

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang Masalah**

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondermarck, 2003). Salah satu jenis kanker adalah kanker leher rahim (serviks). Kanker serviks merupakan kanker peringkat kedua setelah kanker payudara yang berkisar 10% dari seluruh kanker pada wanita. Kanker serviks merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di usia reproduktif pada wanita di negara-negara berkembang dengan penduduk yang memiliki status sosial ekonomi yang rendah (Tortolero *and* Franco, 2004; Rasjidi, 2007).

Terapi umum pada penderita kanker serviks yaitu operasi, radioterapi dan kemoterapi. Salah satu agen kemoterapi yang paling sering digunakan dalam penanganan kanker servik adalah cisplatin (Dipiro *et al.*, 2008). Cisplatin dapat menyebabkan beragam efek samping seperti neurotoksisitas, toksisitas ginjal atau penekanan sum-sum tulang belakang (Florea *and* Busselberg, 2011).

Masalah yang mempersulit upaya pengobatan kanker adalah efek samping pengobatan dan kondisi ekonomis sebagian besar masyarakat yang belum memadai. Mengingat adanya masalah tersebut, maka perlu dicari alternatif dengan memanfaatkan tumbuhan obat di sekitar kita. Pengobatan tradisional sering dilakukan

masyarakat karena biayanya murah, bahannya mudah didapat dan aman bagi tubuh serta memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan obat-obat modern (Sastomidjojo, 1997).

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.). Tanaman sirsak mengandung saponin, flavonoid, tanin, kalsium, fosfor, vitamin (A, B, C), fitosterol, ca-oksalat, dan alkaloid murisine (Mangan, 2009). Menurut Arifianti (2014) biji sirsak mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, saponin, polifenol dan alkaloid. Senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman sirsak adalah *Annonaceous acetogenins* yang telah lama diteliti dan terbukti bersifat antikanker, selain itu juga bersifat antiparasit, insektisida, anticacing, antibakteri, dan antivirus (Taylor, 2002). Beberapa *acetogenin annonaceae* dalam tanaman sirsak meliputi: *annocatalin*, *annohexocin*, *annonomicin*, *annomontacin*, *annonacin*, *cis-annonacin* (Raintree, 2004). Biji dan daun sirsak secara empiris banyak digunakan sebagai antikanker (Evira, 2013).

Menurut Yuan (2003) efek sitotoksik dan modulasi siklus sel ditunjukkan pada biji buah nona (*Annona reticulata* L.) terhadap sel kanker kandung kemih T24 dimana *Annonacin* mampu mengistirahatkan siklus sel pada fase G1 dan menghambat perkembangan pada fase S, selain itu p53, p21 dan protein *checkpoint* dapat ditingkatkan oleh *annonacin*. Ekstrak etanol biji sirsak dapat menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa secara in vitro dengan potensi hambatan sebesar  $8,906 \pm 4,497 \mu\text{g/ml}$ . Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol biji sirsak dapat digunakan sebagai pilihan terapi antikanker (Arifianti *et al.*, 2014). Untuk itu perlu

dilakukan penelitian lebih lanjut pada ekstrak etanol biji sirsak terhadap sel kanker servik (HeLa) untuk mengetahui mekanisme molekuler melalui modulasi siklus sel. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi yang bermanfaat dalam pemilihan obat alternatif anti kanker serviks yang murah, ekonomis dan mudah diperoleh.

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

Apakah ekstrak etanolik biji sirsak (*Annona muricata* L.) berpengaruh terhadap modulasi siklus sel kanker HeLa ?

### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak etanolik biji sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap modulasi siklus sel kanker HeLa.

### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yakni :

1. Memberikan bukti ilmiah pengaruh ekstrak etanolik biji sirsak terhadap modulasi siklus sel kanker serviks HeLa.
2. Menambah data ilmiah mengenai potensi biji sirsak sebagai agen pengobatan tradisional kanker serviks HeLa.

## E. Tinjauan Pustaka

### 1. Kanker

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondermarck, 2003). Menurut IARC (2012) Insiden kanker pada perempuan di Indonesia mencapai 134 per 100.000 penduduk, dimana kanker serviks merupakan insiden tertinggi kedua setelah kanker payudara dengan jumlah insiden 17 per 100.000 penduduk. Estimasi Globocan angka kematian di Indonesia untuk kanker serviks adalah 8,2 kematian per 100.000 penduduk.

