

## Artikel Penelitian

# Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47D Secara In Vitro

Wiwi Pertiwi<sup>1</sup>, Dessy Arisanty<sup>2</sup>, Linosefa<sup>3</sup>

## Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak di Indonesia dengan angka mortalitas yang tinggi. Kandungan acetogenin, alkaloid, tannin, dan flavonoid pada daun sirsak dipercaya dapat menghambat pertumbuhan sel kanker.

**Tujuan:** Mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D secara in vitro.

**Metode:** Ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode MTT menggunakan *cell line* T47D yang dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirsak dan tiga variasi masa inkubasi serta pengulangan sebanyak empat kali. Pemeriksaan dibaca menggunakan *xMark microplate reader* dan selanjutnya ditentukan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel. **Hasil:** Ada penurunan viabilitas sel seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan pada ketiga masa inkubasi. Konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel pada masa inkubasi 24 jam 569,8 µg/ml, 48 jam 431,6 µg/ml, dan 72 jam 94,26 µg/ml. **Simpulan:** Ekstrak daun sirsak berpengaruh terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D dan dapat menghambat 50% viabilitas sel pada konsentrasi 94,26 µg/ml pada masa inkubasi 72 jam yang berpotensi sebagai antikanker.

**Kata kunci:** ekstrak daun sirsak, viabilitas, *cell line* T47D

## Abstract

*Breast cancer is the most common type cancer in Indonesia with a high mortality rate. The component of acetogenins, alkaloids, tannins, and flavonoids in soursop leaves are believed to inhibit the growth of cancer cells.*

**Objectives:** *To determined the effect of soursop leaf extract for the viability of T47D breast cancer cell line in vitro.*

**Methods:** *This study was an experimental design with the MTT method using T47D cell lines which was divided into eight groups of treatment with different concentration of soursop leaf extract, three variations of incubation period, and repetition carried out four times. The test was read by xMark microplate reader and determine the concentration of extract which can inhibit 50% of cell viability.* **Results:** *The decreasing in cell viability along with increasing in concentration given during the three incubations period. The concentration of extract can inhibit 50% of cell viability during the incubation period at the 24-hour, 48-hour and 72-hour incubation period were 569.8 µg/ml, 431.6 µg/ml, and 94.26 µg/ml sequentially.* **Conclusion:** *Soursop leaves extract affect the viability of T47D breast cancer cells line in each concentration group and inhibit 50% cell viability at a concentration of 94.26 µg/ml during the 72-hour incubation period which potentially as anticancer.*

**Keyword:** *soursop leaves extract, viability, T47D breast cancer cell line*

**Affiliasi penulis:** 1. Prodi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia. 2. Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia. 3. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia.

**Korespondensi :** Dessy Arisanty,

Email:dessyarisanty@med.unand.ac.id Telp: 085278252096

## PENDAHULUAN

Penyakit kanker adalah penyakit yang timbul akibat pertumbuhan tidak normal sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker.<sup>1</sup> Ancaman kanker di Indonesia meningkat seiring dengan perubahan pola hidup masyarakat.<sup>2</sup> Berdasarkan *Pathological Based*

*Registration* di Indonesia tahun 2010, kanker payudara merupakan kanker terbanyak di Indonesia dengan frekuensi relatif 18,6%. Angka kejadian di Indonesia diperkirakan 12/100.000 wanita dengan angka mortalitas yang tinggi.<sup>3</sup>

