

PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) TERHADAP VIABILITAS GALUR SEL KANKER PROSTAT

Retno Yulianti¹, Ria Kodariah², Puspita Ekawuyung²

Abstrak

Daun sirsak mengandung senyawa aktif *annonaceous acetogenins* yang memiliki efek sitotoksik pada sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas dan peningkatan daya hambat terhadap galur sel kanker prostat PC3. Desain penelitian adalah eksperimental *in vitro*. Subyek penelitian adalah *cell line* PC3 yang terbagi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol sel, kelompok perlakuan dengan ekstrak metanol daun sirsak (EMDS) dengan konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 mg/mL dan kelompok doksorubisin. Kelompok perlakuan diuji viabilitas sel dengan MTT assay pada inkubasi 0 dan 24 jam dan dilakukan pengamatan morfologi sel. Data dianalisis dengan uji statistik ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan penurunan nilai OD pada kelompok EMDS 6,25 dan 12,5 ug/mL, namun uji statistik tidak berbeda bermakna dan kemampuan menghambat viabilitas sel paling besar ada pada kelompok EMDS 12,5 ug/mL (nilai OD 0,94). Pengamatan morfologi sel menunjukkan efek sitotoksik. Kesimpulan: Ekstrak metanol daun sirsak memiliki peran potensial sebagai antikanker terhadap galur sel kanker prostat PC3 meskipun sangat kecil efek penghambatannya.

Kata kunci: ekstrak metanol daun sirsak, viabilitas sel, sel kanker PC3.

Abstract

Soursop leaves contain annonaceous acetogenins active compounds that have a cytotoxic effect on cancer cells. The aim of this study is to determine the effect of soursop leaf extract on the viability and inhibitory rate on the prostate cancer cell line PC3. The study was an experimental in vitro study. Subjects were 5 groups of PC3 cell line: cell control group, the group treated with methanol extract of soursop leaves (EMDS) with the concentrations of 6.25; 12.5 and 25 mg/mL and the doxorubicin group. The groups were tested using the MTT cell viability assay at 0 and 24 hours of incubation followed by PC3 cell morphology examination. Data were analyzed by ANOVA test. The results showed a decrease in the OD value of 6.25 and 12.5 ug/mL EMDS group, but statistical tests did not differ significantly and the EMDS 12.5 mg/mL group showed the highest ability in inhibiting cell viability (OD 0.94). Observation of cell morphology showed cytotoxic effects. Conclusion: The methanol extract of soursop leaf has a potential as an anticancer against prostate cancer cell lines despite the very small inhibitory effect.

Keywords: methanol extract of soursop leaves, cell viability, PC3 cancer cells

Afiliasi Penulis : 1. Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Pembangunan Nasional "Veteran". 2. Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Indonesia **Korespondensi:** Retno Yulianti, Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Pembangunan Nasional "Veteran", email : dr.retnoyulianti@yahoo.com

PENDAHULUAN

Saat ini permasalahan angka kematian akibat kanker semakin meningkat. Penyakit kanker menjadi penyebab kematian nomor dua di dunia. Berdasarkan data *Cancer Research UK* dan GLOBOCAN tahun 2008 diperkirakan penyakit kanker terjadi hampir 12,7 juta kasus baru dan angka kematian tercatat sebesar 7,6 juta (13%)^{1,2}, sedangkan prevalensi kanker di Indonesia mencapai 4.3 per 1.000 orang (sekitar 12 juta) pertahun.³ Salah satu kanker yang sering didiagnosis pada pria adalah kanker prostat. Data dunia menyebutkan bahwa angka kejadian kanker prostat mencapai sekitar 899.000 (13,6%), sedangkan angka kematiannya tercatat sebesar 258.000 (6,1%).² Di Indonesia, insiden kanker prostat selama periode Januari 1995 hingga Desember 2007 menurut data Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo dan Rumah Sakit Kanker Dharmais terdapat 610 kasus kanker prostat dan terjadi peningkatan hampir tiga kali lipat.⁴

Kanker merupakan penyakit multi-kompleks yang dapat merusak banyak fungsi sel dan mempunyai kemampuan untuk tumbuh cepat dan tidak terkendali serta mampu bermetastasis ke jaringan tubuh lain yang jauh dari tempat asalnya.⁵ Efek samping dan efek resistensi tubuh terhadap obat kemoterapi serta biaya pengobatan yang mahal menjadikan alasan yang mendorong pasien mencari pengobatan alternatif seperti obat herbal. Masyarakat masih menganggap obat herbal tidak memiliki efek samping yang merugikan, mudah didapat dan cukup murah dibandingkan dengan obat modern.⁶ Bahkan WHO sejak tahun 2002

membuat suatu strategi dalam pengobatan tradisional.⁷

Indonesia sebagai negara yang kaya akan sumber bahan nabati alami masih belum sepenuhnya dapat menggali dan memanfaatkan bahan obat-obatan alami terutama untuk mengatasi penyakit kanker. Sehingga perlu dieksplorasi tumbuh-tumbuhan yang ada terutama di pekarangan rumah sebagai obat tradisional, meskipun secara turun temurun masyarakat kita sudah memakai tanaman obat yang dikenal dengan jamu untuk mengatasi berbagai penyakit.

