

UJI ISOLAT AKTIF DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP SEL HELA DAN KARAKTERISASINYA

Okid Parama Astirin¹⁾, Mira Hartati¹⁾, Inayah¹⁾, Anif Nur Artanti¹⁾,
Adi Prayitno²⁾, dan Vector Dewangga³⁾

¹⁾ Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta

²⁾ Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta

³⁾ Program Pascasarjana, PS Biosain, Universitas Sebelas Maret, Surakarta
Surel: parama_astirin@yahoo.com

ABSTRACT

Cancer is a disease that is ranked second leading cause of death in the world. Indonesia is the second country in the world after China, which has the majority of people with cancer of the cervix uteri. Cervical cancer cells infected with HPV known to express 2 oncogene, ie E6 and E7. Both oncogene is a protein that can inhibit the expression of the p53 gene as a cancer suppressor gene. Drugs that are used usually in the form of a chemical drug that works with the system cycle dependent drug that kills cancer selectively in phases of growth such as the stage of mitosis or DNA synthesis, Most chemotherapeutic drugs have side effects and complications such as damage to the network are still healthy. Therefore began much research on drug ingredients from nature that can serve as an anti-cancer chemoprevention as an agent that has potential as a companion agent chemotherapy. The aim of this research activity of *Annona muricata* L. isolates active against HeLa cells. Cytotoxicity assay performed with MTT-assay method, after the pure isolates obtained structural characterization using FT-IR and UV-Vis spectrophotometry. The spectra obtained is then interpreted to be the chemical cluster compounds. Active isolates from chloroform-ethyl acetate fraction leaves of the soursop (*A. muricata* L.) has a IC_{50} value against HeLa cells amounted to 77.096 $\mu\text{g/ml}$. Tests using KLT found that the most active isolates from chloroform-ethyl acetate fraction leaves of the soursop (*A. muricata* L.) contain compounds terpenoids and steroids. Of testing using FT-IR absorption peak found 16, existence lactone group derived from the group C = O on γ - butyrolactone, which allegedly is a lactone group constituent acetogenin

Keywords: HeLa, *Annona muricata*, lacton group.

ABSTRAK

Kanker merupakan penyakit yang menempati peringkat kedua penyebab kematian di dunia. Indonesia merupakan negara kedua di dunia setelah China yang memiliki pengidap kanker servik uteri terbanyak. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen tersebut merupakan protein yang dapat menghambat ekspresi gen p53 sebagai gen penekan kanker. Obat-obatan yang digunakan biasanya berupa obat kimia yang bekerja dengan sistem cycle dependent drug yang membunuh kanker secara selektif pada fase-fase pertumbuhannya seperti tahap mitosis atau pada sintesis DNA, Kebanyakan obat-obat kemoterapi memiliki efek samping dan komplikasi berupa kerusakan-kerusakan pada



jaringan yang masih sehat. Oleh karena itu mulai banyak dilakukan penelitian tentang bahan obat dari alam yang dapat berfungsi sebagai antikanker sebagai agen kemoprevensi yang berpotensi sebagai agen pendamping khemoterapi. Penelitian ini bertujuan aktifitas isolat aktif *Annona muricata* L. terhadap sel HeLa. Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT-assay, setelah didapatkan isolat murni dilakukan karakterisasi struktur dengan menggunakan FT-IR dan spektrofotometri UV-Vis. Spektra yang diperoleh kemudian diinterpretasi untuk dilihat gugus kimia senyawanya. Isolat aktif dari fraksi kloroform-etil asetat daun sirsak (*A. muricata* L.) memiliki nilai IC_{50} terhadap sel HeLa sebesar 77,096 $\mu\text{g/ml}$. Pengujian dengan menggunakan KLT dijumpai bahwa isolat teraktif dari fraksi kloroform-etil asetat daun sirsak (*A. muricata* L.) mengandung senyawa terpenoid dan steroid. Dari pengujian menggunakan FT-IR dijumpai 16 peak serapan, keberadaan gugus lakton yang berasal dari gugus C=O pada γ – butirolakton, yang diduga merupakan gugus lakton penyusun acetogenin.

