

**PSI  
39**

Jakarta



107  
**2**

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**MODULASI EKSPRESI PROTEIN ANTIPROLIFERASI DAN  
PROAPOPTOSIS EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)  
TERHADAP TIKUS TERINDUKSI 7,12- DIMETIL BENZ[*a*]ANTRAZENA  
(DMBA)**

**RISBINKES**

**Oleh:**

**Rosa Adelina, S.Farm., Apt, dkk**

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
KEMENTERIAN KESEHATAN  
2012**



2

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**MODULASI EKSPRESI PROTEIN ANTIPROLIFERASI DAN  
PROAPOPTOSIS EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)  
TERHADAP TIKUS TERINDUKSI 7,12-DIMETIL BENZ[a]ANTRAZENA  
(DMBA)**

**RISBINKES**

Oleh:

**Rosa Adelina, S.Farm., Apt, dkk**

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
KEMENTERIAN KESEHATAN  
2012**

## SUSUNAN TIM PENELITI

No.	N a m a	Keahlian / Kesarjanaan	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1.	Rosa Adelina, S.Farm, Apt	Apoteker	Ketua Pelaksana	Bertanggung jawab atas semua pelaksanaan penelitian. Melakukan uji dengan <i>molecular docking</i> dan analisis data.
2.	drh. Putri Reno Intan	Kedokteran Hewan	Peneliti	Membantu ketua pelaksana dalam pelaksanaan uji karsinogenesis dan analisis data.
3	Intan Sari Oktoberia	Analisis Kimia	Teknisi	Membantu ketua pelaksanaan dalam pembuatan ekstrak daun sirsak dan karakterisasi ekstrak.

**KEPUTUSAN**  
**KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**NOMOR : HK.03.05/1/323/2012**

**TENTANG**

**PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA**  
**RISET PEMBINAAN KESEHATAN (RISBINKES) BADAN PENELITIAN DAN**  
**PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**KEMENTERIAN KESEHATAN RI TAHUN 2012**

**KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**

- Menimbang** : 1. Bahwa untuk melaksanakan kegiatan Riset Pembinaan (Risbin) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012 perlu dibentuk Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) pada masing-masing Satuan Kerja di Lingkungan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
2. Bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes);
- Mengingat** : 1. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
2. Undang-Undang Nomor 18 tahun 2002 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan, Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
3. Undang-undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144. Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);

4. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Teknologi Kekayaan Intelektual serta Hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
6. Peraturan Presiden Nomor 10 Tahun 2005 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Kementerian Negara Republik Indonesia sebagaimana telah diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 50 Tahun 2008;
7. Instruksi Presiden Nomor 4 tahun 2003 tentang Pengkoordinasian Perumusan dan Pelaksanaan Kebijakan Strategis Pembangunan Nasional Ilmu Pengetahuan dan Teknologi;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/ 1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
9. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/ Menkes/ SK/ X/ 1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
10. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1144/ Menkes/ Per/ VIII/ 2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
11. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 021/Menkes/SK/1/2011 tentang Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun 2010 – 2014;
12. Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nomor: HK.03.05/1/147/2012 tentang Tim Pengelola Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;

## MEMUTUSKAN :

Menetapkan :

KESATU : KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN TENTANG PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA RISET PEMBINAAN KESEHATAN (RISBINKES) BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN KEMENTERIAN KESEHATAN TAHUN 2012.

KEDUA : Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 dengan susunan Tim sebagaimana tersebut dalam lampiran keputusan ini.

KETIGA : Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 bertugas:

1. Mengkoordinir pelaksanaan kegiatan penelitian dan pengembangan kesehatan sesuai dengan bidang fokus, jenis insentif, judul penelitian, pelaksana penelitian/perekayaan dan jumlah dana yang dialokasikan sesuai dengan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nomor: HK.03.05/1/147/2012 tentang Tim Pengelola Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;
2. Melakukan monitoring dan evaluasi terhadap semua pelaksanaan kegiatan Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) sebagaimana dimaksud pada butir 1;
3. Melaporkan proses pelaksanaan, kemajuan dan akhir kegiatan penelitian secara periodik kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang meliputi dokumen *hard copy* dan *soft copy* sebagai berikut:
  - a. Laporan akhir penelitian
  - b. Data mentah dan karakteristik data penelitian (definisi operasional, struktur data, dsb)
  - c. Naskah rancangan publikasi ilmiah hasil penelitian
  - d. Usulan HKI untuk hasil penelitian yang berorientasi HKI

- KEEMPAT** : Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 bertanggungjawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- KELIMA** : Tim sebagaimana dimaksud pada diktum kedua diberikan honorarium sesuai dengan ketentuan yang berlaku;
- KEENAM** : Biaya pelaksanaan kegiatan penelitian ini dibebankan pada Daftar Isian Penggunaan Anggaran Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;
- KETUJUH** : Keputusan ini mulai berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan bulan Desember 2012.

DITETAPKAN DI : JAKARTA  
PADA TANGGAL : 12 JANUARI 2012



LAMPIRAN 1  
 KEPUTUSAN KEPALA BADAN LITBANGKES  
 NOMOR : HK.03.05/1/323/2012  
 TANGGAL : 12 JANUARI 2012

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA RISET PEMBINAAN BADAN LITBANGKES TAHUN 2012

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
1	Pengembangan Formula Ekstraksi DNA M. tuberculosis Menggunakan Teknik Guanidine Thiosianat Termodifikasi	Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Penyakit Menular	Kindi Adam, S.Si	Ketua Pelaksana
				Yuni Rukminiati, M.Biomed	
				Rosa Adelina, Apt	
				Novi Amalia	
2	Modulasi Ekspresi Protein Antiproliferasi dan Proapoptosis Ekstrak Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> L.) terhadap Tikus Terinduksi 7,12-Dimetil Benz[ $\alpha$ ]Antazena (DMBA)	Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Penyakit Tidak Menular	Rosa Adelina, S.Farm, Apt	Ketua Pelaksana
				drh. Putri Reno Intan	Peneliti
				Intan Sari Oktoberina	Teknisi
3	Pola Diare dan Terapinya pada Pasien Balita di Rumah Sakit Penyakit Infeksi Sulianti Saroso dan Puskesmas Bantar Gebang Bekasi	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Penyakit Menular	dr. Armaji Kamaludi Syarif	Ketua Pelaksana
				Syachroni, S.Si	Peneliti
				Aniska Novita Sari, S.Si	Peneliti
4	Hubungan Karakteristik Penderita Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV) Dewasa dengan Lama Waktu Perawatan di RSPI Sulianti Saroso	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Penyakit Menular	dr. Heni Kismayawati	Ketua Pelaksana
				Aris yulianto, S.Si	Peneliti
				Arga Yudhistira, S.Sos	Peneliti
5	Studi Pelaksanaan Pemberian Profilaksis Tuberkulosis pada Anak di Puskesmas Wilayah DKI Jakarta dan Bekasi	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Kesehatan Ibu Dan Anak	dr. Retna Mustika Indah	Ketua Pelaksana
				dr. Dona Arlinda	Peneliti
				dr. Armaji Kamaludi Syarif	Peneliti

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya milik Allah SWT yang telah memberikan berkah dan karuniaNya sehingga laporan akhir penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah pada Rasulullah SAW, Nabi akhir zaman yang telah mengajarkan untuk berlomba-lomba dalam mencari ilmu pengetahuan sehingga dapat menjadi motivasi penulis untuk melakukan penelitian. Laporan penelitian ini merupakan salah satu komitmen peneliti untuk mempertanggungjawabkan penelitian yang telah dilakukan kepada pihak penyandang dana, yaitu Sekretariat Badan Litbangkes. Topik penelitian yang dilakukan penulis adalah uji preklinis dengan metode *in vivo* dan *in silico* yang bertujuan untuk melengkapi data *in vitro* dan memperkuat bukti empiris mengenai efek daun sirsak sebagai antikanker. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk melengkapi data farmakologis daun sirsak sehingga dapat memberikan informasi mengenai potensi daun sirsak sebagai agen antikanker.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang telah mendanai penelitian ini. Selain itu penulis ucapkan terima kasih kepada semua anggota tim yang telah berperan aktif dalam penelitian dan pihak-pihak yang membantu dalam terlaksananya penelitian ini.

Jakarta, November 2012

Penulis

## RINGKASAN EKSEKUTIF

Modulasi Ekspresi Protein Antiproliferasi dan Proapoptosis Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Tikus Terinduksi DMBA

Oleh: Rosa Adelina, S.Farm, Apt

Menurut data WHO, jumlah penderita kanker di dunia setiap tahun bertambah sekitar tujuh juta orang dan dua pertiga diantaranya berada di negara-negara yang sedang berkembang. Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di Indonesia dengan persentase 16.85%. Oleh karena itu perlu diupayakan suatu pengobatan kanker baru yang aman, selektif, dan dapat digunakan secara luas oleh masyarakat, yaitu dengan mengeksplorasi bahan alam yang sangat berpotensi untuk dikembangkan. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.). Daun sirsak mengandung 17 senyawa acetogenin yang berefek sitotoksik. Berita daun sirsak dapat menyembuhkan kanker sangat meluas, namun penelitian *in vivo* yang memperkuat bukti empiris dan data *in vitro* belum dilakukan. Oleh sebab itu dilakukan penelitian *in vivo* untuk menelusuri potensi daun sirsak sebagai agen antiproliferatif dan proapoptosis pada tikus yang diinduksi 7,12- Dimetil Benz[*a*]antrazena (DMBA). Selain itu dilakukan uji komputasi untuk mengetahui kemungkinan mekanisme aksinya sebagai antikanker.

Hasil uji *in vivo* menunjukkan bahwa DMBA mampu meningkatkan aktivitas proliferasi sel hepar dan sel epitelial payudara. Pengecatan histopatologi, AgNOR, dan nRas menunjukkan DMBA mampu meningkatkan proliferasi sel hepar dan epitelial payudara sedangkan ekstrak daun sirsak mampu menurunkan tingkat proliferasi sel secara signifikan dengan ekstrak 800 mg/kgBB yang memiliki kemampuan menurunkan tingkat proliferasi sampai mendekati normal. Pengecatan imunohistokimia p53 menunjukkan ekstrak daun sirsak mampu meningkatkan kemungkinan apoptosis secara signifikan pada semua ekstrak di sel hepar dan hanya pada dosis 800mg/kgBB pada sel epitelial payudara.

Hasil *docking* molekuler menunjukkan senyawa acetogenin yang dimiliki daun sirsak (Annomuricin E dan Muricapentocin) merupakan inhibitor Protein Kinase C yang lebih baik dibandingkan naftindin, senyawa inhibitor PKC. Protein Kinase C adalah protein proliferasi yang berperan penting dalam proses karsinogenesis sehingga ketika

Protein Kinase C dapat dihambat maka proses karsinogenesis juga dapat dihambat. Kemungkinan mekanisme aksi antikanker daun sirsak adalah melalui antiproliferasi. Berdasarkan hasil uji komputasi, didapatkan kemungkinan aksi senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak dalam menghambat perkembangan kanker. Oleh karenanya, hasil ini harus diperkuat lagi dengan uji *in vitro* untuk membuktikan mekanisme aksi antiproliferasi ekstrak daun sirsak secara nyata.

Kesimpulan dari laporan akhir penelitian ini adalah senyawa acetogenin yang terkandung dalam daun sirsak berpotensi sebagai antikanker dengan mekanismenya sebagai antiproliferasi. Oleh karenanya metode *docking* molekuler dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk mengetahui kemungkinan mekanisme molekuler suatu obat sehingga dapat berefek antikanker. Berdasarkan uji *in vivo* didapatkan bahwa ekstrak daun sirsak dapat berfungsi sebagai antikanker dengan menurunkan jumlah *black dot* dan ekspresi protein nRas serta menaikkan ekspresi protein p53 terutama pada ekstrak 800mg/kgBB.

## ABSTRAK

Jumlah kematian akibat kanker menunjukkan insidensi yang tinggi di dunia. Oleh karena itu perlu diupayakan suatu pengobatan kanker yang relatif lebih aman, lebih selektif, dan dapat digunakan secara luas oleh masyarakat, yaitu dengan mengeksplorasi bahan alam yang sangat berpotensi untuk dikembangkan. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Daun sirsak mengandung 17 senyawa baru yang berperan sebagai sitotoksik. Berita daun sirsak dapat menyembuhkan kanker sangat meluas, namun penelitian *in vivo* yang memperkuat bukti empiris dan data *in vitro* belum dilakukan. Oleh sebab itu dilakukan penelitian *in vivo* untuk menelusuri potensi daun sirsak sebagai agen antiproliferatif dan proapoptosis pada tikus yang diinduksi 7.12- Dimetil Benz[*a*]antrazena (DMBA).

Percobaan *in vivo* terhadap lima kelompok tikus yang masing-masing berjumlah enam ekor, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Pada akhir perlakuan, kelima kelompok tikus dinekropsi, diambil organ hepar dan sel epitelial payudara lalu dibuat preparat dan dilakukan pengecatan HE untuk melihat gambaran histopatologi sel, pengecatan n-Ras untuk melihat ekspresi protein pemicu proliferasi, pengecatan p53 untuk melihat ekspresi protein pemicu apoptosis dan pengecatan AgNOR untuk mengetahui jumlah *black dot* yang menggambarkan proliferasi sel. Selain itu dilakukan uji komputasi menggunakan *software Molecular Operating Environment* (MOE) untuk mengetahui afinitas dan interaksi antara senyawa *acetogenin* dengan Protein Kinase C (PKC). Data *in vivo* yang akan didapatkan berupa gambaran histopatologi, tingkat ekspresi protein n-Ras dan p53, serta jumlah *black dot* pada sel hepar dan epitelial payudara tikus. Dari uji komputasi akan didapatkan gugus farmakofor yang berperan dalam ikatan, bentuk interaksi acetogenin-PKC dan *score* yang menggambarkan kekuatan acetogenin-PKC.

Rendemen ekstrak daun sirsak yang dihasilkan sebesar 6.95%. Hasil penelitian akan membuktikan kebenaran khasiat daun sirsak sebagai antikanker. Nilai kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar air, susut pengeringan, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol berturut-turut 1.7; 0.45; 13.49; 10.11; 51; dan 1.01%. Berdasarkan nilai GGT, ekstrak daun sirsak mampu menghambat proses karsinogenesis dibandingkan dengan kontrol DMBA. Pengecatan histopatologi, AgNOR, dan nRas menunjukkan DMBA mampu meningkatkan proliferasi sel hepar dan epitelial payudara sedangkan ekstrak daun

sirsak mampu menurunkan tingkat proliferasi sel secara signifikan dengan ekstrak 800 mg/kgBB yang memiliki kemampuan menurunkan tingkat proliferasi sampai mendekati normal. Pengecatan imunohistokimia p53 menunjukkan ekstrak daun sirsak mampu meningkatkan kemungkinan apoptosis secara signifikan pada semua ekstrak di sel hepar dan hanya pada dosis 800mg/kgBB pada sel epitelial payudara. Untuk uji komputasi, nilai RMSD yang dihasilkan sebesar 1.3906 Å. Skor *docking* yang dihasilkan ligand referens, Annomuricin E, dan Muricapentocin berturut-turut adalah -71.161; -127.739, dan -116.87. Annomuricin E memiliki afinitas paling baik dibandingkan kedua ligand lainnya dan memiliki 5 ikatan hydrogen ligand-PKC.

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
RINGKASAN EKSEKUTIF.....	ii
ABSTRAK.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
PENDAHULUAN.....	1
TUJUAN.....	2
Tujuan Umum.....	2
Tujuan Khusus.....	2
MANFAAT.....	3
TINJAUAN PUSTAKA.....	3
Karsinogenesis.....	3
Onkogen dan p53.....	5
Protein Kinase C.....	6
HIPOTESIS.....	7
METODE.....	7
Kerangka Teori Penelitian.....	7
Kerangka Konsep Penelitian.....	8
Tempat dan Waktu Penelitian.....	9
Jenis dan Desain Penelitian.....	9
Sampel Penelitian.....	9
Variabel.....	10
Cara Pengumpulan Data.....	11
Bahan dan Cara Kerja.....	11
Bahan.....	11
Alat.....	12
Cara Kerja.....	13
HASIL.....	24
Determinasi, Maserasi, dan Karakterisasi Ekstrak.....	24

Uji <i>In Vivo</i> .....	25
Uji Komputasi.....	30
PEMBAHASAN.....	34
Ekstraksi.....	34
Uji <i>In Vivo</i> .....	34
Uji Komputasi.....	35
KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
Kesimpulan.....	37
Saran.....	38
UCAPAN TERIMA KASIH.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Tabel karakterisasi simplisia dan ekstrak.....	25
Tabel 2. Hasil Skoring Pengamatan Histopatologi Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara.....	27
Tabel 3. Hasil Analisis mAgNOR Hepar dan Payudara menggunakan <i>Oneway</i> ANOVA.....	28
Tabel 4. Hasil Analisis Skor nRas pada Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara.....	29
Tabel 5. Hasil Analisis Skor p53 pada Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara.....	29
Tabel 6. Konformasi paling stabil hasil minimalisasi energy.....	30
Tabel 7. Skor hasil <i>docking</i> .....	31
Tabel 8. Interaksi senyawa dengan PKC.....	32

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Protein Kinase C.....	6
Gambar 2. Bagan Kerangka Konsep.....	8
Gambar 3. Struktur Annonuricin E.....	14
Gambar 4. Struktur Muricapentocin.....	14
Gambar 5. Alur penelitian uji komputasi.....	15
Gambar 6. Alur penelitian uji <i>in vivo</i> .....	21
Gambar 7. Simplisia daun <i>Annona muricata</i> L. basah.....	24
Gambar 8. Kelarutan ekstrak dengan emulsifier dan kelarutan ekstrak tanpa emulsifier.....	25
Gambar 9. Nilai GGT dari sampel tikus yang terpilih.....	26
Gambar 10. Hasil Validasi Metode <i>Docking</i> .....	31
Gambar 11. Struktur 07u ( <i>naphthyridine</i> ).....	31
Gambar 12. Interaksi 07u-PKC.....	33
Gambar 13. Interaksi Annonuricin E-PKC.....	33
Gambar 14. Interaksi Muricapentocin-PKC.....	33
Gambar 15. Tahapan dalam karsinogenesis.....	35
Gambar 16. Jalur Aktivasi PKC.....	37

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Daftar Istilah.....	39
Lampiran 2. Lembar Persetujuan Etik.....	40
Lampiran 3. Hasil Determinasi Tanaman.....	41
Lampiran 4. Hasil Karakterisasi Ekstrak.....	42
Lampiran 5. Data uji GGT.....	44

## PENDAHULUAN

Kematian akibat kanker menunjukkan insiden yang tinggi di dunia dan semakin meningkat setiap tahunnya. Menurut WHO jumlah penderita kanker di dunia setiap tahun bertambah sekitar tujuh juta orang, dan dua per tiga diantaranya berada di negara-negara yang sedang berkembang. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta meninggal karena kanker pada tahun 2030. Ironisnya, menurut Union for International Cancer Control pada tahun 2009, kejadian ini akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang.<sup>1</sup> Di Amerika Serikat, lebih dari 12.000 jumlah kematian per tahun terkait dengan kanker hepar.<sup>2</sup> Insiden kanker payudara di negara berkembang semakin meningkat dari tahun ke tahun.<sup>3,4</sup> Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia dengan persentase 16,85%.<sup>1</sup> Untuk itu diperlukan pengobatan kanker secara dini karena kanker umumnya berakhir dengan kematian. Pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif untuk penyakit kanker sangat penting untuk diteliti.<sup>5</sup>

Umumnya pengobatan kanker dilakukan dengan mengangkat jaringan kanker dengan operasi atau dengan mematikan sel kanker. Cara ini tidak dapat mengatasi kanker yang sudah mengalami metastasis. Pengangkatan jaringan kanker pada umumnya tidak bisa tuntas menghilangkan kanker karena kemungkinan ada jaringan yang masih tertinggal dan dapat tumbuh menjadi jaringan kanker baru. Terapi lainnya seperti kemoterapi dan radioterapi kurang selektif dalam membunuh sel kanker, seringkali sel normal juga ikut rusak dan mati sehingga tidak aman untuk sel normal.<sup>6</sup> Oleh karena itu perlu diupayakan suatu pengobatan kanker yang relatif lebih aman, lebih selektif, dan dapat digunakan secara luas oleh masyarakat. Penemuan obat baru antikanker dapat dilakukan dengan mengeksplorasi bahan alam sangat berpotensi untuk dikembangkan.<sup>7</sup>

Beberapa peneliti melaporkan bahwa bahan tanaman mempunyai potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen *suppressor* kanker, sehingga berpotensi sebagai agen antikanker.<sup>8</sup> Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.). Daun sirsak mengandung senyawa golongan *acetogenin*, minyak esensial, *reticuline*, *loreximine*, *coclaurine*, *annomurine*, dan *higenamine*. Golongan senyawa *acetogenin* adalah komponen fitokimia dalam daun sirsak

yang memiliki potensi sebagai antikanker<sup>9,10</sup> dan daun sirsak mengandung hingga 17 senyawa *acetogenin* yang berperan sebagai sitotoksik.<sup>11</sup> *Bullatacin* yang juga termasuk golongan *acetogenin* terbukti dapat menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram) pada hepatoma.<sup>12</sup> Pada beberapa waktu yang lalu, berita daun sirsak dapat menyembuhkan kanker sangat meluas, penelitian yang sudah dilakukan baru sampai pada tahap *in vitro*. Oleh karenanya dilakukan penelitian *in vivo* untuk membuktikannya menggunakan hewan coba tikus untuk uji antikanker.<sup>13</sup>

Proses proliferasi sel dipengaruhi oleh beberapa protein, diantaranya protein n-Ras dan c-Myc. Overekspresi protein c-Myc terjadi pada berbagai jenis kanker yaitu sekitar 90% kanker rahim, 80% kanker payudara, 70% kanker kolon, 50% kanker hepar dan berbagai jenis kanker darah. Dengan demikian, 1/8 kematian yang disebabkan oleh kanker berkaitan dengan perubahan ekspresi protein c-Myc.<sup>14</sup> Oleh karena itu, jika protein-protein seperti n-Ras dan c-Myc dihambat maka akan menghambat laju proliferasi sel tersebut. p53 merupakan *tumor suppressor* yang dapat menginduksi apoptosis. p53 akan terekspresi saat terjadi kerusakan DNA. Dengan demikian pada peristiwa apoptosis, ekspresi protein p53 akan meningkat. Untuk itu, melalui penelitian ini ditelusuri potensi daun sirsak sebagai agen antiproliferatif dan pemicu apoptosis pada tikus terinduksi 7,12-Dimetil Benz[*a*]antrazena (DMBA). Marker tumor dalam pengamatan histopatologi adalah protein n-Ras, protein p53 dan *black dot* pada pewarnaan AgNOR.

## TUJUAN

### Tujuan Umum

Melengkapi data farmakologis daun sirsak sebagai obat tradisional dan membuktikan kebenaran bukti empiris daun sirsak sebagai agen antikanker.

### Tujuan Khusus

- a) Mendapatkan gambaran histopatologi sel hepar dan epitelial payudara tikus yang diberikan perlakuan.
- b) Mengukur efek ekspresi n-Ras pada sel hepar dan epitelial payudara tikus yang diberikan perlakuan.

- c) Menghitung jumlah *black dot* pada sel hepar dan epitelial payudara tikus yang diberikan perlakuan.
- d) Mengukur efek ekspresi p53 pada sel hepar dan epitelial payudara tikus yang diberikan perlakuan.
- e) Menilai kekuatan afinitas dan interaksi antara 2 senyawa *acetogenin*, yaitu *Annomuricin E* dan *Muricapentocin*, dengan protein kinase C (PKC).

## MANFAAT

Hasil dari penelitian ini adalah mengetahui potensi ekstrak etanolik daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan kanker pada tikus betina terinduksi 7,12- Dimetil Benz[a]antrazena (DMBA) dan menelusuri kemungkinan mekanisme antiproliferatif yang terjadi.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Karsinogenesis

Pada dasarnya, kanker adalah suatu penyakit genetik dalam hal perubahan selular sampai tingkat DNA dan perubahan ini diakibatkan oleh induksi dari berbagai faktor terutama lingkungan. Kanker ditandai dengan adanya gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler.<sup>15</sup> Karsinogenesis merupakan tahapan pembentukan kanker, ada empat tahapan karsinogenesis, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis.

