



Eksplorasi Senyawa dan Efek Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap Viabilitas dan Ekspresi Gen BCL2 pada Sel HeLa

Jasmin Ayla Fitri Daulay¹, Hanifa Tasya Kamila², Rahma Yulia³, Nadila Ananda Putri⁴

¹⁻⁴Program Studi S1 Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Indonesia

Email: jasminayla18@gmail.com¹, hanifakamila03@gmail.com², rahmayulia080703@gmail.com³,
putrianandanadila04@gmail.com⁴

*Penulis korespondensi: jasminayla18@gmail.com

Abstrak. Human Papillomavirus (HPV) infection is typically the cause of cervical cancer, one of the cancers with a high death rate among women. Despite their widespread use, conventional therapeutic approaches still have drawbacks, such as the emergence of cancer cell resistance and severe side effects. Natural compounds are now used as safer alternative treatments as a result. Soursop leaves (*Annona muricata L.*) are one plant that has been shown to have anticancer potential. Through phytochemical screening, compound identification using GC-MS, cell viability testing using the MTT Assay, and BCL2 gene expression analysis using qPCR, this study attempts to examine the potential of soursop leaf extract as an anticancer agent against cervical cancer cells (HeLa cells). The results of the phytochemical examination showed that steroids, phenolics, and alkaloids were present. Ostole, bisacumol, and ricinoleic acid were found to be the predominant components when the active chemicals were identified by GC-MS. With an IC₅₀ value of 5.01 µg/mL, the MTT experiment demonstrated that soursop leaf extract could decrease cell viability as the concentration rose. Furthermore, BCL2 gene expression was significantly reduced, especially in treatments with doses of 500 and 1000 µg/mL, according to the results of qPCR gene expression analysis. The overall findings suggest that soursop leaf extract may be used as a natural anticancer treatment against HeLa cells by lowering the expression of the BCL2 gene.

Kata Kunci: *Annona muricata L.*; BCL2; MTT Assay; qPCR; Sel HeLa.

Abstrak. Salah satu jenis kanker yang paling umum terjadi pada wanita adalah kanker serviks, yang umumnya disebabkan oleh infeksi Human Papillomavirus (HPV). Pengobatan konvensional sudah lama digunakan, tetapi memiliki efek samping dan resistensi sel kanker. Hal ini mendorong penggunaan bahan alam sebagai pengobatan alternatif yang lebih aman. Daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah salah satu tanaman yang diketahui memiliki sifat antikanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kemungkinan ekstrak daun sirsak berfungsi sebagai agen antikanker terhadap sel kanker serviks (sel HeLa). Ini akan melakukannya melalui skrining fitokimia, identifikasi senyawa dengan GC-MS, uji viabilitas sel dengan metode MTT Assay, dan analisis ekspresi gen BCL2 dengan qPCR. Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa ada senyawa alkaloid, fenolik, dan steroid. Identifikasi senyawa aktif dengan GC-MS menunjukkan bahwa ada Dengan nilai IC₅₀ sebesar 5,01 g/mL, assay MTT menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mampu mengurangi viabilitas sel seiring peningkatan konsentrasi. Selain itu, hasil analisis ekspresi gen dengan qPCR menunjukkan penurunan signifikan pada ekspresi gen BCL2, terutama pada konsentrasi 500 dan 1000 g/mL. Berdasarkan hasil ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki potensi sebagai agen antikanker alami terhadap sel HeLa me

Keywords: *Annona muricata L.*; BCL2; Metode MTT; Sel HeLa; qPCR.

1. LATAR BELAKANG

Salah satu keganasan yang terus memengaruhi kesehatan perempuan secara global dan nasional adalah kanker serviks. Selain meningkatkan angka kesakitan, penyakit ini juga menyebabkan peningkatan angka kematian pada perempuan, terutama di negara berkembang yang masih menghadapi keterbatasan dalam deteksi dini, akses layanan kesehatan, dan keberlanjutan terapi. Kematian akibat kanker serviks mencapai 348.874 kasus di seluruh dunia, atau 8,1% dari total kematian akibat kanker pada perempuan. Di Indonesia, kematian akibat kanker serviks dilaporkan mencapai 20.708 kasus, atau 18,1% dari total kematian akibat kanker pada perempuan (Bray et al., 2024). Kondisi ini menunjukkan

bahwa kanker serviks bukan hanya masalah klinis, tetapi juga masalah kesehatan masyarakat yang membutuhkan metode pencegahan, deteksi dini, dan pengobatan yang lebih baik.

