

Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Sel Kanker Mamalia Secara *In Vitro*

Lusiana Arifianti, Sukardiman, Herra Studiawan, Rakhmawati, Lulus Megawati
Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga,
E-mail: l.arifianti@gmail.com

Abstract

Cancer is the process of body cells proliferation that is uncontrolled. Treatment of cancer such as surgery, radiotherapy and chemotherapy have many side effects, therefore natural anticancer is needed. The soursoup (*Annona muricata* L.) is a traditional medicinal plant that is empirically used for anti-inflammatory and antitumor by Indonesian. The purpose of this study is to determine the cytotoxic effect of *Annona muricata* 's seed extract against T47D, HeLa, WiDr and Raji mammalian cancer cell lines. The cytotoxic test performed by MTT assay. The parameter obtained from the cytotoxic test was IC_{50} , that produce inhibitory concentration of cancer cells by 50%. The results showed that *A. muricata* seed extract has a cytotoxic activity with IC_{50} were $20.36 \pm 1.58 \mu\text{g/mL}$; $8.91 \pm 4.49 \mu\text{g/mL}$; $40.06 \pm 3.12 \mu\text{g/mL}$ and $11.24 \pm 4.53 \mu\text{g/mL}$ for T47D, HeLa, WiDr and Raji cells respectively. It can be concluded that the *A. muricata* seed extract was potential to be developed as anticancer agent especially on services cancer.

Keywords: *Annona muricata* Linn., MTT assay, T47D, WiDr, HeLa, Raji

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondermarck, 2003).

Pengobatan kanker secara medis memerlukan biaya yang sangat tinggi. Dalam beberapa dekade terakhir, praktisi medis setidaknya telah memiliki tiga metode pengobatan kanker, yakni tindakan bedah, radiasi dan kemoterapi. Sebanyak sepertiga penderita kanker diperkirakan dapat disembuhkan melalui modalitas terapi yang bersifat lokal (tindakan bedah dan radiasi), namun bagi duapertiga lainnya terutama yang penyakit kankernya telah mengalami mikrometastasis ke organ tubuh lain, diperlukan modalitas terapi yang bersifat sistemik (kemoterapi).

Tumbuhan, telah lama diketahui merupakan sumber yang sangat penting dalam upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Sirsak telah diteliti sejak tahun 1940-an, semua bagian tanaman sirsak ini dapat digunakan untuk pengobatan (Evira, 2013). Kandungan fitokimia tanaman ini adalah asetogenin, alkaloid, kuinolina, isokuinolina, tanin, kumarin, prosianidin, flavonoid, amil kaproat (Lim, 2012). Senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman sirsak *Annonaceous acetogenin*, telah lama diteliti dan terbukti bersifat antikanker, selain itu juga bersifat antiparasit, insektisida, anticacing, antibakteri, dan antivirus (Taylor, 2012).

Penelitian sebelumnya menunjukkan efek sitotoksik daun sirsak pada sel kanker pankreas, yaitu CD18/HPAF dengan nilai IC_{50} sebesar $73 \mu\text{g/mL}$ (Torres et al., 2012). Efek sitotoksik selektif diberikan ekstrak etil asetat daun sirsak terhadap sel kanker paru (A549) dengan nilai IC_{50} sebesar $5,09 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$ (Moghadamtousi et al., 2014) dan sel kanker kolon, yaitu HCT-116 dan HT-29 dengan nilai IC_{50} masing-masing $11,43 \pm 1,87 \mu\text{g/mL}$ dan $8,98 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$

(Karimian et al., 2014). Sampai saat ini jarang diketahui efek sitotoksik dari biji sirsak. Untuk itu pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak biji sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap beberapa sel kanker mamalia yaitu payudara (T47D), kolon (WiDr), serviks (HeLa) dan nasofaring (Raji) secara *in vitro*. Berdasarkan data yang diperoleh diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmiah mengenai kegunaan tanaman sirsak sebagai agen antikanker.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman. Bahan Tanaman yang digunakan adalah biji dari buah sirsak (*Annona muricata* Linn.), yang diperoleh dari Kecamatan Kepohbaru, Kabupaten Bojonegoro. Biji sirsak tersebut diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Sel Kanker Manusia. Sel kanker manusia yang digunakan adalah beberapa jenis *continuous cell line*, diantaranya yaitu sel kanker payudara (T47D), sel kanker kolon (WiDr), sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker nasofaring (Raji) yang diperoleh dari CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Bahan Kimia. Etanol 96%, Media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penisilin – streptomisin (Sigma), Amfoterizin B (Sigma), Dimethyl sulfoxide (DMSO), tripsin-EDTA (Sigma) (trypsin 0,25%), Tripkan Blue (Sigma), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) difenil tetrazolium bromida (MTT) (Sigma), Sodium Duodecyl Sulfate (SDS) dan Phosphat Buffer Saline (PBS) (Invitrogen).

