

Pengaruh Ekstrak Daun *Annona muricata* L. Terhadap Ekspresi *caspase 3* pada Adenokarsinoma Mamma mencit C3H

Hikmah Fitriani, Tissa Octavira Permatasari, Ruri Eka M. Mulyaningsih

Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung jati

Hikmahfitriani19@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang : Pengobatan kanker payudara berupa pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi masih banyak menimbulkan efek samping. Efek samping ini dapat diminimalisir dengan penggunaan tanaman obat salah satunya yaitu tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang bekerja secara selektif dalam menyerang sel kanker. **Tujuan :** Penelitian ini ingin membuktikan pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit C3H. **Metoda :** Penelitian eksperimental pada hewan coba dengan desain *Randomized Post Test Only Control Group*. Sebanyak dua belas ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor, dibagi dalam 2 kelompok : yaitu kelompok kontrol (K) tidak diberi perlakuan dan Kelompok Perlakuan (P) diberi ekstrak daun sirsak dengan dosis 1mg/hari, selama tiga minggu, diukur ekspresi *caspase 3*. Dilakukan uji *Mann Whitney* untuk masing-masing kelompok. **Hasil :** Terdapat perbedaan yang bermakna pada ekspresi *caspase 3* antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p = 0,004$). Didapatkan peningkatan median ekspresi *caspase 3* (K = 0,4 dan P = 1,36) **Kesimpulan :** Pemberian ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan ekspresi *caspase 3* pada adenokarsinoma mamma
Kata Kunci: Ekstrak daun sirsak, *caspase 3*, adenokarsinoma mamma

ABSTRACT

Background : Treatment of breast cancer such as surgery, radiotherapy and chemotherapy still has a lot of side effects. This can be minimized by using herbal medicine such as *Annona muricata* L. which works selectively attacking cancer cells. **Objective :** The aim for this research was to determine effect of *Annona muricata* L. leaves extract on the *caspase 3* expression on adenocarcinoma mammae in C3H mice. **Methods :** Animal experiment using *Post Test Only Control Group* design was done. Twelve C3H mice were inoculated with tumour and were divided into two groups : Control (C) group and the other group was Treatment (T) group with *Annona muricata* L. leaves extract of dose 1 mg/day. All of the groups were treated for three weeks and then measuring *caspase 3* expression. *Mann Whitney* test was conducted to analyze the data. **Result :** There were significant differences on the *caspase 3* expression between control group compared with one group administrated with *Annona muricata* L. leaves extract of dose 1 mg/day respectively ($p = 0,004$) between control group compared with one group administrated with *Annona muricata* L. leaves extract of dose 1 mg/day ($p = 0,004$). From the result, median of *caspase 3* expression were increased with Control = 0,4 and Treatment = 1,36. **Conclusion :** *Annona muricata* L. leaves extract can increase *caspase 3* expression
Keywords: *Annona muricata* L. leaves extract, *caspase 3*, adenocarcinoma mammae

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyakit keganasan yang umum dijumpai pada wanita (IARC, 2007). Sebanyak 20% dari seluruh kasus keganasan di dunia adalah kanker payudara. Angka kematian dunia diperkirakan mencapai 519. 000 dalam setahun, 69% diantaranya terjadi di negara berkembang. Data badan Registrasi kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK- IAPI) tahun 1994 memperlihatkan bahwa persentase kanker payudara wanita menduduki urutan tertinggi (11,77%) setelah kanker rahim (24,14%) (Sugito, 1994). Di Jawa Tengah pada tahun 2005 ditemukan sebanyak 3.884 kasus (36,83%) dari keseluruhan kasus kanker dan merupakan urutan kedua setelah kanker

leher rahim, sedangkan di Semarang pada tahun 2005 ditemukan kanker payudara sebanyak 749 kasus atau 19,62 % dari keseluruhan kasus kanker di Jawa Tengah, dan insiden ini berada pada urutan ketiga tertinggi (Dinkes, 2005).

Bagi sebagian orang hampir menerima vonis kanker serupa dengan menerima vonis kematian, karena masalah pembiayaan pengobatan kanker yang sangat mahal (DeVita, 2001). Salah satu upaya pengobatan yang telah dirintis sejak zaman dahulu untuk mengobati berbagai penyakit diantaranya penyakit kanker adalah dengan pemanfaatan fitofarmaka, untuk menggali kandungan unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat. Dari

beribu-ribu tanaman yang telah digunakan oleh masyarakat sebagai obat, salah satunya ialah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.)