Kehilangan atau tidak responnya suatu sel terhadap pengaturan pertumbuhan sel normal menyebabkan terjadinya tumor yang dapat menginvasi dan merusak jaringan sekitarnya dan dapat bermetastasis ke jaringan lain.<sup>3</sup> Subtipe molekuler kanker payudara terdiri dari Luminal A, Luminal B, Claudin low, Basal like breast cancer, dan HER2. *Cell line* T47D termasuk pada subtipe luminal A dengan *marker* ER+, PR+, HER2-, dan Ki-67.<sup>4</sup> Angka kejadian kanker payudara dengan subtipe luminal A adalah sekitar 50-60% dari populasi penderita kanker payudara. Pasien dengan kanker payudara tipe luminal A memiliki prognosis yang baik dan relaps yang lebih rendah dibandingkan subtipe lainnya.<sup>5</sup> Pengobatan kanker payudara yang umum dilakukan adalah pembedahan yaitu dengan mengangkat jaringan kanker, namun masih beresiko tumbuh menjadi jaringan kanker baru karena pengangkatan yang tidak sempurna. Selain itu, bisa juga dilakukan kemoterapi dan radioterapi namun selain dapat membunuh sel kanker juga dapat merusak sel normal.<sup>6</sup> Pada kanker payudara dengan subtipe luminal A yang tidak respon dengan kemoterapi, pilihan terapi ajuvan utamanya adalah hormonal.<sup>3</sup> Sekarang ini menjadi populer di masyarakat pengobatan kanker dengan ekstrak daun sirsak karena aman, dan tidak menimbulkan efek samping.<sup>7</sup>

Sirsak (*Annona muricata* Linn) merupakan tanaman buah yang berasal dari family *Annonaceae* yang tersebar di daerah tropis dan subtropis di dunia, dan bermanfaat sebagai antikanker, antikonvulsan, antirematik, antiparasit, antimalaria, hepatoprotektif dan antidiabetes. Studi fitokimia mengungkapkan bahwa *annonaceous acetogenins* adalah komponen utama dari *A.muricata*.<sup>8</sup> Daun, batang, kulit batang, dan biji sirsak mengandung senyawa acetogenin yang memiliki kerja antitumor dan toksisitas selektif terhadap sel kanker.<sup>9</sup> Kandungan senyawa pada daun sirsak acetogenin berfungsi sebagai sitotoksik yang berpotensi sebagai antikanker. Acetogenin merupakan

inhibitor dari kompleks 1 mitokondria yang menyebabkan penurunan produksi ATP sehingga menyebabkan kematian sel kanker.<sup>10</sup> Pada daun sirsak juga terkandung alkaloid, tannin, dan flavonoid yang berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker.<sup>11</sup> Efek senyawa aktif timbul akibat adanya interaksi pada sel. Intensitas efek senyawa aktif berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikatnya, dan intensitas efek akan mencapai maksimal jika semua reseptor diduduki oleh senyawa aktif sehingga mencetuskan perubahan biokimiawi dan fisiologis sehingga respon sel terhadap suatu senyawa bioaktif akan berbeda-beda.<sup>12</sup>

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rosa Adelina telah membuktikan potensi ekstrak daun sirsak sebagai antiproliferasi sel kanker hepar tikus terinduksi 7,12 Dimetilbenz [] antracene (DMBA), dilihat dari hasil pemeriksaan histopatologi dan penentuan aktivitas proliferasi sel hepar dengan AgNOR menunjukkan adanya penurunan aktivitas proliferasi sel hepar secara signifikan.<sup>6</sup> Berdasarkan penelitian Yahaya Gavamukulya menunjukkan meningkatnya persentase kematian sel dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak pada kanker payudara *cell line* MDA dan SKBR3 secara *in vitro*.<sup>13</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Agli Adhitya Anugrah Putra pada tahun 2012 juga menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirsak terhadap sel kanker serviks uteri HeLa, dimana terjadi penurunan jumlah sel HeLa seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak.<sup>14</sup>

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D.

## METODE

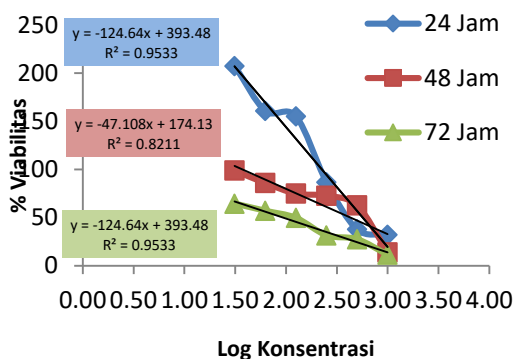
Penelitian dilakukan dari bulan September 2018 – Maret 2019 di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas untuk pembuatan ekstrak daun sirsak dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang. Subjek pada penelitian ini adalah *cell line* T47D dengan kondisi 80% konfluens, tumbuh dan berkembang dengan baik,

intak, dan tidak terkontaminasi. Sampel akan dibagi menjadi delapan kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirsak yaitu 1000 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml, 125 $\mu$ g/ml, 62,5 $\mu$ g/ml, 31,25 $\mu$ g/ml, kontrol sel, dan kontrol media. Masing-masing perlakuan akan diinkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam, dan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.

