

**PENELITIAN**

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP GEN ANTI APOPTOSIS BCL-2 CONTINUOUS CELL T47D PADA KANKER PAYUDARA

Devin Mahendika,¹ Luthfi Darnez¹

ABSTRAK

Pendahuluan: Kanker payudara menduduki peringkat pertama kasus terbanyak keganasan di Indonesia. Studi fitokimia asetogenin sebagai substansi utama dari sirsak berpotensi sebagai agen sitotoksik dan memicu apoptosis sel kanker payudara.

Metode: Penelitian ini merupakan jenis *true experimental* menggunakan studi *in-vitro* dengan menggunakan *continuous cell* T47D yang diinkubasi selama 72 jam pada dua kelompok studi, kelompok perlakuan diberi larutan ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi sesuai IC-50 94,26 µg/ml. Hasil penelitian ini dilihat dari nilai *cycle quantification* RT-PCR yang akan dilakukan analisis uji normalitas *Saphiro Wilk*, analisis kemaknaan *Mann-Whitney Test*, dan penentuan hasil ekspresi gen dengan rumus Livak.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan sel kanker payudara yang diberi perlakuan mengekspresikan 1,36 kali lipat lebih tinggi dibandingkan sel kelompok kontrol untuk mengekspresikan protein anti-apoptosis BCL-2. Hasil penelitian juga menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol untuk ekspresi gen BCL-2 *continuous cell* T47D kanker payudara dengan nilai $p=0,002$ ($p<0,005$).

Pembahasan: Asetogenin adalah inhibitor kuat dari NADH dehidrogenase yang dapat menurunkan produksi ATP yang dapat menyebabkan kematian pada sel kanker. Pada inhibisi ini dapat memicu adanya aktivasi pada jalur apoptosis dan pengaktifan gen p53 dengan target gen BCL-2 yang dapat menghentikan siklus dari sel yang akan mencegah proliferasi yang tidak terkendali.

Simpulan: Terdapat perbedaan yang signifikan dan bermakna pada nilai *cycle quantification* RT-PCR gen BCL-2 pada sel kelompok menggunakan ekstrak daun sirsak dan kontrol. Selain itu, ekstrak daun sirsak yang mengandung asetogenin tidak efektif dalam menurunkan kadar ekspresi gen anti-apoptosis BCL-2 pada *continuous cell* T47D kanker payudara.

Kata kunci: Asetogenin, *Continuous cell* T47D, Ekstrak daun sirsak, Gen BCL-2, RT-PCR.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer ranks first in the most cases of malignancy in Indonesia. Phytochemical studies of acetogenin as the main substance of soursop have the potential as a cytotoxic agent and trigger apoptosis of breast cancer cells.

Method: This research is a *true experimental* type using *in-vitro* studies using *continuous cell* T47D, the treatment group was given a solution of soursop leaf ethanol extract. The results of this study are seen from the RT-PCR cycle quantification which will be analyzed of the *Mann-Whitney Test*, and determination of gene expression using the Livak formula.

Result: The results showed that the treated T47D cells expressed 1.36 times higher than the control group cells to express the anti-apoptotic protein BCL-2. It's a significant difference between the treatment and control groups for the expression of the BCL-2 T47D gene, $p=0.002$ ($p<0.005$).

Discussion: Acetogenin is a strong inhibitor of NADH dehydrogenase which can decrease the production of ATP which can cause death in cancer cells. This inhibition can trigger the activation of the apoptotic pathway and the activation of the BCL-2 gene which can stop the cell cycle which will prevent uncontrolled proliferation.

Conclusion: There was a significant difference value of the cycle quantification RT-PCR of the BCL-2 gene in group treatment and control. In addition, soursop leaf extract containing acetogenin was not effective in reducing the expression levels of the anti-apoptotic gene BCL-2 in *continuous* T47D cells of breast cancer.

Keywords: Acetogenin, BCL-2 gene, *Continuous cell* T47D, Soursop leaf extract, RT-PCR.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu neoplasma ganas pada jaringan payudara yang berasal dari epitel tubulus yang membawa air susu ke puting dan kelenjar penghasil air susu yang dapat mengalami pertumbuhan abnormal sel pada jaringan payudara.^[1,2]

Kanker payudara merupakan salah satu kanker yang menjadi penyebab kematian kelima di dunia dengan perkiraan sebesar 2,3 juta kasus baru berdasarkan data *Global Burden of Cancer* (GLOBOCAN) tahun 2020.^[3] Menurut *World Health Organization* (WHO), kanker payudara menjadi beban

kesehatan dunia sebesar 19,6 juta disbanding 107,8 juta dari total seluruh beban kesehatan jika dihitung dari *Disability Adjusted Life Years* (DALYs).^[4,5]

Dilihat dari angka *Mortality Incidence Ratio* (MIR) tahun 2020 sebagai indikator yang representatif untuk tingkat kelangsungan hidup 5 tahun secara global berkisar sebesar 0,30.^[5,6] Diperkirakan pada tahun 2030, jumlah kasus baru yang terdiagnosis di seluruh dunia mencapai 2,7 juta per tahun dengan jumlah kematian 0,87 juta per tahun.^[7,8] Di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah, kejadian kanker payudara diperkirakan akan meningkat lebih tajam karena gaya hidup westernisasi misalnya penundaan kehamilan, kurangnya inisiasi menyusui

¹ Program Studi
Profesi Dokter,
Fakultas
Kedokteran
Universitas
Andalas, Padang

dini, usia *menarche* muda, kurangnya aktivitas fisik, dan pola nutrisi yang buruk), kurangnya mengenai pengetahuan akan kanker payudara, serta masih rendahnya angka deteksi kanker secara dini.^[9]

Di Indonesia, diperkirakan angka kejadiannya 12/100.000 wanita dan lebih dari 80% kasus ditemukan berada pada stadium yang lanjut, di mana upaya pengobatan sulit dilakukan.^[10] Merujuk data *Pathological Based Registration* keganasan payudara ini menempati urutan pertama dengan frekuensi relatif sebesar 18,6%.^[10] Pada tahun 2018, prevalensi kanker payudara berkisar pada angka 40 per 100.000 populasi.^[11] Survei retrospektif dari epidemiologis Indonesia hingga tahun 2021 menunjukkan bahwa jenis kanker yang paling banyak ditemui adalah kanker payudara (30,8%) disusul kanker serviks (14,2%).^[11]

Kanker payudara merupakan penyebab kematian akibat keganasan nomor dua terbanyak pada wanita setelah kanker serviks dan kasusnya cenderung melonjak tajam setiap tahunnya.^[12] Data observasi yang didapatkan dari bagian rekam medik dan informasi kesehatan Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Dr. M. Djamil Padang didapatkan data kanker payudara dalam kurun waktu 2017 hingga 2021 dengan jumlah penderita kanker payudara berturut-turut sebesar 1941, 2756, 1457, dan 3856 kunjungan rawat jalan.^[13]

Saat ini banyak terapi yang dikembangkan untuk mematikan penyakit keganasan, seperti terapi medikamentosa, pembedahan, penyinaran dengan menggunakan radioterapi dan kemoterapi.^[14] Akan tetapi dari seluruh agen pengobatan tersebut, kekurangan yang dihasilkan pun juga bervariasi.^[14] Pembedahan yang dilakukan dapat berisiko munculnya kembali jaringan kanker baru ataupun pembedahan terhadap kanker yang tidak sempurna ataupun tidak tuntas.^[14] Terapi penyinaran dapat menyebabkan efek samping seperti gangguan gastrointestinal, mielosupresi, immunosupresi, anemia, dan kerontokan pada rambut bahkan bersifat toksisitas sel inang yang normal.^[15]

Mengingat slogan "*back to nature*", *herbal medicine* telah meneliti aktivitas anti kanker dari segi kajian kemotaksonomi yang sering dimanfaatkan juga sebagai antibakteri, antimalaria, antidiabetik, antikonvulsan, antirematik, antiparasit, antihipertensi, antianemia, antiinsomnia, menurunkan kadar kolesterol, obat asam urat, meningkatkan imun tubuh, antioksidan, antiradang, antipenuaan, hepatoprotektif yaitu salah satu spesies dari famili *Annonaceae* atau yang dikenal dengan sirsak dengan memanfaatkan bagian daun tumbuhan ini yang dilakukan proses ekstraksi.^[16]

