

Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Sebagai Penghambat Perkembangan Tumor Payudara

Atina Husaana^{(a)*}, Qathrunnada Djam'an^(a), Edijanti Goenarwo^(a), Chodidjah^(a)

^(a) Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Indonesia

^(b) Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Indonesia

Kanker payudara merupakan penyebab kematian kedua setelah kanker leher rahim pada wanita. Pengobatan kanker sampai sekarang masih belum berhasil dengan baik. Daun sirsak merupakan obat tradisional yang secara empirik dipakai masyarakat Indonesia sebagai obat antiinflamasi dan antikanker. Kandungan aktif acetogenin pada daun sirsak diketahui dapat menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktivitas caspase-3 dan menghambat proliferasi pada kultur sel kanker. Dengan tujuan untuk mengetahui potensi antikanker ekstrak daun sirsak, penelitian ini dilakukan dengan rancangan *post test randomized control group design*, menggunakan 24 ekor mencit C3H yang telah diinokulasi bubur tumor jenis adenokarsinoma mamma dan telah tumbuh tumor. Mencit kemudian dikelompokkan secara random menjadi kelompok 1 (kontrol), 2 dan 3, berturut-turut mendapatkan aquades, ekstrak daun sirsak dosis 10 mg/kg dan 20 mg/kg. Perlakuan diberikan peroral selama 30 hari. Selama perlakuan, volume tumor diamati tiap 3 hari untuk mengetahui penghambatan perkembangan tumor payudara. Pada hari ke-31, jaringan tumor diambil dan dibuat preparat histopatologi untuk pengecatan imunohistokimia terhadap ekspresi protein Ki-67 dan pengecatan Tunnel, berturut-turut untuk mengetahui tingkat proliferasi serta jumlah sel kanker yang mengalami apoptosis. Data di uji dengan uji *One Way Anova*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mampu memperlambat pertumbuhan tumor payudara tetapi tidak mengurangi besar tumor akhir. Disamping itu, ekstrak daun sirsak mampu menghambat proliferasi sel melalui hambatan ekspresi Ki-67 dan mampu meningkatkan apoptosis.

Kata kunci : daun sirsak, *Annona muricata*, tumor payudara, Ki-67, apoptosis.

The Extract of Soursop Leaves (*Annona muricata*) as Inhibitors of Breast Tumor Development

Breast cancer remains the second most common cause of death after cervix cancer in women. Breast cancer still can not be treated satisfactorily. Soursop leaves is has been used empirically in Indonesian society as anti-inflammatory and anticancer. Active ingredients acetogenin on soursop leaves is known to induce apoptosis by increasing the activity of caspase-3 and inhibits cancer cell proliferation *in vitro*. The study to observe the anticancer potential of soursop leaves extract was conducted with *post-test randomized control group design*. Twenty four C3H mice that had been inoculated with homogenate of adenocarcinoma breast tumor and has been growing tumors. Mice were divided randomly into group 1 (control), 2 and 3 that get distilled water, soursop leaves extract at a dose of 10 mg/kg and 20 mg/kg respectively. Treatment was given orally for 30 days. During the treatment, the tumor volume was observed every 3 days to determine the inhibition of breast tumor progression. On day 31, the tumor tissue was taken and made preparations for Ki-67 immunohistochemistry staining to determine the level of proliferation, and Tunnel staining to observe the number of cancer cells undergoing apoptosis. The data was analysed with *One Way Anova*. The results indicated that the soursop leaves extract had the potential to inhibit the growth of breast tumors but it has not been able to show the final tumor size reduction. In detail, soursop leaves extract could inhibit cell proliferation by down regulate Ki-67 expression and increase apoptosis.

Keywords: soursop leaves, *Annona muricata*, breast tumor, Ki-67, apoptosis.

