

KADAR ASAM SALISILAT TIKUS PASCA PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*)

SALICYLIC ACID LEVEL OF RATS POST ADMINISTRATION OF SOURSOP (*Annona muricata*) LEAF EXTRACT

Mizan Sahroni¹, Silvia Andriani²

^{1,2}Faculty of Health, University of Muhammadiyah Pringsewu

*Email Correspondence: silviaandriani2808@gmail.com

Abstract: Salicylic acid levels in rats after administration of soursop (*Annona muricata*) leaf extract. Cancer is the second deadliest disease in the world, prevention of cancer is one way that can be done by consuming lots of fruits or vegetables containing antioxidants, anticancer or salicylic acid. Soursop is a plant that contains antioxidant and anticancer compounds. This study aims to determine the effect of soursop leaf extract on salicylic acid levels in DMBA-induced carcinogenic rats. The study used 20 rats which were divided into 4 groups, negative control, positive control (DMBA induction), P1 (DMBA induction + 20 mg/kg BW soursop leaf extract) and P2 (DMBA induction + 40 mg/kg BW soursop leaf extract). The results of the study showed that the positive control group rats had the highest salicylic acid levels, the P1 and P2 rats had the lowest salicylic acid levels. From this, it was concluded that administration of soursop leaf extract was thought to be able to suppress the carcinogenic effect of DMBA on rats which was characterized by a decrease in salicylic acid levels.

Key word: salicylic acid, soursop leaf extract, DMBA, carcinogenic, rats

Abstrak: Kadar asam salisilat tikus pasca pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*). Kanker menjadi penyakit paling mematikan nomor dua di dunia, pencegahan kanker menjadi salah satu cara yang dapat dilakukan dengan mengonsumsi buah atau sayur yang banyak mengandung antioksidan, antikanker atau asam salisilat. Sirsak menjadi salah satu tanaman yang mengandung senyawa antioksidan dan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun sirsak terhadap kadar asam salisilat pada tikus yang diinduksi karsinogenik DMBA. Penelitian menggunakan 20 tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok, kontrol negatif, kontrol positif (induksi DMBA), P1 (induksi DMBA + ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB) dan P2 (induksi DMBA + ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB). Hasil penelitian menunjukkan tikus kelompok kontrol positif memiliki kadar asam salisilat yang paling tinggi, tikus P1 dan P2 memiliki kadar asam salisilat paling rendah. Dapat disimpulkan pemberian ekstrak daun sirsak diduga mampu menekan efek karsinogenik DMBA terhadap tikus yang ditandai dengan penurunan kadar asam salisilat.

Kata kunci: asam salisilat, ekstrak daun sirsak, DMBA, karsinogenik

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab utama kematian kedua di dunia setelah penyakit kardiovaskular (GBD, 2015). Efek fatal dari kanker dapat ditanggulangi dengan pemberian pengobatan yang tepat. Namun, peningkatan tingkat kelangsungan hidup kanker karena penggunaan obat presisi atau imunoterapi terutama terjadi di negara-negara berpenghasilan tinggi, sedangkan di negara-negara berpenghasilan rendah pencegahan kanker, pendidikan, dan akses ke tes skrining kanker serta pengobatan kanker tidak memadai (Horton and Gauvreau, 2015; Lowy and Collins, 2016). Potensi teknik pencegahan kanker, termasuk vaksinasi dan program berhenti merokok, untuk mengurangi kejadian dan angka kematian kanker belum cukup terealisasi, dan upaya-upaya tersebut khususnya tertinggal di populasi yang kurang beruntung secara sosial ekonomi (Vineis and Wild, 2014). Hal ini

menyebabkan hasil kanker yang lebih buruk dan tingkat kejadian kanker yang lebih tinggi di negara-negara berpenghasilan rendah. Pengendalian kanker membutuhkan alokasi sumber daya yang tepat untuk pencegahan kanker, diagnosis dini, dan perawatannya.