Kata kunci: *Annona muricata*, HeLa, gugus lakton

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang menempati peringkat kedua penyebab kematian di dunia. Indonesia merupakan negara kedua di dunia setelah China yang memiliki pengidap kanker servik uteri terbanyak (Meiyanto *et al.*, 2006). Saat ini kanker merupakan salah satu penyebab kematian yang paling sering terjadi dan kasus penderita senantiasa bertambah (Mutschler, 1991).

Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen tersebut merupakan protein yang dapat menghambat ekspresi gen p53 sebagai gen penekan kanker. Pada peristiwa ini onkogen lebih tinggi jumlahnya dibandingkan p53 sehingga proliferasi sel kanker menjadi tidak terkendali (Prayitno, 2006; Goodwin & DiMaio, 2000). Obat-obatan berupa obat kimia bekerja dengan sistem *cycle dependent drug* yang membunuh kanker secara selektif pada fase-fase pertumbuhannya seperti tahap mitosis atau pada sintesis DNA (Robins & Kumar, 1997).

Kebanyakan obat-obat kemoterapi memiliki efek samping dan komplikasi berupa kerusakan-kerusakan pada jaringan yang masih sehat (Cotrans *et al.*,

1997).Telahdibuktikanadanyaefek negatif obat kanker terhadap sel normal (dalam hal ini penerapan dilakukan pada hewan percobaan) maupun terhadap beragam kultur sel kanker (*human cell line*). Oleh karena itu mulai banyak dilakukan penelitian tentang bahan obat dari alam yang dapat berfungsi sebagai antikanker (Wahyuningsih & Yustina, 1999)sebagai agen kemoprevensi yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Tujuannya adalah untuk memperkecil efek negatif yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi.

Banyak penelitian yang menggunakan ekstrak tanaman sirsat (*Annona muricata* L.) untuk berbagai *cell line* kanker. De Melo *et al.* (2010) menyatakan ekstrak methanol *A. muricata* L. berpotensi sebagai anti kanker antara lain pada HEP-2 (*laryngeal cancer*) and NCI-H292 (*lungcancer*); kanker ovarium, myeloma dan leukemia urin tikus putih (McLaughlin *et al.*, 2009).Penelitian ini menggunakan isolat aktif *Annona muricata* L. yang telah dimurnikan terhadap sel HeLa namun belum pernah sebelumnya dikarakterisasi oleh Astirin *et al.* (2013). Penelitian ini bertujuan menguji aktifitas bioaktif dan sitotoksisitas pada sel HeLa sebagai model kanker serviks yang disebabkan oleh virus.

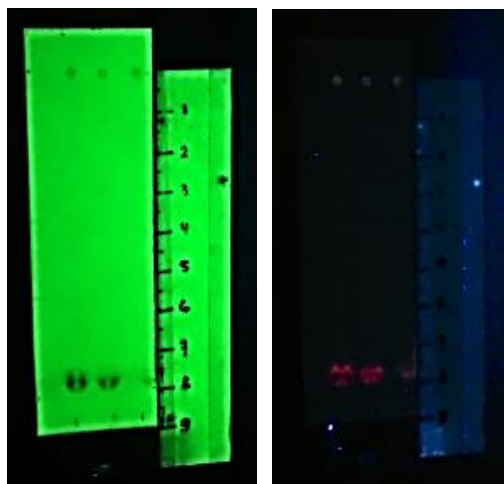
METODOLOGI

Fraksinasi dilakukan menggunakan *Vaccum Liquid Chromatography*. Setelah diperoleh banyak fraksi, profil kandungan senyawa kimia dimonitor menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian diuji dengan menggunakan KLT untuk dicari fraksi mana yang menghasilkan spot tunggal. Setelah didapatkan isolat murni dilakukan karakterisasi struktur dengan menggunakan FT-IR

dan spektrofotometri UV-Vis. Uji sitotoksitas terhadap Sel HeLa dilakukan dengan metode MTT-assay .