Pada tahap inisiasi, zat-zat karsinogenik diaktifasi terlebih dahulu oleh enzim di dalam tubuh terutama di hepar menjadi senyawa metabolitnya. Senyawa metabolit ini ada yang bersifat reaktif, mutagenik dan mampu berikatan dengan makromolekul dalam tubuh seperti DNA dengan ikatan irreversibel. Sel yang terinisiasi umumnya tetap stabil dan tidak tumbuh menjadi kanker tetapi jika suatu saat terjadi pemaparan suatu zat promoter maka sel akan berkembang ke arah kanker.<sup>16</sup> Inisiasi merupakan hasil dari perubahan genetik yang mengakibatkan proliferasi sel yang abnormal pada sebuah sel.

Tahap promosi, tidak melibatkan perubahan struktural dalam genom secara langsung, tetapi biasanya ditandai dengan perubahan ekspresi gen dari sel yang terinisiasi. Perubahan ini diduga terjadi dari interaksi perubahan genetik pada stadium inisiasi dan

faktor lingkungan yang disebut *promoting agents* yang berfungsi untuk pertumbuhan stadium promosi dan mengantarkan tumbuh lebih lanjut menjadi stadium progresi. Contoh dari *promoting agent* adalah croton oil. Senyawa aktif dari minyak ini adalah *12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate* (TPA) yang akan berikatan dengan reseptor membran, protein kinase C, yang kemudian akan mengaktifkan *cytoplasmic serine / threonine protein kinase cascade* yang akan memacu faktor transkripsi dari proliferasi sel.<sup>6</sup> Perubahan ekspresi gen yang terjadi tidak hanya melibatkan perubahan dan susunan genetik saja, tetapi juga peningkatan replikasi selektif sel yang terinisiasi akibat pengaruh *promoting agents*.<sup>16</sup>

Stadium progresi lebih sering terjadi dari sel promosi, ditandai munculnya neoplasma ganas diikuti perubahan genetik nyata yang melibatkan perubahan struktur dalam dalam inti sel. Jika stadium promosi adalah stadium yang potensial untuk maksud pencegahan terhadap perkembangan kanker, maka stadium progresi harus diobati dengan harapan kesembuhan.<sup>17</sup> Pada tahap ini populasi sel tumor sepenuhnya adalah malignan. Sel maligna ini selanjutnya mengalami perubahan lebih lanjut sehingga mencapai tahap selanjutnya yaitu metastasis.<sup>18</sup> Pada fase ini juga akan terjadi aktivasi onkogen dan kehilangan fungsi dari enzim topoisomerase sehingga akan menyebabkan karsinoma dan metastasis.<sup>15</sup>

Pada tahap metastasis terjadi ekspansi sel kanker ke jaringan-jaringan lain di seluruh tubuh melalui pembuluh darah maupun pembuluh limfe, atau bisa juga melewati rongga tubuh. Sel yang lepas akan menempel pada jaringan lain dan membentuk tumor sekunder.<sup>19</sup> Mekanisme tersebut berbeda dengan sel normal, pada sel normal pertautan antar sel sangat kuat (didukung matriks ekstraseluler) sehingga kecil kemungkinan sel lepas dan juga jika ada sedikit sel normal yang lepas akan segera dihancurkan saat perjalanannya ataupun mengalami proses apoptosis.<sup>6</sup> CAMs (Cell-cell Adhesion Molecules) menjaga sel-sel untuk tetap berikatan satu sama lain. Molekul tersebut mengalami degradasi pada sel kanker sehingga pertautan antar sel lemah.<sup>20</sup>

Selain melalui mekanisme diatas ada dua mekanisme lain dalam karsinogenesis, antara lain Knudson's Model of Retinoblastoma dan Vogelstein's Model of Colon Cancer. Pada model Knudson mengemukakan terjadinya tumor mata yang diakibatkan oleh tidak berfungsinya kedua alel *retinoblastoma* (RB). Hipotesis Knudson menerangkan bahwa

pembentukan kanker lebih merupakan suatu proses daripada akibat dari suatu kejadian atau paparan. Kedua model ini menggambarkan bahwa mutasi gen dapat sekaligus menjadi dominan, tetapi juga dapat bersifat resesif pada tingkat seluler. Hal ini berlaku pada mutasi *germline* pada *suppressor tumor* atau *mismatch repair gene*.<sup>18</sup> Sedangkan pada model Vogelstein merupakan pengembangan dari model Knudson. Pada model Vogelstein dijelaskan perubahan genetik terjadi tahap demi tahap, dan perubahan tersebut akan mempengaruhi gen supresor tumor pada *germline*. Mutasi berikutnya akan mempengaruhi aktivasi onkogen *k-ras*, diikuti oleh hilangnya sifat kontrol dari gen *suppressor* seperti *p53* dan *DCC*. Setelah diawali perubahan genotip tersebut untuk selanjutnya akan diikuti perubahan fenotip dari selnya, mulai dari sel normal berkembang menjadi tumor non kanker, dan akhirnya menjadi bentuk sel ganas dengan kemampuan metastasis.<sup>18</sup>

### Onkogen dan p53

Salah satu strategi untuk pengembangan obat-obat anti-kanker adalah dengan menemukan senyawa-senyawa yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen pengatur pertumbuhan; yakni onkogen dan gen *tumor suppressor*. Onkogen, yaitu kelompok gen yang menstimulasi perkembangan sel melalui daur sel / *cell cycle* (serangkaian peristiwa meliputi pembesaran sel, replikasi DNA dan pembelahan sel, serta pemindahan set gen yang lengkap pada sel anak). *Cell cycle* sangat ditentukan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang terdiri dari *cyclins* dan *cyclin dependent kinase* (CDK4, CDK6, dan CDK2), sedangkan inhibitor CDK adalah p16, p21, dan p27. Tumor suppressor gen, gen penekan tumor, kelompok gen yang membatasi perkembangan tumor. Tumor suppressor gen merupakan fungsi penyeimbang dari onkogen. Tumor supresor antara lain adalah protein *p53* dan protein Retinoblastoma (pRb).<sup>5</sup>

Di sisi lain, telah banyak dilaporkan juga bahwa bahan-bahan dari tanaman (*active ingredients*) memiliki potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen *tumor suppressor*, sehingga berpotensi sebagai anti-kanker. Senyawa-senyawa tersebut banyak terdapat di dalam tumbuhan, yaitu berupa senyawa flavonoid, polifenol, alkaloid dan sebagainya.<sup>21</sup> Protein *p53* berperan menginduksi hambatan pertumbuhan, reparasi DNA atau apoptosis pada respon stres seluler. Mutasi gen *p53* didapatkan pada lebih dari 90% *small cell lung cancer* (SCLC) dan lebih dari 50% *non small cell lung cancer* (NSCLC).<sup>22</sup>



Gambar 1. Struktur Protein Kinase C

Famili Protein Kinase C (PKC) terdiri dari sekurang-kurangnya 12 isoenzim yang berbeda dan dalam beberapa hal berperan pada pertumbuhan dan diferensiasi sel. Pengaktifan PKC dapat melalui berbagai jalur yaitu pada reseptor G-protein, reseptor tirosin kinase, dan non reseptor tirosin kinase. Selain itu juga dapat diaktivasi secara independen melalui jalur fosfolipase C dan fosfatidil inositol-3 kinase (PI3K).<sup>23</sup> Pada kanker hepar, aktivitas NF $\kappa$ B meningkatkan ER-negatif sehingga sel kanker dapat melawan mekanisme apoptosis. Maka, penghambatan sinyal pada jalur aktivasi NF $\kappa$ B dapat menghentikan salah satu jalur pertumbuhan kanker.<sup>24</sup> Dalam hal ini PKC yang bekerja dalam fosforilasi NF $\kappa$ B dapat dijadikan target penghambatan pertumbuhan kanker.

#### Docking molekuler

Molekul dengan afinitas tinggi, disebut dengan senyawa penuntun, dioptimasi dan kandidat hasil yang paling potensial digunakan untuk fase preklinis dan klinis.<sup>25</sup> Pendekatan berbasis struktur atau *ligand* sudah sangat luas digunakan dalam berbagai penemuan berbasis skrining virtual.<sup>26</sup> Salah satu metode penelitian menggunakan *docking* molekul kecil yang fleksibel (ligand) dengan protein (reseptor) menunjukkan bidang yang sangat strategis dalam penelitian. Orientasi dan konformasi struktur yang kompleks antara ligand dan sisi aktif protein dapat diprediksi dengan metode *docking*. Estimasi energi bebas dari formasi kompleks dikalkulasi untuk mengidentifikasi posisi yang benar dari ligand spesifik dan untuk mengurutkan ligand yang berbeda terkait afinitas ikatannya.<sup>25</sup> Metode yang digunakan untuk proses *docking* haruslah metode yang sudah tervalidasi melalui nilai RMSD. Nilai RMSD kurang dari 2.0 Å menunjukkan bahwa metode yang digunakan valid dan dapat digunakan.<sup>27</sup> Salah satu metode yang bisa digunakan adalah dengan kombinasi

aplikasi ChemAxon (preparasi ligand), YASARA (preparasi target virtual – protein), dan PLANTS (simulasi *docking*).<sup>28</sup>

## HIPOTESIS

Ekstrak etanolik daun sirsak mampu:

1. menghambat proliferasi dan memicu apoptosis sel hepar dan sel epitelial kelenjar payudara tikus betina terinduksi DMBA.
2. menurunkan ekspresi n-Ras pada sel hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA.
3. meningkatkan ekspresi p53 pada sel hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA.
4. menurunkan jumlah black dot pada sel hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA.

## METODE

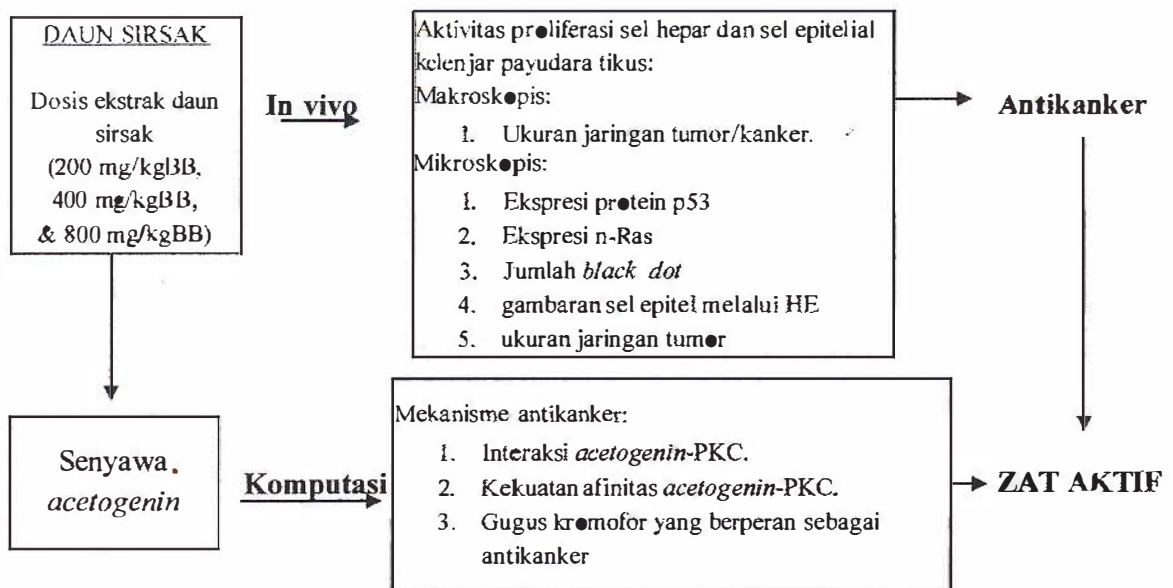
### Kerangka Teori Penelitian

Penyakit kanker merupakan penyakit genetik dimana terjadi perubahan seluler sampai tingkat DNA akibat gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler.<sup>14</sup> Perubahan genetik sering terjadi pada gen-gen yang mengatur pertumbuhan yaitu gen pemicu kanker (*oncogene*) dan gen penghambat terjadinya kanker (*tumor suppressor gene*),<sup>15</sup> sehingga sel akan berproliferasi terus-menerus dan menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal.<sup>16</sup> Aktivitas proliferasi yang terus menerus ini disebabkan oleh gangguan yang terjadi pada regulator *cell cycle* sehingga regulator-regulator ini potensial untuk dijadikan target obat antikanker, diantaranya protein n-Ras, p53, dan protein kinase C.

*Annona muricata* atau sirsak merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antikanker. Selama ini, rebusan daun sirsak digunakan secara empiris untuk mengobati kanker. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa daun sirsak mengandung 17 senyawa *acetogenin* baru yang berperan sebagai sitotoksik. *Bullatacin* yang juga termasuk golongan *acetogenin* terbukti dapat menginduksi apoptosis pada hepatoma.<sup>11</sup> Namun demikian, penelitian-penelitian tersebut belum menunjukkan kemampuan ekstrak daun sirsak dalam menghambat karsinogenesis secara *in vivo*.

●leh karena itu dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengukur dan menilai aktivitas antiproliferasi dan proapoptosis ekstrak daun sirsak dengan melihat potensinya dalam menghambat protein proliferasi yaitu n-Ras, menekan jumlah *black dot*, dan meningkatkan ekspresi protein proapoptosis p53. Selain itu, uji komputasi dengan melakukan *molecular docking* dilakukan untuk mengetahui jenis interaksi senyawa *acetogenin* dengan protein kinase C yang berperan dalam regulasi p53<sup>17</sup> dan mengetahui afinitas dari ikatan tersebut.

#### Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2. Bagan kerangka konsep

Penelitian ini terdiri dari dua uji yaitu uji *in vivo* dan uji komputasi. Untuk uji *in vivo*, ekstrak daun sirsak diteliti dalam tiga (3) peringkat dosis, yaitu 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Dasar perhitungan dosis adalah sebagai berikut: nilai LD50 ekstrak etanolik daun sirsak adalah 1,67 g/kgBB yang diberikan secara per oral. Dosis yang digunakan dalam pengujian adalah dosis yang dihitung kurang dari LD50 dengan diurutkan berdasarkan deret ukur.<sup>18</sup> Untuk variasi dosis diambil berdasarkan deret hitung dimulai dr nilai dibawah dan diatas nilai LD50. Ketiga ekstrak ini dipajankan secara per oral kepada tikus betina yang telah diinduksi dengan DMBA. Untuk mengetahui

pertumbuhan kanker pada organ payudara, dilakukan palpasi organ dan pengukuran jaringan tumor. Sedangkan untuk mengetahui pertumbuhan kanker pada organ hepar, dilakukan pemeriksaan *γ-Glutamyl Transferase (GGT)*. Pada akhir perlakuan, tikus dinekropsi dan dilakukan pengamatan makroskopis serta mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan palpasi organ payudara dan pengukuran jaringan tumor. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengetahui aktivitas proliferasi sel hepar dan sel epitelial kelenjar payudara tikus dengan melihat ekspresi protein p53, n-Ras, dan jumlah *black dot*. Analisis dilakukan secara semikuantitatif dan kuantitatif dengan membandingkan gambaran histopatologi dan ekspresi protein antara ekstrak dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Kelompok kontrol positif adalah kelompok dengan pemberian DMBA saja selama uji sehingga didapatkan tikus dengan keadaan positif tumor/kanker. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok dengan pemberian CMC-Na selama uji sehingga didapatkan tikus normal.

Uji komputasi dilakukan dengan menggunakan *software* MarvinSketch, YASARA, PLANTS, dan PyMol. Uji komputasi diawali dengan preparasi ligand dan protein, *docking ligand (acetogenin)* dengan protein (protein kinase C), dan penentuan interaksi ikatan yang terjadi pada ligand-protein. Hasil akhir akan didapatkan gugus fungsional protein dan atom ligand yang berperan dalam ikatan dan *score* yang menggambarkan kekuatan ikatan ligand-protein. Dengan demikian penelitian ini dapat menggambarkan potensi ekstrak daun sirsak dan kemungkinan mekanisme molekulernya sebagai agen antikanker.

#### Tempat dan Waktu Penelitian

Uji *in vivo* dan komputasi dilakukan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta. Waktu penelitian dilakukan selama delapan bulan.

#### Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium eksperimental dan komputasi.

## Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus betina galur *Sprague Dawley* umur  $\pm 40$  hari dengan berat badan antara 30-60 gram diperoleh dari laboratorium hewan coba, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia.

Kriteria inklusi:

- a) Tikus bergalur *Sprague Dawley*.
- b) Tikus berjenis kelamin betina.
- c) Tikus berumur  $\pm 40$  hari.
- d) Tikus memiliki berat badan antara 30-60 gram.

Kriteria eksklusif:

- a) Tikus tampak sakit.
- b) Terdapat abnormalitas fisik yang tampak.

Jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus betina galur *Sprague Dawley* yang terbagi dalam lima (5) kelompok uji. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus, Ketentuan besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federrer (1955) dengan rumus:<sup>19,20</sup>

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan (t=5)

r = jumlah replikasi/ jumlah sampel dalam satu kelompok (sehingga  $r \geq 5$ )

## Variabel

### 1. Uji *in vivo*

Variabel bebas : Dosis ekstrak daun sirsak 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB.

Variabel tergantung : Aktivitas proliferasi sel hepar dan sel epitelial kelenjar payudara tikus dengan melihat gambaran histopatologi, ukuran tumor dan ekspresi marker tumor yaitu protein p53, n-Ras, serta jumlah *black dot*.

Variabel terkendali : Galur, jenis kelamin, berat badan, lingkungan hidup, dan perlakuan terhadap hewan uji, jumlah lapang pandang penghitungan.

## 2. Metode komputasi

Variabel bebas : Senyawa *acetogenin* (*Annomuricin E* dan *Muricapentocin*).

Variabel tergantung : *Score* yaitu parameter yang menunjukkan kestabilan interaksi *ligand*-protein dan bentuk interaksi yang terjadi pada *ligand*-protein serta mengetahui gugus fungsional protein dan atom *ligand* yang berperan dalam ikatan.

Variabel terkendali : Protein Kinase C (PKC).

### Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara pengamatan secara makroskopis, palpasi organ payudara tikus dan pengukuran tumor. Pengukuran tumor dilakukan dengan menggunakan kaliper. Ukuran yang diukur adalah diameter terbesar dan diameter terkecil. Rumus volume tumor diperoleh berdasarkan penelitian Shibata, dkk, 2003<sup>21</sup> yaitu:

$$\text{Volume tumor} = 0,4 \times \text{diameter terbesar} \times \text{diameter terkecil}$$

Pembulatan volume adalah sampai dengan tiga angka di belakang koma. Pengukuran dilakukan dengan membasahi kulit badan tikus dengan air sebelumnya, supaya bulu-bulunya tidak mengganggu pengukuran.

Pengamatan juga dilakukan secara mikroskopis dengan melihat histopatologi dan ekspresi protein p53, n-Ras, serta jumlah *black dot* pada sel epitelial kelenjar payudara dan organ hepar tikus. Data yang dihasilkan berupa aktivitas antiproliferasi atau proapoptosis, yang didapat dengan cara analisis semikuantitatif untuk penilaian gambaran histopatologi dengan HE, ekspresi n-Ras, p53. Selain itu juga dilakukan analisis kuantitatif terhadap jumlah *black dot* antara ekstrak etanolik daun sirsak dengan dosis berbeda, dan antara kelompok perlakuan ekstrak dengan kontrol negatif. Sedangkan uji komputasi dilakukan untuk mengetahui sisi ikatan

senyawa *acetogenin* dengan PKC, kestabilan interaksi, dan gugus farmakofor yang berperan dalam ikatan *acetogenin*-PKC.

## Bahan dan Cara Kerja

### Bahan

- 1) Bahan untuk preparasi ekstrak
  - a. Bahan tanaman : Daun sirsak (*Annona muricata*) yang didapatkan dari BPTO2T Tawangmangu dan telah diidentifikasi.
  - b. Bahan kimia : Etanol 96%
- 2) Bahan untuk preparasi hewan uji : Sekam, pakan, air ledeng.
- 3) Bahan untuk perlakuan hewan uji
  - a. Variasi dosis ekstrak etanolik daun sirsak.
  - b. Bahan Kimia : CMC-Na 0,5%, *corn oil*, DMBA.
  - c. Hewan Uji : Tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague Dawley* berumur  $\pm 40$  hari dengan berat badan seragam (30-60 gram)
- 4) Bahan untuk pembedahan hewan uji : NaCl 0,9%, *aquadest*, buffer formalin 4%
  - sebagai larutan fiksasi organ, etanol p.a (E. Merck).
- 5) Bahan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan Haematoksilin-Eosin: Formalin 10% (Asia Lab), *Xylene*, Alkohol 100%, Alkohol 96%, Alkohol 80%, Alkohol 70% (Gibco), Mayer Hematoksilin (Sigma), Eosin (Sigma), Poly L Lysin, *Phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma), Hidrogen Peroksida, *Citrate Buffer*, Normal Serum, Antibodi COX dan VEGF, *Biotinylated Goat Anti Polyvalent*, DAB (Sigma), Streptavidine, *Aquadest* (Asia Lab), Balsam Kanada
- 6) Bahan untuk pemeriksaan aktivitas proliferasi dengan pengecatan immunohistokimia n-Ras:

Preparat histologi jaringan hepar dan kelenjar payudara tikus, PBS, paraformaldehid, BSA 8%, antibody n-Ras.
- 7) Bahan untuk pemeriksaan aktivitas proliferasi dengan metode AgNOR:

Preparat histologi jaringan hepar dan kelenjar payudara tikus, *xylene*, buffer sodium sitrat, larutan natrium tiosulfat 5%, solution pengecatan perak (1 bagian volume gelatin, 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 50%).

- 8) Bahan untuk pemeriksaan aktivitas apoptosis dengan pengecatan immunohistokimia p53:

Preparat histologi jaringan hepar dan kelenjar payudara tikus, *xylene*, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, aquadest, antibody monoclonal anti p53, PBS, DAB, haematoksin-eosin, *prediluted blocking serum*.

- 9) Bahan untuk uji komputasi: file protein kinase C yang didapat dari *Protein Data Bank* (PDB).

Alat:

#### **Alat untuk uji *in vivo***

- 1) Alat preparasi ekstrak : Seperangkat alat gelas, neraca analitik, cawan porselen, *rotary evaporator*, kertas saring, kertas timbangan, seperangkat perkulator.
- 2) Alat untuk preparasi hewan uji : Timbangan tikus, kertas label, spidol.
- 3) Alat untuk perlakuan hewan uji : Mortir, stamper, spuit per oral, neraca analitik, spatula, gloves, masker, kanul, tisu, dan seperangkat alat gelas.
- 4) Alat untuk pembedahan hewan uji : Seperangkat alat-alat bedah (pinset, gunting operasi, pisau bedah), kertas label, tisu, *wrapping plastic*, papan bedah, pot untuk wadah organ, kapas, kertas saring, neraca analitik.

#### **Alat untuk komputasi**

Satu set laptop lengkap dengan *software* Marvin Sketch (Chemaxon, Belanda), YASARA (YASARA Biosciences, Austria), PLANTS 1.1 (Universität Konstanz, Jerman), dan PyMol (Schrödinger, Austria).

Cara Kerja:

- 1) Tahap pembuatan ekstrak daun sirsak  
Ekstrak etanolik daun sirsak diperoleh dengan cara remaserasi. Serbuk simplisia ditimbang seksama. Satu bagian simplisia dibasahi dengan sebelas bagian

etanol 96% lalu ditutup selama tiga hari terlindung dari cahaya dengan ketentuan sering diaduk. Setelah tiga hari, hasil maserasi dikerai lalu diperas dengan kain. Ampas dibasahi kembali dengan sepuluh bagian etanol 96% lalu ditutup dua hari terlindung dari cahaya. Maserat disaring kembali dengan kertas saring dan terakhir diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental.

