

Sitotoksisitas Infusa Daun Srikaya (*Annona squamosa*) Terhadap HeLa Cell Lines

(Cytotoxic Assay of *Annona squamosa* Infusion on HeLa Cell Lines)

Amaq Fadholly*

Divisi Farmakologi dan Toksikologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima: 27/08/2024, Disetujui: 14/09/2024, Terbit Online: 30/09/2024

*Penulis untuk korespondensi: amaqfadholly@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Tanaman srikaya merupakan tanaman obat penting yang digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Berbagai bagian dari tanaman srikaya memiliki berbagai efek terapeutik, termasuk daunnya sebagai antikanker secara in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan nilai IC_{50} infusa dari daun srikaya terhadap HeLa cell line. Uji MTT digunakan dengan memberikan lima konsentrasi, yaitu 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, dan 400 $\mu\text{g/ml}$ terhadap HeLa cell lines yang diinkubasi selama 24 jam. Hasil persentase penghambatan pertumbuhan HeLa cell lines menggunakan infusa daun srikaya masing-masing sebesar 12,12%, 23,77%, 32,61% dan 44,92% dengan nilai IC_{50} sebesar 1,256 $\mu\text{g/mL}$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah infusa daun *Annona squamosa* tidak bersifat toksik terhadap HeLa cell lines. Penggunaan infusa daun *Annona squamosa* perlu dikembangkan lebih lanjut dengan bentuk yang berbeda dan diberikan pada sel yang berbeda agar dapat mengetahui potensi sediaan ini dengan lebih spesifik.

Kata kunci: *Annona squamosa*, cytotoxic, HeLa cell lines, MTT

ABSTRACT

Annona squamosa L. is an important medicinal plant used in traditional medicine for the treatment of various diseases. Different parts of *Annona squamosa* L. have various therapeutic effects, including its leaves as anticancer in in vitro method. This study aims to determine the IC_{50} value of *Annona squamosa* infusion on HeLa cell lines. The MTT assay evaluations used five concentrations, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, and 400 $\mu\text{g/ml}$ to HeLa cell lines, then incubated for 24 hours. The results of the percentage of inhibition of HeLa cell line growth using *Annona squamosa* leaf infusion were respectively 12,12%, 23,77%, 32,61% and 44,92% with an IC_{50} value of 1.256 $\mu\text{g/mL}$. The conclusion of this study is that *Annona squamosa* leaf infusion is not toxic to HeLa cell lines. The use of *Annona squamosa* leaf infusion needs to be further developed in different forms and administered to different cells in order to determine the potential of this preparation more specifically.

Keywords: *Annona squamosa*, cytotoxic, HeLa cell lines, MTT

1. Pendahuluan

Kanker adalah istilah umum untuk sekelompok besar penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel abnormal di luar batas normalnya yang menyerang bagian tubuh yang berdekatan dan/atau menyebar ke organ lain. Sebagian besar pertumbuhan abnormal ini tidak dapat dipulihkan dan menyebabkan banyak perubahan yang dapat mengganggu sistem tubuh. Kanker juga dapat digambarkan sebagai tumor ganas atau neoplasma, sedangkan proses sel normal berubah menjadi sel kanker disebut karsinogenesis. Penyakit ini dapat memengaruhi hampir semua bagian tubuh dan memiliki banyak anatomi dan subtipe molekuler yang masing-masing memerlukan strategi manajemen khusus untuk menghindari atau menghambatnya^[1]. Ada lebih dari 200 jenis kanker yang terdeteksi, tetapi kanker yang paling umum diderita pria di dunia adalah kanker paru-paru, prostat, kolorektal, lambung, dan hati. Sementara kanker payudara, leher rahim, kolorektal, paru-paru, dan perut merupakan kanker yang paling sering didiagnosis pada wanita^[2].

