



## Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak terhadap Ekspresi Gen P53 Sel Kanker Payudara T47D

Ariesko Gunanda Rangkuti<sup>1</sup>, Dessy Arisanty<sup>2</sup>, Yuniar Lestari<sup>3</sup>

<sup>1</sup> S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

<sup>2</sup> Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

<sup>3</sup> Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat dan Kedokteran Komunitas Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

### ABSTRACT

#### Abstrak

**Latar Belakang:** Kanker payudara merupakan jenis kanker dengan angka kejadiannya menempati posisi pertama terbanyak di Indonesia dibandingkan dengan jenis kanker lain. Daun sirsak yang mengandung *acetogenin* memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.

**Objektif:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap level ekspresi gen p53 sel kanker payudara T47D secara *in vitro*.

**Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode kuantifikasi relatif *real time* PCR menggunakan *cell line* T47D diinkubasi selama 72 jam yang dibagi menjadi 2 kelompok sampel, yaitu perlakuan dan kontrol. Kelompok perlakuan diberikan larutan uji ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi IC50 = 94,26 µg/ml.

**Hasil:** Hasil nilai Cq dari gen target dan referensi dianalisis dengan menggunakan uji *Mann Whitney* dan rumus livak. Hasil penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol dengan nilai  $p = 0,003$  ( $p < 0,05$ ). Analisis dengan rumus livak menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen p53 sel kanker payudara T47D yang diberi perlakuan, yaitu 2,8015 kali lipat lebih tinggi dari sel kelompok kontrol.

**Kesimpulan:** Ekstrak daun sirsak efektif dapat meningkatkan ekspresi gen p53 pada *cell line* T47D dan terdapat perbedaan yang bermakna dari nilai Cq gen p53 sel kelompok perlakuan dan kontrol.

**Kata kunci:** ekstrak daun sirsak, ekspresi gen p53, *cell line* T47D

*cell line* for 72 hours which was divided into 2 sample groups, namely treatment and control. The treatment group was given a test solution of soursop leaf ethanol extract with a concentration of IC50 = 94.26 µg/ml.

**Results:** The results of the Cq values of the target and reference genes were analyzed using the Mann Whitney test and the livak formula. The results showed a significant difference between the treatment and control groups with  $p$  value = 0.003 ( $p < 0.05$ ). Analysis using the livak formula showed an increase in the p53 gene expression of T47D breast cancer cells that were treated, which was 2.8015 times higher than the control group cells.

**Conclusion:** the soursop leaf extract effectively increase the expression of the p53 gene in the T47D cell line and there is a significant difference in the Cq value of the p53 gene in the treatment and control groups.

**Keyword:** soursop leaf extract, p53 gene expression, cell line T47D

#### Apa yang sudah diketahui tentang topik ini?

Ekstrak daun sirsak memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker

#### Apa yang ditambahkan pada studi ini?

Hubungan pemberian ekstrak daun sirsak dengan level ekspresi gen p53 sel kanker payudara T47D

#### CORRESPONDING AUTHOR

Phone: +6281363787861

E-mail: [desrantius@gmail.com](mailto:desrantius@gmail.com)

#### ARTICLE INFORMATION

Received: July, 11<sup>th</sup>, 2021

Revised: May 10<sup>th</sup>, 2023

Available online: June 16<sup>th</sup>, 2023

#### Abstract

**Background:** Breast cancer is a type of cancer with the highest incidence in Indonesia compared to other types of cancer. Soursop leaves containing *acetogenin* have a cytotoxic effect on T47D breast cancer cells.

**Objective:** This study aimed to determine the effect of soursop leaf extract on the expression level of the p53 gene in T47D breast cancer cells *in vitro*.

