7, MDA-MB-231, sel Hela, HT-29, SKOV-3, Hep-G2 (Wong *et al*, 2011). Senyawa calotropon dari bagian akar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap Leukemia K562 dan kanker lambung 7901 (Wang *et al*, 2008). Ekstrak methanol dan fraksi kloroform bagian bunga mempunyai aktivitas antitumor pada mencit *ascites carcinoma* (Habib *et al*, 2010).

Pada penelitian sebelumnya peneliti telah melakukan pengujian aktivitas antikanker dari tanaman *Calotropis gigantea* pada bagian daun dan bunga serta fraksi-fraksinya. Dari penelitian tersebut telah didapatkan hasil bahwa yang pertama ekstrak etanol bagian daun *Calotropis gigantea* mempunyai potensi sitotoksik lebih tinggi terhadap sel kanker payudara T47D (IC_{50} 459,5 $\mu\text{g/mL}$) dibanding bagian bunga ($IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$). sehingga bagian daun mempunyai potensi untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi agen kemoterapi terutama pada kanker payudara . Kedua Setelah dilakukan pengujian ekstrak etanol daun terhadap sel normal di dapatkan hasil bahwa ekstrak tersebut tidak mempunyai pengaruh yang signifikan $p>0.05$ terhadap pertumbuhan sel normal NiH3T3. Artinya dosis yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam batas aman terhadap pertumbuhan sel normal. Ketiga setelah dilakukan fraksinasi dan dilakukan pengujian sitotoksik di dapatkan hasil bahwa Fraksi etylasetat (IC_{50} : 33.08 $\mu\text{g/mL}$) mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D lebih tinggi dari pada fraksi diklorometan (IC_{50} :103.4 $\mu\text{g/mL}$) fraksi butanol (IC_{50} :126 $\mu\text{g/mL}$) dan fraksi air ($IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$). oleh karena itu fraksi etil asetat mempunyai potensi yang tinggi untuk dikembangkan menjadi obat antikanker terutama untuk terapi kanker payudara (Mutiah dkk, 2014).

Berdasarkan data yang diperoleh peneliti pada penelitian sebelumnya maka penting untuk dilakukan penelitian lanjutan terhadap fraksi etil asetat terutama terkait mekanisme kerjanya sebagai obat antikanker dan pengembangannya menjadi produk fitofarmaka. Ekstrak etil asetat daun *Calotropis gigantea* akan dikembangkan menjadi obat antikanker yang efektif dan selektif dengan pendekatan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) yaitu suatu metode pendekatan mekanisme kerja obat antikanker yang

diharapkan memiliki aktifitas antikanker yang selektif hanya membunuh sel kanker tanpa membunuh sel normal yaitu melalui mekanisme apoptosis sel.

Selanjutnya fraksi etil asetat akan dikembangkan menjadi produk fitofarmaka dengan beberapa langkah lanjutan sebagai berikut: Pertama perlu dilakukan uji preklinik yang meliputi pengujian efektifitas antikanker secara *in vivo*, toksisitas akut, toksisitas sub kronik dan uji teratogenik. Pengujian efektifitas dilakukan untuk penentuan tingkat efektifitas senyawa antikanker dan kisaran dosis terapi tanaman obat. Parameter efektifitas ini ditentukan dari nilai ED₅₀ (*Effectivitas Dose 50%*). Uji toksisitas akut diperlukan untuk mengetahui keamanan tanaman obat dalam tubuh, karena tanaman obat juga merupakan senyawa kimia asing yang belum tentu sepenuhnya aman bagi tubuh. Uji toksisitas akut diukur melalui parameter LD₅₀ (*Lethal Dose 50%*) dan gambaran histopatologi organ ginjal paru-paru jantung, hati otak dan usus. Dengan diketahuinya nilai ED₅₀ dan LD₅₀ maka dapat dipakai untuk menilai batas keamanan obat atau indeks terapi (LD₅₀/ED₅₀). Uji toksisitas sub kronik bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak antikanker *C.gigantea* terhadap tubuh jika digunakan dalam jangka waktu yang lama. Sedangkan uji teratogenik pada hewan coba bunting diperlukan untuk mengetahui keamanan ekstrak pada janin, yang akan menggambarkan keamanan penggunaan bagi ibu hamil dan menyusui.

Yang Kedua diperlukan pengembangan ekstrak tanaman obat dalam bentuk sediaan yang sesuai. Peneliti akan mengembangkan ekstrak daun *C.gigantea* menjadi bentuk tablet dengan metode cetak langsung. Bentuk sediaan tablet dipilih karena lebih stabil dibanding bentuk cair serta takaran atau dosis untuk setiap tablet seragam dan teliti. Selanjutnya bentuk sediaan tablet dari ekstrak *C.gigantea* tersebut akan dilakukan pengujian efektifitas dan keamanan kembali guna mengevaluasi ketepatan formulasi dan bentuk sediaan tablet sehingga tidak mengganggu efektifitas dan keamanan kerja obat. Setelah diketahui efektifitas dan keamanan tablet antikanker *C.gigantea* maka sediaan tersebut siap untuk didaftarkan ke BPOM sebagai Obat Herbal Terstandar (OHT). Pada tahap selanjutnya Status OHT tersebut bisa ditingkatkan menjadi Fitofarmaka melalui uji klinik terlebih dahulu yaitu uji klinik fase I (20-30 pasien), fase II (100-300 pasien), fase III (1000-5000 pasien) dan fase IV *post marketing surveillance*.

Pada tahun pertama ini peneliti akan mengembangkan ekstrak daun *C.gigantea* menjadi Fitofarmaka pada tahapan pengujian mekanisme kerja antikanker secara *in vitro*

dan uji preklinik pada model hewan coba (*in vivo*). Pada tahun ke-2 akan dilanjutkan dengan pembuatan formulasi yang tepat dalam bentuk sediaan tablet. Dari pengujian ini maka sediaan obat anti kanker telah memenuhi syarat untuk didaftarkan sebagai Obat Herbal Terstandar (OHT). Tahun berikutnya, produk OHT antikanker *C.gigantea* ini akan dikembangkan menjadi produk fitofarmaka melalui pengujian secara klinik pada pasien.

A. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan penelitian :

1. Apakah ekstrak etil asetat memiliki mekanisme kerja antikanker melalui jalur apoptosis sel?
2. Berapakah kisaran dosis terapi ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba kanker payudara ?
3. Berapakah kisaran dosis toksik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba?
4. Bagaimana mekanisme perantara kematian pada uji toksitas akut ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba?
5. Bagaimanakah efek sub kronik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker terhadap gambaran histologi organ ginjal paru-paru, jantung, dan hati pada model hewan coba?
6. Bagaimanakah efek sub kronik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker terhadap gambaran hematologi dan biokimia darah pada model hewan coba ?

B. Tujuan penelitian

1. Untuk mengetahui mekanisme kerja antikanker ekstrak etil asetat dengan pendekatan Apoptosis sel kanker
2. Untuk mengetahui kisaran dosis terapi ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba kanker payudara
3. Untuk mengetahui kisaran dosis toksik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba
4. Untuk mengetahui bagaimana mekanisme perantara kematian pada uji toksitas akut ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba
5. Untuk mengetahui bagaimanakah efek sub kronik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker terhadap gambaran histologi organ ginjal, paru-paru, dan hati pada model hewan coba
6. Untuk mengetahui bagaimanakah efek sub kronik ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker terhadap gambaran hematologi dan biokimia darah pada model hewan coba
7. Untuk mengetahui efek teratogenik dari ekstrak etil asetat *C.gigantea* sebagai obat antikanker pada model hewan coba bunting

C. Urgensi Penelitian

Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Resistensi terhadap obat kemoterapi banyak ditemukan pada kanker kolon, payudara prostat dan leukemia.

Resistensi agen kemoterapi tersebut dapat terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain kegagalan inisiasi apoptosis,inaktivasi obat, pengeluaran obat oleh pompa pada membran sel dan mutasi pada target obat (Davis *et al*,2003; Notarbartolo *et al*, 2005). Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penggunaan agen kemoterapi yang memiliki target molecular yang spesifik

menjadi pilihan terapi utama pada pengobatan kanker saat ini terutama melalui jalur apoptosis. Apoptosis sel merupakan kematian sel yang terprogram. Implementasi aktivitas klinik apoptosis tersebut selain menunjukkan efek kemoterapi juga memiliki efek kemopreventif (Hsiang, *et al.*, 1989 ; Cotran , 1999).

Oleh karena itu penting untuk dikembangkan obat baru terutama dari bahan alam yang memiliki potensi tinggi dan target molekular spesifik sehingga diharapkan dapat menurunkan efek samping dan mencegah resistensi obat kemoterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap mekanisme kerja ekstrak fraksi etil asetat *C.gigantea* sebagai agen kemoterapi kanker dan mengembangkan ekstrak terkait menjadi sediaan fitofarmaka.

D. Hipotesa Penelitian

Berdasarkan data penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antikanker tertinggi (IC_{50} : 33.08 $\mu\text{g/mL}$) dibanding fraksi yang lain dari daun *Calotropis gigantea*, serta diketahui pula bahwa dosis yang digunakan sebagai obat antikanker pada ekstrak daun masih dalam batas aman terhadap pertumbuhan sel normal. Sehingga di duga bahwa ekstrak fraksi etil asetat dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka yang mempunyai aktivitas antikanker yang selektif hanya membunuh sel kanker tanpa membunuh sel normal yaitu melalui mekanisme apoptosis sel.

