

UJI EFEKTIFITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG SIRSAK TERHADAP SEL T47D

Firstca Aulia Rachma¹, Haryoto², Peni Indrayudha²

¹Prodi S-1 Farmasi, STIKES Telogorejo Semarang

²Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email : firstca@stikestelogorejo.ac.id, 085728950813

ABSTRAK

Kanker adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker. Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dari simplisia kulit batang sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap sel T47D. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT dengan menggunakan 4 seri konsentrasi, yaitu 250; 125; 62,50; 31,25 dan 15,63 µg/mL dengan kepadatan sel 10.000 sel/sumuran. Identifikasi golongan senyawa kimia menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : *n*-heksan 8:2 menggunakan beberapa pereaksi semprot yaitu FeCl₃, Lieberman Burchard, Vanilin, Sitroborat, dan Dragendorff. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang sirsak (*Annona muricata* L.) kurang poten dalam menghambat sel kanker payudara dengan nilai IC₅₀ sebesar 221,81 µg/mL.

Kata Kunci: *Annona muricata* L, Ekstrak etanol, sitotoksik, T47D

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker (Djajanegara, 2009). Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan di sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah dan menyerang organ-organ penting serta syaraf tulang belakang (Mangan, 2003). Kanker merupakan penyebab utama kematian pada wanita dengan umur antara 30-54 tahun dan anak-anak antara 3-14 tahun di Amerika Serikat (Nafrialdi dan Gan, 2005). Di AS, lebih dari 60% dari kanker terdiagnosis pada penderita yang berusia diatas 65 tahun. Secara keseluruhan, resiko terjadinya kanker di AS meningkat 2 kali lipat setiap 5 tahun setelah usia 25 tahun (Rahayu, 2011).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan cara pembedahan, radiasi dan kemoterapi. Salah satu terapi

yang sering digunakan untuk penyembuhan kanker adalah kemoterapi. Tujuan utama dari kemoterapi adalah merusak secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. Tujuan ini sering mengalami kegagalan dan sampai sekarang masih sedikit sekali obat kanker yang bekerja secara selektif untuk pengobatan jenis kanker tertentu (Dyah dan Suko, 2000). Akibat efek yang merugikan ini, masyarakat cenderung beralih ke obat alam. Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang frekuensi kejadiannya paling tinggi di antara kanker-kanker jenis lain yang sering menyerang wanita. Risiko kanker payudara bagi wanita pascamenopause secara positif terkait dengan konsentrasi estrogen yang berasal dari androgen (Missmer *et al.*, 2004; Kaaks *et al.*, 2005).

Tanaman sirsak (*Annona muricata* Linn.) merupakan bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Komponen senyawa yang terkandung dalam tanaman sirsak antara

lain senyawa-senyawa asetogenin (*muricin H*, *muricin I*, dan *cis-annomontacin*.) serta alkaloid isoquinolon yang memiliki efek sitotoksik (Liaw *et al.*, 2002). Asetogenin adalah senyawa poliketida yang bersifat nonpolar dengan struktur 30–32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus 5-metil-2-furanon. Rantai furanon dalam gugus hidrofuranon pada C23 memiliki aktivitas sitotoksik (Gonzalez, 2002).

Penelitian ekstrak heksan dari kulit batang sirsak mempunyai efek sitotoksik terhadap sel CEM-SS dengan nilai IC_{50} sebesar 0,8 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak etil asetat dari kulit batang sirsak mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HL dengan nilai IC_{50} sebesar 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Shaari, 2005). Hasil uji toksisitas akut ekstrak kulit batang sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter memiliki nilai LC_{50} 181,7 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak kloroform memiliki nilai LC_{50} 134,2 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak etanol memiliki nilai LC_{50} 140,8 $\mu\text{g/mL}$, dan ekstrak akuades memiliki nilai LC_{50} 512,9 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kloroform merupakan ekstrak yang paling aktif dari kulit batang sirsak yang mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, dan glikosida sianogenik.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi dari kulit batang sirsak sebagai agen penghambat dari sel kanker dan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol.

METODE PENELITIAN

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran yang terdapat pada sampel ekstrak kulit batang sirsak (*Annona muricata* Linn.) serta mencocokkan morfologinya terhadap kepustakaan dan determinasi dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Fakultas

Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk

Simplisia kulit batang sirsak yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tanaman yang sehat dan segar dari Desa Lopait Kecamatan Tuntang Salatiga. Kulit batang tersebut dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung, setelah kering simplisia tersebut diblender.