Uji Sitotoksik dengan Metode MTT. Metode ini didasarkan pada reaksi reduksi reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide) yang dikatalis oleh enzim suksinat dehidrogenase yang dikandung oleh sel hidup. Secara ringkas tahapan pengujian ini adalah di transfer sejumlah sel uji sebanyak 1×10^4 sel/sumuran dalam media kultur lengkap yang terdiri dari FBS sebagai nutrisi utama sel, penisilin-streptomisin sebagai pencegah kontaminan

bakteri, amfoterizin-B sebagai pencegah kontaminan jamur dan RPMI 1640 sebagai media pembawa (volume masing-masing sumuran 100 µl) kedalam 96-well plate dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% semalam. Selanjutnya dilakukan pemberian sampel uji dengan seri kadar dan dibuat replikasi tiga kali (triplo), kemudian diinkubasikan kembali semalam. Pengujian hari ke tiga, penambahan reagen MTT, dan setelah 4 jam akan terbentuk kristal formazan pada sel yang masih hidup. Selanjutnya ditambahkan SDS stopper untuk menghentikan reaksi MTT. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 595nm.

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dilakukan penentuan persen viabilitas sel dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Selanjutnya bersama dengan data kadar sampel yang digunakan dilanjutkan penentuan nilai IC₅₀ (Fresney, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Penapisan Fitokimia. Sejumlah 250 gram serbuk simplisia biji sirsak diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% total sebanyak 2,5 liter (dilakukan 3 kali),

menghasilkan ekstrak kental biji sirsak sebanyak 13,546 gram. Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia, untuk mengetahui kandungan golongan kimia yang terdapat dalam ekstrak biji sirsak. Berdasarkan uji skrining fitokimia ekstrak etanol biji sirsak diperoleh hasil positif pada senyawa golongan kimia yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Uji sitotoksik secara In Vitro. Uji sitotoksitas terhadap sel kanker merupakan pengujian dasar yang umum pada obat antikanker maupun senyawa kemopreventif. Melalui parameter IC₅₀, dapat dilihat potensi toksik senyawa/bahan yang diujikan. Salah satu metode yang umum digunakan untuk uji sitotoksitas secara in vitro adalah metode MTT. Adapun prinsip pengujian ini adalah reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh enzim reduktase, suksinat tetrazolium yang masuk ke dalam rantai respirasi pada mitokondria sel-sel yang hidup dan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) dapat melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 595 nm. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dilakukan penentuan persen viabilitas. Selanjutnya bersama dengan data kadar sampel yang digunakan dilakukan penentuan nilai IC₅₀ (Fresney, 2005).