Sirsak merupakan tumbuhan dengan kelas *Dicotyledonae* dari famili *Annonaceae* yang dikenal dengan spesies *Annona muricata* Linn, tanaman sirsak memiliki batang dengan tinggi sekitar 5-6 meter, batang berwarna coklat, bulat, dan bercabang.^[17] Tanaman sirsak mengandung energi sebanyak 65 kalori, 1 gram protein, 0,3 gram lemak, 16,3 gram karbohidrat, 14 miligram selenium, 27 miligram fosfor, 2 gram serat, 0,6 miligram zat besi, 1 miligram vitamin A, 0,07 miligram tiamin, 0,04 miligram riboflavin, 20 miligram vitamin C, dan 0,7 miligram niasin.^[18] Buah sirsak dikenal mampu untuk mengobati gejala seperti diare, *maag*, disentri, demam, flu, dan dapat memperlancar air susu ibu (ASI).^[17] Bunga tanaman sirsak digunakan sebagai terapi bronkitis dan bronkiektasis.^[17] Daun sirsak juga

bermanfaat sebagai obat penyakit jantung, diabetes, dan antikanker, serta mengandung senyawa asetogenin.^[17,18]

Studi fitokimia dan berbagai penelitian terkait herbal *medicine* menunjukkan bahwa *acetogenin annonaceous* merupakan substansi utama dari sirsak dan terdapat sekitar 150 *acetogenin annonaceous* yang telah diisolasi dari bagian tumbuhan sirsak yaitu akar, kayu, kulit, buah, biji, dan paling banyak dari daun sirsak.^[19] Adapun *acetogenin annonaceous* pada daun sirsak berkhasiat sebagai antikanker dengan fungsi kerja sebagai sitotoksik dengan beberapa mekanisme seperti inhibitor NADH oksidase pada enzim plasma sel kanker, penghambatan kompleks I NADH saat transpor elektron mitokondria, menghambat terjadinya fosforilasi oksidatif, menurunkan produksi dari *adenosine triphosphate* (ATP) sitosolik, peningkatan ekspresi dari pompa membran plasma dan P-glikoprotein pada kasus sel kanker yang resisten dan bersifat radikal terhadap obat-obatan, menghentikan fase S, G1, dan inhibitor seluruh fase lainnya pada proses pembelahan sel yang akan menyebabkan terjadinya apoptosis sel kanker.^[20] Kinerja dari asetogenin ini tidak merusak sel normal yang sedang bekerja dalam menjaga kelangsungan hidup dari organisme.^[21]

Selain mengandung asetogenin, pada daun sirsak juga terdapat kandungan flavonoid, alkaloid, dan tanin yang berperan sebagai antikanker dengan menghambat pertumbuhan sel kanker.^[17] Penelitian oleh Adelina *et al.* menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak berperan sebagai agen anti-proliferasi neoplasma pada organ hepar tikus yang terinduksi 7,12 *dimetilbenz [a] antracene* (DMBA), hasil penelitian menunjukkan bahwa pemeriksaan hisopatologi dan determinan proliferasi sel hepar dengan *argyrophillic nucleolar organizer region* (AgNOR) yang menggambarkan terjadinya penurunan aktivitas proliferasi sel hepar secara signifikan ($p=0,000$).^[14]

Penelitian lainnya juga membuktikan bahwa ekstrak daun sirsak dapat menghambat proliferasi sel menggunakan hambatan ekspresi gen Ki-67, sehingga menginduksi terjadinya nekrosis dan apoptosis sel kanker.^[22] Proses induksi dari apoptosis sel kanker ini mesti terjadi secara proporsional untuk menjaga fungsi regulasi sel atau menghindari terjadinya perkembangan sel kanker yang lebih radikal, proses apoptosis ini melibatkan aktivasi *caspase*, lisis protein, dan *deoxyribo-nucleic acid* (DNA), transformasi membran agar dapat dikenali oleh sel-sel fagosit.^[23]

Mekanisme kinerja dan siklus proses induksi apoptosis ini terjadi melalui dua jalur yaitu jalur mitokondria yang diregulasi oleh sekelompok protein berupa famili dari gen BCL yang diklasifikasikan menjadi BCL-2 dan BCL-xL.^[24] Aktivitas kinerja utama dari BCL-2 berperan sebagai anti-apoptosis, BCL-2 akan menghambat apoptosis dan dapat menghalangi pelepasan sitokrom-c dari mitokondria.^[25] Sementara untuk pro-apoptosis diklasifikasikan menjadi Bax, Bid, dan Bad.^[24] Adapun jalur mitokondria ini dimulai dengan stimulasi sitokrom-c yang akan mengaktifasi dari proses apoptosis.^[25] Sementara, untuk jalur kedua yang dikenal dengan jalur sitoplasma, fase inisiasi dipicu oleh fase *death receptor*.^[25]

Hasil riset lainnya oleh Pertiwi yang meneliti terkait pengaruh pemberian Ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas *cell* pada neoplasma payudara

T47D menggunakan metode *in-vitro* dengan uji *microtetrazolium* (MTT) untuk menentukan proliferasi dan apoptosis sel, proses apoptosis terjadi akibat peningkatan aktivitas dari pelepasan sitokrom-c dari mitokondria menuju sitosol, memengaruhi kinerja dari ekspresi gen BCL-2 yang berperan sebagai anti-apoptosis, peningkatan kadar Bax, dan aktivasi dari *executioner caspase-9* untuk menginduksi apoptosis.^[26] Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat viabilitas sel sebanyak 50% dan berpotensi sebagai antikanker dengan luaran hasil IC-50 pada konsentrasi 94,26 µg/ml dengan masa inkubasi 72 jam.^[27]

Benang merah dan kekhasan pada penelitian ini terkait kemotaksonomi dan fitokimia sirsak dan ekstrak daunnya, manfaatnya dalam menginduksi apoptosis sel kanker dan agen anti-proliferasi, limitasi karya tulis dan hambatan dalam penelitian yang pernah ada sebelumnya, belum terdapat adanya kajian dan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak yang berhubungan dengan proses biogenetik dalam proses kematian sel khususnya gen BCL-2 yang berperan sebagai anti-apoptosis dan inhibitor pelepasan sitokrom-c sel kanker payudara *continuous cell* T47D menggunakan teknologi *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR). Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terkait potensi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap gen BCL-2 *continuous cell* T47D pada kanker payudara disamping pengobatan herbal yang saat ini banyak dikembangkan dan diteliti mengingat keamanan dan keefektifannya, ekonomis bernilai pangan, dan murah didapatkan sebagai alternatif pengobatan.

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian *true experimental* menggunakan studi *in-vitro*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas pada bulan Juni 2021-Februari 2022. Pada penelitian ini dilakukan kultur *cell line* T47D dan diberikan perlakuan dengan kadar ekstrak kelompok kontrol sel ataupun media dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak sirsak. Alasan pengambilan dua kelompok belajar ini didasarkan kepada ketersediaan sampel yang sangat terbatas pada saat waktu penelitian yang saat itu sedang terjadi pandemi COVID-19 dan permintaan yang cukup minim akan pemeriksaan biopsi ataupun histopatologi terkait kasus kanker payudara di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Populasi penelitian ini menggunakan beberapa kultur sel pada gen BCL-2 *continuous cell* kanker payudara T47D dan hanya yang bersifat konfluens, tumbuh dan berkembang dengan baik, tidak terkontaminasi, dan intak yang telah dilakukan kultur sehingga dapat dijadikan sampel penelitian. Adapun *continuous cell* kanker payudara ini diambil dari beberapa hasil biopsi sel kanker payudara dari pemeriksaan histopatologi dan biopsi di Laboratorium Patologi Anatomi dan telah dimintai keterangan persetujuan dari penderita kanker melalui formulir persetujuan menjadi sampel penelitian.

Kultur sel ini akan diberikan perlakuan ekstrak dari daun sirsak menggunakan kadar IC-50, setelah itu dilakukan pemeriksaan dan evaluasi hasil ekspresi gen BCL-2 dengan menggunakan metode *Real Time*

Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Pengulangan dihitung dengan menggunakan rumus Faraday dengan didapatkan hasil 16 kali pengulangan menggunakan dua kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol dan perlakuan.

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel terikat yaitu ekspresi relatif gen BCL-2 *continuous cell* kanker payudara T47D, gen yang mengkode BCL-2 pada GTPase sebagai regulator transduksi sinyal kaskade, di mana pada tingkat mRNA yang dibandingkan dengan *house keeping* gen *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) pada siklus fluoresen yang diukur dengan menggunakan metode RT-PCR dengan menggunakan alat *thermal cycler* RT-PCR, dengan hasil ukur nilai Cq, dengan alat ukur PCR. Sementara untuk variabel bebas penelitian ini berupa ekstrak daun sirsak yang dikeringkan kemudian dihaluskan yang dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 95% yang diukur menggunakan timbangan digital, kemudian dilakukan penimbangan larutan stok (1 miligram ekstrak daun sirsak ditambah 1 mililiter etanol) diencerkan hingga didapatkan konsentrasi ekstrak 1000 µg/ml dengan menggunakan rumus pengenceran $M1 \times V1 = M2 \times V2$.