*Corresponding author: atinahussaana@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyebab kematian yang cukup tinggi pada wanita didunia. Setiap tahun terdapat lebih dari 1,1 juta wanita penderita kanker payudara yang baru dengan 410.000 kematian. Peningkatan angka kejadian kanker payudara lebih dari 5% setiap tahun (Moningkey *et al.*, 2000). Pengobatan kanker payudara dengan radioterapi, kemoterapi maupun dengan imunoterapi masih belum mendapatkan hasil yang baik (Zablotska *et al.*, 2005; Weimberg *et al.*, 2007).

Daun sirsak secara empirik telah digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan kanker. Pada penelitian terdahulu akar dari familia Annonaceae lain (*Annona reticulata*) dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan menginduksi apoptosis dan menghambat proliferasi sel tumor secara *in vitro* (Suresh *et al.*, 2011). Zat aktif pada daun sirsak di antaranya alkaloid dan acetogenin. Pada biji familia annonaceae lain (*Annona squamosa*), alkaloid dapat menghentikan pertumbuhan sel kanker pada fase metafase dan menimbulkan kematian sel. Acetogenin dapat menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktifitas caspase-3, menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl yang merupakan protein proapoptosis, dan menghambat proliferasi sel kanker (Pardhasaradi *et al.*, 2004).

Pertumbuhan tumor dipengaruhi oleh protein yang terlibat pada proliferasi sel, dapat dilihat dengan tolok ukur protein Ki-67. Ekspresi protein Ki-67 yang meningkat terdapat pada sel kanker payudara (Azambuja *et al.*, 2007). Daun sirsak yang diberikan pada kultur sel kanker akan mempengaruhi proses apoptosis dengan peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis yaitu terdapatnya kondensasi kromatin, badan apoptotik (*apoptotic body*), dan pengkerutan sel. Selain itu juga terjadi hambatan pada proliferasi sel yang ditandai dengan menurunnya ekspresi protein Ki-67.

METODE PENELITIAN

Alat

Sonde oral, timbangan digital, alat sokletasi, kompor listrik, *rotary evaporator*, spuit injeksi, skalpel.

Bahan

Ekstrak daun sirsak, CMC Na, mencit C3H betina, bufer formalin, H₂O₂, Trypsin, PBS, anti Ki-67.

Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Maret sampai Oktober 2013 di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung dan di bagian Patologi Anatomi RS. Dr. Sardjito Yogyakarta.

Ekstrak Daun Sirsak

Ekstrak daun sirsak dibuat suspensi dengan larutan CMC Na 0,05% untuk memperoleh dosis 10 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB. Perlakuan dosis ekstrak daun sirsak diberikan per oral 1 kali sehari selama 30 hari.

Transplantasi Tumor

Transplantasi tumor pada penelitian ini dikerjakan seperti pada Varticovski (2007). Seekor mencit C3H bertumor sebagai donor kanker payudara dimatikan, jaringan tumor diambil dan dicacah menjadi bubuk dengan ditambahkan larutan garam fisiologis (perbandingan 1:1). Bubur tumor disuntikkan secara subkutis ke setiap mencit resipien. Setelah 7 hari sejumlah 18 mencit yang telah tumbuh tumor dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 mendapat perlakuan peroral dengan aquades 0,2 ml, kelompok 2 dan kelompok 3 berturut-turut mendapat perlakuan peroral dengan ekstrak daun sirsak 10 dan 20 mg/kgBB, sekali sehari selama 30 hari. Pada hari ke-31 jaringan tumor diambil untuk dibuat preparat histopatologi, dilanjutkan dengan pengecatan imunohistokimia dan Tunnel untuk pemeriksaan protein Ki-67 dan pemeriksaan jumlah sel yang mengalami apoptosis.

