

**SINERGISITAS EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI DOKSORUBISIN  
DAN EKSTRAK ETANOL BIJI SIRSAK (*Annona muricata* L.)  
TERHADAP SEL MCF-7**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada  
Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi**

**Oleh:**

**HANIFA FAILASUFI**

**K 100 140 190**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
2018**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

**SINERGISITAS EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI DOKSORUBISIN  
DAN EKSTRAK ETANOL BIJI SIRSAK (*Annona muricata* L.)  
TERHADAP SEL MCF-7**

**PUBLIKASI ILMIAH**

oleh:

**HANIFA FAILASUFI**

**K 100 140 190**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



**Dr. Haryoto, M.Sc.**

**NIP. 196206061988031001**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**SINERGISITAS EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI DOKSORUBISIN  
DAN EKSTRAK ETANOL BIJI SIRSAK (*Annona muricata* L.)  
TERHADAP SEL MCF-7**

**OLEH**

**HANIFA FAILASUFI**

**K 100 140 190**

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Fakultas Farmasi  
Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Pada hari Kamis, 18 Januari 2018  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

**Dewan Penguji:**

**1. Dr. Muhtadi, M.Si.**

**(Ketua Dewan Penguji)**

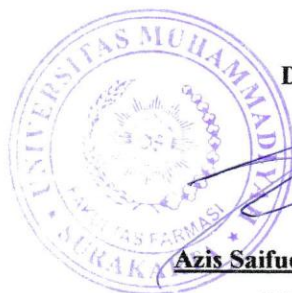
**2. Peni Indrayudha, Ph.D., Apt.**

**(Anggota I Dewan Penguji)**

**3. Dr. Haryoto, M.Sc.**

**(Anggota II Dewan Penguji)**

(.....)  
(.....)  
(.....)



**Dekan,**

**Azis Saifudin, Ph.D., Apt.**

**NIK. 956**

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

**Surakarta, 30 Desember 2017**

Penulis



**HANIFA FAILASUFI**

**K 100 140 190**

# SINERGISITAS EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI DOKSORUBISIN DAN EKSTRAK ETANOL BIJI SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP SEL MCF-7

## Abstrak

Doksorubisin merupakan agen kemoterapi golongan antrasiklin yang paling aktif pada terapi kanker payudara metastatik. Penggunaan doksorubisin diketahui resisten terhadap sel MCF-7 dengan perubahan jalur biokimia, yaitu pada jalur metabolisme, efluks obat, apoptosis, siklus sel, dan perbaikan DNA. Doksorubisin juga menyebabkan kardi toksik karena terjadi akumulasi besi pada mitokondria. Biji sirsak (*Annona muricata* L.) diketahui poten sebagai agen kombinasi kemoterapi (ko-kemoterapi). Pengembangan agen ko-kemoterapi dengan bahan herbal diharapkan dapat menurunkan efek samping doksorubisin. Penelitian bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas ekstrak etanol biji sirsak, efek kombinasinya dengan doksorubisin terhadap sel MCF-7 dan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Ekstraksi biji sirsak menggunakan metode maserasi dengan etanol 96%. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT assay dan kombinasi indeks. Parameter yang diperoleh dari uji sitotoksik adalah  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker hingga 50%. Uji fitokimia ekstrak etanol biji sirsak menggunakan metode KLT-Densitometri. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol biji sirsak yaitu 142,74  $\mu\text{g/mL}$  dan doksorubisin 7,41 nM terhadap sel MCF-7. Kombinasi ekstrak etanol biji sirsak dengan doksorubisin menghasilkan efek sinergis kuat terhadap sel MCF-7 dengan nilai IK 0,102 dengan konsentrasi optimal ekstrak-doksorubisin 17,5  $\mu\text{g/mL}$  – 4 nM ( $\frac{1}{8} IC_{50}$  –  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ). Ekstrak etanol biji sirsak positif mengandung senyawa golongan alkaloid.

**Kata Kunci:** Biji sirsak, indeks kombinasi, MCF-7, doksorubisin.

## Abstract

Doxorubicin is the most active anthracycline chemotherapy agent in the treatment of metastatic breast cancer. The use of doxorubicin is known to be resistant to MCF-7 cells with changes biochemical pathways, those are in metabolic pathways, drug effluents, apoptosis, cell cycle, and DNA repair. Doxorubicin also causes cardiotoxicity due to iron accumulation in the mitochondria. Soursop seeds (*Annona muricata* L.) are known to be potent as a combination agent of chemotherapy (co-chemotherapy). Development of co-chemotherapy agents with herbal ingredients is expected to decrease the side effects of doxorubicin. The objective of this study was to investigate the cytotoxicity of soursop seeds ethanol extract, their combined effect with doxorubicin against MCF-7 cells and the compounds contained in the extract. Soursop seed extraction using maceration method with 96% ethanol. Cytotoxic assay using MTT assay method and index combination. The parameter obtained from cytotoxic test is  $IC_{50}$ , which is concentration which can inhibit cancer cell growth up to 50%. Phytochemical test of soursop seeds ethanol extract using KLT-Densitometry method.  $IC_{50}$  of soursop seeds ethanol extract and doxorubicin to MCF-7 cells were 142,74  $\mu\text{g / mL}$  and 7,41 nM. The combination of soursop seeds ethanol extract with doxorubicin produced a strong synergistic effect on MCF-7 cell with IK value of 0,102 with the optimal concentration