3. Preparasi Ekstrak

Serbuk kering kulit batang sirsak ditimbang sebanyak 1,72 kg dan dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 13 L. Sesekali di aduk dan wadah maserasi ditutup dengan menggunakan plastik hitam agar terhindar dari cahaya. Ampas yang diperoleh dari ekstraksi etanol dikeringkan pada suhu kamar sampai tidak berbau etanol lagi. Sari yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator* (rotavapor) sampai kental kemudian dikeringkan pada suhu kamar sampai tidak berbau etanol lagi. Hasil yang diperoleh ditimbang, sari ini disebut ekstrak etanol kulit batang sirsak.

4. Profil Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam yang akan digunakan yaitu silika gel GF_{254} yang diaktifkan dalam oven pada suhu 100°C selama 1 jam. Larutan uji ditotolkan sebanyak 3 kali pada plat silika gel GF_{254} dan dibiarkan sampai kering, kemudian dielus dengan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3) dengan jarak pengembangan sebesar 5 cm hingga didapatkan pemisahan yang sempurna. Kromatogram diamati bercaknya pada sinar UV_{254} nm dan UV_{366} nm. Kemudian bercak dideteksi dengan pereaksi semprot FeCl_3 , Sitroborat, Dragendorf, Vanilin dan Lieberman-Burchard.

5. Uji Aktivitas antikanker

a. Sterilisasi

1) Sterilisasi LAF

Sterilisasi LAF dilakukan dengan menyalakan lampu UV 2-3 jam sebelum digunakan.

2) Sterilisasi alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian ini harus dalam keadaan steril dan dicuci dengan deterjen atau antiseptik, lalu dibilas dengan air yang bersih dan direndam aquadest 1 jam kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Setelah kering alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas payung dan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

b. Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam wadah *cryotube* diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C kemudian disemprot etanol 70%, *Cryotube* dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril yang berisi medium RPMI 1640 lebih kurang 5-10 mL. Suspensi sel disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, pellet ditambah 1 mL medium penumbuh dengan FBS 10%, diresuspensi hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (3-4 buah). Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga jumlahnya cukup untuk penelitian.

c. Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, medium dibuang dan sel dicuci koloninya dengan larutan PBS untuk membilas sel. Sel ditambah larutan tripsin 2,5% sebanyak 0,5 mL untuk melepaskan sel lalu ditunggu 5 menit dan di inkubator agar sel yang menggerombol dapat lepas,

kemudian di lihat di mikroskop. Sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama dan dihitung jumlah sel nya menggunakan hemositometer.

d. Pembuatan larutan uji

Ekstrak etanol kulit batang sirsak sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO dan ditambah 100 µL media kultur sehingga diperoleh konsentrasi awal (stok) sebesar 100.000 µg/mL. Selanjutnya dibuat 5 seri kadar dari stok dalam media RPMI. Pembuatan larutan uji dilakukan dalam *Laminair Air Flow Cabinet* secara aseptis.

e. Uji Sitotoksik menggunakan Metode MTT

Stok yang telah dibuat lima seri konsentrasi yaitu 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,50 µg/mL, 31,25 µg/mL, dan 15,63 µg/mL dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumuran yang berisi sel dengan kepadatan 10.000 sel/sumuran, dengan volume 100 µL/sumuran. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditambah MTT 110 µL pada masing-masing selanjutnya diinkubasi kembali, setelah inkubasi berjalan selama 3,5 jam reaksi dihentikan dan ditambah SDS 10% dalam HCl 0,01 N sebanyak 100 µL/sumuran untuk melarutkan formazan. Hasilnya dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

f. Uji kandungan senyawa dengan KLT

Ekstrak etanol kulit batang sirsak dilarutkan dalam pelarut yang sesuai yaitu aseton. Larutan sampel dan perbandingan ditotolkan pada plat KLT yang merupakan fase diam yaitu plat silika gel GF₂₅₄, kemudian totolan tersebut dielusi dengan fase gerak Etil asetat: *n*-Heksan dengan perbandingan 8:2 yang sesuai yang diperoleh dari hasil orientasi,

kemudian dikeringkan dan diangin-anginkan. Setelah itu diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Untuk identifikasi senyawa, permukaan plat disemprot dengan berbagai pereaksi semprot untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak etanol kulit batang sirsak. Pereaksi semprot yang digunakan $FeCl_3$ (Deteksi tanin dan polifenol), Sitroborat (deteksi flavonoid), Dragendorf (deteksi alkaloid), Vanilin H_2SO_4 (deteksi minyak atsiri) dan Lieberman-Burchard (deteksi saponin).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan pada Senin, 10 Oktober 2011 di Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta dengan membandingkan ciri-ciri morfologi yang terdapat pada tanaman dengan keterangan pada buku *Flora of Java Spermatophytes only* Volume 1 karangan Backer *et al.* (1965). Determinasi tanaman harus dilakukan untuk mencegah kesalahan dalam pengambilan tanaman. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman yang diidentifikasi tersebut adalah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.).