Infeksi persisten Human Papillomavirus (HPV), terutama tipe risiko tinggi HPV 16 dan 18, terkait secara biologis dengan kanker serviks. Melalui aktivitas onkoprotein E6 dan E7, infeksi HPV dapat mengubah regulasi sel epitel serviks. Onkoprotein E6 berperan dalam mengganggu fungsi p53, sedangkan E7 mengganggu protein pengendali siklus sel. Akibatnya, mekanisme perbaikan DNA, kontrol proliferasi, dan apoptosis menjadi tidak efektif (Okunade, 2020; Oyouni, 2023; Zhang et al., 2020). Jika mekanisme tersebut terganggu, sel abnormal dapat tetap hidup, membelah, dan mengalami perubahan genetik yang mengarah pada perkembangan keganasan.

Untuk pengobatan kanker serviks, metode konvensional seperti pembedahan, radioterapi, kemoterapi, dan imunoterapi telah digunakan. Namun, stadium penyakit, respons individu pasien, resistensi sel kanker, dan efek samping yang muncul selama pengobatan dapat memengaruhi efektivitas terapi (Burmeister et al., 2022; Ferrall et al., 2021). Dalam beberapa kasus, terapi yang diberikan juga dapat memengaruhi kualitas hidup pasien, sehingga diperlukan metode tambahan yang lebih selektif, aman, dan berpotensi mendukung keberhasilan terapi. Oleh karena itu, senyawa bioaktif yang berasal dari bahan alam semakin banyak dipelajari sebagai alternatif atau sumber potensial dalam pengembangan obat antikanker baru.

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) mengandung metabolit sekunder seperti acetogenin, alkaloid, fenolik, steroid, dan senyawa lain yang berpotensi memiliki efek farmakologis. Karena itu, daun sirsak menjadi salah satu bahan alam yang banyak diteliti dalam pengembangan agen antikanker (Gavamukulya et al., 2017; Ilango et al., 2022). Senyawa-senyawa tersebut diperkirakan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker melalui berbagai mekanisme, seperti mengganggu metabolisme energi sel, menghambat proliferasi, dan menginduksi apoptosis. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker, termasuk sel kanker serviks. (Qorina et al., 2020) menemukan nilai IC_{50} ekstrak daun sirsak sebesar 5,91 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel HeLa, sedangkan (Putri et al., 2022) melaporkan bahwa ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan apoptosis sel HeLa. Temuan tersebut juga didukung oleh (Rachmawati et al., 2012), yang menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun sirsak berpengaruh terhadap proliferasi dan apoptosis sel HeLa. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daun sirsak layak dikaji lebih lanjut sebagai kandidat agen antikanker alami.

Apoptosis merupakan jalur penting dalam kematian sel kanker. Ketika gen antiapoptosis seperti BCL2 diekspresikan secara berlebihan, proses kematian sel dapat terhambat. Protein Bcl-2 berperan dalam menjaga kelangsungan hidup sel kanker dengan menghambat permeabilitas membran mitokondria dan mencegah aktivasi kaskade caspase (Alam et al., 2021; Kaloni et al., 2023; Qian et al., 2022). Ekspresi BCL2 yang tinggi dapat meningkatkan resistensi sel kanker terhadap terapi dan tekanan biologis. Oleh karena itu, penurunan ekspresi BCL2 dapat menjadi indikator awal bahwa bahan uji memiliki potensi untuk memicu apoptosis dan menghambat kelangsungan hidup sel kanker. Dengan

demikian, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kandungan senyawa dalam ekstrak daun sirsak serta menganalisis pengaruhnya terhadap viabilitas sel HeLa dan ekspresi gen BCL2.

2. KAJIAN TEORITIS

Kanker Serviks dan Sel HeLa

Karena berasal dari sel kanker serviks manusia dan memiliki pertumbuhan yang stabil, sel HeLa adalah model *in vitro* yang banyak digunakan dalam penelitian kanker serviks. Model ini dapat digunakan untuk menilai aktivitas sitotoksik, antiproliferatif, dan mekanisme molekuler potensial agen antikanker yang mencakup ekstrak tanaman. Infeksi HPV persisten, terutama tipe 16 dan 18, terkait erat dengan kanker serviks. Onkoprotein E6 dan E7 dari HPV memiliki kemampuan untuk mengganggu fungsi p53 dan protein pengatur siklus sel. Akibatnya, proses perbaikan DNA, kontrol proliferasi, dan kontrol apoptosis menjadi tidak efisien. Dalam keadaan seperti ini, sel yang tidak biasa dapat berkembang menjadi ganas (Okunade, 2020; Oyouni, 2023; Zhang et al., 2020).

Potensi Daun Sirsak sebagai Agen Antikanker

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak diteliti karena mengandung berbagai metabolit sekunder yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis, seperti acetogenin, alkaloid, fenolik, steroid, dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut diketahui berkaitan dengan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antiproliferatif, dan antikanker (Gavamukulya et al., 2017; Ilango et al., 2022). Acetogenin dilaporkan mampu menghambat kompleks I pada rantai transpor elektron mitokondria, sehingga produksi ATP pada sel kanker menurun dan sel menjadi lebih rentan mengalami kematian (Hadisaputri et al., 2021). Selain itu, senyawa fenolik juga berperan dalam pengaturan jalur apoptosis, salah satunya melalui penurunan ekspresi protein antiapoptosis seperti Bcl-2 (Teniente et al., 2023). Dengan demikian, kandungan fitokimia dalam daun sirsak mendukung potensinya sebagai kandidat agen antikanker alami.