of 17,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  - 4  $\mu\text{M}$  ( $\frac{1}{8}$   $\text{IC}_{50}$  -  $\frac{1}{2}$   $\text{IC}_{50}$ ) extracts of doxorubicin. Soursop ethanol extract positively contains the alkaloids group

**Keywords:** Soursop seed, combination index, MCF-7, doxorubicin.

## 1. PENDAHULUAN

Kanker ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, invasi jaringan, dan metastasis yang luas (Chisholm-Burnset *et al.*, 2008). Menurut data Globocan (*International Agency for Research of Cancer*) 2012 terdapat 14,1 juta kasus kanker baru, 8,2 juta kematian akibat kanker dan 32,6 juta orang yang hidup dengan kanker (dalam 5 tahun diagnosis) pada 2012 di seluruh dunia. Di Indonesia pada 2014 kanker mengakibatkan kematian sebesar 0,6% dan kanker payudara berada pada urutan pertama yaitu, 48.998 kejadian (WHO, 2014).

Terapi kanker payudara dapat dilakukan dengan operasi, kemoterapi, ataupun radioterapi. Kemoterapi merupakan pilihan terapi yang paling banyak dipilih oleh penderita kanker. Doksorubisin termasuk golongan antrasiklin yang merupakan kelas agen kemoterapi paling aktif pada terapi kanker payudara metastatik (Chisholm-Burnset *et al.*, 2008). Namun, penggunaan doksorubisin diketahui resisten terhadap sel MCF-7. Mekanismenya dengan perubahan jalur biokimia, yaitu pada jalur metabolisme, jalur efluks obat, jalur apoptosis, jalur siklus sel, dan jalur perbaikan DNA (AbuHammad and Zihlif, 2013). Menurut Ichikawa *et al.* (2014) doksorubisin juga menyebabkan kardi toksik karena terjadi akumulasi besi pada mitokondria selama terapi berjalan. Pengembangan agen kombinasi kemoterapi (ko-kemoterapi) yang dapat menurunkan efek samping doksorubisin masih perlu diupayakan.

Bahan herbal sebagai agen kombinasi kemoterapi mempunyai kelebihan efek samping yang rendah. Ekstrak biji sirsak (*Annona muricata* L.) potensial sebagai agen kombinasi kemoterapi karena ekstrak etanolnya poten terhadap sel T47D dengan  $\text{IC}_{50}$   $20,36 \pm 1,58 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Arifianti *et al.*, 2014). Menurut Egydio-Brandão *et al.* (2017) *Annona muricata* L. mengandung senyawa alkaloid, yaitu anonain, annonamin, asimilobin, koklaurin, isoboldin, isolaurelin, liriodeenin, *N*-metil koklaurin, norcoridin, *O*-dimetil koklaurin, *O*-metil koklaurin, remerin, dan silopin. Alkaloid liriodeenin mempunyai efek antiproliferasi dan antikanker terhadap sel T yang terinfeksi oleh HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus type I*) dengan nilai  $\text{EC}_{50}$  3,62  $\mu\text{M}$  (Egydio-Brandão *et al.*, 2017). Pemanfaatan biji sirsak sebagai agen kombinasi kemoterapi bermanfaat untuk meningkatkan daya guna dari biji sirsak yang sebelumnya hanya dijadikan limbah rumah tangga saja.

Kombinasi ekstrak etanol biji sirsak dengan doksorubisin diharapkan dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik agen kemoterapi doksorubisin dan sensitivitas terhadap sel MCF-7 serta dapat

menurunkan dosis penggunaan doksorubisin. Penurunan dosis diharapkan dapat menurunkan efek samping dalam hal resistensi dan efek hepatotoksik.

## 2. METODE

### 2.1 Alat

Oven, blender, inkubator CO<sub>2</sub> (Binder), mikroskop (Olympus Jepang), mikropipet (Soccorex), vortex (Genie), 96 well-plate (Iwaki), microtube, LAF (Nuaire), ELISA reader (ELX 800 Bio Tech), tabung conical steril (Nunc), neraca analitik, *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), sonikator, alat gelas (Pyrex), vakum dan corong Buchner.

