



Aktivitas Sitotoksik dan Profil Kromatogram Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) yang Diiradiasi

(Cytotoxic Activity and Chromatogram Profile of Irradiated Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves)

ERMIN KATRIN^{1*}, RHILA AMALIAH², ZUHELMI AZIZ², HENDIG WINARNO^{1,2}

¹Laboratorium Bahan Kesehatan PAIR-BATAN, Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta Selatan,
12440.

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640.

Diterima 4 Maret 2014, Disetujui 18 Agustus 2014

Abstrak: Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman yang termasuk dalam suku Annonaceae, daunnya memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker. Usaha untuk mengawetkan daun sirsak kering dilakukan dengan teknik iradiasi gamma. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada bioaktivitas dan profil kromatogram fraksi aktif dari daun sirsak. Serbuk kering daun sirsak diiradiasi gamma dengan dosis 0 (kontrol); 5; 7,5; 10 dan 15 kGy dan diulang sebanyak dua kali untuk setiap dosis iradiasi. Kemudian masing-masing sampel dimaserasi secara bertahap dengan *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Setiap ekstrak diuji aktivitas sitotoksitasnya terhadap sel leukemia L1210. Ekstrak etil asetat paling aktif ($IC_{50} = 7,36 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksan (20,18 $\mu\text{g/mL}$) dan etanol (13,89 $\mu\text{g/mL}$). Ekstrak etil asetat difraksinasi menggunakan kolom kromatografi diperoleh 10 fraksi. Hasil uji aktivitas sitotoksik 10 fraksi diperoleh bahwa fraksi 8 paling aktif ($IC_{50} 0,45 \mu\text{g/mL}$). Aktivitas sitotoksik fraksi 8 dari sampel yang diiradiasi menunjukkan bahwa iradiasi gamma menurun aktivitas sitotoksik, namun masih dalam batas aktif ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$). Analisis dan identifikasi fraksi 8 dengan KCKT dan KLT-densitometri terlihat puncak yang mengalami penurunan luas pada sampel yang diiradiasi. Dosis maksimum untuk iradiasi daun sirsak dengan tidak merusak bioaktivitas dan tidak mengubah profil kromatogramnya adalah 7,5 kGy.

Kata kunci: daun sirsak, *Annona muricata* L., iradiasi gamma, aktivitas sitotoksik, sel leukemia L1210.

Abstract: Soursop (*Annona muricata* L.) is one of plants included in Annonaceae which the leaves has cytotoxic activity on cancer cells. Preservation efforts of soursop leaves is carried out by gamma irradiation technic. This research aimed to study the effect of gamma irradiation on the bioactivity and chromatogram profiles of the active fraction from soursop leaves. Dry powders of soursop leaves were irradiated using gamma with doses of 5; 7.5; 10; and 15 kGy and repeated twice, respectively for certain doses. Then each sample was macerated with *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol gradiently. Each extract was tested against leukemia L1210 cells. Ethyl acetate extract was the most active ($IC_{50} = 7.36 \mu\text{g/mL}$) compared with *n*-hexane (20.18 $\mu\text{g/mL}$) and ethanol extract (13.89 $\mu\text{g/mL}$). Ethyl acetate extracts was fractionated using column chromatography obtained ten fractions. The result of cytotoxic activities assay of ten fractions were obtained that fraction 8 was the most active with IC_{50} value of 0.45 $\mu\text{g/mL}$. Cytotoxic activity of fraction 8 from irradiated samples showed that gamma irradiation decreased cytotoxic activity of fraction 8, but they were still active ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$). Analysis and identification of fraction 8 by the HPLC and TLC-densitometry showed that there were broad peak which decreased in the irradiated samples. The maximum radiation dose for soursop leaves without damaging its bioactivity and that did not change the chromatogram profiles is 7.5 kGy.

Keywords: soursop leaves, *Annona muricata* L., gamma irradiation, cytotoxic activity, leukemia L1210 cell lines.

* Penulis korespondensi, Hp. 08158273801
e-mail: erminkk@batan.go.id



PENDAHULUAN

KANDUNGAN senyawa bioaktif fitokimia yang ditemukan dalam tanaman sirsak berbagai macam. Salah satu komponen yang bermanfaat penting adalah asetogenin. Senyawa ini hanya ditemukan pada keluarga Annonaceae yang awalnya dikenal sebagai pestisida dan antiparasit. Sejak tahun 1940, banyak ilmuwan yang telah mempelajari sifat senyawa asetogenin dan senyawa tersebut telah banyak digunakan dalam penelitian ilmiah kedokteran^(1,2). Senyawa asetogenin yang memiliki 350 senyawa turunan yang ditemukan pada keluarga Annonaceae, 82 senyawa diantaranya ada di dalam sirsak. Sifat sitotoksik asetogenin dilaporkan dapat menyerang dan mematikan sel kanker dengan aman dan selektif. Khasiat asetogenin menunjukkan bahwa daun dan batang *Annona muricata* L. memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker^(1,2,3).

Jerry L. McLaughlin dan Soelaksono Sastrodihardjo menemukan beberapa senyawa aktif yang termasuk dalam asetogenin. Beberapa diantaranya murikatosin A, murikatosin B, annonasin A, trans-isoannonasin, annonasin-10-one, dan murikatosin⁽¹⁾. Daun *Annona muricata* L. berkhasiat sebagai obat bisul, antikejang, peluruh keringat, antikanker, antitumor, antivirus, antibakteri, antijamur, anti-inflamasi (anti-peradangan), antidepresi, antihipertensi, antidiabetes, emetik, sedatif, analgesik dan antimutagenik^(4,5,6).

Asetogenin merupakan inhibitor enzim yang ditemukan di dalam jaringan sel kanker. Senyawa ini akan menghambat (memblokir) transportasi *adenosine triphosphate* (ATP) di dalam sel kanker. ATP adalah sumber energi di dalam tubuh yang bisa diibaratkan sebagai bahan bakar pertumbuhan sel kanker. Karena itu, sel kanker membutuhkan ATP dalam jumlah banyak untuk tumbuh dan berkembang biak, menjalankan pompa dan mengusir agen penyerang. Asetogenin yang ikut masuk ke dalam tubuh akan menempel pada reseptor dinding sel dan berfungsi merusak ATP di dalam dinding mitokondria. Akibatnya, produksi energi di dalam sel kanker pun terhenti dan akhirnya sel kanker mati.

Senyawa asetogenin hanya menyerang sel kanker yang memiliki kelebihan ATP. Asetogenin akan mengganggu peredaran darah sel kanker dengan mengurangi jumlah ATP dan mampu menutup pompa antar-sel. Asetogenin tidak menyerang sel-sel normal di dalam tubuh. Sel-sel normal jarang berkembang menggunakan mekanisme pompa, sehingga sel-sel normal tidak memerlukan sejumlah energi dalam jumlah yang besar untuk menjalankan proses pertumbuhan alaminya. Selain itu, sel normal tidak terpengaruh oleh inhibitor ATP. Hal inilah yang

membuat senyawa di dalam daun sirsak dianggap selektif dan hanya memilih sel kanker untuk diserang⁽⁷⁾.