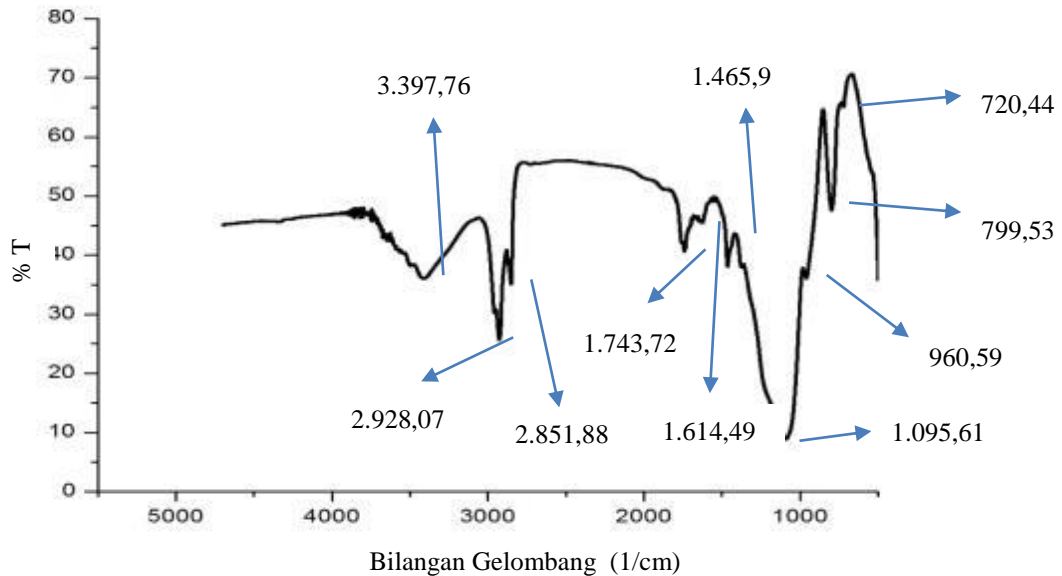
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi senyawa tunggal dilakukan dengan teknik VLC (*Vaccum Liquid Chromatography*). Fraksi hasil VLC selanjutnya dideteksi dengan TLC, tujuannya untuk melihat kemurnian fraksi paling aktif paska VLC. Profil spot menunjukkan adanya senyawa tunggal. Pada Gambar 1, hasil sinar UV₂₅₄ memperlihatkan terjadinya peredaman yang ditandai dengan adanya beberapa zona gelap berlatar belakang fluoresensi hijau. Peredaman tersebut menunjukkan adanya kandungan suatu senyawa. Dalam pengamatan dengan sinar UV₃₆₆ terlihat spot yang berpendar dan berwarna, hal itu menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang sehingga dapat berpendar pada penyinaran dengan UV gelombang panjang.



Gambar 1. Bercak Tunggal Isolat pada Panjang Gelombang 254 nm (Kiri) dan 366 nm (Kanan) panah

Setelah didapatkan isolat murni dilakukan karakterisasi struktur dengan menggunakan FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*). Untuk mengetahui lebih detail senyawa yang terdapat pada isolat aktif *A. muricata* L., karakterisasi isolat dilakukan dengan menggunakan FT-IR dan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 2. Grafik FT-IR Isolat Aktif *A. muricata* L.

Gambar 2 dijumpai 16 titik serapan yang mewakili 16 gugus fungsional yang terdapat pada isolat aktif *A. muricata* L. Mengacu pada Pradana *et al.* (2015), interpretasi serapan dilakukan hingga panjang gelombang maksimum 500 cm^{-1} , hingga hanya diambil 15 titik serapan yang memenuhi tabel standar rentang bilangan gelombang FT-IR. Serapan yang muncul pada FT-IR diinterpretasikan seperti pada Tabel 1.