Viabilitas sel diperiksa menggunakan metode MTT. Hasil akan dibaca menggunakan alat *Xmark microplate reader* dengan metode kolorimetri sehingga dihasilkan nilai absorbansi. Berdasarkan nilai absorbansi akan ditentukan persentase sel hidup dan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel.

## HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D secara *in vitro* dengan masa inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam didapatkan hasil sebagai berikut:



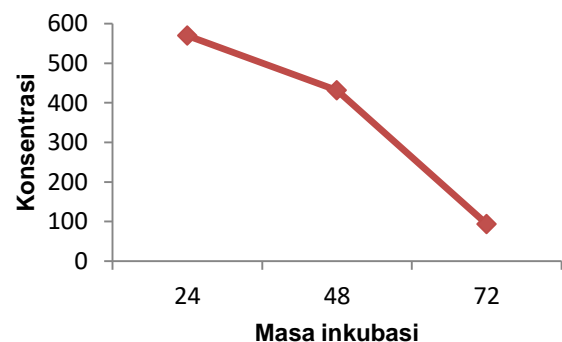
**Gambar 1.** Viabilitas sel line kanker payudara T47D berdasarkan masa inkubasi.

Pada Gambar 1 didapatkan hasil bahwa ekstrak daun sirsak dalam konsentrasi yang berbeda menghasilkan viabilitas sel yang berbeda. Pada masa inkubasi 24 jam, viabilitas sel terkecil didapatkan pada pemberian ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/ml sebesar 32,305% dan viabilitas sel terbesar sebesar 207,441% pada konsentrasi 31,25%. Pada masa inkubasi 48 jam, viabilitas sel terkecil didapatkan pada pemberian ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/ml sebesar 14,107% dan viabilitas sel terbesar sebesar 98,972% pada konsentrasi 31,25%. Pada masa inkubasi 72 jam,

viabilitas sel terkecil didapatkan pada pemberian ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/ml dengan persentase viabilitas sel sebesar 11,513%. dan persentase viabilitas sel terbesar sebesar 64,639% pada konsentrasi 31,25%. Dari penelitian ini didapatkan semakin besar konsentrasi maka viabilitas sel akan menurun, serta semakin lama masa inkubasi persentase viabilitas sel juga akan rendah.

Hubungan antara konsentrasi ekstrak daun sirsak dengan viabilitas sel dapat menggunakan grafik log konsentrasi dengan viabilitas sel. Dari grafik tersebut selanjutnya dapat ditentukan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel berdasarkan nilai regresi. Pada masa inkubasi 24 jam didapatkan persamaan regresi  $y = a + bx$  dengan nilai  $a$  sebesar 393,48, nilai  $b$  sebesar -124,64. Pada persamaan regresi  $y = 393,48 + (-124,64)x$  dan mengganti nilai  $y$  dengan 50% didapatkan nilai  $x$  sebesar 2,755, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel kanker sebesar 569,8 $\mu$ g/ml dan nilai  $R = 0,95$ .

Pada masa inkubasi 48 jam didapatkan persamaan regresi  $y = 174,13 + (-47,108)x$  dan mengganti nilai  $y$  dengan 50% didapatkan nilai  $x$  sebesar 2,63, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel kanker sebesar 431,6  $\mu$ g/ml dan nilai  $R = 0,82$ . Masa inkubasi 72 didapatkan persamaan regresi  $y = 119,62 + (-35,262)x$  dan mengganti nilai  $y$  dengan 50% dan didapatkan nilai  $x$  sebesar 1,97, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel kanker sebesar 94,26  $\mu$ g/ml dan nilai  $R = 0,97$ .