**Methods:** This study is an experimental study with *real time* PCR relative quantification method using incubated T47D

## Pendahuluan

Kanker adalah sel tubuh yang mengalami perubahan (mutasi) dan membelah lebih cepat dibandingkan dengan sel normal sehingga tumbuh tidak terkendali.<sup>1</sup> Berdasarkan data GLOBOCAN yang merupakan bagian dari *International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2018, terdapat sekitar 18,1 juta kasus kanker baru dan 9,6 juta kematian akibat kanker. Jumlah ini meningkat dibandingkan dengan tahun 2012 yaitu terdapat 14,1 juta kasus kanker baru dan 8,2 juta kematian akibat kanker. Di dunia, jumlah total orang yang hidup dalam 5 tahun setelah terdiagnosis kanker (prevalensi 5 tahun) adalah sekitar 43,8 juta jiwa.<sup>2,3</sup>

Kanker payudara merupakan jenis kanker terbanyak di dunia. Hal ini terlihat dalam hal kasus barunya dengan perkiraan 2,1 juta diagnosis pada tahun 2018.<sup>2</sup> Berdasarkan data *The Global Cancer Observatory* tahun 2020 di Indonesia angka kejadian kanker payudara menempati posisi pertama dibandingkan dengan jenis kanker lain. Angka kejadian kanker payudara di Indonesia adalah 65.858 kasus (16,6%) dengan angka kematian terbanyak kedua yaitu 22.430 kasus (9,6%).<sup>4</sup>

Secara umum pengobatan kanker payudara dilakukan dengan operasi untuk mengangkat jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker tersebut. Pada kanker payudara yang sudah mengalami metastasis tidak akan bisa teratasi dengan kedua cara tersebut. Pada umumnya operasi pengangkatan jaringan kanker tidak bisa tuntas menghilangkan kanker. Hal ini dikarenakan kemungkinan ada jaringan yang tertinggal dan dapat tumbuh menjadi jaringan kanker yang baru.<sup>5</sup> Oleh karena itu, sangat penting untuk meneliti pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif untuk penyakit kanker.<sup>5</sup> Berdasarkan kajian kemotaksonomi, aktivitas antikanker telah diketahui dan terbukti dari beberapa tanaman famili *Annonaceae*. Salah satu alternatif untuk diteliti ialah menggunakan ekstrak daun sirsak.<sup>6</sup>

*Annona muricata* Linn, umumnya dikenal sebagai sirsak, merupakan tanaman buah yang berasal dari famili *Annonaceae* yang terdiri dari 130 genus dan 2300 spesies. Tanaman ini tersebar luas di daerah tropis dan subtropis dan telah banyak penelitian yang dilakukan yang membuktikan secara tradisional, *in vitro*, dan *in*

*vivo* bahwa daun sirsak bermanfaat sebagai antikanker, antirematik, antikonvulsan, antiparasit, antimalaria, antidiabetes dan hepatoprotektif. Evaluasi fitokimia ekstensif telah membuktikan bahwa *A. Muricata* adalah sumber yang kaya senyawa *annonaceous acetogenin* dan telah diisolasi dari buah, daun, pericarp, biji, akar, dan kulit pohon dari *A. Muricata* sebanyak lebih dari 100 *annonaceous acetogenin*.<sup>7</sup> *Acetogenin* yang terkandung dalam daun, biji, batang, dan kulit batang sirsak memiliki kerja antitumor dan toksisitas selektif terhadap sel kanker.<sup>8</sup>

Penelitian sebelumnya, menunjukkan efek sitotoksik daun sirsak pada sel kanker pankreas, yaitu CD18/HPAF dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 73 µg/ml.<sup>8</sup> Ekstrak etil asetat daun sirsak juga memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker paru (A549) dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 5,09±0,41 µg/mL.<sup>9</sup> *Annonaceous acetogenin* mampu mendeteksi dan membedakan sel normal dan sel kanker, sehingga bisa bekerja menghambat dan membunuh sel kanker secara selektif.<sup>10</sup>

*Acetogenin* yang terkandung dalam daun sirsak memiliki efek sitotoksik yang berpotensi sebagai antikanker. *Acetogenin* bisa membedakan sel kanker dan sel normal berdasarkan dari kebutuhan sel akan ATP (Adenosine trifosfat). Sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan sel normal, karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal. Kebutuhan ATP yang lebih tinggi tersebut dideteksi sebagai sel kanker oleh *acetogenin* kemudian masuk dan menempel pada dinding sebelah dalam mitokondria yang berfungsi sebagai tempat memproduksi energi ATP bagi sel.<sup>11</sup> *Acetogenin* merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau *NADH dehidrogenase* yang menyebabkan menurunnya produksi ATP sehingga menginduksi terjadinya apoptosis.<sup>8,11</sup> Mekanisme inhibisi tersebut juga dapat mengaktifkan p53, suatu *tumor suppressor genes* yang dapat menghentikan siklus sel pada fase G1 sehingga dapat mencegah proliferasi sel yang tidak terkendali.<sup>11</sup> Telah diketahui bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki efek antiproliferatif disertai dengan penghentian siklus pada fase G1 dan mengkonfirmasi keterlibatan jalur intrinsik dalam apoptosis.<sup>9</sup>

