

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**PEMANFAATAN DAUN SRIKAYA (*Annona squamosa L.*)
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA KANKER KOLON**

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. SRI AGUS SUDJARWO, drh., Ph.D.
Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh.
AMAQ FADHOLLY, drh., M.Si.**

**0004095603
0010035907
061817117306**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)



KKC
ICK
LP 57/19
Sud
P

PEMANFAATAN DAUN SRIKAYA (*Annona squamosa L.*)
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA KANKER KOLON

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. SRI AGUS SUDJARWO, drh., Ph.D.	0004095603
Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh.	0010035907
AMAQ FADHOLLY, drh., M.Si.	061817117306

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pemanfaatan Daun Srikaya (*Annona squamosa* L.) sebagai Terapi Kanker pada Kanker Kolon

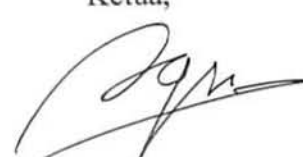
Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : SRI AGUS SUDJARWO,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0004095603
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 085645000684
Alamat surel (e-mail) : ags158@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM
NIDN : 0010035907
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Amaq Fadholly, drh.
NIDN :
Perguruan Tinggi :
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000

Mengetahui,
Dekan, FKH UNAIR

(Prof. Dr. Puji Sianto, drh., M.Kes.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 21 - 11 - 2018
Ketua,

(SRI AGUS SUDJARWO,)
NIP/NIK 195609041984031004

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR

(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Kanker kolon masih menjadi salah satu kanker yang paling umum ditemukan di negara berkembang dibandingkan dengan negara di kawasan Eropa dan Amerika. Data terbaru kanker kolon dilaporkan pada tahun 2016 di Amerika Serikat yakni terdapat 95.270 kasus baru dengan 49.190 kematian yang terjadi akibat kanker kolon. Berdasarkan lembaga survei kanker dunia (Globocan) dilaporkan bahwa pada tahun 2012 kanker kolon menempati urutan ketiga di dunia. Sementara itu kanker kolon menempati urutan ke empat kanker yang paling sering terjadi di Asia Tenggara pada tahun 2017. Data pada Kemenkes RI tahun 2015 melaporkan bahwa di Indonesia penyakit kanker kolon berada pada urutan kedua setelah kanker payudara.

Kanker kolon tidak hanya menjadi masalah utama bagi manusia namun juga pada hewan, terutama hewan peliharaan seperti anjing dan kucing. Pada anjing gangguan pada saluran pencernaan yang paling banyak ada pada kolon, sekum, rektum (48 – 67 %), diikuti oleh usus kecil (29 - 30 %) dan lambung (0 - 19 %), sedangkan pada kucing kasus gangguan pada kolon mencapai 30 %. Terdapat sekitar 20 % dari kasus kanker kolon pada umumnya *inoperable* dan relatif tidak dapat disembuhkan jika kanker sudah bermetastasis.

Daun Srikaya merupakan tanaman kandidat obat antikanker. Daun srikaya dilaporkan memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, phenol, karbohidrat dan saponin. Saponin diketahui berkhasiat sebagai antitumor dan menghambat pertumbuhan kanker. Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan inhibisi angiogenesis. Tanin berfungsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Alkaloid diketahui berpotensi sebagai agen antikanker dengan menghambat proliferasi dan menginduksi proses apoptosis pada sel kanker.

Ekstrak daun srikaya memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 dan menghambat proliferasi sel kanker payudara sebagai imunostimulan. Dengan adanya efek imunostimulan dari ekstrak daun srikaya apabila dijadikan sebagai nanopartikel ekstrak daun srikaya sebagai kandidat antikanker diharapkan akan menambah daya serap yang lebih lama dan langsung menuju sel kanker *WiDr*. Secara umum untuk menganalisis aktivitas nanopartikel ekstrak daun srikaya terhadap sel *WiDr*, sedangkan secara khusus menganalisis aktivitas sitotoksik dengan menentukan nilai IC_{50} dan pengaruhnya terhadap proses apoptosis sel melalui *marker caspase-3* serta indeks apoptosis.

Penelitian menunjukkan bahwa setelah dilakukan *Particle Size Analyzer (PSA)* ukuran nanopartikel ekstrak daun srikaya 99% dibawah 100 nm. Nanopartikel ekstrak daun srikaya terbukti memiliki aktivitas sitotoksik dengan IC_{50} sebesar 162,42 $\mu\text{g/ml}$. Senyawa dari nanopartikel ekstrak meningkatkan ekspresi *caspase-3* dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel *WiDr*. Nanopartikel ekstrak daun srikaya sangat potensial sebagai agen antikanker dengan menginduksi apoptosis melalui *marker caspase-3* dan indeks apoptosis sel kanker *WiDr*.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian tentang potensi ekstrak daun srikaya (*Annona squamosa L.*) sebagai agen antikanker pada kanker kolon (*WiDr cell line*) pada tahap pertama dapat terselesaikan.