Mengonsumsi buah-buahan dan sayuran menjadi salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menjaga kesehatan tubuh dan menurunkan prevalensi angka kejadian kanker. Konsumsi buah dan sayur berdasarkan penelitian diketahui mampu menurunkan resiko kanker (Aune *et al.* 2011). Tanaman diketahui memiliki banyak kandungan yang dapat digunakan sebagai antiaoksidan dan antikanker, salah satunya tanaman sirsak. Sirsak diketahui mengandung banyak senyawa yang berperan sebagai antioksidan antikanker serta banyak manfaat dalam mencegah atau mengobati berbagai penyakit lain. Selain mengonsumsi buah yang mengandung senyawa antikanker, mengonsumsi buah yang mengandung banyak asam salisilat juga dapat dilakukan. Asam salisilat merupakan senyawa yang secara alami banyak disintesis oleh tumbuhan seperti tumbuhan buah, sayur, herba hingga tumbuhan penghasil rempah (Spadafranca *et al.* 2007; Wood *et al.* 2011 Malakar *et al.* 2017). Asam salisilat pada dasarnya merupakan hormon tanaman yang berfungsi untuk melawan patogen dan cekaman lingkungan. Selain berguna bagi tanaman, asam salisilat diketahui memiliki banyak fungsi bagi kesehatan manusia seperti anti-inflamasi, antikanker, pelindung saraf, efek antidiabetes, dan sebagainya.

Pada pengujian efek antikanker tumbuhan, peneliti umumnya menggunakan hewan uji yang diinduksi karsinogenik untuk memicu kanker pada hewan uji, DMBA menjadi salah satu yang paling banyak digunakan dalam proses induksi kanker pada hewan uji. Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (PAH) adalah karsinogen kuat. Di antaranya, *dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) terkenal karena kemampuannya menginduksi *karsinoma mammae* pada tikus Sprague-Dawley (SD) betina (Kerdelhué, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak tanaman sirsak terhadap kadar asam salisilat pada tikus yang diinduksi DMBA.

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium biokimia dan biologi molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan pola rancangan *Post Test Only Control Grup Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berumur 6-7 minggu dengan berat rata-rata berkisar antara 100-200 gram. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (induksi DMBA), P1 (DMBA + 20 mg/kgBB), P2 (40 DMBA + mg/kgBB).

Ekstraksi Daun Sirsak

Pembuatan ekstrak daun sirsak menggunakan daun sirsak yang telah dikeringkan sebanyak 500 gram. Kemudian daun sirsak di giling menjadi serbuk (*simplisia*). Setelah itu, daun sirsak dimaserasi dalam etanol 70%. Selanjutnya disaring sampai didapat maserat jernih. Maserat dievaporasi dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental daun sirsak.

Penginduksian DMBA dan Ekstrak Daun Sirsak

Induksi DMBA menggunakan sonde oral, dengan jadwal pemberian seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kgBB dengan pelarut minyak jagung. Setiap tikus pada kelompok kontrol positif, P1 dan P2 dengan berat sekitar 200 gram mendapatkan kurang lebih 1 ml 34 larutan dengan konsentrasi 4mg/ml. Bahan yang akan digunakan untuk larutan ekstrak daun sirsak adalah ekstrak daun sirsak yang dilarutkan dalam aquades. Ekstrak daun sirsak diberikan dengan dosis 20mg/kgBB pada kelompok P1 dan 40mg/kgBB pada kelompok P2. Selama penginduksian senyawa DMBA, tikus setiap hari diinduksi ekstrak daun sirsak. Penginduksian DMBA dan ekstrak daun sirsak dilakukan 4 minggu.

