

Efek Sitotoksik Formula Jamu Daun Sirsak, Buah Takokak, dan Umbi Bidara Upas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Cytotoxic Effect of Jamu Formula of Sirsak Leaves, Takokak Fruits, and Bidara Upas Bulb against Breast Cancer Cell Line MCF-7

Yuli Widiyastuti*, Ika Yanti M. Sholikhah, Sari Haryanti

Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia

*Email: ywidiyasis@gmail.com

Diterima: 28 Desember 2018

Direvisi: 8 Maret 2019

Disetujui: 1 Juli 2019

Abstrak

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Pengobatan kanker yang sangat rumit dan berbiaya tinggi mendorong masyarakat untuk mencari pengobatan alternatif dengan menggunakan tumbuhan obat. Beberapa tumbuhan obat yang secara empiris diklaim memiliki khasiat sebagai antikanker adalah sirsak (*Annona muricata*), takokak (*Solanum torvum*), dan bidara upas (*Merremia mammosa*). Ramuan tumbuhan obat tersebut belum pernah diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker MCF-7. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas sitotoksik formula jamu antikanker yang terdiri dari 3 jenis tumbuhan tersebut. Pengaruh ekstrak tunggal dan formula campuran ketiga jenis ekstrak tanaman obat tersebut diuji aktivitasnya terhadap viabilitas sel MCF-7 dengan metode MTT assay. Selanjutnya, formula jamu dengan kombinasi ekstrak tanaman obat yang paling aktif diuji aktivitasnya terhadap ekspresi protein Bcl-2 dengan metode imunositokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak tunggal maupun formula ekstrak campuran daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7. Formula A berupa campuran daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1 memberikan hasil penghambatan viabilitas sel MCF-7 tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 48 $\mu\text{g/ml}$. Formula tersebut juga meningkatkan proses apoptosis pada sel MCF-7 yang ditunjukkan melalui penurunan ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2.

Kata kunci: Umbi bidara upas; Daun sirsak; Buah takokak; Apoptosis; MCF-7

Abstract

Cancer is one of the leading cause of death in the world. Complicated and high cost treatments of cancer encourages people to look for alternative treatments among others using medicinal plants. Some medicinal plants that are empirically claimed to have anticancer effect are soursop (*Annona muricata*), takokak (*Solanum torvum*), and bidara upas (*Merremia mammosa*). However, these medicinal herbs have not been tested for cytotoxic activity against MCF-7 cancer cells. The purpose of this study was to determine the cytotoxic activity of the anticancer herbal formula consisting those three plants. The effect of each single extract and the combination formula were tested for their activity on cell viability of MCF-7 with MTT assay method. The herbal formula with the most active combination of medicinal plant extracts was further tested for its activity on the expression of Bcl-2 protein by immunocytochemistry methods. The results showed that each single extract and the combination formula gave cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cells. Formula A, consisted of a mixture of soursop leaves, takokak fruit, and bidas upas bulb with a ratio of 1:1:1, results in highest inhibition of the viability of MCF-7 cells with IC_{50} values of 48 $\mu\text{g/ml}$. The formula also enhances the apoptosis process in MCF-7 cells which is shown by decreasing the expression of antiapoptotic Bcl-2 proteins.

Keywords: Sirsak leaves; Takokak fruit; Bidara upas bulb; Apoptosis; MCF-7

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit seluler yang bersifat laten dan diawali dengan suatu proses karsinogenesis. Proses terjadinya kanker dapat berlangsung sampai puluhan tahun. Karsinogenesis atau proses terjadinya kanker dari sel normal, terbagi dalam beberapa tahap yaitu inisiasi, promosi, konversi, dan progresi. Tiga tahap pertama terjadi dari sel normal yang berubah menjadi sel kanker, dan tahap terakhir terjadi setelah sel kanker terbentuk.¹ Karsinogenesis diawali dengan proses inisiasi pada sel oleh senyawa karsinogenik dan dengan adanya agen pemacu pertumbuhan (promoter), baik intra maupun ekstra seluler, sel akan membentuk massa tumor (fase promosi). Jika pada fase promosi ini perubahan genetik berlangsung terus, pertumbuhan sel semakin tidak terkontrol (fase progresi).² Sel kanker bersifat agresif dan memiliki kemampuan invasif (menyusup dan merusak jaringan di dekatnya) dan metastasis (menyebarkan ke jaringan lainnya melalui sistem pembuluh darah dan limpa) sehingga karena patogenesis tersebut maka kanker dinyatakan juga sebagai penyakit seluler.³