### 2.2 Bahan

Simplisia biji sirsak, doksorubisin, etanol 96%, DMSO, sel MCF-7, DMEM, larutan MTT, larutan PBS, tripsin-EDTA, Penicilin-streptomycin 1%, SDS 10 % dalam 0,01 N HCl, akuabides, alkohol 70%, FBS 10%, silica gel GF254, n-heksana, etil asetat, dan reagen semprot (sitroborat, FeCl<sub>3</sub>, dan Dragendorff, Liebermann-Buchard).

### 2.3 Ekstraksi

Serbuk biji sirsak ditimbang sebanyak 1,43 kg kemudian direndam dengan 10,725 L etanol 96%, diremaserasi selama 3 kali 24 jam. Setelah itu disaring kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak dibiarkan di atas *waterbath* hingga ekstrak menjadi kental.

### 2.4 Uji Sitotoksik

Suspensi sel MCF-7 dalam media dimasukkan ke dalam plate 96 sebanyak 100 µL. Plate diinkubasi selama 24-48 jam hingga konfluen 70-80%. Setelah konfluen, media dibuang, kemudian ditambahkan 100 µL ekstrak dengan seri kadar 250; 125; dan 62,5 µg/mL. Plate diinkubasi selama 24-48 jam. Medium pada akhir inkubasi dibuang, dicuci dengan 100 µL PBS, lalu ditambah tiap sumuran 100 µL reagen MTT. Plate diinkubasi kembali selama 4 jam pada 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan reagen MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi ini dihentikan dengan 100 µL larutan SDS 10% dalam HCl 0,01N. Plate dibungkus kertas dan ditempatkan pada suhu kamar di tempat gelap selama 24 jam. Serapan kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Data absorbansi sel untuk menghitung persentase sel hidup dan nilai IC<sub>50</sub>-nya (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2013).

$$\text{Sel hidup (\%)} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dihitung regresi liniernya dan dibuat grafik log konsentrasi vs % sel hidup. Jika nilai r pada regresi linier lebih besar dari r tabel, maka persamaan tersebut memenuhi standar untuk mencari

IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai antilog X pada kurva baku  $Y = BX + A$  (log konsentrasi ekstrak dalam µg/mL vs % sel hidup) dengan y=50.

## 2.5 Uji Kombinasi

Nilai IC<sub>50</sub> senyawa tunggal yang diperoleh digunakan untuk membuat seri konsentrasi kombinasi. Seri konsentrasi yang digunakan, yaitu  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{4}$ ;  $\frac{1}{8}$  IC<sub>50</sub>. Metode untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah Indeks Kombinasi (IK) dengan persamaan menurut *Cancer Chemoprevention Research Center* (2010), sebagai berikut:

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

(Dx)<sub>1</sub>, (Dx)<sub>2</sub> merupakan konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan agar memberikan efek sebesar efek kombinasi. (D)<sub>1</sub>, (D)<sub>2</sub> merupakan konsentrasi kedua sampel agar memberikan efek yang sama. Hasil perhitungan dari IK kemudian diinterpretasikan menurut kategori sebagai berikut:

| Tabel 1. Interpretasi Nilai IK |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Nilai KI                       | Interpretasi                      |
| < 0,1                          | Efek sinergis sangat kuat         |
| 0,1 – 0,3                      | Efek sinergis kuat                |
| 0,3 – 0,7                      | Efek sinergis                     |
| 0,7 – 0,9                      | Efek sinergis ringan - sedang     |
| 0,9 – 1,1                      | Mendekati efek aditif             |
| 1,1 – 1,45                     | Efek antagonis ringan - sedang    |
| 1,45 – 3,3                     | Efek antagonis                    |
| > 3,3                          | Efek antagonis kuat – sangat kuat |

(*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2010)

## 2.6 Uji Fitokimia

Ekstrak dengan konsentrasi 10 mg/mL ditotolkan pada plat lalu dielusi menggunakan n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, 6:4, 3:7, dan 4:6. Bercak diamati pada UV 254 nm dan 366 nm. Plat lalu disemprot dengan reagen penampak FeCl<sub>3</sub>, sitoborat, Liebermann-Burchard dan Dragendorff. Plat kemudian dibaca dengan densitometri untuk mengetahui peak area masing-masing bercak.