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) oleh masyarakat Indonesia telah banyak digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit termasuk kanker. Berbagai penelitian melaporkan bahwa daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas antikanker. Zat aktif dalam tanaman ini yang berkhasiat sebagai anti kanker salah satunya adalah *Annonaceous acetogenins* (Hamizah, 2012). *Acetogenins* merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau NADH dehidrogenase yang akan menyebabkan kematian sel kanker (Kim, 1994). Mekanisme inhibisi tersebut juga akan memicu terjadinya aktivasi jalur apoptosis serta mengaktifkan p53 (*tumor suppressor genes*) yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegah terjadinya proliferasi tak terkendali (Gonzales, 2009).

Studi mengenai kemampuan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menghambat karsinogenesis masih sangat terbatas. Hal ini patut disayangkan, karena selain *acetogenins*, daun sirsak juga mengandung berbagai macam senyawa kimia lainnya seperti alkaloid, asam lemak, minyak esensial, flavonoid, saponin, triterpenoid, fitosterol, dan senyawa polifenol yang kemungkinan besar juga memiliki efek antikarsinogenesis (deSousa, 2010).

Penelitian sebelumnya tahun 2012, didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak daun sirsak menurunkan ekspresi Ki-67 pada kanker payudara tikus Sprague Dawley. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak daun sirsak dapat menghambat pertumbuhan tumor pada tikus (Sitorus, 2012). Kematian sel kanker dapat terjadi dengan pengaktifan jalur apoptosis yang ditandai dengan pengaktifan *caspase*. *Caspase 3* merupakan enzim sentral yang teraktifkan melalui jalur pengaktifan *death receptor* maupun dari jalur mitokondria sehingga *caspase 3* sering dipakai sebagai penanda sel yang telah mengaktifkan program apoptosisnya (Tamaki, 2003).

Berdasarkan uraian di atas maka dalam penelitian ini akan dikaji mengenai mekanisme proapoptotik senyawa yang terdapat dalam daun sirsak melalui ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit. Ekspresi *caspase 3* merupakan salah satu marker untuk aktivitas apoptosis. *Caspase 3* merupakan salah satu agen proapoptotik yang berperan sebagai *caspase* efektor utama (eksekutor) dalam proses apoptosis, serta mempengaruhi aktivasi *caspase* efektor lain, yaitu *caspase 6* dan *7* (Krajewska, 2007). Beberapa studi mengatakan bahwa aktivitas *caspase 3* berkaitan dengan gambaran morfologi apoptosis. Penelitian ini menggunakan indikator *caspase 3* untuk

mengetahui efek proapoptosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.). Untuk mendeteksi dan menilai aktivitas apoptosis pada jaringan, *caspase 3* terbukti merupakan metode pewarnaan imunohistokimia yang mudah, sensitif, dan dapat diandalkan sehingga direkomendasikan untuk digunakan pada deteksi dan penilaian apoptosis jaringan (Rachel, 2003). Studi *in vivo* pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap kanker payudara khususnya pengaruhnya pada ekspresi *caspase 3* belum pernah dilakukan. Penelitian ini ingin membuktikan pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit C3H. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi masyarakat yaitu untuk memberikan informasi pada masyarakat luas bahwa tanaman sirsak dapat digunakan sebagai alternatif obat herbal untuk penyakit kanker payudara.

METODOLOGI PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only randomized control group design*. Perlakuannya adalah dengan memberikan ekstrak daun sirsak dosis tunggal 1mg/hari, sedangkan keluarannya adalah ekspresi *caspase 3*. Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan.

Subyek Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit C3H dengan kriteria inklusi : a). Mencit C3H yang telah terdapat kanker payudara, b). Umur 2-3 bulan, 3).berat badan 20-30 gram, d).Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, dan normal. Kriteria eksklusi : mencit yang telah terjadi kanker payudara tampak sakit. Drop out: mencit mati selama perlakuan.

Perlakuan

Mencit dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, yaitu : a). Kontrol yaitu mencit yang tidak diberi ekstrak daun sirsak, dan b). Perlakuan yaitu mencit yang diberikan ekstrak daun sirsak 1mg/hari per oral selama tiga minggu.