Prevalensi penyakit kanker di dunia cenderung semakin meningkat. Pada tahun 2012 diperkirakan terdapat 14 juta kasus kanker baru, dengan 8 juta di antaranya berakhir pada kematian.⁴ Laporan tersebut juga menyebutkan jumlah kasus kanker di dunia akan meningkat 2 kali lipat dalam 30 tahun terakhir, dan jika tidak dilakukan penanganan yang tepat akan meningkat 2 kali lipat pada tahun 2020, dan meningkat 3 kali lipat pada tahun 2030.⁵

Pengembangan terapi yang komprehensif untuk mengatasi kanker sangat diperlukan untuk menekan jumlah kematian penderita. Pengembangan terapi ini diharapkan juga mampu mengatasi resistensi terhadap agen kemoterapi konvensional yang telah ada saat ini.⁵ Pengembangan obat kanker baru dari tanaman obat sebagai agen kemoterapi

terus berjalan. Di seluruh dunia banyak hasil penelitian telah dipublikasi di berbagai jurnal tentang upaya pencarian senyawa aktif baru yang memiliki potensi sebagai agen kemoterapi.

Tanaman sejak dahulu merupakan sumber obat bagi berbagai tujuan pengobatan dan pemeliharaan kesehatan termasuk untuk penanganan kanker.⁶ Dalam 30 tahun terakhir telah ditemukan dan dilansir sebanyak 236 kandidat senyawa aktif (*New Chemicals Entities*, NCEs) sebagai obat kanker dan hampir 80% di antaranya merupakan senyawa bahan alam, termasuk tumbuhan obat. Vinkristin dan vinblastine merupakan contoh senyawa dari tumbuhan obat yang digunakan untuk pengobatan kanker darah. Beberapa senyawa antikanker baru yang kemudian menyusul dikembangkan antara lain kamptothekin dari tanaman *Camptotheca acuminata* dan phodopilotoksin (*Phodophyllum peltatum*), termasuk sejumlah senyawa semisintesis dan turunannya, yaitu topotekan, irridotekan, docetaxel, cabizetaxel, etoposide, dan teniposide.⁷

Kecenderungan masyarakat dalam menggunakan pengobatan tradisional untuk mengatasi kanker dan tumor secara mandiri tersebut umumnya berdasarkan informasi yang diperoleh melalui media massa. Berbagai tanaman obat Indonesia seperti sirsak, takokak, bidara upas, keladi tikus, benalu, dan duri tujuh merupakan sebagian dari tanaman obat yang digunakan untuk pengobatan kanker dan tumor oleh berbagai etnis.⁸ Sebagian masyarakat yang merasakan manfaat pengobatan kanker dan tumor dengan tanaman obat tersebut banyak yang memberikan testimoni di media massa sehingga akhirnya memengaruhi masyarakat dalam memilih cara pengobatan kanker dan tumor.

Penggunaan tumbuhan obat untuk upaya mandiri dalam mengatasi dan mengobati kanker perlu memperoleh dukungan informasi ilmiah. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk beberapa

tumbuhan yang secara empiris dinyatakan berkhasiat sebagai antikanker. Daun sirsak telah diketahui mengandung senyawa acetogenin yang secara *in vitro* mampu menghambat proliferasi kanker payudara.⁹ Pada penelitian lain, takokak (*Solanum torvum*) dinyatakan memiliki efek sitotoksik terhadap sel EAC dengan IC₅₀ di bawah 200 µg/mL.¹⁰ Sementara itu, tanaman bidara upas (*Merremia mammosa*) yang mengandung senyawa bersifat oksidase dari getah umbinya kemungkinan memiliki aktivitas antikanker sehingga mendukung penggunaan empiris sebagai obat tradisional untuk tumor payudara.¹¹

Kajian awal penapisan potensi sitotoksik untuk antikanker secara *in vitro* lebih sering dilakukan terhadap ekstrak tumbuhan secara tunggal, padahal penggunaan jamu antikanker sering dalam bentuk formula berupa kombinasi beberapa jenis tumbuhan obat. Untuk itu, uji aktivitas formula jamu antikanker yang berupa campuran beberapa tumbuhan obat perlu dilakukan untuk menetapkan ramuan paling potensial yang akan dikembangkan. Penelitian ini mengkaji aktivitas sitotoksik formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas pada sel kanker payudara MCF-7.