Salah satu bahan alam yang memiliki potensi sebagai obat tradisional (herbal) adalah daun sirsak. Daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) merupakan salah satu tanaman dari *family Annonaceae*. Beberapa uji fitokimia yang telah dilakukan ternyata daun sirsak mengandung senyawa kimia antara lain alkaloid, karbohidrat, glikosida, saponin, tanin, *phytosterol*, terpenoid, flavonoid, minyak esensial dan *annonaceous acetogenins*.⁸ Manfaat dari senyawa yang terkandung dalam tanaman sirsak terutama daunnya dapat digunakan untuk pestisida, antimikroba, antiparasit, antiprotozoal, pengobatan untuk asma, sakit kepala, hipertensi, batuk dan sedatif, antioksidan dan bahkan beberapa senyawa aktif daun sirsak memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker seperti kanker hati, galur sel kanker ovarium, payudara, kandung kemih dan kulit pada dosis yang rendah ($IC_{50} < 4 \text{ ug/mL}$).^{9,10}

Efek sitotoksik asetogenin dengan cara bekerja di kompleks I rantai transport elektron melalui penghambatan NADH-ubiquinon oksidoreduktase di mitokondria sebagai organ tempat dihasilkannya energi dalam bentuk ATP.

Sel-sel kanker sangat membutuhkan energi dalam bentuk ATP untuk memperbanyak diri, namun akibat efek aktivitas asetogenin sel kanker kekurangan sumber energi sehingga proses proliferasi berhenti dan selanjutnya sel kanker mengalami kematian sel.^{11,12} Meskipun memiliki efek sitotoksik, namun asetogenin bekerja secara selektif hanya menyerang sel yang abnormal dengan energi yang besar untuk pertumbuhannya.¹⁰

Salah satu turunan *annonaceous acetogenin* seperti *Annonacin* memiliki kemampuan menahan siklus sel pada fase G₁ dan menghambat masuknya sel ke dalam fase S dengan menginduksi p21, Bax dan Bad pada galur sel kanker kandung kemih T24.¹⁰

Pamungkas AR. membuktikan bahwa ekstrak metanol daun sirsak memiliki efek sitotoksik dan mampu menginduksi apoptosis pada galur sel kanker payudara T47D dengan konsentrasi IC₅₀ sebesar 46,194 µg/mL.¹³

Dari penelitian-penelitian tersebut, meskipun pendekatan secara empiris ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dipercaya berpotensi sebagai antikanker pada manusia, namun potensi yang dimiliki daun sirsak sebagai antikanker masih akan terus dikembangkan agar didapatkan informasi ilmiah yang akurat terutama untuk pengobatan kanker prostat.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik *in vitro* menggunakan rancangan *post test control group only design*. Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa tahap kegiatan, yaitu kultur galur sel kanker

prostat PC3, persiapan konsentrasi ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* L.), uji sitotoksitas MTT assay dan analisis data.

Subjek penelitian adalah galur sel kanker prostat PC3 yang didapatkan dari SCI KalGen, PT Kalbe dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif (doksorubisin), kontrol sel (kontrol negatif) dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi bertingkat yaitu 6,25; 12,5 dan 25 µg/mL.

Bahan tanaman yang digunakan adalah ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Soedirman, Purwokerto. Ekstrak metanol daun sirsak dilarutkan hingga diperoleh larutan stok 5 mg/mL kemudian dilarutkan dengan RPMI dengan cara pengenceran hingga didapatkan konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 µg/mL.

Galur sel kanker prostat PC3 dikultur di Laboratorium *Oral Biology* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, Jakarta sebagai *monolayer adherent* di dalam medium RPMI 1640, FBS 10% v/v dan 1% penisilin-streptomisin. Sel diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C, 5% CO₂. Subkultur dilakukan apabila sel mencapai konfluen 90%. Medium lama dalam *flask* kultur dibuang dan sel dibilas dengan RPMI, lalu EDTA dan tripsin 0,025% 3cc kemudian diinkubasi selama 2 menit dalam inkubator pada suhu 37°C 5% CO₂, ambil suspensi sel dan masukkan ke dalam tabung steril 15 ml untuk disentrifugasi pada kecepatan 1200 rpm 10 menit. Setelah supernatan dibuang, dilakukan penambahan media partum-