**Gambar 2.** Konsentrasi ekstrak yang menghambat 50% viabilitas sel berdasarkan masa inkubasi.

Variasi masa inkubasi juga berpengaruh terhadap konsentrasi yang dapat menghambat 50% viabilitas sel kanker. Hasil ditemukan secara berurutan yaitu 569,8 µg/ml, 431,6 µg/ml, dan 94,26 µg/ml, artinya semakin lama masa inkubasi menghasilkan konsentrasi yang semakin kecil.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D secara in vitro dengan menggunakan metode MTT. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, pembuatan ekstrak, subkultur sel, pembuatan dan pemberian larutan uji, pemberian larutan MTT, dan pembacaan absorbansi menggunakan *xMark microplate reader*.

Pada penelitian ini diketahui terdapat pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D dengan ditemukan penurunan persentase viabilitas sel seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang diberikan pada ketiga masa inkubasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yahaya Gavamukulya yang menunjukkan terdapatnya efek sitotoksik ekstrak daun sirsak dengan meningkatnya kematian sel seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap sel kanker payudara *cell line* MDA, dan SKBR3 dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masingnya adalah 248,77 µg/ml dan 202,33 µg/ml, dan tidak memiliki efek sitotoksik pada sel normal lien.<sup>13</sup>

Konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel didapatkan 569,8 µg/ml pada masa inkubasi 24 jam, 431,6 µg/ml, dan 94,26 µg/ml pada masa inkubasi 72 jam. Dari hasil penelitian didapatkan ekstrak daun sirsak baru dapat menghambat pertumbuhan *cell line* kanker payudara T47D setelah 72 jam.

Pada penelitian yang dilakukan semakin besar konsentrasi ekstrak daun sirsak yang diberikan semakin kecil persentase viabilitas sel, dan semakin lama masa inkubasi semakin rendah persentase viabilitas sel. Berdasarkan teori Menten mengenai pendudukan reseptor mengatakan bahwa efek suatu senyawa bioaktif akan muncul oleh karena adanya interaksi dengan reseptor pada sel, intensitas efek

bahan bioaktif berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikat, dan fraksi reseptor tergantung pada dosis dan lama paparan. Semakin lama paparan dan semakin besar dosis, maka intensitasnya akan meningkat.<sup>15</sup> Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Reta Fitriana Kusuma yaitu terdapat pengaruh antara lamanya masa inkubasi terhadap proliferasi sel kanker payudara dan nilai IC<sub>50</sub>.<sup>16</sup>

*Chinese Herbal Medicine* (CHM) sudah digunakan sebagai terapi kanker payudara. Bahan bioaktif herbal didapatkan dari hasil ekstraksi bahan alami seperti tanaman, hewan, serangga, dan batu serta mineral. CHM berperan sebagai antikanker dengan menginduksi apoptosis dan diferensiasi, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, menghambat angiogenesis, *reversing multidrug resistance* (MDR).<sup>17</sup>

Daun sirsak dipercaya oleh masyarakat berfungsi sebagai antikanker. Ekstrak daun sirsak dapat menurunkan persentase viabilitas *cell line* kanker payudara T47D diduga karena adanya kandungan acetogenin. Acetogenin memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker dengan menghambat kompleks I mitokondria sehingga akan terjadi penurunan produksi ATP, menginduksi apoptosis, dan mengaktifkan p53 serta dapat menghentikan siklus sel pada fase G1 sehingga menyebabkan kematian sel. Ekstrak daun sirsak juga dapat menghambat migrasi dan invasi dari sel kanker.<sup>8</sup> Pada daun sirsak juga terkandung alkaloid, tannin, dan flavonoid yang berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker.<sup>12</sup> Flavonoid memiliki efek antikanker dengan menghambat pertumbuhan sel dan aktivitas kinase, menginduksi terjadinya apoptosis, penekanan ekspresi matriks metalloproteinase dan perilaku invasif tumor, serta antiproliferasi.<sup>18</sup>

Pada penelitian ini ditemukan meningkatnya intensitas warna ungu pada persentase sel hidup yang tinggi dengan konsentrasi ekstrak yang rendah. Penelitian ini dilakukan dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) untuk mengukur jumlah sel hidup atau viabilitas sel. Serbuk garam tetrazolium kuning dilarutkan dengan PBS dan diletakan pada setiap sumuran sel. Garam tetrazolium akan berkurang karena enzim

dehydrogenase yang terdapat pada sel yang aktif secara metabolik, sehingga akan menghasilkan kristal formazan yang berwarna ungu. Kristal formazan tersebut akan dilarutkan menggunakan DMSO dan selanjutnya warna ungu yang terbentuk dapat diukur menggunakan xMark microplate reader untuk menilai absorbansi. Jumlah sel hidup yang aktif dan intensitas warna ungu yang terbentuk memiliki hubungan yang linier, sehingga reagen MTT akan menghasilkan nilai absorbansi yang rendah ketika tanpa adanya sel hidup.<sup>19</sup>