E. Roadmap Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang berkelanjutan. Paket penelitian ini akan dikerjakan kurang lebih 4-7 tahun berturut-turut dengan tujuan akhir mendapatkan sediaan Fitofarmaka yang terstandar sebagai antikanker. Tahapan yang dilakukan meliputi: tahap I, II dan III. Tahap pertama adalah tahap untuk penentuan mutu dan keamanan ekstrak. Tahap kedua adalah tahap untuk menentukan mutu dan keamanan bentuk sediaan tablet. Tahap ke-III adalah tahapan uji klinik. Pada tahap I dan II akan diperoleh hasil akhir berupa sediaan obat herbal terstandar (OHT) antikanker. Sedangkan pada tahap III akan diperoleh hasil akhir berupa sediaan fitofarmaka.

1. Tahap I

Pada tahap pertama ini akan dilakukan beberapa langkah penelitian yang bertujuan untuk pemastian mutu ekstrak, efektifitas farmakologi dan keamanan ekstrak terpilih sebagai antikanker. Setelah diketahui efektifitas dan keamanan ekstrak tersebut maka akan dilanjutkan dengan standarisasi ekstrak dengan tujuan untuk menjamin mutu ekstrak agar sediaan obat fitofarmaka yang akan diperoleh nantinya mempunyai efikasi yang konsisten. Beberapa langkah penelitian yang akan dilakukan adalah :

a. Determinasi Tanaman

Tujuan determinasi ini adalah untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan.

b. Pembuatan Ekstrak

Metode ekstraksi yang akan dipakai pada penelitian ini adalah metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Kelebihan pelarut etanol tsb adalah karena senyawa etanol tidak toksik bagi manusia dan mampu menyari sebagian besar senyawa yang terkandung dalam tanaman (FHI, 2008).

c. Uji Efektifitas Antikanker secara *in vitro*

Uji efektifitas antikanker secara *in vitro* ini akan dilakukan pada sel kanker payudara T47D. Tujuan uji ini adalah untuk mengetahui kemampuan sitotoksitas dan konsentrasi efektif ekstrak etanolik dari bagian daun, bunga batang dan akar dari tanaman *C. gigantea*. Selanjutnya akan dipilih ekstrak yang memiliki efektifitas yang tinggi.

d. Uji Efektifitas Antikanker secara *in vivo*

Ekstrak yang diketahui memiliki efektifitas yang tinggi akan dilanjutkan dengan pengujian secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba. Tujuan pengujian ini adalah untuk memastikan efek farmakologi antikanker dan menentukan rentang dosis efektif ekstrak terkait. Parameter pengukuran yang digunakan adalah berat kanker, histopatologi dan nilai LD₅₀

e. Uji ketoksikan akut

Tujuan uji ketoksikan akut pada *road map* penelitian ini adalah untuk menetapkan potensi ketoksikan akut, yakni kisaran dosis letal atau dosis toksik kombinasi obat terkait pada penggunaan dosis tunggal. Selain itu, uji ini juga ditujukan untuk menilai berbagai gejala klinis yang timbul, adanya efek toksik yang khas, dan mekanisme perantara terjadinya kematian hewan uji. Parameter yang akan diperoleh pada uji ini adalah Harga LD₅₀ yaitu besarnya dosis suatu senyawa yang dapat menyebabkan kematian 50% jumlah populasi dalam jangka waktu tertentu .Evaluasi dilakukan tidak hanya mengenai LD₅₀, tetapi juga terhadap kelainan tingkah laku, stimulasi atau depresi sistem syaraf pusat, aktivitas motorik dan pernapasan hewan uji untuk mendapat gambaran sebab kematian dilengkapi juga dengan pemeriksaan laboratorium klinik dan pembuatan preparat histopatologi dari organ yang dianggap memerlukannya kelainan (Darmansjah, 1995).

f. Uji Ketoksikan SubKronik dan toksisitas kronik

Uji ketoksikan sub kronik pada *road map* penelitian ini akan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keamanan campuran ekstrak terkait pada penggunaan dosis berulang selama jangka waktu kurang dari 3 bulan. Sedangkan uji toksisitas kronik bertujuan untuk mengetahui keamanan campuran ekstrak terkait dalam jangka waktu lebih dari 3 bulan. Hal ini penting untuk dilakukan karena untuk mengantisipasi kemungkinan ketoksikan kombinasi ekstrak terhadap organ apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama.

g. Uji teratogenik

Uji tertogenik ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keamanan campuran ekstrak tanaman terkait terhadap janin pada penggunaan selama masa kehamilan. Parameter yang diamati meliputi kematian janin, resorpsi awal, resorpsi akhir, kondisi fisik janin, berat badan janin, berat plasenta, skeletal dan histopatologi.

h. Standarisasi ekstrak

Tujuan standarisasi ekstrak pada penelitian ini adalah untuk menjamin mutu efikasi efek farmakologi secara konsisten dan menjamin keamanan pada konsumen. Parameter-parameter standarisasi ini mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia dan Peraturan

menteri kesehatan Republik Indonesia NOMOR 760/MENKES/ PER/ IX/1992 tentang fitofarmaka (FHI, 2008; Permenkes, 1992). Standarisasi yang akan dilakukan pada tahap ini meliputi parameter spesifik dan parameter non spesifik. Penentuan parameter spesifik pada penelitian ini meliputi aspek kandungan kimia kualitatif dan kuantitatif senyawa marker, dalam hal ini senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas farmakologi antikanker. Pendekatan metode yang digunakan adalah Kromatografi lapis tipis-densitometri. Sedangkan parameter nonspesifik yang penting untuk ditentukan adalah kadar air, abu total dan abu larut asam. Hasil yang akan diperoleh di bandingkan dengan parameter yang ada dalam farmakope Herbal Indonesia (FHI, 2008).

2. Tahap II

Pada tapan kedua ini akan dibuat sediaan farmasi yang sesuai untuk keefektifan dan keamanan ekstrak terpilih. Selanjutnya akan dilakukan pengujian dan standarisasi bentuk sediaaan tersebut. Hasil akhir dari tahapan ini adalah Obat Herbal Terstandar (OHT) untuk penyakit kanker . Beberapa langkah penelitian yang akan dilakukan pada tahap kedua ini adalah:

a. Formulasi Tablet dan pengujian sifat fisik tablet

Formulasi tablet ini bertujuan untuk menentukan formula yang paling sesui untuk keefektifan dan keamanan ekstrak terkait. Metode pembuatan tablet yang digunakan adalah metode cetak langsung. Keuntungan dari metode ini adalah tahapan proses penggerjaan yang sedikit sehingga biaya, tenaga kerja dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi dapat direduksi. Selain itu metode ini juga tidak melibatkan pemanasan dan air sehingga tidak mempengaruhi stabilitas bahan aktif. Kemudian dilakukan evaluasi sifat fisik dari bentuk sediaan tersebut yang meliputi keseragaman bobot, kekerasan, kerapuhan, dan waktu hancur tablet. Bentuk sediaan tablet dipilih karena lebih stabil dibanding bentuk cair serta takaran atau dosis untuk setiap tablet seragam dan teliti.

b. Toksisitas Subkronik dan kronik

Tujuan pengujian kembali uji toksisitas sub kronik dan kronik ini adalah untuk mengetahui keamanan campuran ekstrak tanaman terkait dalam bentuk sediaan tablet jika digunakan dalam jangka waktuk yang lama, subkronik (kurang dari 3 bulan),

Kronik (lebih dari 3 bulan). Pengujian ini mengacu pada keputusan BPOM Nomor : HK.00.05.4.2411 tentang ketentuan pokok pengelompokan dan penandaan obat bahan alam Indonesia tahun 2004 bahwa Obat Herbal terstandar harus aman sesuai persyaratan yang ditetapkan.

c. Uji sediaaan tablet antikanker pada hewan coba

Pengujian efek antikanker ekstrak terpilih dalam bentuk sediaan farmasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keefektifan ekstrak tersebut dalam bentuk sediaan tablet.

d. Uji Teratogenik

Uji tertogenik ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keamanan campuran ekstrak tanaman terkait setelah dibuat sediaan tablet terhadap janin pada penggunaan selama masa kehamilan. Parameter yang diamati meliputikematian janin, resorpsi awal, resorpsi akhir, kondisi fisik janin, berat badan janin, berat plasenta, skeletal dan histopatologi

e. Penentuan kadar senyawa marker dalam campuran ekstrak

Penentuan kadar senyawa marker ini perlu dilakukan karena untuk menjamin stabilitas dan kadar senyawa tersebut setelah dibuat dalam bentuk sediaan tablet. Metode pendekatan yang dipakai adalah kromatografi lapis tipis-densitometri.