Berdasarkan penelitian yang dilakukan peneliti sebelumnya, telah diketahui bahwa ekstrak etanol

daun sirsak (*Annona muricata Linn*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai  $IC_{50} = 94,26 \mu\text{g/ml}$  pada masa inkubasi 72 jam.<sup>12</sup> Penelitian tersebut masih memerlukan penelitian-penelitian lebih lanjut untuk mengetahui cara kerja ekstrak daun sirsak dalam mempengaruhi sel kanker payudara T47D secara seluler dan molekuler. Saat ini belum adanya penelitian untuk melihat mekanisme kematian sel (apoptosis) secara molekuler dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata Linn*) melalui ekspresi gen p53 pada sel kanker payudara T47D.

Oleh sebab itu, peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui peran serta gen p53 terhadap kematian sel kanker payudara T47D oleh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata Linn*) secara *real time* PCR. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan terapi kanker dengan memanfaatkan daun sirsak (bahan alam) yang berpeluang sebagai salah satu sumber obat antikanker. Daun sirsak digunakan karena lebih efektif yaitu mudah didapatkan, pengambilannya tidak merusak pertumbuhan tanaman, dan ketersediaan *cell line* kanker payudara T47D di Laboratorium tempat penelitian.

## Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan studi *in vitro*. Penelitian ini melakukan tahap pembacaan ekspresi gen p53. Penelitian akan dilakukan dengan menggunakan hasil kultur sel kanker payudara T47D diberikan perlakuan dengan ekstrak etanol daun sirsak dengan kadarnya adalah nilai *Half-maximal Inhibitory Concentration/IC<sub>50</sub>* yaitu  $94,26 \mu\text{g/ml}$ , setelah itu akan dilanjutkan dengan pemeriksaan pada ekspresi gen target yaitu gen p53 dan gen referensi yaitu gen GAPDH dengan menggunakan metode *real time polymerase chain reaction* (PCR).

Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah sel T47D yang telah di kultur di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, yang akan diteliti pada ekspresi gen p53 dengan menggunakan PCR. Pada penelitian ini ada 2 kelompok yang akan diteliti yaitu, yang diberi zat uji (perlakuan) dan yang tidak diberi zat uji (kontrol).

Data hasil yang diperoleh berupa nilai *Cq/Cycle Quantification* dari gen target dan gen referensi.

Nilai *Cq* dari masing-masing gen tersebut kemudian dirata-rata dengan menggunakan SPSS 15.0. Nilai *Cq* gen p53 kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan menggunakan uji *mann whitney*, jika nilai  $p < 0,05$  berarti adanya perbedaan yang bermakna. Nilai *Cq* gen p53 juga dianalisis dengan menggunakan rumus  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yaitu dengan cara dinormalisasi dengan nilai *Cq* gen GAPDH sebagai gen referensi.

Nomor izin kaji etik pada penelitian ini adalah No: 045/KEP/FK/2019, dan institusi yang mengeluarkan no izin kaji etik penelitian ini adalah Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

## Hasil

Pembacaan nilai *Cq* dari gen P53 dan GAPDH dilakukan dengan menggunakan *Thermal Cycler* RT-PCR di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Hasil yang didapatkan pada setiap kelompok penelitian berupa nilai *Cycle Quantification* dari masing-masing sampel yang ada pada setiap kelompok penelitian. Perbandingan rerata nilai *Cq* pada setiap kelompok disajikan dalam tabel 1.