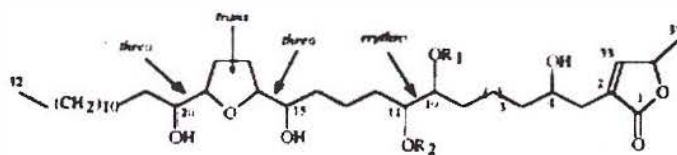
Terdapat tiga peringkat dosis ekstrak yang digunakan dalam penelitian, yaitu 200mg/kgBB (dosis I), 400 mg/kgBB (dosis II), dan 800 mg/kgBB (dosis III).<sup>18</sup> Ekstrak ditimbang sesuai dosis, dilarutkan dengan larutan CMC-Na 0,5% dalam mortir hingga diperoleh larutan homogen dengan konsentrasi yang jika diberikan kepada hewan uji tidak melebihi volume maksimal yang diperbolehkan (volume maksimal lambung tikus adalah 5 ml, untuk menghindari gangguan pencernaan maka yang diperbolehkan untuk pencekokan kurang dari 5 ml). Larutan ekstrak dalam CMC-Na 0,5% ini selalu dibuat baru, sebelum diberikan kepada hewan uji.

## 2) Uji Komputasi<sup>28,29</sup>

Langkah-langkah yang akan dilakukan selama uji komputasi adalah :

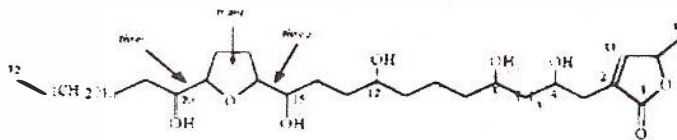
- a. Membangun Struktur *Annomuricin E* dan *Muricapentocin* serta minimalisasi energi menggunakan *software MarvinSketch*

Pada tahap ini, struktur *Annomuricin E* dan *Muricapentocin* dibangun dan energinya diminimalkan sehingga didapatkan konformasi molekul yang paling stabil yaitu dengan mencari konformasi struktur yang memiliki energi terendah. File disimpan dalam format \*.mol2.



Gambar 3

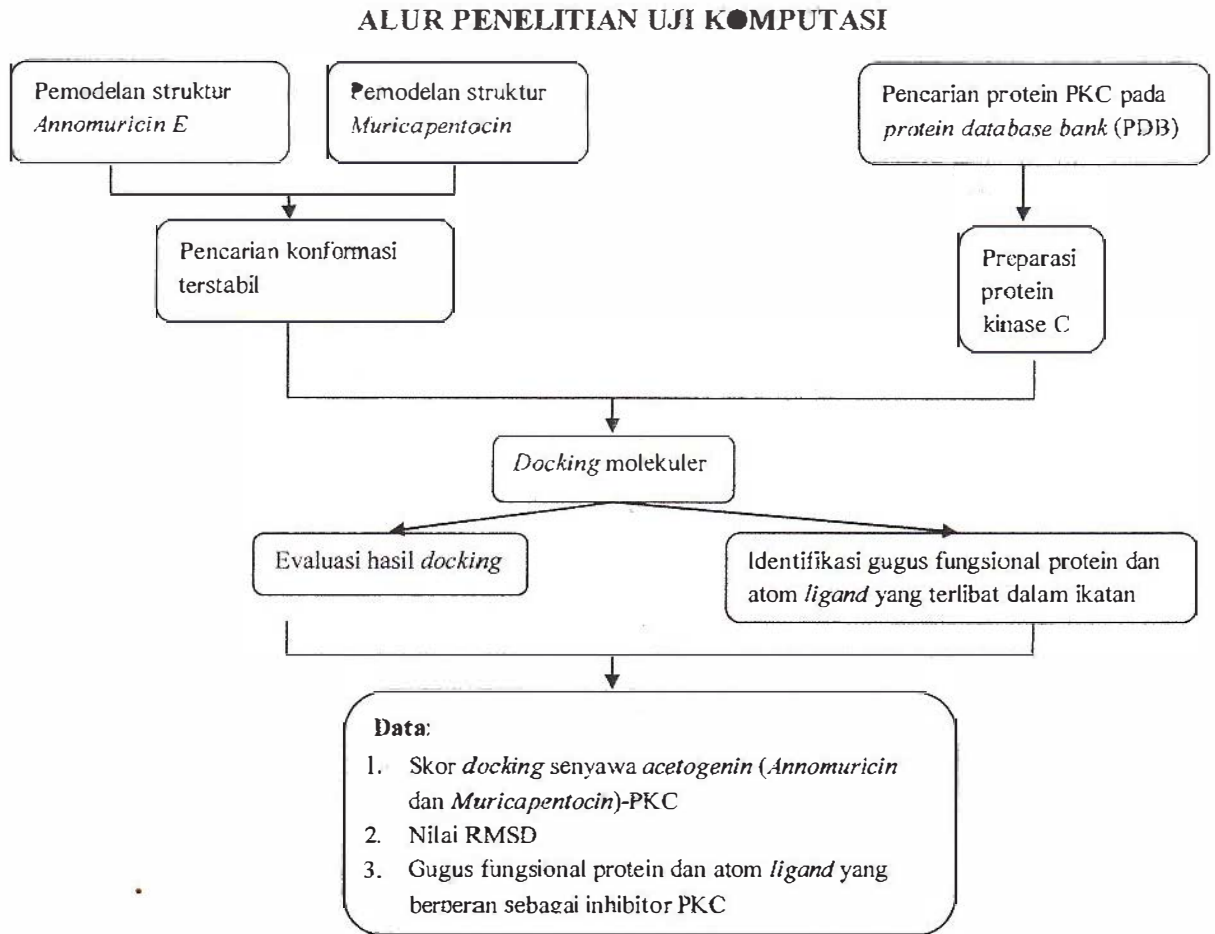
Gambar 3. Struktur *Annomuricin E*<sup>9</sup>



Gambar 4. Struktur Muricapentocin<sup>9</sup>

- b. Preparasi protein kinase C menggunakan *software* YASARA.  
 Pada tahap ini *native ligand* dihilangkan kemudian ditambahkan atom hidrogen dan file disimpan dalam format \*.mol2.
- c. *Docking* molekuler menggunakan *software* PLANTS 1.1.  
 Pada tahap ini dilakukan pemilihan *binding site* protein kinase C sebagai target *docking*. Setelah itu, dilakukan proses *docking* antara *binding site* makromolekul (protein) dengan *ligand* yang dianggap sebagai senyawa obat, yaitu *Annomuricin E* dan *Muricapentocin*. Setelah proses *docking* akan dicari ikatan *ligand*-protein yang memiliki *score* PLANTS terendah yaitu konformasi yang memiliki kestabilan ikatan tertinggi.
- d. Evaluasi hasil *docking* molekuler menggunakan *software* YASARA.  
 Pada tahap ini dilakukan evaluasi hasil *docking* dengan melakukan perhitungan *Root Mean Square Deviation* (RMSD), yaitu dengan meng-*aligned* konformasi *ligand native* hasil *docking* dengan konformasi *native ligand* referensi struktur kristal dari PDB. Identifikasi gugus fungsional protein dan atom *ligand* yang berperan dalam ikatan hidrogen *ligand*-protein menggunakan *software* Pymol.  
 Pada tahap ini dilakukan *load* protein dari referensi yang telah dipreparasi dan konformasi paling stabil dari *ligand* hasil *docking*. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi gugus fungsional protein dan atom *ligand* yang berperan dalam ikatan hidrogen *ligand*-protein.

Alur penelitian uji komputasi terlihat pada gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Alur penelitian uji komputasi

### 3) Perlakuan pada hewan uji.<sup>20</sup>

#### a) Pembuatan larutan DMBA

Senyawa DMBA ditimbang sesuai dengan dosis yaitu 20 mg/kgBB setiap pemberian dilarutkan dalam minyak jagung (*corn oil*) dengan bantuan vortex hingga diperoleh larutan jernih yang homogen dengan konsentrasi 4 mg/ml. Dengan konsentrasi ini, masing-masing hewan uji akan mendapat larutan DMBA tidak melebihi volume maksimal yang diperbolehkan. Larutan DMBA dalam minyak jagung ini selalu dibuat baru, sebelum diberikan kepada hewan uji.

b) Perlakuan terhadap hewan uji

Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah berbahan plastik dengan ukuran 28 x 44 x 18 cm dengan suhu 25°C dalam ruang berAC. Tikus diadaptasikan di kandang percobaan selama satu minggu sebelum diberi perlakuan. Berat badan tikus ditimbang secara rutin setiap 2 kali dalam seminggu selama percobaan berlangsung dan diberikan makan dan minum setiap hari. Penggantian serbuk *bedding* dilakukan secara berkala.

c) Uji Karsinogenesis<sup>30,31</sup>

Uji karsinogenesis dilakukan dengan menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi ke dalam 5 kelompok yang secara umum dibagi menjadi empat tahap:

**Tahap induksi kanker.** Pada tahap ini kelompok kontrol negatif tidak dipajankan DMBA sedangkan keempat kelompok lainnya dipajankan DMBA sebanyak 20 mg/kgBB (dilarutkan dengan corn oil). DMBA berfungsi sebagai zat pemicu tumbuhnya tumor secara sistemik. Tahap ini berlangsung selama 5 minggu (minggu ke-0 s/d ke-5) dan pemejanaan dilakukan secara per oral menggunakan sonde dengan frekuensi 2 kali seminggu. Palpasi dilakukan ketika dicurigai telah munculnya tumor dan dilakukan pengukuran tumor sebanyak 2 kali seminggu.

**Tahap menunggu tumbuhnya tumor.** Pada tahap ini kelima kelompok tidak diberikan perlakuan apapun, hanya diberikan pakan dan minum. Tujuan dari tahap ini adalah agar tumor dapat tumbuh dan terlihat pada tubuh tikus. Tahap ini berlangsung selama 2 minggu (minggu ke-5 s/d minggu ke-6). Di tahap ini juga dilakukan palpasi dan pengukuran diameter tumor serta pengujian GGT (*γ-Glutamyl Transferase*) sebagai hepatoma *marker*. Jumlah tikus yang diperiksa GGT berjumlah 1 yang mewakili masing-masing kelompok perlakuan.

**Tahap pemberian ekstrak.** Pada tahap ini, kelompok yang dipajankan ekstrak sirsak hanya kelompok III-V, yaitu kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor. Tujuan tahap ini adalah melawan sel kanker dengan pemberian ekstrak daun sirsak. Tahap ini berlangsung selama 17 hari (minggu ke-7 s/d pertengahan minggu ke-10) dan pemejanaan dilakukan

secara per oral menggunakan sonde dengan frekuensi 1 x setiap hari. Uji GGT juga dilakukan sebanyak 4 kali selama proses penelitian.

**Tahap nekropsi.** Pada akhir perlakuan, seluruh tikus dikorbankan dengan cara disuntikkan ketamin dosis 800 mg/kgBB kemudian dilakukan nekropsi dan dilakukan palpasi serta pengukuran diameter tumor pada sel epitelial payudara dan organ hepar. Selanjutnya organ hepar dan payudara disimpan dalam buffer formalin 40%. Pada tahap akhir, *cadaver* tikus dimusnahkan dengan cara dibakar. Analisis makroskopis dilakukan dengan melihat ada tidaknya nodul tumor pada organ hepar dan payudara lalu dihitung besarnya tumor dengan pengukuran diameter. Analisis mikroskopis dilakukan dengan mengamati tingkat proliferasi sel dengan AgNOR, ekspresi protein n-Ras dan p53 pada hepar dan payudara tikus.

d) Preparasi organ hepar dan payudara tikus dengan teknik pewarnaan HE.

Sel epitelial kelenjar payudara dan hepar akan dipotong menggunakan *scalpel*, gunting, dan pinset. Proses yang dilakukan terdiri dari 6 langkah. Pertama, **Fiksasi**, yaitu sampel organ yang akan dibuat sediaan histopatologi difiksasi dengan larutan buffer neutral formalin 10% (BNF) selama 1 minggu. Tahap ini penting untuk menghentikan proses enzimatis pada jaringan. Kemudian *ditreaming* dengan ketebalan 3-5 cm. Kedua, **Dehidrasi**, yaitu proses untuk penarikan air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan sampel yang diuji dengan cara merendamnya dengan larutan alkohol konsentrasi bertingkat (alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II). Proses ini umumnya dilakukan pada masing-masing cairan selama 2 jam. Ketiga, **Clearing**, yaitu proses yang bertujuan untuk membuang sisa alkohol yang masih terdapat dalam jaringan. Zat yang digunakan sebagai larutan adalah *xylol* (*xylol* I, *xylol* II, *xylol* III), proses ini umumnya dilakukan pada masing-masing cairan selama 30 menit. Keempat, **Infiltrasi**, yaitu pengisian paraffin ke dalam pori-pori jaringan menggunakan paraffin cair dengan titik didih 56°C dan dilakukan sebanyak 4 tahap dari tabung pertama hingga tabung yang keempat. Lamanya infiltrasi pada masing-masing tabung adalah 30 menit. Kelima, **Embedding**, yaitu penanaman jaringan ke dalam paraffin, dengan cara meletakkan jaringan ke dalam cetakan paraffin. Paraffin cair dituangkan ke

dalam cetakan tersebut hingga memenuhi dua per tiga tinggi blok. Jaringan dibenamkan sampai dasar cetakan. Paraffin ini didiamkan sampai mengeras sampai akhirnya dapat dilepaskan dari blok pencetaknya. Proses ini sebaiknya dikerjakan dekat sumber panas dengan alat-alat yang telah dihangatkan terlebih dahulu untuk mencegah pembekuan paraffin sebelum proses selesai. Terakhir, *Sectioning*, yaitu proses pemotongan jaringan. Pada tahap ini jaringan yang telah diblok disimpan dalam lemari es untuk mengeraskan paraffin dan memudahkan pemotongan yang dilakukan dengan mikrotom.

Untuk mendapatkan sediaan histopatologi yang baik, jaringan dipotong dengan ketebalan 5 mikron. Hasil potongan kemudian diletakkan di atas air yang telah dihangatkan terlebih dahulu agar tidak mengkerut dan terlipat. Setelah itu hasil potongan diletakkan di atas gelas objek. Agar jaringan lebih melekat pada gelas objek maka dilakukan pemanasan dalam inkubator pada suhu 25°C.

- e) Preparasi organ hepar dan payudara dengan teknik pewarnaan p53. (tahap ini sedang proses pengerjaan)

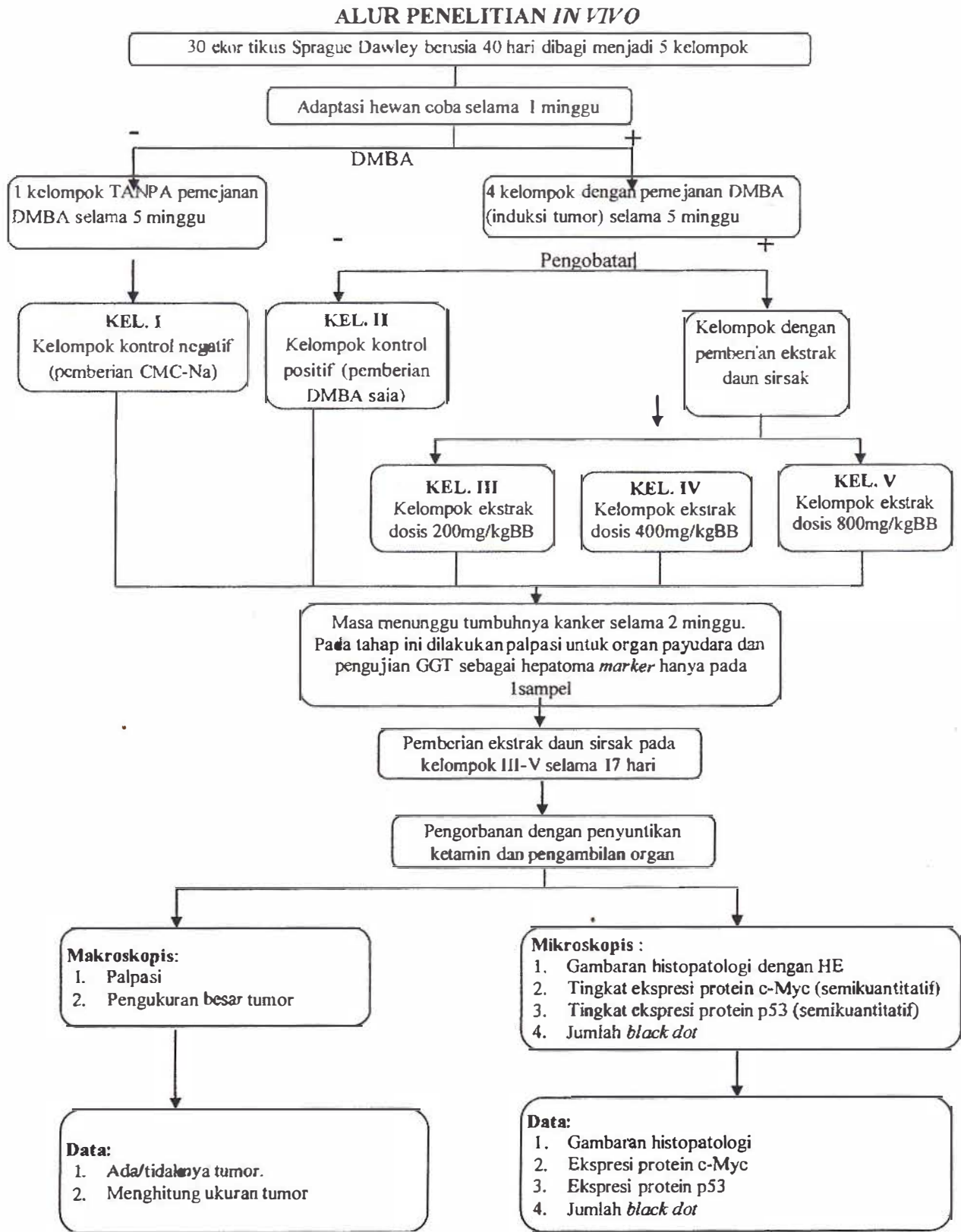
Preparat yang akan diamati dideparafinasi dengan *xylene* tiga kali masing-masing selama tiga menit kemudian perlakuan rehidrasi berturut-turut dengan etanol 96% dua menit, etanol 80% dua menit, etanol 70% satu menit dan aquades satu menit. Selanjutnya preparat direndam dalam peroxidase blocking solution selama dua menit dan diinkubasi *prediluted blocking serum* pada suhu 25°C selama 10 menit. Antibodi monoklonal anti p53 ditambahkan pada preparat selama 10 menit dan dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* selama 5 menit. Preparat diinkubasi dengan antibody sekunder selama 10 menit dan dicuci dengan PBS 5 menit. Langkah selanjutnya adalah inkubasi dengan peroksidase selama 10 menit dan dicuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat lalu diinkubasi dengan kromogen DAB, Hematoxylin Eosin kemudian dicuci dengan aquades. Langkah terakhir preparat dibersihkan dan ditutup dengan *coverslip*. Ekspresi p53 diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

- f) Preparasi organ hepar dan payudara dengan teknik pewarnaan n-Ras. (tahap ini sedang proses pengerjaan)

Preparat akan direndam dalam peroxidaseblocking solution pada suhu kamar selama 10menit, diinkubasi dalam prediluted blockingserum 25°C selama 10 menit. Masing-masing preparat ditambah antibodi monoklonal antin-Ras, dicuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat diinkubasikan DAB (*Diaminobenzidine tetrachloride*) selama 10 menit, diinkubasi dengan Hematoxylin-Eosin selama 3menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Preparat dibersihkan, ditetesi dengan mounting media, dan ditutup dengan *coverslip*.

- g) Preparasi organ hepar dan payudara dengan teknik pewarnaan AgNOR.

Untuk pengecatan *Argyrophilic Nucleolar Organizer region* atau AgNOR, preparat histologi jaringan dari organ hati dan payudara tikus diimersikan dalam buffer sodium sitrat (pH 6,0) kemudian diinkubasi dalam autoclave pada suhu 120 °C (tekanan 1,1-1,2) selama 20 menit. Setelah itu diinginkan sampai suhu 37 C, slide kemudian diimersikan ke dalam solution pengecatan perak yang terdiri dari 1 bagian volum gelatin 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 25% dalam lingkungan yang terkontrol suhunya yaitu pada suhu 37°C selama 11 menit. Reaksi dihentikan dengan mencuci slide menggunakan aqua bidestilata untuk menghilangkan perak nonspesifik. Selanjutnya, semua jaringan didehidrasi menggunakan etanol 96% dengan konsentrasi yang dinaikkan secara bertingkat, dibersihkan dengan xylene dan ditempelkan pada resin atau medium sintesis. Alur penelitian uji *in vivo* terlihat pada gambar 6.



Gambar 6. Alur penelitian uji *in vivo*

5) Manajemen dan analisis data.

a. Pengamatan histopatologi sel dengan metode Haematoksilin Eosin.

Evaluasi hasil uji dilakukan terhadap gambaran mikroskopis sel hepar dan epitelial kelenjar payudara hewan uji. Analisis dilakukan secara semikuantitatif yaitu dengan pengamatan perubahan gambaran sel normal-abnormal lalu dikelompokkan dan *discoring* ( skor 0 untuk nilai normal dan skor 1 untuk nilai abnormal). Pengamatan dilakukan sebanyak 10 lapang pandang.

b. Pengamatan ekspresi n-Ras dengan metode imunohistokimia.

Metode imunohistokimia digunakan untuk mengetahui banyaknya sel yang mengekspresikan protein n-Ras. Analisis data dilakukan secara semikuantitatif yaitu dengan pengamatan warna sel lalu dikelompokkan dan diskoring. Pengamatan dilakukan sebanyak 10 lapang pandang. Ekspresi positif jika sel berwarna coklat atau gelap dominan (dibanding kontrol) dan diberikan skor 1-3 dengan melihat intensitas warna. Ekspresi negatif jika sel berwarna biru dan diberikan skor 0.

c. Pengamatan ekspresi p53 dengan metode imunohistokimia.

Metode imunohistokimia digunakan untuk mengetahui banyaknya sel yang mengekspresi protein p53. Analisis data dilakukan secara semikuantitatif yaitu dengan pengamatan warna sel lalu dikelompokkan dan diskoring. Pengamatan dilakukan sebanyak 10 lapang pandang. Ekspresi positif jika sel berwarna ungu atau gelap dominan (dibanding kontrol) dan diberikan skor 1-3 dengan melihat intensitas warna. Ekspresi negatif jika sel berwarna biru dan diberikan skor 0.

d. Pengamatan ekspresi AgNOR.

Analisis data dilakukan secara kuantitatif yaitu dengan menghitung *black dot* yang dikonversikan ke nilai mAgNOR. Pengamatan titik hitam dilakukan sebanyak 10 lapang pandang dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000X dalam minyak imersi. Hasil perhitungan titik hitam dikonversikan ke nilai mAgNOR yaitu jumlah seluruh titik hitam pada 250 sel kemudian dirata-rata dengan cara membagi jumlah seluruh titik hitam dengan jumlah sel yang diamati.

Data dianalisis secara statistik menggunakan *oneway ANOVA*, dengan syarat bila jumlah *black dot* di tiap-tiap kelompok terdistribusi normal dengan variasi homogen. Uji normalitas dan homogenitasnya menggunakan Kolmogorov Smirnov. Uji parametrik yang digunakan adalah uji Tuckey. Tingkat kepercayaan ditentukan 95%.

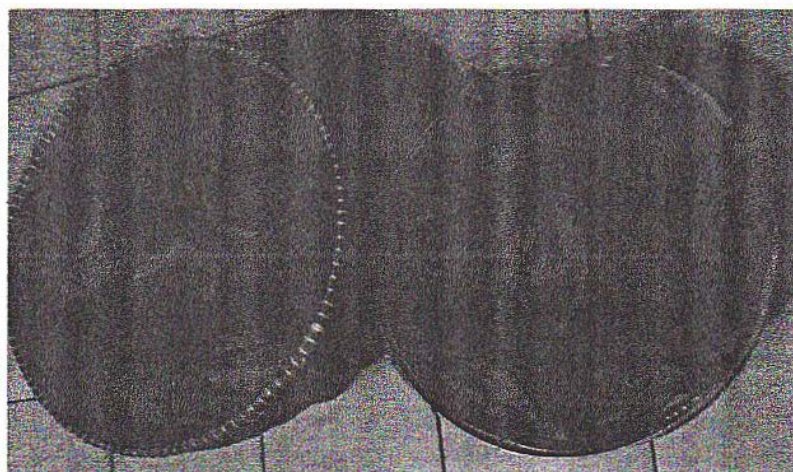
e. Penentuan afinitas dan interaksi senyawa uji terhadap protein kinase C.

