

## SELEKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) PADA LINI SEL KANKER PAYUDARA

### ANTICANCER SELECTIVITY OF SIRSAK (*Annona muricata*) LEAF EXTRACT ON BREAST CANCER CELL LINES

Dina Fatmawati<sup>1</sup>, Suparmi<sup>2</sup>, Iwang Yusuf<sup>3</sup>, Israhnanto<sup>4</sup>

Bagian Biologi, Fakultas kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung

Email : [1dienafatma@unissula.ac.id](mailto:dienafatma@unissula.ac.id), [2suparmi@unissula.ac.id](mailto:suparmi@unissula.ac.id), [3iwangyusuf@unissula.ac.id](mailto:iwangyusuf@unissula.ac.id), [4israhnanto@unissula.ac.id](mailto:israhnanto@unissula.ac.id)

#### ABSTRACT

Studies have been conducted on cytotoxicity of sirsak (*Annona muricata*) against T47D cell line. However, the selectivity of *Annona muricata* leaf extract against MCF-7 breast cancer has not established. This study aimed to determine the index selectivity of *Annona muricata* leaf extract against MCF-7 breast cancer cell line. In this quasy experimental study using 2 kind of cell line, The MCF-7 breast cancer cell line and Vero cell line as normal cell were treated with *Annona muricata* leaf extract at dose 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.5 µg/mL respectively. The MTT assay were used to evaluate the viability of both cell line after treatment with *Annona muricata* leaf extract. The data of viability cells were analyzed with Probit regression to determine the IC<sub>50</sub> value of *Annona muricata* leaf extract in both cell lines. The selectivity of two treatment was determine based on the selectivity index (SI) that represents the ratio of IC<sub>50</sub> value of *Annona muricata* leaf extract. The IC<sub>50</sub> value of MCF-7 and normal cell were 44.94 and 184.04 respectively with selectivity index 4. This result suggested that *Annona muricata* had cytotoxic effect in MCF-7 breast cancer cell line but not in normal cells. In conclusion *Annona muricata* leaf extract has cytotoxic effect to MCF7 breast cancer cell selectively.

**Keywords** : *Sirsak, Annona muricata, MCF-7 cell, selectivity.*

#### PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyebab kematian tertinggi pada wanita di Indonesia. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menurunkan angka kematian akibat kanker payudara diantaranya dengan mengembangkan beberapa alternatif terapi. Prinsip pengembangan terapi anti kanker payudara saat ini lebih didasarkan pada efektivitas dan selektivitas kerja terhadap sel kanker (Vorobiof, 2016).

Salah satu jenis terapi konvensional kanker payudara adalah penggunaan kemoterapi. Penggunaan kemoterapi tersebut cenderung bersifat toksik. Doksorubisin merupakan kemoterapi yang toksik terhadap sel yang mengalami proliferasi sehingga dapat mengakibatkan toksisitas pada

sel normal yang mengalami aktivitas proliferasi yang tinggi seperti sel pada sumsum tulang dan mukosa usus bahkan pada jantung (Mitry & Edwards, 2016). Hal tersebut membuat sebagian besar pengobatan sitotoksik tidak memiliki selektivitas yang tinggi pada sel kanker dan juga mengakibatkan toksisitas pada jaringan normal (Patel, 2011). Berbagai strategi pada terapi antikanker payudara digunakan untuk menginduksi mekanisme apoptosis pada sel kanker sehingga aktivasi mekanisme apoptosis spesifik pada sel kanker payudara menjadi lebih efektif untuk mengobati kanker payudara dan memiliki toksisitas minimal pada sel normal.

*Annona muricata* (Sirsak) merupakan tanaman yang berpotensi sebagai antikanker payudara (Syed et

*al.*, 2016). Hasil penelitian terdahulu menyebutkan bahwa ekstrak daun *Annona muricata* memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat ( $IC_{50}$ ) terhadap sel kanker payudara T47D (Suyatmi, *et al.*, 2012). *Annona muricata* dengan memiliki kandungan *acetogenin* yang diduga dapat menyebabkan penurunan ATP pada sel kanker sehingga dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada sel kanker (Antony & Vijayan, 2016; Ragasa, *et al.*, 2012; Sun, *et al.*, 2014; Suryawinata & Sukohar, 2016). Penelitian pendahuluan menggunakan simulasi *docking* molekuler membuktikan bahwa *acetogenin* yang berasal dari *Annona muricata* memiliki ikatan yang kuat dengan protein Bcl-XI dan berpotensi menginduksi apoptosis dari jalur intrinsik (Antony & Vijayan, 2016).