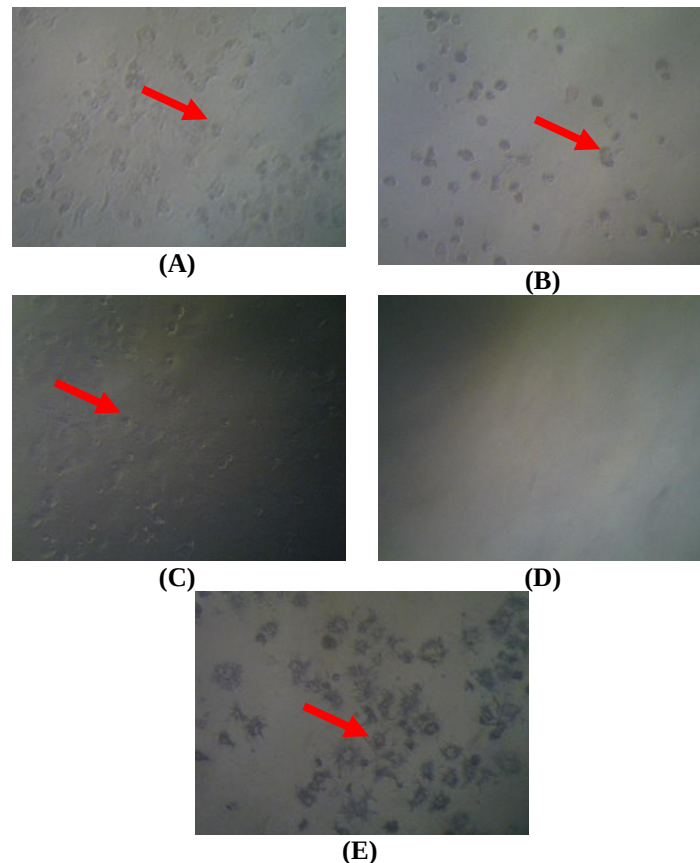
## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Ekstraksi Biji Sirsak

Ekstraksi biji sirsak menggunakan metode maserasi. Sebanyak 1,43 kg serbuk kering biji sirsak menghasilkan ekstrak kental sebesar 63,08 gram. Persentase rendemen ekstrak diperoleh sebesar 4,41%.

### 3.2 Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Biji Sirsak dan Doksorubisin terhadap Sel MCF-7

Pengujian sitotoksik ekstrak etanol biji sirsak terhadap sel MCF-7 memberikan nilai  $IC_{50}$  142,74  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak dikatakan poten jika memiliki  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , moderate jika  $100 \mu\text{g/mL} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ , dan tidak toksik jika  $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ . Senyawa potensial dapat dijadikan agen antikanker sedangkan moderat dapat dijadikan agen kemopreventif. Dari hasil pengujian ekstrak etanol biji sirsak terhadap sel MCF-7 termasuk moderat sehinggadapat menjadi agen kemopreventif dengan agen kemoterapi doksorubisin (Tussanti *et al.*, 2014).

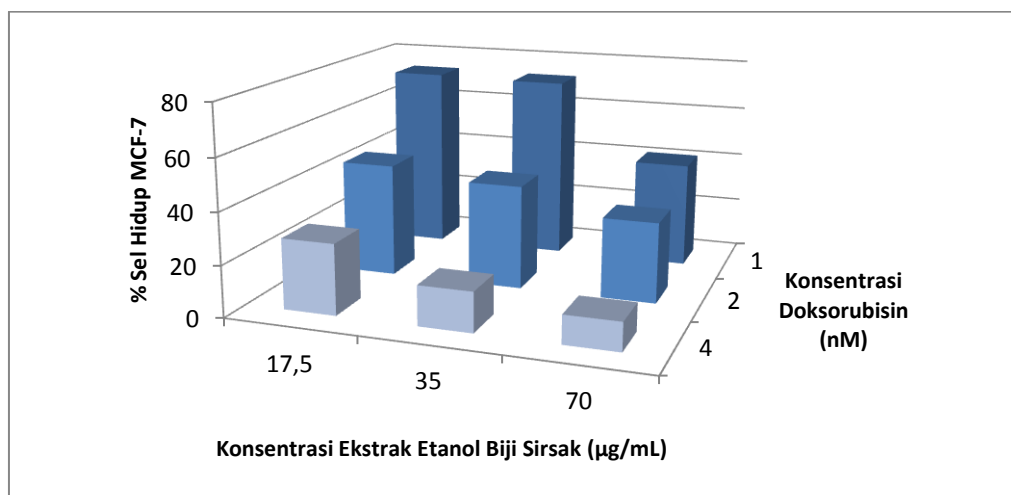


Gambar 1. Sel MCF-7 pada perlakuan dengan Ekstrak Etanol Biji Sirsak (A), Doksorubisin (B), Kontrol Sel (C), Kontrol Media (D) dan setelah pemberian garam MTT, membentuk kristal formazan (E).

Sel MCF-7 mempunyai kelemahan, yaitu resisten terhadap kemoterapi doksorubisin. Resistensi disebabkan ekspresi Pgp pada sel MCF-7 tinggi sehingga menurunkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doksorubisin (Wonget *al.*, 2006). Hasil uji sitotoksik doksorubisin mempunyai  $IC_{50}$  7,41 nM terhadap sel MCF-7.