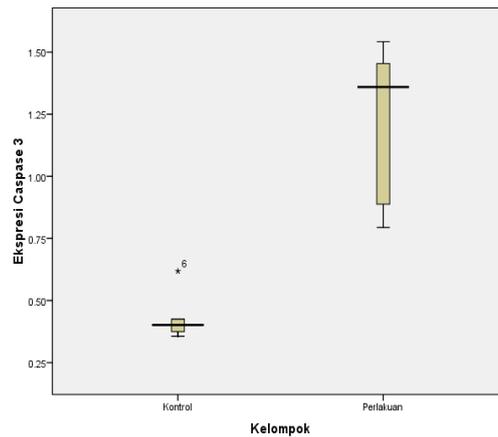
Pengukuran Ekspresi Caspase 3

Ekspresi *caspase 3* dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma yang berwarna coklat tiap 100 sel pada 10 lapang pandang besar, kemudian dilihat dengan pembesaran 400x.

Analisis Data

Analisis data ekspresi *caspase 3* menggunakan Uji *Mann Whitney* dengan batas kemaknaan 0,05 pada interval kepercayaan 95% dengan menggunakan alat bantu software komputer SPSS 18.00.

Hasil Penelitian



Gambar 1. Blox Plot Caspase 3

Dari gambar 1 terlihat gambaran blox plot median ekspresi *caspase 3* kelompok perlakuan (P) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (K). Median untuk kelompok perlakuan adalah 1,36 lebih tinggi dibandingkan dengan median kelompok perlakuan yaitu 0,4.

Hasil analisis *Mann Whitney* untuk *caspase 3* diperoleh nilai signifikansi 0,004, karena nilai $p < 0,05$ maka berarti bahwa antara kelompok kontrol terdapat perbedaan secara signifikan dengan kelompok perlakuan.

Hasil Pengamatan Mikroskopis Pewarnaan Imunohistokimia

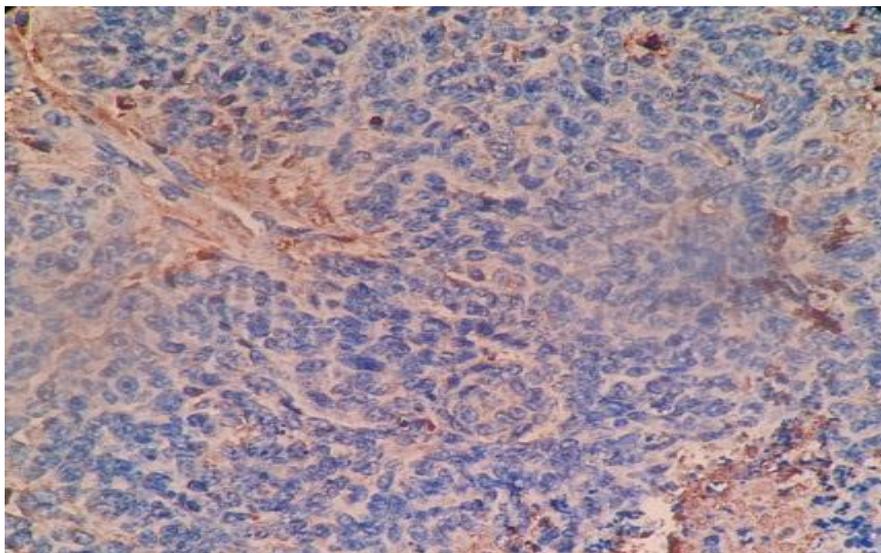
Pewarnaan imunohistokimia terhadap slide sediaan jaringan adenokarsinoma mamma ini menggunakan pengecatan imunohistokimia *caspase 3* dari Termo *caspase 3* (CPP32) antibodi primer rabbit polyclonal anti *caspase-3*. Sel yang positif mengekspresikan *caspase 3* akan memiliki sitoplasma yang berwarna coklat. Hal ini

disebabkan karena lokalisasi *caspase 3* adalah di sitoplasma. Perhitungan ekspresi *caspase 3* dihitung per 100 sel menurut metode Aihara et al, dengan pembesaran 400 x, pada 10 lapang pandang dari tiap preparat kemudian diambil reratanya. Contoh foto hasil pengamatan mikroskopis pada adenokarsinoma mamma hewan coba dari kedua kelompok perlakuan dengan pembesaran 400x dapat dilihat pada gambar 2 dan 3