Pada penelitian ini dipelajari pengaruh iradiasi gamma pada aktivitas sitotoksitas ekstrak daun sirsak. Teknik iradiasi gamma telah digunakan oleh beberapa perusahaan obat herbal untuk mempertahankan obat herbal tetap higienis dan diharapkan khasiatnya tidak berubah sampai ke konsumen. Dosis iradiasi gamma sampai 10 kGy yang diserap oleh bahan yang diiradiasi menurut *Codex Alimentarius Commission* merupakan dosis yang aman⁽⁸⁾.

Indonesia sudah memiliki peraturan resmi yang mengatur tentang dosis iradiasi maksimum, yaitu PERMENKES 701/MENKES/Per/VIII/2009 tentang pangan iradiasi⁽⁹⁾. Dalam peraturan tersebut terlampir jenis pangan yang diizinkan untuk diiradiasi, tujuan iradiasi dan dosis serap maksimum untuk masing-masing jenis pangan. Teknologi iradiasi gamma ditujukan untuk membuat bahan pangan menjadi lebih awet namun tetap aman, higienis, tidak menurunkan nilai gizi, sehingga dapat dikonsumsi manusia⁽¹⁰⁾. Khusus untuk obat herbal kering belum ada ketentuan dosis iradiasi maksimum, oleh karena itu perlu diteliti berapa dosis iradiasi gamma maksimum untuk daun sirsak kering yang diklaim sebagai obat penyakit kanker.

Serbuk kering daun sirsak diiradiasi, dimaserasi, dan difraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka. Fraksi-fraksi dari sampel kontrol yang diperoleh kemudian diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210. Fraksi dibuat dengan variasi konsentrasi yaitu 0,5; 1; 2; 4; dan 8 µg/mL. Fraksi yang paling aktif dari sampel yang diiradiasi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210 untuk mengetahui pengaruh iradiasi gamma terhadap aktivitas sitotoksiknya. Selain itu pengaruh iradiasi gamma dipelajari juga terhadap profil spektrum serapan melalui analisis spektrofotometer ultraviolet-visibel, profil kromatogramnya melalui analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT), KLT-densitometri dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun sirsak (*Annona muricata* L.) segar diperoleh dari kelompok tani Warung Kiara di Pelabuhan Ratu, Sukabumi, Jawa Barat. Daun sirsak dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong. Determinasi menunjukkan bahwa tanaman tersebut adalah *Annona muricata* L. suku Annonaceae. Sel leukemia L1210 dari The Institute of Physical and Chemical Research Jepang (RIKEN). Pelarut *n*-heksan, etil asetat, etanol,

metanol, kloroform, Roswell Park Memorial Institute [RPMI 1640 (Gibco)], *calv bovine serum* (Gibco), *tryphan blue*, silika gel *mesh 70-230* (Merck), *cellite 545* (Merck), lempeng silika GF₂₅₄ (Merck), larutan penampak bercak serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10% dan metanol HPLC (Prolabo).

Alat. Iradiator karet alam (IRKA), kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu C-R4A), spektrofotometer ultraviolet-visibel (HP8453), peralatan untuk kromatografi kolom, rotavapor, inkubator CO₂, oven, otoklaf, penguap putar vakum/rotavapor (Eyela dan Buchi), desikator hampa, lampu UV 254 nm dan 366 nm (Camag), densitometer (TLC Scanner 3 Camag), *multi well plate tissue's culture*, *haemocytometer* (Neubauer improved), pemanas listrik (*hot plate*), pencuci ultrasonik, timbangan analitik (Mettler Toledo), *laminar air flow* (LAF), mikroskop (Nikon HFX-DX), alat *seal matic*, lemari pendingin (*freezer*), dan alat-alat gelas.

METODE. Persiapan Sampel. Daun sirsak dicuci bersih dan dikeringkan di ruang bersuhu 24 °C selama kurang lebih tiga minggu. Daun sirsak dihancurkan sampai menjadi serbuk dengan susut pengeringan 8,73%. Serbuk daun sirsak dimasukkan ke dalam kantong plastik poli etilen dan ditutup rapat. Disiapkan 10 kantong plastik, kemudian diisi serbuk daun sirsak masing-masing 80 g/kantong.

Iradiasi Sampel dan Pembuatan Ekstrak. Daun sirsak diiradiasi gamma dengan sumber ⁶⁰Co pada dosis 5; 7,5; 10 dan 15kGy di IRKA PAIR-BATAN, dilakukan ulangan sebanyak dua kali. Pada bulan Januari 2012 aktivitas sumber ⁶⁰Co yaitu 134.000 Ci dengan laju dosis 9 kGy/jam. Masing-masing serbuk daun sirsak kontrol dan yang telah diiradiasi dimaserasi bertingkat menggunakan pelarut berturut-turut *n*-heksan, etilasetat, dan etanol.

Pengujian Sitotoksitas Ekstrak dengan Metode Pembacaan Langsung⁽¹⁾. Ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol dari serbuk daun sirsak kontrol masing-masing diuji aktivitas sitotoksiknya secara *in vitro* terhadap sel leukemia L1210 dengan menghitung nilai aktivitas sitotoksiknya. Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak dilakukan dengan variasi konsentrasi 5; 10; 20; 40 dan 80 µg/mL, percobaan dilakukan duplo. Sebagai blanko digunakan metanol sebanyak 10 µL. Sel leukemia L1210 disuspensikan ke dalam media yang telah mengandung *calv bovine serum* sehingga jumlah sel sekitar 2 x 10⁵ sel/mL. Media mengandung suspensi sel leukemia L1210 sebanyak 990 µL dimasukkan ke tiap sumuran dalam *multi well plate tissue's culture*, lalu ditambahkan 10 µL bahan uji, sehingga volume total media sel kanker dan bahan uji sebanyak 1 mL. Suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada

suhu 37 °C dalam inkubator 5% CO₂. Setelah 48 jam dilakukan perhitungan sel. Suspensi sebanyak 90 µL dimasukkan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran), ditambahkan 10 µL larutan 1% *tryphan blue*, dan dihomogenkan. Jumlah sel dihitung dengan metode pembacaan langsung dalam hemositometer Neubauer improved di bawah mikroskop. Hasil analisis diolah menggunakan statistik nilai probit sehingga diperoleh nilai IC₅₀ (konsentrasi zat uji yang dapat menghambat sebanyak 50% sel leukemia L1210 setelah masa inkubasi selama 48 jam). Ekstrak dengan nilai IC₅₀ ≤ 20 µg/mL dinyatakan aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210.