METODE

Bahan dari masing-masing bagian tanaman yang terdiri dari daun sirsak, umbi bidara upas, dan buah takokak dipotong dan dicuci bersih kemudian dikeringkan, selanjutnya bahan diserbuk dengan blender dan diayak dengan ukuran 20 mesh. Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 50 g, dimasukkan dalam panci infusa, ditambah 500 ml akuades dan dibuat sediaan infusa. Infusa kemudian disaring dan dikeringkan di oven sehingga didapatkan ekstrak kering.

Sel kanker payudara MCF-7 diperoleh dari ATCC (*American Type Culture Collection*) USA. Perbanyakan sel kanker dilakukan dengan cara mencairkan stok *cell line* dari *cryogenic storage*, kemudian

dipindahkan ke dalam *conical tube* 15 mL, ditambahkan media sampai 10 mL, dan selanjutnya dipisahkan menggunakan *centrifuge* pada 1000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dihentakkan dengan jari supaya lepas kemudian ditambahkan media kultur dan dituang dalam *culture flask*. Sel diinkubasi pada 37 °C dalam inkubator CO₂ 5% dan jika sel sudah konfluen maka sel siap digunakan (dipanen).

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *assay*. Seratus mikro liter suspensi yang berisi *cell line* dalam media kultur *Eagle's Minimum Essential Media* (EMEM) dengan kepadatan 8.000 sel dimasukkan ke dalam masing-masing 96-*well plate*, dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator CO₂ 5% sampai konfluen. Sel diberi perlakuan ekstrak tunggal dan formula ekstrak dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80, dan 160 µg/ml sebanyak 3 ulangan, ditambah kontrol sel dan kontrol media. *Microplate* diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator CO₂ 5%. Pengamatan dan dokumentasi dilakukan pada akhir perlakuan. Selanjutnya, media kultur dibuang dan dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS), ditambahkan 110 µl larutan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoli-um bromide] (MTT) ke dalam setiap *well* dan diinkubasikan pada inkubator CO₂ 5% suhu 37 °C. Setelah 4 jam, ditambahkan 100 µl *stopper* berupa larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N ke dalam setiap *well* untuk melarutkan kristal formazan. Absorbansi dibaca dengan *microplate reader* pada λ 595 nm setelah dibiarkan dalam suhu kamar semalam.¹²

Analisis hasil absorbansi digunakan untuk menghitung % kematian dan viabilitas sel dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ mati} = \frac{(a - b) - (c - b)}{(a - b)} \times 100\%$$

$$\% \text{hidup (viabilitas)} = \frac{(c - b)}{(a - b)} \times 100\%$$

Keterangan:

a = absorbansi kontrol sel

b = absorbansi kontrol media

c = absorbansi sampel

Pengamatan ekspresi protein Bcl-2 dilakukan dengan metode imunositokimia. Sel MCF-7 (kepadatan 5×10^4 sel/well) ditanam pada *coverslip* dalam 24-well plate sampai 80% konfluen. Well plate diinkubasikan dengan ekstrak air formula ekstrak selama 18 jam. Medium diambil, dicuci dengan PBS. Cover slip yang memuat sel diangkat, diletakkan di dalam 6 well plate. Preparat difiksasi dengan metanol dingin. Preparat dicuci dengan PBS, kemudian ditetesi dengan hidrogen peroxidase blocking solution selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian dibuang. Preparat diinkubasi dengan prediluted blocking serum selama 10 menit pada suhu kamar, lalu dibuang. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan primer antibodi monoklonal anti Bcl-2 pengenceran 1:50 selama 24 jam pada suhu 40 °C. Pada akhir inkubasi, preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit, kemudian diinkubasi dengan biotinylated universal secondary antibody selama 10 menit dan dicuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat diinkubasi dalam streptavidin-peroxidase complex reagent selama 10 menit dan dicuci dengan PBS selama 5 menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dalam substrate solution DAB selama 10 menit lalu dicuci dengan akuades. Preparat direndam dalam pewarna Mayer's hematoxylin selama 3 menit dan dicuci dengan akuades, lalu dicelupkan dalam alkohol, dibersihkan, dicelupkan dalam xylol, kemudian ditetesi dengan mounting media dan ditutup cover slip. Ekspresi protein diamati di bawah mikroskop cahaya perbesaran 100 kali.¹³