Kanker leher rahim atau biasa dikenal dengan kanker serviks merupakan salah satu kanker yang paling banyak dialami oleh wanita yang disebabkan oleh Human Papilloma Virus (HPV)^[3]. Saat ini, penyakit ini telah menjadi salah satu ancaman paling serius bagi kehidupan wanita di seluruh dunia. Meskipun jumlah kasus kanker serviks menunjukkan penurunan di sebagian besar wilayah maju selama tiga dekade terakhir, namun terus meningkat atau tetap tidak berubah di hampir semua negara berkembang termasuk di Asia Pasifik^[4].

Pengobatan kasus kanker, termasuk kanker serviks dapat menggunakan obat kimia dan obat herbal. Obat herbal berbeda dari obat yang didefinisikan secara klinis dalam karakternya serta nilai pengobatannya. Biasanya, obat herbal merupakan formulasi multi obat yang mencakup produk hewani dan mineral sebagai komponen penting atau aditif. Obat herbal sebagian besar mencakup dosis dan rangkaian pengobatan yang ditentukan secara empiris namun perlu dievaluasi kembali dalam segi kualitas, keamanan dan kemanjurannya^[5]. Salah satu tanaman herbal yang berpotensi adalah srikaya (*Annona squamosa*). Srikaya merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk dijadikan sebagai sumber pengobatan. Daun srikaya merupakan salah satu bagian dari tanaman srikaya yang diduga memiliki

aktivitas antikanker. Berdasarkan data empiris, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, anti radang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor^[6].

Hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa, srikaya (*Annona squamosa* L.) mempunyai kandungan senyawa asetogenin (squamostatins A, B, C, dan D) serta *annotemoyin-1* dan *-2*, dan glukopiranosid kolesteril yang memiliki efek sitotoksik dan antitumor secara *in vivo*. Senyawa asetogenin yang berasal dari tanaman golongan Annonaceae memperlihatkan aktivitas antitumor 40- 300 kali lebih kuat dibandingkan dengan takso^{[7][8]}. Ekstrak kloroform daun srikaya juga dilaporkan menunjukkan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* sebesar 98% dengan nilai LC50 1,77 µg/mL. Ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun srikaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC50 masing-masing sebesar 7,6948 µg/mL dan 4,5467 µg/mL^{[9][10]}. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dalam rangka eksplorasi bentuk sediaan daun srikaya, penelitian dilakukan untuk mengetahui potensi infusa daun srikaya terhadap penghambatan pertumbuhan HeLa cell line yang biasa digunakan sebagai perwakilan dari sel kanker serviks.

2. Materi dan Metode

2.1. Pernyataan Etik

Seluruh perlakuan dan prosedur dalam penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Indonesia (No: KE/FK/0106/EC/2018).

2.2. Persiapan Infusa *Annona squamosa*

Daun *Annona squamosa* didapatkan dari Kabupaten Lumajang, Jawa Timur, Indonesia. Daun srikaya yang berwarna hijau dan tidak rusak kemudian disortasi basah untuk memisahkan bagian tanaman obat yang telah dipanen dari bahan asing atau pengotor lain lalu dicuci bersih, dipotong-potong ditimbang 10 gram dimasukkan ke dalam panci infusa lalu tambahkan 100 ml aquadest, dan dipanaskan selama 15 menit, terhitung mulai suhu 90°C, sambil sesekali diaduk. Hasil Infusa yang sudah disaring kain flanel ditambahkan aquades sampai 100 ml.

2.3. Kultur HeLa cell lines

HeLa cell lines didapatkan dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Indonesia. Sel dikultur dalam media DMEM dan ditambah dengan FBS 10% (v/v), streptomisin-penisilin 3% dan *fungizone* 1%, dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°. Sel dikultur dalam *flask* ukuran 25 cm² dengan media sebanyak 7 ml dan dipanen menggunakan 0,25 *trypsine*-EDTA setelah kepadatan sel mencapai 80%.