Pemisahan Ekstrak dengan Kromatografi Kolom. Ekstrak yang paling aktif difraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan adsorben silika gel 60 (70-230 *mesh*). Proses pemisahan setiap fraksi seberat 1 g dilakukan dengan pengelusi sistem landaian (gradien) dengan eluen *n*-heksan:etilasetat (30:1; 20:1; 10:1; 5:1; 3:1; 2:1; 1:1); etil asetat; etilasetat:metanol 1:1; dan metanol. Setiap fraksi ditampung sebanyak 150 mL. Setiap fraksi yang diperoleh dipekatkan kemudian dikeringkan dalam desikator vakum hingga diperoleh bobot konstan. Setiap fraksi dianalisis dengan KLT, fraksi-fraksi yang mempunyai pola kromatogram sama akan digabung.

Pengujian Sitotoksitas. Fraksi-fraksi dari sampel kontrol yang diperoleh kemudian diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210 fraksi dengan variasi konsentrasi fraksi 0,5; 1; 2; 4; dan 8 µg/mL. Fraksi yang paling aktif dari sampel yang diiradiasi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210 untuk mengetahui pengaruh iradiasi gamma terhadap aktivitasnya. Metode yang digunakan sama dengan pengujian sitotoksitas ekstrak dengan metode pembacaan langsung.

Identifikasi Fraksi Paling Aktif dengan Spektrofotometri UV-vis. Ditimbang 1 mg fraksi paling aktif (dari sampel yang tidak dan yang diiradiasi), masing-masing dilarutkan dalam etil asetat 10 mL sehingga diperoleh pembacaan serapan antara 0,2-0,8. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer ultraviolet-visibel pada panjang gelombang 200-700 nm. Berdasarkan spektrum dipelajari pengaruh iradiasi gamma pada serapan larutan fraksi dan diperoleh panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk analisis fraksi dengan KCKT.

Analisis KLT. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Setiap fraksi ditotolkan sebanyak 5 µL dengan konsentrasi 10.000 µg/mL pada lempeng silika gel GF₂₅₄, kemudian masing-masing fraksi dieluasi dengan eluen yang sesuai. Setelah itu bercak diamati

di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Lempeng kemudian disemprot dengan pereaksi penampak bercak serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga berbentuk bercak yang tetap.

Identifikasi Ekstrak dan Fraksi Paling Aktif Daun Sirsak dengan KLT-Densitometri. Ekstrak paling aktif dan fraksi paling aktif daun sirsak ditotolkan masing-masing sebanyak 5 μ L (konsentrasi 10.000 μ g/mL) pada lempeng silika gel GF₂₅₄ kemudian dieluasi dengan eluen yang sesuai. Kemudian hasil eluasi dianalisis dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum (280 nm) yang didapat dari spektrofotometri UV-vis untuk fraksi dan 254 nm untuk ekstrak.

Pemeriksaan Profil Kromatogram dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Fraksi paling aktif dengan dosis iradiasi 0; 5; 7,5; 10 dan 15 kGy dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Fraksi paling aktif ditimbang 1,6 mg dan dilarutkan dengan 1 mL metanol, kemudian disaring dengan filter membran. Larutan disuntikkan ke inlet dengan volume 20 μ L dengan eluen metanol : air (85 : 15) pada panjang gelombang 280 nm dan laju alir 1 mL/menit.

Analisis Data. Data IC₅₀ fraksi paling aktif, luas puncak utama hasil KCKT dan serapan spektrofotometri UV-vis yang pada panjang gelombang maksimum dianalisis dengan ANOVA satu arah menggunakan SPSS 20 *for windows* pada taraf kepercayaan 95%

($\alpha = 0,05$) untuk menunjukkan pengaruh iradiasi gamma terhadap aktivitas sitotoksik dari daun sirsak yang tidak diiradiasi (kontrol) dan yang diiradiasi, luas puncak serta serapan pada panjang gelombang maksimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi. Hasil ekstraksi secara maserasi serbuk kasar kering daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi (5; 7,5; 10; 15 kGy) dengan bobot masing-masing 80 g menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol ditampilkan pada Tabel 1. Ekstrak *n*-heksan dari serbuk kasar kering daun sirsak yang tidak diiradiasi (0 kGy) maupun yang diiradiasi (5; 7,5; 10; 15 kGy) berkisar antara 6,02 sampai 6,46 g. Ekstrak etil asetat berkisar antara 4,84 sampai 5,08 g, sedangkan ekstrak etanol berkisar antara 19,24 sampai 19,58 g. Ekstrak etanol memiliki persentase rendemen yang paling banyak dibandingkan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat. Hasil maserasi sampel kontrol dan yang diiradiasi menunjukkan bahwa iradiasi gamma tidak mempengaruhi jumlah ekstrak yang diperoleh.

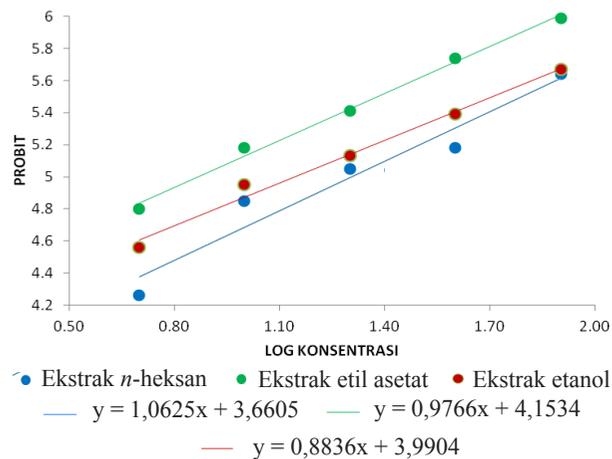
Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Daun Sirsak Kontrol terhadap Sel Leukemia L1210. Pada ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol daun sirsak yang tidak diiradiasi dilakukan uji aktivitas sitotoksik untuk mengetahui ekstrak yang paling aktif menghambat

Tabel 1. Hasil ekstraksi *n*-heksan, etil asetat dan etanol serbuk kering daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Ekstrak	Dosis Iradiasi (kGy)	Warna	Bobot Ekstrak (g)		Rata - rata	Rendemen (%)
			Simplo	Duplo		
<i>n</i> -heksan	0	Kuning	5,274	5,061	5,168	6,46
	5	Kuning	5,077	5,130	5,104	6,38
	7,5	Kuning	4,933	4,720	4,827	6,03
	10	Kuning	4,848	4,790	4,819	6,02
	15	Kuning	4,889	5,002	4,946	6,18
Etil asetat	0	Hijau	4,026	3,982	4,004	5,01
	5	Hijau	4,093	4,039	4,066	5,08
	7,5	Hijau	4,056	4,066	4,061	5,08
	10	Hijau	3,913	3,959	3,936	4,92
	15	Hijau	3,902	3,837	3,870	4,84
Etanol	0	Coklat	15,525	15,602	15,564	19,45
	5	Coklat	15,435	15,357	15,396	19,25
	7,5	Coklat	15,511	15,267	15,389	19,24
	10	Coklat	15,456	15,347	15,402	19,25
	15	Coklat	15,678	15,656	15,667	19,58



pertumbuhan sel leukemia L1210. Hasil uji aktivitas sitotoksik dari masing-masing ekstrak diperlihatkan pada Gambar 1. Berdasarkan persamaan regresi linier pada Gambar 1 diperoleh nilai IC_{50} untuk setiap ekstrak daun sirsak (Tabel 2).