2. Pengumpulan dan Penyerbukan Bahan

Kulit batang sirsak yang digunakan berasal dari Desa Lopait Kecamatan Tuntang Salatiga. Kulit batang sirsak diambil dari satu daerah disebabkan karena kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda tergantung dari bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh.

Kulit batang sirsak yang diperoleh, dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih yang bertujuan

untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya dari kotoran yang melekat pada batang tanaman. Setelah bahan terkumpul kemudian dipotong agar menjadi bagian yang lebih kecil, sehingga mempercepat proses pengeringan. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari langsung. Proses pengeringan bertujuan untuk mencegah kerusakan enzimatik, karena dengan berkurangnya kadar air, enzim-enzim akan menjadi tidak aktif. Selain itu, untuk mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri serta terjadinya perusakan bahan aktif yang dapat menurunkan kualitas dan kuantitas bahan aktif dalam simplisia.

Setelah simplisia kering kemudian diserbuk. Proses pembuatan serbuk dilakukan dengan blender. Tujuan penyerbukan adalah untuk memperkecil ukuran partikel. Semakin kecil ukuran partikel, semakin besar luas permukaan serbuk yang kontak dengan cairan penyari sehingga proses penyarian akan lebih efektif. Karena dengan penyerbukan sejumlah sel-sel akan rusak dan ini akan memudahkan pengambilan kandungan zat aktif oleh pelarut (Voight, 1986).

3. Penyarian

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik dua senyawa atau lebih berdasarkan sifat kepolarannya. Pemilihan etanol 96% sebagai cairan penyari karena etanol bersifat polar, sehingga dapat menarik senyawa baik yang relatif polar maupun non polar. Serbuk sampel sebanyak 1,72 kg direndam selama 24 jam menggunakan 13 L etanol dan selama perendaman dilakukan pengadukan sesering mungkin untuk membuat kondisi yang homogen pada saat perendaman. Ekstrak yang didapat kemudian dikentalkan dengan menggunakan evaporator dan diangin-anginkan pada suhu ruangan sampai pelarut benar-benar hilang, sehingga diperoleh ekstrak etanol

sebanyak 59,5 gram, sehingga didapat rendemen 3,46 %.

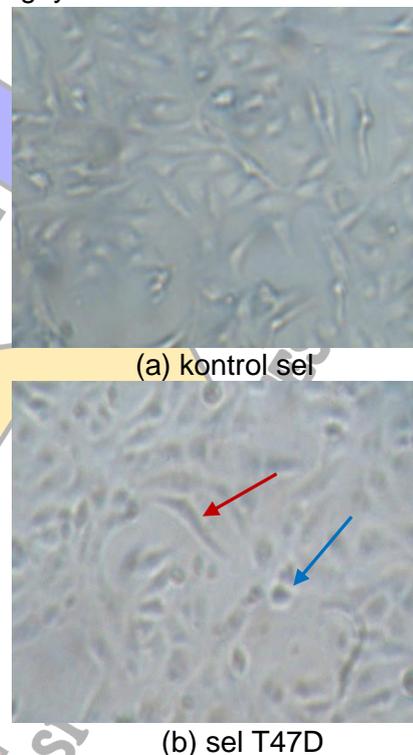
4. Uji Sitotoksik Terhadap Sel T47D dengan Metode MTT

Metode yang digunakan adalah MTT assay yang bekerja secara kolorimetri dengan dasar pembentukan warna antara sel yang hidup. Reagen MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide) merupakan garam tetrazolium yang larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Sel T47D ditumbuhkan dalam *flask* dengan media penumbuh yang berisi RPMI dan FBS yang merupakan sumber nutrisi makanan bagi sel T47D. Sel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C agar pertumbuhan optimal. Media penumbuh perlu ditambahkan *pens-strep* yang berisi Penicillin-Streptomisin sebagai antibiotik yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri. Di samping itu juga perlu ditambah *fungizone* sebagai penghalang pertumbuhan jamur dan spora yang dapat mengganggu pertumbuhan sel T47D.