3. Tahap III

Tahap ketiga ini adalah tahap uji klinik yang merupakan pengembangan Obat herbal Terstandar menjadi sediaan fitofarmaka, tahap ketiga ini akan dilakukan kurang lebih sekitar 4-7 tahun.

a. Uji Klinik Fase I

Akan dilakukan Pengujian pada sukarelawan sehat untuk mengetahui keamanan OHT (Obat Herbal Terstandar) pada manusia dan untuk mengetahui rentang dosis aman serta profil farmakokinetiknya. Jadi pengujian ini lebih focus pada keamanan obat terkait. Pada uji klinik fase I ini menggunakan 20-30 orang sukarelawan sehat. Sediaan OHT diberikan pada rentang dosis terapi dan ditentukan keamanan dan profil farmakokinetiknya yang meliputi t_{max} , C_{max} , $t_{1/2}$ dan AUC.

b. Uji Klinik fase II

Uji klinik fase II bertujuan untuk mengetahui khasiat atau efek farmakologi OHT terkait. Fase ini dilakukan pada pasien kanker kolon dengan jumlah antara 100-200 sukarelawan. Pendekatan yang akan digunakan adalah metode TROHOC yaitu membandingkan efek antara obat uji pada penderita antikanker yang diberi terapi obat dengan penderita kanker kolon tanpa diberi terapi obat.

c. **Uji Klinik fase III**

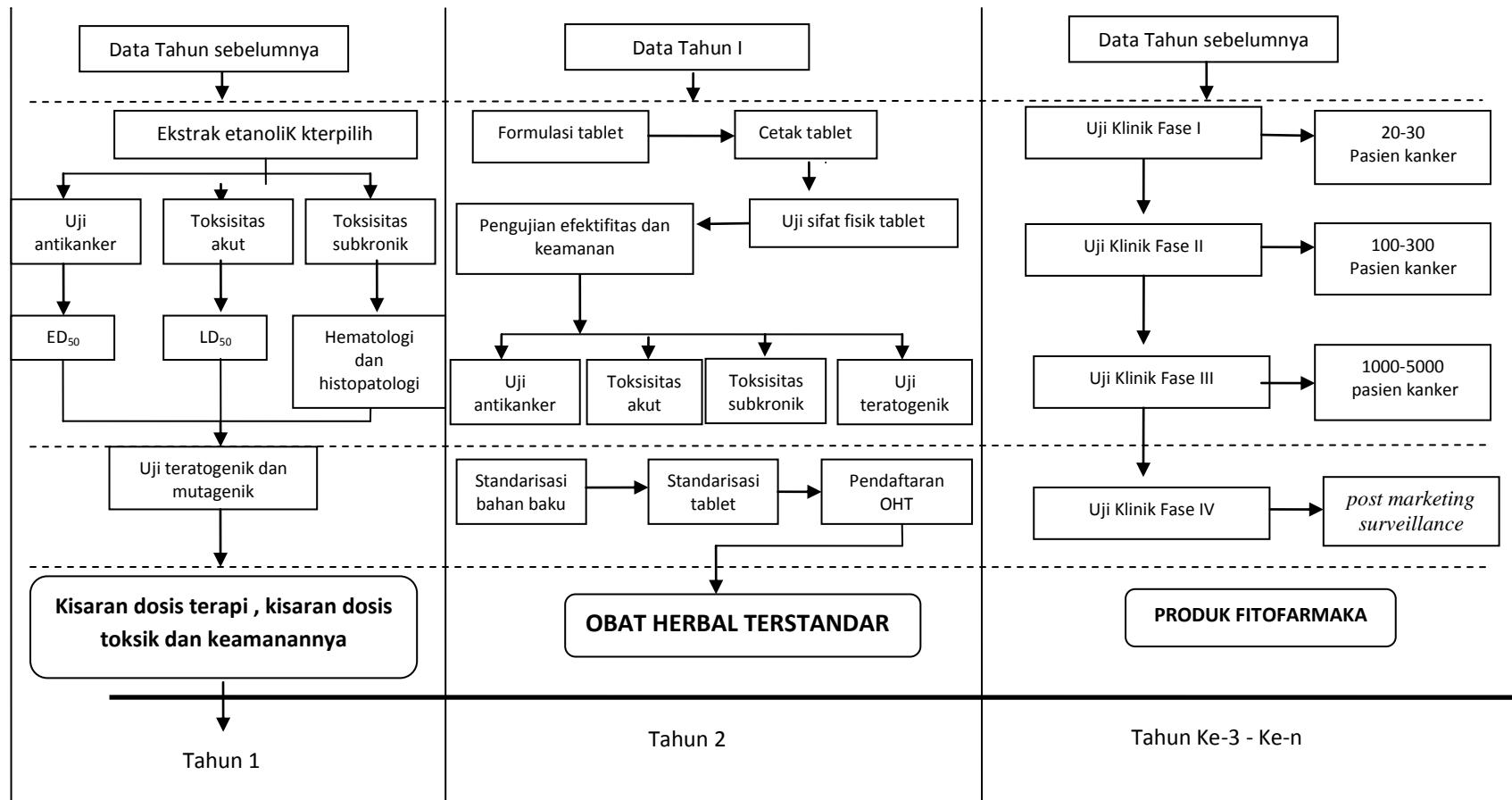
Fase ini adalah fase pengujian pada pasien dalam jumlah yang lebih besar, (*random control* dan *double blind*) dalam hal ini pengujian pada pasien acak dan tanpa ada perlakuan khusus untuk melihat efektivitas antikanker dan kemungkinan timbulnya efek yang tidak diinginkan. Sukarelawan yang dibutuhkan sejumlah 1000-5000 orang. Pendekatan metode uji yang digunakan adalah metode TROHOC yaitu yaitu membandingkan efek antara obat uji pada penderita kanker yang diberi terapi obat dengan penderita kanker tanpa diberi terapi obat.

d. **Uji Klinik Fase IV**

Pengujian saat *post marketing surveillance*, pengujian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas dan efek yang merugikan setelah obat dilepas ke pasar dan dipakai oleh banyak pasien, pengujian ini dilakukan setelah mendapat ijin edar sementara. pengujian ini dilakukan apabila tidak ditemukan efek yang merugikan yang cukup serius saat uji klinik fase I sampai fase III. Selama uji klinik fase IV dilakukan pemantauan dan monitoring secara terus menerus.

Road map penelitian ini digambarkan pada skema di bawah ini:

ROAD MAP PENELITIAN

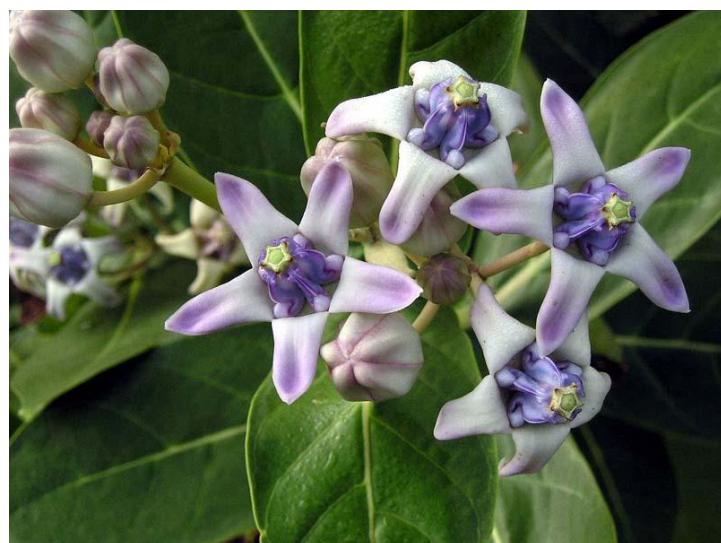


BAB II

STUDI PUSTAKA

1. Tinjauan tanaman

Biduri atau *Calotropis gigantea* adalah tumbuhan yang umum dijumpai di Indonesia, Malaysia, Philippines, Thailand, Sri Lanka, India dan China. Di Indonesia bunga ini dikenal dengan nama antara lain *babakoan*, *badori*, *biduri*, *widuri*, *saduri*, *sidoguri*, *bidhuri*, *burigha* (Jawa); *rubik*, *biduri*, *lembega*, *rembega*, *rumbigo* (Sumatera); *Manori*, *maduri* (Bali); *muduri*, *rembiga*, *kore*, *krokoh*, *kolonsusu*, *modo kapauk*, *modo kampauk* (Nusa Tenggara); *rambega* (Sulawesi). Sementara dalam bahasa Inggris, bunga ini dikenal dengan nama *Crown Flower*, *Giant milk weed*, *mudar plant*; dan dalam bahasa tagalog disebut sebagai *kapal-kapal*. Gambar Tanaman *Calotropis gigantean* disajikan pada tabel di bawah ini:



Gambar 1. tanaman *Calotropis gigantea*

2. Kajian Riset Sebelumnya

a. Kandungan senyawa

Calotropis gigantea telah dilaporkan mengandung alkaloid, glikosida sianogenik, senyawa fenolik dan tannin (Mahajan dan Badgjar, 2008), kardenolid (Lhinhatrakool dan Sutthivaiyakit, 2006; Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010), flavonoid (Sen *et al*, 1992), terpen (Anjaneyulu dan Row, 1968), sterol (Habib *et al*, 2007), proteinase (Abraham dan Joshi, 1979), asam amino nonprotein (Pari *et al*, 1998). Beberapa penelitian kandungan aktif pada tiap bagian tanaman *Calotropis gigantea* disajikan pada tabel di bawah ini:

Kandungan Kimia	Bagian	Gol. senyawa	Pustaka
19-Nor- and 18,20-Epoxy-cardenolides	Daun	Cardenolid	Lhinhatrakool dan Sutthivaiyakit, 2006
15beta-hydroxycardenolides	Daun	Cardenolid	Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010
16alpha-hydroxycalactinic acid methyl ester	Daun	Cardenolid	Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010
Isorhamnetin-3-O-rutinoside		Flavonol	Sen et al
Isorhamnetin-3-O-Glucopyranoside		Flavonol	Sen et al
Taraxasteryl acetate		Flavonol	Sen et al
Calotropain-F1 dan	Getah	Proteinase	Abraham dan Joshi, 1976
Calotropain-FII	Getah	Proteinase	Abraham dan Joshi, 1976
3'-methylbutanoates of α -amyrin	Getah	Triterpen ester	Thakur et al, 1984
ψ -taraxasterol	Getah	Triterpen ester	Thakur et al, 1984
Calotropins DI	Getah	Proteinase	Pal dan Sinha, 1980
Calotropins DII	Getah	proteinase	Pal dan Sinha, 1980
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate	Bunga	Triterpenoid	Habib dan Karim, 2009
Anhydrosophoradiol-3-acetate	Bunga	Triterpenoid	Habib dan Karim, 2009
Calotropone	Akar	Glikosida jantung	Wang et al, 2008
Calotropises juiterpenol	Akar	Terpen	Gupta dan Ali, 2000
Calotropisesterterpenol	Akar	Terpen	Gupta dan Ali, 2000
Calotropbenzofuranone	Akar	Aromatik	Gupta dan Ali, 2000
Coroglaucigenin	Akar	Cardenolid	Maoyuan et al, 2008
Frugoside	Akar	Cardenolid	Maoyuan et al, 2008
Stigmasterol	Akar Batang	Sterol	Habib et al, 2007
β -sitosterol	Akar Batang	Sterol	Habib et al, 2007
Giganticine	Akar Batang	Asam amino nonprotein	Pari et al, 1998

b. Aktifitas farmakologi

Secara ilmiah tanaman tersebut telah terbukti mempunyai beberapa efek farmakologi. Pada bunga terbukti aktif sebagai analgesik (Pathak dan Argal, 2007), antimikroba dan sitotoksik terhadap *Artemia salina* (Habib dan Karim, 2009). Daunnya telah terbukti aktif sebagai antidiare (Chitme *et al*, 2004), anti Candida (Kumar *et al*, 2010), antibakteri (Kumar *et al*, 2010),. Pada akar terbukti aktif sebagai antipiretik (Chitme *et al*, 2005), antimikroba (Alam *et al*, 2008), insektisida (Alam *et al*, 2009), CNS (Argal dan Pathak, 2006), kontrasepsi (Srivastava, 2007). Getah tanaman tersebut terbukti berefek purgatif, prokoagulan (Rajesh *et al*, 2005), *wound healing* (Nalwaya, 2009), antimikroba (Kumar *et al*, 2010). Batang dilaporkan mempunyai efek hepatoprotektor (Lodhi *et al*, 2009). Beberapa penelitian terbaru terkait kemampuan tanaman *Calotropis gigantea* sebagai antikanker yaitu potensi sitotoksik senyawa cardenolid dari daun terhadap sel kanker payudara MCF-7, sel kanker kulit KB, sel kanker paru NCL-H18 (Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010), potensi sitotoksik ekstrak diklorometan dari daun terhadap sel MCF-7, MDA-MB-231, sel Hela, HT-29, SKOV-3, Hep-G2 (Wong *et al*, 2011). Senyawa calotropon dari bagian akar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap Leukemia K562 dan *gastric cancer* 7901 (Wang *et al*, 2008).

Berdasarkan data pengalaman masyarakat (etnofarmakologi) dan beberapa pembuktian aktivitas antikanker serta kandungan senyawa aktif tanaman *C.gigantea* tersebut, maka kami menduga bahwa tanaman *C.gigantea* mempunyai potensi yang sangat tinggi untuk dikembangkan menjadi produk fitofarmaka antikanker. Oleh karena itu pada penelitian akan dilakukan pembandingan efektifitas antikanker beberapa bagian tanaman *C. gigantea* yaitu bagian bunga, daun, akar dan batang terhadap sel kanker payudara T47D. Masing-masing bagian tanaman akan diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dan pengujian dilakukan secara *in vitro*.ekstrak terpilih akan dilanjutkan dengan pengujian mekanisme kerja antikanker dengan menggunakan pendekatan jalur apoptosis sel.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis/Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik (*true experimental*) dengan menggunakan sel kanker payudara T47D. Penelitian ini dilakukan dengan pendekatan *Postes Only Kontrol Group Design* yaitu desain penelitian yang dilakukan dengan membandingkan hasil yang didapatkan setelah perlakuan dari sampel uji dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Perlakuan terhadap semua sampel, kontrol positif dan kontrol negatif dilakukan secara bersamaan dan lama perlakuan pengamatan dilakukan secara bersama-sama pula.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman *Calotropis gigantea* yang didapatkan dari Lembaga Ilmu Pengetahuan (LIPI) Purwodadi Jawa Timur. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D

3.3 Tahapan penelitian

Beberapa tahapan penelitian pada tahun pertama adalah:

1. Determinasi tanaman yang bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan.
2. Ekstraksi daun *C.gigantea* dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan pelerut etil asetat.
3. Uji mekanisme induksi apoptosis sel secara *in vitro* pada sel kanker payudara T47D dengan pendekatan flowcytometry
4. Uji Toksisitas akut ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba.
5. Uji Toksisitas sub kronik ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba.

6. Uji teratogenik ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba.

Tahun ke-2

7. Pembuatan formulasi yang sesuai dan pembuatan bentuk sediaan tablet ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker metode cetak langsung
8. Evaluasi sifat fisik tablet ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker yang meliputi pengujian keseragaman bobot, kekerasan, kerapuhan dan waktu hancur
9. Uji efektifitas tablet ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba kanker payudara untuk mendapatkan efektifitas ekstrak terkait setelah dibuat bentuk sediaan tablet
10. Uji Toksisitas akut tablet ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba kanker payudara untuk mendapatkan gambaran histopatologi organ paru-paru, ginjal dan hati sebagai indikator pengaruh tablet ekstrak daun *C. gigantea* pada organ tubuh jika digunakan dalam jangka waktu yang lama
11. Uji Toksisitas sub kronik tablet ekstrak daun *C.gigantea* sebagai antikanker pada model hewan coba kanker payudara untuk mendapatkan gambaran histopatologi organ paru-paru, ginjal dan hati serta gambaran hematologi yang berupa data kadar Hgb, RBC, WBC, Limfosit, Neutrofil, Monosit, glukosa, kolesterol, trigliserit, urea darah, ALP, SGPT dan SGOT sebagai indikator pengaruh efek sediaan tablet terkait pada organ tubuh jika digunakan dalam jangka waktu yang lama
12. Design kemasan tablet Obat Herbal Terstandar antikanker ekstrak daun *C.gigantea*
13. Pendaftaran tablet OHT antikanker ekstrak daun *C.gigantea* Ke BPOM

Pada tahun ke 3-sampai tahun ke-7 Status OHT tersebut bisa ditingkatkan menjadi Fitofarmaka melalui uji klinik terlebih dahulu yaitu uji klinik fase I (20-30 pasien), fase II (100-300 pasien), fase III (1000-5000 pasien) dan fase IV *post marketing surveillance*

3.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

3.5.1 Bahan penelitian

Bahan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Calotropis gigantea* yang diambil dari kota malang Jawa Timur. Bagian tanaman yang akan diambil adalah bagian daun, bunga, batang dan akar. Pengeringan dilakukan dengan cara ditutupi kain hitam supaya tidak terkena sinar matahari langsung. Simplisia yang telah kering diserbuk dan dimasukkan dalam botol coklat yang kering.

1.5.2 Bahan untuk ekstraksi

Pelarut yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi maserasi adalah etanol 70% dan etil asetat

3.5.3 Bahan untuk kultur sel

Sel kanker yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sel *line* kanker payudara. Sel kaker payudara yang digunakan adalah T47D, sel tersebut akan diperoleh dari *Cancer Chemoprevention Research Centre* (CCRC), Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Sel T47D dalam medium Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) ditambah dengan 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Labortories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacalay Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacalay Tesque). Semua sel dikultur dalam incubator pada 5% CO₂, 37°C.

1.5.3 Bahan uji sitotoksik

Dimetil sulfoksida (DMSO), akan digunakan untuk melarutkan ekstrak *Calotropis gigantea*. konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian ini maksimal 1% dalam medium kultur. 0,025% tripsin dalam medium kultur digunakan untuk memanen sel. Phosphate buffer saline (PBS) digunakan sebagai larutan penyangga pencuci. 3-(4,5-dimethyliazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) digunakan sebagai reagen yang bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase pada sel.

1.5.4 Bahan untuk pengujian induksi apoptosis metode *flowcytometry*

Larutan *propidium iodine* (PI) (Sigma) yang terdiri dari 50 μ g/ml PI, 20 μ g/ml, dan 0,1% Triton-X (Pro GC-Merck) dalam PBS. AnnexinV assay (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Biovision) dan binding buffer.