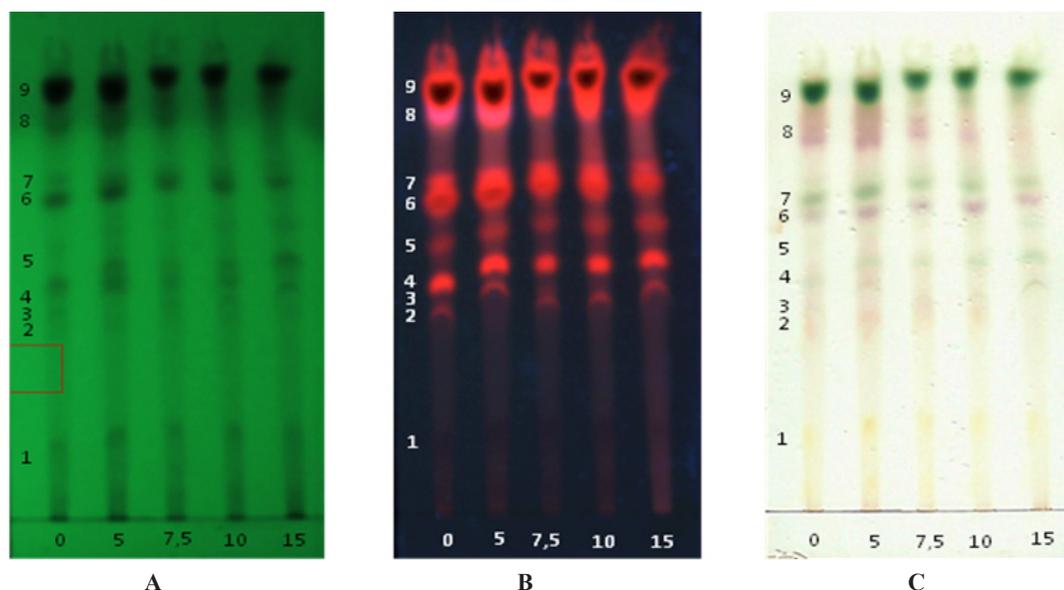
Gambar 1. Grafik hubungan antara log konsentrasi dan nilai probit ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol daun sirsak kontrol.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan etanol serbuk kasar kering daun sirsak kontrol (*Annona muricata* L.) terhadap sel leukemia L1210.

Ekstrak	Rendemen (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>n</i> -heksan	6,46	20,18
Etil asetat	5,01	7,36
etanol	19,45	13,89

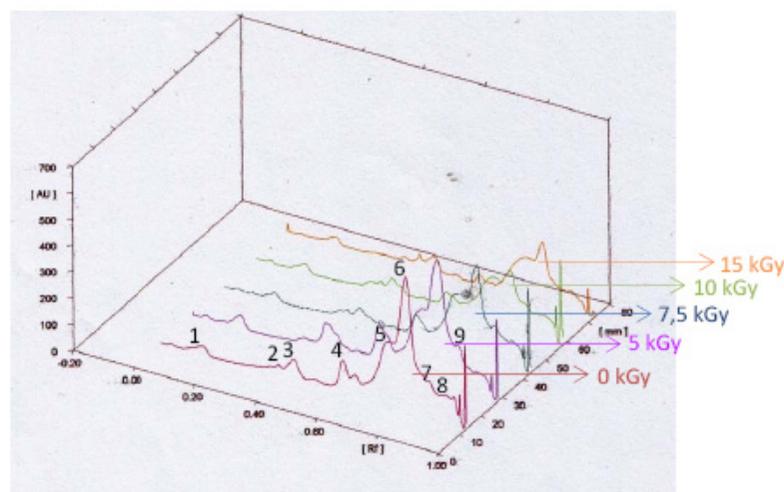
Ketiga ekstrak tersebut mempunyai aktivitas sitotoksik ($\leq 20 \mu\text{g/mL}$) artinya ketiga ekstrak tersebut berpotensi sebagai anti kanker. Suatu ekstrak tanaman dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker apabila memiliki nilai $IC_{50} < 20 \text{ mg/ml}$ ⁽¹²⁾. Aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat etil asetat ($7,36 \mu\text{g/mL}$) lebih besar dari ekstrak etanol ($13,89 \mu\text{g/mL}$) dan ekstrak *n*-heksan ($20,18 \mu\text{g/mL}$). Dari ketiga ekstrak tersebut, ekstrak etil asetat yang paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210. Selanjutnya ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom.

Analisis KLT Ekstrak. Analisis KLT dilakukan terhadap ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi, karena ekstrak etil asetat memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil terhadap penghambatan pertumbuhan sel leukemia L1210 yaitu $7,36 \mu\text{g/mL}$. Profil kromatogram ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi yang diamati pada lampu UV λ 254 nm (Gambar 2.A), λ 366 nm (Gambar 2.B) serta setelah disemprot dengan penampak bercak serum sulfat dan dipanaskan di atas *hot plate* (Gambar 2.C) terdapat 9 bercak. Secara umum semua bercak yang terdapat pada kromatogram kontrol juga terdapat pada kromatogram sampel yang diiradiasi namun pada kromatogram ekstrak etil asetat daun sirsak yang diiradiasi $\geq 7,5 \text{ kGy}$ terlihat adanya pemudaran bercak ke-8 warna (merah muda keunguan) Gambar 2.C, tetapi bercak tersebut masih terdeteksi dengan baik pada pengamatan λ 254 dan 366 nm.



Gambar 2. Pola kromatogram dari kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat dari daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi. A: kromatogram diamati pada lampu UV 254 nm, B: kromatogram diamati pada lampu UV 366 nm, C: kromatogram setelah disemprot penampak bercak dan dipanaskan, fase gerak: kloroform-metanol (7:3), fase diam: silika gel GF_{254} , deteksi: sinar UV 254 dan 366 nm, penampak bercak: serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%.





