

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker masih menjadi masalah besar di bidang kesehatan karena merupakan penyakit yang menduduki urutan ketiga penyebab kematian di Indonesia setelah penyakit jantung dan paru-paru (Nugroho *et al.*, 2000). Menurut WHO (Organisasi Kesehatan Dunia), setiap tahun penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang. Dua pertiga dari penderita kanker di dunia berada di negara-negara yang sedang berkembang (Anonim, 1994). Kanker yang sering ditemukan diseluruh dunia dengan insidensi relatif tinggi adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan kanker nomor dua terbanyak yang menyerang wanita di Indonesia dan menjadi pembunuh nomor satu wanita di dunia (Mangan, 2003). Menurut WHO, setiap tahun lebih dari 250.000 kasus baru kanker payudara terdiagnosis di Eropa dan kurang lebih 175.000 di Amerika Serikat (Anonim, 2008).

Pengobatan kanker secara medis memerlukan biaya yang sangat tinggi. Selain melalui bedah dan radiasi, pengobatan kanker masih mengandalkan kemoterapi. Kemoterapi menggunakan obat-obat antikanker terkendala masalah kekurangefektifan obat dalam membunuh sel kanker dan efek samping yang harus diderita oleh pasien (Djajanegara dan Prio, 2010). Usaha untuk mengobati kanker dengan obat tradisional semakin banyak dilakukan dengan alasan pengobatan tersebut memerlukan biaya yang lebih murah, lebih mudah didapat, efek samping relatif kecil, dan dapat diramu sendiri (Mangan, 2003).

Tanaman srikaya (*Annona squamosa* L) berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin, polifenol dan senyawa poliketida (Dalimarta, 2003). Menurut data empiris, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor (Dalimarta, 2003). Beberapa penelitian

sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman srikaya mempunyai aktivitas sitotoksik. Magadula *et al.* (2009) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun srikaya mempunyai efek toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} 0,64 $\mu\text{g/mL}$. Uji sitotoksisitas ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun *Annona squamosa* L pada sel HeLa, memberikan nilai LC_{50} berturut-turut 4,5467 dan 7,6984 $\mu\text{g/mL}$ (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Aktivitas antikanker tanaman srikaya salah satunya disebabkan adanya senyawa asetogenin (Ahmad, 2007). Penelitian Hui (2003) menyebutkan bahwa senyawa skuamostolida merupakan senyawa asetogenin baru yang diisolasi dari biji *Annona squamosa* dan bersifat sitotoksik terhadap sel karsinoma hati (bel-7402) dan sel karsinoma nasofaring (CNE2) dengan nilai IC_{50} berturut-turut 4,79 dan 1,24 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun srikaya yang berasal dari Indonesia terhadap sel T47D sejauh penelusuran peneliti belum dilakukan. Berdasarkan uraian diatas, penelitian lebih lanjut tentang potensi sitotoksik ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L) terhadap sel kanker payudara T47D dan mengetahui golongan senyawa yang tersari dalam ekstrak etanol daun srikaya perlu untuk dilakukan.

B. Perumusan Masalah

Berdasar latar belakang masalah, maka rumusan masalah dapat disusun sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D?
2. Golongan senyawa kimia apakah yang terkandung dalam ekstrak etanol daun srikaya tersebut?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengukur efek sitotoksik ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) terhadap sel T47D dengan menentukan IC₅₀ menggunakan metode MTT *assay*.
2. Menentukan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun srikaya dengan uji tabung dan kromatografi lapis tipis.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Srikaya (*Annona squamosa* L)

a. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman srikaya dalam sistematika tumbuhan sebagai berikut :

Divisio	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Ranales
Familia	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona squamosa</i> Linn

(Steenis, 1981)

b. Morfologi tanaman

Annona squamosa L. (Famili Annonaceae) yang di Indonesia umumnya dikenal dengan nama srikaya berbentuk 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 (Steenis, 2005).

c. Kegunaan

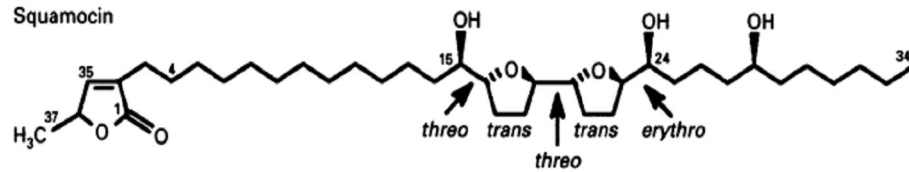
Hampir seluruh bagian tanaman srikaya dapat dimanfaatkan untuk mengobati berbagai penyakit. Daun tumbuhan ini digunakan untuk mengatasi encok, batuk, selesma, demam, rematik, gangguan saluran pencernaan dan penyakit kulit, serta menurunkan kadar asam urat yang tinggi dalam darah (Ahmad, 2007). Daun srikaya juga dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor (Dalimarta, 2003). Penelitian menunjukkan bahwa fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *Annona squamosa* bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* dan sel HeLa (Djajanegara, 2009). Daun *Annona squamosa* juga terbukti mempunyai aktivitas larvisidal pada nyamuk (Magadula *et al*, 2009). Selain itu, daun srikaya juga bersifat antimikroba terhadap *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Fumigatus*, *Bacillus subtilis*, dan *Shigella shiga* (Ahmad, 2007). Aktivitas antihiperqlikemia pada tikus hiperqlikemia juga dapat ditimbulkan oleh daun srikaya melalui stimulasi pelepasan insulin (Pandey dan Barve, 2011). Biji, akar dan kulit batang dapat digunakan untuk gangguan pencernaan (Ahmad, 2007). Buah tumbuhan ini digunakan pula untuk gangguan pencernaan seperti diare, dan disentri. Ekstrak kulit batang srikaya memiliki efek antikarsinogenik pada hamster yang diinduksi DMBA (Pandey & Barve, 2011).