Skrining Fitokimia dan Analisis GC-MS

Skrining fitokimia merupakan tahap awal yang dilakukan untuk mengidentifikasi golongan metabolit sekunder dalam ekstrak bahan alam. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mengandung alkaloid, fenolik, dan steroid, yang mengindikasikan adanya senyawa bioaktif dengan potensi aktivitas antikanker. Identifikasi lebih lanjut menggunakan GC-MS dilakukan untuk mengetahui senyawa dominan dalam ekstrak etanol daun sirsak berdasarkan waktu retensi dan spektrum massa. Hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa dominan yang terdeteksi meliputi osthole, bisacumol, dan ricinoleic acid. Osthole diketahui

memiliki aktivitas antikanker melalui beberapa mekanisme, antara lain menghambat proliferasi dan migrasi sel kanker, serta menginduksi apoptosis melalui peningkatan Bax, penurunan Bcl-2, dan aktivasi caspase-3 serta caspase-9 (Che et al., 2018) .

MTT Assay sebagai Uji Viabilitas Sel

MTT Assay merupakan metode kolorimetri yang digunakan untuk menilai viabilitas sel berdasarkan aktivitas metabolik mitokondria. Metode ini pertama kali dikembangkan sebagai uji cepat untuk mengukur pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel melalui pendekatan kolorimetri (Mosmann, 1983). Prinsip metode ini didasarkan pada kemampuan sel hidup dalam mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan berwarna ungu. Semakin banyak jumlah sel hidup, semakin tinggi kristal formazan yang terbentuk, sehingga nilai absorbansi yang terbaca juga semakin besar. Namun, hasil MTT Assay perlu dipahami sebagai indikator aktivitas metabolik sel, sehingga interpretasi viabilitas dan sitotoksitas perlu dilakukan secara hati-hati (Ghasemi et al., 2021). Dalam penelitian antikanker, MTT Assay digunakan untuk mengetahui kemampuan ekstrak atau senyawa dalam menurunkan viabilitas sel kanker, sekaligus menentukan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% viabilitas sel. Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan bahwa suatu bahan mampu memberikan efek penghambatan pada konsentrasi yang lebih kecil, sehingga aktivitas sitotoksiknya cenderung lebih kuat (Berrouet et al., 2020). Dengan demikian, pengujian MTT Assay pada sel HeLa dapat memberikan gambaran awal mengenai potensi ekstrak daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks.

Apoptosis dan Peran Gen BCL2

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel terprogram yang berfungsi untuk menghilangkan sel rusak atau abnormal. Pada sel kanker, proses apoptosis sering mengalami gangguan sehingga sel yang seharusnya mati tetap bertahan dan terus berproliferasi. Salah satu regulator penting dalam proses apoptosis adalah gen BCL2, yang mengkode protein Bcl-2 sebagai protein antiapoptosis (Kaloni et al., 2023). Ekspresi BCL2 yang berlebihan dapat menghambat kematian sel, meningkatkan kelangsungan hidup sel kanker, serta berkontribusi terhadap resistensi terapi (Alam et al., 2021; Qian et al., 2022). Sebaliknya, penurunan ekspresi BCL2 dapat menggeser keseimbangan ke arah aktivasi protein proapoptosis, seperti Bax dan Bak, sehingga memicu pelepasan sitokrom c serta aktivasi caspase-9 dan caspase-3. Oleh karena itu, analisis ekspresi BCL2 melalui qPCR penting dilakukan untuk menilai apakah ekstrak daun sirsak berpotensi memengaruhi jalur apoptosis pada sel HeLa.

Kerangka Teoritis Penelitian

Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram yang berperan penting dalam menjaga keseimbangan jumlah sel serta menghilangkan sel yang mengalami kerusakan atau kelainan. Dalam kondisi normal, apoptosis membantu mencegah pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Namun, pada sel kanker, mekanisme apoptosis sering mengalami gangguan sehingga sel abnormal tetap dapat bertahan hidup, membelah, dan berproliferasi secara terus-menerus. Salah satu regulator penting dalam jalur apoptosis adalah protein Bcl-2 yang dikodekan oleh gen *BCL2*. Protein ini berperan sebagai faktor antiapoptosis karena mampu menghambat proses kematian sel. Ekspresi *BCL2* yang berlebihan dapat menyebabkan sel kanker lebih sulit mengalami apoptosis, meningkatkan kelangsungan hidup sel, serta berkontribusi terhadap resistensi terhadap terapi antikanker (Kaloni et al., 2023).

