BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan disekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah dan menyerang organ-organ penting serta syaraf tulang belakang (Mangan, 2003). Kanker payudara dan kanker leher rahim merupakan dua macam kanker yang frekuensi kejadiannya paling tinggi di antara kanker-kanker jenis lain yang sering menyerang wanita. Penderita kanker payudara di Indonesia sebanyak 12,10%, terbanyak kedua setelah kanker leher rahim (19,18%) (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002).

Pengobatan penyakit kanker secara modern seperti pembedahan, radiasi, penggunaan obat-obat kemoterapi dan terapi hormon telah banyak dilakukan. Namun usaha-usaha ini belum memperoleh hasil yang memuaskan (Nafrialdi dan Gan, 1995), bahkan efek dari kegagalan pembedahan bisa menyebabkan kanker menyebar ke bagian tubuh lain dengan kondisi yang parah (Sudewo, 2004). Dewasa ini pengobatan penyakit kanker dengan tanaman obat tradisional lebih disukai, selain biayanya murah dan mudah didapat, juga karena efek samping yang relatif kecil. Pengembangan penelitian pada tanaman berkhasiat obat banyak dilakukan untuk menemukan obat-obat baru yang relatif aman dan selektif dalam pengobatan penyakit kanker (Mangan, 2003).

Salah satu tanaman obat yang diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker yaitu daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.). Menurut data empiris, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor (Dalimarta, 2003). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun srikaya mempunyai efek ketoksikan terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} 1,77 µg/mL (Wahyono, 1995).

Ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun *Annona squamosa* L. menunjukkan efek toksik pada sel HeLa dengan nilai LC_{50} berturut-turut 4,5467 dan 7,6984 µg/mL (Djajanegara, 2009). Ekstrak diklorometan konsentrasi 5% dan ekstrak air konsentrasi 25% dari biji *Annona squamosa* juga memiliki aktivitas antitumor terhadap sel tumor BC-8 (Pardhasaradhi *et al*., 2004), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al*., 2005). Berdasarkan penelitian Pardhasaradhi (2004) diketahui bahwa ekstrak diklorometan yang bersifat nonpolar memiliki aktivitas antitumor yang lebih tinggi daripada ekstrak air. Penelitian lebih lanjut tentang potensi aktivitas sitotoksik fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap sel kanker payudara T47D dan mengetahui golongan senyawa apa yang tersari dalam fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya perlu untuk dilakukan.

B. Perumusan Masalah

Berdasar latar belakang maka rumusan masalah dapat disusun sebagai berikut:

1. Apakah fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya (*Anonna squamosa* Linn.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan berapa nilai IC_{50}-nya?
2. Golongan senyawa kimia apakah yang terkandung di dalam fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya tersebut?

C. Tujuan Penelitian

Berdasar latar belakang dan rumusan masalah, maka tujuan pada penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efek sitotoksik fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) terhadap sel T47D dengan menghitung IC_{50}-nya dengan metode *MTT assay*.
2. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya secara Kromatografi Lapis Tipis.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tinjauan tentang tanaman *Annona squamosa* Linn.

a. Klasifikasi tumbuhan

Klasifikasi tanaman srikaya dalam sistematika tumbuhan sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Annonaceae
Marga	: *Annona*
Jenis	: *Annona squamosa* Linn.

b. Nama daerah

Tanaman srikaya memiliki beberapa nama daerah, yaitu : Jawa (sarikaya, srikaya, serkaya, surikaya, srikawis, sarkaja, serakaja, sirikaja), Sumatera (delima bintang, serba bintang, sarikaya, seraikaya), Nusa Tenggara (sirkaya, srikaya, garoso, ata), Sulawesi (atis soe walanda, sirikaya, sirikaja, perse, atis, delima srikaya, srikaya), serta Maluku (atisi, hirikaya, atis) (Gunawan, 2001).

c. Morfologi tumbuhan

Pohon atau perdu, tinggi 2-7m. Daun elliptis memanjang sampai bentuk lanset tumpul, 6-17 kali 2,5-7,5cm, tepi rata. Bunga 1-2 berhadapan atau di samping daun. Daun kelopak segitiga, waktu kuncup bersambung secara katup (klepsgewijs), kecil. Daun mahkota yang terluar berdaging tebal, panjang 2-2,5cm, dari putih kuning, dengan pangkal yang berongga akhirnya ungu. Daun mahkota yang terdalam sangat kecil atau tidak ada. Dasar bunga dipertinggi. Benang sari banyak, putih. Penghubung ruang sari di atas ruang diperpanjang dan melebar, dan menutup ruangnya. Bakal buah banyak, ungu tua. Kepala putik duduk, rekat menjadi satu, mudah rontok. Buah majemuk lengkung bentuk bola, garis tengah 5-10 cm, berlilin. Anak buah khususnya dengan ujung yang melengkung, pada waktu masak sedikit atau banyak melepaskan diri satu dengan yang lain. Biji masak mengkilat. Daging buah putih. Pohon buah-buahan dari Hindia Barat, banyak ditanam (Steenis, 2005).