Alur penelitian dan pengukuran variabel penelitian dilakukan dengan pembuatan ekstrak daun sirsak sebanyak 2 kilogram dicuci bersih, dipotong kecil, dan dianginkan. Ekstrak dibuat dengan menggunakan metode maserasi, daun sirsak yang sudah dihaluskan kemudian dilarutkan dalam etanol ekstrak 95% dan didiamkan selama 3x24 jam. Kemudian, larutan tersebut dilakukan penyaringan menggunakan ekstrak encer. Seterusnya, dilakukan penambahan etanol ke dalam ampas yang tertinggal pada maserator sampai larutan yang keluar tidak berwarna, kemudian dilakukan pemekatan pada ekstrak encer yang didapatkan menggunakan rotasi evaporator sampai pekat. Setelah dilakukan ekstraksi daun sirsak, dilakukan pengenceran larutan sehingga didapatkan konsentrasi IC-50 94,26 µg/ml, kemudian sel kanker pada gen BCL-2 yang telah konfluens ditambahkan tripsin-etilenadiaminatetraasetat (EDTA) dan dilakukan inkubasi selama 5-15 menit, sentrifus dalam 1500 radian per menit selama 5 menit, koleksikan pelet dan suspensikan dalam 3 mililiter medium, dilakukan pengenceran hingga didapatkan konsentrasi sel akhir 3×10^5 sel 4000 µl media kultur, kemudian menyiapkan 6 *well plate* dan melakukan transfer 4000 µl suspensi sel ke dalam tiap *plate*/sumuran, kemudian lakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk melihat gambaran penyebaran sel dan diteruskan dengan melakukan inkubasi sel dalam inkubator. Setelah sel kembali normal, buat konsentrasi sampel pada IC-50 sebanyak 4 mililiter, kemudian ambil 6 sumuran yang berisi sel yang telah terinkubasi, buang semua media kultur dari sumuran, lakukan pencucian sel dalam sumuran dengan natrium perborat dengan konsentrasi 500 µl per masing-masingnya, dan dilakukan pembuangan setelah dilakukan pencucian terhadap larutan natrium perborat, kemudian masukkan sampel sebanyak 4 mililiter ke dalam sumuran, dilakukan kontrol sel pada medium kultur dilanjutkan dengan inkubasi plate selama 72 jam dan dikeluarkan setelah selesai, amati kondisi sel setelah 24 jam pertama, amati, dokumentasikan dilakukan pembuangan media dari sumuran, lakukan penambahan tripsin EDTA sebanyak 2 mililiter dan lakukan inkubasi selama 5-10 menit, dan lakukan

sentrifus dalam 1500 radian per menit dalam 5 menit, koleksi pelet dan buang supernatan hasil sentrifus.

Proses isolasi *ribo-nucleic Acid* (RNA) dilakukan dengan menambahkan larutan natrium perborat dengan konsentrasi 200 μ l dan 400 μ l binding buffer, kemudian lakukan vorteks selama 15 detik. Kemudian, masukkan ke dalam *collection tube* tabung *high pure filter* dan pipet sampel ke dalam tabung filter, sentrifus selama 15 detik sebanyak 8000 kali dan buang supernatan, pipet 90 μ l DNase I *incubation buffer* ke dalam tabung reaksi dan miksasi dengan 10 μ l DNase I, pipet juga dilarutkan dalam tabung filter inkubasi pada suhu 15-25°C selama 15 menit, tambahkan 500 μ l *wash buffer* I ke dalam tabung filter, lakukan sentrifus selama 15 detik pada 8000 kali dan buang supernatan, lanjutkan dengan menambahkan 500 μ l *wash buffer* II ke dalam tabung filter, sentrifus selama 60 detik pada 8000 kali dan buang supernatan, tambahkan kembali *wash buffer* II sebanyak 200 μ l, sentrifus selama 120 detik sebanyak 13.000 kali, lepaskan *collection tube* dan masukkan tabung filtrasi dalam 1,5 mililiter tabung mikrofus, terakhir tambahkan 50-100 μ l *elution buffer* ke dalam tabung filter, sentrifus selama 60 detik sebanyak 8.000 kali hingga didapatkan isolat dari RNA sel.

Miksasi isolat RNA yang telah dilakukan isolasi dengan 5x *i-script reverse transcription supermix* dan *nuclease-free water* hingga total volume 20 μ l, kemudian dilakukan inkubasi campuran reaksi dalam *thermal cycler* sehingga didapatkan produk komplemen DNA (c-DNA). Adapun kinerja RT-PCR pada penelitian ini, menggunakan prinsip kinerja PCR-mix yaitu 1 μ l *reverse primer*, 4 μ l *Taq polymerase*, 1 μ l *TaqMan probe*, 8 μ l *water-PCR grade*, dan 1 μ l *forward primer*, kemudian dilakukan pencampuran PCR-mix, kemudian pipet sebanyak 15 μ l PCR-mix ke dalam *precooled light cycler® capillary*, dan tambahkan 5 μ l *template c-DNA*. Kemudian, tutup kapiler dengan *stopper*, dilanjutkan dengan pemindahan kapiler ke dalam *sample carousel* dan letakkan dalam *centrifuge bucket*, lakukan sentrifus menggunakan *light cycler® carousel centrifuge 2.0* dan melakukan pemindahan sampel *carousel* ke *light cycler® 2.0 instrument*, lakukan pengaturan program pada *light cycler® 2.0 instrument* dengan pengaturan siklus pertama pre-inkubasi selama 10 menit pada suhu 95°C, siklus kedua amplifikasi selama 45 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi selama 10 detik pada suhu 95°C, tahap pelekatan selama 30 detik pada suhu 57°C, dan tahap elongasi selama 1 detik pada suhu 57°C. Tahap ketiga dilanjutkan dengan pendinginan selama 30 detik pada suhu 40°C dengan susunan primer gen BCL-2 terhadap sampel yang digunakan berupa *forward primer* 5'-TCA CTC AGT GTG TAC AGG G-3' dan *reverse primer* 5'-GCA TAC TGT TTC AGC ATG GCA C-3', sementara untuk gen GAPDH dengan *forward primer* 5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3' dan *reverse primer* 5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A-3', selanjutnya alat siap untuk digunakan.

Seluruh data dari ekspresi gen BCL-2 yang didapatkan berupa nilai Cq yang diperoleh dari RT-PCR secara *online* dari setiap periode, instrumen dan perlengkapan RT-PCR memperoleh *output* berupa kurva amplifikasi. Ketika seluruh pendataan selesai dan didapatkan perolehan hasil reaksi, dilakukan identifikasi fase eksponensial melalui pemeriksaan hasil catatan yang telah terekam pada instrumen, hasil Cq dari produk pengolahan RT-PCR diuji melalui analisis statistik menggunakan uji *Man-Whitney test*

untuk melihat gambaran level ekspresi gen BCL-2 yang diperlakukan dengan pemberian zat uji (kontrol) dan tidak diberikan zat uji (bebas).

Langkah-langkah pada penelitian ini telah dilakukan validasi dan telah diuji dalam beberapa penelitian mengenai pengaruh pemberian asetogenin pada sirsak terhadap gen anti apoptosis BCL-2 *continuous cell* T47D

pada kanker payudara seperti pada penelitian Pertiwi, Yahaya *et.al*, dan Chatterjee *et.al*. Hasilnya begitu signifikan terhadap *outcome* pengobatan pada pasien kanker payudara yang akan dijelaskan pada pembahasan penelitian ini.

Penelitian ini telah lulus kaji etik, protokol penelitian, dan memiliki *ethical clearance* oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan nomor surat: 094/KEP/FK/2022.

HASIL

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk melihat potensi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap gen anti-apoptosis BCL-2 *continuous cell* T47D pada kanker payudara dengan membandingkan data kuantifikasi gen GAPDH pada siklus fluoresen dengan metode RT-PCR. Pada penelitian ini didapatkan hasil rerata nilai Cq dari gen BCL-2 pada sel kanker payudara tanpa diberi perlakuan dan diberi perlakuan ekstrak daun sirsak secara berturut-turut selama 72 jam adalah 31,40 dan 34,82. (Dapat dilihat pada Tabel 1.)

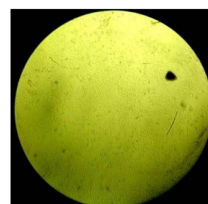
Tabel 1. Hasil Kuantifikasi Gen BCL-2 dan GAPDH pada Siklus Fluoresen yang Terbaca *Cycle Quantification* dari Hasil RT-PCR.