Sel kanker memiliki perbedaan dengan sel normal di dalam tubuh. Sel kanker memiliki ciri-ciri sebagai berikut (Hanahan dan Weinberg, 2011) :

1. Mempunyai kemampuan untuk mempertahankan sinyal proliferasi atau pertumbuhannya sendiri.
2. Mempunyai kemampuan untuk menghindari sinyal anti pertumbuhan.
3. Mampu menginvasi jaringan dan bermetastatis karena kehilangan E-caderin yang merupakan molekul penting dalam adhesi sel dengan sel lain.
4. Mempunyai kemampuan untuk melakukan replikasi yang tidak terbatas.
5. Mempunyai kemampuan untuk angiogenesis sehingga dapat bertahan hidup.
6. mempunyai kemampuan untuk melawan kematian sel atau menghindari program apoptosis.

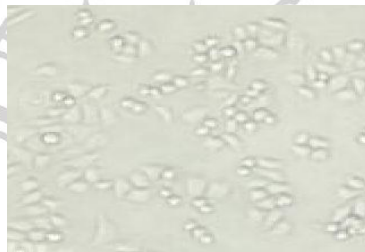
## 2. Kanker serviks dan sel HeLa

Kanker serviks adalah keganasan yang terjadi pada leher rahim dimana dalam keadaan ini terdapat kelompok-kelompok sel abnormal, yang timbul diantara epitel, yang melapisi ektoleher rahim maupun endoleher rahim kanalis servikalis yang sebagai *scuamosa columner junction* atau SCJ yang terbentuk oleh sel-sel jaringan yang tumbuh terus-menerus tak terbatas (Kustiyati, 2011).

Human papillomavirus (HPV) yang merupakan faktor inisiator dari kanker serviks yang menyebabkan terjadinya gangguan sel serviks. Onkoprotein E6 dan E7 yang berasal dari HPV merupakan penyebab terjadinya degenerasi keganasan. Integrasi DNA virus dimulai pada daerah E1-E2. Integrasi menyebabkan E2 tidak berfungsi, tidak berfungsinya E2 menyebabkan rangsangan terhadap E6 dan E7 yang akan menghambat p53 dan protein retinoblastoma (pRb). E6 akan mengikat p53 sehingga Tumor suppressor gene (TSG) p53 akan kehilangan fungsinya, yaitu untuk menghentikan siklus sel pada fase G1. Sedangkan onkoprotein E7 akan mengikat TSG Rb (Retinoblastoma), ikatan ini menyebabkan terlepasnya E2F, pembebasan E2F membiarkan transkripsi produk gen yang dibutuhkan sel untuk masuk fase S dari siklus sel, dengan kata lain terjadi peningkatan proliferasi sel terus menerus (Shin *and* Dubeau, 2001).

Sel Hela adalah sel yang berasal dari sel-sel kanker serviks yang diambil dari seorang penderita kanker serviks bernama Henrietta Lacks. Sel ini bersifat immortal dan produktif sehingga banyak digunakan dalam penelitian ilmiah (Rahbari *et al.*, 2009; Capes *et al.*, 2010; Watts *and* Denise, 2010). Sel kanker

serviks yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk *cell cycle progression* (DeFilippis *et al.*, 2003). Sebagian besar sel kanker serviks, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker serviks. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin *and* DiMaio, 2000). Gambar morfologi sel kanker HeLa dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Morfologi sel kanker HeLa** (Dokumentasi pribadi).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu

memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986).

### 3. Siklus sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke dua sel anak. Secara umum, pembelahan sel terbagi menjadi 2 tahap, yaitu mitosis (M) (pembelahan 1 sel menjadi 2 sel) dan interfase (proses di antara 2 mitosis). Interfase terdiri dari fase gap 1 (G1), sintesis DNA (S), gap 2 (G2) (Vermeulen *et al.*, 2003).