Induksi apoptosis ini merupakan hal yang penting dalam pengembangan terapi antikanker payudara yang bersifat selektif. Penelitian yang dilakukan oleh Syed *et al.*, (2016) membuktikan bahwa ekstrak air *Annona muricata* memiliki efek sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7, 4TI namun belum selektivitasnya belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui selektivitas antikanker ekstrak sirsak (*Annona muricata*) pada sel kanker payudara yang ditentukan berdasarkan indeks selektivitas.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian kuasi eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

#### Persiapan Ekstrak Sirsak

Daun sirsak diperoleh dari daerah Semarang. Sebanyak 500 g daun sirsak basah dikering anginkan

dibawah sinar matahari selama 3 hari, dan selanjutnya dibuat dalam bentuk serbuk. Serbuk daun sirsak diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol pada alat *soxhletasi* dengan perbandingan serbuk dengan pelarut 1:3. Hasil ekstraksi diuapkan dalam *rotary evaporator* menghasilkan ekstrak kental seberat 30 g.

#### Kultur Sel

Pada penelitian ini digunakan lini sel kanker payudara MCF-7 dan lini sel normal Vero. Lini sel MCF-7 dan vero diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FK UGM.

Sel diamati setiap hari dengan mikroskop *inverted* dan media penumbuh diganti setiap hari. Apabila media pada *tissue culture flask* (TCF) berwarna kuning jernih dan ~ 80% sel telah memenuhi TCF, sel dipanen dan didistribusikan ke dalam beberapa TCF. Dalam *biosafety cabinet level 2*, media lama dibuang dan sel yang melekat disemprot pelan-pelan dengan media baru. Suspensi sel yang didapat dimasukan ke dalam beberapa TCF, disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dengan tutup TCF dilonggarkan. Setelah jumlah sel cukup/*konfluent*, sel dilepaskan dari dinding TCF kemudian medium diganti dengan medium DMEM baru. Dengan bantuan pipet pasteur, media disemprotkan berulang-ulang sehingga sel lepas. Untuk membantu melepaskan sel, dilakukan tripsinisasi, yaitu menambahkan tripsin-EDTA 0,25%. Sel kemudian dimasukan ke dalam tabung sentrifuga dengan penambahan DMEM kemudian disentrifugasi pada 1200 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan medium 1 mL untuk resuspensi sel.

Kerapatan sel dihitung dengan mengambil suspensi sel sebanyak 20  $\mu$ L. Sel dihitung dengan bantuan

hemositometer pada mikroskop cahaya. Jumlah sel total diperoleh dengan mengalirkan faktor pengenceran dengan bilangan  $10^4$ /mL Untuk keperluan uji apoptosis masing-masing diperlukan minimum  $5 \times 10^5$ /mL sampai  $1 \times 10^6$ /mL media kultur.

### Uji Sitotoksik

Suspensi sel MCF-7 maupun sel vero ( $5 \times 10^4$  sel/ml) dimasukkan ke dalam mikrowell terpisah dan diinkubasi dengan ekstrak etanol daun sirsak (triplo) pada medium kultur ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%) selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak sirsak yang digunakan sebesar 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dan 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pada akhir inkubasi, media kultur pada sel dibuang dan dicuci dengan PBS 1x kemudian ditambahkan MTT 100 mikroliter, termasuk untuk kontrol media. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk garam formazan). Setelah garam formazan jelas terbentuk, pada kultur sel ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl diinkubasi pada tempat gelap semalam. Setelah kurang lebih 24 jam sel diperiksa di *elisa reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu, intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding terbalik dengan jumlah sel yang mati (Fatmawati, *et al.*, 2016).

Nilai  $\text{IC}_{50} < 50$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  dikategorikan memiliki efek sitotoksik kuat, jika nilai  $50$   $\mu\text{g}/\text{mL} < \text{IC}_{50} < 200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  dikategorikan sitotoksik sedang, dan nilai  $200 < \text{IC}_{50} < 1000$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  dikategorikan memiliki efek sitotoksik lemah. Nilai  $\text{IC}_{50} > 1000$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  dikategorikan tidak memiliki efek sitotoksik (Kuetze, 2017).