Untuk analisis statistik, data absorbansi perlakuan ekstrak terhadap sel MCF-7 di

setiap well dengan 3 kali ulangan dikonversikan menjadi rerata % viabilitas sel, kemudian dianalisis dengan regresi linier untuk memperoleh nilai IC₅₀. Data kualitatif hasil imunositokimia disemikuantitatifkan menggunakan metode Allred Score.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak tanaman tunggal terhadap sel MCF-7

Pada uji aktivitas ekstrak tanaman obat tunggal terhadap sel MCF-7, daun sirsak memberikan pengaruh sitotoksik paling kuat dengan nilai IC₅₀ paling rendah sebesar 56,61 µg/mL. Persentase viabilitas sel dari perlakuan masing-masing ekstrak tanaman obat secara tunggal disajikan pada Tabel 1.

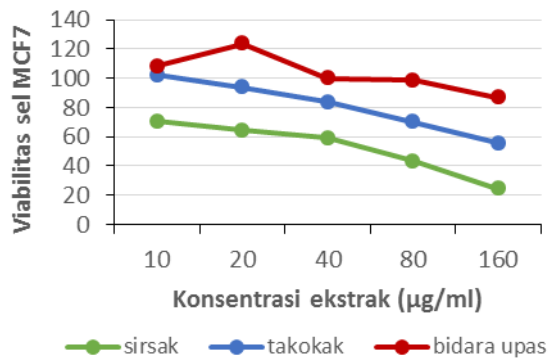
Tabel 1. Persentase viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas

Jenis ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)					IC50 (mg/ml)
	10	20	40	80	160	
Sirsak	70,59	64,4	59,2	43,4	24,2	56,6
Takokak	102,3	93,7	83,7	70,2	55,4	85,7
Bidara upas	108,1	123,5	100	98,4	86,9	101,2

Viabilitas sel karena pengaruh ekstrak air tunggal masing-masing dari daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas diamati dengan metode MTT. Penentuan potensi sitotoksik menggunakan parameter kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50% (IC₅₀). Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa hasil uji sitotoksikitas ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan bidara upas pada sel MCF-7 diperoleh nilai IC₅₀ berturut turut 56,61 µg/mL, 85,75 µg/mL, dan 101,26 µg/mL. Masing-masing perlakuan ekstrak tanaman obat secara tunggal menunjukkan adanya hubungan linier antara konsentrasi dan efek sitotoksik yang dihasilkan. Semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan semakin meningkat efek sitotoksiknya (Gambar 1).

Dalam pengembangan obat baru termasuk untuk antikanker, salah satu pendekatan yang paling efisien adalah melalui eksplorasi etnofarmakologi.⁵ Hal ini dibuktikan dalam penelitian awal melalui uji sitotoksitas, sebagian spesies tanaman obat yang secara empiris digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan tumor atau kanker, memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker bahkan ada yang mematikan sel kanker. Penggunaan tanaman obat dan herbal untuk komplemen terapi kanker payudara telah sering dilaporkan.¹⁴

Pada penelitian sebelumnya, ekstrak etanol daun sirsak terbukti memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} sebesar 17,149 $\mu\text{g/ml}$.¹⁵ Senyawa aktif yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker dalam daun sirsak adalah acetogenin.¹⁶



Gambar 1. Rata-rata viabilitas sel MCF-7 dari pengaruh ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas

Panigrahi *et al.* (2014) menyebutkan bahwa ekstrak etanolik buah takokak (*Solanum torvum*) memiliki efek sitotoksik kuat terhadap pertumbuhan sel Ehrlich's Ascites Carcinoma (EAC).¹⁷ Buah takokak termasuk ke dalam famili Solanaceae yang memiliki kandungan senyawa aktif antara lain steroidal sapogenin yang memiliki berbagai aktifitas farmakologi.⁹ Selain takokak, buah dari *Solanum nigrum* (ranti) juga punya aktivitas sitotoksik pada sel

HeLa.¹⁸ Berdasarkan morfologi serta viabilitas sel, masing-masing perlakuan dari ekstrak tanaman tunggal menunjukkan adanya efek sitotoksik yang ditandai dengan perubahan morfologi dan peningkatan jumlah kematian sel. Nilai viabilitas sel MCF7 akibat perlakuan ekstrak uji disajikan pada Gambar 1.