Pemeriksaan Kadar Asam Salisila

Hati tikus diambil dan buat menjadi homogenat, selanjutnya 25µL homogenate hati ditambah 125µL akuades dan 250µL TCA 10% divorteks sampai merata dan dientrifuse (5000 rpm selama 10 menit), Supernatan dibuang dan endapan yang tersisa ditambahkan 250µL TCA 5 % dan divorteks sampai merata lalu disentrifuge (5000rpm selama 10 menit), supernatan dibuang dan endapan hidrolisat ditambah H2SO4 0,1 N sebanyak 125µL dan kocok lalu letakkan dipenangas 80°C selama satu jam selanjutnya di sentrifuse sebentar, selanjutnya hidrolisat diambil 12,5µL dan ditambahkan 12,5µL natrium periodat lalu divorteks dan diamkan 20 menit pada suhu kamar, selanjutnya tambahkan 125µL natrium arsenit 10 % lalu divorteks, selanjutnya ditambahkan 375µL larutan TBA 0,6% dalam NA2SO4 0,5M lalu dikocok dan letakkan di penangas air mendidih selama 20 menit, dan di penangas Es 0°C selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 540µL larutan sikloheksanon (Sigma). Sentrifuse selama 3 menit, 5000rpm. Fasa sikloheksanon yang terbentuk pada bagian atas larutan diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 549 nm.

Analisis Data

Data diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*, setelah itu dilanjutkan Uji homogenitas / *Levene*. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji *one way ANOVA*. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, akan diuji dengan uji *Kruskal-Wallis*. Jika pada uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *LSD*, uji *post-hoc* untuk uji *Kruskal-Wallis* adalah dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL

Tabel 1. Kadar Asam Salisilat Pada Tikus Hasil Induksi DMBA dan Ekstrak Daun Sirsak

Kelompok	Shapiro Wilk	Levene Test	Kadar Asam sialat Rerata ±s.d.(µg/mg)
1	0,49	0,974	0,042±0,016 ^a
2	0,967		0,070±0,016 ^b
P1	0,054		0,032±0,016 ^a
P2	0,314		0,034±0,017 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan berdasarkan uji *LSD* 0,05. Kelompok 1: kontrol negatif, 2: kontrol positif, P1: DMBA + ekstrak 20 mg/kgBB, p2: DMBA + ekstrak 40mg/kgBB

Data yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan uji normalitas terlebih dahulu untuk melihat apakah data terdistribusi secara normal, uji normalitas dilakukan dengan *Shapiro Wilk*, hasil uji normalitas menunjukkan semua data terdistribusi normal yang diketahui dari nilai uji yang semuanya

lebih besar dari 0,05. Data selanjutnya diuji homogenitasnya menggunakan levene test pada taraf signifikansi 0,05, hasil uji levene menunjukkan data homogen dengan nilai levene test lebih besar dibanding 0,05. Data terakhir diuji menggunakan anova dan uji BNT untuk mengetahui perlakuan yang memberikan efek signifikan terhadap kadar asam salisilat pada tikus.

Kadar asam salisilat pada tiap perlakuan bervariasi, analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada taraf signifikansi 0,05, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan terhadap hewan uji coba mempengaruhi kadar asam salisilat secara signifikan. Kadar asam salisilat pada perlakuan kontrol tanpa pemberian DMBA memiliki kadar asam salisilat 0,042, sedangkan hewan yang diberi DMBA memiliki kadar asam salisilat tertinggi yaitu 0,070, untuk perlakuan yang diberikan ekstrak tanaman sirsak pada semua konsentrasi menghasilkan asam salisilat yang lebih rendah dibandingkan perlakuan kontrol tanpa DMBA dan kontrol dengan DMBA.

PEMBAHASAN

Kadar tertinggi asam salisilat pada perlakuan kontrol positif dengan DMBA disebabkan karena DMBA bisa menyebabkan peningkatan ekspresi enzim sialiltransferase, yaitu enzim yang diperlukan untuk biosintesis sialokonjugat pada berbagai jaringan tumor. Peningkatan enzim ini akan menyebabkan peningkatan jumlah asam sialat pada glikoprotein yang terdapat pada membran sel (Susantiningih, 2014). Pada perlakuan kontrol negatif kadar asam salisilat lebih rendah karena tidak ada DMBA yang memicu peningkatan kadar asam salisilat. Sedangkan pada perlakuan P1 dan P2 kadar asam salisilat lebih rendah dibandingkan perlakuan kontrol positif dan kontrol negatif meskipun pada perlakuan tersebut diinduksi oleh DMBA yang bersifat karsinogenik adalah karena efek pemberian ekstrak daun sirsak.