Sampel	Cq BCL-2		Cq GAPDH	
	DP	TP	DP	TP
Pertama	34,75	32,18	35,88	30,97
Kedua	34,70	32,93	33,19	30,88
Ketiga	34,97	30,17	33,77	28,81
Keempat	34,86	30,12	35,56	28,67
Kelima	34,12	32,33	32,24	31,17
Keenam	34,84	32,77	32,05	31,12
Ketujuh	34,93	30,03	34,02	29,15
Kedelapan	35,42	30,69	34,47	29,47
Rata-Rata	34,82	31,40	33,89	30,03

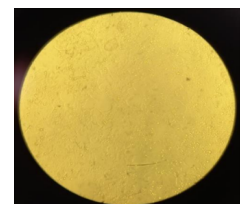
Keterangan :

DP : dengan perlakuan

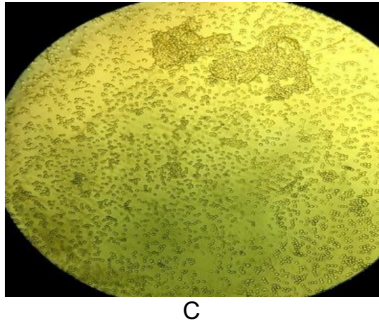
TP : tanpa perlakuan



A



B



Gambar 1. Pengamatan di Bawah Mikroskop Pembesaran 10 Kali

- A. *Continuous Cell* T47D Kanker Payudara Diberikan Perlakuan Ekstrak Daun Sirsak, Berfluoresensi Hijau (Proses Apoptosis), Zat Warna Berikatan dengan DNA Untai Ganda
- B. *Continuous Cell* T47D Kanker Payudara yang Tidak Diberikan Perlakuan Ekstrak Daun Sirsak, Berfluoresensi Kuning (Sel Kanker Payudara Asli), Tampak Sel Utuh, Keadaan Tinggi, Terdapat Adhesi pada Satu Sel dengan yang Lainnya
- C. *Continuous Cell* T47D Kanker Payudara Diberikan Tripsin-EDTA, menunjukkan Fluoresensi Hijau saat Proses Proliferasi

Hasil *cycle quantification* gen BCL-2 yang telah didapatkan diolah secara statistik menggunakan uji berikut :

- Uji normalitas *Shapiro-Wilk* terhadap kelompok perlakuan didapatkan nilai $p=0,815$ ($p>0,05$) dan kelompok kontrol didapatkan hasil statistik $p=0,022$ ($p<0,05$), angka statistik ini bermakna bahwa nilai *cycle quantification* gen BCL-2 pada kelompok perlakuan memiliki nilai normal, sedangkan berbanding terbalik pada kelompok kontrol dengan hasil normalitas tidak normal.
- Analisis dilanjutkan uji *Mann-Whitney test* dan didapatkan hasil $p=0,002$ ($p<0,005$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari nilai *cycle quantification* pada gen BCL-2 antara kelompok perlakuan dan kontrol. (Dapat dilihat pada **Tabel 2.**)

Tabel 2. Hasil Uji *Man-Whitney Test* Berdasarkan Analisis *Statistic for the Social Sciences* (SPSS).

Sampel	Nilai Cycle Quantification			
	N	Rata-rata	SD	<i>p</i>
Kelompok Perlakuan	8	34,82	0,34	0,002
Kelompok Kontrol	8	31,40	1,17	

Keterangan:

- n* : total sampel
SD : standar deviasi
p : taraf signifikansi

Penilaian ekspresi gen BCL-2 RT-PCR, menggunakan *relative quantification* menggunakan rumus Livak $2^{-\Delta\Delta Cq}$, hal yang perlu diperhatikan adalah normalisasi dari gen target *cycle quantification* BCL-2 dengan gen GAPDH sebagai gen referensi antara perlakuan dan kontrol, adapun perhitungannya dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \Delta Cq_{(\text{perlakuan})} &: Cq \text{ BCL-2} - Cq \text{ GAPDH} \\ \Delta Cq_{(\text{perlakuan})} &: 34,82 - 33,89 \\ \Delta Cq_{(\text{perlakuan})} &: 0,93 \\ \Delta Cq_{(\text{kontrol})} &: Cq \text{ BCL-2} - Cq \text{ GAPDH} \\ \Delta Cq_{(\text{kontrol})} &: 31,40 - 30,03 \\ \Delta Cq_{(\text{kontrol})} &: 1,37 \end{aligned}$$

Selanjutnya dilakukan normalisasi antara sampel perlakuan dan sampel kontrol:

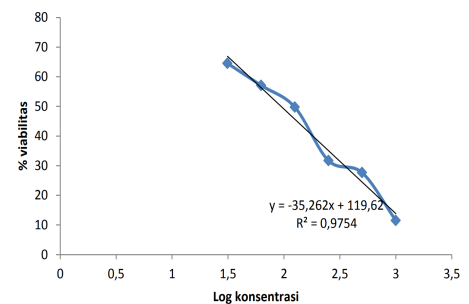
$$\begin{aligned} \Delta\Delta Cq &= \Delta Cq_{(\text{perlakuan})} - \Delta Cq_{(\text{kontrol})} \\ \Delta\Delta Cq &= 0,93 - 1,37 \\ \Delta\Delta Cq &= -0,44 \end{aligned}$$

Penghitungan rasio ekspresi dengan menggunakan rumus Livak di bawah ini didapatkan:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta Cq} &= \text{rasio ekspresi gen yang dinormalisasi} \\ \Delta\Delta Cq &= 2^{-(-0,44)} = 1,36 \end{aligned}$$

Maka dapat disimpulkan bahwa, *continuous cell* kanker payudara T47D yang diberi perlakuan mengekspresikan gen BCL-2 1,36 kali lebih tinggi dari sel kelompok kontrol.

Adapun jika dilihat hubungan antara konsentrasi ekstrak daun sirsak IC-50 94,26 $\mu\text{g/ml}$ selama 72 jam dapat menggunakan grafik log konsentrasi dengan viabilitas sel (Dapat dilihat pada **Gambar 2.**)



Gambar 2. Konsentrasi Ekstrak Daun Sirsak dengan Viabilitas Sel Selama 72 jam

Berdasarkan gambar diatas didapatkan persamaan regresi $y = a + bx$ dengan nilai *a* sebesar 119,62, nilai *b* sebesar -35,262. Pada persamaan regresi $y = 119,62 + (-35,262)x$ dan mengganti nilai *y* dengan 50% dan didapatkan nilai *x* sebesar 1,97, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dapat menghambat 50% viabilitas sel kanker sebesar 94,26 $\mu\text{g/ml}$.

PEMBAHASAN

Akhir-akhir ini, induksi apoptosis merupakan pendekatan terbaru dan krusial dalam terapi kanker seiring perkembangan ilmu kedokteran bioteknologi dan fitofarmaka. Sebagian besar zat bioaktif dalam ekstrak daun sirsak atau fraksi pada penelitian ini memiliki aktivitas dalam pengobatan kemoterapi kanker yang bekerja dalam menghalangi perkembangan siklus sel dan memicu apoptosis.^[26]

Studi terbaru mengenai proses apoptosis, menunjukkan bahwa senyawa organik terkadang digunakan sebagai penginduksi apoptosis.^[26] Agen ini dapat berupa molekul, ekstrak atau senyawa baru yang disintesis.^[26] Agen atau obat antikanker yang digunakan secara klinis dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker telah banyak diketahui.^[26]

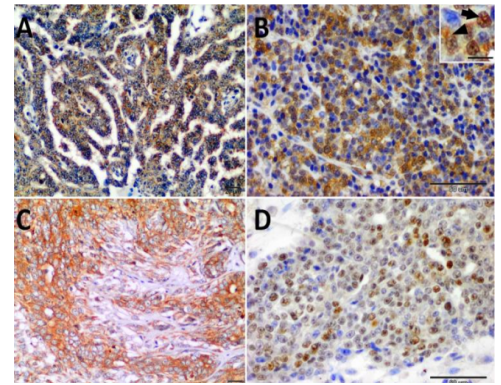
Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai ekspresi gen BCL-2 yang diidentifikasi berdasarkan *relative quantification* menggunakan suatu alat yang dapat menentukan kualitas suatu DNA yang dikenal dengan RT-PCR dengan perhitungan rumus Livak didapatkan ekspresi gen BCL-2 lebih tinggi 1,36 kali dibandingkan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi gen BCL-2 *continuous cell* T47D pada kanker payudara.