Mengukur Ekspresi Protein Ki-67

Ekspresi protein Ki-67 pada penelitian ini dilakukan secara imunohistokimia dengan metode *Labelled Avidin Biotin Peroxidase Complex* (ABPC) dengan antibodi anti Ki-67. Hasil pulasan imunohistokimia Ki-67 dinyatakan positif bila terdapat sel-sel dengan inti berwarna coklat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

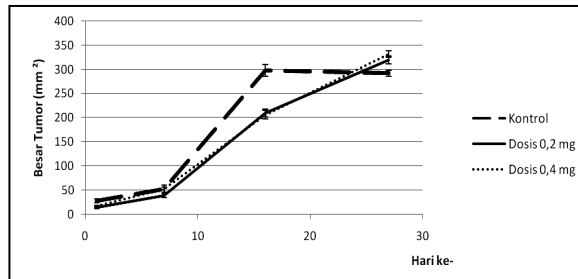
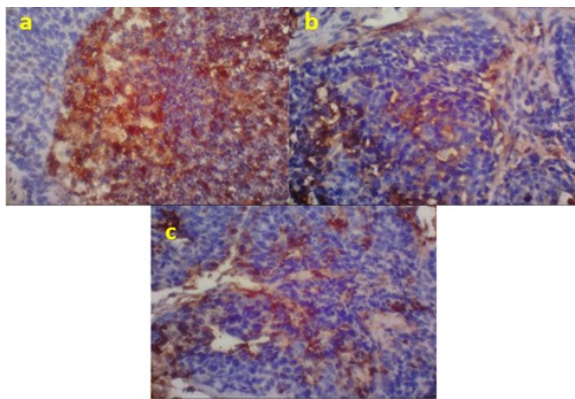
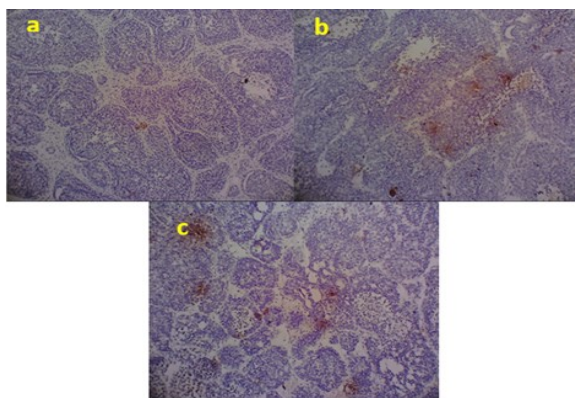
Pada penelitian ini, perkembangan tumor pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak daun sirsak diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Hasil pengamatan secara makroskopik seperti dapat dilihat pada **Tabel 1** dan perkembangan tumor seperti diilustrasikan dalam **Gambar 1** menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak dosis 0,2 mg tidak berpengaruh memperlambat pembesaran tumor, sedangkan dosis 0,4 mg cenderung memperlambat pembesaran tumor walaupun besar tumor akhir tidak berbeda dengan kontrol.

Kurang berpengaruhnya ekstrak daun sirsak terhadap perlambatan dan pengurangan besar tumor tersebut kemungkinan disebabkan karena perlakuan yang kurang lama. Untuk memastikan pengaruh pada tingkat molekuler, jaringan tumor diambil untuk melihat faktor yang mempengaruhi proliferasi dan apoptosis melalui pengecatan imunohistokimia (IHC).

Pengecatan IHC dilakukan untuk melihat ekspresi protein Ki-67 sebagai parameter faktor proliferasi, sedangkan pengecatan Tunnel untuk melihat jumlah sel yang mengalami apoptosis. Hasil pengamatan terhadap ekspresi Ki-67 ditampilkan pada **Gambar 2**. Dari **Gambar 2** dapat dilihat bahwa ekspresi Ki-67 pada jaringan tumor payudara pada tikus yang tidak mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak (kontrol), secara kualitatif terlihat lebih banyak dibandingkan tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak. Adapun ekspresi Ki-67 pada tikus yang mendapat ekstrak daun sirsak dosis 0,2 mg dan dosis 0,4 mg tidak terlihat berbeda.