Tahapan dalam siklus sel dikontrol oleh regulator siklus sel yaitu:

- a. Cyclin. Jenis cyclin utama dalam siklus sel adalah cyclin D, E, A, dan B. Cyclin diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi cyclin berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Berbeda dengan cyclin yang lain, cyclin D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi dari *growth factor*.
- b. Cyclin-dependent kinases (Cdk). Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4, 6, 2, dan 1. Cdks merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan cyclin untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena *catalytic site*, tempat ATP dan substrat berikatan diblok

oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengeblokan tersebut. Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses *downstream* dengan cara memfosforilasi protein spesifik.

- c. Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI), merupakan protein yang dapat menghambat aktivitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks cyclin-Cdk. Cyclin-dependent kinase inhibitor terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat cyclin D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 cyclin-Cdk dan cyclin B-Cdk1. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Ekspresi p21 diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk ekspresi p21 (Vermeulen *et al.*, 2003).

Siklus sel dimulai dari masuknya sel dari fase G0 (*quiescent*) ke fase G1 karena adanya stimulus oleh *growth factor*. Pada awal fase G1, Cdk 4 dan atau 6 diaktifkan oleh cyclin D (cycD). Kompleks Cdk4/6 dengan cycD akan menginisiasi fosforilasi dari keluarga protein retinoblastoma (pRb) selama awal G1. Efek dari fosforilasi ini, fungsi histon deasetilasi (HDAC) yang seharusnya menjaga kekompakan struktur kromatin menjadi terganggu. Akibatnya struktur DNA menjadi longgar dan faktor transkripsi yang semula diikat pRb menjadi lepas dan transkripsi dari E2F *responsive genes* yang dibutuhkan dalam progresi siklus



sel ke fase S menjadi aktif. Gen tersebut antara lain *cycE*, *cycA*, *Cdc25*, DNA polimerase, timidilat kinase, timidilatsintetase, DHFR (Satyanarayana *and* Kaldis, 2009; Vermeulen *et al.*, 2003). Pada transisi fase G1 ke fase S, Cdk2 aktif dengan mengikat *cycE*. Kompleks tersebut melanjutkan proses fosforilasi pRb (status hiperfosforilasi) supaya proses transkripsi yang dipacu E2F tetap aktif dan *Restriction point* (R) yang ada di batas fase G1/S dapat terlampaui. Pada saat inilah *cycA* ditranskripsi (Satyanarayana *and* Kaldis, 2009). Selama G1/S, kompleks Cdk2-*cycE* juga memfosforilasi inhibitor p27 sehingga p27 terdegradasi (Vermeulen *et al.*, 2003). Ketika siklus sel akan memasuki fase S, *cycE* akan didegradasi dan Cdk2 yang dibebaskan akan mengikat *cycA* (Cooper *and* Hausman, 2004).

Kompleks Cdk2-*cycA* dibutuhkan sel untuk mereplikasi DNA selama fase S. Kompleks Cdk2-*cycA* akan memfosforilasi protein yang dibutuhkan dalam replikasi DNA supaya aktif, contohnya adalah protein CDC6 (Cell Division Cycle 6). Kompleks tersebut juga menjaga supaya tidak terjadi *multiplicity* replikasi DNA. Pada akhir fase S, *cycA* akan melepas Cdk2 dan mengikat Cdk1 (Cdc2) yang meregulasi transisi sel dari S ke G2 (Dhulipala *et al.*, 2006). Kompleks *cycA*-Cdk1 akan memfasilitasi kondensasi kromatin yang dibutuhkan untuk penggandaan sel (Lapenna *and* Giordano, 2009). Pada fase G2, sel juga memiliki kesempatan melakukan mekanisme *repair* apabila terjadi kesalahan sintesis DNA (Baumforth *and* Crocker, 2003). Memasuki fase mitosis, *cycA* akan didegradasi dan terjadi peningkatan ekspresi *cycB* yang akan mengikat Cdk1. Kompleks

Cdk1-cycB secara aktif memacu mitosis. Kompleks cycB-Cdk1 berperan penting dalam kontrol *rearrangement* mikrotubul selama mitosis (Dhulipala *et al.*, 2006; Lapenna *and* Giordano, 2009).