●output yang diperoleh berupa *score*, yang menyatakan kestabilan/kekuatan interaksi ligan-reseptor. Analisis data dilakukan dengan membandingkan *score Annomuricin E - PKC* dan *Muricapentocin - PKC*.

## HASIL

### Determinasi, Maserasi dan Karakterisasi Tanaman

Hal yang dilakukan pertama kali adalah determinasi tanaman di Pusat Penelitian Biologi-LIPI dengan memberikan sampel daun *Annona muricata* L. basah yang didapatkan dari lokasi pengambilan. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang diberikan benar merupakan spesies *Annona muricata* L. (lampiran 2).



Gambar 7. Simplisia daun *Annona muricata* L. basah.

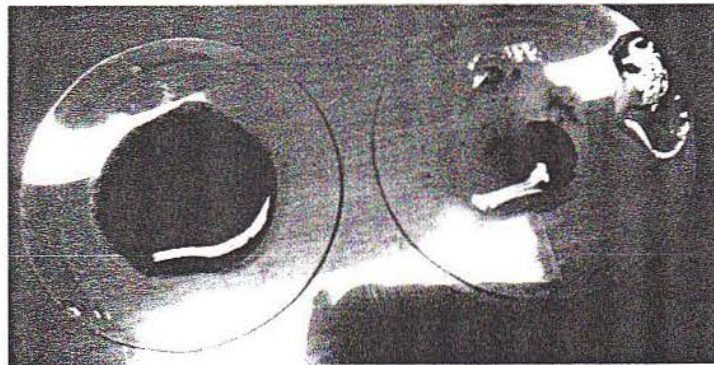
Ekstrak etanolik daun sirsak didapatkan dengan cara remaserasi. Dari 501,9 gram daun sirsak diperlukan 10 L etanol 96% dan didapatkan hasil 34, 8750 gram ekstrak kental. Dengan demikian diperoleh rendemen sebesar 6,95%. Pada uji karakterisasi dilakukan uji karakterisasi nonspesifik dan uji karakterisasi spesifik. Uji karakterisasi nonspesifik mencakup kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar air, susut pengeringan, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Sedangkan untuk uji karakterisasi spesifik menggunakan pola kromatogram yang dilihat menggunakan densitometer dengan metode kromatografi lapis tipis. Pelarut yang digunakan untuk uji karakterisasi spesifik ini adalah etanol, etil asetat, dan heksan yang mewakili gradasi tingkat kepolaran senyawa (polar-nonpolar) (lampiran 3). Pola kromatogram menunjukkan kadar senyawa yang terlarut pada pelarut heksan lebih tinggi dibandingkan pada pelarut etanol dan etil asetat.

Tabel 1. Tabel karakterisasi Simplisia dan Ekstrak

Uji Karakterisasi Non Spesifik	Hasil
Kadar abu total	1,70 %
Kadar abu tidak larut asam	0,45 %
Kadar air	13,49 %
Susut pengeringan	10,11 %
Kadar sari larut air	51,00 %
Kadar sari larut etanol	1,01%

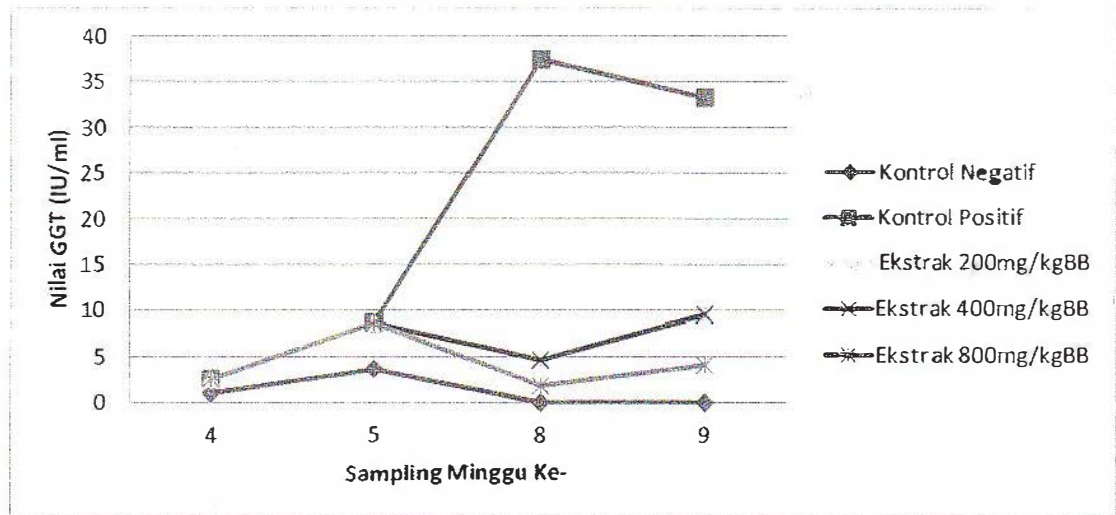
#### Uji In Vivo

Ekstrak yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan CMC-Na 0,5% menunjukkan ekstrak tidak larut sempurna sehingga diberikan emulsifier agar larut (Gambar 7).



Gambar 8. Kelarutan ekstrak dengan emulsifier (1) dan kelarutan ekstrak tanpa emulsifier (2)

Proses karsinogenesis diamati dengan melihat nilai  $\gamma$ -Glutamyl Transferase (GGT) yang dibandingkan dengan referensi dan ada/tidaknya nodul pada organ payudara. Hasil uji karsinogenesis pada kanker hepar menggunakan hepatoma marker  $\gamma$ -Glutamyl Transferase (GGT) menggambarkan bahwa DMBA mampu menginduksi karsinogenesis pada organ hepar. Gambaran lain yang ditunjukkan adalah ekstrak 800mg/kgBB mampu menghambat pertumbuhan tumor hepar dibandingkan kedua dosis lainnya (Gambar 8). Sedangkan untuk organ payudara, tidak ditemukan nodul selama proses penelitian.



Gambar 9. Nilai GGT dari sampel tikus yang terpilih

Gambaran Histopatologi sel Hepar dan Epitelial Payudara dengan Pewarnaan Haematoksilin Eosin

Pengecatan menggunakan pewarnaan Haematoksilin Eosin dimaksudkan untuk melihat gambaran histopatologi organ hepar dan sel epitelial payudara dari kelima kelompok tikus. Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data jumlah titik hitam terdistribusi normal. Parameter homogenitas yang digunakan adalah angka signifikansi yang didapatkan dari tes *homogeneity of variances* yaitu jika nilai signifikansinya lebih besar atau sama dengan 0,05 untuk taraf kepercayaan 95%. Dari hasil perhitungan statistik, didapatkan nilai signifikansi *homogeneity of variances test* sebesar 0,577 untuk hepar dan 0,363 untuk payudara. Karena data yang dianalisis terdistribusi normal, maka digunakan metode analisis mAgNOR statistik parametrik dengan uji One Way ANOVA.

Hasil analisis menunjukkan kelompok kontrol positif dan ekstrak berbeda nyata dengan kontrol negatif pada organ hepar maupun sel epitelial payudara. Hal ini menunjukkan bahwa DMBA mampu menyebabkan abnormalitas pada sel normal. Rata-rata skor pada kelompok ekstrak yang lebih rendah menunjukkan kemampuan ekstrak daun sirsak sebagai antikanker dengan kemampuan ekstrak yang sebanding dengan dosis namun belum mampu mengembalikan abnormalitas sel ke kondisi normal hingga dosis 800mg/kgBB (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Skoring Pengamatan Histopatologi Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara

Kelompok Tikus	Rata-rata skor $\pm$ SD organ Hepar	Rata-rata skor $\pm$ SD Sel Epitelial Payudara
Kontrol Negatif	0.0000 $\pm$ 0.0000*	0.0000 $\pm$ 0.0000*
Kontrol Positif	1.0000 $\pm$ 0.0000 <sup>a</sup>	1.0000 $\pm$ 0.0000 <sup>a</sup>
Ekstrak 200mg/kgBB	0.8400 $\pm$ 0.0894* <sup>a</sup>	0.9000 $\pm$ 0.0707* <sup>a</sup>
Ekstrak 400mg/kgBB	0.5600 $\pm$ 0.0548* <sup>a</sup>	0.5400 $\pm$ 0.0548* <sup>a</sup>
Ekstrak 800mg/kgBB	0.2400 $\pm$ 0.0548* <sup>a</sup>	0.2400 $\pm$ 0.0548* <sup>a</sup>

Cat: \* ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif

<sup>a</sup> ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negatif

#### Penentuan Aktivitas Proliferasi sel Hepar dan Epitelial Payudara dengan Pewarnaan AgNOR

Penghitungan skor AgNOR dilakukan dengan membedakan antara hepar yang normal dengan hepar yang terinsidensi tumor. Untuk menentukan aktivitas proliferasi sel tumor, maka dilakukan teknik pewarnaan perak (AgNOR) pada NOR. NOR (*Nuclear Organizer Region*) adalah pita DNA pada tangan pendek kromosom akrosentrik yang berhubungan dengan aktivitas gen ribosomal RNA, sintesis protein, dan proliferasi sel. Preparat AgNOR digunakan untuk mengamati tingkat proliferasi sel hepar baik yang terkena tumor ataupun normal.

Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data jumlah titik hitam terdistribusi normal. Parameter homogenitas yang digunakan adalah angka signifikansi yang didapatkan dari tes *homogeneity of variances* yaitu jika nilai signifikansinya lebih besar atau sama dengan 0,05 untuk taraf kepercayaan 95%. Dari hasil perhitungan statistik, didapatkan nilai signifikansi *homogeneity of variances test* sebesar 0,986 untuk hepar dan 0,478 untuk payudara. Karena data yang dianalisis terdistribusi normal, maka digunakan metode analisis mAgNOR statistik parametrik dengan uji One Way ANOVA.

Hasil analisis statistik *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Test Uji Tuckey HSD* taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa angka mAgNOR hepar antara kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan angka mAgNOR kelompok perlakuan kontrol negatif dan kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB; 400 mg/kgBB; dan 800 mg/kgBB. Hal ini menandakan aktivitas proliferasi yang paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan DMBA. Angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak 800 mg/kgBB tidak berbeda signifikan, artinya aktivitas proliferasi antara keempat kelompok tersebut mendekati sama. Sedangkan angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok ekstrak 200 dan 400 mg/kgBB berbeda signifikan yang memiliki arti ekstrak dengan kedua dosis ini mampu menurunkan tingkat proliferasi sel namun tidak dapat mengembalikan aktivitas proliferasi sel ke tingkat normalnya seperti kelompok ekstrak 800 mg/kgBB (Tabel 3).

Hasil analisis statistik *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Test Uji Tuckey HSD* taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa angka mAgNOR sel epitelial payudara antara kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan angka mAgNOR kelompok perlakuan kontrol negatif dan kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB; 400 mg/kgBB; dan 800 mg/kgBB. Hal ini menandakan aktivitas proliferasi yang paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan DMBA. Angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak 800 mg/kgBB tidak berbeda signifikan, artinya aktivitas proliferasi antara keempat kelompok tersebut mendekati sama. Sedangkan angka mAgNOR antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok ekstrak 200 dan 400 mg/kgBB berbeda signifikan yang memiliki arti ekstrak dengan kedua dosis ini mampu menurunkan tingkat proliferasi sel namun tidak dapat mengembalikan aktivitas proliferasi sel ke tingkat normalnya seperti kelompok ekstrak 800 mg/kgBB. Hasil analisis statistik pada organ hepar dan sel epitelial payudara memiliki tren aktivitas proliferasi yang sama (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Analisis mAgNOR Hepar dan Payudara menggunakan *Oneway Anova*

Kelompok Tikus	Rata-rata <i>blackdot</i> ± SD pada Organ Hepar	Rata-rata <i>blackdot</i> ± SD pada Sel Epitelial Payudara
Kontrol Negatif	1.195 ± 0.1393*	1.0880 ± 0.0533*
Kontrol Positif	2.484 ± 0.2509 <sup>a</sup>	2.1208 ± 0.1175 <sup>a</sup>
Ekstrak 200mg/kgBB	1.965 ± 0.1685 <sup>a</sup>	1.7256 ± 0.0450 <sup>a</sup>
Ekstrak 400mg/kgBB	1.838 ± 0.2194 <sup>a</sup>	1.5168 ± 0.0168 <sup>a</sup>
Ekstrak 800mg/kgBB	1.451 ± 0.1440*	1.1984 ± 0.0373*

Cat: \* ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif  
<sup>a</sup> ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negative

#### Penentuan Ekspresi Protein Proliferasi n-Ras pada sel Hepar dan Epitelial Payudara.

Salah satu cara untuk melihat aktivitas karsinogenesis adalah dengan melihat ekspresi protein proliferasi, salah satunya adalah protein nRas. Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data jumlah titik hitam terdistribusi normal. Parameter homogenitas yang digunakan adalah angka signifikansi yang didapatkan dari tes *homogeneity of variances* yaitu jika nilai signifikansinya lebih besar atau sama dengan 0,05 untuk taraf kepercayaan 95%. Dari hasil perhitungan statistik, didapatkan nilai signifikansi *homogeneity of variances test* sebesar 0,401 untuk hepar dan 0,178 untuk payudara. Karena data yang dianalisis terdistribusi normal, maka digunakan metode analisis mAgNOR statistik parametrik dengan uji *One Way ANOVA*

Hasil analisis statistik *Oneway ANOVA* menunjukkan DMBA mampu meningkatkan aktivitas proliferasi sel secara signifikan yaitu dengan membandingkan kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Ekstrak daun sirsak dapat

menurunkan tingkat proliferasi sel dengan tingkat kemampuan berdasarkan dosis. Ekstrak daun sirsak dengan dosis 800 mg/kgBB mampu menurunkan tingkat proliferasi secara bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Tren penekanan ekspresi protein proliferasi sama antara organ hepar dan sel epitelial payudara.

Tabel 4. Hasil Analisis Skor nRas pada Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara

Kelompok Tikus	Rata-rata skor $\pm$ SD organ Hepar	Rata-rata skor $\pm$ SD Sel Epitelial Payudara
Kontrol Negatif	0.0000 $\pm$ 0.0000*	0.0000 $\pm$ 0.0000*
Kontrol Positif	2.0000 $\pm$ 0.7906 <sup>a</sup>	2.2000 $\pm$ 0.5701 <sup>a</sup>
Ekstrak 200mg/kgBB	1.6400 $\pm$ 0.5683 <sup>a</sup>	1.9000 $\pm$ 0.5477 <sup>a</sup>
Ekstrak 400mg/kgBB	1.6200 $\pm$ 0.5675 <sup>a</sup>	1.4000 $\pm$ 0.5477 <sup>a</sup>
Ekstrak 800mg/kgBB	0.7000 $\pm$ 0.2739*	0.8000 $\pm$ 0.8367*

Cat: \* ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif

<sup>a</sup> ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negative

#### Penentuan Ekspresi Protein Apoptosis p53 pada sel Hepar dan Epitelial Payudara.

Salah satu cara untuk melihat penghambatan proses karsinogenesis adalah dengan melihat ekspresi protein apoptosis, salah satunya adalah protein p53. Secara statistik, data diuji homogenitasnya dengan uji Kolmogorov Smirnov dan menunjukkan bahwa data jumlah titik hitam terdistribusi normal. Parameter homogenitas yang digunakan adalah angka signifikansi yang didapatkan dari tes *homogeneity of variances* yaitu jika nilai signifikansinya lebih besar atau sama dengan 0,05 untuk taraf kepercayaan 95%. Dari hasil perhitungan statistik, didapatkan nilai signifikansi *homogeneity of variances test* sebesar 0,349 untuk hepar dan 0,038 untuk payudara. Karena data yang dianalisis terdistribusi normal, maka digunakan metode analisis mAgNOR statistik parametrik dengan uji *One Way* ANOVA. Hasil analisis statistik *One Way* ANOVA menunjukkan ekstrak mampu meningkatkan potensi apoptosis secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif pada organ hepar namun hanya mampu meningkatkan apoptosis secara signifikan pada ekstrak dosis 800mg/kgBB pada sel epitelial payudara.

Tabel 5. Hasil Analisis Skor p53 pada Organ Hepar dan Sel Epitelial Payudara

Kelompok Tikus	Rata-rata skor $\pm$ SD organ Hepar	Rata-rata skor $\pm$ SD Sel Epitelial Payudara
Kontrol Negatif	0.5000 $\pm$ 0.5000	0.5000 $\pm$ 0.5000
Kontrol Positif	0.5000 $\pm$ 0.3536	0.5000 $\pm$ 0.5000
Ekstrak 200mg/kgBB	2.1000 $\pm$ 0.4183* <sup>a</sup>	1.2000 $\pm$ 0.4472
Ekstrak 400mg/kgBB	1.8000 $\pm$ 0.8367* <sup>a</sup>	1.3000 $\pm$ 0.6708
Ekstrak 800mg/kgBB	2.2000 $\pm$ 0.9083* <sup>a</sup>	1.7000 $\pm$ 0.8367* <sup>a</sup>

Cat: \* ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol positif

<sup>a</sup> ada perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negatif

## Uji Komputasi

Tahap yang dilakukan untuk penelitian ini adalah preparasi ligand dan PKC, perhitungan RMSD, *docking*, dan visualisasi hasil *docking*. Pada tahap preparasi struktur ligand dilakukan minimalisasi energi dan penetapan lima (5) konformasi ligand yang memiliki energi konformasi terendah (Tabel 2). Hasil minimalisasi energi menunjukkan ligand *native* 07u memiliki konformasi yang lebih stabil dibandingkan Annomuricin E dan Muricapentocin.

Tabel 6. Konformasi Paling Stabil Hasil Minimalisasi Energi

Ligan	Energi Kelima Konformasi
07u	1. 60,88 kkal/mol 2. 60,98 kkal/mol 3. 61,09 kkal/mol 4. 62,11 kkal/mol 5. 62,21 kkal/mol
Annomuricin E	1. 93,73 kkal/mol 2. 93,94 kkal/mol 3. 94,02 kkal/mol 4. 94,90 kkal/mol 5. 95,47 kkal/mol
Muricapentocin	1. 93,04 kkal/mol 2. 93,84 kkal/mol 3. 94,04 kkal/mol 4. 94,97 kkal/mol 5. 95,24 kkal/mol

Tahap selanjutnya adalah validasi metode *docking* molekuler dengan menghitung nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Konformasi ligand *native* referens yang memberikan nilai  $PLANTS_{CHEMPLP}$  terbaik adalah konformasi 1 (lampiran 4). Nilai RMSD yang dihasilkan pada perhitungan ini sebesar 1,3906 Å yang berarti konformasi struktur ligand *native* referens dengan ligand *native* hasil *docking* mirip dan terpinil dengan baik seperti yang terlihat pada gambar 9. Ligand *native* referens berwarna *cyan* dan ligand *native* hasil *docking* berwarna merah.

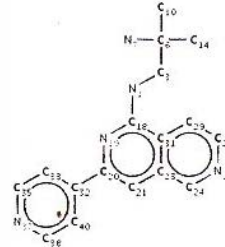


Gambar 10. Hasil Validasi Metode *Docking*

Tahap selanjutnya dilakukan *docking* molekuler terhadap senyawa Annomuricin E dan Muricapentocin. Hasil *docking* molekuler pada ketiga ligand (07u, Annomuricin E, dan Muricapentocin) menunjukkan bahwa ligand Annomuricin E memiliki skor paling rendah (Tabel 3). Hal ini menunjukkan ikatan Annomuricin E - PKC paling stabil dan Annomuricin E memiliki kemampuan penghambatan PKC yang paling baik. Adapun 5 ikatan hidrogen yang terbentuk pada ikatan Annomuricin E - PKC melibatkan 3 atom pada ligand yang memberikan kontribusi pada kestabilan ikatan tersebut. Sedangkan ligand 07u melibatkan 3 atom yang mampu menghasilkan 4 ikatan hidrogen dan ligand Muricapentocin melibatkan 4 atom yang mampu menghasilkan 5 ikatan hidrogen (Tabel 4 dan Gambar 9-11).

Tabel 7 Skor Hasil *Docking*

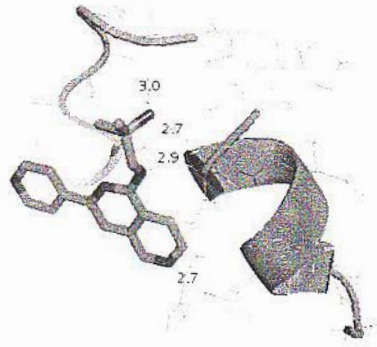
Ligan	Skor
07u	-71,161
Annomuricin E	-127,739
Muricapentocin	-116,87



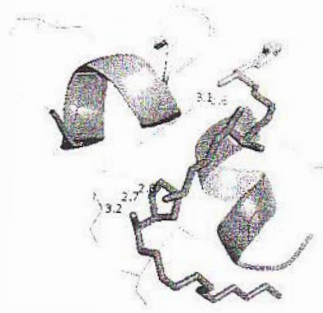
Gambar 11 struktur 07u (*naphthyridine*)

Tabel 8. Interaksi senyawa dengan PKC

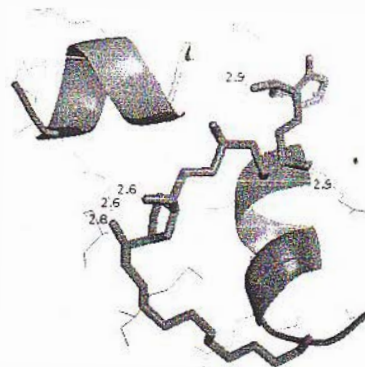
Senyawa	Jenis Ikatan	Residu yang Berperan pada Reseptor	Atom yang berperan pada Ligan	Jarak Ikatan	Keterangan		
07u	Hidrogen	Fenilalanin 612	N pada gugus 7-amina	3,0 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Histidin 606	N pada gugus 26-naftiridin	2,7 Å	Ligan sebagai akseptor hidrogen		
		Leusin 609	N pada gugus 3-amina	2,9 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Leusin 609	N pada gugus 7-amina	2,7 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
Annomuricin F	Hidrogen	Serin 465	O dari 13-hidroksi	3,2 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Asparagin 623	O dari 13-hidroksi	2,7 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Asparagin 623	O dari 18-hidroksi	2,8 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Triptofan 619	O dari 29-hidroksi	3,1 Å	Ligan sebagai akseptor hidrogen		
		Leusin 609	O dari 29-hidroksi	2,6 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
Muricapentocin	Hidrogen	Serin 465	O dari 13-hidroksi	2,8 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Asparagin 622	O dari 13-hidroksi	2,6 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Asparagin 622	O dari 18-hidroksi	2,6 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		
		Arginin 610	O dari 25-hidroksi	2,9 Å	Ligan sebagai akseptor hidrogen		
		Leusin 617	O dari 28-hidroksi	2,9 Å	Ligan sebagai donor hidrogen		



Gambar 12. Interaksi 07u-PKC



Gambar 13. Interaksi Annonuricin E- PKC



Gambar 14. Interaksi Muricapentocin-PKC

## PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Rendemen ekstrak yang didapat dalam penelitian ini sebesar 6,95% lebih kecil dibandingkan dengan referensi yang sebesar 19,3%.<sup>11</sup> Perbedaan hasil dapat disebabkan oleh metode ekstraksi yang digunakan dan lokasi tempat tumbuhnya pohon sirsak yang mempengaruhi besarnya kandungan senyawa aktif dalam ekstrak.