**Tabel 1.** Data Kuantifikasi gen p53 dan GAPDH pada siklus fluoresen yang terbaca (*Cq/Cycle quantification*) dari hasil *Real Time* PCR

Sampel	Cq p53		Cq GAPDH	
	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol
1	32,36	31,55	34,62	29,94
2	31,81	31,34	32,27	29,94
3	35,82	31,61	32,04	27,65
4	34,83	33,64	34,49	27,59
5	35,89	31,43	32,22	30,06
6	35,42	31,64	32,06	30,18
7	35,17	31,81	33	28,16
8	34,63	32,36	33,59	28,33
<b>Rata-rata</b>	34,49	31,92	33,04	28,98

Data kuantifikasi yang diperoleh pada tabel 1 kemudian diuji dengan menggunakan uji *mann whitney* untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna atau tidak. Uji *mann whitney* dilakukan sebagai alternatif dari uji *Indepent Sample T-Test* karena data tidak terdistribusi normal. Hasil uji *mann whitney* rerata Nilai *Cq* Gen

p53 pada Sel Kanker Payudara T47D disajikan dalam Tabel 2.

**Tabel 2.** Rerata Nilai Cq Gen p53 pada Sel Kanker Payudara T47D

Variabel	Nilai Cq				Nilai P*)
	n	Median	Min	Maks	
<b>Kelompok Perlakuan</b>	8	35	31,81	35,89	0,003
<b>Kelompok Kontrol</b>	8	31,625	31,34	33,64	

\*) Berdasarkan Uji *Mann Whitney*

Berdasarkan hasil pada Tabel 2 didapatkan nilai  $p < 0,05$ . Artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara nilai Cq gen p53 sel kanker payudara T47D pada kelompok perlakuan dan kontrol. Hal tersebut menandakan bahwa pemberian larutan uji ekstrak etanol daun sirsak terhadap sel kanker payudara T47D mempengaruhi ekspresi gen p53 dari sel tersebut pada kedua kelompok penelitian.

Rerata nilai Cq gen p53 dan gen GAPDH sel kanker payudara T47D pada kedua kelompok penelitian kemudian dianalisis menggunakan rumus livak. Fungsi dari nilai Cq gen GAPDH adalah untuk normalisasi data dari nilai Cq gen p53. Gen GAPDH bertindak sebagai gen referensi/*housekeeping gene*.

Analisis nilai ekspresi gen p53 dari *Real Time PCR* menggunakan *relative quantification*, yaitu dengan menggunakan Rumus Livak:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Pertama, nilai Cq gen p53 (gen target) dinormalisasi dengan nilai Cq gen GAPDH (gen referensi) untuk sampel perlakuan dan sampel kontrol:

$$\Delta Cq_{(perlakuan)} = Cq \text{ p53} - Cq \text{ GAPDH}$$

$$34,49 - 33,04 = 1,45$$

$$\Delta Cq_{(kontrol)} = Cq \text{ p53} - Cq \text{ GAPDH}$$

$$31,92 - 28,98 = 2,94$$

Kedua, nilai  $\Delta Cq$  sampel perlakuan dinormalisasi dengan nilai  $\Delta Cq$  sampel kontrol:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(perlakuan)} - \Delta Cq_{(kontrol)}$$

$$\Delta\Delta Cq = 1,45 - 2,94 = -1,49$$

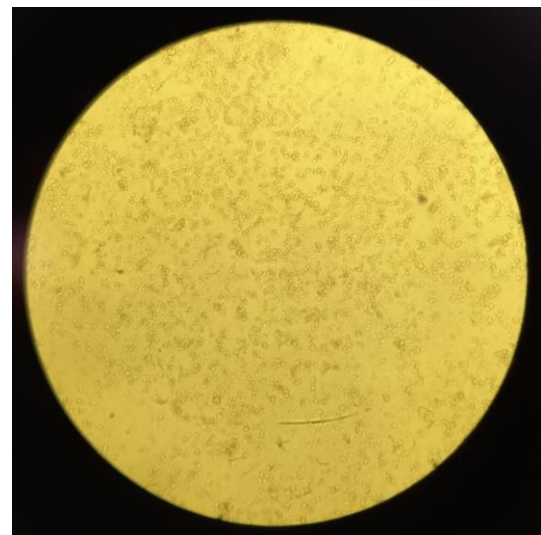
Terakhir, hitung rasio ekspresi:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Rasio ekspresi yang dinormalisasi}$$