Seri konsentrasi ekstrak etanol kulit batang sirsak yang digunakan adalah 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, dan 15,625 µg/mL. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen *stopper* yaitu larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% yang berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatis dan untuk melarutkan garam formazan sehingga kompleks warna ungu bisa ditetapkan secara spektrofotometri dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Semakin besar absorbansi maka semakin banyak sel yang hidup yang bereaksi dengan MTT. Absorbansi ini kemudian digunakan untuk menghitung persentase sel hidup. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media tanpa perlakuan.

Sel yang sehat ditandai dengan sel bentuk daun, berinti, jernih, dan bersinar

di bawah mikroskop. Sel yang hidup akan terlihat terang karena adanya cairan sitoplasma yang bersifat meneruskan cahaya. Ketika sel akan membelah, sel membulat dan terlihat berbeda dari sekelilingnya.



Gambar 2. Morfologi sel T47D

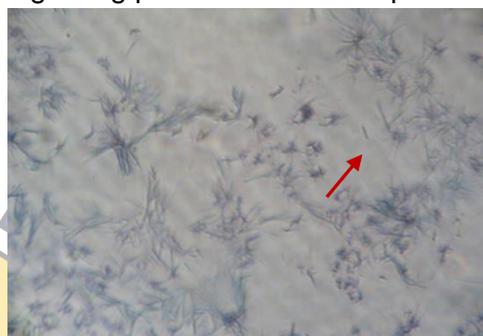
Keterangan:
→ = Sel Hidup
→ = Sel Mati

Untuk memudahkan pengamatan dalam penghitungan sel hidup, digunakan reagen MTT. Garam tersebut dapat dipecah menjadi formazan oleh sistem *succinate tetrazolium reductase* yang terdapat pada jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel hidup. Enzim mitokondria pada sel aktif tersebut yang memetabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dan berwarna ungu (Mostmann, 1983 *cit* Rohman, 2008). Setelah diinkubasi selama 4 jam dengan penambahan MTT, reaksi dihentikan dengan penambahan

larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% yang berfungsi sebagai *stopper solution* yang dapat mendenaturasi protein menjadi unit polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida.

Warna ungu ini selanjutnya dideteksi serapannya secara spektrofotometer dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Reaksi ini memperlihatkan reduksi MTT menjadi formazan oleh enzim reduktase. Semakin kuat intensitas warna ungu diperoleh absorbansi yang semakin besar. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang hidup dan bereaksi dengan garam

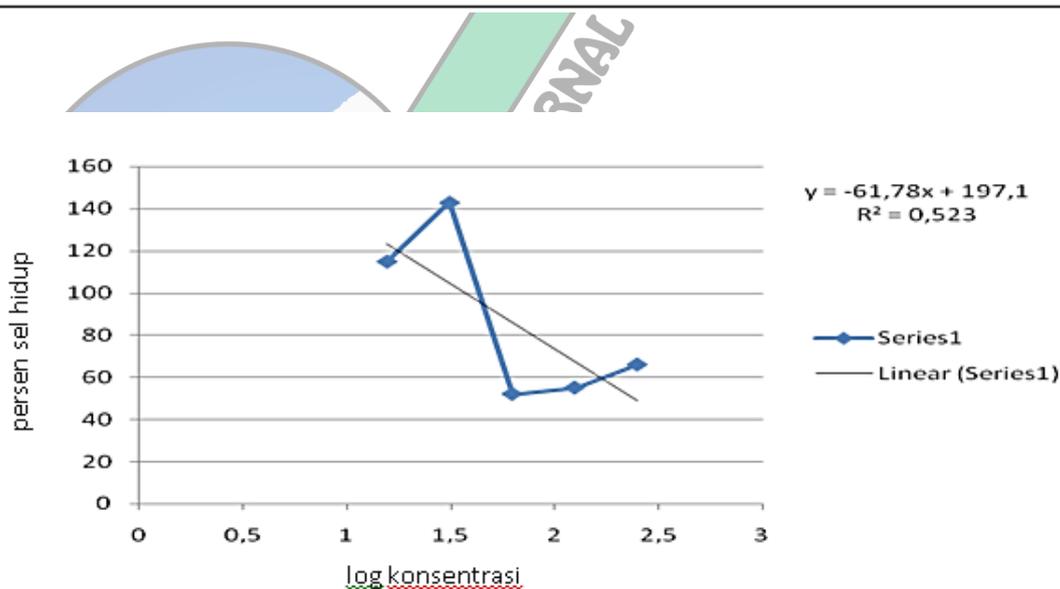
tetrazolium, sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak. Absorbansi ini kemudian digunakan untuk menghitung persentase sel hidup.