Penelitian ini menggunakan daun sirsak yang telah dilakukan proses ekstraksi, daun sirsak telah terbukti kaya akan senyawa asetogenin yang berperan dalam proses apoptosis sel kanker tanpa merusak sel yang sehat.^[27] Asetogenin sebagai senyawa poliketida dengan struktur 30-32 rantai karbon yang tidak terikat oleh rantai cabang dengan gugus *5-methyl-2-furanone*, rantai *furanone* pada gugus *hydrofuranone* memiliki aktivitas bersifat sitotoksik khususnya pada C23, sementara senyawa poliketida merupakan prekursor utama dalam pembentukan senyawa yang ada pada daun sirsak seperti flavonoid, terpenoid, dan tanin sebagai promotor fungsi metabolisme.^[27]

Asetogenin berperan sebagai inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria dan NADH dehidrogenase, sehingga hal ini menimbulkan konsekuensi dalam penurunan produk ATP sehingga mengakibatkan dari kematian sel kanker dengan mengaktifkan jalur p53 sebagai pengendali dari proses proliferasi yang masif.^[27]

Mekanisme kematian sel kanker apabila diberikan ekstrak daun sirsak terjadi melalui proses inhibisi transporter glukosa (GLUT) di dalam membran plasma, sehingga hal ini menyebabkan kebutuhan akan glukosa pada sel kanker berkurang bahkan sama sekali tidak terpenuhi yang akan menyebabkan terjadinya apoptosis.^[28] Konsekuensi dari keadaan ini adalah penurunan ATP yang signifikan sehingga energi pada sel tumor untuk respirasi bahkan proses proliferasi, proses apoptosis ini sangat mendukung proses kerja dari gen BCL-2 dengan mekanisme pelepasan sitokrom-c dan peningkatan permeabilitas membran mitokondria.^[28]

Peran dari protein dan jalur p53 juga dapat menekan dari produksi dari gen BCL-2.^[29] Penelitian oleh Yarsi menunjukkan bahwa, kelebihan ekspresi pada gen BCL-2 yang menghambat kinerja *caspase-3* yang dipengaruhi oleh sel normal dan masih berfungsi dalam fungsi sel dapat terjadi pada sel yang kekurangan gen BCL-2.^[29] Beberapa penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa, ketika terjadi mutasi gen, penurunan protein anti-apoptosis seperti gen Bax dan kelebihan ekspresi dari protein anti-apoptosis seperti BCL-2 juga menyebabkan proses proliferasi yang masif.^[30]



Gambar 3. Gambaran Imunohistokimia pada Beberapa Tipikal Sel Kanker Payudara yang Mengekspresikan gen BCL-2 pada Hasil Penelitian oleh Izabella *et al.*^[30]

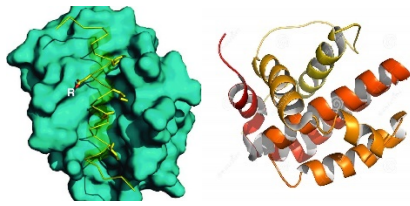
- A.Kanker Payudara Tipe Tubular, Sel Neoplastik dengan Sitoplasma Sedang
 B.Kanker Payudara Tipe Padat, *Immunostaining* Sitoplasma Intens untuk Bax dengan Nukleus Fokal Immunoreaktivitas (Panah : Sitoplasma dan Inti Sel)
 C.Karsinoma Payudara Tipe Kompleks, *Imunostaining* Sitoplasma Intens untuk CC3
 D.Karsinoma Payudara Tipe Padat, Ekspresi Protein p53 Menunjukkan Immunoreaktivitas Nuklir yang Intens

Protein pro-apoptosis seperti protein Bax bekerja sebagai anti-neoplasma dengan protein target BCL-2, apabila senyawanya memengaruhi protein pro-apoptosis ataupun anti-apoptosis.^[29] Pengaruh senyawa asetogenin ekstrak daun sirsak terhadap ekspresi protein pro-apoptosis (PUMA, Noxa, Bax) dapat dipengaruhi atau tidak dipengaruhi oleh p53.^[29]

Pernyataan di atas didukung oleh penelitian oleh Lio-Ru dan Kuo-Hu, penelitian yang dilakukan pada kanker payudara dengan melakukan pemberian biji kedelai dengan efek apoptosis pada sel kanker melalui mekanisme peningkatan ekspresi Bax tanpa diinduksi oleh gen p53.^[31] Peran dari protein Bax yaitu dengan mengendalikan kematian sel akibat gangguan respirasi sel pada mitokondria dan pelepasan sitokrom-c yang sering menjadi target kinerja gen p53.^[31] Penelitian lain yang mendukung penelitian di atas juga ditunjukkan oleh penelitian Orozeo dan Failla yang menunjukkan bahwa kulit buah manggis mampu menghambat apoptosis sel kanker payudara T47D dengan menekan gen BCL-2 dengan meningkatkan kinerja *caspase-3* dan peningkatan protein Noxa dan Omi/HtrA2.^[32]

Gen BCL-2 yang menjadi target p53 dalam proses *up-regulation* pada mekanisme kinerja apoptosis, hal ini dikarenakan gen p53 sebagai gen respor tumor yang menjadi sentral regulasi proses apoptosis.^[31] Gen p53 berperan dalam proses transkripsi yang mengatur ekspresi protein seperti Bax, Noxa, PUMA, Omi/HtrA2.^[32] Proses aktivasi dari gen p53 ini dapat terjadi akibat adanya stimulasi proses stres oksidatif, kekurangan asam folat dan piridoksin, radioterapi, atau kemoterapi.^[31] Pada sel tumor yang kehilangan struktur dan fungsi gen p53 sering ditemukan penurunan ekspresi dari protein Bax, hal ini diakibatkan oleh protein Bax membentuk saluran membran mitokondria dan sebagian besar mengalami proses translokasi bahkan delesi ke mitokondria, maka daripada itu pengaruh protein Bax, Noxa, PUMA, ataupun Omi/HtrA2 perlu ditinjau lebih

lanjut untuk bisa menjadi pembanding dan menelaah terhadap pengaruh ekspresi gen anti-apoptosis BCL-2 *continuous cell* T47D pada kanker payudara.^[33]



Gambar 4. Gen BCL-2 sebagai Protein Regulator yang Mengatur Proses Apoptosis Sel dengan Mekanisme Inhibitor Anti-Apoptosis dan Induksi Pro-Apoptosis.^[30]

Sementara, keluarga anti-apoptosis seperti protein BCL-2 yang berperan penting dalam pengaturan kematian sel yang terprogram, famili dari BCL-2 ini terbagi menjadi tiga kelompok yaitu anti-apoptosis, pro-apoptosis, dan pro-apoptosis BH-3.^[34] Proses kinerja protein BCL-2 ini dapat melakukan *attachment* pada membran luar dari mitokondria, kemudian menghambat dari pelepasan sitokrom-c, sedangkan kelompok anti-apoptosis protein ini akan menghambat dari pelepasan sitokrom-c dan *apoptosis activating factor-1* (APAF-1).^[34] Sitokrom-c dan APAF-1 ini berperan penting dalam jalur instrinsik mekanisme apoptosis dengan pengaktifan *caspase-9* untuk bertahan hidup.^[34] Namun, sistem pertahanan ini tidak diimbangi dengan fungsi apoptosis sel yang diperantarai oleh Bax dan Bak sebagai pro-apoptosis yang bekerja dengan berikatan dengan membran luar mitokondria dan akan menyebabkan terjadinya pelepasan sitokrom-c dari mitokondria, sedangkan Bak akan berikatan dengan Bcl-xl (anti-apoptosis) untuk membebaskan APAF-1, apabila tidak terjadi *up-regulation* atau *down-regulation* pada sistem regulasi BCL-2 ataupun Bcl-xl, hal ini berujung pada kematian sel yang diperantarai oleh pengaktifan *caspase-9* dan *caspase-3*.^[34]

Apoptosis sebagai serangkaian proses pengaturan kematian sel dengan tujuan mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang mengalami degradasi atau cacat.^[35] Proses apoptosis ini melibatkan intraseluler, sel yang mengalami apoptosis akan mengaktifasi enzim untuk mendegradasi DNA pada protein dan nukleus sel sehingga sel mengalami perubahan bentuk menjadi sel yang mati sehingga pada akhirnya menjadi target fagositosis yang akan dilakukan oleh makrofag, akan tetapi pada kejadian ini membran plasma sel tetap utuh sesuai bentuk awalnya yang akan menjadi incaran utama.^[35] Sel yang telah mengalami apoptosis akan mengalami eliminasi sebelum terjadinya lisis sel sehingga akan menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi yang akan terlihat tanda-tanda inflamasi berupa tumor, kalor, rubor, dolor, dan *functiolaesa*.^[35]

Proses apoptosis ini biasanya akan berfungsi dalam regulasi jumlah sel dan membersihkan sel yang rusak untuk supresi gen tumor disamping juga menjalankan proses kematian sel yang terprogram.^[35] Gambaran yang terlihat pada sel yang mengalami kanker biasanya menunjukkan sel mengalami penyusutan, pepadatan kromatin, dan badan apoptosis yang mudah untuk difagositosis oleh makrofag.^[35] Proses terjadinya apoptosis ini diperantarai oleh kinase di *growth factor signaling*

pathways dan *particular proteases* yang dikenal dengan *caspase*.^[36] Fase terjadinya apoptosis dibagi menjadi fase inisiasi, pada fase ini *caspase* menjadi aktif untuk proses peningkatan laju reaksi kimiawi sel atau katalisis, dilanjutkan fase eksekusi di mana enzim akan beraksi untuk menjalankan fungsi membuat sel menjadi apoptosis.^[36,37]