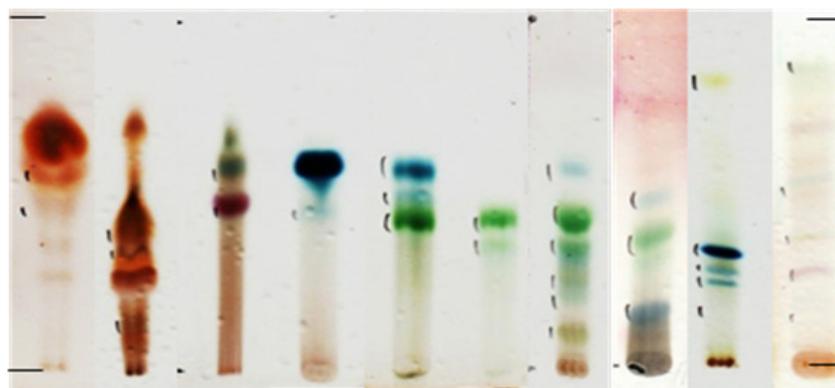
Gambar 3. Profil kromatogram KLT-densitometri ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi pada panjang gelombang 254 nm.

Analisis KLT-Densitometri. Pada kromatogram ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan hasil iradiasi yang diamati pada λ 254 nm terdapat 9 puncak. Profil kromatogram KLT-densitometri ekstrak etil asetat ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan profil kromatogram KLT-densitometri pada Gambar 3 terlihat ada 9 puncak dan ada perbedaan luas puncak antara sampel kontrol dengan yang diiradiasi. Puncak ke-6 adalah puncak utama karena memiliki luas yang paling besar namun pada dosis $\geq 7,5$ kGy terjadi penurunan luas pada puncak 6. Secara umum, luas puncak menurun seiring meningkatnya dosis iradiasi. Penurunan luas puncak seperti yang terjadi diakibatkan adanya kerusakan komponen akibat iradiasi, namun ada beberapa puncak mengalami peningkatan luas yang diduga disebabkan adanya degradasi senyawa sehingga membentuk komponen baru.

Fraksinasi dan KLT Fraksi-fraksi. Fraksinasi dilakukan pada ekstrak daun sirsak yang paling aktif

saja dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 yaitu ekstrak etil asetat daun sirsak dengan IC_{50} sebesar $7,36 \mu\text{g/mL}$. Dari hasil fraksinasi dengan metode kromatografi kolom diperoleh 10 fraksi. Fraksi 7 mempunyai rendemen dengan persentase terkecil (0,01 g), sedangkan fraksi 9 persentasenya paling besar (0,42–0,46 g). Persentase rendemen hasil fraksinasi ekstrak etil daun sirsak setelah iradiasi ada yang meningkat dan ada juga yang menurun. Hal ini disebabkan adanya pengaruh iradiasi gamma terhadap komponen-komponen tertentu yang kemudian mengalami perubahan struktur sehingga terjadi perbedaan bobot komponen-komponen yang terekstrak ke dalam pelarut selama maserasi. Analisis KLT terhadap 10 fraksi dari ekstrak etil asetat daun sirsak ditunjukkan pada Gambar 4.

Aktivitas Sitotoksik Fraksi-fraksi terhadap Sel Leukemia L1210. Uji aktivitas sitotoksik fraksi-fraksi terhadap sel leukemia L1210 hanya dilakukan



Fr 1 Fr 2 Fr 3 Fr 4 Fr 5 Fr 6 Fr 7 Fr 8 Fr 9 Fr 10

Gambar 4. Pola kromatogram dari kromatografi lapis tipis fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak etil asetat menggunakan kromatografi kolom. Fase diam: silika gel GF₂₅₄, detektor: sinar UV 254 nm, penampak bercak: serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%, fase gerak: *n*-heksan-etil asetat = 9:1 (Fr. 1-2), *n*-heksan-etil asetat = 6:4 (Fr. 3-8), kloroform-metanol = 95:5 (Fr. 9), kloroform-metanol = 9:1 (Fr. 10).



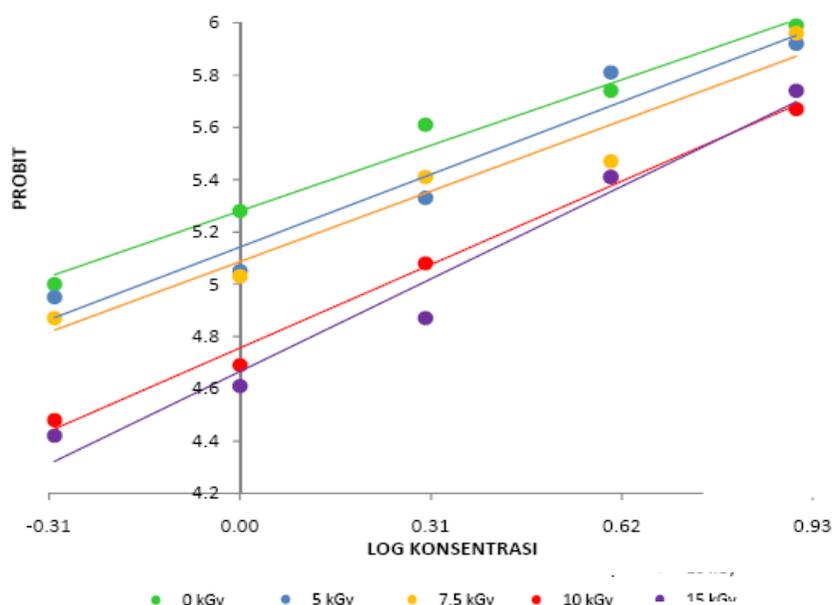
pada fraksi 1-10 dari daun sirsak yang tidak diiradiasi untuk mengetahui fraksi mana yang paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210. Hasil

Tabel 3. Hasil uji aktivitas fraksi 1-10 dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* L.) kontrol terhadap sel leukemia L1210.

Fraksi	IC ₅₀ (µg/mL)
1	1,12
2	1,14
3	1,56
4	0,88
5	0,84
6	0,81
7	1,17
8	0,45
9	1,32
10	2,03

uji aktivitas sitotoksik terhadap sepuluh fraksi dari hasil kromatografi kolom ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol (0 kGy) menunjukkan bahwa fraksi-fraksi tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel leukemia L1210. Dari sepuluh fraksi yang diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210, fraksi 8 yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dengan nilai IC₅₀ paling kecil yaitu 0,45 µg/mL (Tabel 3). Fraksi 8 ini dipilih untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada daun sirsak melalui uji aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210. Analisis dilakukan dengan KLT-densitometri dan KCKT. Fraksi 8 yang digunakan yaitu fraksi 8 yang difraksinasi dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi (5; 7,5; 10; dan 15 kGy).

Hasil perhitungan aktivitas sitotoksik fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi ditampilkan sebagai grafik hubungan antara log konsentrasi dengan probit pada Gambar 5. Dari grafik tersebut diperoleh persamaan garis linier untuk



Gambar 5. Grafik hubungan antara probit dan log konsentrasi fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi

menghitung IC₅₀. Nilai IC₅₀ fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi disajikan pada Tabel 4. Nilai IC₅₀ rata-rata ditampilkan dalam bentuk diagram batang pada Gambar 6, menunjukkan adanya peningkatan nilai IC₅₀ fraksi 8 seiring dengan meningkatnya dosis iradiasi gamma, namun masih dapat dikatakan sangat aktif karena IC₅₀ < 20 µg/mL.