buhan baru, kemudian dibagikan ke dalam beberapa *flask* kultur.¹⁴

Uji sitotoksitas dilakukan dengan cara: sel PC3 yang sudah dipanen, selanjutnya dihitung dengan haemositometer lalu dimasukkan ke dalam 96 *well plate* yang berisi medium lengkap dengan kepadatan 20.000/*well* sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{well}$. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan *starvasi* dengan medium RPMI 1640, FBS 1% dan penisilin-streptomisin 1% selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai masukkan ekstrak metanol daun sirsak dengan konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan doksorubisin 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagai kontrol positif sebanyak 100 μL lalu inkubasi kembali selama 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, dilihat hasilnya dan difoto. Selanjutnya supernatan dibuang lalu ditambahkan MTT dengan konsentrasi 0,5 mg/mL dalam PBS dimasukkan ke masing-masing *well* sebanyak 100 μL . Kemudian diinkubasi selama 4 jam pada inkubator 5% CO₂ pada suhu 37°C. Lalu ditambah *stop solution* sebanyak 100 μL . *Stop solution* adalah larutan HCl 0,04N dalam isopropanol. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1-2 jam dan absorbansi dibaca pada serapan 595 nm dengan *Elisa reader*.¹⁵ Dilakukan juga pada kontrol sel dan kontrol media. Setiap pengujian dilakukan *duplo*.

Data yang diperoleh sebelum dianalisa lebih lanjut akan diuji normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan homogenitasnya dengan uji *Levene*. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun sirsak terhadap galur sel kanker prostat PC3 dilakukan uji *one way Anova* dilanjutkan uji *t-dependen* namun jika data tidak berdistribusi normal dan homogen maka

analisa dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis* untuk membandingkan data lebih dari dua sampel yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antara data kelompok kontrol dengan data kelompok perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan interval kepercayaan 95% dan $p < 0,05$.¹⁶

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) maka dilakukan uji kolorimetris kuantitatif untuk proliferasi sel (viabilitas sel) yaitu menggunakan metode tidak langsung MTT assay. Prinsip MTT memperlihatkan aktivitas metabolik di mitokondria sel hidup, yang tergantung pada reduksi garam tetrazolium MTT oleh enzim *suksinat dehidrogenase* mitokondria sel viable, untuk membentuk produk formazan ungu yang jumlahnya setara dengan jumlah sel hidup yang terdapat dalam kultur.¹⁵ Artinya, intensitas warna ungu yang terbentuk ini berkorelasi secara langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, dengan demikian berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup. Pengukuran sel hidup yang didapat berupa nilai rerata *optical density* (OD) dari masing-masing kelompok.

Pada penelitian ini dilakukan perlakuan terhadap ekstrak metanol daun sirsak dengan konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada kultur galur sel kanker prostat PC3 dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan dan kontrol positif menggunakan doxorubisin. Diperoleh hasil nilai absorbansi untuk menghitung persentase viabilitas galur sel kanker prostat PC3 yang tersaji pada

Tabel.1. Untuk mengetahui pengaruh EMDS yang diberikan terhadap viabilitas sel PC3 maka penghitungan dilakukan terhadap nilai OD setelah waktu inkubasi 24 jam.

Pertumbuhan dan pembelahan sel merupakan hal penting dalam masalah kanker, karena kanker merupakan penyakit yang menunjukkan adanya pembelahan sel yang tidak terkendali.⁵ Pembelahan sel terjadi dalam urutan peristiwa yang dikenal dengan siklus pembelahan sel atau siklus sel. Umumnya untuk menyelesaikan satu siklus pembelahan diperlukan 12 jam sampai 24 jam.¹⁷ Waktu ini dikenal dengan kecepatan pembelahan sel. Penelitian ini mengidentifikasi pembelahan/proliferasi sel PC3 terjadi sesudah 24 jam, hal ini sesuai dengan sifat sel PC3 yang memiliki *doubling time* selama 25 jam, sehingga waktu 24 jam diharapkan dapat melihat efek anti-neoplastik dari senyawa aktif ekstrak

metanol daun sirsak terhadap sel PC3.¹⁸ Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuan dkk¹⁹ menunjukkan bahwa dalam 24 jam sudah terjadi penurunan ketahanan hidup sel kanker kandung kemih T24 yang diinkubasi dengan asetogenin *squamocin* dan *annonacin* dari akar *Annona reticulata*. Ini membuktikan senyawa aktif asetogenin bersifat sitotoksik terhadap sel kanker dengan kemampuannya menghambat pembelahan/proliferasi sel pada fase G₁ dan meningkatkan apoptosis dengan meningkatkan ekspresi proapoptosis Bax dan Bad serta p21.