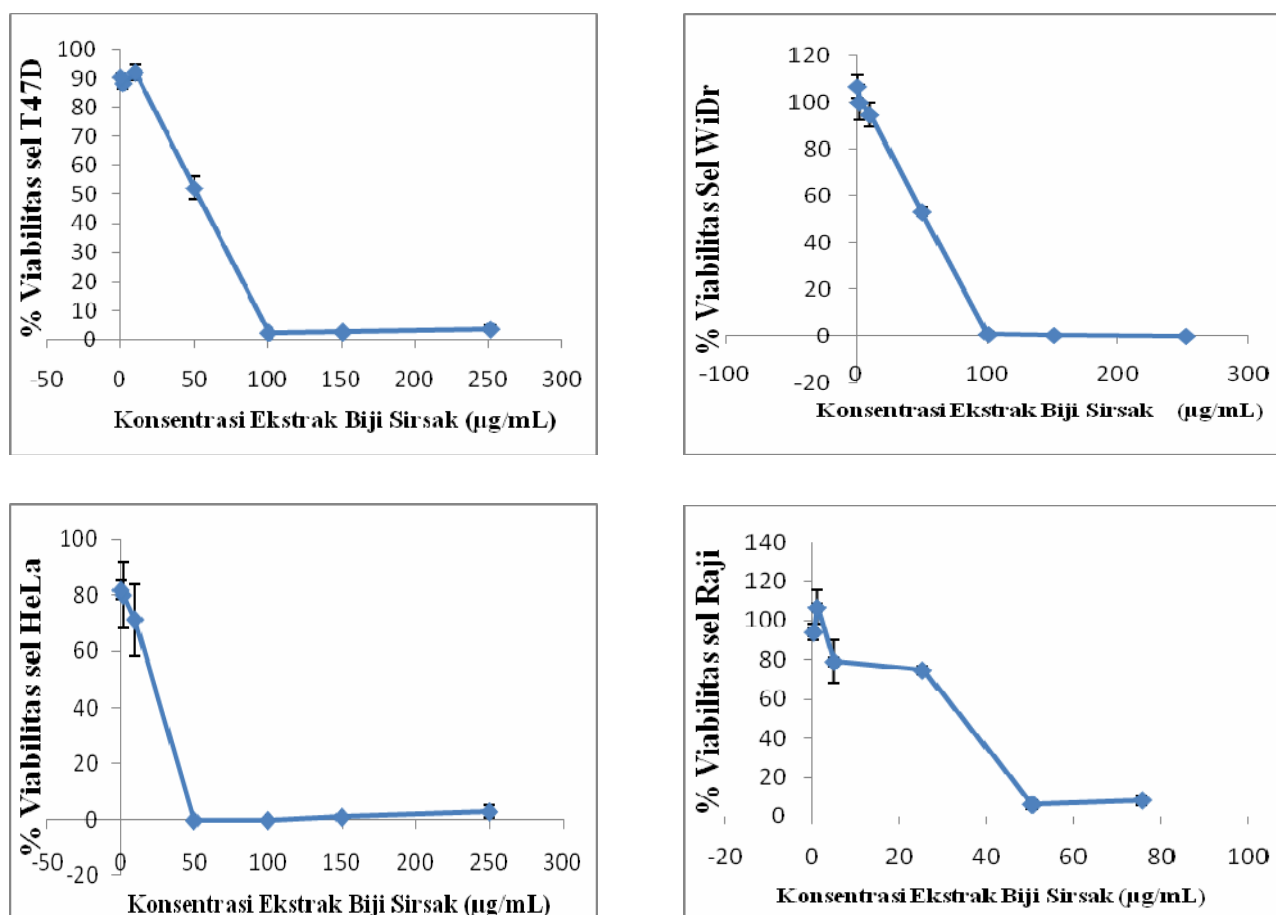
Harga IC₅₀ dari ekstrak etanol biji sirsak pada masing-masing sel kanker tertera pada Tabel 2:

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia ekstrak biji sirsak berdasarkan reaksi warna dan pengendapan

No.	Golongan Senyawa	Nama Reaksi	Reaksi Warna, Pengendapan dan KLT	Keterangan
1.	Alkaloid	Mayer	Terjadi endapan	(+) alkaloid
		Wagner	Terjadi endapan	(+) alkaloid
		Uji KLT Dragendorff	(+) noda warna Jingga (Rf: 0,67)	(+) alkaloid
2.	Glikosida saponin	Uji buih	Terjadi buih	(+) saponin
		Liebermann-Burchard	Tidak terjadi warna hijau biru, merah ungu atau kuning muda	(-) saponin steroid, saponin triterpenoid, saponin jenuh
			Terjadi cincin merah	
3.	Flavonoid	Salkowski		(+) steroid tak jenuh
		KLT penampak noda anisaldehyd asam sulfat	(+) noda merah ungu (Rf: 0,37)	(+) terpenoid/ steroid bebas
		KLT	(+) noda kuning intensif (Rf: 0,51)	(+) flavonoid
4.	Tanin dan polifenol	Butanol, as. asetat glasial, air		
		Gelatin – NaCl	Tidak terjadi endapan	(-) tanin
		FeCl ₃	Terjadi warna hijau - hitam	(+) polifenol

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak Biji Sirsak pada sel kanker mamalia

Sampel	Harga IC ₅₀ (µg/mL)			
	Sel T47D	Sel WiDr	Sel HeLa	Sel Raji
Ekstrak Biji Sirsak	20,36 ± 1,58	40,06 ± 3,12	8,91 ± 4,49	11,24 ± 4,53

**Gambar 1.** Kurva linieritas persen viabilitas masing-masing sel kanker terhadap konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak (*Annona muricata* L.)

Berdasarkan kurva hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan persen sel hidup untuk mengetahui jumlah masing-masing sel kanker (T47D, WiDr, HeLa, dan Raji) yang diujikan dengan ekstrak etanol kulit buah sirsak dapat dilihat secara umum bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan uji yang diberikan semakin rendah persentase kehidupan masing-masing sel kanker yang terjadi (Gambar 1), yang dapat diartikan memiliki aktivitas sitotoksitas terhadap masing-masing sel kanker tersebut. Disebutkan dalam literatur, bahwa ekstrak dapat dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik jika nilai IC₅₀ kurang dari 1000 µg/mL setelah 24 jam kontak dengan sel kanker. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol biji sirsak dapat digunakan sebagai pilihan terapi antikanker. Aktivitas ini dapat disebabkan kandungan kimia yang spesifik dari familia Annonaceae yaitu *annoneous acetogenin*.