TABEL 1. Perjalanan Besar Tumor pada Mencit yang Dinokulasi dengan Bubur Tumor Payudara

Hari	Rerata Besar Tumor (mm ²)		
	Kontrol	Dosis 0,2 mg	Dosis 0,4 mg
1	28,39±4,25	14,53±2,30	16,75±1,82
7	53,19±7,42	38,65±3,61	51,60±5,41
16	297,52±12,53	209,37±8,06	205,88±8,67
27	291,65±6,17	319,93±8,32	331,90±6,68

**GAMBAR 1.** Perjalanan besar tumor pada mencit yang dinokulasi dengan bubur tumor payudara.**GAMBAR 2.** Ekspresi Ki-67 pada jaringan tumor payudara ditunjukkan dengan warna coklat. (a) tikus yang tidak mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak (kontrol); (b) tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak dosis 0,2 mg dan (c) tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak dosis 0,4 mg.**GAMBAR 3.** Hasil pemeriksaan apoptosis dengan pengecatan Tunnel pada jaringan tumor payudara. Apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel. (a) tikus yang tidak mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak (kontrol); (b) tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak dosis 0,2 mg dan (c) tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak dosis 0,4 mg dengan perbesaran 100x.

Adapun untuk melihat pengaruh ekstrak daun sirsak pada apoptosis digunakan pengecatan Tunnel.

Berdasarkan pengecatan Tunnel seperti diilustrasikan pada **Gambar 3**, dapat dilihat bahwa apoptosis pada jaringan tumor payudara pada tikus yang tidak mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak (kontrol), secara kualitatif terlihat lebih sedikit dibandingkan tikus yang mendapatkan perlakuan ekstrak daun sirsak. Adapun apoptosis pada tikus yang mendapat ekstrak daun sirsak dosis 0,2 mg dan dosis 0,4 mg tidak terlihat berbeda.

Dari berbagai hasil yang ditampilkan di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak mempunyai kecenderungan menghambat proliferasi melalui penghambatan ekspresi Ki-67. Di samping itu, ekstrak daun sirsak mempunyai kecenderungan untuk meningkatkan apoptosis. Hal ini kemungkinan karena kandungan acetogenin yang mempunyai efek anti tumor yang poten baik secara invitro maupun secara invivo.

Golongan acetogenin (squamocin) diketahui mempunyai efek dapat menghambat proliferasi kultur sel HL-60 dengan IC₅₀ pada 0,17 µg/mL dan menginduksi apoptosis pada sel HL-60. Mekanisme squamocin terhadap apoptosis menyebabkan kondensasi nucleus, fragmentasi DNA dan pemecahan PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*) dan menginduksi aktifitas caspase 3. Ekspresi Bcl2, Bax, tidak ada perubahan pada kultur sel HL-60 yang diberi Squamocin walaupun SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) aktif setelah treatment Squamocin (Zhu *et al.*, 2002). Acetogenin juga merupakan inhibitor NADH quinon oxidase (complex 1). NADH dehydrogenase merupakan enzim yang berada pada membran mitokondria bagian dalam mengkatalisis transfer elektron dari NADH ke *Co enzyme Q*. NADH complex 1 meningkatkan apoptosis. Squamocin (gol. Acetogenin) memodulasi fosforilasi Histon (Lee *et al.*, 2011). Histon merupakan protein pada struktur kromatin sel *eukaryotic*, terlibat pada regulasi gen, mitosis dan DNA repair.