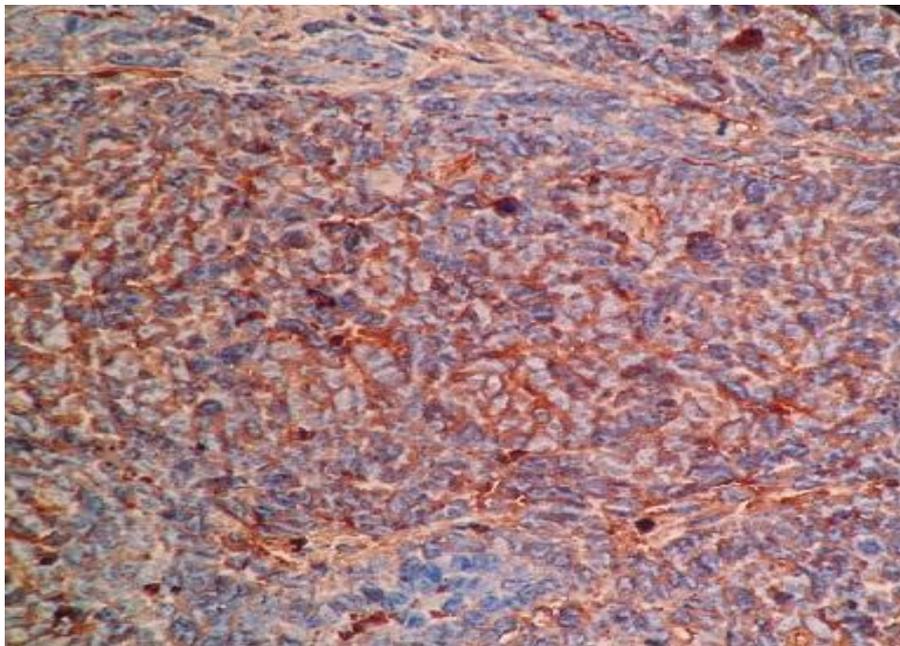
Kelompok kontrol (K), tanpa pemberian ekstrak daun sirsak. Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami ekspresi *caspase 3* dengan median sebesar 0,4. Terlihat adanya jumlah sel yang mempunyai sitoplasma berwarna coklat

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit C3H. Pada penelitian ini median ekspresi *caspase 3* pada mencit yang diberi ekstrak daun sirsak lebih tinggi jika dibandingkan dengan median pada mencit



Gambar 2 Preparat *Caspase 3* Pewarnaan IHC Kelompok Kontrol.



Gambar 3 Preparat *Caspase 3* Pewarnaan IHC Kelompok Perlakuan. Kelompok perlakuan (P), diberi ekstrak daun sirsak 1mg/hari per oral. Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami ekspresi *caspase 3* dengan median sebesar 1,36. Terlihat adanya peningkatan jumlah sel yang mempunyai sitoplasma berwarna coklat.

yang tidak diberi ekstrak daun sirsak ($p=0,004$). Penghitungan ekspresi caspase 3 pada kelompok kontrol diperoleh median sebesar 0,4 sedangkan median untuk kelompok perlakuan yaitu 1,36. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian daun sirsak dengan dosis 1mg/hari per oral dapat meningkatkan ekspresi caspase 3 yang merupakan penanda untuk aktivitas apoptosis pada kanker payudara mencit C3H. Pada penelitian sebelumnya diketahui terdapat peningkatan caspase 3 pada human hepatoma yang diberi *annonaceous acetogenins* dengan mekanisme menurunkan kadar intraselluler cGMP yang akan menginduksi apoptosis. Pada sel Bladder T24 *annonacin* yang terdapat pada ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan aktivitas caspase 3 (Yuan, 2003).

Acetogenins adalah senyawa *polyketides* dengan struktur 30-32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus 5 *methyl-2 furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* pada C23 memiliki aktivitas sitotoksik. *Annonaceous acetogenins* bekerja dengan menghambat produksi ATP dengan mengganggu kompleks I mitokondria. Sel kanker membutuhkan banyak energi sehingga membutuhkan banyak ATP. *Acetogenins* masuk dan menempel di reseptor dinding sel dan merusak ATP di dinding mitokondria. Dampaknya produksi energi di dalam sel kanker pun berhenti dan akhirnya sel kanker pun mati. Hebatnya *acetogenins* di dalam sel kanker sangat selektif, karena hanya menyerang sel kanker yang kelebihan ATP. *Acetogenins* menyebabkan permeabilitas membran terganggu dan menghambat berkembangnya sel kanker sehingga memberi kesempatan bagi tubuh untuk melakukan pengaturan kematian sel melalui apoptosis yang

