

BAB 6**PEMBAHASAN****6.1 Analisa Hasil****6.1.1 Analisa Uji Fitokimia**

Pada pengujian komponen fitokimia secara kualitatif menggunakan reagen pada ekstrak daun salam dan daun sirih merah baik yang menggunakan metode ekstraksi dingin (maserasi) dan metode ekstraksi panas (soxhletasi) dengan pelarut etanol 96%. Berdasarkan studi literatur sedangkan pada studi Safitri dan dan Farah (2008) kandungan dari ekstrak *Piper crocatum* adalah alkaloid, flavonoid, tanin positif terdapat dalam ekstrak tersebut dan untuk pengujian saponin didapatkan hasil negatif. Untuk kandungan daun salam diantaranya terdiri dari tanin, flavonoid, minyak atsiri (Sumono, 2008). Pada hasil pengujian komponen fitokimia secara kualitatif didapatkan hasil yang positif terhadap kandungan saponin, minyak atsiri dan fenol pada kedua tanaman, baik menggunakan metode maserasi maupun metode soklet kemungkinan terdapat kandungan yang berbeda pada tanaman dikarenakan asal dari bahan tanaman obat yang di ekstrak berasal dari kondisi tanah pada daerah berbeda-beda sehingga metabolit yang dihasilkan dari tanaman tersebut juga berbeda.

6.1.2 Pengaruh Ekstrak Daun Salam Dan Daun Sirih Merah Terhadap Induksi Apoptosis.

Apoptosis atau kematian sel terprogram sangat penting dalam pengontrolan jumlah sel. Apoptosis atau kematian yang terprogram merupakan mekanisme oleh sel yang mengalami kematian sebagai pengontrolan dari proliferasi sel atau respon dari kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki (Ghobarial *et al.*, 2010). Secara luas terdapat dua tipe perubahan biokimia yang dapat diamati dalam apoptosis yaitu dengan mengaktifasi *caspase*, mengganggu DNA dan protein serta merubah permeabilitas membran dan pengenalan dari fagositosis (Wong, 2011).

Immunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi yaitu berupa antigen seperti (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi yang berikatan dengan antigen. Immunohistokimia digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi karakteristik dari kejadian selular seperti proses proliferasi atau apoptosis sel (Ramos, 2005). Untuk memvisualisasi hasil dari interaksi antigen dan antibody yang biasa digunakan adalah konjugasi antibody dan enzim seperti peroksidase. Untuk mempelajari morfologi sel, sel yang terdapat didalam jaringan difiksasi dan kemudian dilokalisasi diantara sel dan selanjutnya dapat diamati menggunakan mikroskop cahaya atau mikroskop elektron (Rantam, 2003).

Berdasarkan hasil penelitian imunohistokimia yang menunjukkan apoptosis melalui *caspase-3*, pemberian ekstrak tunggal salam maserasi, sirih merah maserasi, dan salam sokhlet menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap aktivasi *caspase-3* yang ditunjukkan hasil uji one way ANOVA ($p: 0,047$). Untuk

dosis tunggal terbaik dari ekstrak yang dapat mengaktivasi caspase-3 adalah ekstrak daun salam maserasi dengan dosis 10,16 $\mu\text{g/mL}$ dan yang kedua adalah salam maserasi dengan dosis 20,32 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan untuk pemberian ekstrak kombinasi tidak berpengaruh signifikan terhadap indeks aktivasi caspase-3 yang ditunjukkan dengan hasil uji one way ANOVA ($p: 0,117$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun salam atau daun sirih merah tunggal dapat mengaktifasi caspase-3 sehingga sel kanker serviks yaitu dalam hal ini sel HeLa berpengaruh terhadap apoptosis. Pada Pengujian kombinasi dari ekstrak daun salam dan daun sirih merah tidak berpengaruh terhadap apoptosis sel HeLa.