Cdk1 dapat dinonaktifkan oleh Wee1 dan Myt1 dengan cara Wee1 dan Myt1 akan memfosforilasi Cdk1 pada tirosin-15 dan atau threonin-14. Defosforilasi pada situs tersebut dapat dilakukan oleh Cdc25 sehingga Cdk 1 menjadi aktif kembali dan siklus sel tetap berlangsung (Vermeulen *et al.*, 2003). Pada akhir fase mitosis, cycB akan didegradasi oleh *anaphase promoting complex* (APC) melalui proses proteolitik. APC juga berfungsi untuk memacu kromatid untuk berpisah bergerak ke masing-masing kutub untuk menyelesaikan mitosis (anafase) (Lapenna *and* Giordano, 2009).

Untuk menjamin bahwa DNA berduplikasi dengan akurat dan separasi dari kromosom terjadi dengan benar, maka siklus sel melakukan mekanisme *checkpoint*. *Checkpoint* bertugas mendeteksi kerusakan DNA. Apabila terdapat kerusakan DNA, *checkpoint* akan memacu *cell cycle arrest* sementara untuk perbaikan DNA atau *cell cycle arrest* permanen sehingga sel memasuki fase *senescent*. Bila mekanisme *cell cycle arrest* tidak cukup menjamin DNA yang rusak diduplikasi, maka sel akan dieliminasi dengan cara apoptosis (Siu *et al.*, 1999). Pada *checkpoint* ini, DNA sel induk diperiksa apakah terdapat kerusakan atau tidak. Bila terdapat DNA yang rusak, siklus sel dihentikan hingga mekanisme *repair* DNA rusak telah selesai. Setelah melampaui R, sel menjadi *committed* (komitmen) untuk menyelesaikan keseluruhan satu siklus (*no return point*) dan

selanjutnya sel harus mampu melakukan replikasi DNA. Bila tidak melampaui R, sel dapat kembali ke fase G<sub>0</sub>. Hilangnya kontrol dari R akan menghasilkan *survival* DNA yang rusak (Cooper and Hausman, 2004).

Ketika p53 terfosforilasi maka p53 tidak bisa lagi mengikat mdm2, kemudian inilah yang mampu menghilangkan penghambatan p53 dimediasi mdm2. DNA damage agent mengaktifkan p53 karena jika DNA rusak, maka DNA tidak akan diperbanyak. Jika diperbanyak maka bisa menghasilkan sel-sel dengan mutasi yang merusak, yang kemudian dapat mengakibatkan kanker. Jadi, p53 mengenali ketika sel telah mengalami kerusakan DNA dan menghentikan siklus sel (*cell cycle arrest*) sehingga sel dapat memperbaiki kerusakan (*repair*), atau dalam banyak kasus, hanya memberitahu sel untuk bunuh diri (apoptosis), yaitu dengan cara menstimulasi transkripsi gen seperti *p21* dan *Bax* sehingga siklus sel berhenti atau terjadi apoptosis (Siu *et al.*, 1999).

*Checkpoint* selanjutnya terdapat pada fase S yang berfungsi mendeteksi kerusakan DNA yang direplikasi. *Checkpoint* pada G<sub>2</sub> mencegah inisiasi mitosis sebelum replikasi DNA selesai. *Checkpoint* utama dalam fase S/G<sub>2</sub>/M adalah Chk1. Ketika terdapat kerusakan DNA, protein kinase ATR akan memfosforilasi Chk1, kemudian Chk1 memfosforilasi Cdc25C pada serin-216. Fosforilasi tersebut menyebabkan kompleks cycB-Cdk1 yang bertanggung jawab pada progresi fase G<sub>2</sub>/M tidak aktif. Selain itu, Chk1 juga memfosforilasi Cdc25A yang bertugas mengaktifkan kompleks cycE-Cdk2 dan cycA-Cdk2 yang berperan pada progresi

fase S. Dengan difosforilasinya Cdc25A oleh Chk1, kompleks cyc-Cdk menjadi tidak aktif dan terjadi *S arrest* (Xiao *et al.*, 2003; Beckerman *et al.*, 2009).

*Checkpoint* yang terakhir, disebut *spindle checkpoint*, bertugas menjaga integritas genom menjelang akhir mitosis. Jika terjadi kegagalan pada penempatan pasangan kromosom pada *spindle*, akan terjadi mitosis *arrest*. Pada sel kanker, *checkpoint* tidak berfungsi dengan baik dan siklus sel berlangsung tanpa kendali (Cooper *and* Hausman, 2004).

