

# Aktivitas Sitotoksitas Ekstrak Metanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Karsinoma Hepatoseluler Strain HUH7IT-1 Cell Line

Dadan Ramadhan Apriyanto<sup>1</sup>, Sri Hartati<sup>2</sup>, Beti Ernawati Dewi<sup>3</sup>, Chie Aoki-Utsubo<sup>4</sup>, Hak Hotta<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Swadaya Gunung Jati, Cirebon, [dadanramadhanapriyanto95@gmail.com](mailto: dadanramadhanapriyanto95@gmail.com)

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Serpong

<sup>3</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

<sup>4</sup>Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences, 7-10-2, Tomogaoka, Suma-ku, Kobe 654-0142, Japan

<sup>5</sup>Department of Oral Vaccine and Drug Development, Kobe University Graduate School of Health Sciences, 1-5-6 Minatojima-minamimachi, Chou-ku, Kobe 650-0047, Japan

## ABSTRAK

**Latar Belakang:** Karsinoma hepatoseluler (HCC) merupakan tumor ganas hati primer dengan prognosis pada umumnya dapat menyebabkan kematian. Studi awal penelitian antiviral hepatitis C pada tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* L.) pada konsentrasi 20 µg/mL memperlihatkan toksisitas yang sangat tinggi terhadap Huh7it-1 cell line, yang diindikasikan memiliki potensi anti kanker terhadap sel hati, sehingga penelitian ini bertujuan menguji beberapa konsentrasi lebih rendah pada ekstrak metanol daun *Annona muricata* L. (EMDAM) terhadap Karsinoma Hepatoseluler strain Huh7it-1 cell line.

**Metode:** Sel diuji dengan konsentrasi 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 µg/mL selama 48 jam. Sitotoksitas EMDAM terhadap Huh7it-1 dilihat dengan mikroskop *inverted* dan selanjutnya diukur dengan metode MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium].

**Hasil:** Hasil uji menunjukkan sel memperlihatkan bentuk tidak monolayer pada mikroskop *inverted* dengan sitotoksitas hingga konsentrasi terendah pada 0.3 µg/mL mencapai 84,7%, sehingga konsentrasi 50% Sitotoksitas (CC<sub>50</sub>) < 0.3 µg/mL.

**Simpulan:** Hasil uji mengindikasikan bahwa EMDAM memiliki potential terhadap aktivitas anti kanker hati. Studi lebih lanjut diperlukan untuk purifikasi untuk senyawa aktif sebagai antikanker atau target mekanisme terhadap aktivitas anti kanker hati.

**Kata kunci:** Karsinoma Hepatoseluler, Huh7it-1, Sitotoksitas, *Annona muricata*

## ABSTRACT

**Background:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignant tumor of liver cells with prognosis can cause death within 2-3 months. Previous studies of *Annona muricata* L. on anti-HCV studies at concentrations of 20 µg / mL showed very high toxicity to Huh7it-1 cell line, it was indicated to have anti-cancer potential of liver cells, so this study tested the potency of anticancer activity extract methanol leaf *Annona muricata* L. (EMDAM) against Hepatocellular Carcinoma Huh7it-1 strain cell line with low dose.

**Methods:** Cells were tested with concentrations of 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 µg / mL for 48 hours. The EMDAM cytotoxicity of Huh7it-1 was seen with an inverted microcomputer and then measured with MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium].

**Results:** The results showed that the cells presented non-monolayer form in an inverted microscope with cytotoxicity until the lowest concentration of 0.3 µg / mL reached 84.7%, thus concentrating 50% cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) < 0.3 µg / mL.

**Conclusion:** The results indicate that EMDAM has the potential for anti-liver cancer activity. Further studies are needed for purification for active compounds as anticancer or target mechanisms against anti-liver cancer activity.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, Huh7it-1, Cytotoxicity, *Annona muricata*

## Pendahuluan

Karsinoma Hepatoseluler (HCC) merupakan tumor ganas primer pada sel hepatosit dengan prognosis pada umumnya dapat menyebabkan kematian.<sup>1</sup> Penderita HCC sekitar 70-90% memiliki riwayat penyakit hepatitis kronik dan sirosis yang dapat disebabkan oleh infeksi

Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, penyakit alkohol hati, dan nonalcoholic steatohepatitis (NASH).<sup>2,3</sup> Faktor resiko lain dalam perkembangan HCC meliputi diabetes, obesitas, kontaminasi aflatoxin pada makanan, faktor turunan tertentu seperti *hemochromatosis*, dan beberapa *metabolic disorders*.<sup>4</sup>