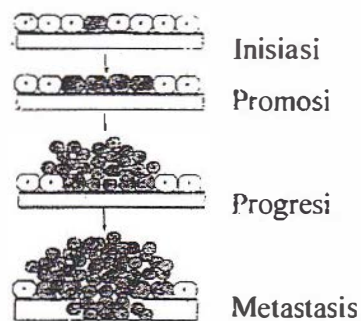
Nilai kadar abu baik kadar total dan kadar abu tidak larut asam menunjukkan bahwa ekstrak mengandung abu yang relatif sedikit. Kadar air dan susut pengeringan menunjukkan kadar air yang cukup tinggi (> 10%) yang menandakan massa ekstrak masih mengandung air yang cukup banyak. Pola kromatogram menunjukkan kandungan senyawa yang paling banyak terdapat dalam ekstrak adalah senyawa nonpolar. Kemungkinan senyawa nonpolar yang terlarut adalah senyawa acetogenin.

### Uji In Vivo

Hasil pengukuran GGT dari 5 ekor tikus dari masing-masing kelompok menunjukkan bahwa DMBA dapat memicu karsinogenesis. Aktivitas karsinogenik dari DMBA dan beberapa senyawa polisiklik hidrokarbon lainnya didasarkan pada kemampuannya dalam melakukan pengikatan terhadap molekul DNA. Proses tersebut akan menyebabkan mutasi somatik.<sup>32</sup> DMBA dapat berikatan dengan DNA pada kodon 12 dimana di dalam kodon tersebut terletak gen yang mengatur protein *ras* dan *p53*.<sup>33</sup> Dengan demikian adanya pemaparan dengan DMBA pada hewan uji akan mengakibatkan mutasi pada gen *ras* atau *p53*. Adanya kemampuan penghambatan karsinogenesis oleh ekstrak daun sirsak yang ditunjukkan pada uji GGT kemungkinan disebabkan adanya penghambatan protein proliferasi (n-Ras) dan protein apoptosis (p53) yang terlihat pada pengecatan histopatologi dan imunohistokimia. Walaupun dapat menghambat karsinogenesis, kemampuan ekstrak daun sirsak belum dapat mengimbangi kemampuan DMBA dalam menginduksi karsinogenesis. Hal ini terlihat pada nilai GGT yang berada jauh dari nilai normal (0-2 IU/l).<sup>34</sup> GGT sendiri merupakan enzim/biomarker yang spesifik dan sensitif dalam memantau karsinogenesis di hepar. Nilai GGT akan meningkat secara signifikan di hepatosit pada tahap prekanker dan karsinoma *hepatocellular*.<sup>35</sup> Namun, data

ini memiliki keterbatasan dalam jumlah hewan coba sehingga data ini belum dapat digunakan sebagai hasil uji *in vivo*.

Nodul yang tidak terlihat pada hasil eksperimen kemungkinan disebabkan masa menunggu yang kurang lama sehingga benjolan tumor belum terbentuk. Namun dengan hasil uji GGT yang menunjukkan proses karsinogenesis sudah berjalan maka kemungkinan tahap karsinogenesis baru mencapai tahap promosi (Gambar 15). Hasil pengecatan histopatologi dan imunohistokimia menunjukkan bahwa DMBA mampu menginisiasi pembentukan tumor dan ekstrak mampu menghambat karsinogenesis, baik sebagai antiproliferasi maupun proapoptosis dengan nilai hasil yang signifikan terlihat pada ekstrak dosis 800 mg/kgBB.



Gambar 15. Tahapan dalam karsinogenesis<sup>18</sup>

### Komputasi

Uji komputasi dilakukan untuk memprediksi kemungkinan mekanisme molekuler yang terjadi antara ligand-protein sehingga dapat berperan sebagai agen antikanker. Salah satu mekanisme molekuler antikanker adalah dengan menghambat aktivasi PKC yang berperan dalam proliferasi sel kanker.

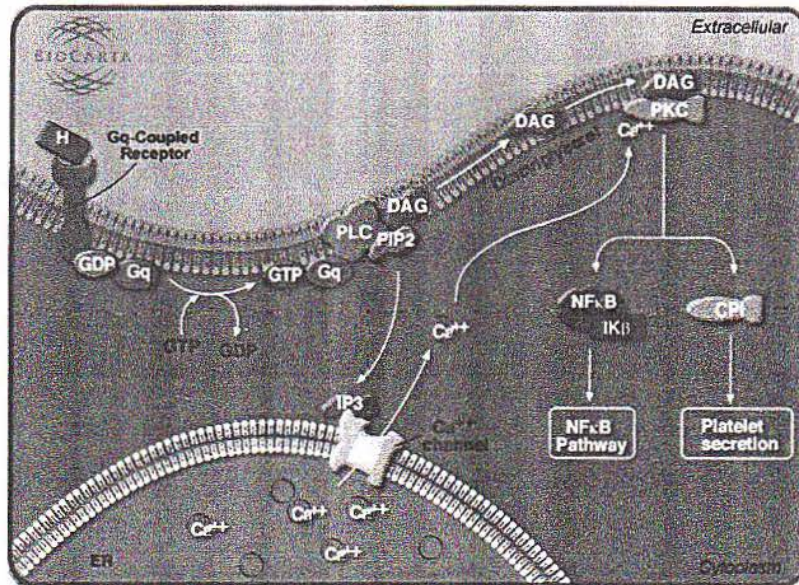
Penggunaan *software* PLANTS baru familiar digunakan selama dua tahun oleh praktisi kimia komputasi di Indonesia. Walaupun termasuk *software* baru, namun PLANTS mampu memberikan kesuksesan hasil yang lebih bagus dalam waktu yang lebih singkat.<sup>28</sup> Metode yang digunakan oleh peneliti telah tervalidasi oleh nilai RMSD yang kurang dari dua sehingga metode ini dapat digunakan untuk proses *docking*.<sup>27</sup> Nilai RMSD < 2Å

menunjukkan struktur yang referens memiliki energi paling rendah yang sangat mirip dengan struktur hasil *docking*.<sup>28</sup> Hal ini menunjukkan aplikasi *software* yang digunakan (MarvinSketch, YASARA, dan PLANTS 1.1) memiliki kapabilitas prediksi yang valid dalam kondisi ideal, tanpa terganggu variabel lain.

Docking molekuler dilakukan untuk memprediksi kemampuan *ligand* untuk berikatan dengan PKC dan memprediksi kekuatan ikatan yang terjadi antara *ligand*-PKC. Penghambatan molekul PKC oleh senyawa *acetogenin* akan menghasilkan respon biologis berupa efek penghambatan proliferasi (antiproliferasi) yang dapat diprediksi melalui skor yang didapatkan dari hasil *docking*. Skor merupakan parameter kekuatan afinitas pengikatan *ligand* terhadap reseptor. Semakin stabil interaksi *ligand*-protein dicerminkan dengan semakin rendahnya skor (minus). Kestabilan interaksi ini sebanding dengan potensi senyawa dalam memberikan efek yang sama dengan *ligand* referens (antiproliferasi) secara virtual.

Hasil minimalisasi energi menggunakan aplikasi MarvinSketch akan memberikan konformasi yang berbeda dengan jumlah yang diinginkan oleh peneliti. Konformasi ini akan memberikan posisi titik awal *docking* yang berbeda tergantung konformasinya. Titik awal ini akan memberikan hasil yang berbeda berdasarkan algoritma stokastik yang digunakan dalam PLANTS. Oleh karenanya, berdasarkan nilai stokastik dari PLANTS<sub>CHEMPLP</sub> dan untuk menghindari bias, digunakan lima konformasi untuk proses *docking*.<sup>28</sup>

Berdasarkan tabel 3, Annomuricin E memberikan skor *docking* yang paling rendah. Hal ini menunjukkan interaksi Annomuricin E-PKC memberikan afinitas ikatan paling baik walaupun melibatkan jumlah atom yang lebih sedikit dibandingkan kedua *ligand* lainnya. Selain itu, jumlah atom yang berperan dalam suatu ikatan dan energi konformasi *ligand* tidak berdampak terhadap kekuatan ikatan. Kemungkinan yang berperan dalam kekuatan ikatan adalah konformasi *ligand*. Hasil *docking* molekuler menunjukkan bahwa kedua senyawa *acetogenin* yang terkandung dalam daun sirsak berpotensi sebagai agen antiproliferasi yang dapat berperan sebagai antikanker. PKC yang merupakan salah satu dari regulator dalam siklus sel merupakan titik penting dalam proses proliferasi sel kanker melalui jalur NFKB (Gambar 16). Dengan demikian penghambatan aktivasi protein ini akan menghambat proliferasi sel kanker sehingga potensial sebagai agen antikanker.



Gambar 16. Jalur Aktivasi PKC<sup>36</sup>

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Ekstrak daun sirsak mampu menghambat proliferasi dan memicu apoptosis organ hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA.
2. Ekstrak daun sirsak mampu menurunkan ekspresi nRas organ hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA secara signifikan pada ekstrak dosis 800mg/kgBB dibandingkan dengan kontrol positif.
3. Ekstrak daun sirsak mampu meningkatkan ekspresi p53 organ hepar di semua dosis ekstrak dan sel epitelial payudara pada ekstrak dosis 800mg/kgBB dibandingkan dengan kontrol positif.
4. Ekstrak daun sirsak mampu menurunkan jumlah *black dot* sel hepar dan sel epitelial payudara tikus betina terinduksi DMBA dengan kemampuan hampir mendekati nilai normal pada ekstrak dosis 800mg/kgBB dibandingkan dengan kontrol positif.
5. Berdasarkan uji GGT, ekstrak daun sirsak mampu menghambat proliferasi pada sel hepar dibandingkan dengan kontrol positif. Namun data ini belum dapat digunakan sebagai data *in vivo* karena jumlah sampel tidak mencukupi.

6. Metode komputasi yang digunakan valid dengan nilai RMSD < 2 dengan hasil Annomuricin E memiliki afinitas paling baik dibandingkan senyawa referens dan Muricapentocin. Ikatan ligand-PKC yang berperan adalah ikatan hidrogen sebanyak 4-5 ikatan.

#### Saran

1. Untuk penelitian mendatang, sebaiknya menggunakan senyawa standar untuk menentukan kadar senyawa acetogenin dalam ekstrak etanolik daun sirsak.
2. Perlunya periode menunggu munculnya nodul kanker yang lebih lama
3. Perlunya uji komputasi terhadap protein lain yang berperan dalam mekanisme karsinogenesis.
4. Penelitian ini merupakan uji pendahuluan untuk penelitian selanjutnya dengan mempertimbangkan keterbatasan-keterbatasan penelitian ini.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Sekretariat Badan Litbangkes atas dana yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.
2. Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang memberikan izin untuk melakukan penelitian di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
3. Panitia Pembina Ilmiah Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan masukan dan arahan dalam pengajuan proposal penelitian.
4. Dra. Ani Isnawati, M.Kes selaku Kepala Laboratorium Farmasi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang memberikan izin untuk melakukan penelitian di laboratorium, mengarahkan, memberikan masukan dan mendampingi peneliti selama melakukan penelitian.
5. drh. Wien Winarno selaku Kepala Laboratorium Hewan Coba, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang memberikan izin untuk melakukan penelitian di laboratorium dan memberikan masukan selama penelitian in vivo berlangsung.
6. dr. Emiliana Tjitra, PhD selaku Pembina penelitian Risbinkes peneliti yang memberikan masukan dan arahan selama penelitian serta bimbingan dalam penulisan.
7. Dr. Hari Purnomo dan Muhammad Radifar,S. Farm atas diskusi mengenai proses *docking* molekuler.

8. Rekan-rekan di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Hewan Coba yang memberikan dukungan atas penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- 1 Yayasan Kanker Indonesia. 2012, *YKI-Jakarta Race*, diunduh dari <http://yayasankankerindonesia.org/2012/yki-jakarta-race/>.
- 2 Thuluvath PJ, Choti M, Geschwind JF, Norvitz L, dan Kalloo AN. *Liver Cancer*, 2006, dalam <http://gastro.nts.jhu.edu>.
- 3 Singletary K, MacDonald C, Tovinnelli M, Fisher C, dan Wallig M. Effect of the diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoilmethane on rat mammary DNA adduct and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Carcinogenesis* 1998; 9(6): 1039-1043.
- 4 Yaar, Mina, Eller, Mark S, Panova I, Kubera J, Wee, Lee H, Cowan, Kenneth H, dan Gilchrest BA. Telomeric DNA induces apoptosis and senescence of human carcinoma cells. *Breast Cancer Research* 2007;9:R13.
- 5 Gibbs JB. Anticancer Drug Targets: Growth Factor and Growth Factor Signaling. *Journal Clinical Investigation* 2000;105 (1): 9-13.
- 6 King RJB, *Cancer Biology*, 2nd Ed., London: Pearson Education Limited, 2000.
- 7 Walaszek Z, Hanausek M, dan Slaga TJ. Mechanisms of Chemoprevention, *Supplement American College of Physicians* 2004;125:128-133.
- 8 Khastgir HN, Sengupta SK, dan Sengupta P. Note on the constituents of the Indian medicinal plant *Oldenlandia corymbosa* Linn. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 1960;49:562-563.
- 9 Chang FR dan Wu YC. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Product* 2001;64:925-31.
- 10 Yuan SF, Chang H, Chen H, Yeh Y, Kao Y, Lin K, Wu Y, dan Su J, Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway, *Life Science* 2003;72(25):2853-2861.
- 11 Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu F, McLaughlin JL, dan Sastrodihardjo S, Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the Leaves of *Annona muricata*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy* 1998; 97(00534):S0163-3864.

- 
- 12 Chih H, Chiu HF, Tang KS, Chang FR, dan Wu YC. Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. *Life Science* 2001;69:1321-31.
  - 13 Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, dan Sugiyanto. Penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus terinduksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour), Merr. *Majalah Farmasi Indonesia* 2007;18(4): 169-175.
  - 14 Weinberg RA. How Cancer Arises. *Scientific American* 1996;275(3), 62-75.
  - 15 Hanahan D dan Weinberg RA. *The Hallmark of Cancer Cell*. 57-70, 2000.
  - 16 Soeripto. *Mekanisme Molekuler Karsinogenesis*, Yogyakarta: Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran UGM. 38-42, 1977.
  - 17 Pitot HC. The Molecular Biology of Carcinogenesis. *Cancer* 1993; (72) 962-970.
  - 18 Schneider KA. *Encyclopedia of Human Biology*. 2nd Edition, Vol. 2. London: Academic Press. 312-315, 1997.
  - 19 Murray RK, Granner DK, Mayes PA, dan Rodwell VW. Kanker, Onkogen, dan Faktor-Faktor Pertumbuhan, dalam *Biokimia Harper*, diterjemahkan oleh: Hartono, A., Edisi II, Penerbit EGC: Jakarta, 1990.
  - 20 Ruoslahti E. 1996. How Cancer Spread. *Scientific American* 1996; (9) 72-77.
  - 21 Shapiro GI, dan Harper JW. Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control. *Journal Clinical Investigation* 1999; 104 (12) : 1645-1653
  - 22 Minna JD, Roth JA, dan Gazdar AF. Focus on Lung Cancer. *Cancer Cell* 2002; 1(1): 49-52.
  - 23 Mackay HJ dan Twelves CJ. Protein Kinase C : a target for anticancer drugs? *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10: 389-396.
  - 24 Kopp E dan Ghosh S. NF- $\kappa$ B and Cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 52(3): 617-624.
  - 25 Korb O, Stützle T, dan Exner TE.. *PLANTS: Protein-Ligand ANT System*. 20th Molecular Modelling Workshop (Online). Erlangen : Computer-Chemie-Centrum, 2006.
  - 26 Oprea T dan Matter H. Integrating Virtual Screening in Lead Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004; 8 : 349-358.

- 
- 27 Marcou G dan Rognan D. Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007; 47(1): 195-207.
- 28 Prasajo SL, Hartanto FA, Yuniarti N, Ikawati Z, dan Istyastono EP. Docking of 1-Phenylsulfonamide-3-Trifluoromethyl-5-parabromophenyl-pyrazole to Cyclooxygenase-2 Using PLANTS. *Indonesian Journal of Chemistry* 2010; 10(3):348-351.
- 29 Chemcomp. *Molecular Modeling and Simulations* (online). 2011, diunduh dari [www.chemcomp.com/software-mol.htm](http://www.chemcomp.com/software-mol.htm).
- 30 Pratiwi D, Hastuti N, Armandari J, Widyastuti N, Ikawati M, Riyanto S, dan Meiyanto E. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) meningkatkan Ekspresi p53 Pada Sel Payudara Tikus Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenzen[a]antrasena. *Proceeding Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia* 2008, ISBN : 978-979-95108-6-0, ISFI, pp. 100 – 106.
- 31 Nugroho PA, Putri DAK, Darna AP, Riyanto S, dan Meiyanto E. Penelusuran Mekanisme Penekanan Ekspresi N-Ras Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) Sebagai Agen Kemopreventif Docking Molekuler pada Protein Target C-SRC dan CYP1A2. *Proceeding Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia* 2008, ISBN: 978-979-95108-6-0, ISFI, pp. 184 – 192.
- 32 Brookes P dan Lawley PD. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 1964; 202:781-84.
- 33 Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, dan Smith J. Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 1984; 307:658-660.
- 34 Weber DK, Danielson K, Wright S, dan Foley JE. Hematology and Serum Biochemistry Values of Dusky-Footed Rat (*Neotoma fuscipes*). *Journal of Wildlife Disease* 2002; 38(3) : 576-582.
- 35 Jian W, Nianyue W, Zhiqiang C, Yinwei W, Wei Z, dan Zheng F. A Simple and Specific Method for Detection of Hepatoma Specific GGT by Affinity Chromatography. *Science* 2007; 38(3) : 160-164.
- 36 Biocarta. Activation of PKC through G protein coupled receptor, 2012, diunduh dari [http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h\\_pkcPathway](http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_pkcPathway)

## Lampiran 1

### DAFTAR ISTILAH

- Proliferasi sel : Pertumbuhan sel.
- Apoptosis : Kematian sel terprogram.
- Protein n-Ras : Golongan kelompok protein yang memicu proliferasi sel.
- Protein p53 : Golongan kelompok protein yang memicu apoptosis.
- DMBA : 7,12- Dimetil Benz[*a*]antrazena. Zat karsinogenik penginduksi tumor.
- Black dot : Titik hitam hasil pewarnaan histopatologi AgNOR yang merupakan inti sel.
- Protein kinase C : Protein yang ikut berperan dalam proses proliferasi sel.
- HE : Haematoksillin Eosin. Jenis pewarnaan histopatologi untuk melihat gambaran sel.
- AgNOR : *Argyrophilic Nucleolar Organizer*. Jenis pewarnaan histopatologi.



## **PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)**

Nomor : KE.01.03 / EC / 151 / 2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

***"Modulasi Ekspresi Protein Antiproliferasi dan Proapoptosis Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata L.) Terhadap Tikus Terinduksi 7,12-Dimetil Benz[ $\alpha$ ]Antrazena (DMBA)"***

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

**Rosa Adelfina, S.Farm., Apt.**

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 26 Maret 2012

Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Badan Litbang Kesehatan,

  
Prof. Dr. M. Sudomo

*(Circular official stamp of the Ministry of Health, Litbang Kesehatan, and Komisi Etik Penelitian Kesehatan is partially visible behind the signature.)*



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**( Indonesian Institute of Sciences )**  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
**( Research Center for Biology )**

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 31 Mei 2012

Nomor : 942./IPH.1.02/If.8/V/2012  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(i). Rosa Adelina, S.Farm., Apt.  
Kementerian Kesehatan RI  
Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan  
Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan  
Jalan Percetakan Negara No.23  
Jakarta - 10560

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Sirsak	<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijoe Rahajoe  
NIP. 19670624 1993032004

**Analysis Report**

Method	C:\CAMAG\winCATS\Data\LITBANG\etil asetat 254 260712.cme	
Created by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 11:49:33 AM
Last modified by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 12:04:10 PM
SOP document		
Validated	Design	
Description :		
Analysis	F:\litbang 260712\etil asetat 254 260712.cna	
Created/used by	litbang	Monday, 30 July 2012 12:51:35 PM
Current user	litbang	

**Detection - CAMAG TLC Scanner****Information**

Application position	20.0 mm
Solvent front position	100.0 mm

**Instrument**

Executed by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 12:07:49 PM
Number of tracks	10	
Position of first track X	10.0 mm	
Distance between tracks	20.0 mm	
Scan start pos. Y	20.0 mm	
Scan end pos. Y	170.0 mm	
Slit dimensions	5.00 x 0.30 mm, Micro	
Optimize optical system	Light	
Scanning speed:	20 mm/s	
Data resolution:	100 µm/step	

**Measurement Table**

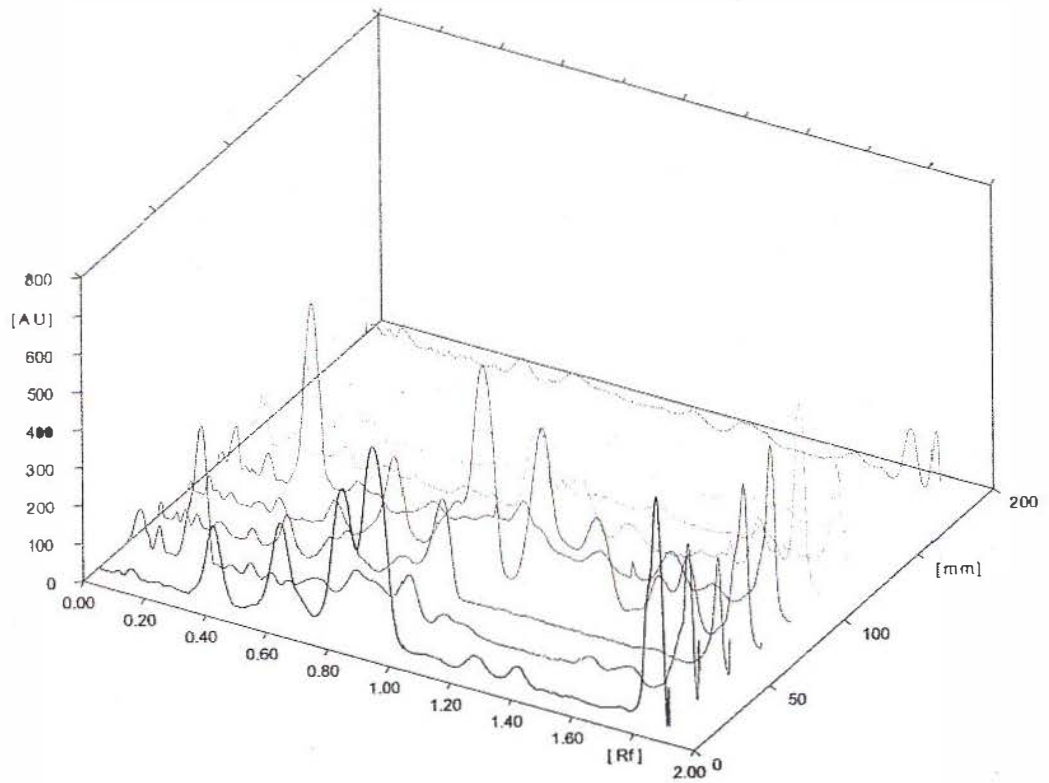
Wavelength	254
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	256 V

**Integration****Properties**

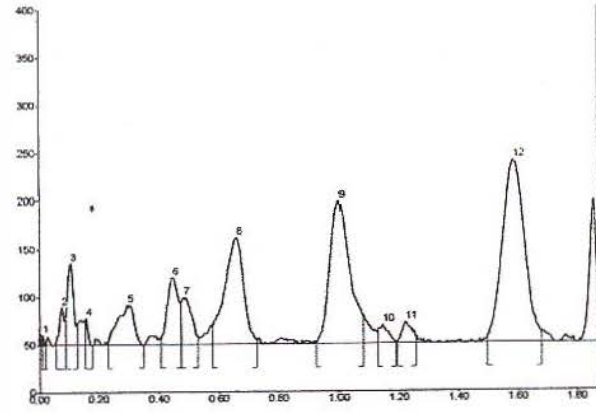
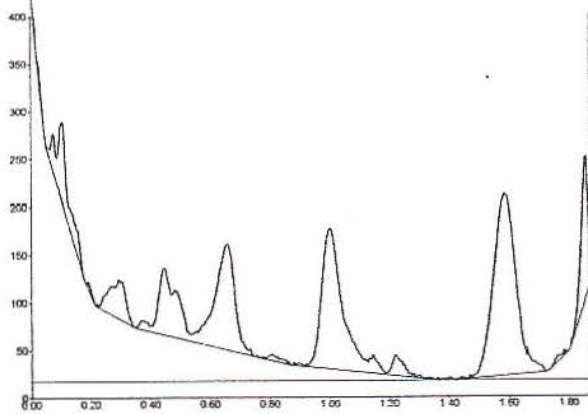
Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	20.0 mm
Track end position	170.0 mm
Display scaling	Automatic