2.4. Penghitungan Nilai IC₅₀

Larutan Uji dibuat dengan melarutkan 10 mg infusa daun *Annona squamosa* dalam 100 µl DMSO. Dari larutan stok dibuat seri konsentrasi 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, dan 400 µg/mL dalam media kultur DMEM untuk uji sitotoksik yang dilakukan secara triplo dengan menggunakan sediaan cisplatin sebagai kontrol positif. Nilai IC₅₀ infusa daun *Annona squamosa* terhadap HeLa cell lines ditentukan oleh hasil MTT. Sel dikultur dalam pelat 96 sumuran dengan kepadatan 1x10⁴ sel/sumuran dengan volum 100 µL dan diinkubasi pada suhu 37°, 5% CO₂ semalaman. Sel ditambahkan dengan berbagai konsentrasi selama 24 jam, kemudian media yang lama digantikan dengan 100 µL DMEM dan 10 µL MTT (5 mg MTT/ mL) ke setiap sumuran dan inkubasi selama 4 jam. Perlakuan kontrol sel hanya dengan media tanpa diberikan perlakuan. Kristal formazan yang terbentuk pada sel hidup dilarutkan dengan 100 µL SDS stopper HCL 0,1 N dan diukur menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) reader (Bio Rad, USA) dengan absorbansi 595 nm.

2.5. Analisis data

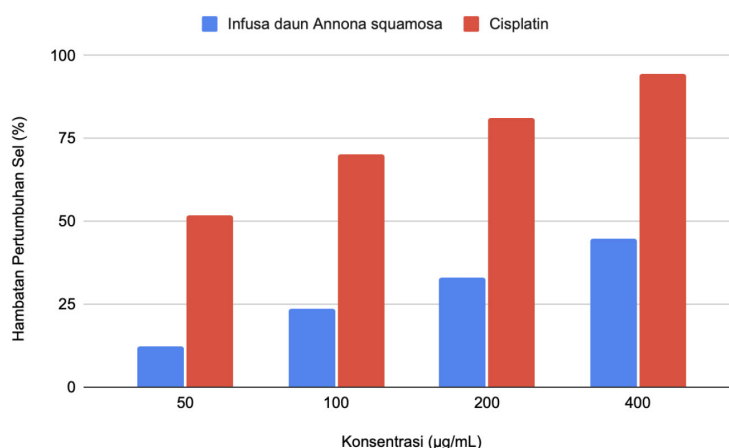
Perbedaan nilai absorbansi dan IC₅₀ pada kelompok perlakuan dan kontrol dihitung menggunakan analisis regresi linier menggunakan *Microsoft Excel* 2020 (Microsoft Inc., USA).

3. Hasil

Hasil dari uji sitotoksitas infusa daun *Annona squamosa* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi infusa daun *Annona squamosa* yang diberikan maka semakin rendah jumlah sel hidup dari HeLa cell lines. Penghambatan pertumbuhan HeLa cell lines tertinggi yang diberikan infusa daun *Annona squamosa* didapatkan dari konsentrasi 400 µg/mL dengan nilai hambatan sebesar 44,92 % dan nilai terendah didapatkan dari konsentrasi 50 µg/mL dengan nilai hambatan sebesar 12,12%. Hasil nilai penghambatan dari konsentrasi 100 dan 200 µg/mL secara berturut-turut didapatkan nilai hambatan sebesar 23,77% dan 32,92% sehingga nilai IC₅₀ infusa daun *Annona squamosa* terhadap HeLa cell lines yang didapatkan adalah sebesar 1,256 µg/mL. Berdasarkan nilai penghambatan, infusa daun *Annona squamosa* belum mencapai penghambatan pertumbuhan HeLa cell line lebih dari sama dengan 50%. Hasil ini berbanding terbalik dengan hasil pengamatan pertumbuhan HeLa cell lines yang diberikan sediaan cisplatin sebagai kontrol positif. Besaran hambatan yang didapatkan pada konsentrasi yang sama secara berurutan dari rendah ke tinggi adalah 51,66%, 70,15 %, 81,05% dan 94,42% dengan nilai IC₅₀ sebesar 27,17 µg/mL. Data dari rerata besaran penghambatan pertumbuhan HeLa cell lines dapat dilihat pada **Tabel 1** dan **Gambar 1**.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ dari ekstrak *Capsicum annuum* dan cisplatin pada HeLa cell lines.