Sebaliknya, aktivasi protein proapoptosis seperti Bax dan Bak dapat memicu perubahan permeabilitas membran mitokondria sehingga mendorong terjadinya apoptosis. Penurunan ekspresi *BCL2* menjadi salah satu indikator penting bahwa suatu senyawa berpotensi mengaktifkan kembali jalur apoptosis pada sel kanker. Oleh karena itu, analisis ekspresi gen *BCL2* menggunakan metode qPCR penting dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) mampu memengaruhi jalur apoptosis pada sel HeLa. Pengujian ini dapat memberikan gambaran mengenai mekanisme molekuler ekstrak dalam menekan pertumbuhan sel kanker serviks.

Dengan demikian, kajian teori ini mendukung dugaan bahwa ekstrak daun sirsak berpotensi sebagai calon agen antikanker alami. Potensi tersebut berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif di dalamnya yang diduga mampu menurunkan viabilitas sel HeLa serta menekan ekspresi gen *BCL2* sebagai gen antiapoptosis. Penurunan ekspresi *BCL2* dapat membuka peluang terjadinya aktivasi apoptosis, sehingga sel kanker menjadi lebih rentan mengalami kematian terprogram. Oleh sebab itu, ekstrak daun sirsak layak diteliti lebih lanjut sebagai bahan alami yang berpotensi mendukung pengembangan terapi antikanker, khususnya pada kanker serviks.

3. METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas di Padang, Sumatera Barat, Indonesia, adalah lokasi penelitian eksperimental in vitro. Untuk penelitian ini, Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas telah memberikan izin dengan nomor referensi 142/UN.16.2/KEP-FK/2025.

Alat dan Bahan

Sampel penelitian ini tumbuh dan berkembang dengan baik menggunakan daun sirsak dan sel HeLa yang tidak terkontaminasi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini termasuk tabung reaksi, pipet tetes, kertas saring, evaporator rotasi, aliran air laminar, mikropipet berbagai ukuran, GC-MS (Thermo ISQ Series), burung merak, botol kultur, vortex, spindown, centrifuge, air mandi, incubator CO₂, mikroskop invert, cyclometer termal, dan alat PCR.

Pembuatan Serbuk Simplisia dan Ekstraksi Daun Sirsak

Untuk sederhana, daun sirsak harus dipilih yang sehat, tidak rusak, dan tidak tercemar. Daun dipotong dan dicuci setelah dicuci dengan air mengalir. Daun dikeringkan secara tidak langsung di bawah sinar matahari selama satu minggu hingga kering. Selanjutnya, daun kering dihaluskan dengan blender dan diayak untuk menghasilkan serbuk simplisia. Untuk melakukan ekstraksi, 100 gram serbuk simplisia dicampur dengan 1000 mililiter etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Sambil sesekali diaduk dan disaring, campuran disimpan selama tiga hingga lima hari pada suhu ruang. Sebuah evaporator rotasi digunakan untuk menguapkan filtrat hingga menghasilkan ekstrak daun sirsak yang kental. Kemudian disimpan dalam wadah tertutup di tempat sejuk untuk menjaga senyawa bioaktif stabil.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengevaluasi kandungan alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid dalam ekstrak daun sirsak. Tujuan dari skrining fitokimia ini adalah untuk menemukan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid dalam ekstrak daun sirsak. Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan 1 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi dan kemudian meneteskan 2 hingga 3 tetes pereaksi Mayer. Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes HCl pekat dan serbuk magnesium, dan uji saponin dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃ 1% ke dalam 1 mL ekstrak. Uji triterpenoid dilakukan dengan mencampurkan ekstrak dengan anhidrida asetat dan beberapa tetes H₂SO₄ pekat; uji steroid juga dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes H₂SO₄ pekat.

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Kolom kapiler TG-1MS dan kumpulan GC-MS Thermo ISQ (ISQ 7000) digunakan untuk mengidentifikasi bahan-bahan yang ada dalam ekstrak daun sirsak. Karena helium berfungsi sebagai gas pengangkut, sebanyak 1 µL sampel diinjeksi ke dalam sistem. Analisis dilakukan dengan pembagian mode dengan rasio 50:1. Suhu awal ditahan selama satu menit pada 50°C. Kemudian naik dengan kecepatan 7 °C/menit hingga 270°C, dan kemudian

ditahan kembali selama satu menit. Analisis ini berlangsung selama 33,429 menit. Pencocokan spektrum massa dengan basis data NIST digunakan untuk mengidentifikasi bahan yang ditemukan.

Kultur Sel

Sel HeLa yang digunakan adalah sel yang dikumpulkan di laboratorium dan disimpan dalam tank nitrogen. Sebelum digunakan, sel dicairkan melalui proses thawing pada suhu 37°C. Setelah itu, pelet sel dimasukkan kembali ke dalam medium kultur baru yang mengandung 10% FBS. Selanjutnya, medium kultur yang mengandung antibiotik penicillin-streptomycin, antifungi, dan DMEM dimasukkan ke dalam flask kultur dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Ini dilakukan untuk mendukung pertumbuhan sel dan mencegah kontaminasi. Pertumbuhan sel dipantau melalui mikroskop, dan medium diganti setiap dua hingga tiga hari. Setelah mencapai konfluensi sekitar 70–80%, sel HeLa digunakan dalam penelitian.