Dari data OD 24 jam yang didapatkan dilakukan analisis statistik ANOVA dan dilanjutkan dengan analisis *Posthoc* untuk mengetahui apakah terdapat nilai rerata absorbansi yang berbeda diantara masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 1. Profil Aktivitas Ekstrak Metanol Daun Sirsak Terhadap % Sel Hidup Sel PC3 pada Inkubasi 0 dan 24 Jam

No Ulangan	0 Jam						24 jam					
	Med	K(-)	EMDS	EMDS	EMDS	Doxo	Med	K(-)	EMDS	EMDS	EMDS	Doxo
			6,25	12,5	25				6,25	12,5	25	
1	0.09	0.18	0.2	0.14	0.29	0.2	0.11	0.28	0.26	0.29	0.26	0.22
2	0.33	0.97	0.7	1.37	0.74	0.76	0.33	1.17	0.81	1.12	1.2	1.01
3	0.05	0.15	0.2	0.18	0.12	0.18	0.21	0.82	0.96	0.9	0.65	0.86
4	0.21	0.37	0.31	0.54	0.24	0.23	0.67	0.82	1.06	0.51	0.94	0.67
5	0.56	0.77	0.78	0.73	0.81	0.83	0.67	0.82	0.61	0.56	0.83	0.72
6	0.03	0.25	0.17	0.18	0.15	0.18	0.15	0.1	0.09	0.14	0.12	0.03
Mean	0.21	0.45	0.39	0.52	0.39	0.4	0.36	0.67	0.63	0.59	0.66	0.58

Keterangan: EMDS: ekstrak metanol daun sirsak ($\mu\text{g/mL}$)

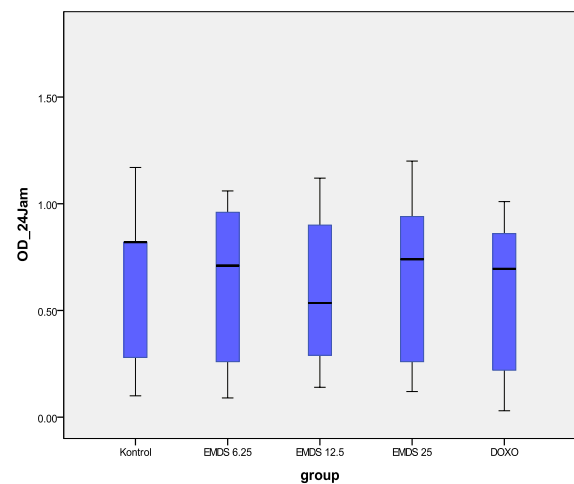
Tabel 2. Rata-Rata Nilai Serapan (Absorbansi/OD) pada Berbagai Kelompok Sesudah Inkubasi 24 Jam

Kelompok Perlakuan	N	Mean	Standar Deviasi
Kontrol	6	0.6683	0.39862
EMDS 6.25 $\mu\text{g/mL}$	6	0.6317	0.38861
EMDS 12.5 $\mu\text{g/mL}$	6	0.5867	0.36789
EMDS 25 $\mu\text{g/mL}$	6	0.6667	0.41239
Doksorubisin	6	0.585	0.38025
Total	30	0.6277	0.36387

Hasil uji ANOVA menunjukkan terdapat kecenderungan penurunan rata-rata nilai OD pada kelompok EMDS 6,25 $\mu\text{g/ml}$ dan kelompok EMDS 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan kelompok kontrol tetapi meningkat kembali pada kelompok EMDS 25 $\mu\text{g/ml}$ dengan OD yang hampir sama dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Nilai OD pada kelompok pemberian Doksorubisin sebagai kelompok kontrol positif juga lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Walaupun demikian kecenderungan penurunan nilai OD pada seluruh kelompok dibandingkan kelompok kontrol tanpa perlakuan tidak berbeda bermakna. (Gambar 1)

Dalam penelitian ini, meskipun hasil rerata pada berbagai kelompok menunjukkan peningkatan nilai OD sebelum dan sesudah diinkubasi selama 24 jam, yang berarti menunjukkan adanya peningkatan proliferasi/relatif viabilitas sel PC3, namun hasil rerata pada inkubasi sesudah 24 jam menunjukkan kecenderungan penurunan nilai OD

pada kelompok EMDS 6,25 $\mu\text{g/mL}$ dan kelompok EMDS 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan kelompok kontrol tetapi meningkat kembali pada kelompok EMDS 25 $\mu\text{g/mL}$ dengan OD yang hampir sama dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan. (Gambar 1) Ini diduga adanya efek sitotoksik dari senyawa aktif yang paling banyak terkandung dalam ekstrak daun sirsak yaitu asetogenin.