d. Kandungan kimia

Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin, polifenol dan senyawa poliketida (Dalimarta, 2003). Kulit batang, daun dan biji mengandung asetogenin, alkaloid annonain, squamosamide, dan senyawa-senyawa kelompok aforfin seperti koridin, roemerin, norkoridin, norisokoridin dan glausin (Alen, 2003).

e. Kegunaan

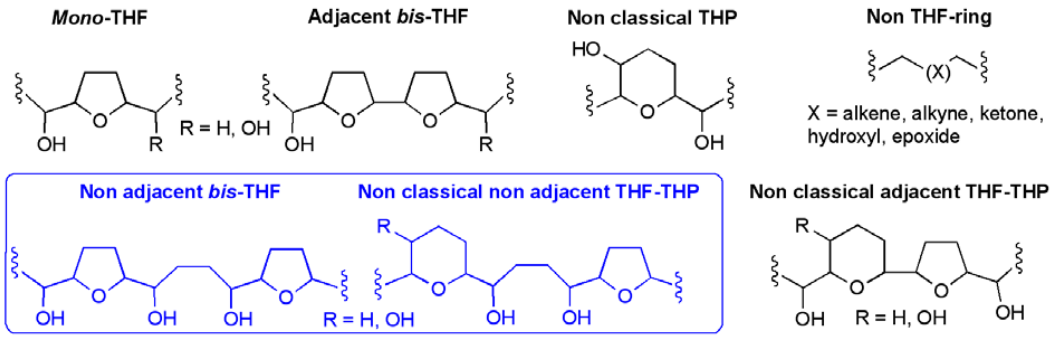
Daun tumbuhan ini digunakan untuk mengatasi encok, batuk, selesma, demam, rematik, gangguan saluran pencernaan dan penyakit kulit, serta menurunkan kadar asam urat yang tinggi dalam darah. Biji, akar dan kulit batang dapat digunakan pula untuk gangguan pencernaan (Ahmad, 2007). Selain itu, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor (Dalimarta, 2003).

f. Penelitian sebelumnya

Tanaman srikaya (*Annona squamosa* Linn.) berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bagian-bagian pada tanaman srikaya mempunyai aktivitas sitotoksik. Ekstrak diklorometan konsentrasi 5% dan ekstrak air konsentrasi 25% dari biji *Annona squamosa* memiliki aktivitas antitumor terhadap sel tumor BC-8 (Pardhasaradhi *et al*., 2004), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al*., 2005).

Asetogenin merupakan senyawa kimia yang terkandung dalam bangsa *Annonaceae* yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker, parasitisidal, dan antimikroba (Pardhasaradhi, 2004). Asetogenin merupakan senyawa poliketida dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone* (Gambar 1). Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* pada C-23 memiliki aktivitas sitotoksik. Derivat asetogenin yang berefek sitotoksik antara lain asmicin, bulatacin, dan squamocin (Shiddiqi, 2008). *Annonaceous* asetogenin bekerja dengan menghambat produksi ATP dengan mengganggu komplek 1 mitokondria (Pardhasaradhi, 2004). Dua *Annonaceous* acetogenin yang

(squamostatin-C dan squamostatin-D) berhasil diisolasi dari ekstrak biji *Annona squamosa* (Gajalakshmi, 2011). Squamocins-B-toN, coumarinoligans, annotemoyin-1, annotemoyin-2, dan squamocin merupakan beberapa senyawa asetogenin yang diisolasi dari biji dan mempunyai aktivitas antimikroba dan antikanker (Pandey, 2011).



Gambar 1. Kerangka struktur senyawa asetogenin (Spurr, 2010)

Hasil penelitian lainnya menyebutkan bahwa asetogenin dari Annonaceae menunjukkan aktivitas sitotoksik dan penghambat sel pertumbuhan. Bulatacin yang merupakan salah satu derivat dari asetogenin mempunyai aktivitas antitumor secara *in vitro*. Asetogenin dari Annonaceae yang diisolasi dari biji *Annona atemoya* menunjukkan sitotoksisitas pada sel kanker HepG2, KB, CCM2, dan CEM. *Squamocin*, derivat asetogenin yang lain menunjukkan efek antiproliferatif pada sel kanker HL-60 dengan mengaktivasi caspase-3 (Phardasaradhi *et al*., 2005). Selain terkandung dalam biji srikaya, senyawa kimia asetogenin, *squamone*,2,4 *cis* dan *trans bullatacinone* juga dapat diperoleh dari hasil pemurnian ekstrak biji, daun, dan ranting tanaman annonaceae (Hegnaur, 1986). Hasil penelitian Spurr (2010) juga menyatakan bahwa asetogenin dapat diisolasi dari hasil pemurnian ekstrak biji, daun, dan ranting tanaman annonaceae.