3.6 Jalannya Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman akan dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jawa Timur

3.6.2 Ekstraksi dan Fraksinasi Tanaman

Secara singkat masing-masing serbuk daun, bunga, batang dan akar tanaman *Calotropis gigantea* di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% rasio 1:5 selama 72 jam. Kemudian filtrate di saring, dan sedimen di ekstraksi kembali menggunakan pelarut etanol 70% dengan rasio 1:2 selama 72 jam. Reekstraksi dilakukan 2x. filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dievaporasi dengan pengurangan tekanan agar diperoleh ekstrak etanol pekat. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan pelarut etil asetat 1:1

3.6.4 Analisis induksi Apoptosis sel dengan *flowcytometry*

Sel sebanyak 5×10^5 sel/sumuran ditanam dalam 6-well plate kemudian sel diinkubasikan hingga normal kembali. Sel diberi perlakuan pelarut DMSO (025%) dan isolate aktif . Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifius dan disentrifius (2000 rpm, 3 menit) kemudian supernatan dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya, ditambah PBS, dan PBS ditransfer ke *microtube* yang sama dari satu perlakuan, kemudian disentrifugasi lalu supernatan dibuang. Tahap ini diulangi sekali lagi kemudian sel dipanen dengan tripsin. Sel ditransfer ke dalam *microtube* yang sama kemudian disentrifugasi (2000 rpm, 3 menit). Sisa panenan sel yang berada pada sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifugasi lagi, kemudian PBS dibuang. Endapan ditambah reagen PI-Annexin V dengan hati-hati, dan segera dihomogenkan. *Microtube* yang berisi suspensi sel dibungkus

aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air 37°C selama 5 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam tabung *flowcytometer* dengan menggunakan filter nilon, selanjutnya siap dianalisis dengan *flowcytometer*.

3.6.5 Pengelompokan hewan coba untuk uji efektifitas antikanker

Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak (random). Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yang terdiri dari:

Kelompok I : Kontrol negative dengan pemberian CMCNa 0,5%

Kelompok II : Kontrol positif dengan pemberian Methotrexate 2,5 mg/KgBB

Kelompok III : Terapi Fraksi etil asetat Daun *C. gigantea* dosis 50 mg/kgBB

Kelompok IV : Terapi Fraksi etil asetat Daun *C. gigantea* dosis 100 mg/kgBB

Kelompok V : Terapi Fraksi etil asetat Daun *C. gigantea* dosis 150 mg/kgBB

Kelompok VI : Terapi Fraksi etil asetat Daun *C. gigantea* dosis 200 mg/kgBB

Hewan uji diinduksi DMBA 25 µg dalam 0,1 ml aseton secara subkutan. Induksi dilakukan dua kali seminggu selama 6 minggu (Manoharan et al, 2010). hewan uji ditreatmen peroral selama 14 hari (minngu ke-7 dan ke-8). Palpasi dilakukan setelah inisiasi DMBA sampai minggu ke-16. Pada minggu ke 16 dilakukan nekropsi jaringan. Berat badan ditimbang sebelum induksi DMBA dan selama treatmen.

3.6.6 Uji Toksisitas akut ekstrak daun *C.gigantea*

Pengelompokan hewan coba

Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak (random). Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol ditambah 4 kelompok untuk empat peringkat dosis. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit, dengan pembagian kelompok sebagai berikut.

Kelompok I : Kelompok kontrol

Kelompok II : Pemberian Fraksi EA Daun *C.gigantea* dosis 1500mg/KgBB

Kelompok III : Pemberian Fraksi EA Daun *C.gigantea* dosis 2500mg/KgBB

Kelompok IV : Pemberian Fraksi EA Daun *C.gigantea* dosis 3500mg/KgBB

Kelompok V : Pemberian Fraksi EA Daun *C.gigantea* dosis 4500mg/KgBB

Sediaan uji diberikan pada hewan uji peroral, dengan kekerapan pemberian sekali selama masa uji. Sebelum dilakukan perlakuan hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama 8-12 jam dengan tetap diberi minum secukupnya. Pengamatan fisik terhadap gejala-gejala toksik dilakukan selama 24 jam dan pada 3 jam pertama dilakukan secara intensif terhadap semua kelompok mencit.

Pengamatan fisik terhadap gejala-gejala toksik pada kulit dan bulu, mata dan membran mukosa, sistem pernafasan, sistem peredaran darah, sistem otonom dan syaraf pusat, sistem saluran cerna, sistem genitourinaria, pola perilaku serta aktivitas motorik. Hewan uji yang mati setelah pemberian suspensi sediaan uji sesegera mungkin dibedah pada bagian perut secara melintang. Selanjutnya diambil organ ginjal, paru-paru, dan hati. Sedangkan sisa hewan uji yang masih hidup saat akhir masa 24 jam setelah pemberian suspensi sediaan uji, dimatikan dengan cara dibius menggunakan eter selanjutnya dibedah dan diambil organnya.

3.6.7 Uji Toksisitas sub kronik ekstrak daun *C.gigantea*

Pada uji toksisitas sub kronik ini hewan uji dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok treatmen fraksi EA pada dosis normal. tretmen dilakukan selama 3 bulan. Setelah treatmen hewan uji dikorbankan dan dilakukan pengambilan darah, nekropsi jaringan lambung, usus, ginjal, limpa dan hepar. Pada sampel darah dilakukan analisa kadar SGOT dan SGPT serta analisa biokimia darah yang meliputi kadar glukosa darah, kolesterol, trigliserid, limfosit neutrofil, ALP, Hb, RBC dan WBC

3.6.8 Uji teratogenik ekstrak daun *C.gigantea*

Pada uji teratogen hewan uji dibagi dua kelompok kelompok control yaitu kelompok mencit bunting tanpa treatmen dan kelompok perlakuan pemberian fraksi EA pada mencit bunting. Treatmen dilakukan mulai hari pertama kebuntingan sampai hari ke 19. Pada hari ke-20 hewan coba dikorbankan dan dilakukan pengambilan janin. Selanjutnya dilakukan pengamatan anatomi fisologi janin untuk mendeteksi kemungkinan adanya kelainan janin.

3.6.9 Proses pembedahan mencit

Mencit dilumpuhkan dengan kloroform, diletakkan diatas tatakan gabus dan keempat kaki difiksasi dengan jarum fiksasi. Seluruh tubuh mencit disemprot dengan alkohol 70%. Potong kulit beserta perut bagian bawah (dekat alat kelamin) menuju samping kanan dan kiri sampai sisi perut. Setelah itu diteruskan menuju kearah leher, sternum ikut dipotong. Ambil organ dengan menggunakan dan pinset dan gunting lurus. Organ dimasukkan kedalam toples yang telah diisi formalin 10% untuk membuat preparat histologi.

3.6.10 Pembuatan preparat histologi

Pembuatan preparat histologi menurut Balasubramanian dan Chatterjee, 2010; Shukla, *et al.* 1999 dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, organ difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

2. Tahap Dehidrasi

Pada tahap ini, organ yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan ethanol 70 % selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan ethanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan ethanol 95 % sebanyak 2 kali dan dalam ethanol absolut selama 1 jam dan diulang sebanyak 2 kali pada ethanol absolut yang berbeda.

3. Tahap Clearing (Penjernihan)

Pada tahap ini, organ yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar ethanol dengan menggunakan larutan xylene I selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene II selama 1,5 jam.

4. Tahap Embedding

Pada tahapan ini, organ dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60°C, kemudian parafin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama ± 1 jam.

5. Tahap Sectioning (pemotongan)

Pada tahapan ini, organ yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 mikron dengan pisau mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam *water bath* bersuhu 40°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan kemudian diambil dengan *object glass* dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan.

6. Tahap Staining (Pewarnaan)

Hasil potongan diwarnai dengan hematoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut :

- A) Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit.
- B) Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit.
- C) Preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam ethanol absolut selama 5 menit.
- D) Preparat diambil dari ethanol absolut dan direndam dalam ethanol 96% selama 30 detik.
- E) Preparat diambil dari ethanol 96% dan direndam dalam ethanol 50% selama 30 detik.
- F) Preparat diambil dari ethanol 50% dan direndam dalam *running tap water* selama 5 menit.
- G) Preparat diambil dari *running tap water* dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 menit.
- H) Preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam *running tap water* selama 2-3 menit.
- I) Preparat diambil dari *running tap water* dan direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit.
- J) Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 75 % selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam ethanol absolute selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolut yang berbeda.

- K) Preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit.
- L) Preparat diangkat dan dikeringkan.
- M) Preparat ditutup menggunakan *deckglass*.

3.7 Analisis Data

3.7.2 Analisis Induksi apoptosis sel dengan *flowcytometry* (Reager et al., 2011)

Pada analisis induksi apoptosis ini digunakan pengecatan kombinasi antara *Propidium iodine* (PI) dan annexin-V, dengan kombinasi pengecatan ini akan diketahui perbedaan sel yang viable (hidup), apoptosis dan sel nekrosis. Selain itu dari uji ini juga akan diketahui sel yang mengalami *early apoptosis* dan sel yang *late apoptosis*. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik menggunakan paired-samples T-test (SPSS 16.0 for windows) dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan dengan rerata pada $p < 0,05$ dianggap signifikan, sedangkan $p > 0,05$ tidak signifikan secara statistic.