# winCATS Planar Chromatography Manager

All tracks at WavelengthSc4



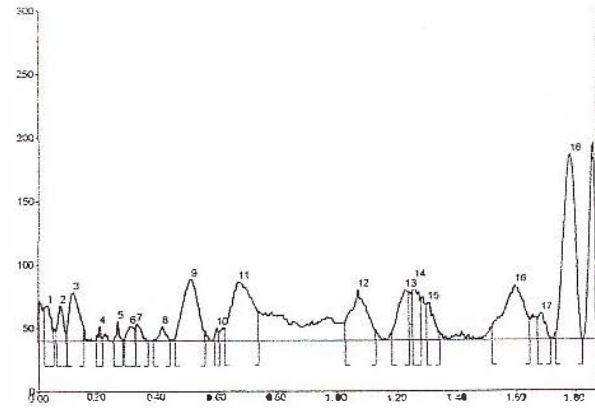
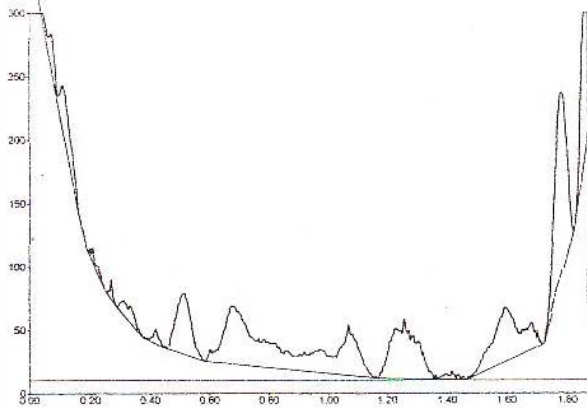
Track 9, ID: ekstrak sirsak1



winCATS Planar Chromatography Manager

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0.01	3.9	0.01	10.9	1.33	0.02	0.1	63.3	0.16	unknown *
2	0.05	6.3	0.08	30.4	4.81	0.09	25.3	542.4	1.41	unknown *
3	0.09	25.8	0.11	85.5	10.45	0.13	19.6	1735.9	4.51	unknown *
4	0.15	25.2	0.16	28.1	3.44	0.18	0.0	308.2	0.80	unknown *
5	0.23	2.0	0.30	41.7	5.10	0.35	0.0	2108.6	5.48	unknown *
6	0.41	6.4	0.45	70.4	8.60	0.47	43.8	2335.6	6.07	unknown *
7	0.47	43.9	0.48	50.0	6.11	0.53	8.9	1592.1	4.14	unknown *
8	0.58	19.7	0.66	112.3	13.71	0.73	5.5	6599.5	17.14	unknown *
9	0.93	2.0	1.00	148.3	18.11	1.08	30.5	8788.9	22.83	unknown *
10	1.13	11.2	1.15	19.6	2.40	1.19	2.1	571.6	1.48	unknown *
11	1.20	2.0	1.22	22.2	2.72	1.26	7.7	681.2	1.77	unknown *
12	1.50	4.2	1.59	190.2	23.23	1.68	12.1	13173.0	34.22	unknown *

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.02	26.2	0.03	28.3	4.46	0.05	7.7	595.0	2.69	unknown *
2	0.06	8.6	0.08	28.3	4.45	0.09	6.3	503.8	2.28	unknown *
3	0.09	6.3	0.12	38.7	6.09	0.15	12.5	1175.8	5.32	unknown *
4	0.19	0.1	0.21	12.0	1.88	0.22	2.6	95.1	0.43	unknown *
5	0.25	0.2	0.27	15.7	2.47	0.28	1.9	129.1	0.58	unknown *
6	0.29	0.1	0.31	12.0	1.88	0.33	8.6	245.1	1.11	unknown *
7	0.33	8.8	0.33	14.1	2.22	0.37	0.5	246.9	1.12	unknown *
8	0.38	0.1	0.42	11.7	1.84	0.44	0.2	213.6	0.97	unknown *
9	0.46	2.2	0.52	48.7	7.66	0.56	7.6	2243.7	10.16	unknown *
10	0.59	2.2	0.60	10.5	1.65	0.61	6.9	99.0	0.45	unknown *
11	0.63	9.8	0.67	46.7	7.35	0.74	23.0	3008.3	13.62	unknown *
12	1.03	13.6	1.07	40.3	6.35	1.13	8.3	1933.2	8.75	unknown *
13	1.18	4.6	1.23	40.1	6.30	1.24	37.4	1283.6	5.81	unknown *
14	1.25	35.9	1.26	47.5	7.48	1.28	30.5	927.5	4.20	unknown *
15	1.30	27.9	1.30	30.2	4.75	1.34	5.5	671.5	3.04	unknown *
16	1.52	9.5	1.60	43.4	6.84	1.64	16.5	2734.0	12.37	unknown *
17	1.67	16.6	1.68	21.3	3.35	1.72	1.3	478.9	2.17	unknown *
18	1.73	5.3	1.78	146.1	22.99	1.83	0.0	5508.9	24.93	unknown *

**Analysis Report**

---

Method	C:\CAMAG\winCATS\Data\LITBANG\etil_asetat_366_260712.cme	
Created by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 11:49:33 AM
Last modified by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 12:09:23 PM
SOP document		
Validated	Design	
Description :		
Analysis	F:\litbang_260712\etil_asetat_366_260712.cna	
Created/used by	litbang	Monday, 30 July 2012 12:52:26 PM
Current user	litbang	

**Detection - CAMAG TLC Scanner****Information**

Application position	20.0 mm
Solvent front position	100.0 mm

**Instrument**

Executed by	litbang	Monday, 30 July 2012 12:52:16 PM
Number of tracks	10	
Position of first track X	10.0 mm	
Distance between tracks	20.0 mm	
Scan start pos. Y	20.0 mm	
Scan end pos. Y	170.0 mm	
Slit dimensions	5.00 x 0.30 mm, Micro	
Optimize optical system	Light	
Scanning speed:	20 mm/s	
Data resolution:	100 µm/step	

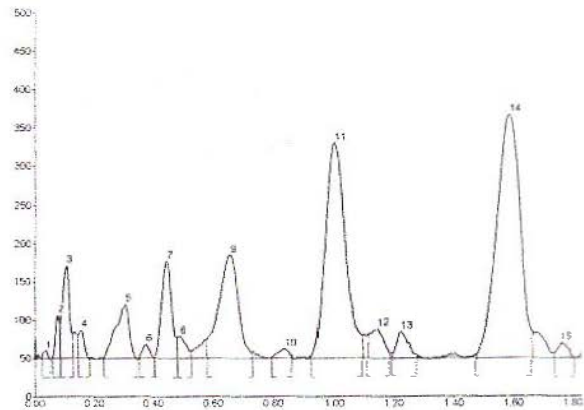
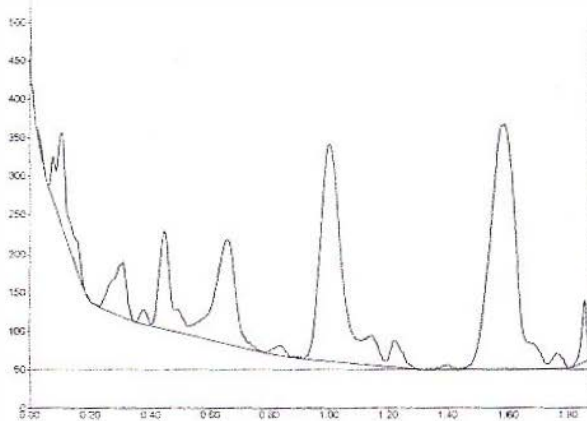
**Measurement Table**

Wavelength	366
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	307 V

**Integration****Properties**

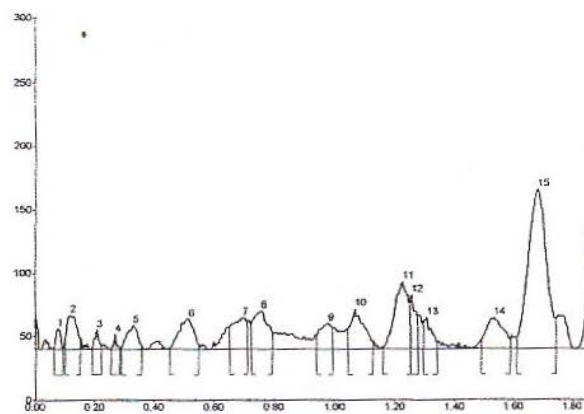
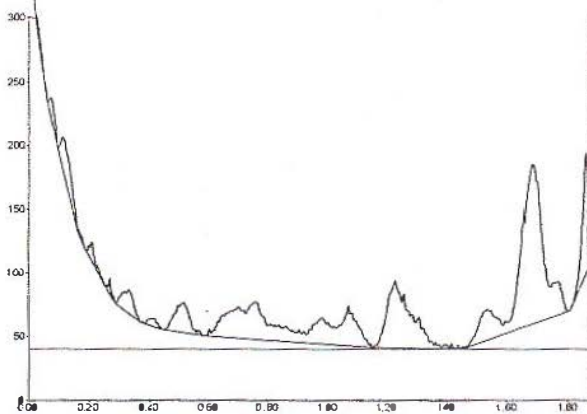
Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	20.0 mm
Track end position	170.0 mm
Display scaling	Automatic

Track 9, ID: ekstrak sirsak1



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.02	0.4	0.04	11.1	0.84	0.05	0.3	154.4	0.24	unknown *
2	0.06	0.2	0.08	57.2	4.33	0.09	47.6	710.8	1.08	unknown *
3	0.09	48.0	0.11	121.9	9.22	0.13	32.8	2681.6	4.09	unknown *
4	0.15	31.6	0.16	38.2	2.89	0.18	1.1	715.0	1.09	unknown *
5	0.23	0.1	0.31	71.4	5.40	0.34	0.2	3079.5	4.70	unknown *
6	0.35	0.8	0.38	19.4	1.46	0.40	2.0	433.5	0.66	unknown *
7	0.40	2.1	0.45	127.8	9.66	0.48	28.1	3996.5	6.09	unknown *
8	0.48	28.2	0.49	29.8	2.25	0.52	10.2	819.3	1.25	unknown *
9	0.58	25.2	0.66	136.1	10.29	0.73	7.7	8221.0	12.54	unknown *
10	0.79	1.6	0.84	13.4	1.01	0.86	5.0	451.4	0.69	unknown *
11	0.93	3.9	1.00	281.9	21.31	1.10	31.4	17625.8	26.88	unknown *
12	1.12	31.5	1.15	39.2	2.96	1.19	8.1	1656.4	2.53	unknown *
13	1.20	7.1	1.22	35.4	2.68	1.28	4.6	1303.2	1.99	unknown *
14	1.48	5.4	1.59	319.2	24.13	1.67	35.2	23077.3	35.19	unknown *
15	1.74	6.6	1.76	20.5	1.55	1.80	0.0	656.0	1.00	unknown *

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



winCATS Planar Chromatography Manager

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.06	0.0	0.08	16.6	3.34	0.09	1.0	240.1	1.22	unknown *
2	0.10	6.6	0.12	27.4	5.52	0.15	9.0	849.3	4.31	unknown *
3	0.19	0.9	0.21	15.4	3.11	0.22	2.5	192.6	0.98	unknown *
4	0.25	0.0	0.27	12.0	2.42	0.28	2.5	101.8	0.52	unknown *
5	0.29	0.1	0.33	18.9	3.81	0.36	3.4	621.0	3.15	unknown *
6	0.45	0.4	0.52	24.1	4.86	0.55	4.2	1079.5	5.48	unknown *
7	0.65	17.2	0.70	25.3	5.09	0.71	22.5	1073.6	5.45	unknown *
8	0.73	20.3	0.76	30.6	6.17	0.80	13.8	1346.7	6.84	unknown *
9	0.94	10.6	0.98	20.6	4.14	1.00	16.4	759.5	3.86	unknown *
10	1.04	15.6	1.07	32.3	6.50	1.13	6.3	1332.0	6.76	unknown *
11	1.16	1.9	1.23	53.5	10.76	1.25	36.7	2229.5	11.32	unknown *
12	1.25	37.6	1.26	43.2	8.70	1.28	25.7	704.3	3.58	unknown *
13	1.30	20.9	1.31	25.4	5.12	1.34	5.1	601.8	3.06	unknown *
14	1.49	6.7	1.54	25.2	5.07	1.59	7.2	1349.2	6.85	unknown *
15	1.61	9.1	1.68	126.1	25.40	1.75	24.2	7215.3	36.63	unknown *

**Analysis Report**

Method C:\CAMAG\winCATS\Data\LITBANG\etanol 254 260712.cme  
 Created by bblk jakarta Thursday, 26 July 2012 11:49:33 AM  
 Last modified by bblk jakarta Thursday, 26 July 2012 12:14:22 PM  
 SOP document  
 Validated Design  
 Description :

Analysis F:\litbang 260712\etanol 254 260712.cna  
 Created/used by litbang Monday, 30 July 2012 12:49:05 PM  
 Current user litbang

**Detection - CAMAG TLC Scanner**

**Information**

Application position 20.0mm  
 Solvent front position 100.0 mm

**Instrument**

CAMAG TLC Scanner "Scanner\_180713" SN 180713 (2.01.02)  
 Executed by bblk jakarta Thursday, 26 July 2012 12:17:29 PM  
 Number of tracks 10  
 Position of first track X 10.0 mm  
 Distance between tracks 20.0 mm  
 Scan start pos. Y 20.0mm  
 Scan end pos. Y 170.0 mm  
 Slit dimensions 5.00 x 0.30 mm, Micro  
 Optimize optical system Light  
 Scanning speed: 20 mm/s  
 Data resolution: 100 µm/step

**Measurement Table**

Wavelength 254  
 Lamp D2 & W  
 Measurement Type Remission  
 Measurement Mode Absorption  
 Optical filter Second order  
 Detector mode Automatic  
 PM high voltage 256 V

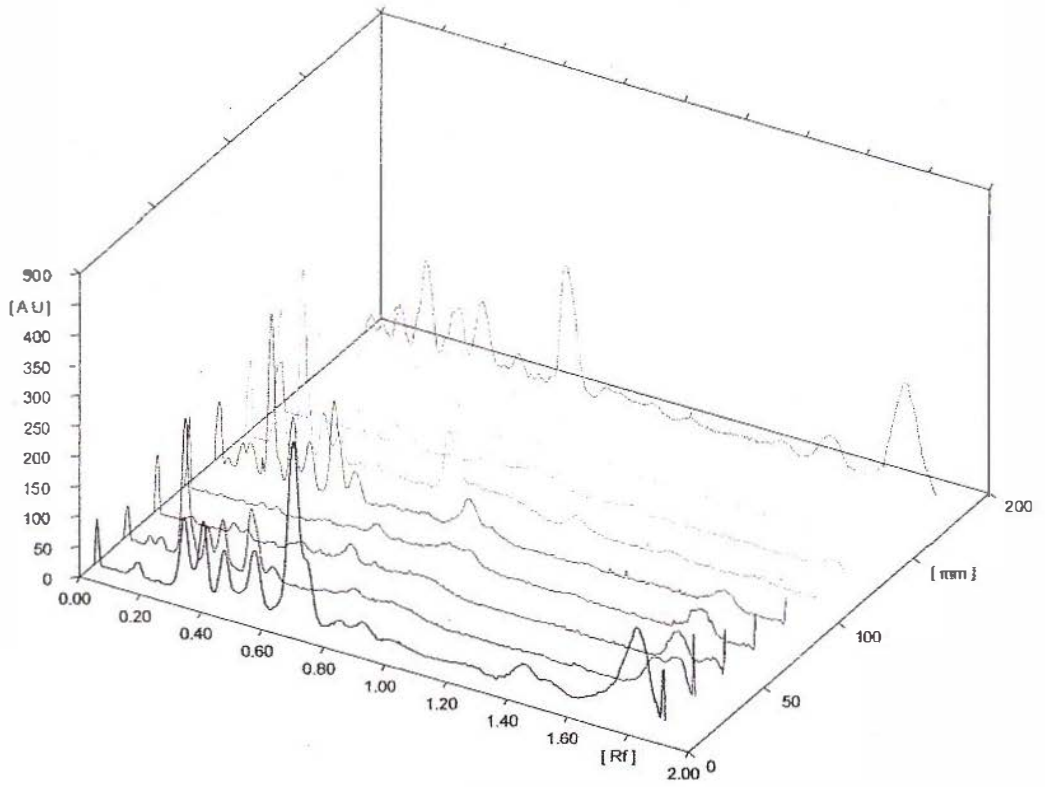
**Integration**

**Properties**

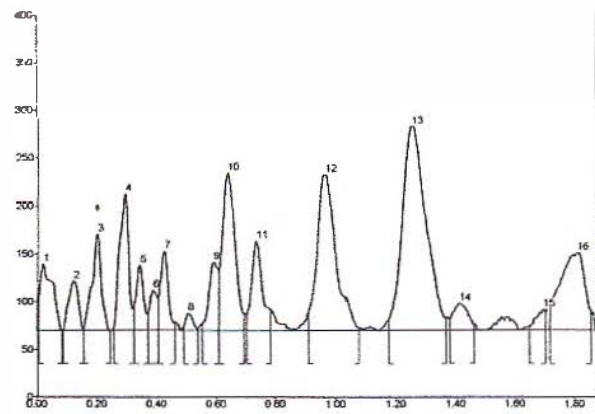
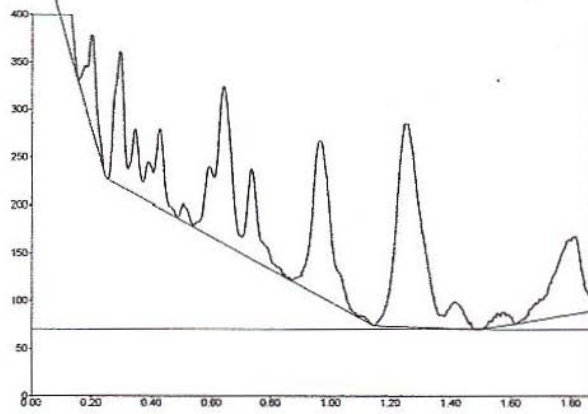
Data filtering Savitsky-Golay 7  
 Baseline correction Lowest Slope  
 Peak threshold min. slope 5  
 Peak threshold min. height 10 AU  
 Peak threshold min. area 50  
 Peak threshold max. height 990AU  
 Track start position 20.0 mm  
 Track end position 170.0 mm  
 Display scaling Automatic

winCATS Planar Chromatography Manager

All tracks at WavelengthSc4



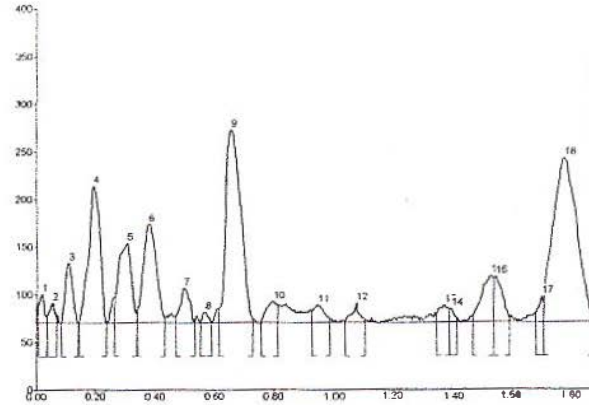
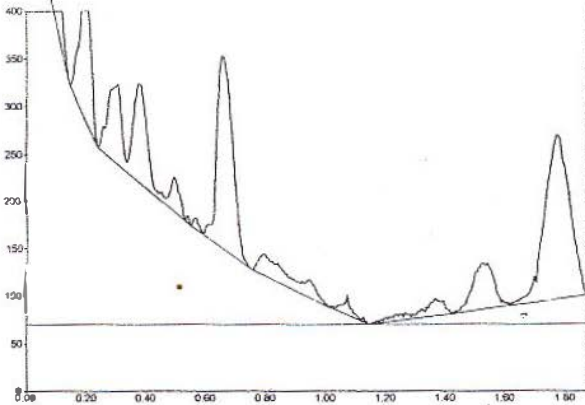
Track 9, ID: ekstrak sirsak1



winCATS Planar Chromatography Manager

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	21.6	0.02	69.8	4.93	0.08	0.4	2686.9	4.40	unknown *
2	0.09	0.0	0.12	52.0	3.68	0.16	1.8	1580.1	2.58	unknown *
3	0.16	2.1	0.20	101.0	7.14	0.24	0.2	2862.3	4.68	unknown *
4	0.25	0.1	0.30	142.0	10.04	0.32	22.7	3984.8	6.52	unknown *
5	0.32	23.3	0.34	68.4	4.84	0.37	17.2	1590.9	2.60	unknown *
6	0.37	17.4	0.39	42.0	2.97	0.40	33.3	933.8	1.53	unknown *
7	0.41	33.4	0.43	83.5	5.90	0.46	8.2	2057.3	3.37	unknown *
8	0.49	3.8	0.51	18.5	1.31	0.54	2.1	427.7	0.70	unknown *
9	0.55	7.2	0.59	71.7	5.07	0.61	63.2	1957.6	3.20	unknown *
10	0.61	63.3	0.64	164.3	11.61	0.69	17.6	6704.5	10.97	unknown *
11	0.70	17.3	0.74	93.8	6.63	0.78	22.2	3167.7	5.18	unknown *
12	0.91	17.5	0.97	162.6	11.49	1.08	3.1	9323.8	15.25	unknown *
13	1.17	10.8	1.25	213.0	15.05	1.37	13.3	15613.5	25.54	unknown *
14	1.38	12.1	1.41	28.5	2.02	1.46	5.8	1335.5	2.18	unknown *
15	1.65	3.7	1.70	22.2	1.57	1.70	21.1	632.1	1.03	unknown *
16	1.72	23.6	1.81	81.4	5.75	1.86	21.7	6275.7	10.27	unknown *

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.01	19.7	0.02	31.1	2.84	0.04	6.9	481.1	1.08	unknown *
2	0.04	7.1	0.05	21.6	1.97	0.07	5.7	367.9	0.83	unknown *
3	0.09	0.3	0.11	63.5	5.80	0.14	0.2	1435.6	3.23	unknown *
4	0.15	0.1	0.20	144.7	13.21	0.24	0.4	5093.0	11.45	unknown *
5	0.26	26.6	0.31	84.2	7.69	0.34	10.2	3323.6	7.47	unknown *
6	0.34	11.0	0.38	103.7	9.47	0.43	6.1	4262.9	9.59	unknown *
7	0.47	7.3	0.50	37.1	3.39	0.53	1.0	1066.2	2.40	unknown *
8	0.55	0.3	0.57	11.7	1.07	0.59	1.6	197.9	0.45	unknown *
9	0.62	15.3	0.66	203.2	18.55	0.73	4.4	9475.1	21.31	unknown *
10	0.76	0.4	0.80	22.7	2.08	0.81	18.1	716.2	1.61	unknown *
11	0.93	12.2	0.95	19.2	1.75	0.99	4.7	637.6	1.43	unknown *
12	1.04	2.5	1.07	21.3	1.95	1.10	4.0	480.2	1.08	unknown *
13	1.34	9.3	1.37	18.7	1.71	1.39	13.9	524.2	1.18	unknown *
14	1.39	14.1	1.39	14.9	1.36	1.41	5.0	209.5	0.47	unknown *
15	1.47	7.5	1.53	49.1	4.48	1.54	46.6	1819.5	4.09	unknown *
16	1.54	46.7	1.54	48.2	4.40	1.59	4.4	1322.7	2.97	unknown *
17	1.68	10.1	1.70	27.6	2.52	1.71	20.1	391.9	0.88	unknown *
18	1.71	22.2	1.78	172.8	15.78	1.87	0.6	12668.0	28.48	unknown *