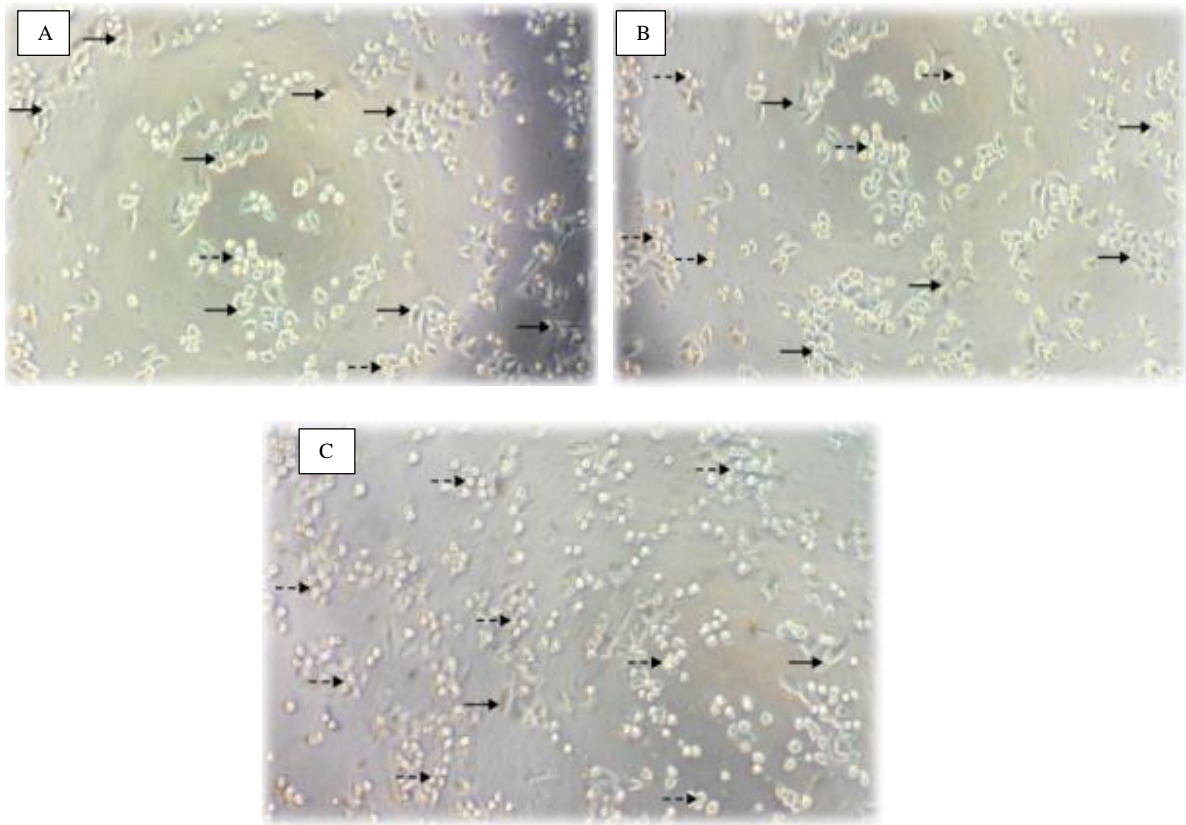
Tabel 1. Interpretasi FT-IR

| Serapan | Bilangan Gelombang (1/cm) | Intepretasi Gugus |
|---------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 3.397,76 | O-H (hidroksil alkohol) |
| 2 | 2.958,93 | C-H (alkana jenuh) |



| Serapan | Bilangan Gelombang (1/cm) | Intepretasi Gugus |
|---------|---------------------------|--------------------------------------|
| 3 | 2.928,07 | C-H (alkana jenuh) |
| 4 | 2.851,88 | C-H (alkana jenuh) |
| 5 | 1.870,07 | C=O |
| 6 | 1.762,05 | Siklobutanon / fenolik ester |
| 7 | 1.743,72 | C=O |
| 8 | 1.614,49 | C=C |
| 9 | 1.465,96 | H-C-H |
| 10 | 1.375,30 | Karboksilat |
| 11 | 1.095,61 | C-O / C-C |
| 12 | 960,59 | C-H aromatik |
| 13 | 799,53 | C-H aromatik |
| 14 | 720,44 | C-H aromatik |
| 15 | 545,88 | Alkil - |
| 16 | 464,86 | C-H out plane, p- substitusi benzene |