3.7.2 analisis data uji ketoksikan akut, subkronik, teratogenik

Penelitian ini menggunakan uji statistik *One Way Anova (Analysis of Variance)*. Hasil pengujian yang diperoleh digunakan untuk menggambarkan pengaruh pemberian perlakuan ekstrak daun *Calotropis gigantea* terhadap gambaran histologi organ dan hasil pemeriksaan hematologi mencit bermakna atau tidak. Penelitian ini bermakna bila $p < 0,05$. Kemudian dilakukan analisis *Post Hoc* dengan uji Tukey apabila terdapat perbedaan yang signifikan, untuk mengetahui kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Untuk mengetahui hubungan antara dosis ekstrak daun *Calotropis gigantea* dengan efek penghambatan pertumbuhan massa solid sel kanker dilakukan uji korelasi bivariat. Sedangkan untuk menentukan harga IC_{50} , ED_{50} dan LD_{50} di buat analisis probit dengan program SPSS.

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 ± 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 40 °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 porcelin dipanaskan pada suhu 105 °C selama 15 menit untuk menguapkan air dalam cawan, kemudian cawan dimasukkan dalam desikator yang berisi silika gel yang telah diaktifasi 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 perkolasii 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 dimerasasi 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 ditumbuhinya kapang dan jamur, tidak beracun, netral, absorbsinya 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 dimerasasi 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 $5 - 10^{\circ}\text{C}$ 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	Dragendorff	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).

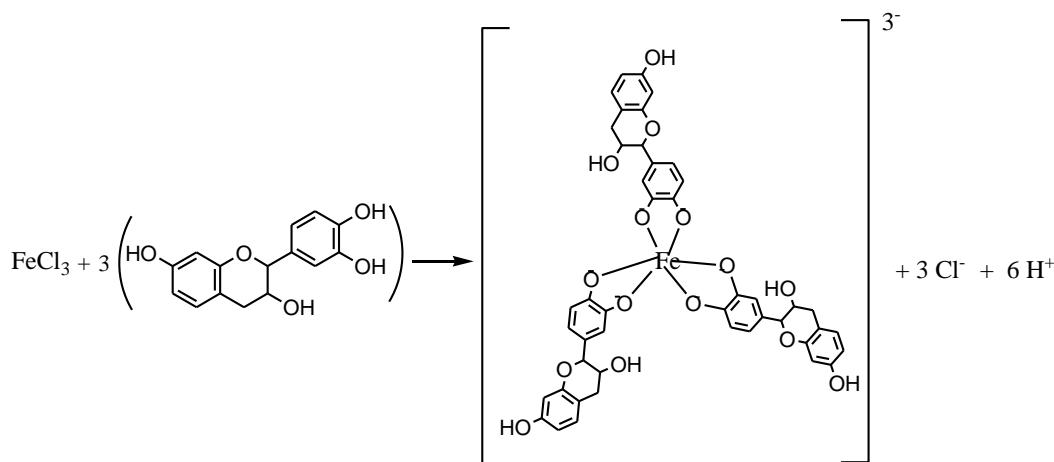
4.4.1.2 Tanin

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 sepit/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 penjenuhan 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 pendektsian 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 fluorosensi 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 fluorosensi 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 berfluorosensi. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aeksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluorosensi 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).

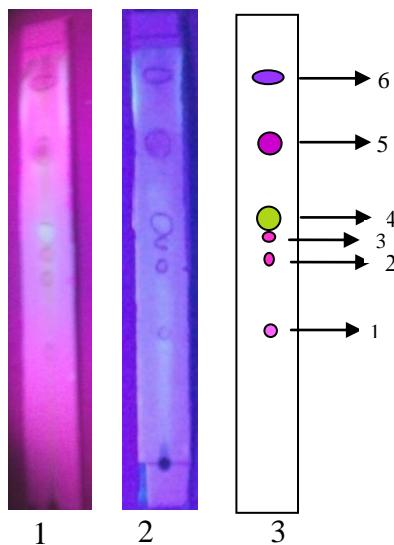
4.4.2.1 Triterpenoid

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

Tabel 4.3 Data penampakan noda golongan senyawa triterpenoid hasil KLTA dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen Lieberman-Burchad 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 KLTA 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 KLTA golongan senyawa triterpenoid dengan eluen kloroform : metanol = 10 : 1 (v/v)

No.	Rf 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-Burchad dan disinari lampu UV 366 berwarna merah muda dan ungu. Hal ini sesuai dengan Harborne (1987) yang menyatakan bahwa reagen Lieberman-Burchad 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

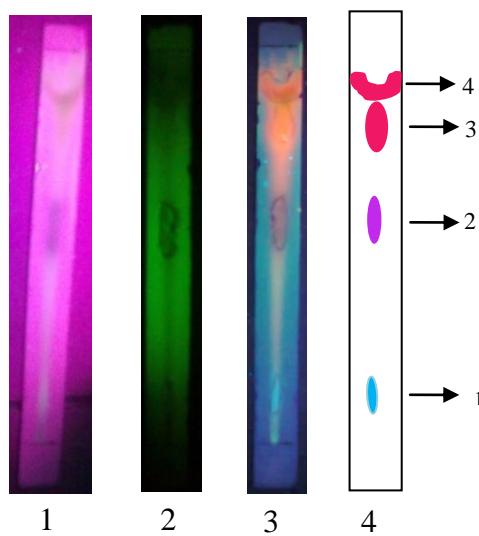
Hasil KLTA golongan senyawa tanin dalam ekstrak etanol 70 % daun widuri dengan 5 variasi eluen menggunakan reagen FeCl_3 seperti ditunjukkan pada Tabel 4.5.

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 : $\text{HCl} = 30 : 10 : 3$ (v/v)	2	Terpisah	0,49; 0,68
4.	Butanol : asam asestat : 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 KLTA 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 KLTA 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): Cs<Cm. 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 meghindari 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 penggerat 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-

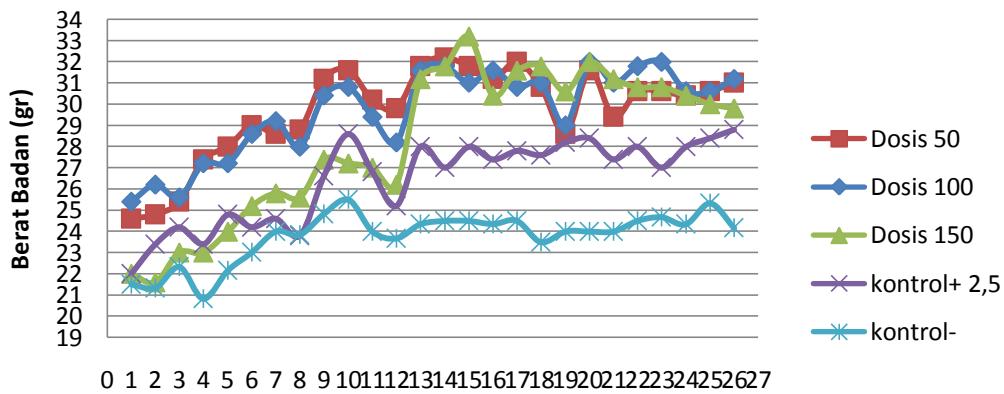
masing berat nodul dicatat kemudian nodul disimpan dalam formalin 10 % untuk kemudian dibuat preparat imunohistokimia.

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.

Perubahan Berat Badan Mencit Terapi Ekstrak Daun Widuri



Induksi DMBA **Terapi**
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 tenguk 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.