### 3.3 Kombinasi Ekstrak Etanol Biji Sirsak-Doksorubisin terhadap Sel Kanker MCF-7

Kombinasikan ekstrak etanol biji sirsak-doksorubisin terhadap sel MCF-7 menggunakan metode Indeks Kombinasi. Nilai  $IC_{50}$  tunggal ekstrak etanol biji sirsak dan doksorubisin digunakan untuk menentukan seri konsentrasi pada kombinasi. Seri kadar ekstrak etanol biji sirsak-doksorubisin secara berturut-turut adalah 70; 35; 17,5  $\mu\text{g/mL}$  (ekstrak etanol biji sirsak dengan  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{4}$ ;  $\frac{1}{8}$   $IC_{50}$ ) dan 4; 2; 1 nM (doksorubisin dengan  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{4}$ ;  $\frac{1}{8}$   $IC_{50}$ ).



Gambar 2. Viabilitas sel MCF-7 pada kombinasi Ekstrak Etanol Biji Sirsak dan Doksorubisin

Gambar 2 menunjukkan viabilitas sel MCF-7 setelah diberi perlakuan ekstrak etanol biji sirsak dengan doksorubisin. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin sedikit sel MCF-7 yang hidup. Kombinasi doksorubisin dengan ekstrak etanol biji sirsak memberikan indeks kombinasi seperti yang tercantum pada Tabel 2. Perlakuan dengan kombinasi ekstrak etanol biji sirsak-doksorubisin menunjukkan efek sinergis kuat terhadap sel MCF-7 dengan nilai IK 0,102 (nilai IK 0,1-0,3). Kombinasi paling optimal pada dosis ekstrak-doksorubisin 17,5 µg/mL – 4 nM ( $\frac{1}{8}$  IC<sub>50</sub> –  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>). Efek sinergis yang dihasilkan mampu menurunkan penggunaan dosis doksorubisin dengan efikasi yang lebih tinggi.

Tabel 2. Nilai Indeks Kombinasi dari kombinasi Ekstrak Etanol Biji Sirsak dengan Doksorubisin pada sel MCF-7

| Konsentrasi Ekstrak Biji Sirsak (µg/mL) | Konsentrasi Doxorubicin (nM) |        |        |
|-----------------------------------------|------------------------------|--------|--------|
|                                         | 1                            | 2      | 4      |
| 17,5                                    | 0,229*                       | 0,222* | 0,102* |
| 35                                      | 0,199*                       | 0,177* | 0,138* |
| 70                                      | 0,228*                       | 0,166* | 0,147* |

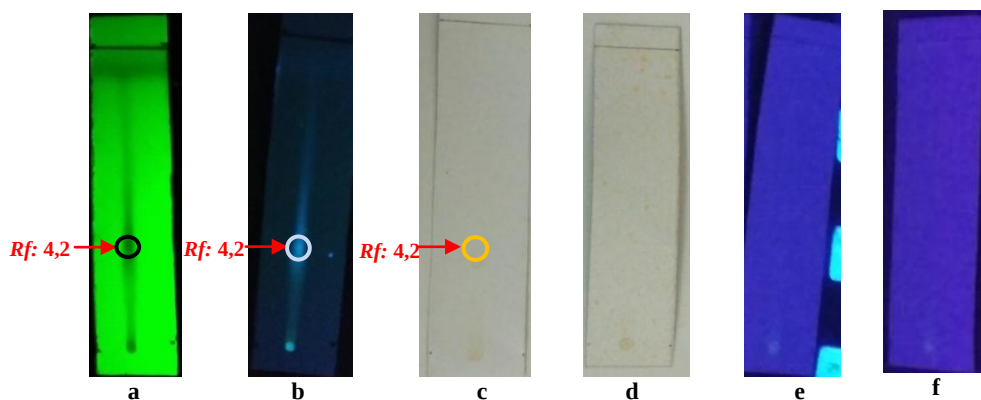
Kombinasi ekstrak etanol biji sirsak dengan doksorubisin menghasilkan efek yang saling menguatkan sehingga meningkatkan efikasi obat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol biji sirsak, semakin kuat peningkatan efek sitotoksik doksorubisin oleh senyawa ini pada sel MCF-7. Efek sinergisme dari hasil uji kombinasi dimungkinkan adanya kemampuan kombinasi tersebut untuk mencegah resistensi obat karena pompa *efflux* Pgp. Pgp berperan sebagai pompa *efflux* doksorubisin pada sel kanker payudara MCF-7 sehingga efek sitotoksik doksorubisin berkurang (Wong *et al.*, 2006). Dengan adanya penghambatan pompa *efflux* Pgp dapat mengembalikan efikasi doksorubisin untuk menghambat pertumbuhan sel MCF-7.