Dari pengamatan (Gambar 3) terlihat bahwa penambahan konsentrasi ekstrak uji menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah kematian sel. Jumlah sel hidup pada kontrol negatif lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel hidup

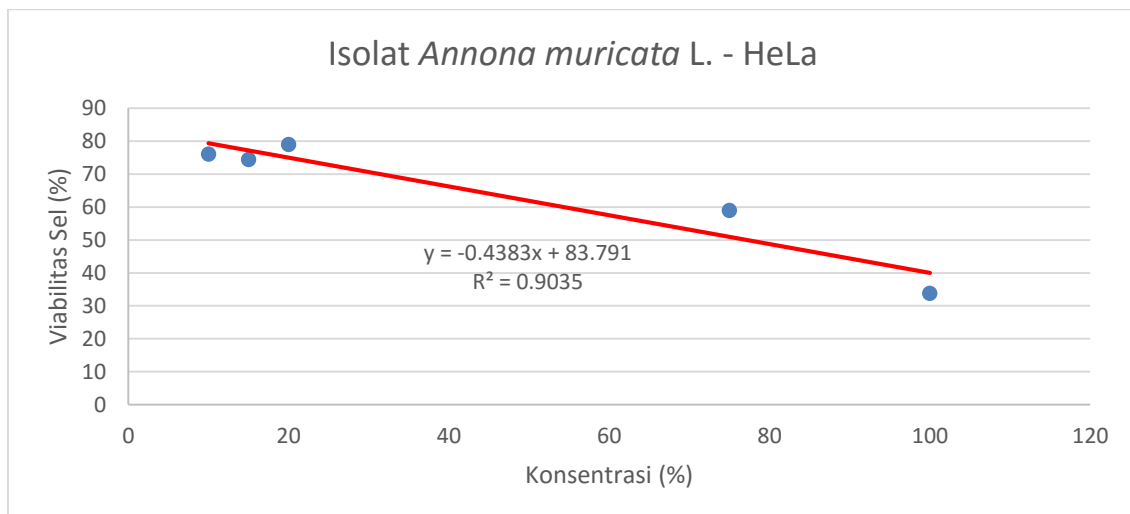


Gambar 3. Profil Sel HeLa paska pemberian isolat aktif *Annona muricata* L., perbesaran 100x (Keterangan: → sel hidup, - → sel mati; A: konsentrasi 50 µg/ml, B: konsentrasi 75 µg/ml, C: konsentrasi 90 µg/ml)

Setelah didiamkan semalam, kemudian dibaca menggunakan *ELISA Reader* untuk menentukan nilai absorbansi. panjang gelombang yang digunakan adalah 550 nm merupakan panjang gelombang maksimum untuk mendapatkan pengukuran yang sensitif dan spesifik (Pebriana *et al.*, 2008). Hasil pengamatan sel dengan metode MTT-Assay dihitung persentase sel hidup dan analisis harga IC_{50} dengan program Microsoft Excel (regresi linear dari log konsentrasi) seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel Nilai Absorbansi ELISA Reader

| No. | Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) | Rata-rata absorbansi | Rata-rata viabilitas sel (%) |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1 | 10 | 0,802 | 76,17 |
| 2 | 15 | 0,788 | 74,51 |
| 3 | 20 | 0,827 | 79,02 |
| 4 | 75 | 0,654 | 59,01 |
| 5 | 100 | 0,436 | 33,82 |
| kontrol sel | | 1,008 | 98,23 |
| kontrol media | | 0,144 | 0,00 |



Gambar 4. Grafik Regresi Pengaruh Konsentrasi Isolat *Annona muricata L.* dengan Viabilitas Sel HeLa

Dari Gambar 4 diperoleh nilai $R^2 = 0.9035$ yang mendekati angka 1, ini berarti isolat teraktif *A. muricata L.* memiliki pengaruh yang signifikan terhadap viabilitas sel HeLa. Kurva Gambar 4 menunjukkan persamaan garis $y = -0.4383x + 83.791$, sehingga

diperoleh nilai IC_{50} sebesar 77,096 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian sel HeLa oleh Witianingsih (2014), dimana diperoleh nilai IC_{50} dari fraksi kloroform *A. muricata* L sebesar 166,32 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} antara isolat dibandingkan fraksi jauh lebih kecil, hal ini terjadi karena senyawa yang terdapat pada fraksi masih bersifat umum, belum sampai pada senyawa yang paling aktif.