MTT Assay

Sel HeLa dengan konfluensi sekitar 80% dipanen dengan menggunakan tripsin-EDTA dan hemositometer. Setelah itu, ekstrak daun sirsak diberikan kepada sel dalam konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, dan 32,15 g/mL untuk perawatan. Selama 24 jam, sel diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Setelah itu, medium dibuang, sel dicuci dengan PBS, dan larutan MTT ditambahkan. Setelah kristal dilarutkan menggunakan DMSO, absorbansi kristal diukur menggunakan pembaca ELISA dengan panjang gelombang 570 nm. Data absorbansi digunakan untuk menghitung persentase viabilitas sel dan nilai IC₅₀ ekstrak daun sirsak terhadap sel HeLa.

Pengukuran Ekspresi BCL-2

Metode PCR real-time atau qPCR digunakan untuk menguji ekspresi gen BCL2. Ini dimulai dengan mengekstrak ekstrak daun sirsak dari sel HeLa sebelum mengekstrak RNA totalnya. Selanjutnya, berbagai konsentrasi PCR digunakan. Setelah itu, RNA dimurnikan dengan NanoDrop pada rasio 260/280 nm. Setelah sample memenuhi standar kemurnian, kit reverse transcription digunakan untuk melanjutkan ke tahap sintesis cDNA. Dalam reaksi qPCR, gen referensi terdiri dari GAPDH, primer BCL2, dan SYBR Green Master Mix. CDNA yang dihasilkan digunakan sebagai templat. Amplifikasi dilakukan sesuai dengan protokol kit, dan analisis ekspresi gen dilakukan menggunakan metode Cq untuk membandingkan tingkat ekspresi BCL2 antar kelompok perlakuan.

Untuk analisis qPCR, primer yang digunakan terdiri dari primer maju 5'-TCA CTC AGT GTG TAC AGG G-3' dan primer balik 5'-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3'. Selain itu, primer maju 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' dan primer balik 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'. Reaksi amplifikasi qPCR dilakukan dengan menggunakan alat PCR dalam beberapa tahapan.

Analisis Data

Data dari uji MTT Assay dianalisis untuk menentukan persentase viabilitas sel setelah perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun sirsak. Persentase viabilitas dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Viabilitas Sel} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \dots(i)$$

Ekstrak daun sirsak positif mengandung alkaloid, fenolik, dan steroid yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif. Sementara itu, flavonoid, saponin, dan triterpenoid tidak terdeteksi dalam ekstrak.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mengandung senyawa alkaloid, fenolik, dan steroid. Perubahan warna atau endapan unik pada setiap uji identifikasi menunjukkan keberadaan senyawa tersebut. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kandungan metabolit sekunder yang dapat membantu berbagai fungsi biologis, termasuk sifat antikanker. Dikenal bahwa alkaloid, fenolik, dan steroid memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker, mempengaruhi proses proliferasi, dan berkontribusi pada mekanisme kematian sel. Namun, uji terhadap flavonoid, saponin, dan triterpenoid menunjukkan hasil negatif. Akibatnya, dalam penelitian ini, ketiga senyawa tersebut tidak ditemukan dalam ekstrak daun sirsak.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Daun Sirsak

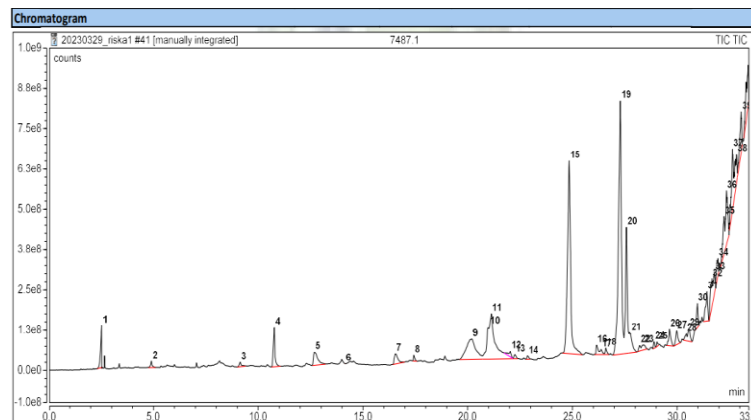
Uji	Pengamatan	Hasil
Alkaloid	Terbentuk endapan putih	Positif
Fenolik	Terbentuk warna biru kehitaman	Positif

Flavonoid	Terbentuk warna jingga	Negatif
Saponin	Terbentuk busa yang tidak hilang	Negatif
Steroid	Terbentuk cincin berwarna hijau	Positif
Triterpenoid	Terbentuk cincin berwarna merah	Negatif

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mengandung senyawa alkaloid, fenolik, dan steroid. Setiap uji memiliki warna atau endapan unik, yang menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kandungan bioaktif yang dapat membantu aktivitas biologis, termasuk berfungsi sebagai antikanker. Pada pengujian, flavonoid, saponin, dan triterpenoid tidak ditemukan karena tidak menunjukkan perubahan endapan, busa, atau warna yang khas.