#### 4. Tanaman sirsak

Sirsak merupakan tanaman dengan tinggi pohon sekitar 8 meter. Batang coklat berkayu, bulat, bercabang. Mempunyai daun bebentuk telur atau lanset, ujung runcing, tepi rata, pangkal meruncing, pertulangan menyirip, panjang tangkai 5 mm, hijau kekuningan. Bunga terletak pada batang atau ranting, daun kelopak kecil, kuning keputi-putihan, benang sari banyak berambut. Buahnya bukanlah buah sejati, yang dinamakan "buah" sebenarnya adalah kumpulan buah-buah (buah agregat) dengan biji tunggal yang saling berimpitan dan kehilangan batas antar buah. Daging buah sirsak berwarna putih dan berbiji hitam. Akar berwarna coklat muda, bulat dengan perakaran tunggang (Syamsuhidayat *and* Hutapea, 1991). Gambar tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) dapat dilihat pada Gambar 2a, b dan c.



(a)

(b)

(c)

**Gambar 2. Tanaman Sirsak.** (a) pohon sirsak; (b) buah sirsak; (c) biji sirak (Dokumentasi pribadi)

### 5. Klasifikasi tanaman sirsak

Klasifikasi tanaman sirsak (Haryoto, 1998) adalah sebagai berikut :

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| Kingdom     | : Plantae                   |
| Divisi      | : Magnoliophyta             |
| Class       | : Magnoliopsida             |
| Ordo        | : magnoliales               |
| Family      | : Annonaceae                |
| Genus       | : Annona                    |
| Spesies     | : <i>Annona muricata</i> L. |
| Nama daerah | : Sirsak, nongko sabrang    |

### 6. Deskripsi tanaman

Pohon sirsak memiliki model Troll, ketinggian mencapai 8-10 meter dan diameter batang 10-30 cm. Daun sirsak berwarna hijau muda sampai hijau tua memiliki panjang 6-18 cm, lebar 3-7 cm, bertekstur kasar, berbentuk bulat telur,

ujungnya lancip pendek, daun bagian atas mengkilap hijau dan gundul pucat kusam di bagian bawah daun, berbentuk lateral saraf. Daun sirsak memiliki bau tajam menyengat dengan tangkai daun pendek sekitar 3-10 mm (Radi, 1998).

Bunga pada tanaman sirsak berbentuk tunggal (*flos simplex*) yaitu satu bunga terdapat banyak putik sehingga dinamakan bunga berpistil majemuk. Bagian bunga tersusun secara *hemicylis*, yaitu sebagian terdapat dalam lingkaran yang lain spiral atau terpencah. Mahkota bunga berjumlah 6 sepalum yang terdiri dari 2 lingkaran, bentuknya hampir segi tiga, tebal dan kaku, berwarna kuning keputih-putihan dan setelah tua mekar kemudian lepas dari dasar bunganya. Putik dan benang sari lebar dengan banyak karpel (bakal buah). Bunga keluar dari ketiak daun, cabang, ranting atau pohon. Bunga umumnya sempurna, tetapi terkadang hanya bunga jantan dan bunga betina saja dalam satu pohon (Radi, 1998).

Buah sirsak memiliki bentuk sejati berganda yaitu buah yang berasal dari satu bunga dengan banyak bakal buah tetapi membentuk satu buah. Buah memiliki duri sisik halus. Apabila sudah tua daging buah berwarna putih, lembek dan berserat dengan banyak biji berwarna coklat kehitaman (Radi, 1998).

Biji buah sirsak berwarna coklat agak kehitaman dan keras, berujung tumpul, permukaan halus mengkilat dengan ukuran panjang kira-kira 16,8 mm dan lebar 9,8 mm. Jumlah biji dalam satu buah bervariasi, berkisar antara 20-70 butir biji normal, sedangkan yang tidak normal berwarna putih kecoklatan dan tidak berisi (Radi, 1998).