Menurut **Waechter et al. (1997)**, *acetogenin* sangat selektif, hanya menyerang sel kanker yang memiliki kelebihan *ATP*. Senyawa ini tak menyerang sel-sel lain yang normal di dalam tubuh, mengganggu peredaran sel kanker dengan cara mengurangi jumlah *ATP*. Beberapa literatur menyebutkan bahwa kandungan *acetogenin* dalam *A. muricata* L. memiliki mekanisme inhibisi kompleks I mitokondria, mekanisme itu akan mengganggu proses transfer elektron. Inhibisi kompleks I mitokondria oleh asetogenin akan menyebabkan menurunnya produksi *ATP*. Penurunan jumlah *ATP* akan menginduksi apoptosis (*Bri'ere et al.*, 2009; Apte and Sarangarajan, 2009).

Mekanisme penghambatan sel HeLa dapat terjadi melalui tiga mekanisme, antara lain *cell cycle arrest* (penghentian siklus sel), *cell cycle delay* (penghambatan siklus sel) atau mekanisme apoptosis. Menurut Kamuhabwa *et al* (2000), nilai $IC_{50} < 100$ $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan sebagai senyawa antiproliferatif. Dari acuan tersebut maka nilai IC_{50} fraksi teraktif daun sirsak memiliki efek antiproliferatif dengan dugaan mekanisme *cell cycle delay*.

Senyawa *acetogenin* memiliki ciri khas berupa adanya gugus laktone pada salah satu ujungnya sehingga karakterisasi menggunakan spektrofotometri inframerah dapat membantu (*Pradana et al.*, 2015). Pada hasil spektrofotometri inframerah yang ditunjukkan oleh Gambar 2, serapan pada 3.397,76 cm^{-1} cukup lebar yang menunjukkan adanya gugus O-H alkohol, O-H alkohol memiliki ciri khas berupa bentuk serapan yang

melebar pada $3.600\text{--}3.300\text{ cm}^{-1}$. Serapan khas lainnya terdapat pada $2.928,07\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya rantai C-H yang tidak simetris dan $2.851,88\text{ cm}^{-1}$ yang menandakan adanya rantai menunjukkan adanya C-H simetris, kedua gugus yang berdekatan tersebut menunjukkan vibrasi adanya rantai C-H sp^3 . Vibrasi pada $1.465,96\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi C-H bengkok berupa vibrasi guntingan (Silverstein *et al.*, 2005).

Acetogenin ialah senyawa poliketida dengan struktur 30–32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* di C_{23} memiliki aktivitas sitotoksik. Derivat *acetogenin* yang berfungsi sitotoksik adalah *asimicin*, *bulatacin*, dan *squamocin* (Kardinan, 2005). Menurut Ferras (1999), hasil uji UV-Vis pada absorbansi tinggi (panjang gelombang 222 dan 230 nm) dapat menjadi penanda keberadaan gugus ketolakton dan tetrahidrofuran. Mengacu pada hasil tersebut, keberadaan gugus senyawa pada panjang gelombang tersebut diduga dimiliki oleh senyawa turunan *acetogenin* yaitu *rollidecin*, *rollitacin* atau *rollinacin* (Feras, 1999).