Uji aktivitas formula ekstrak terhadap sel MCF-7

Berdasarkan hasil uji viabilitas sel MCF-7 atas perlakuan ekstrak tunggal daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas, dilakukan penentuan viabilitas sel MCF-7 dari perlakuan kombinasi campuran ekstrak 3 tanaman tersebut. Kombinasi susunan formula disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kombinasi susunan formula ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas untuk uji viabilitas sel MCF-7

Jenis ekstrak	Komposisi		
	Formula A	Formula B	Formula C
Sirsak	1	1	1
Takokak	1	1	2
Bidara upas	1	2	1

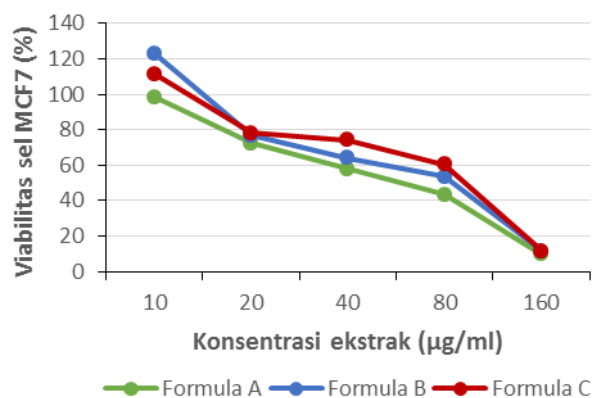
Penetapan proporsi jenis ekstrak dalam menyusun formula (A, B dan C) mengacu pada nilai IC_{50} dari uji sitotoksik masing-masing tanaman obat. Daun sirsak dengan nilai IC_{50} terendah menjadi bagian penyusun utama dengan proporsi sama untuk setiap formula, kemudian untuk umbi bidara upas diberikan 2 bagian pada formula B sedangkan buah takokak 2 bagian pada formula C. Masing-masing formula diuji terhadap viabilitas sel MCF-7 dengan metode MTT *assay* dengan hasil sebagai mana tercantum pada Tabel 3.

Dari hasil MTT *assay* diketahui bahwa formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan masing-masing ekstrak 1:1:1 memberikan hasil penghambatan viabilitas sel MCF-7

terbesar (IC_{50} terkecil) sebesar 48,89 $\mu\text{g/mL}$. Pengaruh konsentrasi formula terhadap viabilitas sel MCF-7 disajikan pada Gambar 2. Efek formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas berlaku tergantung dosis (*dose dependent manner*), yaitu semakin tinggi dosis formula yang diberikan maka semakin menurun viabilitas sel MCF-7.

Tabel 3. Persentase viabilitas sel MCF7 setelah perlakuan ekstrak air formula jamu

Jenis ekstrak	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	10	20	40	80	160	
Formula A	98,3	72,3	57,8	43,2	9,5	48,8
Formula B	123,1	76,8	63,9	53,6	11,6	59,2
Formula C	111,6	78,3	74,2	60,5	11,6	69,2

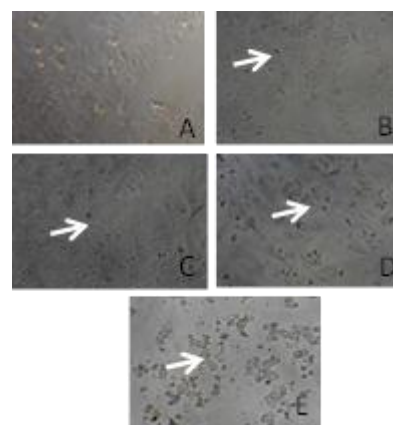


Gambar 2. Efek formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas terhadap viabilitas sel MCF-7 dengan waktu inkubasi selama 24 jam

Perlakuan formula ekstrak pada sel MCF-7 berpengaruh terhadap morfologi dan viabilitas sel yang ditunjukkan dengan bentuk sel yang semakin membulat, membesar, dan akhirnya mati. Efek perlakuan ekstrak formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas mulai terlihat pada konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$. Kematian sel tertinggi terjadi pada konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$. Hasil observasi perubahan morfologi sel ditampilkan pada Gambar 3.

Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10^3 sel MCF-7 dengan ekstrak formula

A (20-160 $\mu\text{g/ml}$) selama 48 Jam. Perubahan morfologi terlihat pada konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ (B), 40 $\mu\text{g/ml}$ (C), 80 $\mu\text{g/ml}$ (D) dan 160 $\mu\text{g/ml}$ (E) dibandingkan dengan kontrol (A) dengan perbesaran 100 kali. Tanda anak panah menunjukkan morfologi sel yang mengalami kematian.



Gambar 3. Morfologi sel MCF-7 akibat perlakuan formula A

Pada Gambar 3 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi formula A yaitu campuran daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1, maka akan semakin besar perubahan morfologi dan kematian sel. Pada konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$ mulai terjadi pembesaran sel (*giant cell*), dan pada konsentrasi 80 dan 160 $\mu\text{g/mL}$ telah terjadi kematian sel.

Dari hasil uji viabilitas perlakuan kombinasi ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas, diperoleh hasil bahwa formula A dengan perbandingan 1:1:1 memberikan nilai IC_{50} paling kecil yang berarti formula tersebut paling toksik. Dibandingkan dengan pemberian ekstrak tunggal, ekstrak formula A memberikan efek penghambatan viabilitas sel MCF-7 lebih tinggi yang ditandai dengan nilai IC_{50} lebih rendah yaitu 48,89 $\mu\text{g/ml}$. Peningkatan efek toksik dari pemberian formula ekstrak 3 tanaman tersebut kemungkinan terjadi karena adanya kombinasi senyawa aktif yang

bersifat saling menguatkan efek sitotoksik sehingga nilai IC_{50} semakin menurun. Kandungan utama daun sirsak adalah acetogenin dan kandungan buah takokak adalah sejumlah golongan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker seperti alkaloid, terpenoid, fenol, dan flavonoid.^{15,18}

Dari Gambar 3 terlihat bahwa pemberian formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas memberikan pengaruh terhadap perubahan morfologi dan viabilitas sel MCF-7. Perubahan morfologi sel MCF-7 akibat pemberian formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas berupa terjadinya perbesaran sel (*giant cell*) dibandingkan dengan kontrol. Setelah terjadi perbesaran kemudian sel mulai tampak membulat dan pipih lalu mati. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka perubahan morfologi sel semakin terlihat dengan jelas. Hal ini bisa disebabkan adanya penghambatan siklus sel pada fase G2/M sehingga sel yang telah mengalami mitosis dan replikasi DNA gagal mengalami pembelahan, akhirnya terbentuk sel yang poliploid dan berlanjut menuju apoptosis.

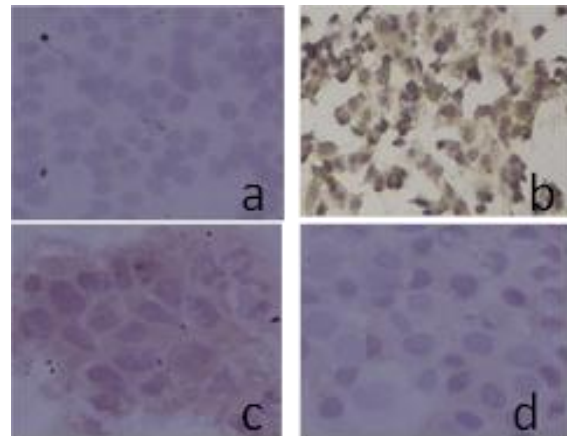
Sirsak mengandung annonuricin A dan B yang memiliki aktivitas sitotoksik di beberapa sel kanker antara lain kanker paru A-549, sel kanker payudara MCF-7, dan sel kanker kolon HT-29.¹⁹ Selain itu, sirsak juga mengandung bullatacin yaitu suatu senyawa acetogenin yang memiliki aktivitas antikanker. Bullatacin mampu menginduksi marginasi kromatin dan kondensasi sel tumor yang kemudian diikuti dengan kematian sel (apoptosis).²⁰

Bidara upas yang secara tradisional digunakan untuk pengobatan kanker dan tumor juga mengandung sejumlah senyawa aktif yang memiliki aktivitas antikanker. Kandungan flavonoid pada umbi bidara upas juga dapat memacu imunitas seluler dengan memproliferasi limfosit dan produksi *reactive oxygen intermediate* oleh sel makrofag.²¹ Aktivitas ini sangat

berperan dalam pencegahan mekanisme seluler perkembangan sel kanker.