dipicu oleh TNF α . Penelitian lain juga menunjukkan bahwa daun sirsak yang merupakan family *Annonaceae* tidak hanya memiliki kemampuan menghasilkan *acetogenins* tapi juga dapat menghasilkan senyawa fenol yang mengandung gugus *styril-lactones* dengan berat molekul rendah. *styril-lactones* diaktivasi oleh enzim caspase, memicu kerusakan transmembran mitokondria mamalia sehingga menghasilkan sitokrom c (Wiat, 2003). *Styryl-lactones* diduga berperan dalam produksi protein *c kinase*. Protein *c kinase* berfungsi dalam jalur transduksi signal dan diduga dapat menghambat pertumbuhan tumor, termasuk di dalamnya adalah gen caspase 3 sebagai caspase eksekutor (Choi, 1990).

SIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak daun sirsak dengan dosis 1mg/hari per oral pada adenokarsinoma mamma mencit C3H selama 3 minggu dapat meningkatkan ekspresi *caspase 3*.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis pemberian ekstrak daun sirsak untuk menentukan dosis optimal yang efektif untuk meningkatkan ekspresi *caspase 3*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bahan aktif *acetogenins* yang terkandung dalam daun sirsak terutama dalam pengaruhnya terhadap ekspresi *caspase 3* adenokarsinoma.

Daftar Pustaka

- Choi PM, Wong KMT, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 4650-7.
- de Sousa, Viera OV, de Jesus R G de Pinho GDV, Yamamoto J, Alves CH, Silvana M. Antinociceptive and antiinflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *Int J Mol Sci.* 2010;11:2067-78.
- DeVita V, Vincen T, Samuel H, Rosenberg, Steven A. *Cancer – Principles and practice of oncology.* 6th ed, editor: Lippincot Williams and Wilkins: Philadelphia; 2001.
- Gonzalez CLF, Tavora F, Caminha I, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Cellular respiration and tumor suppressor genes. In: Apte SP, Sarangarajan R, editors. New York: Springer ; 2009: 131-40.
- Hamizah S, Roslida AH, Fezah O, Tan KI, Tor YS, Tan CI. Chemopreventive potential of annona muricata L. leaves on chemically induced skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac J Canc Prev.* 2012; 13(3):2533-39.
- International Agency for Research on Cancer . Kasus kanker meningkat 10% di Eropa. *Majalah Medical Update;* April 2007;19.
- Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, Mclaughlin JL, Sastrodiharjo S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, annomuricin e and muricapentocin, from the leaves of annona muricata. *J Nat Prod.* 1998; 61(4):432–36.
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of In vivo patterns of expression of CPP32 (caspase 3), a cell death protease. *J Cancer Res.* 1997;57:1605-13.
- Pencapaian Program Kesehatan Menuju Jawa Tengah Sehat [database on the Internet]. Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Jawa Tengah. 2005 [cited 2012 Feb 29]. Available from: <http://www.dinkesjateng.org/profil2005/bab4.html>.
- Rachel DW, Gamer DS, William SD, et al. Comparison of immunohistochemistry of activated caspase 3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 sub cutaneous xenograft. *J Pathol.* 2003;199(2):221-8.
- Sitorus M. Imunoekspressi KI-67 pada tumor payudara tikus wistar yang diinokulasi tumor terinduksi tenzo(a) pyrene dan diberikan ekstrak daun sirsak. Medan Universitas Sumatera Utara; 2012.
- Sugito H. Kanker di Indonesia Tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan ahli Patologi Indonesia. Jakarta: Dirjen YanMed Dep.Kes RI; 1994. p 3-6.
- Tamaki T, Naomoto Y, Kimura S, Kawshima R, Shirakawa Y, et al. Apoptosis in normal tissue induced by anti-cancer drugs. *J Int Med Res.* 2003;31:6-16.
- Wuart C. Goniotalamus Species: A source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections. *eCAM.* 2007;4(3): 299-311.
- Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Yeh YT, et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenins, arrest cancer cell at the G1 phase and causes cytotoxicity in a bax-and caspase 3 related pathway. *Life Sci .* 2003; 72 : 2853-61.