Anova test, $p=0.99$

Gambar 1. Grafik Perbandingan Nilai Rata-Rata Absorbansi (OD) Antar Kelompok Perlakuan Setelah Inkubasi 24 Jam

Efek sitotoksik asetogenin diawali melalui proses difusi dari asetogenin ke dalam membran sel kemudian menghambat kompleks I rantai transport elektron di mitokondria melalui penghambatan NADH-ubiquinon oksidoreduktase. Enzim NADH bekerja pada transport elektron terminal pada saat Fe-S dan ubiquinon yang menyebabkan gradien proton antar membran yang diciptakan untuk reduksi pernafasan dari O_2 ke H_2O dihambat, sehingga mengakibatkan proses fosforilasi oksidatif di mitokondria terganggu yang kemudian berefek pada penurunan

jumlah ATP yang dihasilkan. Akibatnya sel mengalami kekurangan energi untuk proses metabolismenya dan menyebabkan pertumbuhan sel terhambat sehingga sel mengalami apoptosis.^{11,12}

Meskipun dalam penelitian ini hanya menggunakan ekstrak kasar bukan hasil isolasi kandungan dari daun sirsak, namun efek sitotoksik yang ditunjukkan diduga dapat berasal dari senyawa aktif asetogenin yang merupakan kandungan terpenting dalam daun sirsak atau senyawa lain yang terkandung dalam daun sirsak seperti flavonoid, tannin dan alkaloid yang juga memiliki efek antikanker.⁸

Kecenderungan penurunan yang tidak berbeda bermakna menunjukkan rendahnya aktivitas pada ekstrak metanol daun sirsak karena senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar tersebut beragam senyawa baik yang polar, semi polar maupun non polar sehingga efek toksiknya saling mempengaruhi.

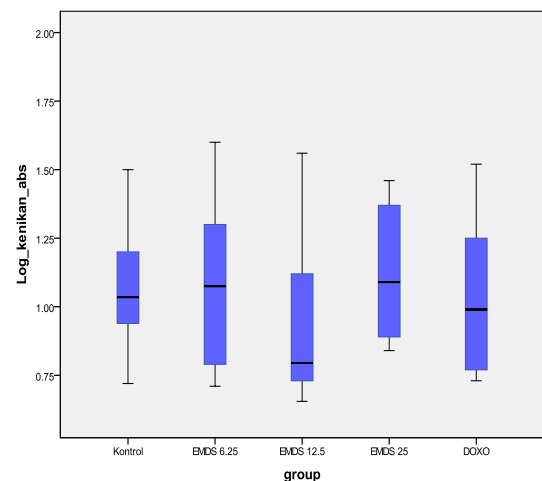
Selanjutnya dengan mempertimbangkan bahwa proliferasi sel tidak sepenuhnya terhenti pada saat diinkubasi, maka dilakukan analisis untuk menilai apakah pemberian EMDS mempunyai efek dalam menghambat laju proliferasi dari 0 jam menuju 24 jam, penghitungan dilakukan dengan membandingkan selisih nilai absorbansi setelah 24 Jam dikurangi nilai absorbansi 0 Jam. Selisih nilai kenaikan pada masing-masing kelompok tertera pada Tabel.3

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan nilai rerata peningkatan absorbansi dari 0 jam menuju 24 Jam masa inkubasi dilakukan analisis statistik ANOVA dan dilanjutkan dengan analisa

Posthoc yang hasilnya terlihat pada gambar 2.

Tabel 3. Peningkatan Rata-Rata Nilai Serapan (Absorbansi/OD) / Kelompok (Nilai Dalam Bentuk Log) Dari Masa Inkubasi 0 Jam Sesudah Inkubasi 24 Jam

Kelompok Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation
Kontrol	6	1.07	0.26
EMDS 6.25 µg/mL	6	1.09	0.32
EMDS 12.5 µg/mL	6	0.94	0.34
EMDS 25 µg/mL	6	1.12	0.26
Doksorubisin	6	1.04	0.29
Total	30	1.05	0.29



Anova test, $p=0.99$

Gambar 2. Grafik Perbandingan Kenaikan Nilai Rata-Rata Absorbansi (OD) Antar Kelompok Perlakuan dari Masa Inkubasi 0 Jam Sampai 24 Jam Inkubasi.

Dari grafik tersebut tampak bahwa kenaikan rata-rata nilai absorbansi (OD) terendah terjadi pada kelompok EMDS 12,5 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa dosis tersebut mempunyai kemampuan menghambat viabilitas sel paling besar dibandingkan kelompok lainnya yang berarti bahwa konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi optimal untuk mampu menghambat viabilitas sel PC3. Tetapi hasil tersebut tidak bermakna signifikan dan belum mencapai penghambatan sel sebesar 50%.