Pada jalur MAPK (jalur proliferasi) squamosin menurunkan fosforilasi ERK dan mengaktifkan caspase 3, 8, dan 9 pada proses apoptosis (Lee *et al.*, 2011). Acetogenin aliphatic menghambat proliferasi sel melalui jalur RAS/RAF/Monstituen MEK/ERK (Ambrosio *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Ekstrak daun sirsak mampu memperlambat pertumbuhan tumor payudara tetapi tidak mampu mengurangi besar tumor akhir. Ekstrak daun sirsak mampu menghambat proliferasi sel melalui hambatan ekspresi Ki-67 dan mampu mening-

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichman AH, dan Pober JS, 2010, **Cellular and Molecular Immunology**, Philadelphia, WB Saunders Coy.
- Andreef M, Goodrich DW, dan Pardee AB, 2000, **Cell proliferation, Differentiation, and Apoptosis**, Cancer Medicine-NCBI Bookshelf, BC Decker Inc., Atlanta.
- Azambuja E, Candoso F, Castro J, Colloza M, Mano MS, Sotirion C, Larsimont D, Gebhart MJP, dan Paesmans, 2007, Ki67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patient, **Br J Cancer**, 96, 1504-1513.
- Azhar TN, Wijaya, dan Zulfa A, 2000, **Dasar Biologi Molekuler**, Badan Penerbit UNDIP, Semarang .
- Baskar R, Rajeswari V, dan Kumar TS, 2007, *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species, **Indian J Exp Biol**, 45(5), 480-5.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, dan Liang J, 2005, Caspase Family Proteases and Apoptosis, **Acta Biochim Biophys Sin**, 37(11), 719-27.
- Frank LM dan Teich NM, 1997, **Cellular and Molecular Biology of Cancer**, 3rd ed., Oxford University Press, New York.
- Jager R, 2007, Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue cultur experiments, **Crit Rev Oncol Hematol**, 63(3), 231-40.
- Lai CS, Mas RH, Nair NK, Majid MI, Mansor SM, dan Navarasman V, 2008, Typhonium Flagelliforme inhibits cancer cell growth in vitro and induces apoptosis: An evaluation by the bioactivity guide approach, **J Ethnopathomol**, 118(1), 14-20.
- Matsushige A, Kotake Y, Matsunami K, Otsuka H, Ohta S, dan Takeda Y, 2012, Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*, **Chem Pharm Bull**, 60(2), 257-9.
- Moningkey dan Ivone S, 2000, **Epidemiologi Kanker Payudara**, Medika, Jakarta.
- Pardhasaradhi BV, Reddy M, Ali AM, Kumari AL, dan Khar A, 2004, Antitumor activity of *Annona squamosa* seed extract is through the generation of free radicals and induction apoptosis, **Indian J Biochem Biophys**, 41(4), 167-72.
- Mohan S, Bustamam A, Ibrahim S, Al-Zubairi AS, Aspollah M, Abdullah R, Taha MM, Beng NK, dan Isa NM, 2010, Typhonium flagelliforme inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vitro and induces apoptosis in vivo, **Leuk Res**, 34(11), 1483-92.
- Rachmani EPN, Suhesti TS, dan Adityono RW, 2012, The Breast of Anti Cancer From Leaf Extract of *Annona muricata* Against Cell Line in T47D, **Int J Appl Sci Tech**, 2(1), 157-164.
- Suresh HM, Shivakumar B, Hemalatha K, Heroor S, Hugar DS, dan Rao S, 2011, In vitro antiproliferative activity of *Annona reticulata* roots on human cancer cell lines, **Pharmacognosy Res**, 3(1), 9-12.
- Varticovski L, Hollingshead MG, Robles AI, Wu X, Cherry J, Munroe DJ, Lukes L, Anver MR, Carter JP, Borgel SD, Stotler H, Bonomi CA, Nunez NP, Hursting SD, Qiao W, Deng CX, Green JE, Hunter KW, Merlino G, Steeg PS, Wakefield LM, dan Barrett JC, 2007, Accelerated Preclinical Testing Using Transplanted Tumors from Genetically Engineered Mouse Breast Cancer Models, **Clin Cancer Res**, 13(7), 2168-77.
- Zablotska LB, Chak A, Das A, dan Neugut AI, 2005, Increased Risk of Squamous Cell Esophageal Cancer after Adjuvant Radiation, **Am J Epidemiology**, 161(4), 330-7.