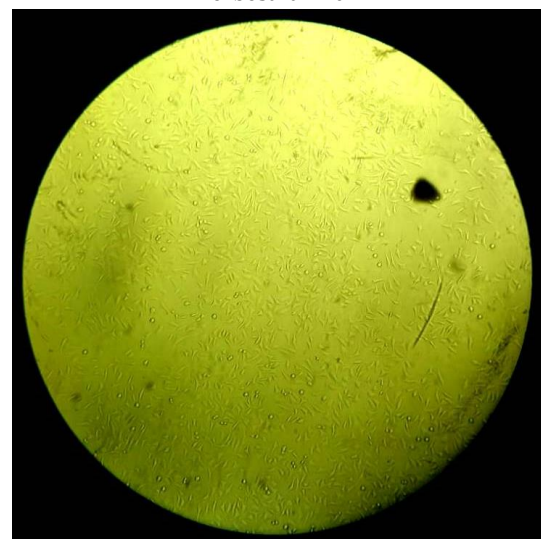
$$2^{-(-1,49)} = 2,8$$

Sel kanker payudara T47D yang diberi perlakuan mengekspresikan gen p53 pada tingkat 2,8 kali lipat lebih tinggi dari sel kelompok kontrol.

Secara mikroskopis antara sel kanker payudara T47D kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol menunjukkan adanya perbedaan jika dilihat dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Sel kanker payudara T47D yang diberikan larutan uji dan sel kanker payudara T47D yang tidak diberikan larutan uji secara berturut-turut disajikan pada gambar 1 dan 2. Sel kanker payudara T47D yang diberikan larutan uji menunjukkan adanya tanda-tanda apoptosis yaitu bentuk sel sudah tidak utuh dan berkurangnya kepadatan sel. Sedangkan sel kanker payudara T47D yang tidak diberikan larutan uji menunjukkan gambaran sel tampak utuh, terdapat adhesi antara satu sel dengan yang lainnya, dan sel tumbuh dengan kepadatan yang tinggi.



**Gambar 1.** Sel T47D yang diberikan Perlakuan, Perbesaran 10x



**Gambar 2.** Sel T47D yang Tidak diberikan Perlakuan, Perbesaran 10x

## Diskusi

Berdasarkan dari hasil penelitian ini, ekstrak etanol daun sirsak diketahui dapat memacu terjadinya apoptosis yang ditandai dengan meningkatnya ekspresi dari gen p53 kelompok perlakuan setelah dilakukan analisis dengan menggunakan rumus livak. Hal ini sejalan dengan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Pertiwi, dkk yaitu adanya penurunan viabilitas sel kanker payudara T47D setelah diberikan perlakuan ekstrak etanol daun sirsak yang menandakan 50% populasi sel kanker mengalami kematian sel karena efek sitotoksik dari ekstrak ini.<sup>12</sup> Oleh karena itu dapat diketahui bahwa kematian 50% sel yang terjadi salah satunya diakibatkan oleh meningkatnya ekspresi gen p53 akan memacu proses apoptosis pada sel kanker payudara T47D. Hal yang serupa juga ditemukan pada penelitian Rachmawati, dkk bahwa ekstrak etanol daun sirsak dapat menghambat proliferasi dari sel HeLa dengan dosis tertentu pada paparan 48 jam dan juga ditemukan ekspresi gen p53 yang meningkat setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak ini dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa dan menginduksi terjadinya apoptosis. Mekanisme tersebut dimediasi oleh p53.<sup>13</sup>