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, skuamosamida, dan senyawa-senyawa kelompok aporfin seperti koridin, roemerin, norkoridin, norisokoridin dan glausin (Alen, 2003). Menurut Ahmad (2007) daun dan kayu tumbuhan ini merupakan sumber yang kaya akan alkaloid aporfin. Alkaloid golongan aporfin mempunyai aktivitas sebagai antikanker (Stevigny *et al*, 2005). Hampir semua alkaloid yang dihasilkan oleh *Annona squamosa* mempunyai struktur isokuinolin, seperti bensiltetrahidroisokuinolin, aporfin, dan oksoaporfin. Linalool, Borneol, Eugenol, Farnesol, dan Geraniol terdapat dalam ekstrak daun srikaya yang memiliki aktivitas antibakteri (Pandey & Barve, 2011).

Asetogenin merupakan senyawa kimia yang terkandung dalam bangsa Annonaceae yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker, parasitidal, dan antimikroba (Pardhasaradhi *et al.*, 2004). Asetogenin merupakan senyawa poliketida dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* pada C₂₃ memiliki aktivitas sitotoksik. Derivat asetogenin yang berefek sitotoksik antara lain asimisin, bullatasin, dan skuamosin (Shiddiqi *et al.*, 2008). Gambar 1 menunjukkan salah satu struktur kimia asetogenin yaitu skuamosin. *Annonaceous* asetogenin bekerja dengan menghambat produksi ATP dengan mengganggu kompleks I mitokondria (Pardhasaradhi *et al.* , 2004). Dua *Annonaceous* asetogenin (skuamostatin-C dan skuamostatin-D) berhasil diisolasi dari ekstrak biji *Annona squamosa* (Gajalakshmi *et al*, 2011). Skuamosin B toN, ligan kumarin, annotemoyin-1, annotemoyin-2, dan skuamosin merupakan beberapa senyawa asetogenin yang diisolasi dari biji dan mempunyai aktivitas antimikroba dan antikanker (Pandey & Barve, 2011).



Gambar 1. Struktur kimia skuamosin (Degli *et al*, 1994)

2. Kanker Payudara dan Obat Antikanker Payudara

Menurut Hanahan dan Weinberg (2000), sel kanker memiliki karakteristik sebagai berikut :

- a. Sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri. Sinyal pertumbuhan diperlukan agar sel dapat terus membelah. Berbeda dari sel normal, sel kanker dapat tetap dan terus tumbuh.
- b. Tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan. Sel kanker tidak merespon adanya sinyal yang dapat menghentikan terjadinya pertumbuhan dan pembelahan sehingga sel kanker dapat terus membelah.
- c. Sel kanker mampu menghindar dari mekanisme apoptosis. Apoptosis merupakan program bunuh sel ketika sel tersebut mengalami kerusakan, baik struktural maupun fungsional, yang tidak dapat ditolerir lagi. Namun sel kanker dapat menghindar dari kematian dengan mengeblok jalur terjadinya apoptosis di dalam sel.
- d. Sel kanker memiliki potensi tidak terbatas untuk mengadakan replikasi.
- e. Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis untuk mencukupi kebutuhannya akan oksigen dan nutrisi. Cabang pembuluh darah baru yang menuju sel kanker akan terbentuk untuk mensuplai kebutuhan nutrisi dan oksigen dari sel kanker.
- f. Sel kanker mampu menginvasi jaringan di sekitarnya dan membentuk anak sebar.

Kanker payudara adalah kanker yang berasal dari kelenjar, saluran, dan jaringan penunjang payudara tetapi tidak termasuk kulit payudara (Mangan, 2003). Kanker payudara adalah kanker yang paling sering ditemukan pada perempuan (diluar kanker kulit), dan kanker ini sangat jarang ditemukan pada laki-laki. Kanker payudara memperlihatkan keganasan sel epitel yang membatasi duktus atau lobus payudara. Awalnya hanya terlihat hiperplasi sel dengan perkembangan sel-sel atipikal. Sel-sel ini kemudian berlanjut menjadi karsinoma in situ dan menginvasi stroma. Kanker membutuhkan waktu 7 tahun untuk tumbuh dari satu sel menjadi massa yang cukup besar untuk dapat dipalpasi (kira-kira berdiameter 1 cm). Sekitar 24% kanker payudara sudah mengalami metastasis pada ukuran tersebut (Price, 2005).