Analisis GC-M

Sejumlah puncak pada kromatogram yang ditunjukkan oleh analisis GC-MS menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mengandung berbagai senyawa. Perbedaan dalam waktu retensi dan luas area puncak menunjukkan sifat dan kelimpahan relatif senyawa. Senyawa dominan yang dianggap bertanggung jawab atas aktivitas biologis dan dampak sitotoksik ekstrak terhadap sel HeLa diidentifikasi dengan menggunakan hasil pencocokan spektrum massa.



Gambar 1. Hasil Kromatogram GC-MS Ekstrak Etanol Daun Sirsak

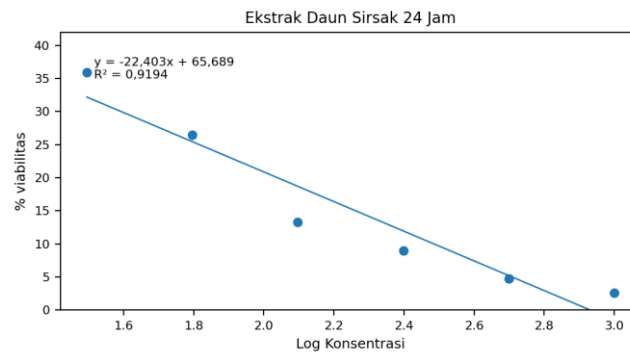
Berdasarkan hasil kromatogram GC-MS, terdeteksi sebanyak 40 puncak yang masing-masing merepresentasikan keberadaan senyawa berbeda dalam ekstrak daun sirsak. Informasi rinci mengenai senyawa-senyawa yang teridentifikasi tersebut disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Senyawa pada Ekstrak Etanol Daun Sirsak

No.	Nama Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas Relatif (%)
1.	Formic acid, 1,1-dimethylethyl ester	2.517	1.25
2.	2-Furanmetanol	4.898	0.28
3.	Isoneral	9.142	0.28

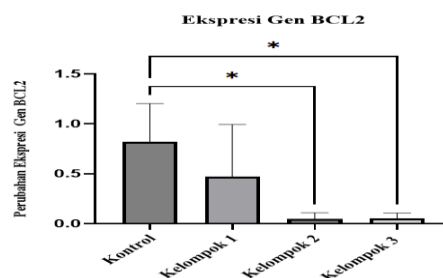
No.	Nama Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas Relatif (%)
4.	Bicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dione, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	10.765	1.80
5.	Dextroamphetamine	12.679	1.69
6.	N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	14.145	0.00
7.	Oxacyclododecan-2-one	16.547	1.06
8.	2-Carene	17.434	0.21
9.	N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	20.189	5.76
10.	Tetradecanoic acid	21.039	2.64
11.	Tetradecanoic acid	21.131	7.31
12.	Tetradecanoic acid	22.039	0.46
13.	Ricinoleic acid	22.247	0.24
14.	Retinal, 9-cis-	22.866	0.18
15.	Osthole	24.852	17.62
16.	Digitoxin	26.158	0.51
17.	Digitoxin	26.376	0.38
18.	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	26.593	0.32
19.	2-Methyl-6-(p-tolyl) hept-2-en-4-ol	27.287	21.65
20.	Ricinoleic acid	27.583	6.68
21.	Digitoxin	27.774	1.81
22.	Ricinoleic acid	28.199	0.30
23.	Digitoxin	28.386	0.55
24.	Digitoxin	28.896	0.23
25.	Digitoxin	29.042	0.17
26.	7-epi-cis-sesquisabinene hydrate	29.637	1.02
27.	aR-Turmerone	29.974	0.87
28.	Digitoxin	30.430	0.36
29.	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	30.569	0.81
30.	Octadecanoic acid	30.971	1.14
31.	Digitoxin	31.426	1.89
32.	Ricinoleic acid	31.661	1.85
33.	Digitoxin	31.780	1.18
34.	Digitoxin	31.950	1.03
35.	Digitoxin	32.246	2.00
36.	Digitoxin	32.355	3.26
37.	Cholest-5-en-3-ol (3 β)-, tetradecanoate	32.647	3.78
38.	Digitoxin	32.841	1.94
39.	Digitoxin	33.056	2.47
40.	Digitoxin	33.396	3.03

Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak mengandung 40 senyawa dengan komposisi yang bervariasi. Tiga senyawa dengan persentase area terbesar adalah osthole pada puncak 15, ricinoleic acid pada puncak 20, dan 2-methyl-6-(p-tolyl) hept-2-en-4-ol atau bisacumol pada puncak 19. Persentase area yang tinggi menunjukkan bahwa ketiga senyawa tersebut memiliki kelimpahan dominan dalam ekstrak. Oleh karena itu, senyawa-senyawa ini diduga berperan penting dalam aktivitas biologis ekstrak daun sirsak, terutama potensi sitotoksik dan antikanker terhadap sel HeLa.