Hasil tersebut berbeda dengan konsentrasi optimal yang didapat dalam penelitian Rachmani EPN dkk.²⁰ yakni 17,149 µg/mL. Konsentrasi optimal tersebut mampu menyebabkan apoptosis sel T47D secara signifikan. Hal ini diduga karena sel T47D termasuk sel hormonal dependen yang memiliki respon yang baik terhadap obat/zat antikanker dan prognosinya juga lebih baik,²¹ berbeda dengan sel PC3 yang termasuk sel hormonal independen dan sel yang sangat metastatik atau agresif¹⁸, sehingga dengan konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 µg/mL kurang memberikan respon secara signifikan, meskipun ada kecenderungan pada konsentrasi 12,5 µg/mL mampu menunjukkan penghambatan viabilitas sel PC3.

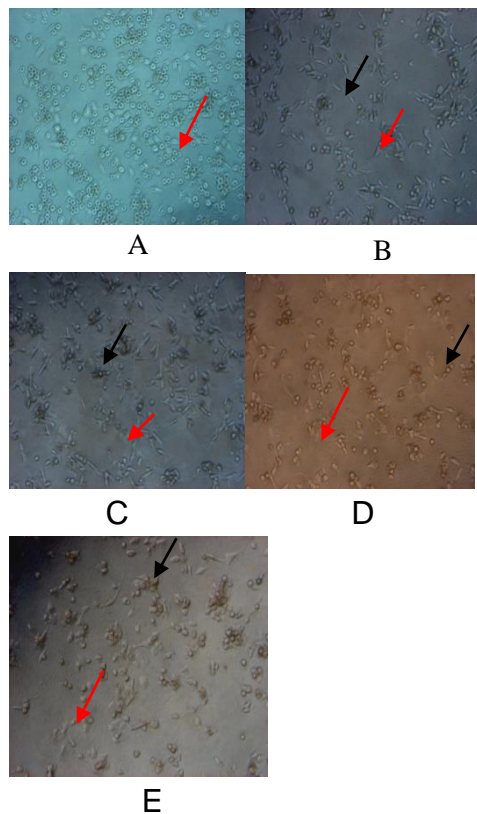
Kecenderungan penurunan viabilitas dari 6,25 dan 12,5 µg/mL namun meningkat kembali pada konsentrasi 25 µg/mL, hal ini berkaitan dengan semakin besar kadar sampel semakin panjang harga *doubling time* dan semakin kecil jumlah sel yang hidup. Hal ini disebabkan karena ekstrak metanol daun sirsak tidak cukup untuk membunuh semua sel sehingga sel yang masih hidup terus berproliferasi dan didukung tersedianya nutrisi dari media

RPMI 1640. Selain itu terkait juga dengan teori respon dosis, seperti penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati dkk.²² dan Suyatmi dkk.²³ yang menggunakan sel yang sama yakni sel HeLa, menunjukkan efek ekstrak daun sirsak berbeda. Pada penelitian Rahmawati dkk.²² dengan memakai 4 dosis ekstrak (20,50,100,200 µg/mL) didapatkan dosis optimal 111,75 µg/mL, sedangkan Suyatmi dkk.²³ dengan 9 dosis (10,20,30,50,100,150,200, 300 dan 500 µg/mL) didapatkan dosis optimal 97 µg/mL. Hal ini terkait dengan intensitas efek obat berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikat dan fraksi reseptor tergantung pada beberapa hal diantaranya dosis dan lamanya paparan. Setelah fraksi reseptor semua sudah diduduki oleh obat maka peningkatan dosis tidak lagi menimbulkan respon yang terus meningkat tetapi membentuk kurva plateau/ mendatar.²⁴ Pada penelitian ini, menunjukkan respon dosis, dimana terjadinya kecenderungan penurunan inhibisi pada konsentrasi 25 µg/mL kemungkinan di konsentrasi 12 µg/mL sudah merupakan batas optimal respon terhadap ekstrak.

Jika dilihat rerata nilai OD, pada konsentrasi 12,5 µg/mL (0,58) memiliki nilai OD sedikit lebih rendah dengan doksorubisin (0,59). Ini menunjukkan bahwa dosis doksorubisin yang digunakan belum cukup mampu menghambat sel PC3 secara signifikan karena sel PC3 sebagai sel yang metastatik dan independen hormonal sangat resisten terhadap doksorubisin. Hal ini berbeda dengan dosis doksorubisin sebesar 15 µg/mL yang disadur dari penelitian yang dilakukan Titiek S dkk.²⁵ menggunakan senyawa alkaloid mahkota dewa (*Phaleria macocarpa*) pada sel T47D

me-nunjukkan efek sitotoksik yang signifikan pada dosis optimal sebesar 11,14 $\mu\text{g/mL}$.