Saat ini terapi HCC yang memiliki tingkat kesembuhan rendah terutama pada pasien yang tidak memenuhi syarat untuk metode bedah (reseksi). Reseksi dapat dipilih pada kondisi penderita dengan hati tanpa sirosis, namun kebanyakan HCC kondisi hati dengan fase lanjut, hanya < 30% penderita yang dapat ditangani dengan reseksi dan tranpalntasi. Pilihan lain tanpa reseksi diantaranya *percutaneous ethanol injection*, *radiofrequency ablation* dan *transarterial chemoembolization*.<sup>3</sup> Keberhasilan reksesi mencapai 35% penderita HCC dapat bertahan hidup selama 5 tahun, sedangkan tanpa reksesi < 10%.<sup>5</sup>

Hal ini mendorong untuk mencari kandidat antikanker terhadap sitotoksisitas HCC menggunakan bahan alam seperti tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.) yang merupakan famili dari *Annonaceae* diketahui memiliki khasiat sebagai pereda sakit kepala, insomnia, dan obat sakit perut. Ekstrak etanol daun *Annona muricata* L. memiliki kandungan fitokimia diantaranya terpenoid, steroid, flavonoids, cardiac glycoside, tannin, phenol, alkaloid, dan reducing sugar. Kandungan tersebut memiliki aktivitas secara biologi sebagai antitumor, immunomodulator, antispasmodic, antimalarial, antiparasitic, antibacterial, antifungal dan antihelmintic.<sup>6</sup>

Studi awal penelitian antiviral hepatitis C pada tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* L.) pada konsentrasi 20 µg/mL memperlihatkan toksisitas yang sangat tinggi terhadap Huh7it-1 *cell line*, yang diindikasi memiliki potensi anti kanker terhadap sel hati, sehingga penelitian ini bertujuan menguji beberapa konsentrasi lebih rendah pada ekstrak metanol daun *Annona muricata* L. (EMDAM) terhadap Karsinoma Hepatoseluler strain Huh7it-1 *cell line*.

## Metode

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengetahui aktivitas sitotoksisitas metanol daun *Annona muricata* secara *in vitro* terhadap Huh7it-1 *cell line*. Pengujian untuk mengetahui konsentrasi 50% tosik (CC<sub>50</sub>) terhadap Huh7it-1 *cell line*.

### Material Tumbuhan dan lokasi

Daun *Annona muricata* L. didapat dari Pusat Penelitian Kimia, LIPI, Serpong, Indonesia. Tumbuhan diidentifikasi oleh ahli botani pada Pusat Penelitian Botani dan Biologi, LIPI, Cibinong, Indonesia. Ekstraksi tumbuhan indonesia dilakukan di laboratorium Pusat penelitian Kimia LIPI Serpong, sedangkan pengujian Sitotoksisitas dilakukan di Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi Universitas Indonesia (PRV KP-UI).

## Sel

Sel digunakan adalah *derivat* human hepatocarcinoma (Huh7it-1) *cell line*. Sel ditumbuhkan dalam medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco) dengan suplemen 10% *fetal bovine serum* (Biowest), non-essential amino acids (Gibco), Kanamycin (100 IU/mL) (Sigma), dengan kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## Ekstraksi

Daun *Annona muricata* L. dikeringkan anginkan hingga daun berwarna coklat, dihaluskan (*Grinding*) dan ditimbang untuk sampel daun berat sampel awal kering berkisar 500 gr. Kemudian dimaserasi dengan n-heksana sebanyak 4x, masing-masing dalam 4 L pelarut. Hasil filtrat tersebut dievaporasi dengan alat evaporator pada temperatur 40°C. Hasil filtrat dipetoleh ekstrak n-heksan. Residu heksan di lanjutkan di maserasi dengan metanol, kemudian hasil filtrat tersebut dievaporasi dengan alat evaporator pada temperatur 40°C. Hasil filtrat diperoleh ekstrak metanol daun *Annona muricata* (EMDAM) berkisar 5,1 gr.

## Persiapan Stok Ekstrak

EMDAM ditimbang sebesar 80 mg. Setelah itu dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) 100% sebanyak 700 µl untuk mendapatkan larutan stok dengan konsentrasi 100 mg/ml. Larutan stok disimpan pada -30°C hingga digunakan.