KESIMPULAN

- a. Isolat aktif dari fraksi kloroform-etil asetat daun sirsak (*A. muricata* L.) memiliki nilai IC_{50} terhadap sel HeLase besar $77,096\text{ }\mu\text{g/ml}$.
- b. Pada pengujian dengan menggunakan KLT dijumpai bahwa isolat teraktif dari fraksi kloroform-etil asetat daun sirsak (*A. muricata* L.) mengandung senyawa terpenoid dan steroid. Dari pengujian menggunakan FT-IR dijumpai 16 *peak* serapan, serapan pada $1.743,72\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan keberadaan gugus lakton yang berasal dari gugus C=O pada γ – butirolakton, yang diduga merupakan gugus



lakton penyusun *acetogenin*. Dari pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dijumpai puncak absorpsi pada panjang gelombang 210 nm, 213 nm, 216-234 nm, yang menunjukkan adanya gugus ketolakton

DAFTAR PUSTAKA

- Apte SP & Sarangarajan R. 2009. *Metabolic Modulation of Carcinogenesis In Cellular Carcinogenesis and Respiration*. In: Apte, S.P, and Sarangarajan R., editors. Cellular Carcinogenesis and Respiration. Springer, New York.
- Astirin OP, Artanti AN, Fitria MS, Perwitasari EA, & Prayitno A. 2013. *Annona muricata* Linn leaf induce apoptosis in cancer cause virus. *Journal of Cancer Therapy* 4: 1244-1250.
- Brière JJ, Benit P, Rustin P. 2009. *The Electron Transport Chain and Carcinogenesis*. In: Apte, S.P, and R. Sarangarajan, editors. Cellular Carcinogenesis and Respiration. Springer, New York.
- Cotrans RS, Kumar V, & Robbins SL. 1997. *Robbins Patologic Basis of Disease*. 6th ed. W. B. Saunders Co., London.
- De Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim E. LC, & Albuquerque UP. 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. *Molecules* 2010 (15): 8534-8542.
- Feras & Xiao Xi Liu. 1999. *Annonaceous acetogenins: Recent Progress*. Purdue University, Indiana. USA.
- Goodwin EC & DiMaio D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12513-12518.
- Kamuhabwa A, Nshimo C, & P. de Witte. 2000. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in tanzanian tradisional medicine. *Journal of Ethnopharmacol* 70: 143-149.
- Kardinan A. 2005. *Pestisida Nabati Ramuan dan Aplikasi*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- McLaughlin. 2008. Paw-paw and cancer annonaceous acetogenin from discovery to commercial products. *J Nat Prod*. 71 (7): 1311–1321.



- Meiyanto E, Supardjan, Da'i M, & Agustina D. 2006. Efek antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 14 (1): 11-15.
- Mutschler E. 1999. *Dinamika Obat*. Ed ke-5, Cetakan Ketiga. ITB Press, Bandung.
- Pebriana RB, Wardhani BWK, Widiyanti E, Wijayanti NLS, Wijayant TR, Riyanto S, & Meiyanto E. 2008. Pengaruh ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara. *Pharmacon* 9 (1): 21-26.
- Pradana PY, Suratmo S, & Retnowati R. 2015. Isolasi dan karakterisasi senyawa turunan acetogenin dari daun sirsak (*Annona muricata*) serta uji toksisitas. *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya* 1 (1): 798-804.
- Prayitno A. 2006. Cervical Cancer with human papilloma virus and epstein barr virus positive. *Journal of Carsinogenesis* 5 (13): 1-4.
- Robins SL & Kumar MD. 1997. *Basic Pathology* part I. W.B. Sauder Co. Philadelphia. 112-207.
- Waechter AI, Ferreira ME, Fournet A, Rojasdearias, Nakayama H, Torres S, Hocquemille RR & Cavea. 1997. Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argen – tilactone isolated from *Annona haematantha*. *Planta Medica* 63:433-435.
- Wahyuningsih & Yustina A. 1999. Effect of Benalu (*Dendrophloe* sp.) Leaves Extract on The male rat (*Rattus norvegicus*) benzidine induced hepatotoxicity. *Jurnal Kedokteran Yarsi* 7 (1): 121-132.
- Witianingsih DA. 2014. Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Terhadap Sel Hela Secara In Vitro dan Profil Kandungan Kimia Fraksi Teraktif. *Skripsi*. FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.