Gambar 3. Kristal formazan (→) yang terbentuk setelah penambahan MTT

Tabel 2. Persentase sel hidup dari sel T47D akibat perlakuan ekstrak etanol kulit batang sirsak (*Annona muricata* L.)

Kon-sentrasi (µg/mL)	Log Konsen-trasi	Absorbansi Perlakuan			Rata-Rata Kontrol sel	Rata-Rata Kontrol media	Rata2 Abs. Perlakuan - Kontrol Media	Abs. Kontrol sel - Kontrol Media	% Sel Hidup
		1	2	3					
250	2,39	0,29	0,61	0,40	0,57	0,18	0,25	0,39	66
125	2,09	0,41	0,31	0,46	0,57	0,18	0,21	0,39	55
62,50	1,79	0,38	0,34	0,43	0,57	0,18	0,20	0,39	52
31,25	1,49	0,75	0,63	0,84	0,57	0,18	0,56	0,39	143
15,63	1,19	0,59	0,62	0,68	0,57	0,18	0,47	0,39	115



Gambar 4. Grafik hubungan antara Log konsentrasi versus Persen Sel Hidup

Tabel 2 memperlihatkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan uji menyebabkan penurunan persentase sel hidup. Konsentrasi 250 µg/mL merupakan konsentrasi tertinggi ekstrak etanol kulit batang sirsak yang menunjukkan presentase sel hidup sebesar 66% dan konsentrasi 15,63 µg/mL merupakan konsentrasi terendah yang menunjukkan presentase sel hidup sebesar 115%. Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin kecil jumlah sel yang mampu bertahan hidup. Hal itu dapat dilihat dari jumlah sel yang bereaksi dengan garam MTT membentuk kristal formazan. Pada kadar yang kecil, banyak sel yang mampu bertahan dan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan sehingga pada pengukuran dengan ELISA reader menunjukkan absorbansi yang besar pula.

Berdasarkan grafik kemudian bisa diperoleh persamaan garis lurus $y=bx+a$, sehingga diperoleh persamaan $y = -63,4x + 198,9$. Dari persamaan garis lurus yang diperoleh, kemudian digunakan untuk mencari harga IC_{50} dengan memasukkan angka 50 sebagai y ke dalam persamaan sehingga dapat diketahui harga x atau log konsentrasinya. Antilog dari harga x merupakan harga IC_{50} . Telah diketahui bahwa semakin kecil harga IC_{50} suatu senyawa akan semakin bersifat toksik terhadap sel.

Hasil penelitian aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol kulit batang sirsak diperoleh harga IC_{50} sebesar 239,88 µg/mL. Suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki efek sitotoksik terhadap sel apabila memiliki $IC_{50} < 100$ µg/mL (Rajabalian, 2007). Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol kulit batang sirsak mempunyai efek sitotoksik kurang poten terhadap sel T47D. Oleh karena itu, perlu dilanjutkan dengan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang sirsak.

Apabila dibandingkan dengan fraksi yang lain, ekstrak etanol kulit batang sirsak mempunyai aktivitas sitotoksik yang paling tinggi yaitu 239,88 µg/mL. Dari perhitungan didapatkan IC_{50} fraksi polar adalah 1051,96 µg/mL (Azni, 2012), fraksi semipolar adalah 1380,38 µg/mL (Septiana, 2012), dan fraksi non polar mempunyai IC_{50} yang terlalu besar (Handayani, 2012). Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak maupun fraksi-fraksi kulit batang sirsak (*Annona Muricata* Linn.) mempunyai efek sitotoksik kurang poten terhadap sel T47D. Pada ekstrak etanol kulit batang srikaya dan fraksinya, didapatkan IC_{50} ekstrak adalah 237,317 µg/mL (Rahayu, 2012), fraksi polar mempunyai IC_{50} 43,524 µg/mL (Umma, 2012), fraksi semipolar adalah 73,56µg/mL (Muflihah, 2012), fraksi non polar adalah 60,586µg/mL (Rachmayanti, 2012). Sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi polar pada ekstrak etanol kulit batang srikaya mempunyai aktivitas sitotoksik paling tinggi terhadap sel T47D.