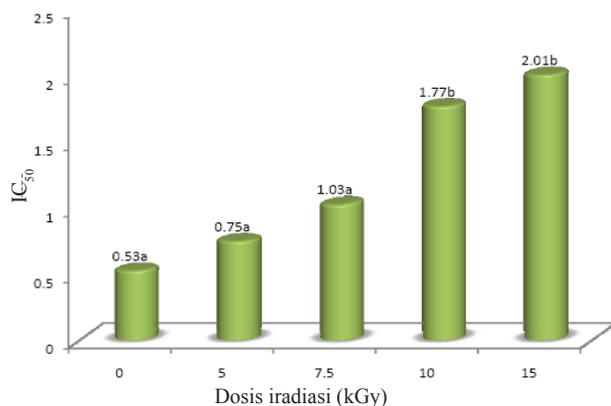
Data IC₅₀ tersebut kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA satu arah dengan menggunakan SPSS 20 pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Dari hasil analisis statistik tersebut diperoleh

hasil bahwa antara daun sirsak kontrol dan daun sirsak yang diiradiasi gamma dengan dosis 5 dan 7,5 kGy tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Namun ada perbedaan yang bermakna antara kontrol dengan daun sirsak yang diiradiasi pada dosis 10 dan 15 kGy. Aktivitas sitotoksik fraksi 8 pada dosis iradiasi lebih dari 7,5 kGy mengalami penurunan, hal ini diduga karena adanya efek langsung radiasi berupa ionisasi pada materi tersebut dimana semakin besar dosis yang diberikan akan semakin besar daya ionisasinya sehingga akan menyebabkan terjadinya perubahan



Tabel 4. Hasil uji aktivitas fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi gamma simplo dan duplo terhadap sel leukemia L1210

Dosis iradiasi (kGy)	Simplo		Duplo		Rata-rata IC ₅₀ (µg/mL)
	Persamaan regresi linier	IC ₅₀ (µg/mL)	Persamaan regresi linier	IC ₅₀ (µg/mL)	
0	$y = 0,8106x + 5,280$	0,45	$y = 0,8039x + 5,172$	0,61	0,53
5	$y = 0,8969x + 5,142$	0,69	$y = 0,8504x + 5,076$	0,81	0,75
7,5	$y = 0,8703x + 5,086$	0,80	$y = 0,8969x + 4,910$	1,26	1,03
10	$y = 0,0298x + 4,756$	1,73	$y = 1,0996x + 4,717$	1,81	1,77
15	$y = 1,1427x + 4,666$	1,96	$y = 1,1660x + 4,633$	2,06	2,01



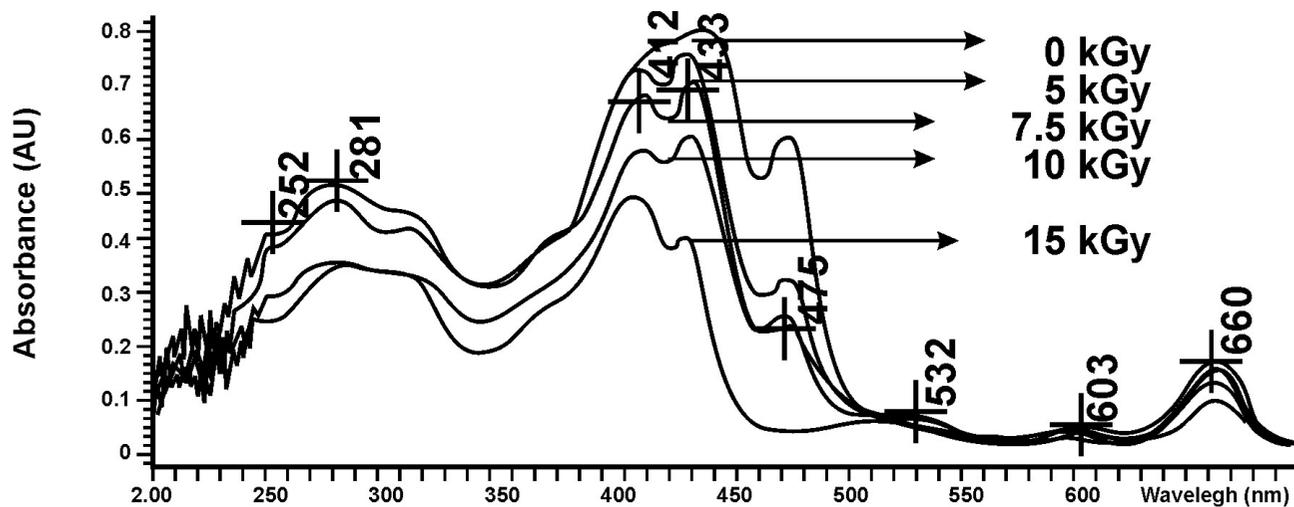
Gambar 6. Diagram pengaruh iradiasi gamma pada aktivitas sitotoksik (IC₅₀) fraksi 8 ekstrak etil asetat daun sirsak. (Angka dengan notasi huruf yang sama menyatakan tidak berbeda nyata).

fisika dan kimia dari komponen dalam daun sirsak. Perubahan ini berdampak pada aktivitas komponen-komponen tersebut terhadap sel leukemia L1210.

Profil Spektrum dan Kromatogram dari Fraksi 8. Spektrum serapan fraksi 8 dari sampel kontrol dan yang diiradiasi, terdapat dua puncak utama yaitu 280 nm pada daerah uv dan 433 nm pada daerah visibel