## Uji Sitotoksisitas Ekstrak

Pengujian toksisitas ekstrak dilakukan menggunakan metode MTT [3 - ( 4 , 5 - dimethylthiazol - 2 - yl ) - 5 ( 3 carboxymethoxyphenyl ) - 2 - ( 4 - sulfophenyl ) - 2H-tetrazolium ]. Konsentrasi uji EMDAM digunakan 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, dan 0.3 µg/mL yang dilarutkan pada medium pertumbuhan sel, dengan kontrol yang digunakan adalah DMSO 0,1% yang dilarutkan pada medium pertumbuhan sel. Sel ditanam pada plate 96 well dengan kepadatan 2x10<sup>4</sup> sel/sumur yang diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah 24 jam, ekstrak tersebut diinokulasikan pada sel dan diinkubasi dengan kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 48 jam. Setelah 48 jam, diamati dengan mikroskop *inverted* dan kemudian ekstrak diganti dengan larutan MTT 10% dalam medium pertumbuhan sel dan diinkubasi dengan kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 4 jam. Setelah 4 jam kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan DMSO 100%. Pembacaan absorbansi dilakukan pada alat Glomax-promega reader pada panjang gelombang 560 nm dan 750 nm. Persentase sitotoksisitas didapat dengan perhitungan sebagai berikut:

Persen sitotoksitas sel =  $100 - \{[(\text{Absorbansi } 560\text{nm-background}) - (\text{Absorbansi } 750\text{nm-background})] / \text{rata-rata kontrol}\} * 100\}$

**Hasil**

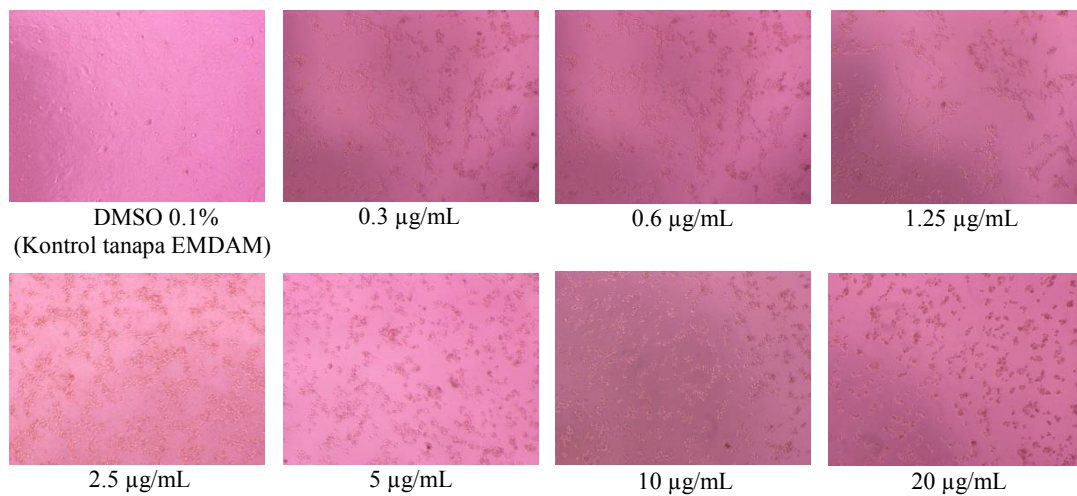
**Gambaran mikroskopis Huh7it-1 cell line**

Konsentrasi uji EMDAM yang digunakan adalah 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, dan 0.3 µg/mL terhadap Huh7it-1 cell line. Gambaran sitotoksitas EMDAM terhadap Huh7it-1 cell line memperlihatkan bentuk sel tidak *monolayer* pada pengamatan mikroskop *inverted*. Sel memperlihatkan bentuk yang tidak beraturan pada

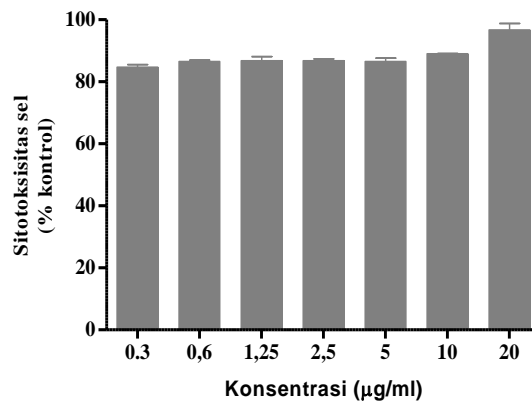
konsentrasi 0.3-1.25 µg/mL dan sel berbentuk bulat yang rusak pada konsentrasi 2.5-20 µg/mL (**Gambar 1**).