5. Analisis Kualitatif Kandungan Kimia

Analisis Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dari ekstrak etanol kulit batang sirsak. Hasil uji ditunjukkan oleh Tabel 3.

Pengamatan yang dilakukan pada UV 254 nm dan 366 nm belum memberikan informasi yang lengkap, terutama untuk mengetahui keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar. Oleh karena itu untuk memperoleh informasi keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar, pengamatan dilakukan dengan memberikan pereaksi semprot pada lempeng KLT tersebut. Pereaksi semprot yang digunakan dalam penelitian ini adalah sitroborat untuk deteksi senyawa flavonoid dari glikosida saponin, dragendroff untuk identifikasi golongan alkaloid, $FeCl_3$ spesifik untuk mendeteksi adanya senyawa polifenol, LB untuk

mendeteksi saponin dan Vanilin untuk mendeteksi adanya minyak atsiri.

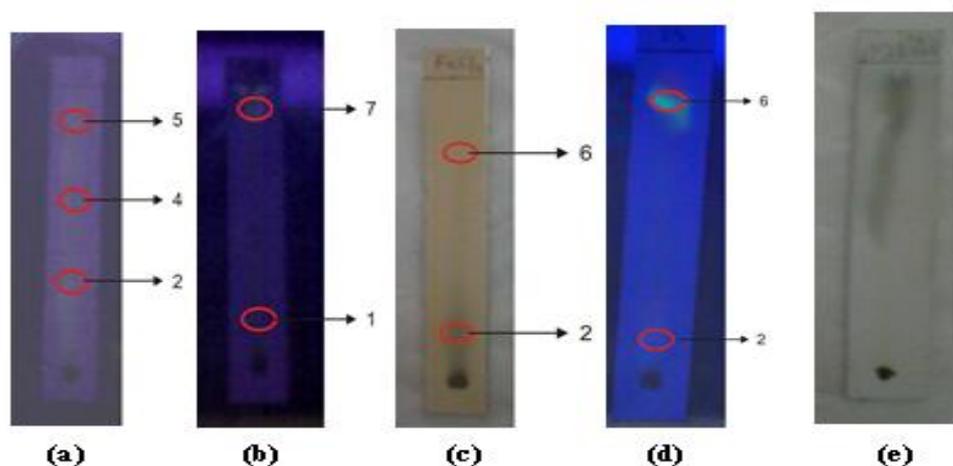
Flavonoid dapat dideteksi dengan dengan pereaksi semprot sitroborat terdapat bercak berwarna kuning, kuning kehijauan di bawah sinar UV 366 nm (Markham, 1982). Bercak berwarna kuning merupakan senyawa flavonoid pada Rf: 0,3; 0,7; dan 0,8.

Pereaksi semprot Dragendorff digunakan untuk mendeteksi komponen alkaloid, menurut Wagner *et al.* (1984) reaksi positif dari uji ini ditunjukkan

dengan warna coklat atau jingga-coklat dan merah-jingga dengan latar belakang kuning sampai kelabu pada Rf: 0,2 dan 0,9 pada UV 366 nm dan merupakan senyawa alkaloid. Pereaksi semprot FeCl₃ spesifik untuk mendeteksi senyawa tannin atau polifenol yang ditunjukkan oleh adanya bercak berwarna abu-abu, hijau sampai biru apabila kromatogram dilihat pada sinar tampak (Wagner *et al.*, 1984). Pada kromatogram terlihat pada Rf: 0,3 dan 0,86.

Tabel 3. Identifikasi Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Kulit Batang sirsak dengan Beberapa Pereaksi Semprot

Bercak	Rf	FeCl ₃ Sinar tampak	Sitroborat 366	Dragendorff 366	LB 366
1	0,2	-	-	Coklat	-
2	0,3	Abu-abu	Kuning kehijauan	-	-
3	0,3	-	-	-	-
4	0,3	-	-	-	-
5	0,7	-	Hijau Kuning kemerahan	-	-
6	0,8	Abu-abu	-	-	Hijau merah
7	0,9	-	-	Merah jingga	-



Gambar 5. Kromatogram setelah disemprot pereaksi sitroborat pada UV 366 nm

Keterangan :

- Kromatogram setelah disemprot dragendorff pada UV 366 nm
- Kromatogram setelah disemprot pereaksi FeCl₃ yang dilihat pada sinar tampak
- Kromatogram setelah disemprot LB pada UV 366 nm
- Kromatogram setelah disemprot pereaksi vanilin yang dilihat pada sinar tampak