Aktivitas sinergisme kombinasi ekstrak etanol biji sirsak dan doksorubisin, kemungkinan dihasilkan dari dua mekanisme yang berbeda oleh kedua senyawa tersebut dalam memacu sitotoksik sel kanker payudara MCF-7. Doksorubisin merupakan antrasiklin terutama inhibitor topoisomerase

II memutus DNA untai ganda. Antrasiklin juga mengalami reduksi elektron ke senyawa reaktif yang dapat merusak DNA dan membran sel. Radikal bebas yang terbentuk dari pengurangan antrasiklin pertama menyumbangkan elektron ke oksigen untuk membuat superoksida, yang dapat bereaksi dengan sendirinya untuk membuat hidrogen peroksida. Pembelahan hidrogen peroksida menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif dan destruktif. Mekanisme ini membutuhkan zat besi sementara antrasiklin merupakan pengikat besi yang ampuh. Kompleks besi antrasiklin dapat berikatan dengan DNA dan bereaksi cepat dengan hidrogen peroksida untuk menghasilkan radikal hidroksil yang dapat memotong DNA (Chisholm-Burns *et al.*, 2008). Sedangkan ekstrak etanol biji sirsak diketahui mengandung senyawa golongan alkaloid. Alkaloid dalam ekstrak etanol biji sirsak diduga senyawa yang bertanggung jawab pada efek sitotoksik. Menurut Mohan *et al.* (2012) alkaloid dapat menghambat enzim topoisomerase yang terlibat dalam induksi apoptosis, replikasi DNA dan ekspresi gen p53.

### 3.4 Fitokimia Ekstrak Etanol Biji Sirsak secara KLT-Densitometri

Identifikasi senyawa menggunakan beberapa pereaksi semprot untuk mengetahui kandungan pada ekstrak etanol tersebut. Pereaksi semprot yang digunakan  $\text{FeCl}_3$ , Sitroborat, Dragendorff, dan Liebermann-Burchard.



Gambar 3. Hasil KLT ekstrak etanol biji sirsak dengan fase gerak etil asetat : n-heksan (6:4) dengan fase diam Silika gel.

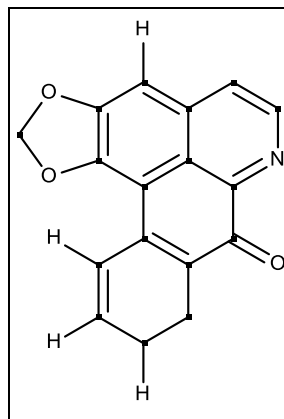
Keterangan:

- a. Deteksi UV 254 nm
- b. Deteksi UV 366 NM
- c. Deteksi reagen semprot Dragendorff pada sinar tampak
- d. Deteksi reagen semprot  $\text{FeCl}_3$  yang dilihat pada sinar tampak
- e. Deteksi reagen semprot LB pada UV 366 nm
- f. Deteksi reagen semprot sitroborat pada UV 366 nm

Pereaksi sitroborat untuk pendeteksi senyawa flavonoid, dragendorff untuk mendeteksi golongan alkaloid,  $\text{FeCl}_3$  untuk mendeteksi senyawa polifenol, dan reagen LB untuk senyawa saponin. Reaksi positif flavonoid dengan adanya bercak kuning, kuning kemerahan di bawah sinar UV 366 nm (Markham, 1982). Alkaloid positif dengan adanya bercak berwarna warna coklat, jingga-coklat (Wagner *et al.*, 1984). Reaksi positif polifenol ditunjukkan bercak abu-abu pada sinar tampak dengan deteksi  $\text{FeCl}_3$  (Wagner *et al.*, 1984). Saponin ditunjukkan adanya bercak hijau gelap

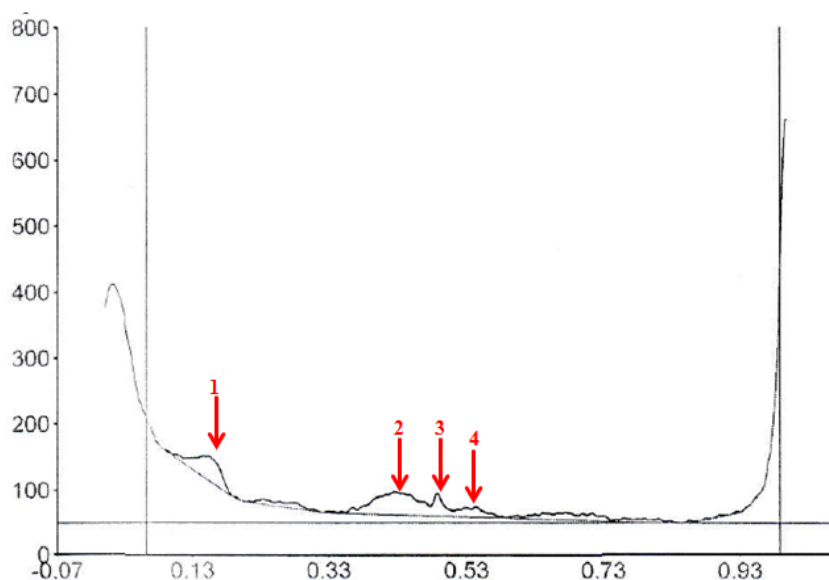
menunjukkan positif steroid dan bercak merah yang menunjukkan triterpenoid dengan deteksi LB. Hasil KLT tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak etanol biji sirsak (*Annona muricata* L.) positif mengandung senyawa golongan alkaloid dan negatif mengandung flavonoid, polifenol dan saponin. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Arifianti *et al.* (2014) ekstrak etano biji sirsak menunjukkan positif mengandung alkaloid, polifenol, dan flavonoid. Hal ini bisa disebabkan karena jenis tanaman, tempat memperoleh bahan, dan ekstraksi yang berbeda.