Gambar 3. Grafik Hubungan Persentase Viabilitas Sel dengan Konsentrasi Ekstrak Masa Inkubasi 24 Jam

Dengan mensubstitusikan $y = 50$ pada persamaan $y = -22,403x + 65,689$, nilai IC_{50} ekstrak daun sirsak ditemukan berdasarkan regresi linier. Hasil perhitungan, $x = 0,700$, dikonversi ke antilog, yang menghasilkan nilai IC_{50} sebesar $5,01 \text{ g/mL}$. Penampilan Gen BCL2: Ekspresi gen BCL2 diamati setelah perawatan ekstrak daun sirsak. Data yang awalnya tidak normal dapat dinormalkan setelah transformasi. Selanjutnya, data diuji dengan One-Way ANOVA, yang menunjukkan perbedaan signifikan antara masing-masing kelompok perlakuan. Hasil uji Tukey, yang ditunjukkan pada Gambar 3, menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi BCL2 secara signifikan dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4. Penurunan Ekspresi Gen BCL2 pada Setiap Kelompok Perlakuan (Uji Tukey's Multiple Comparisons)

Nilai IC_{50} ekstrak daun sirsak diperoleh dari persamaan regresi linier $y = -22,403x + 65,689$ dengan mensubstitusikan $y = 50$. Hasil konversi antilog menunjukkan nilai IC_{50} sebesar $5,01 \mu\text{g/mL}$.

Pembahasan

Skринing fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak mengandung alkaloid, fenolik, dan steroid yang berpotensi bertindak sebagai agen antikanker. Menurut analisis GC-MS, ada empat puluh senyawa dalam ekstrak daun sirsak, dengan tiga senyawa dominan: ricinoleic acid, bisacumol, dan osthole. Osthole adalah turunan kumarin yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker, sedangkan alkaloid diketahui

dapat menghambat proliferasi sel kanker. Senyawa fenolik juga melakukan aktivitas antioksidan dan mengontrol apoptosis. Bisacumol dan ricinoleic acid juga terdapat dalam ekstrak, tetapi penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui sifat antikankernya.

Hasil assay MTT menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak dapat mengurangi viabilitas sel HeLa secara konsentrasi-respons; viabilitas terendah ditemukan pada konsentrasi 1000 g/mL, dan nilai IC₅₀ 5,01 g/mL menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel HeLa. Setelah perlakuan, ekspresi gen BCL2 turun. Penurunan ini menunjukkan bahwa ada penghalang terhadap apoptosis yang lebih rendah. Ini memungkinkan pembentukan jalur proapoptotik melalui Bax/Bak, pelepasan sitokrom c, pembentukan apoptosom, dan aktivasi caspase-3. Akibatnya, efek sitotoksik ekstrak daun sirsak dapat menghentikan pertumbuhan sel HeLa.

5. KESIMPULAN DAN SAAN

Menurut hasil skrining fitokimia, analisis GC-MS, uji MTT, dan analisis ekspresi gen BCL2 dengan qPCR, ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki potensi sebagai antikanker, khususnya terhadap kanker serviks (sel HeLa). Senyawa yang ditemukan dalam ekstrak daun sirsak melalui uji fitokimia dan analisis GC-MS juga dikenal memiliki sifat antikanker.

Hasil penelitian ini menuntut penelitian *in silico* tambahan, seperti molecular docking, untuk mengevaluasi cara senyawa dominan GC-MS berinteraksi dengan target protein kanker dan untuk memperoleh pemahaman yang lebih baik tentang bagaimana fungsinya. Studi *in vivo* juga harus dilakukan pada hewan uji yang terkena kanker serviks untuk membuktikan bahwa antikanker ekstrak bekerja lebih baik dalam sistem biologis yang lebih kompleks.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M., Ali, S., Mohammad, T., Hasan, G. M., Yadav, D. K., dan Hassan, Md. I. (2021). B Cell Lymphoma 2: Target Pengobatan Kanker Potensial Jurnal Ilmu Molekul Internasional, Vol. 22(19), 10442. <https://doi.org/10.3390/ijms221910442>.
- Berrouet, C., Dorilas, N., Rejniak, K. A., dan Tuncer, N. (2020). Comparison of Drug Inhibitory Effects (IC₅₀) in Spheroid Cultures and Monolayer Bulletin of Mathematical Biology, 82(6), 68; <https://doi.org/10.1007/s11538-020-00746-7>.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., dan Jemal, A. (2024). Statistics of Global Cancer 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality for 36 cancers in 185 countries. CA: Journal of Cancer for Clinicians, 74(3), 229–263. Diakses dari: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