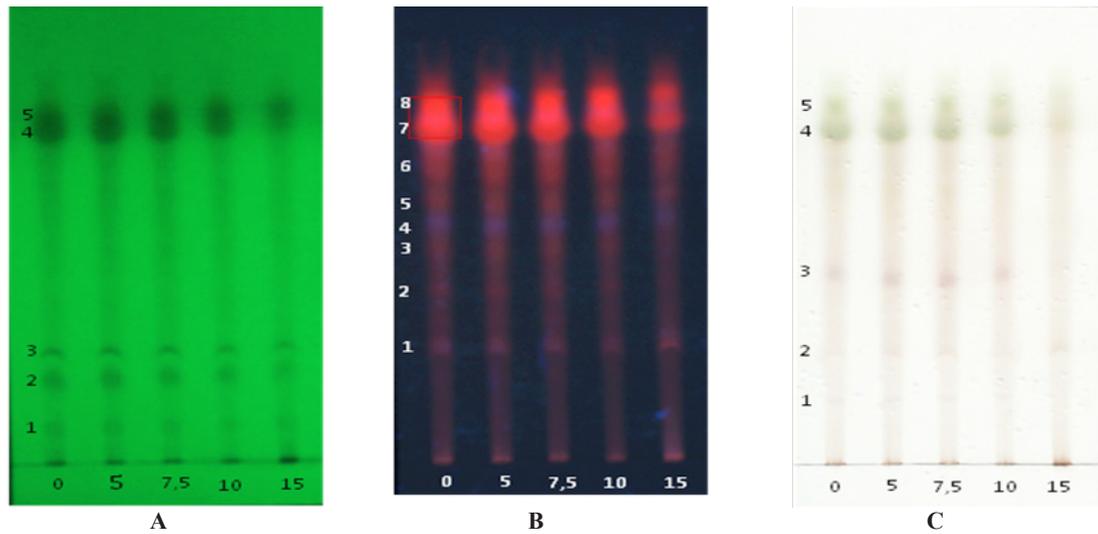
(Gambar 7). Pengaruh iradiasi gamma pada spektrum serapan fraksi 8 mengalami penurunan serapan dengan meningkatnya dosis iradiasi pada daun sirsak baik pada λ 280 maupun 433 nm. Analisis secara statistik ANOVA satu arah dengan menggunakan SPSS 20 terhadap data serapan fraksi 8 pada panjang gelombang 280 dan 433 nm menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara serapan fraksi 8 dari sampel kontrol dengan serapan fraksi 8 dari sampel yang diiradiasi dengan dosis 5 dan 7,5 kGy. Sedangkan untuk serapan fraksi 8 dari sampel yang diiradiasi dengan dosis 10 dan 15 kGy ada perbedaan bermakna dengan serapan fraksi 8 dari sampel kontrol.

Analisis kromatografi lapis tipis dipilih fraksi paling aktif yaitu fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi diamati pada λ 254 (A) dan 366 (B) nm serta setelah kromatogram disemprot dengan penampak bercak serum sulfat dan dipanaskan di atas *hot plate* (C) ditunjukkan pada Gambar 8. Pada profil kromatogram fraksi 8 daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi (Gambar 8A dan C) ditunjukkan terdapat lima bercak. Pada Gambar 8B terdapat 8 bercak yang berpendar. Pada Gambar



Gambar 7. Spektrum serapan fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi (+: panjang gelombang maksimum).





Gambar 8. Pola kromatogram dari kromatografi lapis tipis fraksi 8 ekstrak etil asetat dari daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi.

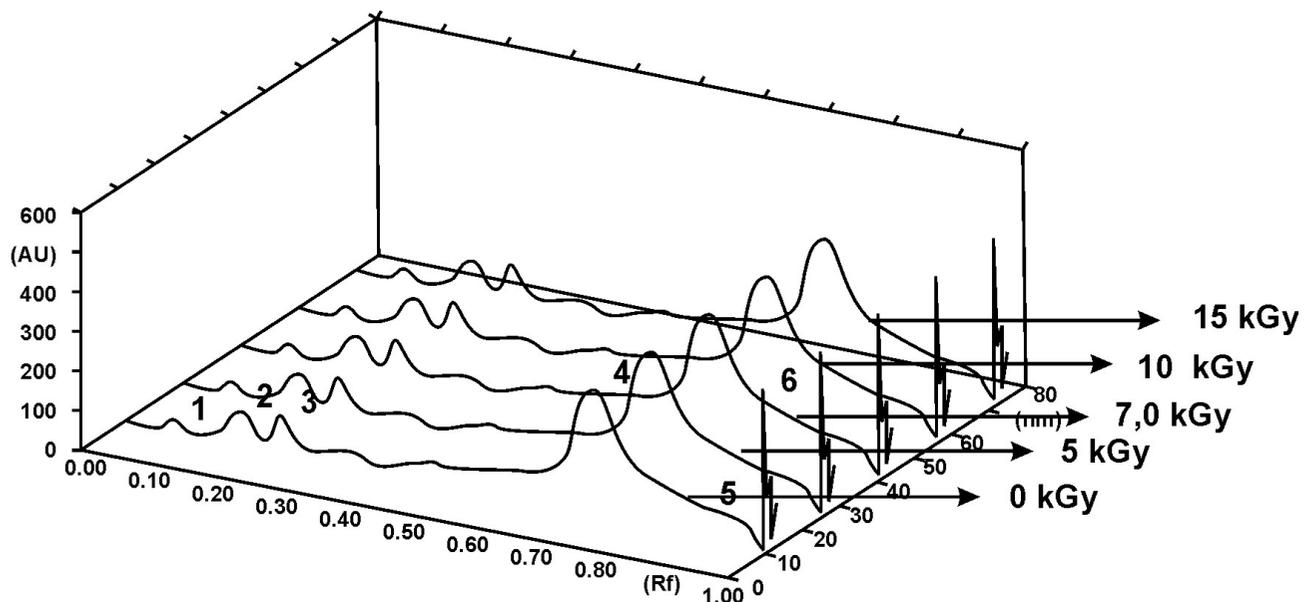
A: kromatogram diamati pada lampu UV 254 nm, B: kromatogram diamati pada lampu UV 366 nm, C: kromatogram setelah disemprot penampak bercak dan dipanaskan, fase gerak: kloroform-etanol (9:1), fase diam: silika gel GF₂₅₄, deteksi: sinar UV 254 dan 366 nm, penampak bercak: serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%.

8C secara visual bercak 3, 4 dan 5 dari sampel yang diiradiasi gamma dosis ≥ 10 kGy tampak semakin berkurang intensitasnya dibandingkan dengan bercak dari sampel kontrol. Pada Gambar 8B diperlihatkan terjadinya pengurangan pendaran bercak 2, 3, 7 dan 8 pada dosis ≥ 10 kGy.

Pada Gambar 8A juga diamati berkurangnya intensitas pada bercak 4 dan 5 pada dosis ≥ 10 kGy. Secara umum semua bercak yang terdapat pada kromatogram kontrol juga terdapat pada kromatogram sampel yang diiradiasi namun intensitas semakin berkurang seiring dengan meningkatnya dosis iradiasi,

hal ini mungkin diakibatkan adanya kerusakan komponen akibat iradiasi gamma. Pada λ 280 nm profil kromatogram KLT-densitometri fraksi 8 daun sirsak kontrol dan hasil iradiasi memiliki 6 puncak (Gambar 9). Dari Gambar 9 terlihat bahwa ada 6 puncak, dan puncak ke-4 adalah puncak utama karena memiliki luas yang paling besar namun pada dosis $\geq 7,5$ kGy terjadi penurunan luas puncak 4.