Amaq	Konsentrasi (µg/mL)	Penghambatan Pertumbuhan Sel (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Infusa daun <i>Annona squamosa</i>	50	12,12	1,256
	100	23,77	
	200	32,92	
	400	44,92	
Cisplatin	50	51,66	27,17
	100	70,15	
	200	81,05	
	400	94,42	



Gambar 1. Grafik besaran hambatan pertumbuhan HeLa cell lines yang diberi perlakuan dengan menggunakan infusa daun *Annona squamosa* dan cisplatin sebagai kontrol positif.

4. Pembahasan

Tanaman srikaya sudah dipakai sejak lama sebagai obat alam untuk mengobati berbagai penyakit. Daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) di Cina digunakan untuk pengobatan nyeri dan bengkak. Biji buah dan daunnya di India digunakan sebagai obat untuk menggugurkan kandungan atau abortifasien, insektisida, dan racun ikan, sedangkan akarnya efektif sebagai pencahar atau purgative dan obat disentri^[11]. Ekstrak etanol buah srikaya menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri gram positif seperti *S. aureus* dan *S. Pneumoniae*^[12]. Tanaman ini dilaporkan mengandung banyak kandungan senyawa kimia seperti glikosida, alkaloids, saponin, flavonoid, tannin, karbohidrat, protein, senyawa fenol, phytosterol, dan asam amino. Asetogenin yang juga merupakan senyawa alami dapat diisolasi dari tanaman srikaya dan menunjukkan berbagai aktivitas biologi seperti sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan aktivitas immunosupresif. Bagian daun dari tanaman ini mengandung 4-(2-nitro-ethyl 1)-1-6-((6- β -D-xylopyranosyl- β -D glucopyranosyl)-oxy) benzene, Anonaine, Benzyltetrahydroisoquinolone, dan lain-lain^[13].

Pada penelitian ini, infusa daun *Annona squamosa* dapat menghambat pertumbuhan HeLa cell lines dengan peningkatan besaran hambatan sesuai dengan tambahan besaran konsentrasi yang diberikan, namun belum sampai pada batas minimum 50% hambatan. Sesuai dengan penggolongan kategori senyawa toksik pada penelitian toksisitas bahan alam, ada empat kategori, yang pertama adalah kategori sangat toksik apabila nilai $IC_{50} \leq 20$ µg/mL, kategori cukup toksik apabila

nilai IC_{50} 21–200 µg/mL, kategori toksik lemah apabila nilai IC_{50} 201–500 µg/mL, dan kategori tidak toksik apabila nilai $IC_{50} \geq 500$ µg/mL^[14]. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 1,256 µg/mL, maka infusa daun *Annona squamosa* masuk dalam kategori tidak toksik atau kurang potensial dalam menghambat dan membunuh HeLa cell lines. Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan hasil yang tidak toksik seperti pemberian ekstrak daun cabe keriting pada HeLa cell lines dan ekstrak *Allium cepa* pada WiDr cell lines^{[15][16]}.