- Burmeister, C. A., Khan, S. F., Schaffer, G., Mbatani, N., Adams, T., Moodley, J., dan Prince, S. (2022). Therapeutics for cervical cancer: Current challenges and future prospects *Studi Virus Tumor*, Vol. 13, No. 200238, <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2022.200238>
- Che, Y., Li, J., Li, Z., Li, J., Wang, S., Yan, Y., Zou, K., dan Zou, L. (2018). Osthole menghalangi ATM/NF-B Signaling dan meningkatkan aktivitas antitumor dan sensitivitas sel kanker servikal terhadap irradiation. *Jurnal Onkologi*, 40(2), 737–747. Diakses dari: <https://doi.org/10.3892/or.2018.6514>
- Ferrall, Lin, K.Y., Roden, R.B.S., Hung, C.-F., dan Wu, T.-C. (2021). Immunotherapy Kanker Cervical: Fakta dan Harapan. *Clinical Cancer Research*, 27(18), 4953–4973. Ini dapat ditemukan di <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CC-20-2833>
- Gagamukulya, Wamunyokoli, dan El-Shemy, HA. *Annona muricata*: Apakah obat alami untuk hampir semua penyakit, termasuk cancer yang berkembang di sekitar kita? analisis menyeluruh dari sejarah dan prospek penelitiannya. *Journal of Asian Pacific Tropical Medicine*, 10(9), 835–848. Sumber informasi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.009>
- Ghasemi, Turnbull, Sebastian, dan Kempson (2021). Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation of the MTT Assay in Bulk and Single-Cell Analysis *Jurnal Ilmu Molekul Internasional*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Hadisaputri, Y. E., Habibah, U. Abdullah, F. F., Halimah, E., Mutakin, M., Megantara, S., Abdulah, R., dan Diantini, A. (2021). Dalam Breast Cancer: Targets and Therapy, Soursop (*Annona muricata L.*) Leaf Extract and Fractions have Antiproliferation Activity and Apoptotic Mechanisms on MCF7 Breast Cancer Cells.
- Ilango, Sahoo, D. K., Paital, B., Kathirvel, K., Gabriel, J. I., Subramaniam, K., Jayachandran, P., Dash, R. K., Hati, A. K., Behera, T. R., Mishra, P., dan Nirmaladevi, R. (2022). A Review of *Annona muricata* and Its Anticancer Properties *Jurnal Kanker*, Vol. 14(18), 4539. <https://doi.org/10.3390/cancers14184539>
- Kaloni, Diepstraten, ST, Strasser, dan Kelly (2023). keluarga protein BCL-2: target menarik untuk pengobatan kanker Panyakit, 28(1–2), 20–38. Sumber informasi: <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01780-7>
- Mosmann, T. Rapid Colorimetric Cell Growth and Survival Assay: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. Sumber informasi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Okunade, K. S. cervical cancer dan human papillomavirus. *Jurnal Obstetrics and Gynaecology*, 40(5), 602–608. Sumber informasi: <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
- Oyouni, AAA (2020). Dalam kanker, human papillomavirus: infeksi, penyebaran penyakit, dan kemajuan dalam vaksin. *Journal of Infection and Public Health*, 16(4), 626–631. Sumber informasi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.014>
- Putri, NM, Arisanty, dan Hilbertina (2022). *Jurnal Ilmu Kesehatan Indonesia*, 3(1), 16–21.
- Qian, Shi, Wei, Yang, Wang, Jin, Yang, dan Wang (2022). The function of BCL-2 family proteins in controlling apoptosis and cancer treatment *Jurnal Frontiers in Oncology*, Vol. 12, 2020, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- Qorina, F., Arsianti, A., Fithrotunnisa, Q., Tejaputri, N., Azizah, N. N., dan Putrianingsih, R. Ketoksik Soursop Leaves (*Annona muricata*) terhadap sel kanker cervical HeLa. *Journal of Pharmacognosy*, 12(1), 20–24. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.4> Rachmawati, E., Karyono, S., & Suyuti, H. (2012). Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan

Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(1), 28–33.
<https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2012.027.01.5>

Teniente, S.L., Gallegos, A.C.F., González, S.C.E., Múzquiz, L.G.C., Flores, S.D.N., dan Herrera, R.R. (2023). Antioxidants, 12(1), 1–15. Pomegranate Peel Polyphenols Effects on Cervical Cancer. Sumber referensi: <https://doi.org/10.3390/antiox12010127>

Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., dan Qiao, Y. Cancer cervical: Epidemiology, risk factors, and screening Cina *Jurnal Penelitian Kanker*, 32(6), 720–728. Sumber informasi dapat ditemukan di <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>.