P53 merupakan *tumor suppressor gene* yang sangat penting perannya dalam mengontrol aktivitas apoptosis. Sebagai tumor supresor, p53 memiliki peran mencegah proliferasi sel dan menjaga integritas genomik.<sup>14</sup> Ada tiga jalur utama gen target p53, yaitu menahan siklus sel saat terjadi kerusakan DNA, perbaikan DNA yang rusak, dan mengontrol apoptosis jika tidak dapat diperbaiki lagi kerusakan yang terjadi.<sup>15</sup> Pada jalur menahan siklus sel saat terjadi kerusakan DNA, akumulasi p53 dalam sel akan mengakibatkan penghambatan siklus sel pada fase G1 karena aktivitas dari p21 (inhibitor CDK). Sedangkan pada jalur perbaikan DNA yang rusak (DNA repair) akan terjadi dua kemungkinan, yaitu perbaikan DNA berhasil dan perbaikan DNA gagal. Apabila perbaikan DNA berhasil maka akan membuat sel menjadi normal kembali, sedangkan apabila perbaikan DNA gagal maka akan berlanjut ke proses apoptosis. Pada jalur apoptosis, gen p53 akan menginisiasi terjadinya proses kematian sel yang terprogram.

Proses kematian sel yang terprogram (apoptosis) akan diinisiasi oleh p53 jika

kerusakan yang terjadi tidak dapat diperbaiki lagi. Apoptosis berguna untuk mengeliminasi kerusakan sel yang terjadi. Gen p53 berperan dalam menginduksi berbagai gen yang terlibat dalam proses apoptosis baik melalui jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik. Pada jalur intrinsik, berbagai protein pro apoptosis, seperti *Bax*, *Bid*, *Puma*, *Noxa* dan p53AIP1 diinduksi oleh gen p53. Protein pro apoptosis yang diinduksi ini akan mendorong mitokondria kehilangan membran potensialnya sehingga melepaskan sitokrom c. Sitokrom c yang dilepaskan akan membentuk kompleks apoptosom dengan Apaf-1 dan *caspase* 9 yang akan menginduksi apoptosis. Selain menginduksi berbagai protein apoptosis, p53 juga menghambat protein apoptosis seperti *Bcl-2*, *Bcl-X* yang melindungi mitokondria dari apoptosis.<sup>15,16</sup> Sedangkan melalui jalur ekstrinsik, p53 akan mengaktifkan reseptor kematian yang berada pada bagian membran plasma, yaitu *Fas/CD95*, *death receptor 4* (DR4) dan *death receptor 5* (DR5). Aktifnya reseptor kematian tersebut akan mengaktifkan *caspase* 8 dan pada akhirnya menginduksi apoptosis.<sup>17</sup> Gen p53 memiliki jalur utama dalam menginduksi apoptosis, yaitu jalur intrinsik. Sedangkan jalur ekstrinsik digunakan untuk memperkuat respon apoptosis.<sup>16</sup> Baik melalui jalur intrinsik maupun ekstrinsik dalam menginduksi berbagai gen yang terlibat dalam proses apoptosis, tentu sel kanker payudara T47D yang memiliki level ekspresi gen p53 yang lebih tinggi akan mengalami apoptosis yang lebih banyak pula dibandingkan dengan sel yang memiliki level ekspresi gen p53 lebih rendah.

Berdasarkan teori diatas, dapat diketahui bahwa salah satu mekanisme ekstrak etanol daun sirsak dalam menyebabkan efek sitotoksik dan antikanker pada sel T47D adalah melalui proses apoptosis yang diinduksi oleh p53. Berdasarkan peran p53 tersebut, tentu akan mengakibatkan kompensasi yang berbeda antara sel kanker payudara T47D yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun sirsak dengan yang tidak diberi perlakuan (kontrol). Pada kelompok perlakuan diberikan larutan uji ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi sesuai IC50. Konsentrasi IC50 yang digunakan yaitu 94,26 µg/ml pada masa inkubasi 72 jam yang dimana ini adalah konsentrasi efektif yang dapat membunuh 50% populasi sel kanker payudara T47D sesuai dengan

penelitian pendahuluan. Sel T47D yang diberi perlakuan memiliki level ekspresi gen p53 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sel T47D yang diberi perlakuan ekstrak akan mendapatkan efek antikanker karena senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tersebut, yaitu *acetogenin*.

Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Muhartono dan Subeki<sup>6</sup> dalam penelitiannya bahwa penggunaan ekstrak daun sirsak berpotensi sebagai antikanker. Penelitian lain yang dilakukan oleh Arifianti dkk<sup>10</sup> menemukan aktivitas ekstrak biji sirsak (*Annona muricata L.*) dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker mamalia, yaitu sel T47D, HeLa, WiDr, dan Raji. Hal ini juga sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Torres dkk<sup>8</sup> bahwa ekstrak daun sirsak menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel kanker pankreas CD18/HPAF dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 73 µg/ml, ekstrak ini bekerja dengan menginduksi sitotoksitas sel kanker pankreas, menghambat metabolisme sel, dan menghambat siklus sel.