Pengamatan ekspresi protein

Protein antiapoptosis Bcl-2 diekspresikan dengan tingkat yang cukup tinggi oleh sel MCF-7. Hal ini berkorelasi dengan respon MCF-7 yang sangat lemah terhadap agen kemoterapi. Berdasarkan hal tersebut maka ditelusuri mekanisme formula ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dalam menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 yang diarahkan pada penghambatan ekspresi Bcl-2. Ekspresi Bcl-2 diamati dengan metode imuno-sitokimia menggunakan antibodi Bcl-2.



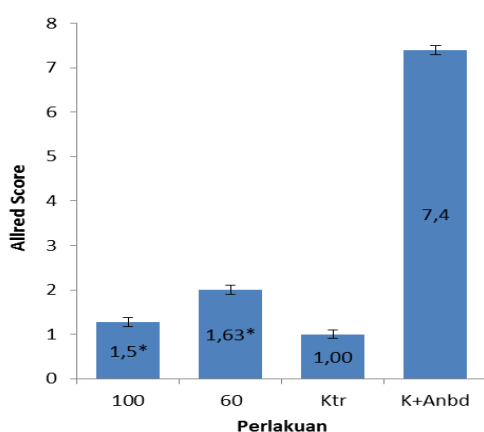
Gambar 4. Efek perlakuan ekstrak air formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1 terhadap ekspresi Bcl-2 pada sel MCF-7

*Ket: a. Kontrol sel tanpa perlakuan yang tidak dicat dengan antibodi; b. Kontrol sel tanpa perlakuan yang dicat dengan antibodi Bcl-2; c. Perlakuan dengan konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$; d. Perlakuan dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan perbesaran 100 kali.

Berdasarkan hasil pengamatan secara kualitatif seperti yang ditampilkan pada Gambar 4, diketahui bahwa pemberian ekstrak formula daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1 menunjukkan adanya penurunan ekspresi Bcl-2 dibandingkan dengan kontrol. Penurunan tingkat ekspresi Bcl-2

ditunjukkan pada perlakuan pemberian ekstrak formula A pada konsentrasi 60 µg/mL dan 100 µg/mL. Perbedaan morfologi sel terjadi pada kedua perlakuan yaitu intensitas warna inti sel yang berbeda dibandingkan dengan kontrol, juga perubahan warna plasma sel pada pemberian formula dengan konsentrasi 60 µg/mL.

Beberapa sel terlihat memiliki inti sel lebih dari satu yang menandakan telah terjadinya mitosis namun sel gagal mengalami pembelahan. Selanjutnya, hasil kuantifikasi ekspresi Bcl-2 dengan menggunakan *Allred Score* memperlihatkan bahwa persentase ekspresi akibat perlakuan formula jamu mengalami penurunan bermakna dibandingkan dengan kontrol sebagaimana terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Ekspresi BCl-2 setelah perlakuan formula jamu selama 48 jam dibandingkan dengan kontrol

Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna dari perlakuan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$).

Gambar 5 menunjukkan bahwa perlakuan jamu menyebabkan intensitas warna coklat sangat berkurang dibandingkan dengan kontrol yang dicat dengan antibodi. Perlakuan jamu dengan konsentrasi semakin tinggi semakin mengurangi intensitas ekspresi Bcl-2, hal ini dapat dilihat pada perlakuan jamu dengan konsentrasi 100 µg/mL ekspresi

Bcl-2 yang memberikan intensitas warna coklat yang lebih rendah dibanding konsentrasi 60 µg/mL.

Apoptosis pada sel MCF-7 akibat perlakuan formula ekstrak diketahui melalui uji imunositokimia dengan mengukur ekspresi protein Bcl-2. Penelusuran mekanisme apoptosis dapat dikorelasikan dengan ekspresi beberapa protein regulator, di antaranya Bcl-2. Sel MCF-7 adalah salah satu jenis sel kanker dengan over-ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2.²² Golongan protein ini mengendalikan homeostatis mitokondria dan berperan dalam inisiasi apoptosis.²³ Pengamatan ekspresi Bcl-2 menunjukkan adanya penurunan yang disebabkan adanya perlakuan formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas. Pada konsentrasi 60 µg/mL, formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas ternyata telah mampu menurunkan ekspresi Bcl-2, bahkan pada konsentrasi 120 µg/mL formula ekstrak telah mampu menekan secara signifikan ekspresi Bcl-2.