Faktor-faktor resiko penyebab kanker payudara:

- 1) Metabolisme hormon estrogen yang berlebihan.
- 2) Faktor keturunan, ditandai dengan adanya mutasi gen p53, BRCA 1 dan BRCA 2.
- 3) Menstruasi kurang dari 13 tahun dan lebih dari 18 tahun.
- 4) Penggunaan kontrasepsi oral, misalnya pil KB.
- 5) Obesitas dan peminum alkohol.
- 6) Wanita yang telah menopause (Dipiro, 2005).

Beberapa kemoterapi yang digunakan untuk kanker payudara:

- 1) Tamoksifen, yang mekanisme kerjanya dengan berikatan pada reseptor modulator estrogen secara selektif.
- 2) Letrozol, anastrozol, dan eksemestan, dengan mekanisme kerjanya sebagai aromatase inhibitors (menghambat kerja enzim aromatase untuk sintesis estradiol yang merupakan karsinogen)
- 3) Doksorubisin (golongan antrasiklin) dan trastuzumab, dengan mekanisme kerja melisiskan sel-sel pembawa protein HER-2 (Dipiro, 2005).

3. Sel T47D

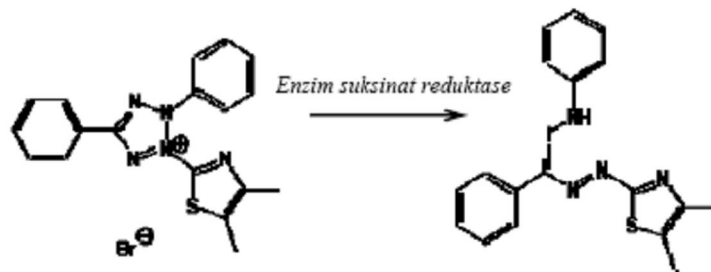
Sel T47D merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER) atau progesteron reseptor positif dan proliferasinya

meningkat dengan adanya estrogen eksogen. Sel T47D juga mengekspresikan p53 yang telah termutasi (Schafer *et al.*, 2000). Gen p53 supresor tumor merupakan faktor transkripsi dalam regulasi siklus sel, pemacuan apoptosis dan perbaikan DNA (Adimoolam dan Ford, 2002). *Missense mutation* terjadi pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain L2*) sehingga p53 kehilangan fungsinya. Jika p53 tidak dapat mengikat elemen-elemen pada DNA, maka akan mengurangi atau menghapuskan kemampuan dalam mengatur siklus sel sehingga tidak ada pemacuan apoptosis (Schafer *et.al.*, 2000).

4. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastematik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada suatu sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel. Akhir-akhir ini uji sitotoksik digunakan secara luas menggantikan uji toksisitas secara *in vivo* yang menggunakan hewan (Fresney, 1986 *cit* Kusumastuti, 2007).

Efek sitotoksik dari ekstrak ditentukan dengan mengukur jumlah sel hidup menggunakan MTT, yaitu suatu garam tetrazolium yang dapat dipecah oleh sistem reduktase suksinat-tetrazolium menjadi formazan. Formazan merupakan zat berwarna ungu dan setelah ditambah dengan stop solution, intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Reaksi MTT membentuk formazan ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan Oleh Enzim Reduktase Suksinat

(Mosmann, 1983 *cit* Kusumastuti, 2007)

E. Landasan Teori

Daun srikaya (*Annona squamosa* L) mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin, polifenol dan senyawa poliketida (Dalimarta, 2003). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya mempunyai efek ketoksikan terhadap larva *Artemia salina* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan nilai LC_{50} 0,64 $\mu\text{g/mL}$ (Magadula *et al*, 2009). Uji sitotoksitas ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun *Annona squamosa* L pada sel HeLa menunjukkan efek toksik dengan nilai LC_{50} berturut-turut 4,5467 dan 7,6984 $\mu\text{g/mL}$ (Djajanegara dan prio, 2009).

Salah satu senyawa dalam bangsa Annonaceae yang mempunyai aktivitas sitotoksik adalah senyawa asetogenin. Menurut Spurr (2010) isolasi hasil pemurnian ekstrak biji, daun, dan ranting dari tanaman annonaceae menghasilkan senyawa aktif asetogenin. Senyawa skuamostolida merupakan senyawa asetogenin baru yang diisolasi dari biji *Annona squamosa* dan bersifat sitotoksik terhadap sel karsinoma hati (bel-7402) dan sel karsinoma nasofaring (CNE2) dengan nilai IC_{50} berturut-turut 4,79 dan 1,24 $\mu\text{g/mL}$ (Hui, 2003). Menurut Pardhasaradhi *et al.* (2004) *Annonaceous* asetogenin bekerja dengan menghambat produksi ATP dengan mengganggu kompleks I mitokondria. Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini diharapkan dapat memperoleh data yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya juga mempunyai efek sitotoksik terhadap sel T47D.

F. Hipotesis

Ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan diduga aktivitas tersebut disumbangkan oleh golongan senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid dan polifenol.