Hasil penelitian Moghadamtousi dkk<sup>9</sup> juga memperlihatkan efek sitotoksik dari ekstrak etil asetat daun sirsak terhadap sel kanker paru (A549) dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 5,09±0,41 µg/mL. Efek antikanker dari ekstrak etil asetat daun sirsak ini didukung oleh beberapa hal sesuai dengan pemaparan di hasil penelitian mereka, yaitu hilangnya membran potensial mitokondria, peningkatan kadar sitokrom c, adanya *upregulation* Bax dan *downregulation* Bcl-2, serta aktivasi dari *caspase* inisiator dan eksekutor. Selain itu aktivitas antiproliferasi juga ditemukan pada hasil penelitian mereka yang disertai dengan penghentian siklus sel pada fase G1. Secara keseluruhan, hasil dari penelitian mereka menemukan bahwa adanya keterlibatan jalur intrinsik dalam apoptosis yang diinduksi.<sup>9</sup>

Mekanisme *acetogenin* yang merupakan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun sirsak dalam menimbulkan efek antikanker dan sitotoksik adalah dengan menghambat oksidase NADH di membran plasma pada sel kanker, menghambat kompleks I mitokondria, menghentikan siklus sel pada fase G1 dan menghambat progresi fase S, dan menginduksi terjadinya apoptosis.<sup>18</sup> *Acetogenin* akan menghambat oksidase NADH di membran plasma pada sel kanker, dimana akan mengakibatkan

terhambatnya produksi NAD<sup>+</sup> yang diperlukan untuk siklus asam sitrat (siklus krebs). Sehingga dapat menurunkan produksi ATP yang merupakan hasil dari siklus krebs itu sendiri. *Acetogenin* juga menghambat siklus sel pada fase G1 dimana pada siklus tersebut terjadi pembentukan makromolekul untuk dimulainya duplikasi DNA, sintesis RNA, protein regulator, dan juga enzim. *Acetogenin* mampu menginduksi apoptosis karena dapat mengaktifkan p21 yang merupakan inhibitor dari enzim *cyclin-dependent* kinase yang berperan dalam siklus sel.

Menurut Moghadamtousi dkk,<sup>9</sup> mekanisme lain *acetogenin* dalam menginduksi apoptosis adalah dengan mempengaruhi permeabilitas membran mitokondria (*Mitochondrial Membran Permeability/MMP*) sehingga akan mengakibatkan *cytochrome c* dari mitokondria mengalami peningkatan translasi ke sitosol untuk mengaktifkan *caspase 9* sebagai *executioner caspase* pada proses apoptosis. Protein seperti Bax yang bersifat pro-apoptosis juga ikut meningkat dikarenakan pelepasan *cytochrome c* ke sitosol tadi melalui dimerisasi dan translokasi ke membran mitokondria bagian luar. Sementara, Bcl-2 yang bersifat anti-apoptosis yang menekan translokasi *cytochrome c* akan mengalami penurunan regulasi.<sup>9</sup> Keluarnya sitokrom c dari mitokondria, peningkatan Bax yang merupakan protein pro-apoptosis, dan regulasi dari protein anti-apoptosis yaitu Bcl-2 yang mengalami penurunan akan menginduksi terjadinya apoptosis.

Oleh karena itu, dapat diketahui bahwa sel kanker payudara T47D yang diberikan perlakuan ekstrak etanol daun sirsak yang dimana didalamnya terkandung senyawa bioaktif *acetogenin* akan mengalami proses apoptosis karena mekanisme aksi dari *acetogenin* ini. Selain *acetogenin* yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis, sel T47D yang diberikan larutan uji juga mengalami peningkatan level ekspresi gen p53. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini yang dimana didapatkan gambaran sel T47D kelompok perlakuan terlihat gambaran kerusakan sel yang menunjukkan tanda-tanda apoptosis yaitu bentuk sel sudah tidak utuh dan berkurangnya kepadatan sel ketika dilihat pada mikroskop *inverted* dengan perbesaran 10x (Gambar 1).