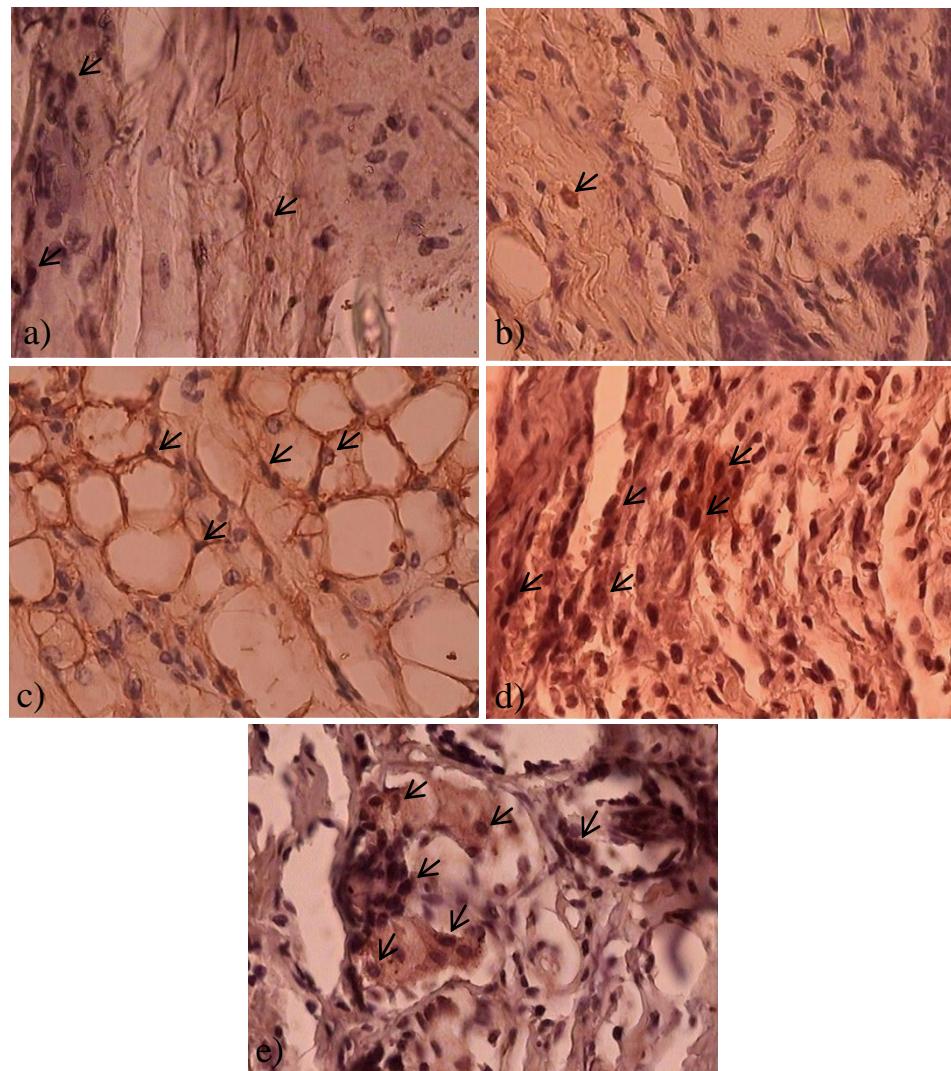
4.5.2 Imunohistokimia (IHK) Kaspase-3

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 Cysteine 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, Metotreksat 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	$3,90 \pm 0,57$
Kontrol positif	$4,00 \pm 0,47$
Dosis 50 mg/KgBB	$4,70 \pm 1,06$
Dosis 100 mg/KgBB	$5,30 \pm 0,82$
Dosis 150 mg/KgBB	$5,50 \pm 0,53$

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.

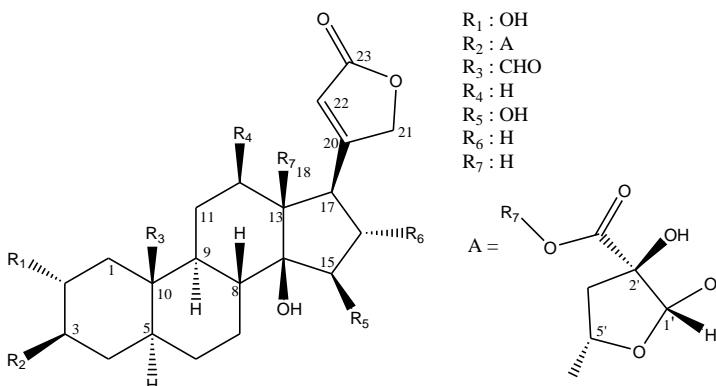
4.6 Dugaan Mekanisme Ekstrak Etanol Daun Widuri dalam Menghambat Pertumbuhan Tumor

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* ($C_{29}H_{40}O_{11}$) dalam daun widuri (Seeka *et al.*, 2010)

Yalon *et al* (2004) menjelaskan bahwa senyawa akan mengaktivasi 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 kaspase-3 mengaktifkan 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* (ganosa) 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 لَكُمْ مَا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِنْهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ 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 الْسَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْهُنَا وَالْأَرْضَ فِي أَلْقَى فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ

وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٌ ﴿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 (かるム) *karîm* pada ayat di atas digunakan untuk mensifati segala sesuatu yang baik sesuai objeknya. Rizqi yang *karîm* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Sehingga pasangan kata tumbuhan yang *karîm* 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 بِقَدْرٍ

“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. Tumbuhan-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 ijin 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.

4.5 Dosis Letal Ekstrak Daun Widuri

Hasil yang diperoleh dalam tahap penelitian meliputi nilai LD₅₀ dan mekanisme perantara kematian. Pengamatan dilakukan meliputi gejala-gejala yang ditimbulkan hingga mencit tersebut mati. Pengujian toksisitas akut LD₅₀ bertujuan untuk menentukan suatu gejala sebagai akibat dari pemberian suatu zat dan untuk menentukan toksisitas senyawa tersebut.

Hasil pengujian terhadap kematian mencit pada berbagai tingkat dosis dapat disajikan pada Tabel 4.5

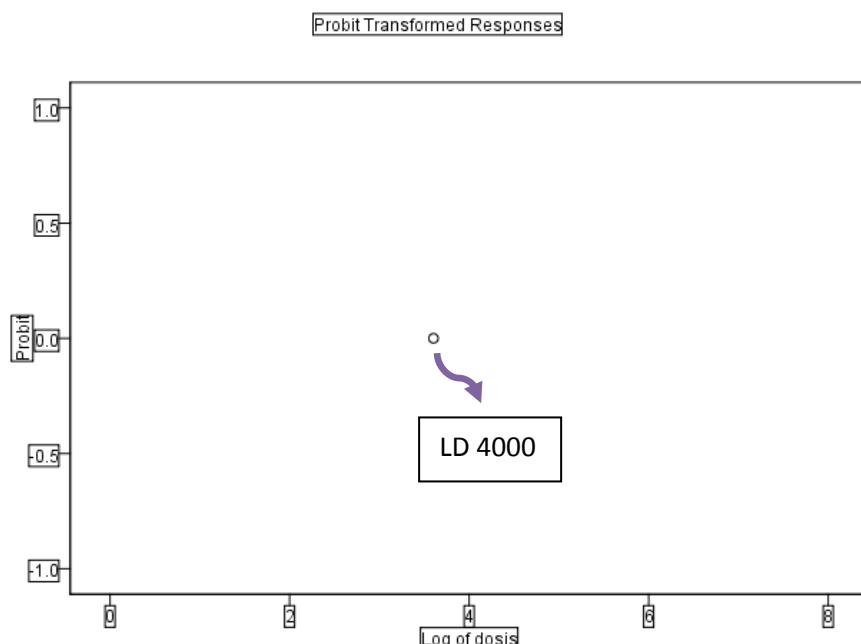
Tabel 4.5 Hasil pengujian LD₅₀ ekstrak daun widuri pada mencit

Dosis (mg/kg BB)	Jumlah Mencit	Mortalitas	Periode Pengamatan Mortalitas (jam)
0	6	0	24
500	6	0	24
1000	6	0	24
2000	6	0	24
4000	6	3	24

Berdasarkan Tabel 4.5, pada kelompok yang diberikan perlakuan 0 hingga dosis 2000 mg/ Kg BB tidak ditemukan kematian pada mencit. Pada kelompok dengan dosis 4000 mg/Kg BB menimbulkan kematian pada hewan uji sebanyak 3 ekor. Yang terdiri dari 1 jantan dan 2 betina. Data yang diperoleh akan diolah dengan analisis probit. Data yang digunakan untuk analisis probit dimulai pada dosis 500 mg/Kg BB sebagai dosis awal hingga dosis 4000 mg/Kg BB sebagai dosis yang paling mematikan.

Grafik analisis probit kematian mencit tersebut dapat disajikan pada Gambar 4.1.

GAMBAR GRAFIK



Gambar 4.5 Grafik analisis probit dosis letal

Nilai yang diperoleh dari analisis probit menggunakan SPSS 16, sebesar 4000 mg/Kg BB. Jika dibandingkan dengan tabel klasifikasi nilai LD_{50} secara umum pada Tabel 4.6, maka hasil penelitian ini berada pada rentang cukup toksik karena berada pada rentang 500 – 5000 mg/Kg BB. Jika digunakan pengobatan hendaknya dosis yang digunakan kurang dari dosis tersebut. Klasifikasi nilai LD_{50} secara umum disajikan dalam Tabel 4.6

Tabel4.6 Klasifikasi toksisitas

Kategori	LD ₅₀
Supertoksik	5 mg/Kg atau kurang
Sangat toksik	5-50 mg/Kg
Toksik	50-500 mg/Kg
Cukup toksik	500-5000mg/Kg
Sedikit toksik	5000-15000mg/Kg
Tidak toksik	>15000mg/Kg

Tabel tersebut diambil dari metode Loomis (1978) dalam Jenova (2009)

Hasil pengujian dosis letal tidak hanya dengan ditentukan secara kuantitatif besarnya dosis namun juga diamati kelakuan masing-masing hewan uji. Parameter yang digunakan dalam pengujian LD₅₀ ekstrak daun biduri adalah nilai LD₅₀ dan gejala-gejala yang teramati selama periode pengamatan 3 jam dan 24 jam (Wahyono, 2006). Hasil pengamatan dari penelitian ini disajikan pada Tabel 4.7

Tabel 4.7 Pengamatan gejala-gejala yang timbul pada uji dosis letal

Pengamatan	Symtom yang teramati	Periode pengamatan
Aktivitas	Aktivitas menurun (tidur)	<3 jam
Reaksi yang timbul	Kencing berkali-kali	<3 jam
Kepekaan terhadap sentuhan	Kepekaan menaik	<6 jam
Kepekaan terhadap bunyi	Kepekaan menaik	<3 jam
Interaksi sosial	Frekuensi tabrakan naik	<3 jam
Reaksi yang aneh	Bertumpuk-tumpuk dengan temannya	<3 jam

Tabel pengamatan gejala klinik tersebut mengacu pada: Pemeriksaan Badan dan Pengamatan Hewan dalam Studi Toksisitas (Loomis, 1978 dalam Jenova, 2009). Hasil-hasil tersebut merupakan efek-efek yang dapat teramati selama penentuan toksisitas akut pada mencit.