2. Sel T47D

Kanker payudara berasal dari jaringan epitelial, dan paling sering terjadi pada sistem duktal. Awalnya terjadi hiperplasia sel-sel dengan perkembangan atipatik. Sel-sel ini akan berlanjut menjadi karsinoma in situ dan menginfasi stroma. Kanker membutuhkan waktu 7 tahun untuk tumbuh dari sebuah sel

tunggal sampai menjadi massa yang cukup besar untuk dapat teraba (kira-kira berdiameter 1 cm). Ukuran tersebut kira-kira 25% kanker payudara telah bermetastasis (Price, 2005).

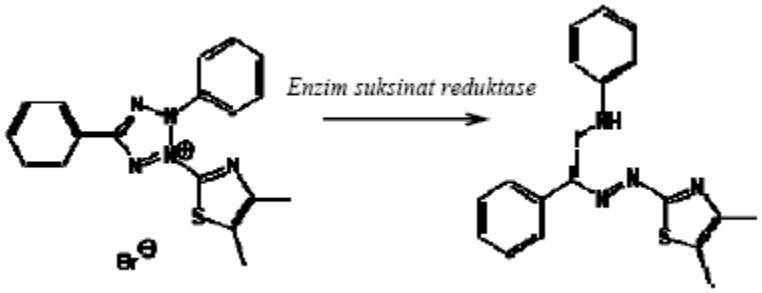
Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Abcam, 2007 cit Rahmi, dan Hermawan, 2009). Sel T47D ini dapat ditumbuhkan dengan medium penumbuh RPMI 1640 dengan *fetal bovine serum 10%* dan antibiotik bebas pada suhu 37°C dan dapat tumbuh secara kontinyu, menempel pada dasar flask (Anonim, 2011). Sel kanker T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif. Sel p53 mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain* L2) sehingga p53 kehilangan fungsinya. Jika p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA, maka kemampuannya untuk regulasi *cell cycle* dapat berkurang atau hilang (Schafer, dkk, 2000).

3. Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan pengembangan untuk mengidentifikasi obat sitotoksik baru atau deteksi obat dengan aktivitas antitumor. Dasar dari percobaan ini antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Informasi yang diperoleh dari kurva seharusnya berhubungan dengan efek in vivo dari obat sitotoksik yang sama. Sitotoksik senyawa merupakan syarat aktivitas antikanker (Burger, 1970).

Uji sitotoksik dapat menggunakan parameter IC_{50}. Nilai IC_{50} menunjukan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi dan menunjukan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

Uji MTT *assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Metode ini merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazon ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader* (Doyle dan Griffith, 2000). Reaksi reduksi MTT menjadi formazan oleh enzim reduktase dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan (Mossmann, 1983)

E. Landasan Teori

Bagian-bagian dalam tanaman srikaya berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Menurut Alen (2003) Kulit batang, daun dan biji *Annona squamosa* L. mengandung asetogenin, alkaloid annonain, squamosamide, dan senyawa-senyawa kelompok aforfin seperti koridin, roemerin, norkoridin, norisokoridin dan glausin (Alen, 2003). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak diklorometan konsentrasi 5% dan ekstrak air konsentrasi 25% dari biji *Annona squamosa* memiliki aktivitas antitumor terhadap sel tumor BC-8 (Pardhasaradhi *et al*., 2004), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al*., 2005). Komponen senyawa yang terkandung dalam tanaman srikaya antara lain senyawa-senyawa asetogenin (skuamostanin A, B, C, dan D) serta *annotemoyin*-1 dan -2, dan glukopiranosid kolesteril yang memiliki efek sitotoksik (Yang *et al*., 2009, Rahman *et al*., 2005). Asetogenin adalah senyawa poliketida dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang

terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* pada C_{23} memiliki aktivitas sitotoksik (Gonzalez, 2002). Senyawa asetogenin dapat diisolasi dari hasil pemurnian ekstrak biji, daun, dan ranting tanaman annonaceae (Spurr, 2010).

Senyawa aktif asetogenin mempunyai aktivitas sitotoksik dengan mekanisme kerja menghambat produksi ATP dengan mengganggu komplek 1 mitokondria dan menghambat NADH oksidase dari membran plasma pada sel tumor (Yang *et al.*, 2008). Asetogenin dari ekstrak biji *Annona squamosa* menginduksi apoptosis sel BC-8, dengan menginduksi fragmentasi DNA dan aktivasi caspase-3. Selain aktivasi caspase-3, ekstrak tersebut juga meregulasi ekspresi gen *Bcl* dan Bcl_{XL} yang berperan dalam induksi apoptosis (Pardharasardhi *et al*., 2004). Derivat asetogenin *squamocin* menunjukkan efek antiproliferatif pada sel kanker HL-60 dengan mengaktivasi caspase-3 (Phardasaradhi *et al*., 2005). Ekstrak diklorometan yang cenderung nonpolar memiliki aktivitas sitosoksik lebih tinggi dibanding ekstrak air (Pardhasaradhi, 2004), sehingga fraksi nonpolar ekstrak etanol daun srikaya diharapkan mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D.

F. HIPOTESIS

Fraksi non polar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) memiliki aktifitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dan dapat mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam daun *Annona Squamosa* Linn.