Berbeda dengan kelompok perlakuan, sel kanker payudara T47D yang tidak diberikan larutan uji (kelompok kontrol) tentu akan mengalami kompensasi yang berbeda dengan kelompok perlakuan. Hal ini dikarenakan pada kelompok kontrol tidak terdapat senyawa bioaktif yang akan menginduksi terjadinya apoptosis sebagaimana yang terjadi pada kelompok perlakuan yang diberi larutan uji ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn). Jika dilihat di bawah mikroskop *inverted*, terlihat gambaran sel T47D yang tidak diberi zat uji masih tampak utuh, terdapat adhesi antara satu sel dengan yang lainnya, dan sel tumbuh dengan kepadatan yang tinggi (Gambar 2).

### Simpulan

Dari penelitian yang dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) efektif dapat meningkatkan ekspresi gen p53 sel kanker payudara T47D dan terdapat perbedaan yang bermakna dari nilai Cq gen p53 sel kelompok perlakuan dan kontrol.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih peneliti sampaikan kepada Elemenesia Foundation yang telah memberikan pendanaan penelitian secara parsial, pihak Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah membantu dan memwadahi penelitian ini.

### Daftar Pustaka

1. Bott R. Data dan Informasi Kesehatan Situasi Penyakit Kanker. *Igarss*. 2014;1-5. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
2. TATEMACHI M. International Agency of Research on Cancer (France). *J Med Soc Toho Univ*. 2003;50:106-7.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
4. IARC. Global Cancer Observatory 2018. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheets.pdf> (accessed March 4, 2021).
5. Adelina R, Febrianti R, Oktoberia Intan Sari, Intan PR. Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn. sebagai Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *J Kefarmasian Indones*. 2015;4:1-12.
6. Muhartono, Subekti. Penggunaan Ekstrak Daun Sirsak sebagai Obat Kemoterapi Kanker Payudara. Pros. Semin. Artik. Ilm. Dies Natalis FK Unila ke 13, 2015, p. 1-8.
7. Moghadamtousi SZ. *Annona muricata* (Annonaceae) : A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci* 2015;16(7): 15625-58. doi: 10.3390/ijms160715625.
8. Torres MP, Rachagani S, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, et al. Graviola: A Novel Promising Natural-Derived Drug That Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo Through Altering Cell Metabolism. *Cancer Lett* 2012;323:29-40. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.031. Graviola.
9. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Paydar M, Rouhollahi E, Karimian H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:1-13. doi: 10.1186/1472-6882-14-299.
10. Arifianti L, Sukardiman, Studiawan H, Rakhmawati, Megawati L. Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak. *J Farm Dan Ilmu Kefarmasian Indones*. 2014;1:63-6.
11. Retnani V, Prajoko YW. Pengaruh Suplementasi Ekstrak Daun *Annona muricata* terhadap Kejadian Displasia Epitel Kelenjar Payudara Tikus Sprague Dawley yang Diinduksi 7,12 Dimethylbenz(a) anthracene [skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2011.
12. Pertiwi W, Arisanty D, Linosefa L. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47D Secara In Vitro. *J Kesehat Andalas*. 2020;9:165-70. doi: 10.25077/jka.v9i1s.1173.
13. Rachmawati E, Karyono S, Suyuti H. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53 The Effect of *Annona muricata* Leaf on Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells Mediated by p53. *J Kedokt Brawijaya*. 2012;27:28-33. doi: 10.21776/ub.jkb.2012.027.01.5
14. Yang H, Wen Y, Chen C, Lozano G, Lee M. 14-3-3 $\sigma$  Positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7096-107. doi: 10.1128/MCB.23.20.7096.
15. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3:994-1013. doi: 10.3390/cancers3010994.
16. Bai L, Zhu W. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol*. 2006;2:141-53.
17. Takimoto R, El-deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER / DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*. 2000;19:1735-43. doi: 10.1038/sj.onc.1203489.
18. Nutrition R. Monograph Graviola *Annona muricata*. Carson City: 2004.