Daun sirsak memiliki banyak senyawa fitokimia yang memiliki banyak fungsi bagi kesehatan. Senyawa yang terkandung di dalam ekstrak sirsak seperti asetogenin, alkaloid dan fenol (Patil *et al.* 2023). Ekstrak daun sirsak juga diketahui memiliki fungsi sebagai antikanker dan antioksidan (Hasmila *et al.* 2019; Solanki *et al.* 2020; Patil *et al.* 2023). DMBA dikenal sebagai salah satu senyawa yang bersifat karsinogenik yang mampu menginduksi kanker, senyawa ini telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian menggunakan hewan uji dan efek karsinogeniknya telah tercatat dengan baik (Batcioglu *et al.* 2012; Lin *et al.* 2012; Kerdelhué *et al.* 2016; Al-Asady *et al.* 2020). Pemberian ekstrak daun sirsak yang memiliki kandungan senyawa antikanker diduga mampu menetralkan efek karsinogenik dari DMBA sehingga menyebabkan kadar asam salisilat pada perlakuan P1 dan P2 lebih rendah dibanding perlakuan kontrol positif. Selain itu ekstrak daun sirsak juga memiliki sifat antioksidan, menurut Balderrama-Carmona *et al.* (2020) sirsak memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Senyawa antioksidan mungkin juga berperan dalam mengatasi efek karsinogenik, menurut Lou *et al.* (2022) antioksidan memiliki potensi dalam terapi kanker. Didier *et al.* (2023) juga menyatakan bahwa penggunaan antioksidan dapat menjadi strategi dalam menurunkan kejadian kanker. Selain itu masih ada kandungan fenolik di dalam ekstrak daun sirsak, beberapa penelitian menunjukkan potensi dari senyawa fenolik dalam pengobatan berbagai penyakit seperti diabetes, jantung hingga kanker (Ls and Nja 2016; Srinivasulu *et al.* 2018).

SIMPULAN

Pemberian ekstrak daun sirsak terbukti memberikan efek yang signifikan terhadap kadar asam salisilat pada organ hati tikus. Kadar asam salisilat pada hati tikus yang diinduksi DMBA lebih tinggi dibandingkan kadar asam salisilat pada hati tikus yang diinduksi DMBA dan ekstrak daun sirsak.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek ekstrak daun sirsak terhadap kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Abounassif, M. A., Mian, M. S., & Mian, N. A. A. (1994). Salicylic Acid. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 23: 421-470.
- Al-Asady, A. M., Ghaleb, N. K. G., Al-nasrawi, A. M. J., & Al-hamed, T. A. (2020). Effect of Carcinogenic Substance (7,12 Dimethylbenz [a] Anthracene (DMBA)) on Tissue, Hematology Character and Enzyme Activity in Rat. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(1): 1172-1177.
- Aune, D., Chan, D. S. M., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 343.
- Aune, D., Lau, R., Chan, D. S., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Nonlinear Reduction in Risk for Colorectal Cancer by Fruit and Vegetable Intake Based on Meta-analysis of Prospective Studies. *Gastroenterology*, 141: 106-118.
- Balderrama-Carmona, A. P., Silva-Beltrán, N. P., Gálvez-Ruiz, C., Ruíz-Cruz, S., Chaidez-Quiroz, C., & Morán-Palacio, E. F. (2020). Antiviral, Antioxidant, and Antihemolytic Effect of *Annona muricata* L. Leaves Extracts. *Plants*, 9(12).
- Batcioglu, K., Uyumlu, A. B., Satilmis, B., Yildirim, B., Yucel, N., Demirtas, H., Onkal, R., Guzel, R. M. & Djamgoz, M. B. (2012) Oxidative stress in the in vivo DMBA rat model of breast cancer: suppression by a voltage-gated sodium channel inhibitor (RS100642). *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 111(2):137-141.
- Chander, M. (2018). Anticancer Efficacy of Some Plant Phenolics - A Recent Scenario. *IJCMAS*, 7: 1746-1768.
- Dao, T.L. (1962). The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons. *Cancer Res*. 22: 973-981.
- Didier, A. J., Stiene, J., Fang, L., Watkins, D., Dworkin, L. D., & Creeden, J. F. (2023). Antioxidant and Anti-Tumor Effects of Dietary Vitamins A, C, and E. *Antioxidant*, 12(3): 632.
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S. & Devi, R. V. (2012). Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: A review. *Int. J. Pharm Pharm Sci*, 4(2): 3-6.
- GBD. (2016). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 388: 1459-544.
- Hasmila, I., Natsir, H., & Soekamto, N. H. (2019). Phytochemical analysis and antioxidant activity of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.). The 3rd International Conference On Science Journal of Physics: Conference Series 1341.
- Horton, S., & Gauvreau, C. L. (2015). Cancer in Low- and Middle-Income Countries: An Economic Overview. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, et al. editors. *SourceCancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.