Selain melakukan uji viabilitas dengan teknik MTT, pengamatan juga dilakukan terhadap perubahan morfologi sel PC3 setelah pemberian ekstrak metanol daun sirsak selama inkubasi 24 jam. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 3



Gambar 3. Gambaran Morfologi Sel PC3.

Keterangan: A. Kontrol Sel PC3 setelah inkubasi 24 jam B. Sel PC3 dengan perlakuan ekstrak metanol daun sirsak pada konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ (B), 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (C), 25 $\mu\text{g/ml}$ (D) dan Sel PC3 dengan pemberian dokso-rubisin (E) (sel hidup: \leftarrow , sel mati: \leftarrow)

Hasil pengamatan morfologi sel PC3 dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak metanol daun sirsak. Jika dilihat di bawah mikroskop, morfologi sel antara sel PC3 yang hidup dan mati menunjukkan perbedaan. Pada

kelompok kontrol sel (Gambar 3.A), semua sel menunjukkan morfologi sel hidup. Sel hidup akan berwarna terang karena terdapat cairan sitoplasma yang dapat meneruskan cahaya dari mikroskop dan berbentuk agak panjang. Pada perlakuan senyawa uji pada konsentrasi tertinggi (25 $\mu\text{g/ml}$) menunjukkan morfologi sel sedikit mengalami kematian (Gambar 3.D). Sel yang mati akan terlihat gelap dan berbentuk bulat. Hal ini terjadi karena sel kehilangan sitoplasma akibat rusaknya membran sel, sehingga sel tidak dapat meneruskan cahaya dari mikroskop. Pada konsentrasi terendah (6,25 $\mu\text{g/ml}$) masih banyak sel hidup, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirsak kurang mampu mempengaruhi kematian sel PC3 (Gambar 3.B).

Sel yang mati dapat merupakan proses apoptosis ataupun nekrosis. Karena menurut Villo, senyawa asetogenin yang bersifat sitotoksik mampu menghambat ikatan NADH oksidase ubiquinon pada membran sel kanker yang menyebabkan sel kekurangan ATP dan berakibat kematian sel. Adanya sinyal positif intrasel akibat kekurangan ATP menyebabkan perubahan pada pori membran mito-kondria sehingga menjadi permeabel dan dilepaskannya kelompok protein proapoptotik kedalam sitosol yaitu Bax atau Bad yang menginduksi pelepasan sitokrom-c yang selanjutnya dapat mengaktifasi jalur *cascade-caspase*.¹¹ Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuan SSF dkk.¹⁹ yang menunjukkan kerja turunan asetogenin *squamocin* yang mampu menghambat proliferasi sel kanker pada fase G_1 dan meningkatkan ekspresi protein Bax dan Bad serta mampu

meningkatkan ekspresi p21. Liang dkk²⁶ juga membuktikan efek squamocin yang mampu memicu mitokondria melepaskan sitokrom-c dan mengaktifasi *caspase cascade*.

Perubahan karakteristik morfologi galur sel kanker prostat PC3 dari hasil kultur, terlihat galur sel PC3 melekat pada dasar wadah (*flask*). Galur sel PC3 termasuk tipe *cell lineadherent* (sel monolayer). Sel monolayer dengan bentuk seperti sel epitel/ pipih, membentuk kelompok dan dapat beradaptasi dengan medium suspensi pertumbuhan. Sel PC3 juga termasuk dalam sel *transformed* yakni sel yang memiliki kemampuan untuk tumbuh tidak terbatas dalam kultur dan biasanya sel tersebut berasal dari sel tumor. Kelebihan dari pertumbuhan yang menempel adalah kemampuan dari sel untuk menempel dan menyebar pada permukaan. Hal ini memudahkan dalam pengujian mikroskop, hibridasi dan pengujian fungsional lainnya.¹⁸

SIMPULAN

Terdapat kecenderungan penurunan viabilitas galur sel kanker prostat PC3 setelah pemberian ekstrak metanol daun sirsak pada inkubasi 24 jam. Ekstrak metanol daun sirsak pada konsentrasi 6,25; 12,5 dan 25 µg/mL tidak menghasilkan perbedaan penurunan viabilitas secara signifikan tetapi terdapat kecenderungan efek sitotoksik optimal terjadi pada konsentrasi 12,5 µg/mL.