## 7. Kandungan kimia tanaman sirsak

Tanaman sirsak mengandung saponin, flavonoid, tanin, kalsium, fosfor vitamin (A, B, C), fitosterol, ca-oksalat, dan alkaloid murisine (Mangan, 2009). Menurut Arifianti (2014) biji sirsak mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, saponin, polifenol dan alkaloid. Senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman sirsak adalah *Annonaceous acetogenins* yang telah lama diteliti dan terbukti bersifat antikanker, selain itu juga bersifat antiparasit, insektisida, anticacing, antibakteri, dan antivirus (Taylor, 2002). Beberapa *acetogenin annonaceae* dalam tanaman sirsak meliputi: *annocatalin*, *annohexocin*, *annomonacin*, *annomontacin*, *annonacin*, *cis-annonacin* (Raintree, 2004).

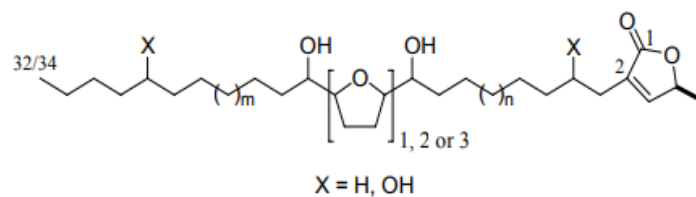
## 8. Khasiat Tanaman Sirsak

Biji dan daun sirsak secara empiris banyak digunakan sebagai antikanker (Evira, 2013). Ekstrak etanol biji sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker mamalia (T47D, HeLa, WiDr dan Raji) secara in vitro dengan potensi hambatan tertinggi terhadap sel kanker servik (HeLa) sebesar  $(8,906 \pm 4,497 \mu\text{g/ml})$  sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol biji sirsak dapat digunakan sebagai pilihan terapi antikanker (Arifianti *et al.*, 2014).

## 9. Annonaceous acetogenin

*Acetogenin* dapat ditemukan pada daun, akar dan paling banyak terdapat pada bagian biji sirsak (Aradilla, 2011). *Annonaceous acetogenin* merupakan suatu kelompok fitokimia yang mengandung poliketida. Kebanyakan *acetogenin* adalah derivat rantai panjang asam lemak (C32 atau C34) dan asam carboxylic terminal

yang dikombinasi dengan 2 unit propanolol pada posisi C2 untuk membentuk methylsubstituted  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated- $\gamma$ - lactone (Kojima *and* Tanaka, 2009). Salah satu struktur yang menarik adalah tetrahydrofuran (THF) atau tetrahydropyran (THP). Struktur *annonaceous acetogenin* digambarkan dalam gambar 3.



**Gambar 3. Struktur annonaceous acetogenin** (Gorman, 2006)

Efek sitotoksik dan anti kanker dari *acetogenins* memiliki beberapa mekanisme yaitu:

1. Menghambat oksidasi dari NADH di membrane plasma pada sel kanker. Enzim ini hanya di ekspresi pada sel normal yang sehat. Dengan menghambat enzim ini ATP selular akan menurun.
2. Menghambat kompleks I (NADH : ubiquimone oxidoreduktase) dalam system transport elektron di mitokondria, menghambat fosforilasi oksidasi dan menghasilkan kadar ATP yang rendah, sehingga menghambat pertumbuhan sel kanker.
3. Menghambat sel kanker yang multi drug resistant. Meningkatkan ekspresi dari plasma membrane pump, P-glycoprotein, adalah kontributor terhadap multidrug resistant. Pompa meningkatkan eliminasi dari kandungan anti kanker sebelum



kandungan tersebut dapat berefek terhadap sel kanker. Dua tempat ATP berikatan pada intraselular ditemukan pada P-glycoprotein, dan aktivitas pompa membutuhkan ATP. *Acetogenin*, lewat penurunan ATP, dapat menurunkan aktivitas atau mematikan pompa P-glycoprotein.

4. *Annonacin* mampu mengistirahatkan siklus sel pada fase G1 dan menghambat progresi fase S. Sebagai tambahan p53 dan p21 dapat ditingkatkan oleh *annonacin* (Raintree, 2004).

## 10. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang ada di bahan alam. Prinsip ekstraksi yaitu perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987; Depkes RI, 1986).

Ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi sebesar 20.000 Hz dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga menimbulkan gelembung spontan (*cavitation*) sebagai stres dinamis serta menimbulkan fraksi interfase. Kelebihan metode ekstraksi ultrasonik yaitu mempercepat proses ekstraksi, dibandingkan dengan ekstraksi termal atau ekstraksi konvensional, metode ekstraksi ultrasonik lebih aman, lebih singkat dan meningkatkan jumlah rendemen kasar (Depkes RI, 2000).

Faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak yaitu faktor biologi meliputi: spesies tumbuhan, lokasi tumbuh, waktu pemanenan, penyimpanan bahan tumbuhan, umur tumbuhan dan bagian yang digunakan (Depkes RI 2000). Lokasi tumbuhan sendiri berarti lingkungan (tanah dan atmosfer) tempat tumbuhan berinteraksi dengan lingkungan yang berupa energi (cuaca, suhu, cahaya) dan materi (air, senyawa organik dan senyawa anorganik). Variasi lingkungan inilah yang dianggap berpengaruh terhadap kualitas ekstrak tumbuhan obat (Depkes RI 2000).

## 11. Flowcytometry

*Flowcytometry* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. Pada suatu populasi sel yang sejenis, misal pada sel kanker yang diberi perlakuan suatu senyawa sitotoksik, dapat dilakukan analisis terhadap fase-fase daur sel, sel apoptosis, serta sel yang mengalami poliploidi. Masing-masing jenis sel tersebut memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom di mana pada fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, fase S, fase G<sub>2</sub>/M berturut-turut memiliki 2, 3, dan 4 set kromosom. Semakin banyak jumlah set kromosom, maka intensitas sinyal optik yang diberikan semakin kuat karena kemampuan fluoresen untuk berinterkalasi pada DNA semakin besar. Pada sel yang mengalami apoptosis (sub G<sub>0</sub>), intensitas fluoresen sangat lemah karena kromosom telah mengalami fragmentasi. Sedangkan pada sel poliploidi, intensitas

yang diberikan sangat kuat karena jumlah set kromosom yang lebih dari 4 set (CCRC, 2014).

## F. Landasan Teori

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Tanaman sirsak mengandung saponin, flavonoid, tanin, kalsium, fosfor vitamin (A, B, C), fitosterol, ca-oksalat, dan alkaloid murisine (Mangan, 2009). Menurut Arifianti (2014) biji sirsak mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, saponin, polifenol dan alkaloid. Senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman sirsak adalah *Annonaceous acetogenins* yang terbukti bersifat antikanker (Taylor, 2002). Beberapa *acetogenin annonaceae* dalam tanaman sirsak meliputi *annocatalin*, *annohexocin*, *annomonacin*, *annomontacin*, *annonacin*, *cis-annonacin* (Raintree, 2004). *Annonaceous acetogenin* bekerja menghambat dan membunuh sel kanker secara selektif, karena mampu mendeteksi dan membedakan sel normal dan sel kanker (Alali *et al.*, 1999). Menurut Yuan (2003) efek sitotoksik dan modulasi siklus sel ditunjukkan pada biji buah nona (*Annona reticulata* L.) terhadap sel kanker kandung kemih T24 dimana *Annonacin* mampu mengistirahatkan siklus sel pada fase G1 dan menghambat perkembangan pada fase S, selain itu p53, p21 dan protein *checkpoint* dapat ditingkatkan oleh *annonacin*. Ekstrak etanol biji sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker mamalia (T47D, HeLa, WiDr dan Raji) secara *in vitro* dengan menggunakan metode MTT assay dengan potensi hambatan terhadap sel kanker

servik (HeLa) sebesar  $8,906 \pm 4,497 \mu\text{g/ml}$ . Aktivitas ini dapat disebabkan kandungan kimia yang spesifik dari familia Annonaceae yaitu *annoceous acetogenin* (Arifianti *et al.*, 2014). Oleh karena itu, ekstrak etanolik biji sirsak diharapkan mampu menghambat siklus sel kanker Serviks (HeLa).

### G. Hipotesis

Berdasarkan uraian tersebut dapat dirumuskan hipotesis yaitu ekstrak etanolik biji sirsak (*Annona muricata* L.) mampu menghambat siklus sel kanker serviks (HeLa).