Secara umum, luas puncak menurun seiring meningkatnya dosis iradiasi pada daun sirsak. Penurunan luas puncak mungkin diakibatkan adanya kerusakan komponen akibat iradiasi gamma. Pada



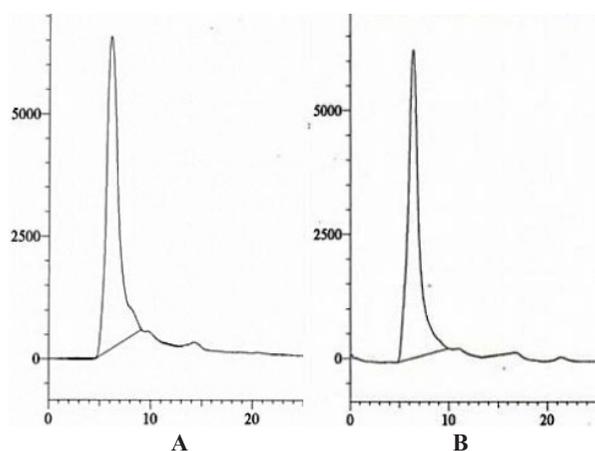
Gambar 9. Profil kromatogram KLT-densitometri fraksi 8 ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi pada panjang gelombang 280 nm.



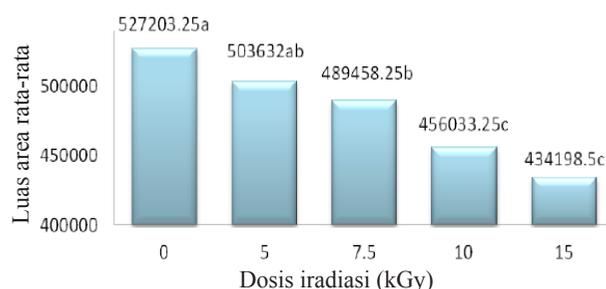


dosis 5 dan 7,5 kGy telah terjadi perubahan pada komponen, namun hal ini tidak menyebabkan perubahan bermakna dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210.

Profil kromatogram KCKT fraksi 8 dari ekstrak etil asetat daun sirsak kontrol dan yang diiradiasi dengan dosis 7,5 kGy dapat dilihat pada Gambar 10. Pada kromatogram baik dari fraksi 8 daun sirsak kontrol maupun yang diiradiasi terdapat satu puncak utama dengan waktu retensi sekita 7,1 menit, namun satu puncak tersebut belum dapat dikatakan murni/tunggal, puncak tersebut diduga terdiri dari lebih satu senyawa yang memiliki sifat fisika kimia yang sama terhadap kondisi KCKT yang digunakan. Tinggi dan luas puncak menurun seiring dengan meningkatnya dosis iradiasi. Hal ini diduga adanya degradasi senyawa-senyawa yang memiliki serapan pada λ 280 nm, hal yang sama diperlihatkan oleh data hasil analisis KLT-densitometri dan spektrofotometri UV-vis.



Gambar 10. Kromatogram KCKT fraksi 8 dari sampel kontrol (A) dan yang diiradiasi 7,5 kGy (B).



Gambar 11. Diagram hasil analisis pengaruh iradiasi pada luas puncak dari kromatogram KCKT. (Angka dengan notasi huruf yang sama menyatakan tidak berbeda nyata).

Berdasarkan luas puncak utama masing-masing dosis iradiasi, dibuat analisis statistik menggunakan ANOVA satu arah (SPSS 20) pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), menunjukkan bahwa tidak ada

perbedaan luas yang bermakna antara kontrol dengan dosis 5 kGy. Pada dosis 7,5; 10 dan 15 kGy menunjukkan ada perbedaan luas yang bermakna terhadap luas puncak utama dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan hasil analisis di atas ada perbedaan luas yang bermakna antara fraksi 8 dosis kontrol dengan yang diiradiasi dosis 7,5 kGy (Gambar 11), namun pada analisis data aktivitas sitotoksik, spektrofotometri UV-vis dan KLT-densitometri fraksi 8 yang diiradiasi dosis 7,5 kGy tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap kontrol.

SIMPULAN

Dosis maksimum iradiasi gamma untuk daun sirsak dengan tetap mempertahankan bioaktivitas terhadap sel leukemia L1210 dan tidak mengubah profil kromatogramnya adalah 7,5kGy. Iradiasi gamma > 7,5 kGy menurunkan luas puncak masing-masing kromatogram, namun tidak mengubah profil pola kromatogram KLT-densitometri dan KCKT ekstrak dan fraksi paling aktif dari daun sirsak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan dan bantuan Sdr. Tjahyono, S.P. serta seluruh staf Balai Iradiator Elektromekanika dan Instrumen – PAIR BATAN yang telah membantu melakukan iradiasi sampel, demikian juga kepada Sdr. Susanto, A. Md. yang telah membantu pelaksanaan penelitian sehingga berlangsung dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kim G, Zeng Lu, Alali F, Rogers LL, Wu FE, McLaughlin JL, *et al.* Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin e, and muricapentocin, from the leaves of *Annonamuricata*. *J Nat Prod.* 1998. 61(4): 432-6.
2. Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med.* 2003. 69(3): 241-46.
3. Hamizah S, Roslida AH, Fezah O, Tan KL, Tor YS, Tan CI. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L. leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2012. 13: 2533-9.
4. My healthy life. Daun sirsak vs kanker. Jakarta: Trubus Swadaya; 2011. 14-5.
5. Zuhud E. Bukti kedahsyatan sirsak menumpas kanker. Cetakan kedua. Jakarta: PT Agromedia Pustaka; 2011. 54-77.
6. Sardi D, Dian AS, Destika C, Syah A, Laksita W, Rosy NA, dkk. Herbal Indonesia berkhasiat. Vol. 08. Depok:





Vol 12, 2014

Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia 254

- Trubus Swadaya; 2009. 441-3.
7. Oberlies NH, Chang CJ, McLaughlin JL. Structure-activity relationship of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7adr) cells. *Journal Medicinal Chemistry*. 1997. 40: 2102-6.
 8. Codex Alimentarius Commission. General standard for irradiated foods codex stan 106 1983. Codex Alimentarius Commission. Rev1. 2003. 1-2.
 9. http://www.hukor.depkes.go.id/up_prod_permenkes/PMK20No.%20701%20ttg%20Pangan%20Iradiasi.pdf. diakses tanggal 15 Oktober 2011.
 10. Irawati Z. Implementasi iradiasi pangan: keamanan, mutu, daya simpan dan regulasi. Prosiding Simposium dan Pameran Teknologi Aplikasi Isotop dan Radiasi. Jakarta: Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN; 2008. 101-8.
 11. Winarno H, Katrin E. Benzophenone glucoside isolated from the ethyl acetate extract of the bark of mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] and its inhibitory activity on leukemia L1210 cell line. *Indo J Chem*. 2009. 9: 142.
 12. Hostettmann K. Assays related to cancer drug discovery. In: Assays for bioactivity. Vol. 6. Switzerland: University of Lausanne, Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry; 1991. 84.