## SIMPULAN

Konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat viabilitas sel sebanyak 50% berdasarkan masa inkubasi secara berurutan adalah 569,8 µg/ml, 431,6 µg/ml, dan 94,26 µg/ml. Konsentrasi ekstrak daun sirsak yang berpotensi sebagai antikanker adalah 94,26 µg/ml masa inkubasi 72 jam.

## SARAN

Pada penelitian selanjutnya, disarankan untuk meneliti cara kerja ekstrak daun sirsak dalam mempengaruhi viabilitas *cell line* kanker payudara T47D secara seluler dan molekuler, membandingkan pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas sel kanker payudara dan sel payudara normal. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* pada hewan coba sehat dan hewan coba yang diinokulasi kanker payudara, dan efek samping serta komplikasi dari ekstrak daun sirsak.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada pihak Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dan Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang sudah membantu dalam memudahkannya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan RI. Stop kanker. Jakarta Selatan: Infodatin Kemenkes RI. 2015.
2. Kementerian Kesehatan RI. Bulan peduli kanker payudara. Jakarta: Infodatin Kemenkes RI; 2016.
3. Komite Nasional Penanggulangan Kanker. Panduan penatalaksanaan kanker payudara. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. 2017.
4. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *BioMed Cent*. 2011;13:1–5.
5. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412.
6. Adelina R. Ekstrak daun *Annona muricata* Linn sebagai antiproliferasi terhadap sel hepar tikus terinduksi 7,13 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *Kefarmasian Indones*. 2014;4(1):1–12.
7. Muhartono S. Penggunaan ekstrak daun sirsak sebagai obat kemoterapi kanker payudara. Dalam: *Prosiding Seminar Presentasi Artikel Ilmiah Dies Natalis FK Unila ke 13*; 2015.
8. Moghadamtousi SZ, Mehran F, Sonia N, Gokula M, Hapipah MA, Habsah AK. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15625–58.
9. Latief A. Obat tradisional. Jakarta: EGC; 2012. hlm. 243-5.
10. Retnani V. Pengaruh suplementasi ekstrak daun *Annona muricata* terhadap kejadian dysplasia epitel kelenjer payudara tikus Sprague dawley yang di induksi 7,12 dimetilbenz[a]anthracene [skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro; 2011.
11. Arifianti L, Sukardiman, Herra S, Rakhmawati, Lulus M. Uji aktivitas ekstrak biji sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap sel kanker mamalia secara *in vitro*. *J Farm dan Ilmu Kefarmasian Indones*. 2014;1(2):63-6.
12. Setiawati A. Pengantar farmakologi. Edisi ke-4. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1995.hlm.10-5.
13. Gavamukulya Y. Phytochemical screening, antioxidant activity and *in vitro* anticancer potensial of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7(1): S355–S63.
14. Putra AAA. Pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap ekspresi gen caspase

- 3 pada kultur sel kanker serviks uteri HeLa [skripsi]. Bandung: Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung; 2012.
15. Rachmawati E, Setyawati K, Hidayat S. Efek ekstrak etanolik daun sirsak pada proliferasi dan apoptosis sel HeLa yang dimediasi oleh p53. *J Kedokt Brawijaya*. 2012;27(1): 28-33.
  16. Kusuma RF. Nilai IC50 proliferasi sel kanker payudara yang diberi ekstrak umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) (Studi eksperimen in vitro terhadap sel T47D pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam) [skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung; 2015.
  17. Ruan W, Lai M, Zhou J . Anticancer effects of Chinese herbal medicine , science or myth?. *J Zhejiang Univ Science B* 2006;7(12):1006–1014.
  18. Kandaswami C. The antitumor activities of flavonoids. *Vivo J*. 2005;19(5):895–909.
  19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.