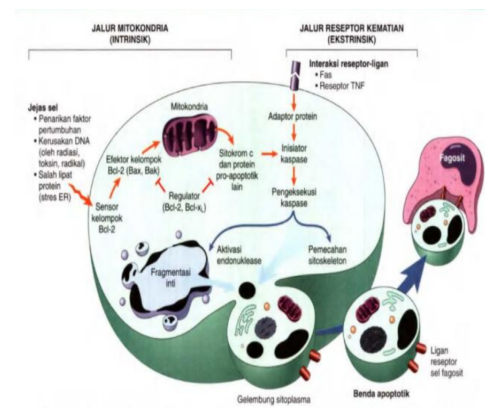
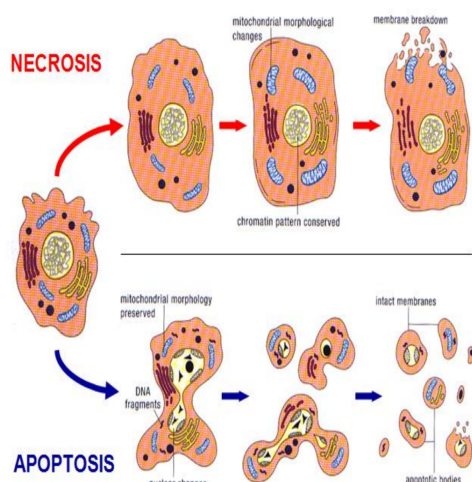
Jalur terjadinya apoptosis secara umum dibagi menjadi dua jalur yaitu tergantung *caspase* dan tidak tergantung *caspase*.^[38] Jalur tergantung *caspase* terbagi menjadi jalur ligan instrinsik dan ekstrinsik. Pada jalur ekstrinsik, jalur *caspase* distimulasi oleh reseptor apoptosis sedangkan pada jalur instrinsik dimulai dengan pelepasan faktor sinyal dari mitokondria dalam sel, mitokondria berperan sebagai *crossstalk organelle* yang berperan dalam jalur apoptosis yang berbeda.^[38] Pada jalur ekstrinsik biasanya dimulai dengan pelepasan ligan bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis, ligan akan berikatan dengan *death receptor* yang terletak di trans-membran sel target yang menginduksi apoptosis. Reseptor kematian yang terletak pada permukaan sel adalah seluruh keluarga reseptor *tumor necrosis factor* (TNF), CD 95 (Fas), dan *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-R1 dan R2.^[38] Ligan yang berikatan dengan reseptor kematian tersebut akan mengakibatkan inisiator *caspase-8* membentuk trimer dengan adaptor *fas associated death domain* (FADD), hasil ikatan tersebut membentuk *death inducing signaling complex* (DISC), CD 95, TRAIL-R1, dan R2 yang secara kompleks dan direk akan terikat dengan FADD, sedangkan TNF-R1 terikat secara indirek melalui molekul adaptor *TNF-receptor associated death domain protein* (TRADD).^[36,39]

Jalur instrinsik apoptosis biasanya disebabkan oleh stres mitokondria karna hilangnya faktor penting pertumbuhan dan aktivitas sel atau senyawa kimia, sehingga dapat menyebabkan gangguan pada proses seluler di mitokondria, sehingga terjadilah pelepasan sitokrom-c dari intermembran mitokondria. Selanjutnya, akan terjadi pemotongan gen BCL-2 oleh protein *caspase-8* yaitu pro-apoptosis BH-3 Bid.^[36] Protein Bid yang telah terpotong di bagian tepi protein ini akan menyebabkan terjadinya pelepasan molekul-molekul pro-apoptosis seperti *apoptosis inducing factor* (AIF), Omi/Htr2, sitokrom-c, dan Samc/Diablo, selanjutnya dengan bantuan dATP akan terbentuk apoptosom akibat interaksi kompleks *caspase-9*, APAF-1, dan sitokrom-c.^[40] Selanjutnya, kompleks *caspase-9* akan mengaktifkan kinerja *downstream* dari pro-*caspase-3*, protein *caspase-3* akan memecah bahkan menghancurkan substrat seperti *poly-ADP ribose polymerase* (PARP) sebagai unit DNA repair dan protein struktural nukleus dan seluler sebagai DNA protein kinase, aparatus mitotik inti, *caspase-activated deoxy-ribonucleid inhibitor* (ICAD) sebagai aktin dan endonuklease, lamina nukleus, serta konstituen seluler lainnya.^[36,40]

Peran dari *caspase-3* juga dapat mengaktifkan kinerja dari pro-*caspase-6* dan pro-*caspase-7* yang berperan dalam amplifikasi kerusakan seluler.^[38] Akibat adanya stres seluler atau bahkan pajanan radiasi akan meningkatkan ekspresi protein p53 yang memicu proses terjadi apoptosis dan *gastrointestinal arrest*.^[36,40] Terjadinya apoptosis juga dapat disebabkan oleh aktivitas kinerja *caspase* independen dan dependen.^[41] Jalur *caspase* dependen sering diawali dengan ligan merangsang perubahan dari potensial membran aksi mitokondria sehingga akan

memicu terjadinya produksi radikal bebas yang akan merangsang dari pengaktifan *caspase* untuk mendorong terjadinya apoptosis.^[41] Sementara, jalur *caspase* independen tidak terlalu berperan dalam menghasilkan radikal bebas, tetapi banyak disebabkan oleh kerusakan mitokondria untuk menghasilkan produk radikal bebas akibat *granzyme-A* (GzmA) yang memicu peningkatan reaktif oksigen spesies dengan target khusus retikulum endoplasma asosiasi kompleks 270-420 kDa yang mengandung GzmA-*activated* DNase NM23-H1 atau kompleks SET yang dipercaya berperan dalam tumorigenesis, selain itu GzmA juga memicu perjalanan *caspase* jalur independen dan dapat menginduksi secara langsung peningkatan senyawa oksigen reaktif.^[41]

Selain proses apoptosis, jalur kematian sel yang dihubungkan dengan hilangnya kontinuitas dan integritas membran serta bocornya isi sel yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel dikenal dengan proses nekrosis.^[35] Sel yang bocor mengakibatkan reaksi lokal yang dikenal dengan radang.^[35] Pada proses nekrosis ini terjadinya diskontinuitas organel sel dan membran plasma, dilatasi mitokondria dengan karakteristik benda amorf, gambaran mielin dalam sitoplasma akibat dari kerusakan lisosom.^[35] Gambaran basofil kromatin akan memudar (kariolisis), gambaran inti mengecil dan warna basofil meningkat yang dikenal dengan piknosis, terkadang DNA berubah menjadi massa padat yang menyusut, gambaran lain dari proses nekrosis yaitu inti piknotik mengalami reproduksi atau fragmentasi, kemudian terjadi kehilangan nukleus dalam 1 atau 2 hari, sel nekrotik biasanya akan dicerna enzim dan menghilang, sehingga akan diganti oleh benda mielin yang akan difagositosis oleh sel lain atau dirubah menjadi asam lemak yang akan mengikat garam kalsium sehingga akan terjadi kalsifikasi pada sel yang telah mengalami nekrosis.^[42]



Gambar 5. Proses Terjadinya Apoptosis dan Nekrosis.^[35]

Ditinjau pada penelitian ini dengan jalur yang dijelaskan mengenai proses terjadinya apoptosis pada suatu sel, hal ini terkait dengan dengan apoptosom yang akan menginisiasi pro-*caspase-9* dan mengubahnya menjadi *caspase-9*, *caspase-9* ini dapat diinhibisi oleh BCL-2 dan Bax-xl yang pada normalnya kedua protein anti-apoptosis ini berada pada sitoplasma dan mitokondria, kedua protein ini biasanya akan menghilang apabila terkena stres oksidatif.^[29] Karena proses stres oksidatif ini terus menerus berlanjut, maka protein anti-apoptosis ini akan digantikan oleh Bax, Bak, dan Bim sebagai protein pro-apoptosis.^[29] Sehingga, hal ini akan mengakibatkan dari terjadinya peningkatan permeabilitas membran mitokondria sehingga protein yang pengatur *caspase* keluar dari sitoplasma.^[29] Hal ini yang sering dikaitkan dengan ekstrak daun sirsak, selain dapat meningkatkan ekspresi pro-apoptosis Bax, ekstrak daun sirsak juga dapat meningkatkan bahkan mengaktifkan pensinyalan p53.^[29] Pentingnya penelitian lebih lanjut terkait protein Bax dan p53 ini penting diteliti pada ekstrak daun sirsak dan pengaruhnya terhadap kanker payudara.