Berdasarkan hasil penelitian pada **Tabel 1** dan **Gambar 1**, aktivitas penghambatan pertumbuhan HeLa cell lines dikaitkan dengan kandungan senyawa metabolit yang ada di dalam daun *Annona squamosa*. Kandungan alkaloid di dalamnya dapat memodulasi jalur pensinyalan yang terlibat dalam proliferasi, siklus sel, dan metastasis. Senyawa ini bekerja dengan cara menyebabkan kerusakan DNA, menginduksi apoptosis, dan bertindak sebagai agen anti-proliferatif. Alkaloid mampu meningkatkan apoptosis dengan cara menginduksi kerusakan DNA^[15]. Senyawa alkaloid memberikan efek penghambatan proliferasi dengan cara penghambatan proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Proses tersebut diperantarai oleh terjadinya penurunan enzim lipoksigenase, siklooksigenase dan xantin oksidase yang dibutuhkan dalam proses pre oksidasi sehingga dapat mempengaruhi siklus sel^[16]. Aktivitas steroid juga bersifat sitotoksik pada sel, termasuk sel HeLa. Selain itu steroid memiliki efek anti tumor pada berbagai macam sel kanker dengan menargetkan fase siklus sel G1/S. Fase G1 merupakan fase yang penting dalam mempengaruhi siklus sel. Jika sel pada fase G1 memutuskan untuk

melanjutkan siklus sel, sel akan memasuki tahap selanjutnya yaitu fase S. Oleh karena itu, untuk menghambat proliferasi sel kanker, senyawa steroid menghambat perkembangan sel pada tahap G1^[17]. Flavonoid yang terkandung di dalam daun *Annona squamosa* juga termasuk ke dalam senyawa polifenol, metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antikanker. Flavonoid mengandung kuersetin yang berasal dari subkelas flavonol. Kuersetin, genistein atau flavopiridol dapat dijadikan sebagai bahan untuk obat kanker. Flavonoid memberikan stimulasi pada aktivitas enzim sehingga terjadi proses penginduksian apoptosis, menghambat siklus hidup sel, mengatur fungsi imun tubuh dan menghambat terbentuknya inflamasi, angiogenesis sel kanker dan, anti proliferasi^{[18][19]}.

5. Simpulan

Infusa daun *Annona squamosa* dapat menghambat pertumbuhan HeLa cell line pada konsentrasi tertinggi 400 µg/mL sebesar 44,92% dengan nilai IC₅₀ sebesar 1,256 µg/mL. Berdasarkan nilai penghambatan, infusa daun *Annona squamosa* belum mencapai penghambatan pertumbuhan HeLa cell line lebih dari sama dengan 50% sehingga pemberian infusa daun *Annona squamosa* dalam penelitian ini belum terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan HeLa cell lines. Penggunaan infusa daun *Annona squamosa* perlu dikembangkan lebih lanjut dengan bentuk yang berbeda dan diberikan pada sel yang berbeda agar dapat mengetahui potensi sediaan ini dengan lebih spesifik.