Pereaksi semprot LB spesifik untuk mendeteksi adanya senyawa saponin pada suatu kromatogram. Adanya senyawa saponin ditunjukkan oleh adanya bercak hijau gelap yang menunjukkan adanya senyawa steroid dan adanya bercak merah (Rf: 0,3 dan 0,86) yang menunjukkan adanya triterpenoid (Kumar *et al.*, 2007). Pereaksi semprot Vanilin spesifik untuk mendeteksi adanya minyak atsiri pada suatu kromatogram. Adanya minyak atsiri ditunjukkan oleh adanya bercak biru sampai ungu pada sinar tampak.

Berdasarkan hasil KLT tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak etanol kulit batang sirsak (*Annona muricata* L) mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol dan saponin. Menurut (Taylor, 2002) dalam daun, biji, kulit batang, dan akar sirsak mengandung banyak senyawa kimia yang aktif secara biologi yang disebut *Annonaceous acetogenin*. Berdasarkan hasil KLT dari fraksi polar terdapat kandungan yang sama dengan kandungan pada ekstrak yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Pada hasil KLT semi polar dan non polar terdapat kandungan flavonoid, saponin, tanin dan minyak atsiri.

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman dari famili *Annonaceae* mengandung senyawa asetogenin yang memiliki aktivitas sitotoksik. Yang (2008) juga menyebutkan bahwa *Annonaceous acetogenin* terdistribusi pada akar, kulit batang, biji, daun, dan buah. Sampai saat ini penelitian tentang distribusi kandungan asetogenin antar tiap bagian tanaman sirsak belum dapat ditemukan, sehingga belum dapat ditunjukkan pengaruh kadar asetogenin di setiap bagian tanaman sirsak terhadap potensi ketoksikannya pada sel kanker. Oleh karena itu, perlu penelitian tentang distribusi senyawa asetogenin pada tiap bagian tanaman sirsak.

Senyawa aktif asetogenin yang terkandung dalam tanaman sirsak dapat diisolasi dari hasil pemurnian ekstrak biji, daun, dan ranting tanaman famili *annonacea* (Spurr, 2010). Asetogenin mempunyai aktivitas sitotoksik dengan mekanisme kerja menghambat produksi ATP dengan mengganggu kompleks I mitokondria dan menghambat NADH oksidase dari membran plasma pada sel tumor.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan :

1. Ekstrak etanol kulit batang sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ sebesar 221,81 µg/mL.
2. Golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang sirsak adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam, 2007, T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899) <http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>, diakses mei 2011.
- Azni, Meicella, 2012, Aktivitas sitotoksik Ekstrak Etanolik kulit batang sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap sel T47D serta Profil Kromatografi Lapis Tipis, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., dan Speirs, V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5(2): 89-95.
- Burger, A., 1970, *Medical Chemistry*, Third Edition, Willey Interscience, New York-London-Sydney-Toronto.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Weells, B. c., and Posey, L. M., 2005, *Pharmacotherapy*