Terapi kombinasi ekstrak daun salam dan sirih merah tidak signifikan mempengaruhi apoptosis dari sel HeLa hal ini kemungkinan terjadi karena beberapa mekanisme kemungkinan kandungan aktif dari ekstrak tersebut saling berinteraksi sehingga menyebabkan aktivitas dari ekstrak tersebut turun atau saling meniadakan aktivitas. Kemungkinan kedua ekstrak daun salam dan daun sirih merah melalui mekanisme yang sama dalam mengaktivasi apoptosis, hal ini sesuai dengan teori bahwa terapi antikanker harus melalui jalur yang berbeda agar memiliki efektivitas yang lebih tinggi dan toksisitas yang rendah.

Untuk metode yang terbaik dari data diatas dapat disimpulkan bahwa ekstraksi maserasi menghasilkan ekstrak yang memiliki aktivitas tinggi terhadap apoptosis sel HeLa. Hal ini dapat disebabkan pada ekstraksi soklet digunakan pelarut yang di berikan pengaruh panas, sehingga kemungkinan zat-zat aktif yang terkandung dalam ekstrak terdapat beberapa yang rusak apabila terkena suhu tertentu. Hal ini akan berakibat pada kandungan zat aktif yang terekstraksi soklet kurang lengkap sehingga berpengaruh terhadap aktivitas farmakologi yang sinergis dari ekstrak tanaman sirih merah dan salam akan turun. Metode maserasi

merupakan metode dingin tanpa adanya pemanasan dan kemungkinan tidak ada zat aktif yang rusak oleh panas sehingga dapat memberikan aktivitas farmakologi yang sinergis.

Ekstrak tunggal daun salam dan daun sirih merah dapat mengapoptosis sel kanker serviks (Sel HeLa) secara signifikan hal ini tidak lepas dari aktivitas komponen mayor ekstrak yang sudah diteliti memiliki aktivitas antioksidan tinggi pada 2.5.1.2. Hal ini sesuai dengan studi Chen (2009) yang menyatakan bahwa mekanisme asam galat sebagai inhibitor dari proliferasi sel dan menginduksi apoptosis pada dosis dan waktu tertentu. Asam galat menginduksi apoptosis dengan aktivasi jalur apoptosis sebelumnya. asam galat menginduksi aktivasi dari caspase-9, caspase-3 yang merupakan pendahulu dari onset apoptosis. Sedangkan menurut Agarwal *et al* (2006) asam kafeat sebagai flavonoid memiliki aktivitas dengan mengaktifkan fas dan induksi bax. Selain itu pada penelitian Russel *et al* (2012) menyebutkan dalam penelitiannya pada sel LNCaP bahwa asam galat dapat meningkatkan kadar dari ROS yaitu H_2O_2 yang dapat memicu apoptosis melalui penegeluaran sitokrom-c dari mitokondria menuju sitokrom-c sehingga dapat meningkatkan aktivasi caspase-9 dan caspase-3 dan apoptosis dan apoptosis terjadi. Sedangkan dari penelitian Sari (2014) menyebutkan bahwa ekstrak sirih merah dan ekstrak daun salam dapat meningkatkan kadar ROS pada sel kanker serviks (Sel HeLa).

Dari hasil studi ini dapat disimpulkan ekstrak salam atau sirih merah dapat mengaktifkan caspase-3 melalui jalur intrinsik atau jalur mitokondria dengan peningkatan ROS sehingga dapat menginduksi bax dan memicu pengeluaran sitokrom-c sehingga caspase-3 teraktivasi. Caspase-3 yang teraktivasi akan

menuju ke nukleus untuk memfragmentasi DNA sehingga nukleus akan terdegradasi dan apoptosis dapat terjadi.

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Farmasi

Dalam melakukan penelitian yang merupakan penelitian berbasis fitoterapi, sebagai farmasis harus lebih memperhatikan bagaimana menghasilkan kualitas ekstrak dari metode ekstraksi, pelarut yang dipakai, dan data empiris sebagai terapi penyakit dan tidak terfokus pada kadar kandungan zat aktif utama, tetapi semua komponen perlu diperhatikan. Selain itu farmasis harus memulai untuk perkembangan obat yang lebih fokus ke arah biomolekular agar mekanisme terapi dapat ditentukan secara jelas.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini tidak dilakukan analisis secara LC ataupun HPLC untuk mengetahui zat yang hilang secara spesifik pada metode maserasi dan soklet sehingga efektivitas terapinya berbeda.