Alkaloid dalam ekstrak etanol biji sirsak diduga senyawa yang bertanggung jawab pada efek sitotoksik. Menurut Mohan *et al.* (2012) alkaloid dapat menghambat enzim topoisomerase yang terlibat dalam induksi apoptosis, replikasi DNA dan ekspresi gen p53. Senyawa-senyawa alkaloid yang terdapat pada *Annona muricata* L., yaitu anonain, annonamin, asimilobin, koklaurin, isoboldin, isolaurelin, liriodein, *N*-metilkoklaurin, norcoridin, *O*-dimetilkoklaurin, *O*-metilkoklaurin, remerin, dan silopin. Alkaloid liriodein diketahui mempunyai efek antiproliferasi dan antikanker dengan nilai  $EC_{50}$  3,62  $\mu$ M terhadap HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus type I*) (Egydio-Brandão *et al.*, 2017).



Gambar 4. Struktur alkaloid liriodein

Ekstrak etanol biji sirsak yang telah terelusi pada plat kemudian dibaca dengan densitometer. Hasil pembacaan *peak area* pada plat didapat grafik seperti pada Gambar 5. Dari grafik tersebut kemudian didapat data nilai  $R_f$  dan *peak area* dari tiap puncak pada plat tersebut pada Tabel 3. Nilai % area dari tiap puncak menggambarkan % kadar senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol biji sirsak.



Gambar 5. Densitogram pada plat KLT ekstrak etanol biji sirsak.

Tabel 3. Nilai Rf, bercak dengan reagen semprot dan % area pada tiap puncak plat KLT pada ekstrak etanol biji sirsak.

| Peak | Rf   | Dragendorff<br>Sinar tampak | Sitroborat<br>UV <sub>366</sub> | FeCl <sub>3</sub><br>Sinar tampak | LB UV <sub>366</sub> | Peak area | % area<br>(%) |
|------|------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------|---------------|
| 1    | 0,16 | (-) alkaloid                | (-) flavonoid                   | (-) polifenol                     | (-) saponin          | 1113,7    | 34,86         |
| 2    | 0,43 | (+) alkaloid                | (-) flavonoid                   | (-) polifenol                     | (-) saponin          | 1404,0    | 43,95         |
| 3    | 0,49 | (-) alkaloid                | (-) flavonoid                   | (-) polifenol                     | (-) saponin          | 415,4     | 13,00         |
| 4    | 0,54 | (-) alkaloid                | (-) flavonoid                   | (-) polifenol                     | (-) saponin          | 261,6     | 8,19          |

Hasil pembacaan densitometri menunjukkan pada puncak ke-2 mempunyai Rf yang sama dengan Rf pada plat KLT yang menunjukkan positif alkaloid. Hal ini membuktikan bahwa senyawa yang paling dominan pada ekstrak etanol biji sirsak adalah senyawa alkaloid dengan persentase dalam ekstrak sebesar 43,95%. Puncak pertama dengan persentase dalam ekstrak 34,86% diduga merupakan senyawa golongan asetogenin. Asetogenin diketahui banyak terkandung dalam biji sirsak (Li *et al.*, 2001). Menurut Arifianti *et al.* (2014) ekstrak etanol biji sirsak menunjukkan positif mengandung alkaloid, polifenol, dan flavonoid. Puncak ke-3 dan ke-4 diduga merupakan senyawa golongan polifenol dan flavonoid dengan masing-masing persentase dalam ekstrak 13% dan 8,19%.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol biji sirsak mampu meningkatkan efek sitotoksik dari doksorubisin secara sinergis kuat. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol biji sirsak dapat dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi. Pengembangan ini dapat berupa penelitian yang sama terhadap sel kanker lain, seperti sel WiDr, HeLa dan sebagainya. Penelitian ini belum dapat menjelaskan mekanisme aksi yang jelas bagaimana kombinasi ekstrak etanol biji sirsak dan doksorubisin dapat berefek sinergis. Hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme ekstrak etanol biji sirsak dan doksorubisin dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7 secara sinergis. Mekanisme ini dapat mendasari penggunaan kombinasi tersebut tepat pada siklus

proliferasi pada sel kanker tersebut. Hasil dari skrining fitokimia didapatkan bahwa ekstrak etanol biji sirsak positif mengandung senyawa alkaloid. Namun, hasil penelitian belum dapat menjelaskan secara spesifik jenis alkaloid yang terdapat dalam ekstrak etanol biji sirsak. Fraksinasi dan isolasi perlu dilakukan untuk mengetahui jenis alkaloid sebagai *chemical marker* agen antikanker pada ekstrak etanol biji sirsak.