Penanganan penyakit kanker selama ini masih menggunakan radioterapi dan kemoterapi yang hasilnya relatif terbatas serta efek sampingnya yang bersifat merusak, karena selain membunuh sel-sel kanker, kedua metode tersebut juga bisa mencederai bahkan membunuh sel-sel yang normal. Selain itu resistensi terhadap obat antikanker bisa terjadi sebagai akibat dari peningkatan jalur anti-apoptosis terhadap obat-obatan yang digunakan dalam terapi.

Pendekatan terapi yang menarik untuk dikembangkan adalah ko-kemoterapi. Ko-kemoterapi adalah upaya penyembuhan kanker dengan mengkombinasikan suatu senyawa yang kemopreventif yang bersifat tidak toksik dengan agen kemoterapi. Salah satu bahan ko-kemoterapi adalah dengan menggunakan tanaman herbal. Kandungan dari herbal secara langsung dapat menghambat proliferasi sel-sel kanker karena telah terbukti menunjukkan berbagai pensinyalan aktivitas antikanker berkaitan dengan kemampuannya dalam mempengaruhi banyak target pada sel kanker. Oleh karena itu pemanfaatan tanaman herbal telah dijadikan sebagai salah satu pengobatan alternatif yang tidak menimbulkan efek samping dan mampu menghambat jalur anti-apoptosis dengan dosis yang relatif rendah. Salah satu bahan alam yang potensial dikembangkan sebagai bahan ko-kemoterapi adalah daun srikaya. Oleh karena itu pada penelitian tahap pertama ini dikembangkan dengan teknologi nano dari daun srikaya yang dapat digunakan sebagai kandidat obat antikanker pada model kanker kolon.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, semoga hasil yang ditulis dalam penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat banyak dan bermanfaat bagi pembaca yang budiman

Surabaya, November 2018
Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	10
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	16
BAB 6 RENCANA TAHAP BERIKUTNYA.....	23
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
DAFTAR PUSTAKA.....	25
LAMPIRAN.....	28

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1.	Hasil skrining daun srikaya.....	14
5.2.	Hasil uji MTT <i>WiDr cells</i>	16
5.3.	Rataan ekspresi <i>caspase-3 WiDr cells</i>	17
5.4.	Rataan apoptosis dan nekrosis <i>WiDr cells</i>	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
5.1. Grafik persebaran ukuran EDS.....	15
5.2. Grafik persebaran ukuran NEDS.....	15
5.3. Ekspresi imunositokimia <i>caspase-3</i>	17
5.4. Induksi Apoptosis.....	18

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Draft artikel ilmiah	26
2. Seminar Internasional.....	27



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang berhubungan dengan tidak terkontrolnya kecepatan pertumbuhan sel abnormal dalam tubuh (Gopinadh, 2015). Berdasarkan data dari *Union of International Cancer* menerangkan bahwa kanker masih menjadi masalah utama penyebab kematian secara global dan memperkirakan peningkatan kasus kanker pertahun mencapai seratus kasus baru dari 100.000 penduduk dunia (UICC, 2012) dan menurut *World Health Organization* akan ada sekitar 7,6 juta orang meninggal disebabkan oleh kanker setiap tahunnya yang diperkirakan akan terus meningkat sekitar 13,1 juta orang meninggal pada tahun 2030 (WHO, 2017).

Kanker kolon masih menjadi salah satu kanker yang paling umum ditemukan di negara berkembang dibandingkan dengan negara di kawasan Eropa dan Amerika (Navarro *et al.*, 2017). Berdasarkan lembaga survei kanker dunia (Globocan) dilaporkan bahwa pada tahun 2012 kanker kolon menempati urutan ketiga di dunia (Ferlay *et al.*, 2015). Sementara itu kanker kolon menempati urutan ke empat kanker yang paling sering terjadi di Asia Tenggara pada tahun 2017 (Chandrasinghe *et al.*, 2017). Data pada Kemenkes RI (2015) melaporkan bahwa di Indonesia penyakit kanker kolon berada pada urutan kedua setelah kanker payudara.

Kanker kolon tidak hanya menjadi masalah utama bagi manusia namun juga pada hewan. Pada anjing gangguan pada saluran pencernaan yang paling banyak ada pada kolon, sekum, rektum (48 – 67 %), diikuti oleh usus kecil (29 - 30 %) dan lambung (0 - 19 %), sedangkan pada kucing kasus gangguan pada kolon mencapai 30 % (Suwa *and* Shimoda, 2017). Terdapat sekitar 20 % dari kasus kanker kolon pada umumnya *inoperable* dan relatif tidak dapat disembuhkan jika kanker sudah bermetastasis (Wang *and* Zhang, 2014).