**Aktivitas Sitotoksitas EMDAM**

Pengujian sitotoksitas EMDAM dengan metode *MTT* terhadap Huh7it-1 cell line. Hasil sitotoksitas EMDAM menunjukkan pada semua konsentrasi uji memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan Huh7it-1 cell line. Persentase sitotoksitas pada konsentrasi 0.3 hingga 20 µg/mL berturut-turut sebesar 84.7%, 86.5%, 86.8%, 86.8%, 86.5%, 89.0%, dan 96.7% (**Gambar 2**). Konsentrasi 50% Sitotoksitas ( $CC_{50}$ ) EMDAM sebesar < 0.3 µg/mL.



**Gambar 1.** Gambaran mikroskopis aktivitas sitotoksitas EMDAM. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop *inverted* perbesaran 100x.



**Gambar 2.** Aktivitas Sitotoksitas EMDAM. Data ditunjukkan dengan membandingkan persentase sitotoksitas dengan kontrol DMSO 0.1% (means ± SD dengan tiga ulangan).

**Pembahasan**

Hasil persentase sitotoksitas EMDAM yang tinggi memiliki potensi terhadap antikanker sel hati ataupun sel kankerlainnya.<sup>7,8</sup> Studi lain dari ekstrak etanol daun *A. muricata* memperlihatkan adanya aktivitas apoptosis terhadap kanker hati (HepG2 *cell line*) dan kanker kolon (HCT116 *cell line*) melalui *ER stress pathway*.<sup>9</sup> Aktivitas antikanker hati pun diperlihatkan dari ekstrak air daun *A. muricata* dengan cara *down and up control* dari Bcl-2 (anti-apoptotic) dan Bax (*pro-apoptotic*) yang diikuti peningkatan eksresi caspase-9 dan caspase-3 terhadap *Huh-7 cell line*.<sup>10</sup>

EMDAM memungkinkan ada beberapa senyawa yang aktif terhadap sel kanker, namun pada studi yang dilakukan belum sampai mengetahui senyawa apa yang sangat berperan terhadap sitotoksitas *Huh7it-1 cell line*.

*Annona muricata* L. tergolong famili *Annonaceae*. Kandungan fitokimia famili *Annonaceae* sala satunya adalah *annonaceous acetogenins* yang merupakan senyawa toksik terhadap sel kanker ataupun pada *multi-drug-resistant cancer cell lines*.<sup>6</sup>

#### Simpulan

EMDAM memiliki potensi sitotoksitas yang cukup tinggi terhadap *Huh7it-1 cell line*, yang kedepannya perlu dikaji lebih lanjut atau purifikasi untuk senyawa aktif sebagai antikanker atau target mekanisme terhadap aktivitas anti kanker hati.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneitian ini didukung oleh Science and Technology Research Partnerships for Sustainable Development (SATREPS) from Japan Science and Technology Agency (JST) and Japan International Cooperation Agency (JICA).

#### Daftar Pustaka

1. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. *Oncologist*. 2010;15(4):14–22.
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557–76.
3. Fong ZV, Tanabe KK. The clinical management of hepatocellular carcinoma in the United States, Europe, and Asia: A comprehensive and evidence-based comparison and review. *Cancer*. 2014;120(18):2824–38.
4. Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis*. 2009;27(2):80–92.
5. Teo EK, Fock KM. Hepatocellular carcinoma: an Asian perspective. *Dig Dis*. 2001;19(4):263–8.
6. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15625–58.
7. Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, Moukette BM, Boyoum FF, Ngogang JY, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):516.
8. Rosdi M, Daud N, Zulkifli R, Yaakob H. Cytotoxic effect of *Annona muricata* Linn leaves extract on Capan-1 cells. *J Appl Pharm Sci*. 2015;045–8.
9. Liu N, Yang HL, Wang P, Lu YC, Yang YJ, Wang L, et al. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *J Ethnopharmacol*. 2016;189:210–7.
10. Banerjee A, Sengupta A, Maji B, Nandi A, Pal S, Mukherjee S. Possible Cytotoxic Activity of *Annona muricata* Leaves in Huh-7 Human Liver Cancer Cells. *Hepatol Pancreat Sci*. 2017;1(1):1–6.