Annonaceous acetogenin bekerja menghambat dan membunuh sel kanker secara selektif, karena mampu mendeteksi dan membedakan sel normal dan sel kanker. Asetogenin menyerang sel secara selektif, artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini sangat berbeda dengan cara kerja obat-obatan kemoterapi yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai macam efek samping. Cara acetogenin dalam membedakan sel kanker dan sel normal adalah berdasarkan dari kebutuhan sel akan ATP (Adenosine Trifosfate). Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal, maka sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. Acetogenin mendeteksi kebutuhan ATP yang lebih tinggi sebagai sel kanker. Selanjutnya

acetogenin masuk ke dalam sel kanker dan menempel pada dinding sebelah dalam mitokondria, yaitu organ di dalam sel yang berfungsi sebagai tempat memproduksi energi ATP bagi sel. Selanjutnya acetogenin memblok produksi energi ATP di dalam mitokondria sel kanker. Akibatnya suplai energi untuk sel kanker akan terputus, sel kanker menjadi lemah dan akhirnya mati (Alali et al., 1999).

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak biji sirsak memiliki potensi sitotoksik terhadap semua sel uji (T47D, HeLa, WiDr dan Raji), meskipun memiliki harga IC_{50} lebih tinggi dibanding obat antikanker doxorubicin (hasil tidak dipublikasikan). Kemampuan ekstrak biji sirsak menghambat pertumbuhan paling kuat terhadap sel kanker servik (HeLa) dengan IC_{50} sebesar $(8,906 \pm 4,497 \mu\text{g/ml})$. Kondisi ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyebutkan efek sitotoksik biji sirsak terhadap kanker ovarian Ehrlich's Ascites Carcinoma (EAC) yang diinokulasikan ke dalam tikus (Ukwubile, 2012). Dengan demikian, ekstrak ini dapat dikembangkan sebagai pengobatan antikanker, utamanya untuk kanker servik. Namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme ekstrak etanol daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan sel raji, sehingga penggunaannya dapat tepat pada siklus proliferasi yang sesuai pada sel kanker tersebut.

Kesimpulan. Ekstrak etanol biji sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker mamalia (T47D, HeLa, WiDr dan Raji) secara in vitro dengan menggunakan metode MTT assay dengan potensi hambatan tertinggi terhadap sel kanker servik (HeLa) sebesar $(8,906 \pm 4,497 \mu\text{g/ml})$.

Ucapan Terimakasih. Penelitian ini didanai oleh BOPTN Dirjen Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui penelitian Hibah Riset Universitas Airlangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL, 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Product*. Vol 62(3), pp. 504-40
- Ukwubile CA, 2012. Phytochemical Screening and Anti-Ovarian Cancer Properties of *Annona muricata* Linn. (*Annonaceae*) Seed Ethanol Extract. *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research*. Vol 1(3): 9-17
- Evira D, 2013. *The Miracle of Fruits*, Jakarta: Gramedia Pustaka. Hal. 269.
- Fresney RI, 2005. *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique*. 5th Ed. John Wiley and Sons. pp. 120-135.
- Hondermarck H, 2003. **Breast Cancer**. *Molecular & Cellular Proteomics* 2.5. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. pp. 281-291.
- Karimian H, Moghadamtousi SZ, Kadir HA., Rouhallahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, 2014. *Annona muricata* Leaves induced G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondrial-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells, *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 156:277-289
- Lim TK, 2012. *Annona muricata*. In: *Edible Medicine and Non Medicine*, Vol. 1 Fruts, Lim, T.K. (Edt). Dondhrect Holdberg London New York: Springer Science and Business Media BV, p. 190-200
- Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Rouhallahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, Karimian H, 2014. *Annona muricata* Leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF-kB. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol 14 (1): 299.
- Taylor L, 2012. *Annona muricata*. Herbal secret of the Rainforest: The Healing Power of over 50 Medicinal Plants you Should Know About.. <http://www.raintree.com/graviola.htm#VOFqZixNfMw>, diakses tanggal 20 Juni 2014.
- Torres MP, Satyanarayana R, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, Johansson SL, Singh PK, Ganti AK, Batra SK, 2012. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters*. Vol 323: 29-40