**Analysis Report**

Method	C:\CAMAG\winCATS\Data\LITBANG\etanol 366 260712.cme	
Created by	bbk jakarta	Thursday, 26 July 2012 11:49:33 AM
Last modified by	bbk jakarta	Thursday, 26 July 2012 12:18:54 PM
SOP document		
Validated	Design	
Description :		
Analysis	F:\litbang 260712\etanol 366 260712.cna	
Created/used by	litbang	Monday, 30 July 2012 12:49:38 PM
Current user	litbang	

**Detection - CAMAG TLC Scanner****Information**

Application position	20.0 mm
Solvent front position	100.0 mm

**Instrument**

Executed by	CAMAG TLC Scanner"Scanner_180713" S/N 180713 (2.01.02)	
Number of tracks	litbang	Monday, 30 July 2012 10:53:26 AM
Position of first track X	10	
Distance between tracks	10.0 mm	
Scan start pos. Y	20.0 mm	
Scan end pos. Y	170.0 mm	
Slit dimensions	5.00 x 0.30 mm, Micro	
Optimize optical system	Light	
Scanning speed:	20 mm/s	
Data resolution:	100 µm/step	

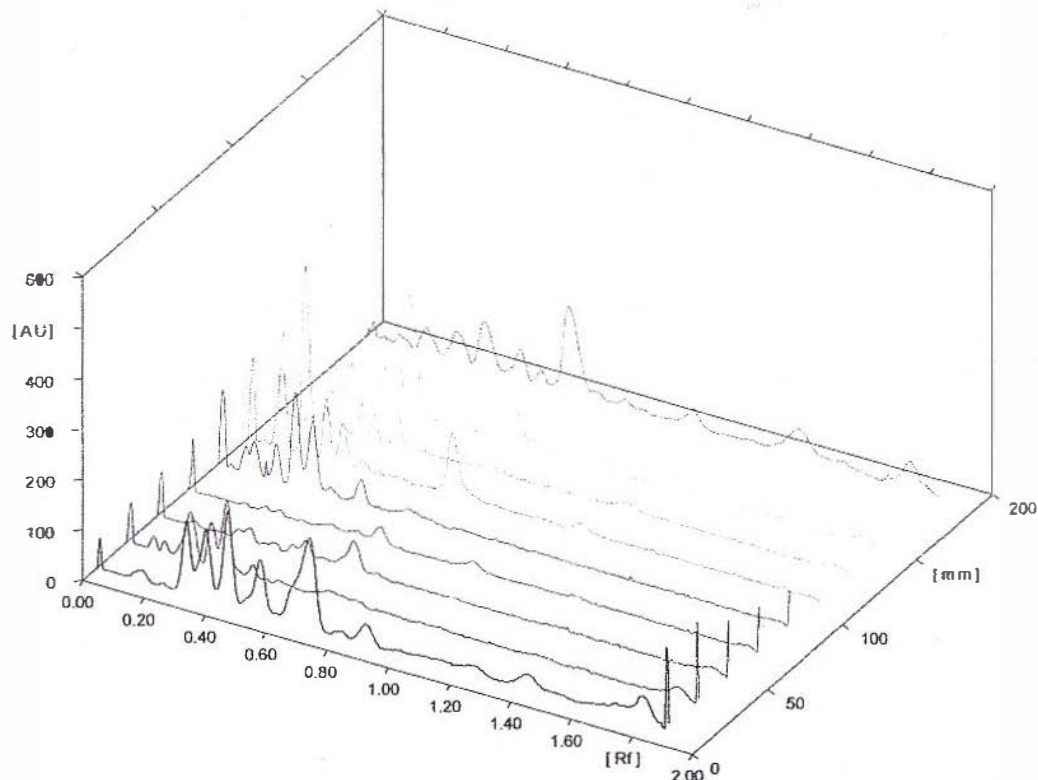
**Measurement Table**

Wavelength	366
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	307 V

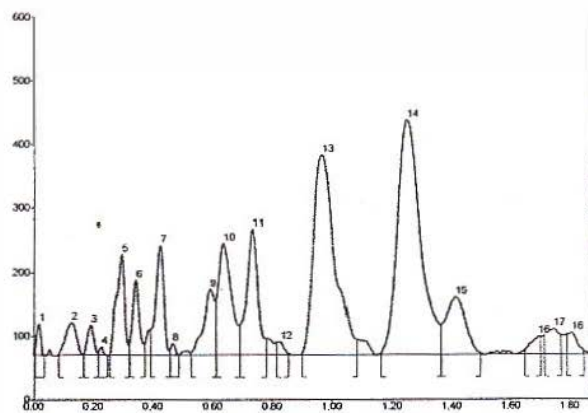
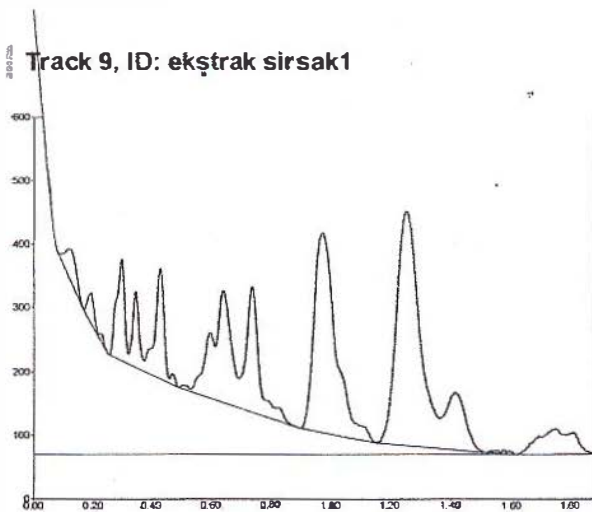
**Integration****Properties**

Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	20.0 mm
Track end position	170.0 mm
Display scaling	Automatic

All tracks at WavelengthSc4



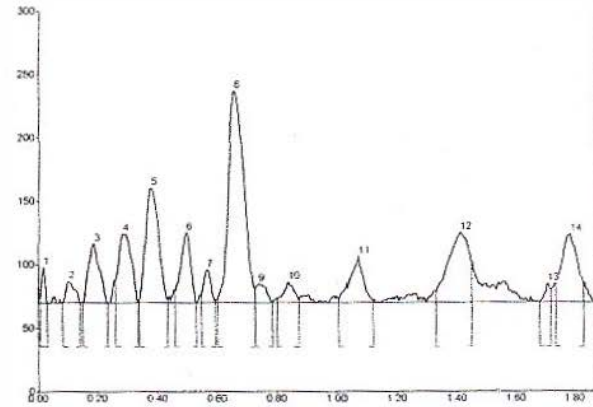
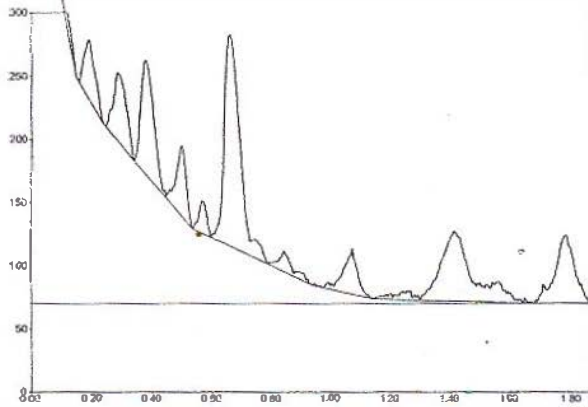
Track 9, ID: ekstrak sirsak1



winCATS Planar Chromatography Manager

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	2.6	0.02	49.7	2.48	0.03	0.6	657.9	0.74	unknown *
2	0.08	0.1	0.13	51.9	2.59	0.17	0.1	1775.7	1.99	unknown *
3	0.17	0.3	0.19	47.5	2.37	0.22	3.4	930.8	1.04	unknown *
4	0.22	3.4	0.23	13.8	0.69	0.25	0.1	162.5	0.18	unknown *
5	0.25	0.0	0.30	158.8	7.92	0.32	15.8	4025.7	4.52	unknown *
6	0.32	16.0	0.34	118.0	5.89	0.37	16.7	2443.6	2.74	unknown *
7	0.39	39.8	0.43	172.5	8.60	0.46	6.8	4431.6	4.97	unknown *
8	0.46	7.0	0.47	18.2	0.91	0.49	0.2	250.9	0.28	unknown *
9	0.53	3.3	0.59	103.3	5.15	0.61	84.6	3581.6	4.02	unknown *
10	0.61	84.6	0.64	175.6	8.76	0.69	46.1	7203.3	8.08	unknown *
11	0.69	46.4	0.74	197.4	9.84	0.78	26.2	7030.2	7.89	unknown *
12	0.81	19.0	0.83	21.2	1.06	0.86	2.9	512.0	0.57	unknown *
13	0.90	0.9	0.97	313.4	15.63	1.08	24.3	20451.7	22.95	unknown *
14	1.16	2.9	1.25	368.0	18.35	1.36	46.9	26459.7	29.69	unknown *
5	1.37	47.1	1.41	91.2	4.55	1.50	3.3	5619.6	6.30	unknown *
6	1.65	6.4	1.70	29.0	1.45	1.70	27.5	851.2	0.96	unknown *
17	1.72	30.5	1.75	40.7	2.03	1.77	31.0	1645.6	1.85	unknown *
18	1.79	31.3	1.81	35.0	1.75	1.85	5.6	1096.2	1.23	unknown *

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.01	3.3	0.02	28.0	4.13	0.03	0.4	290.3	1.07	unknown *
2	0.08	0.2	0.10	17.2	2.54	0.14	0.5	476.9	1.76	unknown *
3	0.15	0.2	0.19	46.7	6.89	0.23	0.2	1564.2	5.77	unknown *
4	0.26	18.5	0.28	54.9	8.09	0.34	0.6	2137.6	7.89	unknown *
5	0.34	1.4	0.38	90.8	13.38	0.44	2.8	3587.3	13.24	unknown *
6	0.46	9.3	0.50	55.6	8.20	0.53	0.4	1681.3	6.21	unknown *
7	0.55	6.7	0.57	26.2	3.86	0.60	1.3	598.7	2.21	unknown *
8	0.60	3.3	0.66	167.2	24.64	0.73	11.2	7903.4	29.18	unknown *
9	0.73	11.6	0.74	14.7	2.17	0.79	0.9	482.1	1.78	unknown *
10	0.80	3.5	0.84	16.6	2.44	0.88	2.4	518.1	1.91	unknown *
11	1.01	2.9	1.07	36.4	5.37	1.12	2.3	1456.5	5.38	unknown *
12	1.33	8.9	1.41	55.4	8.17	1.45	31.7	3534.5	13.05	unknown *
13	1.68	0.1	1.71	14.8	2.18	1.72	10.2	229.7	0.85	unknown *
14	1.74	15.1	1.79	53.9	7.95	1.83	13.7	2625.3	9.69	unknown *

**Analysis Report**

Method	C:\CAMAG\winCATS\Data\LITBANG\hexan 254 260712.cme	
Created by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 11:49:33 AM
Last modified by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 11:56:44 AM
SOP document		
Validated	Design	
Description :		
Analysis	F:\litbang 260712\hexan 254 260712.cna	
Created/used by	litbang	Monday, 30 July 2012 12:53:26 PM
Current user	litbang	

**Detection - CAMAG TLC Scanner****Information**

Application position	20.0 mm
Solvent front position	100.0 mm

**Instrument**

Executed by	bblk jakarta	Thursday, 26 July 2012 12:00:49 PM
Number of tracks	10	
Position of first track X	10.0 mm	
Distance between tracks	20.0 mm	
Scan start pos. Y	20.0 mm	
Scan end pos. Y	170.0 mm	
Slit dimensions	5.00 x 0.30 mm, Micro	
Optimize optical system	Light	
Scanning speed:	20 mm/s	
Data resolution:	100 µm/step	

**Measurement Table**

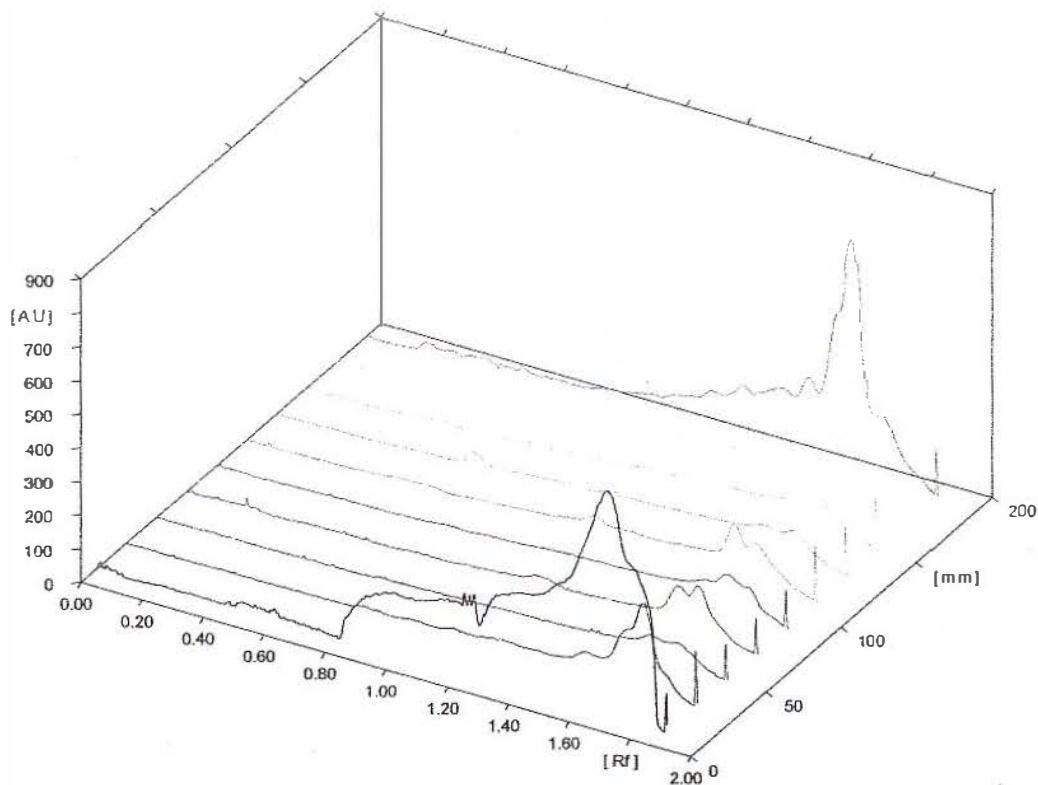
Wavelength	254
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	255 V

**Integration****Properties**

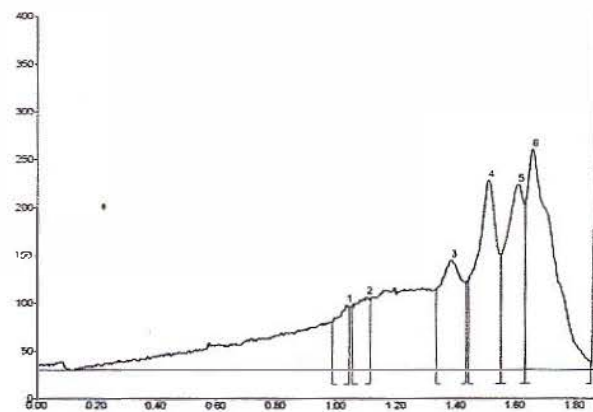
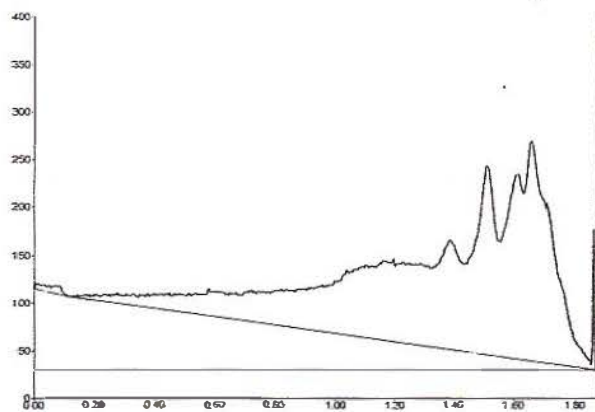
Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	20.0 mm
Track end position	170.0 mm
Display scaling	Automatic

# winCATS Planar Chromatography Manager

All tracks at WavelengthSc4



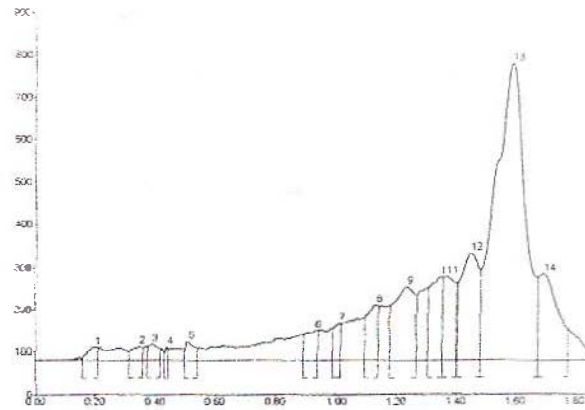
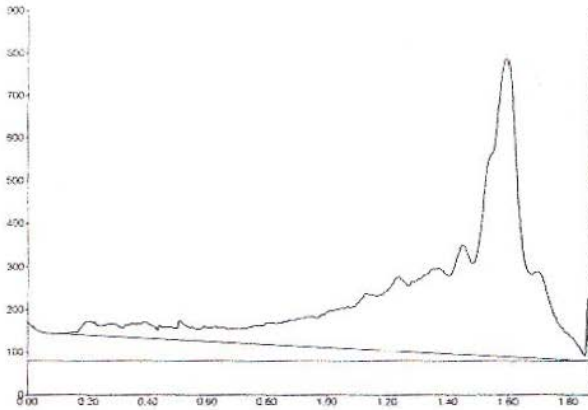
Track 9, ID: ekstrak sirsak1



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.99	50.2	1.04	68.6	7.78	1.04	65.3	2701.8	4.82	unknown *
2	1.05	66.7	1.10	76.8	8.71	1.11	73.8	3405.2	6.07	unknown *
3	1.33	84.0	1.38	115.0	13.05	1.43	92.0	8098.9	14.45	unknown *
4	1.44	92.4	1.51	197.6	22.43	1.55	121.0	12422.6	22.16	unknown *
5	1.55	120.6	1.61	193.2	21.93	1.63	173.3	10451.7	18.64	unknown *
6	1.63	173.9	1.66	230.1	26.10	1.85	8.9	18984.2	33.86	unknown *

winCATS Planar Chromatography Manager

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.16	5.1	0.20	33.2	1.50	0.21	31.2	981.9	0.74	unknown *
2	0.31	22.1	0.35	34.8	1.57	0.36	31.8	1116.1	0.85	unknown *
3	0.38	31.9	0.39	39.9	1.80	0.42	28.8	1230.5	0.93	unknown *
4	0.43	18.8	0.44	33.8	1.52	0.44	26.5	306.4	0.23	unknown *
5	0.50	26.9	0.51	46.3	2.08	0.54	30.4	1326.8	1.01	unknown *
6	0.89	61.0	0.93	71.7	3.23	0.94	71.3	2612.1	1.98	unknown *
7	0.99	76.1	1.01	88.5	3.99	1.01	87.1	1914.4	1.45	unknown *
8	1.10	101.5	1.13	133.0	5.99	1.14	130.4	4612.9	3.50	unknown *
9	1.18	131.2	1.24	176.3	7.94	1.27	155.4	11455.4	8.68	unknown *
10	1.31	173.5	1.35	199.3	8.98	1.36	197.2	7497.3	5.68	unknown *
11	1.36	197.6	1.37	201.1	9.06	1.40	184.8	7190.9	5.45	unknown *
12	1.41	184.9	1.45	255.1	11.49	1.48	216.1	13851.8	10.50	unknown *
13	1.48	216.2	1.60	700.8	31.58	1.68	196.8	65706.0	49.79	unknown *
14	1.68	196.8	1.70	205.4	9.26	1.78	74.2	12158.7	9.21	unknown *

**Analysis Report**

---

SOP document  
Validated Design  
Description :

Analysis F:\litbang 260712\hexan 366 260712.cna  
Created/used by litbang Monday, 30 July 2012 12:56:00 PM  
Current user litbang

**Detection - CAMAG TLC Scanner**

---

**Information**

Application position 20.0 mm  
Solvent front position 100.0 mm

**Instrument**

CAMAG TLC Scanner "Scanner\_180713" S/N 180713 (2.01.02)  
Executed by bblk jakarta Thursday, 26 July 2012 11:39:28 AM  
Number of tracks 10  
Position of first track X 10.0 mm  
Distance between tracks 20.0 mm  
Scan start pos. Y 20.0 mm  
Scan end pos. Y 170.0 mm  
Slit dimensions 5.00 x 0.30 mm, Micro  
Optimize optical system Light  
Scanning speed: 20 mm/s  
Data resolution: 100 µm/step

**Measurement Table**

Wavelength 366  
Lamp D2 & W  
Measurement Type Remission  
Measurement Mode Absorption  
Optical filter Second order  
Detector mode Automatic  
PM high voltage 306 V

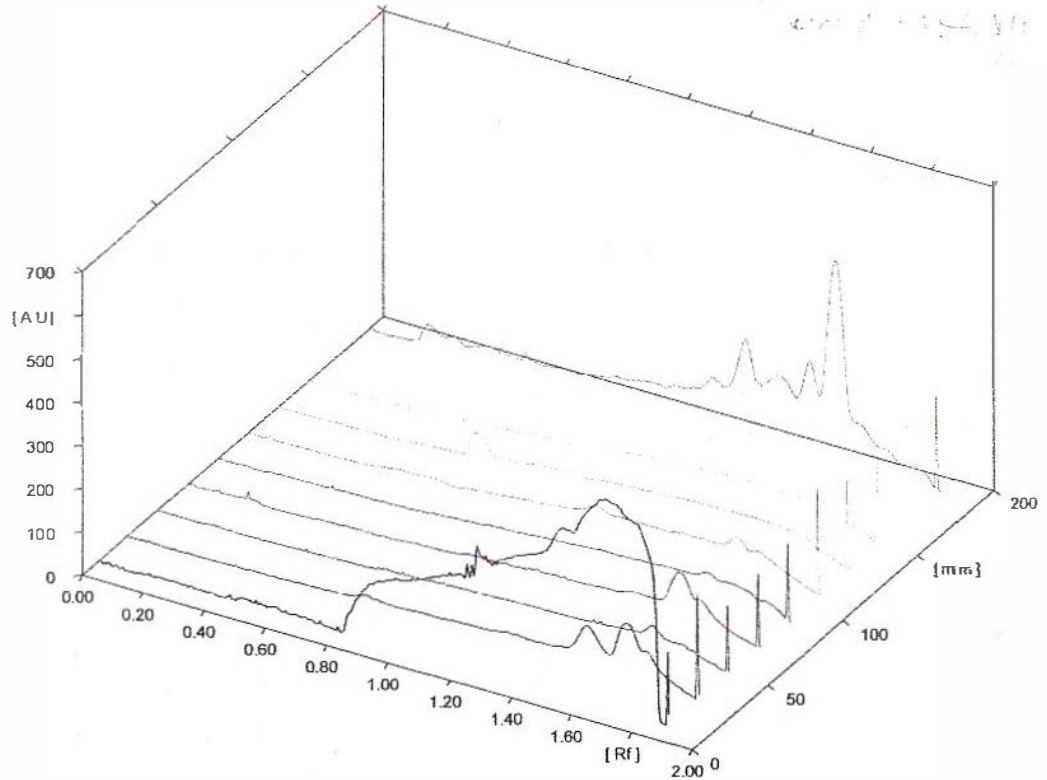
**Integration**

---

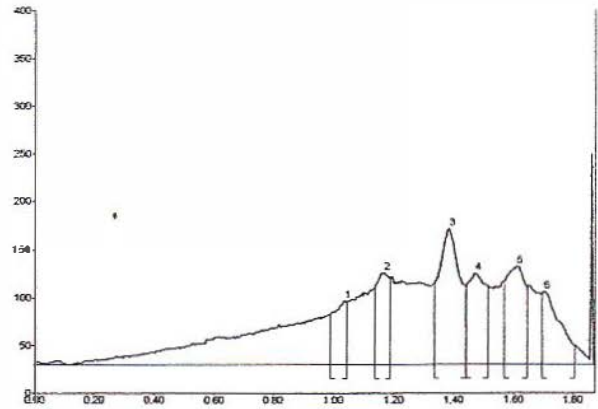
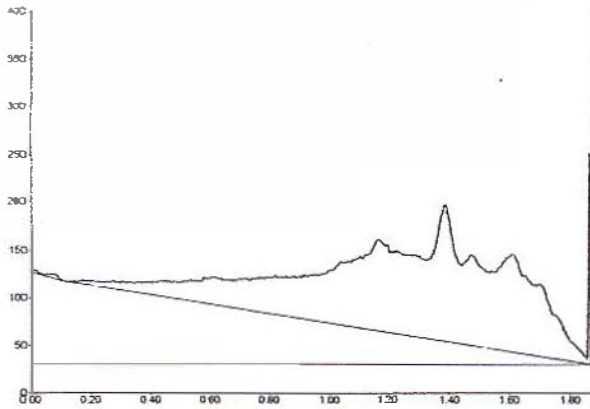
**Properties**