### Analisis Data

Penentuan nilai  $\text{IC}_{50}$  menggunakan analisis regresi probit dari persentase viabilitas sel hidup terhadap log konsentrasi ekstrak daun sirsak. Persentase sel yang hidup dihitung berdasarkan hasil absorbansi (Yudi & Nugroho, 2016) menggunakan rumus:

$$\text{Persentase viabilitas sel} = \frac{AT-AM}{AK-AM} \times 100\%$$

Keterangan :

- T : Absorbansi perlakuan (ekstrak daun sirsak)  
M : Absorbansi media kultur  
K : Absorbansi kontrol sel

Penilaian terhadap indeks selektivitas dilakukan dengan membagi nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak daun sirsak pada sel MCF-7 dengan  $\text{IC}_{50}$  sel vero. Indeks selektivitas menggambarkan ekstrak etanol daun sirsak semakin selektif. indeks selektif  $\leq 2$  menunjukkan ekstrak etanol sirsak tidak selektif (Artun *et al.*, 2016)

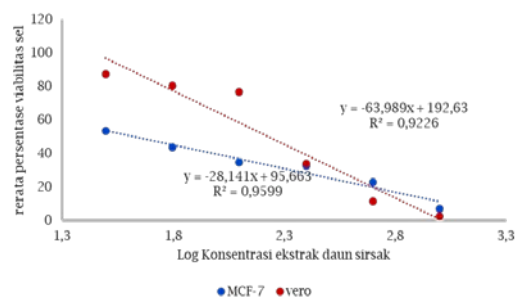
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil ekstraksi diperoleh ekstrak pekat sebesar 30 gram. Hasil uji sitotoksik menunjukkan pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada sel MCF-7 dan sel Vero dengan dosis tertinggi menunjukkan persentase viabilitas sel lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak terendah tabel 1.

Penurunan persentase viabilitas sel berhubungan dengan peningkatan dosis yang diberikan, dibuktikan dengan nilai  $R^2$  pada sel MCF-7 dan sel Vero berturut-turut sebesar 0,95 dan 0,92. Hal tersebut berarti lebih dari 90% penurunan persentase viabilitas sel dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang diberikan.

Tabel 1. Persentase Viabilitas Sel Setelah Pemberian Ekstrak Daun Sirsak

Dosis ( $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrak daun sirsak	Rerata % viabilitas sel setelah pemberian ekstrak daun sirsak		Indek selektivitas
	MCF-7	Vero	
1000	$7,06 \pm 1,42$	$2,59 \pm 0,79$	
500	$22,75 \pm 1,83$	$11,58 \pm 0,50$	
250	$32,72 \pm 0,17$	$33,78 \pm 0,14$	
125	$34,96 \pm 0,17$	$76,95 \pm 0,59$	
62,5	$43,62 \pm 0,92$	$80,61 \pm 0,10$	
31,25	$53,41 \pm 0,08$	$87,44 \pm 0,28$	
$IC_{50}$	44,94	184,04	4,09



Gambar 1. Grafik Persamaan Regresi Antara Persentase Viabilitas Sel Terhadap Konsentrasi Ekstrak Daun Sirsak.

Keterangan :

- y= persentase viabilitas sel;
- x= konsentrasi ekstrak daun sirsak;
- R<sup>2</sup>= persamaan R-adjusted

Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada sel MCF-7 sebesar  $44,94 \mu\text{g/mL}$  sedangkan pada sel vero sebesar  $184,04 \mu\text{g/mL}$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki efek sitotoksik yang sedang terhadap sel MCF-7 namun, memiliki efek sitotoksik lemah terhadap sel vero. Penelitian yang dilakukan oleh Syed *et al.*, (2016) menyebutkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki efek sitotoksik lemah dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $220 \mu\text{g/mL}$ . Adanya perbedaan hasil tersebut diduga disebabkan karena perbedaan pelarut yang digunakan, sehingga membuat zat aktif yang terkandung pada ekstrak berbeda.

Hasil uji selektivitas ekstrak daun sirsak pada sel MCF-7 dan sel Vero menunjukkan indeks selektivitas sebesar 4,09. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak

bersifat selektif terhadap sel kanker. Anthony & Vijayan (2016) menyebutkan daun sirsak memiliki kandungan *acetogenin* yang dapat menghambat protein antiapoptosis Bcl-2. Kandungan zat aktif lain yang terdapat di daun sirsak adalah *quersetin* (Moghadamtousi *et al.*, 2014). *Quersetin* merupakan anti oksidan namun, disisi lain mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker (Zhang *et al.*, 2011; Hashemzaei *et al.*, 2017).