- Kerdelhué, B., Forest, C., & Coumoul, X. (2016). Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. *Biochimie Open*, 3, 49-55.
- Kerdelhué, B., Forest, C., & Coumoul, X. (2016). Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. *Biochimie Open*, 3: 49-55.
- Lin, Y., Yao, Y., Liu, S., Wang, L., Moorthy, B., Xiong, D., Cheng, T., Ding, X., & Gu, J. (2012). Role of mammary epithelial and stromal P450 enzymes in the clearance and metabolic activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mice. *Toxicol. Lett.* 212:97–105.
- Lowy, D. R., & Collins, F. S. (2016). Aiming High--Changing the Trajectory for Cancer. *N Engl J Med*, 374: 1901-1904.
- Ls, R., & Nja, S. (2016). Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. *J. Nutr. Food Sci.* 6: 10–4172.
- Luo, M., Zhou, L., Huang, Z., Li, B., Nice, E. C., Xu, J., & Huang, C. (2022). Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants*, 11(6), 1128.
- Malakar, S., Gibson, P. R., Barrett, J. S., & Muir, J.G. (2017). Naturally occurring dietary salicylates: A closer look at common Australian foods. *J. Food Compos. Anal.* 57: 31–39.
- Paterson, J. R., Srivastava, R., Baxter, G. J., Graham, A. B., & Lawrence, J. R. (2006). Salicylic acid content of spices and its implications. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2891–2896.
- Patil, H. V., Dhankani, M. A., & Dhankani, A. R. (2023). A Review on Marvel Fruit: *Annona muricata*. *Med. Sci. Forum*, 21(26).
- Pavle, R., Slavimir, V., Nenad, S., Dušan, S., Ivan, I., Darko, L., Dušica, R., & Nebojša, R. (2015). The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid. *Acta facultatis medicae Naissensis*, 32(4): 259-265.
- Solanki, J., B. Mandaliya, V. & George, J. J., (2020). Medicinal Properties of *Annona muricata* Extracts in Various Disease. *Recent Trends in Science and Technology*. :126-133.
- Spadafranca, A., Bertoli, S., Fiorillo, G., Testolin, G., & Battezzati, A. (2007). Circulating salicylic acid is related to fruit and vegetable consumption in healthy subjects. *Br. J. Nutr.* 98: 802–806.
- Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C. M., & Suresh, K. C. (2018). Syringic acid (SA) A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. *Biomed. Pharmacother.* 108:547–557.
- Susantiningih, T. 2014. The Effect of Giving Soursop Leaves *Annona muricata* L Extract to Sialic Acid Level on Female Rats Induced DMBA (7,12- dimethylbenz(a)anthracene). *JUKE*, 4(7): 125-131.
- Tatham, M. H., Cole, C., Scullion, P., Wilkie, R., Westwood, N. J., Stark, L. A., & Hay, R. T. (2017) A Proteomic Approach to Analyze the Aspirin-mediated Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Proteom.* 16: 310-326.
- Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet*, 383: 549-557.
- Wood, A., Baxter, G., Thies, F., Kyle, J., & Duthie, G. A. (2011). Systematic review of salicylates in foods: Estimated daily intake of a Scottish population. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: S7–S14.
- Wu, K. K. (2000). Aspirin and salicylate: An old remedy with a new twist. *Circulation*, 102: 2022–2023.