Penelitian oleh Looi *et al.* menunjukkan bahwa ekspresi dari gen BCL-2 yang tinggi memiliki luaran yang buruk pada beberapa kanker termasuk kanker payudara, kanker prostat, kanker serviks, dan melanoma.^[43] Pada penelitian lainnya yang bersifat kontradiksi, ekspresi BCL-2 merupakan suatu luaran prognosis penentu kelangsungan hidup yang baik pada sel. Hal ini erat kaitannya dengan asas proporsionalitas dan netralisasi yang menyangkut ekspresi BCL-2 dapat menginhibisi dari pro-apoptosis Bax, pro-apoptosis ini biasanya membentuk homodimer diantara protein-protein pro-apoptosis itu sendiri, sementara gen BCL-2 membentuk kompleks yang heterogen dengan berikatan pada protein pro-apoptosis, sehingga hal ini akan menyebabkan efek apoptosis tidak terjadi.^[43]

Penelitian oleh Yahaya *et al.* menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak juga dapat menimbulkan apoptosis dengan perantara oleh BCL-2 terhadap continuous cell T47D, MDA, dan SKBR-3.^[44] Bahkan ekstrak daun sirsak memiliki efek sitotoksik aktif apabila memiliki nilai IC-50 < 30 µg/ml dan tidak aktif bersifat sitotoksik jika nilai IC-50 jika msa inkubasi melebihi dari 24 jam.^[44] Selain itu, merujuk pada penelitian oleh Adewolle *et al.* penentu dari kerentanan sel terhadap proses apoptosis adalah faktor gen BCL-2, protein pro-apoptosis, dan anti-apoptosis, peran BCL-2 penting untuk memperantarai dari aktivasi *caspase-3* melalui sitokrom-c yang

menghambat dari *caspase-9*.^[45] Proses apoptosis ini juga diperantarai oleh kaskade yang dicetuskan oleh *death receptor* yang berinteraksi dengan ligan ekstrinsik pada trans-membran sel yang akan mencetuskan dari reseptor *tumor necrosis factor* (TNF), CD 95 (Fas), dan *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-R1 dan R2.^[45]

Penelitian oleh Chatterjee *et.al.* menunjukkan bahwa rasio antara Bax dan BCL-2 dari pemeriksaan *karyotyping* DNA yang telah bermutasi akan memiliki korelasi kuat dengan hasil pada tingginya risiko Bax/BCL-2 ($p=0,003$) akan menghasilkan luaran yang baik pada pemeriksaan *karyotyping* DNA.^[46] Jika dilihat dari mekanisme kerja dari asetogenin pada ekstrak daun sirsak, mengakibatkan pengaktifan *caspase-9* akibat dimerisasi, translasi ataupun delesi mitokondria ke sitosol, BCL-2 sebagai gen anti-apoptosis akan menyebabkan penekanan translokasi sitokrom-c untuk menurunkan ekspresinya, konsekuensi yang ditimbulkan adalah protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak, dan Bim akan meningkat sehingga akan memicu terjadinya apoptosis.^[47] Berdasarkan penelitian oleh Saelans dan Boskovic menunjukkan bahwa pada ekspresi gen BCL-2 erat kaitannya dengan peran penting dari *mitochondrial outer membrane* (MOM) dan protein BH-3.^[48,49]

Peran dari MOM ini adalah bagian dari membran mitokondria yang mengatur dari tingkat permeabilisasi sel, pemisah sitosol dan ruang antar membran, memperantarai pertukaran metabolit, kation, informasi pada sel, proteksi molekul kecil seperti adenin nukleotida, kreatin fosfat, dan kreatin kinase.^[50] Apabila MOM ini mengalami kebocoran, maka akan terjadi pelepasan sitokrom-c dan faktor pemicu protein pro- apoptosis seperti Bax, Bak, Bim sebagai konsekuensi dari fosforilasi sitosolik yang menurun dan bionergi yang berkurang.^[50] Selain peran MOM, protein BH-3 juga memiliki peran dalam aktivator protein Bax dan Bak untuk mempresentasikan MOM serta menekan dari protein anti-apoptosis pada mitokondria dan retikulum endoplasma, karena afinitasnya yang tinggi untuk mengikat dan mempresentasikan protein pro-apoptosis tersebut sehingga protein ini dikenal dengan "*orchestrators of apoptosis*".^[51]

Maka daripada itu, berdasarkan teori yang ada dan penelitian yang telah dilaksanakan tidak terdapat pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap ekspresi gen BCL-2 *continuous cell* T47D kanker payudara. Hasil penelitian oleh Yahaya *et.al* juga menyatakan hal yang sama bahwa terdapatnya efek sitotoksik yang ditimbulkan oleh ekstrak daun sirsak dengan meningkatnya kematian sel seiring dengan peningkatan dari konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap sel kanker payudara cell line MDA, dan SKBR3 dengan nilai IC-50 masing-masingnya adalah 248,77 $\mu\text{g/ml}$ dan 202,33 $\mu\text{g/ml}$, dan tidak memiliki efek sitotoksik pada sel normal lien.^[44]

Berdasarkan teori oleh *National Cancer Institute*, ekstrak dikatakan memiliki efek sitotoksik apabila memiliki nilai IC-50 <30 $\mu\text{g/ml}$, moderat aktif jika nilai IC-50 \geq 30 $\mu\text{g/ml}$ atau IC-50<100 $\mu\text{g/ml}$, dan tidak aktif jika nilai IC-50 > 100 $\mu\text{g/ml}$.^[52] Jika dikaitkan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa, daun sirsak yang mengandung asetogenin tidak efektif dalam menurunkan kadar ekspresi gen anti-apoptosis BCL-2 pada *continuous cell* T47D kanker payudara disebabkan oleh karena penyebab konsentrasi ekstrak yang diberikan, semakin besar konsentrasi ekstrak daun sirsak yang diberikan semakin kecil

persentase viabilitas sel, dan semakin lama masa inkubasi semakin rendah persentase viabilitas sel.^[52]

Jika dikaitkan dengan teori oleh Menten tentang pendudukan sebuah reseptor yang menyatakan bahwa efek dari suatu senyawa bioaktif muncul diakibatkan karena terdapatnya interaksi dengan reseptor sel, intensitas suatu efek bahan bioaktif akan berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikat, dan fraksi reseptor tergantung pada dosis dan lama paparan.^[53] Semakin lama paparan dan semakin besar dosis dari suatu senyawa kimia maka intensitas akan meningkat.^[53] Teori ini didukung oleh penelitian Kusuma bahwa terdapat pengaruh antara lamanya masa inkubasi terhadap proliferasi dari sel kanker payudara dan nilai IC-50.^[54] Sehingga, hal ini dapat menjadi faktor dan alasan penting tidak terdapat pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap ekspresi gen BCL-2 *continuous cell* T47D kanker payudara.

SIMPULAN

Terdapat perbedaan yang signifikan dan bermakna pada nilai *cycle quantification* RT-PCR gen BCL-2 pada sel kelompok menggunakan ekstrak daun sirsak dan tanpa perlakuan (kontrol). Selain itu, ekstrak daun sirsak yang mengandung asetogenin tidak efektif dalam menurunkan kadar ekspresi gen anti-apoptosis BCL-2 pada *continuous cell* T47D kanker payudara.

SARAN

Pentingnya untuk melakukan telaah lanjut dan pengembangan penelitian untuk melihat faktor risiko lain yang memengaruhi gen BCL-2 seperti protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak, Bim atau gen lainnya seperti Noxa, PUMA, Omi/HtrA2, proses karsinogenesis dan pola kematian gen dan protein terkait, mekanisme *death cell* kanker payudara tipe T47D *continuous cell* secara biomolekuler. Disarankan untuk melakukan penelusuran lanjutan terkait hubungan ekstrak daun sirsak dengan jalur p53 sebagai jalur proliferasi dan pengendali sel kanker yang masif melalui studi *in-vitro* dan *in-vivo* terkait fitur klinis ekstrak daun sirsak ini agar dapat digunakan sebagai herbal berbasis bioteknologi untuk masyarakat di masa depan disamping keefektifan dan keefisienan dari terapi yang bersifat alamiah ini. Hal yang paling penting adalah pada penelitian lanjutan perlu dilakukan pengukuran tentatif akan daya yang dibutuhkan, perkiraan sampel yang handal untuk melihat kebutuhan yang sesuai berdasarkan pemberian terapi pemberian ekstrak sirsak ini sesuai prinsip yang rasional. Selain itu penting akan studi lanjutan untuk melihat asosiasi paparan dan kejadian (*odd ratio*) ataupun perbandingan angka prevalensi antara kelompok paparan.

KETERBATASAN PENELITIAN

1. Penelitian ini belum menghitung secara tentatif daya yang dibutuhkan, perkiraan yang handal sesuai minat untuk melihat kebutuhan yang sesuai dalam pemberian asetogenin dalam menginduksi penurunan kadar ekspresi gen anti-apoptosis BCL-2 pada *continuous cell* T47D kanker payudara. Pada penelitian ini, hanya dilihat pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap ekspresi gen BCL-2 sel kanker payudara T47D dengan menggunakan

metode PCR *real time* dalam masa inkubasi 72 jam saja.