Daftar Rujukan

- [1] Pincigher, L., Valenti, F., Bergamini, C., Prata, C., Fato, R., Amorati, R., Jin, Z., Farruggia, G., Fiorentini, D., Calonghi, N. et al. 2023. Myrcene: a natural compound showing anticancer activity in HeLa cells. *Molecules*, 28(18), 6728.
- [2] Brill, E.N., Link, N.G., Jackson, M.R., Alvi, A.F., Moehlenkamp, J.N., Beard, M.B., Simons, A.R., Carson, L.C., Li, R., Judd, B.T. et al. 2024. Evaluation of the therapeutic potential of traditionally-used natural plant extracts to inhibit proliferation of a HeLa cell cancer line and replication of human respiratory syncytial virus (hRSV). *Biology*, 13(9), 696.
- [3] Okunade, K.S. 2020. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.*, 40(5): 602–608.
- [4] Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., & Qiao, Y. 2020. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res.*, 32(6): 720–728.
- [5] Vasques, A.C., Sr, Cavaco, P., Duarte, T., Duarte Branco, V., Miranda Baleiras, M., Pinto, M., Ferreira, F., Falcão, M.F., Dias Domingues, T., & Martins A. 2024. The use of herbal medicines among cancer patients. *Cureus.*, 16(2): e53455.
- [6] Shehata, M.G., Abu-Serie, M.M., Abd El-Aziz, N.M., & El-Sohaimy, S.A. 2021 Nutritional, phytochemical, and in vitro anticancer potential of sugar apple (*Annona squamosa*) fruits. *Sci Rep.* 2021 Mar 18;11(1): 6224.
- [7] Johns, T., Windust, A., Jurgens, T., & Mansor, S.M. 2011. Antimalarial alkaloids isolated from *Annona squamosa*. *Phytopharmacol.*, 1: 49–53.
- [8] Manvi, F.V., Nanjawade, B.K., & Shing, S. 2011. Pharmacological screening of combined extract of *Annona squamosa* and *Nigella sativa*. *Int. J. Pharm. Bio Sci.*, 2: 520–529.
- [9] Kumar, M., Changan, S., Tomar, M., Prajapati, U., Saurabh, V., Hasan, M., Sasi, M., Maheshwari, C., Singh, S., Dhupal, S., Radha, Thakur, M., Punia, S., Satankar, V., Amarowicz, R., & Mekhemar, M. 2021. Custard Apple (*Annona squamosa* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Biological Activities. *Biomolecules*, 11(5): 614.
- [10] Vikas, B., Akhil, B.S., Remani, P. & Sujathan, K. 2017. Free Radical Scavenging Properties of *Annona squamosa*. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 18(10): 2725–2731.
- [11] Al Kazman, B.S.M., Harnett, J.E., & Hanrahan, J.R. 2022. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of Annonaceae. *Molecules*, 27(11):3462.
- [12] Harahap, D., Niaci, S., Mardina, V., Zaura, B., Qanita, I., Purnama, A., Puspita, K., Rizki, D.R., & Iqhrammullah, M. 2022. Antibacterial activities of seven ethnomedicinal plants from family *Annonaceae*. *J Adv Pharm Technol Res.*, 13(3): 148–153.
- [13] Ma. C., Chen, Y., Chen, J., Li, X., & Chen, Y. 2017. A review on *Annona squamosa* L.: phytochemicals and biological activities. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45(5), 933–964.
- [14] Abdel-Hameed, E.S., Salih, A., Bazaid, S.A., Shohayeb, M.M., El-Sayed, M.M., & El-Wakil, E.A. 2012. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *Eur J Med Plants.*, 2, 93–112.
- [15] Fadholly, A. 2024. Sitotoksitas ekstrak cabe merah keriting (*Capsicum annum*) terhadap hela cell lines. *Jurnal Veteriner dan Biomedis*, 2(1), 56–60.
- [16] Fadholly, A., Ansori, A.N.M., Jayanti, S., Proboningrat, A., Kusala, M.K.J., Putri, N., Rantam, F.A., & Sudjarwo, S.A. 2019. Cytotoxic of *Allium cepa* L. on human colon cancer (WiDr) cells: in vitro study. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(7): 3483–3486.

- [17] **Al Amin, M., Emran, T.B., Khan, J., Zehravi, M., Sharma, I., Patil, A., Gupta, J.K., Jeslin, D., Krishnan, K., Das, R., Nainu, F., Ahmad, I., & Wilairatana, P.** 2023. Research Progress of Indole Alkaloids: Targeting MAP Kinase Signaling Pathways in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*, 15(22), 5311.
- [18] **Isah T.** 2016. Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. *Pharmacogn Rev.*, 10(20), 90–99.
- [19] **Seca, A.M.L., & Pinto, D.C.G.A.** 2018. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int J Mol Sci.*, 19(1), 263.
- [20] **Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J.** 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 12(2), 457.
- [21] **Fadholly, A., Sudjarwo, S.A., Rantam, F.A., Mustika, A.A., Andriyanto., Pristihadi, D.N., & Sutardi, L.N.** 2023. Uji toksisitas cabai merah keriting (*Capsicum annuum*) pada sel WiDr secara in vitro. *Current Biomedicine*, 1(2): 70–75.