#### 4. PENUTUP

Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol biji sirsak yaitu 142,74  $\mu\text{g/mL}$  dan doxorubisin 7,41 nM terhadap sel MCF-7. Setelah dikombinasi menghasilkan nilai IK sebesar 0,102 yang merupakan efek sinergis kuat terhadap sel MCF-7 dengan dosis optimum ekstrak-doxorubisin 17,5  $\mu\text{g/mL}$  – 4 nM ( $\frac{1}{8} IC_{50}$  –  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji sirsak positif mengandung golongan senyawa alkaloid dan negatif mengandung flavonoid, polifenol dan saponin.

#### PERSANTUNAN

Terimakasih kepada laboran Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah membantu peneliti menyelesaikan penelitian dan penulisan artikel ilmiah ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- AbuHammad S. and Zihlif, M., 2013. Gene Expression Alterations in Doxorubicin Resistant MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Genomics*, 101(4), 213–220.
- Arifianti L., Sukardiman, Studiawan H., Rakhmawati, Megawati L., 2014, Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Sel Kanker Mamalia Secara In Vitro, *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 1 (2), 63-66.
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2010, *Prosedur Tetap Uji Kombinasi dengan Agen Kemoterapi*, Terdapat di: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.013-Kombinasi.pdf> [Diakses pada 3 Mei 2017].
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2013, *Uji Sitotoksik Metode MTT*, Terdapat di: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.010.02-uji-sitotoksik-MTT.pdf> [Diakses pada 3 Mei 2017].
- Chisholm-Burns, M.A., Wells B. G., Schwinghammer T. L., Malone P. M., Kolesar J. M., Rotschafer J. C., and DiPiro J. T., 2008, *Pharmacotherapy Principles & Practice*, The McGraw-Hill Companies, United States of America.
- Egydio-Brandão, A.P.M., Novaes, P., and Santos, D.Y.A.C., 2017, Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 To 2016. *JSM BiochemMolBiol*, 4(3): 1031.
- Hermawan A., Meiyanto E. and Susidarti R. A., 2010. Hesperidin Meningkatkan Efek Sitotoksik Doxorubicin Pada Sel MCF-7, *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(1), 8-17.
- Ichikawa Y., Ghanefar M., Bayeva M., Wu R., Khechaduri A., and Prasad S. V. N., 2014, Cardiotoxicity of Doxorubicin is Mediatted Through Mitochondrial Iron Accumulation, *The*

*Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 617-630.

- International Agency for Research of Cancer, 2017, GLOBOCAN 2012: *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*, Terdapat di: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) [Diakses pada 28 April 2017].
- Jenie, R.I., dan Meiyanto, E. (2006). Ko-kemoterapi Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara. *Majalah Farmasi Indonesia* 18(2): 81-87.
- Kementrian Kesehatan RI, 2015, *Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI: Stop Kanker*, Jakarta Selatan.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Moghadamtousi S.Z., Fadaeinasab M., Nikzad S., Mohan G., Ali H. M. and Kadir H. A., 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), pp.15625–15658.
- Rieser M. J., Gu Z. M., Fang X. P., Zeng L., Wood K. V., and McLaughlin J. L., 1996, Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*, *Journal of Natural Products*, 59 (2), 100-108.
- Tussanti I., Johan A., and Kisdjamiatun, 2014, Sitotoksitas in vitro ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa*, Reinw. ex Bl.) terhadap sel kanker payudara T47D, *Jurnal Gizi Indonesia*, 2(2), 53-58.
- Wagner, H., Bladt, S., and Zgainski, E. M., 1984, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Diterjemahkan oleh Th. A. Scott, Springer-Verlag, Berlin.
- Wong H. L., Bendayan R., Rauth A. M., Xue H. Y., Babakhanian K., and Wu X. Y., 2006, A Mechanistic Study of Enhanced Doxorubicin Uptake and Retention in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells Using a Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle System, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317 (3), 1372-1381.
- World Health Organization, 2014, *Cancer Country Profiles*, Switzerland.
- Yang H. J., Li X., Zhang N., Chen J. W., & Wang M. Y., 2009, Two new cytotoxic acetogenins from *Annona squamosa*, *J Asian Nat Prod*, 11(3), 250-256.