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa ekstrak etanol buah takokak memiliki efek sitotoksik kuat pada *cell line* Ehrlich's Ascites Carcinoma (EAC).¹⁵ Selanjutnya, pada percobaan *docking* menggunakan protein anti-apoptosis Bcl-2, solasodin pada buah takokak mampu mengikat energi dari protein Bcl-2. Dapat dipahami bahwa senyawa solasodin dengan energi ikatan minimal (-6,16 kkal/mol), diyakini sebagai kompleks ligan-protein terbaik. Hal ini disebabkan dengan menggunakan energi minimal, solasodin memiliki kemampuan mengikat reseptor protein Bcl-2 dan menyebabkan apoptosis.⁹ Dengan demikian, diduga bahwa masing-masing tumbuhan obat yang diuji memiliki senyawa aktif yang sinergis mampu meningkatkan efektifitasnya dalam menghambat proliferasi sel MCF-7 dan bahkan mendorong ke arah apoptosis dibandingkan dengan pengaruh ekstrak tunggal.

KESIMPULAN

Ekstrak air daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas terbukti memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC₅₀ berturut turut 56,61 µg/mL, 85,75 µg/mL, dan 101,26 µg/mL. Formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1 memiliki aktivitas penghambatan viabilitas sel kanker MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 48,89 ug/ml. Pemberian formula ekstrak daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas dengan perbandingan 1:1:1 mulai konsentrasi 60 µg/mL dapat memacu terjadinya apoptosis sel MCF-7, terbukti mampu menekan secara bermakna ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional yang telah memberikan izin dan fasilitas sehingga penelitian ini dapat berjalan.

DAFTAR RUJUKAN

1. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al. Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(10):21087–113.
2. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):135–48.
3. Schneider KA. Counseling about cancer: Strategies for genetic counseling. 3rd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011.
4. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon; 2014.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
6. Greenwell M, Rahman P. Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*. 2015;6(10):4103–12.
7. Khazir J, Riley D, Pilcher L, De Maayer P, Mir B. Anticancer agents from diverse natural sources. *Natural Product Communications*. 2014;9(11):1655–69.
8. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat. Laporan Penelitian Riset Eksplorasi Pengetahuan Lokal Etnomedisin dan Tumbuhan Obat di Indonesia Berbasis Komunitas (Ristoja 2012). Jakarta; 2012.
9. Minari J, Okeke U. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(4):327–34.
10. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2):115–8.
11. Hermawan A, Maryani R. Bidara Upas (*Merremia mammosa*) [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 30]. Available from: http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/en/?page_id=126
12. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editors. Assay guidance manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
13. Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Salameh NM, Jamous RM, Hamadeh AM. Complementary and alternative medicine use among cancer patients in Palestine with special reference to safety-related concerns. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016 Jul;187:104–22.
14. Mangla B, Kohli K. Combination of natural agent with synthetic drug for the breast cancer therapy. *International Journal of Drug Development and Research*. 2009;10(1):22–6.
15. Panigrahi S, Muthuraman MS, Natesan R, Pemiah B. Anticancer activity of ethanolic extract of *Solanum torvum* SW. *International Journal of Pharmacy and*

- Pharmaceutical Sciences. 2014;6(Suppl 1):93–8.
16. Chang FR, Wu YC. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 2001 Jul;64(7):925–31.
 17. Rady I, Bloch MB, Chamcheu R-CN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer properties of *Graviola* (*Annona muricata*): A comprehensive mechanistic review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:1–39.
 18. Daud NNNM, Ya'akob H, Rosdi MN. Acetogenins of *Annona muricata* leaves: Characterization and potential anticancer study. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 2016;3(4):543–51.
 19. Li H, Li X, Bai M, Suo Y, Zhang G, Cao X. Matrine inhibited proliferation and increased apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via upregulation of Bax and down regulation of Bcl-2. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(11):14793–9.
 20. Chiu HF, Chih TT, Hsian YM, Tseng CH, Wu MJ, Wu YC. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 2003 Feb;65(3):319–27.
 21. Jon F. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) Terhadap Proliferasi Limfosit Dan Produksi ROI Makrofag. Studi Eksperimental Infeksi *Salmonella Typhimurium* pada Mencit Balb/C. Universitas Diponegoro; 2012.
 22. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med*. 2003;228(9):995–1003.
 23. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(4):a008714–a008714.