- Penelitian ini masih bersifat *true experimental* dengan melihat nilai rata-rata, standar deviasi, dan taraf signifikansi Cq antara kelompok kontrol dan perlakuan, selain juga melihat nilai rasio ekspresi gen BCL-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada semua instansi yang telah membantu penyelesaian penelitian ini terutama Dr. Dessy Arisanty, S.Si, M.Sc, dr. Hirowati Ali, PhD, dr. Tofrizal, PhD, Sp.PA, M.Biomed, dan Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Andalas.

DAFTAR PUSTAKA

- Danny RY, Susanna MC, Cheng HY, Peter D. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med*. 2014;11:101-15.
- Sergiusz L, Marcin C, Alicja F, Jacek B, Robert S, Andrzej S. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*. 2021;13:4287-93.
- GLOBOCAN (2020c). International Agency for Research on Cancer : Estimated number of new cases from 2020 to 2040, both sexes, age [85+] [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 25]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&single_unit=500000&cancers=20
- World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Disease Burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018; Available online: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html (accessed on March, 25th 2022).
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et.al. Global Cancer Observatory Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- Ginsburg O, Bray F, Coleman M, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, et.al. The global burden of women's cancers: A grand challenge in global health. *Lancet*. 2016;389:847-60.
- Vostakolaei FA, Karim-Kos HE, Janssen-Heijnen MLG, Visser O, Verbeek ALM, Kiemeny L. The validity of the mortality to incidence ratio as a proxy for site-specific cancer survival. *Eur J Public Health*. 2010;21:573-77.
- Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, et.al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. New York: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- Sharma, R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990–2016: Evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer*. 2019;26:428-45.
- Mugi W, Sofia H, Vita A, Rini N. Population based cancer registration in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*. 2021;13:1709-10.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Riset kesehatan dasar (RISKESDAS) tahun 2018. <http://www.kemkes.go.id/resources/download/info-terkini/hasil-riskesdas2018.pdf>.
- Gani. Tumor ganas. *J Poltekkes Jogja*. 2017; hal.6-25.
- Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Dr.M.Djamil. 2021. Data kunjungan pasien rawat jalan di RSUP Dr M Djamil Padang tahun 2017-2021 di Poliklinik Bedah Padang. Instansi Rekam Medik RSUP Dr M Djamil Padang.
- Adelina R, Febrianti R, Oktoberia IS, Intan PR. Ekstrak daun annona muricata linn sebagai antiproliferasi terhadap sel hepar tikus terinduksi 7,12 dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *Kefarmasian Indonesia*. 2015;4:1-12.
- Chitwood K, Etkorn J, Cohen G. Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: Efficacy and cost comparisons. *Dermatologic Surgery*. 2013;39:1306-16.
- Harahap WA. Pembedahan Pada Tumor Ganas Payudara. *Maj Kedokt Andalas*. 2015;38:57.
- Puspitasari ML. Aktivitas antioksidan suplemen herbal daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.). *J Pangan dan Agroindustri*. 2016;4:283–90.
- Puspita EW, Pujiasih. Efek ekstrak metanol daun sirsak (*annona muricata* linn) terhadap pertumbuhan kanker payudara mencit C3H. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 2014;3:17-23.
- Latief A. Obat tradisional. Jakarta: EGC; 2012
- Retnani V, Prajoko YW. Pengaruh suplementasi ekstrak daun annona muricata terhadap kejadian displasia epitel kelenjar payudara tikus sprague dawley yang diinduksi 7,12 dimethylbenz (a) anthracene. *Artikel Ilmiah Sarjana Kedokteran Universitas Diponegoro*. 2011.
- Muhartono, Subekti. Penggunaan ekstrak daun sirsak sebagai obat kemoterapi kanker payudara. *Prosiding Seminar Presentasi Artikel Ilmiah Dies Natalis FK Unila ke 13*. 2015;3:1-8.
- Hussaana A, Djam'an Q, Goenarwo E. Ekstrak daun Sirsak (*annona muricata*) sebagai penghambat perkembangan tumor payudara. *J Farm Sains dan Terap*. 2015;2:41-4.
- O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care*. 2018;18:572-85.
- Fidianingsih I, Handayani ES. Annona muricata aqueous extract suppresses T47D breast cancer cell proliferation. *Universa Med*. 2014;33:19-26
- Dewson G, Kluck RM. Bcl-2 family regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2010. p. 9–22.
- Arisanty D. In vitro cytotoxic study and detection of apoptosis on breast cancer cell lines mda-mb 231 after exposed to azadirachta indica a. juss (neem) extract. *J Kesehat Andalas*. 2013;2:80.
- Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C, Castro-Torres VA, Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Zentella-Dehesa. A selective acetogenins and their potential as anticancer agents. *Front Pharmacol*. 2019;10:1-12.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria?. *Genes to Cells*. 1998;3:697-707.

29. Yarsi J. Protein kelompok Bcl-2 sebagai target senyawa antikanker Bcl-2- family proteins as target of anticancer drug. 2016;14:238-42.
30. Izabella D, Magdalena K, Rafal S. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study. Elsevier. 2016;16:1-37.
31. Chin Y, Kinghorn AD. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. Mini Rev. Org. Chem. 2018;5:355-64.
32. Orozco GF, Chitchumroonchokchai C, Lesinski G, Suksamrarn S, Failla M. α -Mangostin: Anti-inflammatory activity and metabolism by human cells. J. Agric. Food Chem. 2013;61:3891-900.
33. Joseph F, Tomaszewski JR, Philip TC, Carol FF, Armando EF. Dall and hammars : neoplastic lung disease. New York: Springer; 2016. p.21.
34. Dai H, Meng W, Kaufmann S. BCL2 family, mitochondrial apoptosis, and beyond. Cancer Transl Med. 2016;2:7.
35. Vartiainen S. *Caenorhabditis elegans*. Encycl Mov Disord. 2010;3:171-73
36. Wong R. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. J Exp Clin Canc Res. 2011;30:1-14.
37. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Buku ajar patologi robbins/ Vinay Kumar; alih bahasa, Ening krisnuhoni; editor edisi Bahasa Indonesia, I Made Nasar, Santoso Cornain. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2013. p.16-20.
38. Sari LM. Mekanisme molekuler kematian sel. Cakradonya Dent J. 2018;10:65-70.
39. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia G, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging (Albany NY). 2016;8:603-19.
40. Indrasetiawan P, Astuti I. Activity of -terpineol as a potential anticancer candidate: cytotoxicity, proapoptotic and antiproliferative evaluation in TD47 cell lines. J Med Sci (Berkala Ilmu Kedokteran). 2015;44:10-7.
41. Dencic SM, Poljarevic J, Vilimanovich U. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. Chem Res Toxicol. 2012;25:931-9.
42. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res. 2013;1833:3448-59.
43. Looi CY, Moharram B, Paydar M, Arya A, Leong KH, Mohamad K. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds involves NF- κ B, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. BMC Complem Altern M. 2017;13:166-8.
44. Yahaya G. Phytochemical screening, antioxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). Asian Pac J Trop Med. 2014;7:355-63.
45. Adewole SO, Caxton MEA. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn.(annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. Afr J Biomed Res 2016;9:173-87.
46. Chatterjee S, Ovadje P, Griffin C, Tran C, Hamm C, Pandey S. Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. J Ethnopharmacol. 2021;133:86–91.
47. Lienggonegoro LA. Soursop leaf (*Annona muricata*) and its potential as an anti-cancer. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon. 2020;6:653-7.
48. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Grup MV, Loo GV, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene. 2012;23:2861-74.
49. Boskovic ZV, Adams DJ, Theriault JR, Wang AJ, Stern AM, Wagner BK, et.al. High-throughput screening identifies small-molecule enhancers of reactive oxygen species that are nontoxic or cause genotype-selective cell death. ACS Chem Biol. 2013;8:923-9.
50. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opaika JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, et.al. Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. Biochem Soc Trans. 2020;28:164-9.
51. Aisha SD, Hetal B, Bryan L, David WA. BH-3 only proteins : orchestrators of apoptosis. BBACMR. 2014;11:508-20.
52. Lilbaq FZ. Uji aktivitas ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Lin.) yang diembankan pada Zeolit NaX menggunakan metode impregnasi kering sebagai antikanker payudara T47D [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Malang; 2017.
53. Rachmawati E. Efek ekstrak etanolik daun sirsak pada proliferasi dan apoptosis sel HeLa yang dimediasi oleh p53. J Kedokt Brawijaya. 2012;27(1):3-8.
54. Kusuma RF. Nilai IC50 proliferasi sel kanker payudara yang diberi ekstrak umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) (Studi eksperimen in vitro terhadap sel T47D pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam)[Skripsi]. Semarang: Universitas Islam Sultan Agung Semarang; 2015.