Dari Tabel 4.7 menunjukkan adanya perubahan perilaku yang ditunjukkan dengan reaksi yang berbeda-beda pada mencit. Perbedaan reaksi yang terjadi dipengaruhi oleh laju distribusi obat pada tiap-tiap organ tubuh yang berhubungan dengan aliran darah di dalam organ tersebut. Efek toksik sangat bervariasi dalam sifat, organ sasaran, maupun mekanisme kerjanya. Semua efek toksik terjadi karena interaksi biokimiawi antara metabolit sekunder dari tanaman dengan struktur reseptor tertentu di dalam tubuh. Struktur itu dapat bersifat nonspesifik. Penentuan nilai LD₅₀ merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk menilai ketoksikan obat atau suatu zat sehingga dapat diketahui *range* aman yang digunakan dalam pengobatan (Lu, 1995).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Ekstrak daun widuri pada 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 caspase-3 secara signifikan. Oleh karena itu ekstrak daun widuri sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat fitofarmaka
2. Dari uji toksitas akut didapatkan hasil bahwa *Lethal Dose Concentration* (LD_{50}) dari ekstrak daun widuri adalah sebesar 4000 mg/kgBB. Berdasarkan tabel yang diambil dari metode Loomis (1978) dalam Jenova (2009) dosis tersebut masuk kategori cukup toksik (500-5000 mg/Kg BB)

DAFTAR PUSTAKA

- Alam MA, Habib MR, Nikkon R, Rahman M, Karim MR., 2008. Antimicrobial activity of akanda (*Calotropis gigantea* L.) on some pathogenic bacteria. Bangladesh J Sci Ind Res ;Vol 3 No 43 hal:397-404.
- Alam MA, Habib MR, Nikkon F, Khalequzzaman M, Karim MR., 2009. Insecticidal activity of root bark of *Calotropis gigantea* L. against *Tribolium castaneum* (Herbst). World Journal of Zoology, Vol 2 No 4 hal:90-95.
- Argal A, Pathak AK., 2006. CNS activity of *Calotropis gigantea* roots. J. Ethnopharmacol. Vol 1 No 106 hal:142-145.
- Abraham KI, Joshi PN. 1979. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. Biochim Biophys Acta, Vol 1 No 568 hal:111-119.
- Anjaneyulu V, Row LR. 1968. The triterpenes of *Calotropis gigantea* Linn. Curr. Sci. No 6:156 157.
- Abcam, 2007, T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899) datasheet. <http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>, diakses Februari 2007
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Lansdown, R.J.M., dan Speirs, V., 2003, Bereast Cancer Cell Line, Breast Cancer Res., 5(2): 89-95.
- BPOM. 2010. Acuan Sediaan Herbal. Volume ke-5 Edisi , Badan Pengawas Obat dan makanan Republik Indonesia hal:7-8
- Chitme HR, Chandra R, Kaushik S., 2004. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* r. br. in experimental animals. J Pharm Pharmaceut Sci. Vol 1 No7 hal:70-75.
- Chitme HR, Chandra R, Kaushik S. 2005. Evaluation of antipyretic activity of *Calotropis gigantea*(Asclepiadaceae) in experimental animals. Phototherapy Research;Vol 5 No 19 hal:454-456.
- Conze, D. Weiss, L. Regen, P.S. Bushan, A Weaver, D Johnson, P. and Rincon, M, 2001, autocrin production of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols, Biochem. Biophys.Res.Commun.317: 269-275
- Gupta J, Ali M. 2000. Rare chemical constituents from *Calotropis gigantea* roots. Indian J. Pharm. Sci.Vol 1 No 62 hal: 29-32.
- Habib MR; Karim MR. 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. Mycobiology Vol 1 No 37 hal:31-36.
- Habib MR, Nikkon F, Rahman M, Haque ME, Karim MR. 2007. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from methanolic extract of root bark of *Calotropis gigantea* (Linn). Pak. J. Biol. Sci. Vol 22 No 10 hal: 4174-4176.

- Habib dan Karim. 2011. Evaluation of antitumor activity of *Calotropis gigantea* L.root bark against Ehrlich ascites Carcinoma in Swiss albino mice. Elsevier. Asian Pasific journal of tropical medicine hal 786-790
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. Mar –April Vol 2 No 61 hal 69-90
- Kumar G, Karthik L, Bhaskara Rao KV,. 2011, A Review on Pharmacological and Phytochemical Profile of *Calotropis Gigantea* Linn, *Pharmacologyonline* Vol 1: hal: 1-8
- Kumar G, Karthik L, Bhaskara Rao KV,. 2010a. *In vitro* anti-Candida activity of *Calotropis gigantea* against clinical isolates of *Candida*. Journal of Pharmacy Research. Vol No 3 hal: 539-542.
- Kumar G, Karthik L, Bhaskara Rao KV, 2010b, Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves – an *in vitro* study. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research;Vol 2 No 4 hal :141-144.
- KONTRANAS,2007*
- Lhinhatrakool T, Sutthivaiyakit S. 2006. 19-Norand 18, 20-Epoxy-cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. J. Nat. Prod.Vol 8 No 69 hal: 1249-1251.
- Maoyuan w, Wenli M, Yuanyuan D, Shenglan L, Zhunian W, Haofu D. 2008. Cytotoxic Cardenolides from the Roots of *Calotropis gigantea*. Modern Pharmaceutical Research. Vol 2 No1 1 hal :4-9
- Mardisiswojo dan Radjakmanugunsudarso, 1968, Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang, Jilid II, hal 4-5
- Mahajan RT, Badgujar SB. 2008. Phytochemical Investigations of some laticiferous plants belonging to Khandesh Region of Maharashtra. Ethnobotanical Leaflets. Vol 12 hal 1145- 1152.
- Nalwaya N, Pokharna G, Deb L, Jain NK. 2009. Wound healing activity of latex of *Calotropis gigantea*. IJPPS. Vol 1 No 1 hal :176-181
- Pathak dan Argal. 2007. Analgesic activity of *Calotropis gigantea* flower. Fitoterapia Vol 1 No 78 hal: 40-42.
- Pal G, Sinha NK. 1980. Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*. Archives of Biochemistry and Biophysics Vol 2 No 202 hal:321-329.
- Pari K, Rao PJ, Devakumar C, Rastogi JN.1998. A Novel Insect antifeedant nonprotein amino acid from *Calotropis gigantea*. J. Nat. Prod.Vol 1 No 61 hal:102-104.
- Rajesh R, Raghavendra Gowda CD, Nataraju A, Dhananjaya BL, Kemparaju K, Vishwanath BS. 2005. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. Toxicon; Vol 1 No 46 hal:84-92.

- Srivastava SR, Keshri G, Bhargavan B, Singh C, Singh MM,.2007. Pregnancy interceptive activity of the roots of *Calotropis gigantea* Linn. in rats. Contraception. Vol 43 No 75 hal 4318-322.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2012.Cancer Statistic. CA: A Cancer Journal for Clinicians Volume 62 Nomer 1 hal 10-29
- Sudoyo,H., 1997. Pendekatan biomolekuler untuk penemuan obat baru dari sumber daya alam dalam perspektif Indonesia, Cermin Dunia Farmasi. Vol 31 hal 9-11
- Seeka C, Sutthivaiyakit S. 2010. Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. Chem. Pharm. Bull.Vol 5 No 58 hal: 725-728.
- Sen S, Sahu NP, Mahato SB. 1992. Flavonol glycosides from *Calotropis gigantea*. Phytochemistry Vol 8 No 31 hal: 2919-2921.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, Clinical Cancer Research, 6, 4373-4380
- Thakur S, Das P, Itoh T, Imai K, Matsumoto T.1984. Latex extractables of *Calotropis gigantea*.Phytochemistry. Vol 9 No 23 hal :2085-2087.
- Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. 2002. Cancer in Indonesia, present and future. Jpn J Clin Oncol. Mar 31 hal 17-21
- Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides dan Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, Envir. Health Resp, 106 (12), 807-812.
- Wang Z, Wang M, Mei W, Han Z, Dai H,. 2008. A new cytotoxic pregnanone from *Calotropis gigantea*. Molecules. Vol 12 No 13 hal:3033-3039.
- Wahyuningsih,M.S.H., Sofia Mubarika, Ibnu G.Gandjar, Subagus Wahyuono. 2003. Pencarian Senyawa Antikanker dari Bahan Alam, Majalah Obat Tradisional, Vol 8 No 26 hal: 9-11
- Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. 2011. Assessment of antiproliferative and antiplasmoidal activities of five selected Apocynaceae species, BMC Complementary & alternative Medicine 11:3
- WHO.2013. World Cancer Report
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., dan Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, Anticancer Res., 22(4):2253-9.