DAFTAR RUJUKAN

1. Cancer Research UK. Cancer worldwide-the global picture. 2013 [cited 2013__29 March]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/the-global-picture/>.
2. GLOBOCAN. All Cancer Incidence and Mortality World-wide in 2008. 2011 [cited 2011 28 September]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#MEN>.
3. Departemen Kesehatan RI. Riset Kesehatan Dasar, Depkes RI. Jakarta. 2007
4. Umbas R. Penanganan Kanker Prostat Stadium II pada penderita berusia 70 tahun atau lebih: Pengalaman dua rumah sakit tertier di Jakarta. Indonesian J Cancer. 2009;11(4):133-5
5. Robbins and Cotran. Pocket Companion to Pathologic Basis of Disease. Ed.7th. Philadelphia PA: Saunders Elsevier. 2010:15-17,172-4,177-9,202
6. Carelle NR, Piotto E, Bellanger A, Germanaud J, Thuillier A, Khayat D. Changing Patient Perceptions of The Side Effects of Cancer Chemotherapy. Cancer. 2002 July;95(1):155-63
7. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. WHO; 2012. [cited 2012 28 September]. Available from: <http://www.who.int/medicine/organization/trm/orgtrmmmain.shtml>.
8. Adewole SO dan Ojewole JAO. Protective Effects of *Annona muricata* Linn, (*annonaceae*) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats, *Aft. J. Trad Cam.* 2009;6(1):30-41
9. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. In Vitro Antioxidant Studies In Leaves of *Annona* Species. *Indian J. Exp. Biol.* 2007;45:480-85
10. Yuan SSF, Chang HL, Chen HW dkk. Annonacin, A mono-tetra-hydrofuran Acetogenin, Arrests Cancer Cells at the G1 phase and Cause Cytotoxicity in a Bax- and Caspase-3 Related Pathway. *J. Life Sci.* 2003;72:2853-61
11. Villo P. Synthesis of Acetogenin Analogues, *Thesis*, University of Tartu Faculty of Science and Technology Institute of Technology, Tartu. 2008
12. McLaughlin JL. Paw-paw and cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. *J.Nat.Prod.* 2008;71:1311-21
13. Pamungkas AR. Efek Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Ekstrak Metanol Daun Sirsak

- (*Annona muricata*) pada Sel Kanker Payudara T47D, Skripsi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.2011
14. Morgan SJ, Darling DC. *Animal Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers.1993:7-19,27-46,76-77
 15. Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol.Methods*.1983;65 (1–2):55–63
 16. Dahlan M dan Sopiudin. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi 4. Salemba Medika, Jakarta. 2006
 17. Subowo. *Biologi Sel*. Edisi Keenam. Sagung Seto.2011:396-7
 18. American Type Culture Collection(ATCC) CRL-1435. Thawing, Propagating and Cryopreserving Protocol: NCI-PBCF-CRL1435 (PC-3) Prostate Adenocarcinoma. Physcal Science Oncology Cenert Facility. 2012; Version 1.5
 19. Yuan SSF, Chang HL, Chen HW dkk. Selective Cytotoxicity of Squamocin on T24 Bladder Cancer Cells at The S-Phase Via a Bax-, Bad-, and Caspase-3-related Pathway. *J.Life Sci*.2006;78:869-874.
 20. Rachmani EPN, Suhesti TS, Widiastuti R, dan Adityono. The Breast of Anticancer from Leaf Extract of *Annona muricata* Againsts Cell Line in T47D. *Int.J. Appl. Sci.Technol*. 2012;2(1):157-64
 21. Duan R, Ginsburg E, and Vonderhaar BK. Estrogen Stimulates Transcription from The Human Prolactin Distal Promoter Through AP1 and Estrogen Responsive Elements in T47D Human Breast Cancer Cells. *Mol.Cell. Endocrinol*. 2008;281:9-18
 22. Rahmawati A. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanolik Buah Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Skripsi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Soedirman, Purwokerto. 2010
 23. Suyatmin, Suselo YH, Jusuf SA. The Selective Cytotoxicity of Ethanolic Extract of *Annona muricata* leaf on HeLa Cervical Cancer Cells. International Conference: Research and Application on Tradisional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM). Surakarta, Indonesia. 2012
 24. Eaton DL and Gilbert SG. Principles of Toxicology in: Casarett & Doulls Toxicology: The Basic Science of Poisons. Seventh edition. Classen CD (editor). McGraw-Hill.New York.2008:11-23
 25. Sumarawati T dan Famawati D. Isolasi dan uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid Mahkota Dewa (*Phaleria macocarpa*) pada Kultur Sel Kanker Payudara (T47D). Prosiding Seminar Nasional For Cancer. FK Unisula. Semarang.2011:102-10
 26. Liang YJ. Bullatacin Triggered ABCB1 Overexpressing Cell Apoptosis via The Mitochondrial-Dependent Pathway, *J.Biomed.Biotechnol*. 2009