- : a pathophysiologic approach 6 th Ed., Appleton & lange Stamford.
- Djajanegara, Ira., 2009, *Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun Annona Squamosa*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, vol 7, no.1, 7-11.
- Dyah dan Suko, H., 2000, *Kimia Medisinal 2 Editor siswando*, 164, Airlangga University Press, Surabaya.
- Freshney, R.I, 1986, *Culture Of Animal Cells Amanual Of Basic Techniwue*, Fourth Ed, A John Wiley And Sons Inc Publication, New York, USA.
- Goeswin, Agoes, 2009, *Sediaan Farmasi Steril*, Penerbit ITB; Bandung.
- Gonzalez, A., 2002, *Selective Action of Acetogenin Mitochondrial Complex I Inhibitors*, *Naturforsch*, 57c, 1028-1034.
- Handayani, Aulia, 2012, *Aktivitas sitotoksik Fraksi Heksan ekstrak etanolik kulit batang sirsak (Annona muricata Linn.) terhadap sel T47D*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Kumar, et al., 2007, *Antimicrobial effects of Indian medical plants against acne-inducing bacteria*, *Topical journal of Pharmaceutical Research*, June; 6(2); 717-723.
- Liaw, et al., 2002, *New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenin from Annona muricata*, *Journal Of Natural Product Research*, Vol.65(4), pp.470.
- Markham, K.R., 1982, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Magadula et al., 2009, *Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 (Annona muricata L.) species and isolation of active principles*, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 3(9), pp. 674-680.
- Mangan, Y., 2003, *Cara Bijak Menaklukan Kanker*, 3-6, Agro Media Pustaka, Jakarta.
- Mclaughlin., et al., 2008, *Paw-paw and Cancer Annonaceous Acetogenin from Discovery to Comercial Products*, Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Purdue University, 71(7):1311–1321.
- Meiyanto, E., Sismindari, Candra, dan Moerdiani, 2003, *Efek AntiProlifatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (Erithryma fusca L.) terhadap Sel HeLa*, 14, *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Melannisa, R., 2004, *Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara T47D Yang Diinduksi 17β-estradiol: Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis, dan Antiangiogenesis*, Tesis, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada
- Meyer BN, Ferrigni N R., Putnam JE, Jacobson LB, Nicholas DE, McLaughin JL. *Brine Shrimp: A convinient general bioassay for active plant constituent*, *Plant. Med.* 1982.31:34-35.
- Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE, 2004, *Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women*. *J Natl Cancer Inst* 96: 1856–1865.
- Morton, J.F. 1987, *Fruits of Warm Climate*, Media Incorporated, Miami, USA. 505 pp.
- Mosmann, T., 1983, *Rapid Colometric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay*, *J. Immunological Methods.*, 55,63,65,Cit in Anonim, 2011, *MTT Assay*, (Online), diakses Februari 2011.
- Mulyadi, 1997, *Kanker : Karsinogen dan Antikanker*, 96-98, Tiara Wacana Yogya, Yogyakarta
- Nafrialdi dan Ganiswara, S., 2005 *Farmakologi dan Terapi : Anti kanker dan Immunosupresan*, Edisi 4, Bagjan

- Farmakologi Falkutas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pinto, A.C. De Q., M.C.R. Cordiero, S.R.M.de Andrade, F.R.Ferraira, H.A. De C. Filgueiras, R.E.Alves, and D.I Kinpara. 2005. *Annona* spesies. International Centre for Underutilized Crops, University of Southampton. 263pp.
- Price, S., A., 2005, *Patofisiologi Konsep Klinis Proses – Proses Penyakit*, Volume 2, 1303, EGC, Jakarta.
- Rahayu, Wahyu, 2011, *Mengenal, mencegah dan mengobati kanker*, Victory inti cipta, Jakarta.
- Rajabalian, S., Foroumadi, A., Shafiee, A., and Emami, S., 2007, Functionalized N-(2-oxyminoethyl) Piperazinyl Quinolones as New Cytotoxic Agents, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 10 (2), 153-158.
- Rohman, Abdul., Gandjar, Ibnu Gholib., 2008, *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Septiana, Luthfiani, 2012, Aktivitas sitotoksik Fraksi Etil Asetat ekstrak etanolik kulit batang sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap sel T47D, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6, 4373-4380.
- Shaari, 2005, Chemical Constituents From *Annona muricata* L. and *Garcina mangostana* L. and their Biological Activities, *Skripsi*, Universitas Putra Malaysia, Malaysia.
- Spurr, I.B. & Brown, R.C.D., 2010, Total Synthesis of Annonaceous Acetogenins Belonging to the Non-Adjacent Bis-THF and Non-Adjacent THF-THP, *Molecules*, 15, 460-501.
- Sukardja, I., G., D., 2004, *Onkologi*, Edisi 2, 113, Airlangga University Press, Surabaya.
- Syamsuhidayat, S.S dan Hutapea, J.R, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, edisi kedua, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Taylor, L., 2002, Technical Data Report For GRAVIOLA (*Annona muricata* L.), sage press, Austin.
- Tjitrosoepomo, Gembong, 2002, *Taksonomi Tumbuhan Obat (Spermatophyta)*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Verheij, E.W.M. dan R.E. Coronel. 1997. *Prosea. Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2. Buah – buahan yang dapat dimakan*, Gramedia, Jakarta.
- Voight, R., 1986, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Diterjemahkan oleh Soedani Noerono, Edisi V, hal.197-199, Penerbit PT. Alex Media, Komesindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- 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.
- Wirakusumah, Emma, S., 1995, *Buah dan Sayur untuk Terapi*, Swadaya Press, Jakarta.
- Yang, Hai-Jun, Li, Zhang, Chen, Wang, 2008, Two New Cytotoxic Acetogenins from *Annona squamosa*, *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 11, No. 3, 250-256.