Selektivitas ekstrak daun sirsak terhadap sel kanker payudara diduga berhubungan dengan kandungan *quersetin* pada daun sirsak yang dapat memicu apoptosis pada sel kanker namun tidak pada sel normal. Lamson & Brignall (1999) menyebutkan bahwa beberapa sel kanker mengalami kerusakan mekanime pertahanan terhadap ROS sehingga sel-sel tersebut

tidak dapat memanfaatkan anti oksidan tambahan untuk proses *repair*. Hal tersebut menyebabkan penumpukan radikal bebas dalam sel kanker yang berdampak pada kematian sel kanker tersebut.

#### KESIMPULAN

Ekstrak sirsak bersifat sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai indeks selektivitas 4,09. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi antioksidan pada ekstrak daun sirsak dan keterkaitannya dengan induksi apoptosis pada sel kanker payudara secara selektif.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung atas pembiayaan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Antony, P., & Vijayan, R. (2016). Acetogenins from *Annona muricata* as potential inhibitors of antiapoptotic proteins: A molecular modeling study. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1399-1410. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S103216>
- Artun, F. T., Karagoz, A., Ozcan, G., Melikoglu, G., Anil, S., Kultur, S., & Sutlupinar, N. (2016). In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *Journal of B.U.ON.*, 21(3), 720-725. <https://doi.org/10.3390/proceedings1101019>
- Fatmawati, D., Mubarika, S., & Wahyuningsih, M. S. H. (2016). The effect of combined doxorubicin and *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burk. on apoptosis induction in human breast cancer cell. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1744). <https://doi.org/10.1063/1.4953485>
- Hashemzaei, M., Far, A. D., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., ... Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 38(2), 819-828. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5766>
- Kuete, V. (Ed.). (2017). *Medicinal spices and vegetables from Africa: therapeutic potential against metabolic, inflammatory, and systemic diseases*. Cambridge: Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00019-4>
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart and Vasculature*, 10, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>
- Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Paydar M, Rouhollahi E, Karimian H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):299
- Patel, K. J. (2011). *Distribution of anti-cancer drugs within solid tumours and normal tissues and its potential for modification to improve therapeutic index*. ProQuest Dissertations and Theses. Retrieved from [https://search.proquest.com/docview/920130483?accountid=26642%0Ahttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url\\_ver=Z39](https://search.proquest.com/docview/920130483?accountid=26642%0Ahttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39)

- 88-2004&rft\_val\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=disser-  
rtations+%26+theses&sid=ProQ:ProQuest+Dissertations+%26+Theses+Global&a
- Ragasa, C. Y., Soriano, G., Torres, O. B., Don, M.-J., & Shen, C.-C. (2012). Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*, 4(32), 32-37. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.32.7>
- Sun, S., Liu, J., Kadouh, H., Sun, X., & Zhou, K. (2014). Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(12), 2773-2776. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.099>
- Suryawinata, A., & Sukohar, A. (2016). Potensi Annonaceous acetogenins dari Sirsak (*Annona muricata*) sebagai Agen Kemoterapi melalui Induksi Apoptosis dan Inhibisi HIF-1. *Majority*, 5(5), 97-101.
- Suyatmi, Suselo, Y. H., & Jusuf, S. A. (2012). The selective cytotoxicity of ethanolic extract of *Annona muricata* leaf on HeLa cervical cancer cells. In *Research and application on traditional complementary and alternative medicine in health care* (pp. 24-27).
- Syed Najmuddin, S. U. F., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B., & Abd Rahman, N. M. A. N. (2016). Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1290-y>
- Vorobiof, D. A. (2016). Recent advances in the medical treatment of breast cancer. *F1000 Research*, 5, 2-7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9619.1>
- Yudi YHC, Nugroho. H. (2016). Sitotoksisitas Fraksi *Piper porphyrophyllum* terhadap Sel Kanker T47D As – Am x 100 AK – Am. *Biosite*, 02(2), 39-43.
- Zhang M., Steven G.S., Yin L, et al., 2011. Antioxidant properties of Quercetin: Oxygen transport to tissue XXXII. London: Springer.