Data filtering Savitsky-Golay 7  
Baseline correction Lowest Slope  
Peak threshold min. slope 5  
Peak threshold min. height 10AU  
Peak threshold min. area 50  
Peak threshold max. height 990AU  
Track start position 20.0 mm  
Track end position 170.0 mm  
Display scaling Automatic

All tracks at WavelengthSc4



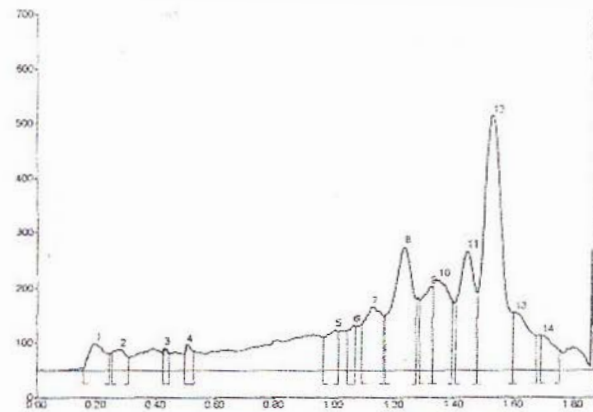
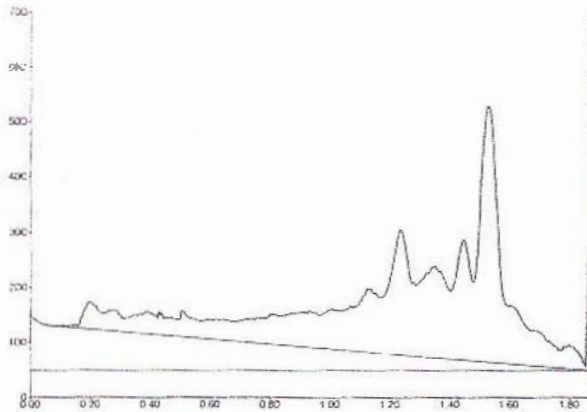
Track 9, ID: ekstrak sirsak 1



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.99	51.9	1.04	67.2	11.56	1.04	65.9	2681.6	8.55	unknown *
2	1.13	79.7	1.17	96.6	16.60	1.19	90.7	3909.6	12.46	unknown *
3	1.34	84.1	1.39	142.8	24.55	1.44	82.6	9277.1	29.57	unknown *
4	1.44	82.4	1.47	96.0	16.50	1.51	82.6	5221.4	16.65	unknown *
5	1.57	86.9	1.61	102.8	17.67	1.65	81.2	5962.6	19.01	unknown *
6	1.70	74.3	1.70	76.4	13.12	1.81	20.3	4316.0	13.76	unknown *

winCATS Planar Chromatography Manager

Track 10, ID: ekstrak sirsak 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.16	5.3	0.20	50.3	2.69	0.25	30.7	2452.6	2.77	unknown *
2	0.25	32.3	0.28	39.7	2.13	0.31	24.9	1600.7	1.81	unknown *
3	0.43	30.4	0.43	42.9	2.30	0.44	30.9	633.8	0.71	unknown *
4	0.50	30.2	0.51	47.9	2.57	0.53	36.2	1062.3	1.20	unknown *
5	0.97	60.9	1.01	75.4	4.04	1.02	71.8	2802.8	3.16	unknown *
6	1.05	73.6	1.07	83.6	4.47	1.08	79.3	1788.9	2.02	unknown *
7	1.09	84.9	1.13	117.5	6.29	1.16	101.2	6126.0	6.91	unknown *
8	1.17	102.7	1.24	227.4	12.18	1.27	132.3	13649.5	15.39	unknown *
9	1.29	129.4	1.33	155.3	8.32	1.33	152.6	4992.3	5.63	unknown *
10	1.33	153.3	1.35	168.1	9.00	1.40	129.0	8187.4	9.23	unknown *
11	1.41	126.2	1.45	219.8	11.77	1.48	143.8	10268.0	11.58	unknown *
12	1.48	143.9	1.53	467.1	25.01	1.60	105.7	27017.8	30.47	unknown *
13	1.60	105.8	1.61	107.9	5.78	1.68	63.3	5467.8	6.17	unknown *
14	1.70	64.1	1.70	64.8	3.47	1.76	38.0	2624.0	2.96	unknown *

## Lampiran 5

### Hasil Uji GGT

Kelompok	Sampling Minggu Ke (IU/ml)				
	0	4	5	8	9
Negatif	0	1.04	3.66	0	0
Positif	0	2.58	8.65	37.4	33.2
Ekstrak 200 mg/kgBB	0	2.58	8.65	4.69	9.8
Ekstrak 400 mg/kgBB	0	2.58	8.65	4.66	9.52
Ekstrak 800 mg/kgBB	0	2.58	8.65	1.84	4.1

## Lampiran 6

### Report

#### AgNOR Hepar

Kelompok perlakuan	Mean	Std. Deviation
Kontrol negatif	1.1952	.13930
Kontrol positif	2.4840	.25087
Ekstrak 200mg/kgBB	1.9648	.16846
Ekstrak 400mg/kgBB	1.8384	.21939
Ekstrak 800mg/kgBB	1.4512	.14401
Total	1.7867	.48449

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AgNOR Hepar
N		25
Normal Parameters(a, b)	Mean	1.7867
	Std. Deviation	.48449
Most Extreme Differences	Absolute	.091
	Positive	.091
	Negative	-.057
Kolmogorov-Smirnov Z		.454
Asymp. Sig. (2-tailed)		.986

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: AgNOR Hepar

Tukey HSD

(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
Kontrol negatif	Kontrol positif	-1.28880(*)	.11986	.000	-1.6475	-.9301
	Ekstrak 200mg/kgBB	-.76960(*)	.11986	.000	-1.1283	-.4109
	Ekstrak 400mg/kgBB	-.64320(*)	.11986	.000	-1.0019	-.2845
	Ekstrak 800mg/kgBB	-.25600	.11986	.244	-.6147	.1027
Kontrol positif	Kontrol negatif	1.28880(*)	.11986	.000	.9301	1.6475
	Ekstrak 200mg/kgBB	.51920(*)	.11986	.003	.1605	.8779
	Ekstrak 400mg/kgBB	.64560(*)	.11986	.000	.2869	1.0043
	Ekstrak 800mg/kgBB	1.03280(*)	.11986	.000	.6741	1.3915
Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol negatif	.76960(*)	.11986	.000	.4109	1.1283
	Kontrol positif	-.51920(*)	.11986	.003	-.8779	-.1605
	Ekstrak 400mg/kgBB	.12640	.11986	.827	-.2323	.4851
	Ekstrak 800mg/kgBB	.51360(*)	.11986	.003	.1549	.8723
Ekstrak 400mg/kgBB	Kontrol negatif	.64320(*)	.11986	.000	.2845	1.0019
	Kontrol positif	-.64560(*)	.11986	.000	-1.0043	-.2869

	Ekstrak 200mg/kgBB	- 12640	11986	827	- 4851	.2323
	Ekstrak 800mg/kgBB	38720(*)	11986	030	.0285	.7459
Ekstrak 800mg/kgBB	Kontrol negatif	25600	11986	244	- 1027	6147
	Kontrol positif	- 1 03280(*)	11986	000	-1 3915	- 6741
	Ekstrak 200mg/kgBB	- 51360(*)	11986	003	- 8723	- 1549
	Ekstrak 400mg/kgBB	- 38720(*)	11986	030	- 7459	- 0285

\* The mean difference is significant at the .05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Rata-rata AgNOR Hepar

Tukey HSD

(I) Kelompok Tikus	(J) Kelompok Tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-1 2888*	.1199	.000	-1.647	-.930
	Ekstrak 200mg/kgBB	-.7696*	.1199	.000	-1.128	-.411
	Ekstrak 400mg/kgBB	-.6432*	.1199	.000	-1.002	-.285
	Ekstrak 800mg/kgBB	-.2560	.1199	.244	-.615	.103
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	1 2888*	.1199	.000	.930	1.647
	Ekstrak 200mg/kgBB	.5192*	.1199	.003	.161	.878
	Ekstrak 400mg/kgBB	.6456*	.1199	.000	.287	1.004
	Ekstrak 800mg/kgBB	1 0328*	.1199	.000	.674	1.391
Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol Negatif	.7696*	.1199	.000	.411	1.128
	Kontrol Positif	-.5192*	.1199	.003	-.878	-.161
	Ekstrak 400mg/kgBB	.1264	.1199	.827	-.232	.485
	Ekstrak 800mg/kgBB	.5136*	.1199	.003	.155	.872
Ekstrak 400mg/kgBB	Kontrol Negatif	.6432*	.1199	.000	.285	1.002
	Kontrol Positif	-.6456*	.1199	.000	-1.004	-.287
	Ekstrak 200mg/kgBB	-.1264	.1199	.827	-.485	.232
	Ekstrak 800mg/kgBB	.3872*	.1199	.030	.029	.746
Ekstrak 800mg/kgBB	Kontrol Negatif	.2560	.1199	.244	-.103	.615
	Kontrol Positif	-1 0328*	.1199	.000	-1.391	-.674
	Ekstrak 200mg/kgBB	-.5136*	.1199	.003	-.872	-.155
	Ekstrak 400mg/kgBB	-.3872*	.1199	.030	-.746	-.029

\* The mean difference is significant at the .05 level.

### Report

Kelompok perlakuan		nRas			
		Mammae	nRas Hepar	p53 Mammae	p53 Hepar
Kontrol negatif	Mean	.0000	.0000	.5000	.5000
	Std. Deviation	.00000	.00000	.50000	.50000
Kontrol positif	Mean	2.2000	2.0000	.5000	.5000
	Std. Deviation	.57009	.79057	.50000	.35355
Ekstrak 200mg/kgBB	Mean	1.9000	1.6400	1.2000	2.1000
	Std. Deviation	.54772	.56833	.44721	.41833
Ekstrak 400mg/kgBB	Mean	1.4000	1.6200	1.3000	1.8000

Ekstrak 800mg/kgBB	Std. Deviation	.54772	.56745	.67082	.83666
	Mean	8000	7000	1.7000	2.2000
Total	Std. Deviation	.83666	.27386	.83666	.90830
	Mean	1.2600	1.1920	1.0400	1.4200
	Std. Deviation	.95873	.88690	.73485	.97553

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		n	n	n	n
		Ras Mammae	Ras Hepar	p53 Mammae	p53 Hepar
N		25	25	25	25
Normal Parameters(a,b)	Mean	1.2600	1.1920	1.0400	1.4200
	Std. Deviation	.95873	.88690	.73485	.97553
Most Extreme Differences	Absolute	.220	.179	.282	.187
	Positive	.186	.146	.282	.187
	Negative	-.220	-.179	-.198	-.124
Kolmogorov-Smirnov Z		1.099	.894	1.409	.933
Asymp. Sig. (2-tailed)		.178	.401	.038	.349

- a. Test distribution is Normal.  
b. Calculated from data.

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	I) Kelompok perlakuan	J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
nRas Mammae	Kontrol negatif	Kontrol positif	-2.20000*	.36056	.000	-3.2789	-1.1211	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-1.90000*	.36056	.000	-2.9789	-.8211	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-1.40000*	.36056	.007	-2.4789	-.3211	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.80000	.36056	.213	-1.8789	.2789	
	Kontrol positif	Kontrol negatif	2.20000*	.36056	.000	1.1211	3.2789	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.30000	.36056	.917	-.7789	1.3789	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.80000	.36056	.213	-.2789	1.8789	
		Ekstrak 800mg/kgBB	1.40000*	.36056	.007	.3211	2.4789	
	Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol negatif	1.90000*	.36056	.000	.8211	2.9789	
		Kontrol positif	-.30000	.36056	.917	-1.3789	.7789	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.50000	.36056	.643	-.5789	1.5789	
		Ekstrak 800mg/kgBB	1.10000*	.36056	.044	.0211	2.1789	
	Ekstrak 400mg/kgBB	Kontrol negatif	1.40000*	.36056	.007	.3211	2.4789	
		Kontrol positif	-.80000	.36056	.213	-1.8789	.2789	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.50000	.36056	.643	-1.5789	.5789	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.60000	.36056	.477	-.4789	1.6789	
	Ekstrak 800mg/kgBB	Kontrol negatif	.80000	.36056	.213	-.2789	1.8789	
		Kontrol positif	-1.40000*	.36056	.007	-2.4789	-.3211	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-1.10000*	.36056	.044	-2.1789	-.0211	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-.60000	.36056	.477	-1.6789	.4789	
	nRas Hepar	Kontrol negatif	Kontrol positif	-2.00000*	.32802	.000	-2.9818	-1.0184
			Ekstrak 200mg/kgBB	-1.64000*	.32802	.001	-2.6216	-.6584
			Ekstrak 400mg/kgBB	-1.62000*	.32802	.001	-2.6016	-.6384
			Ekstrak 800mg/kgBB	-.70000	.32802	.245	-1.6816	.2816
Kontrol positif		Kontrol negatif	2.00000*	.32802	.000	1.0184	2.9818	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.36000	.32802	.806	-.6216	1.3416	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.38000	.32802	.774	-.6016	1.3616	
		Ekstrak 800mg/kgBB	1.30000*	.32802	.006	.3184	2.2816	
Ekstrak 200mg/kgBB		Kontrol negatif	1.64000*	.32802	.001	.6584	2.6216	
		Kontrol positif	-.36000	.32802	.806	-1.3416	.6216	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.02000	.32802	1.000	-.9616	1.0016	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.94000	.32802	.065	-.0416	1.9216	
Ekstrak 400mg/kgBB		Kontrol negatif	1.62000*	.32802	.001	.6384	2.6016	
		Kontrol positif	-.38000	.32802	.774	-1.3616	.6016	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.02000	.32802	1.000	-1.0016	.9616	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.92000	.32802	.073	-.0616	1.9016	
Ekstrak 800mg/kgBB		Kontrol negatif	.70000	.32802	.245	-.2816	1.6816	
		Kontrol positif	-1.30000*	.32802	.006	-2.2816	-.3184	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.94000	.32802	.065	-1.9216	.0416	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-.92000	.32802	.073	-1.9016	.0616	
p53 Mammae		Kontrol negatif	Kontrol positif	.00000	.38471	1.000	-1.1512	1.1512
			Ekstrak 200mg/kgBB	-.70000	.38471	.390	-1.8512	.4512
			Ekstrak 400mg/kgBB	-.80000	.38471	.267	-1.9512	.3512
			Ekstrak 800mg/kgBB	-1.20000*	.38471	.038	-2.3512	-.0488
	Kontrol positif	Kontrol negatif	.00000	.38471	1.000	-1.1512	1.1512	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.70000	.38471	.390	-1.8512	.4512	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-.80000	.38471	.267	-1.9512	.3512	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-1.20000*	.38471	.038	-2.3512	-.0488	
	Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol negatif	.70000	.38471	.390	-.4512	1.8512	
		Kontrol positif	.70000	.38471	.390	-.4512	1.8512	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-.10000	.38471	.999	-1.2512	1.0512	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.50000	.38471	.694	-1.6512	.6512	
	Ekstrak 400mg/kgBB	Kontrol negatif	.80000	.38471	.267	-.3512	1.9512	
		Kontrol positif	.80000	.38471	.267	-.3512	1.9512	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.10000	.38471	.999	-1.0512	1.2512	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.40000	.38471	.834	-1.5512	.7512	
	Ekstrak 800mg/kgBB	Kontrol negatif	1.20000*	.38471	.038	.0488	2.3512	
		Kontrol positif	1.20000*	.38471	.038	.0488	2.3512	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.50000	.38471	.694	-.6512	1.6512	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.40000	.38471	.834	-.7512	1.5512	
	p53 Hepar	Kontrol negatif	Kontrol positif	.00000	.40743	1.000	-1.2192	1.2192
			Ekstrak 200mg/kgBB	-1.60000*	.40743	.007	-2.8192	-.3808

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		HE Mammae	HE Hepar	AgNOR Mammae
N		25	25	25
Normal Parameters(a,b)	Mean	5360	5280	1 5299
	Std. Deviation	39038	38026	38435
Most Extreme Differences	Absolute	184	156	168
	Positive	127	126	168
	Negative	- 184	- 156	- 091
Kolmogorov-Smirnov Z		922	780	842
Asymp. Sig. (2-tailed)		363	577	478

a. Test distribution is Normal

b. Calculated from data.

Report

Kelompok perlakuan		HE Mammae	HE Hepar	AgNOR Mammae
Kontrol negatif	Mean	0000	0000	1 0880
	Std. Deviation	00000	00000	05329
Kontrol positif	Mean	1 0000	1 0000	2 1208
	Std. Deviation	00000	00000	11749
Ekstrak 200mg/kgBB	Mean	9000	8400	1 7256
	Std. Deviation	07071	08944	04504
Ekstrak 400mg/kgBB	Mean	5400	5600	1 5168
	Std. Deviation	05477	05477	01683
Ekstrak 800mg/kgBB	Mean	2400	2400	1 1984
	Std. Deviation	05477	05477	03737
Total	Mean	5360	5280	1 5299
	Std. Deviation	39038	38026	38435

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(i) Kelompok perlakuan	(j) Kelompok perlakuan	Mean Difference (i-j)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
HE Mammas	Kontrol negatif	Kontrol positif	-1.0000*	.02966	.000	-1.0888	-.9112	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.9000*	.02966	.000	-.9888	-.8112	
		Ekstrak 400mg/kgBB	-.5400*	.02966	.000	-.6288	-.4512	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.2400*	.02966	.000	-.3288	-.1512	
		Kontrol positif	1.0000*	.02966	.000	.9112	1.0888	
	Kontrol positif	Kontrol negatif	.0000	.02966	.023	-.0112	.1688	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.4600*	.02966	.000	.3712	.5488	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.7600*	.02966	.000	.6712	.8488	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.9000*	.02966	.000	.8112	.9888	
		Kontrol negatif	-.0000	.02966	.023	-.1888	-.0112	
	Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol negatif	.3600*	.02966	.000	.2712	.4488	
		Kontrol positif	.6600*	.02966	.000	.5712	.7488	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.5400*	.02966	.000	.4512	.6288	
		Kontrol positif	-.4600*	.02966	.000	-.5488	-.3712	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.3600*	.02966	.000	-.4488	-.2712	
	Ekstrak 400mg/kgBB	Kontrol negatif	.3000*	.02966	.000	.2112	.3888	
		Kontrol positif	.2400*	.02966	.000	.1512	.3288	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.7600*	.02966	.000	-.8488	-.6712	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.6600*	.02966	.000	-.7488	-.5712	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.3000*	.02966	.000	-.3888	-.2112	
	HE Hepar	Kontrol negatif	Kontrol positif	-1.0000*	.03347	.000	-1.1001	-.8999
			Ekstrak 200mg/kgBB	-.8400*	.03347	.000	-.9401	-.7399
			Ekstrak 400mg/kgBB	-.5600*	.03347	.000	-.6601	-.4599
			Ekstrak 800mg/kgBB	-.2400*	.03347	.000	-.3401	-.1399
Kontrol positif			1.0000*	.03347	.000	.8999	1.1001	
Kontrol positif		Kontrol negatif	.1600*	.03347	.001	.0599	.2601	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.4400*	.03347	.000	.3399	.5401	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.7600*	.03347	.000	.6599	.8601	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.8400*	.03347	.000	.7399	.9401	
		Kontrol negatif	-.1600*	.03347	.001	-.2601	-.0599	
Ekstrak 200mg/kgBB		Kontrol negatif	.2800*	.03347	.000	.1799	.3801	
		Kontrol positif	.6000*	.03347	.000	.4999	.7001	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.5600*	.03347	.000	.4599	.6601	
		Kontrol positif	-.4400*	.03347	.000	-.5401	-.3399	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.2800*	.03347	.000	-.3801	-.1799	
Ekstrak 400mg/kgBB		Kontrol negatif	.3200*	.03347	.000	.2199	.4201	
		Kontrol positif	.2400*	.03347	.000	.1399	.3401	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.7600*	.03347	.000	-.8601	-.6599	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.6000*	.03347	.000	-.7001	-.4999	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.3200*	.03347	.000	-.4201	-.2199	
AgNOR Mammas		Kontrol negatif	Kontrol positif	-1.0328*	.04035	.000	-1.1535	-.9121
			Ekstrak 200mg/kgBB	-.6376*	.04035	.000	-.7583	-.5169
			Ekstrak 400mg/kgBB	-.4288*	.04035	.000	-.5495	-.3081
			Ekstrak 800mg/kgBB	-.1104	.04035	.083	-.2311	.0103
	Kontrol positif		1.0328*	.04035	.000	.9121	1.1535	
	Kontrol positif	Ekstrak 200mg/kgBB	.3952*	.04035	.000	.2745	.5169	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.6040*	.04035	.000	.4833	.7247	
		Ekstrak 800mg/kgBB	.9224*	.04035	.000	.8017	1.0431	
		Ekstrak 200mg/kgBB	.6376*	.04035	.000	.5169	.7583	
		Kontrol negatif	-.3952*	.04035	.000	-.5169	-.2745	
	Ekstrak 200mg/kgBB	Kontrol negatif	.2088*	.04035	.000	.0881	.3295	
		Kontrol positif	.5272*	.04035	.000	.4065	.6479	
		Ekstrak 400mg/kgBB	.4288*	.04035	.000	.3081	.5495	
		Kontrol positif	-.6040*	.04035	.000	-.7247	-.4833	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.2088*	.04035	.000	-.3295	-.0881	
	Ekstrak 400mg/kgBB	Ekstrak 800mg/kgBB	.3184*	.04035	.000	.1977	.4391	
		Kontrol negatif	.1104	.04035	.083	-.0103	.2311	
		Kontrol positif	-.9224*	.04035	.000	-1.0431	-.8017	
		Ekstrak 200mg/kgBB	-.5272*	.04035	.000	-.6479	-.4065	
		Ekstrak 800mg/kgBB	-.3184*	.04035	.000	-.4391	-.1977	

\*. The mean difference is significant at the .05 level

LEMBAR PENGESAHAN

Modulasi Ekspresi Protein Antiproliferasi dan Proapoptosis Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Tikus Terinduksi DMBA

Jakarta, Desember 2012

MENYETUJUI,

Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan,

Dr. Vivi Lisdawati, Apt, MS  
NIP. 196811181996032001

Ketua Pelaksana,

Rosa Adelina, S.Farm, Apt  
NIP. 198708222010122003

DISETUJUI,

Ketua Panitia Pembina Ilmiah,

Dr. drg. Magdarina DA, M.Sc  
NIP. 195012061984022001

Kepala Pusat Biomedis dan  
Teknologi Dasar Kesehatan,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt  
NIP. 196211191988031001