Penanganan penyakit kanker selama ini masih menggunakan radioterapi dan kemoterapi yang hasilnya relatif terbatas serta efek sampingnya yang bersifat merusak, karena selain membunuh sel-sel kanker, kedua metode tersebut juga bisa

mencederai bahkan membunuh sel-sel yang normal (Liu *et al.*, 2015). Selain itu resistensi terhadap obat antikanker bisa terjadi sebagai akibat dari peningkatan jalur anti-apoptosis terhadap obat-obatan yang digunakan dalam terapi (Creixell and Peppas, 2012).

Pendekatan terapi yang menarik untuk dikembangkan adalah ko-kemoterapi. Ko-kemoterapi adalah upaya penyembuhan kanker dengan mengkombinasikan suatu senyawa yang kemopreventif yang bersifat tidak toksik dengan agen kemoterapi (Prasetyo dkk., 2017). Salah satu bahan ko-kemoterapi adalah dengan menggunakan tanaman herbal. Kandungan dari herbal secara langsung dapat menghambat proliferasi sel-sel kanker karena telah terbukti menunjukkan berbagai pensinyalan aktivitas antikanker berkaitan dengan kemampuannya dalam mempengaruhi banyak target pada sel kanker (Zheng *et al.*, 2017).

Salah satu bahan alam yang potensial dikembangkan sebagai bahan ko-kemoterapi adalah daun srikaya. Daun srikaya (*Annona squamosa L.*) dilaporkan memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, phenol, karbohidrat dan saponin (Kalidindi *et al.*, 2015). Saponin diketahui berkhasiat sebagai antitumor dan menghambat pertumbuhan kanker (Xu *et al.*, 2016). Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan inhibisi angiogenesis (Srivastava *et al.*, 2016). Tanin berfungsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Darvin *et al.*, 2015). Alkaloid diketahui berpotensi sebagai agen antikanker dengan menghambat proliferasi dan menginduksi proses apoptosis pada sel kanker (Shu *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak herbal dalam ukuran nanopartikel menunjukkan peningkatan bioavailabilitas dan sifat fungsional senyawa-senyawa fitokimia yang terkandung dalam tanaman herbal tersebut. Nanopartikel berpotensi mengatasi rendahnya kelarutan ekstrak senyawa aktif dalam air dan meningkatkan aktivitas antioksidan serta pelepasan obat sebanyak 74 kali lebih tinggi (Dewandari dkk., 2013). Pengolahan ekstrak herbal dalam bentuk nanokapsulasi menggunakan bahan penyalut (*coating agent*) diharapkan dapat melindungi ekstrak dari pengaruh suhu, cahaya, kondisi

lingkungan, menghilangkan bau yang tidak sedap dan ekstrak lebih mudah diabsorpsi oleh tubuh (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Salah satu bahan yang bisa digunakan sebagai penyalut adalah kitosan. Kitosan memiliki beberapa keunggulan jika digunakan sebagai bahan penyalut (*coating agent*) diantaranya adalah lebih ekonomis, mudah penangannya, non toksik dan biodegradasi (Jafari *et al.*, 2017).

Penggunaan tanaman herbal sebagai agen antikanker masih menjanjikan dan membutuhkan penelitian lebih lanjut, khususnya pada sel *WiDr* yang diterapi dengan daun srikaya. Pada penelitian ini digunakan nanopartikel ekstrak daun srikaya sebagai terobosan terbaru untuk mengetahui aktivitas antikanker pada sel *WiDr* dan juga untuk mengetahui peningkatan ekspresi *caspase-3* serta indeks apoptosis pada sel *WiDr* yang kemudian dibandingkan dengan ekstrak daun srikaya untuk mengetahui signifikansi perbedaan potensi terapi menggunakan nanopartikel. Penelitian ini diharapkan menjadi salah satu upaya untuk mengembangkan cara baru dalam terapi melawan kanker, khususnya kanker kolon baik dalam kesehatan manusia maupun hewan.

1.2. Permasalahan Penelitian

Tahun 1

1. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya mempunyai efek sitotoksik pada *WiDr cells* secara *in vitro*?
2. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya dapat meningkatkan ekspresi *caspase-3* pada *WiDr cells* secara *in vitro*?
3. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya meningkatkan induksi apoptosis pada *WiDr cells* secara *in vitro*?

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang *Annona squamosa*

Tanaman Srikaya mempunyai bermacam-macam julukan di berbagai daerah. Masyarakat Aceh menyebut tanaman ini dengan delima bintang atau serba bintang, orang Melayu menyebutnya delima srikaya, atau seraikaya di Lampung, dan sarikaya di Sunda. Tanaman Srikaya di Jawa sering disebut sebagai serkaya atau surikaya, dan sarkaya, serekaya, sirikaya di Madura, Gorontalo, dan Buru. Masyarakat Timor menyebutnya ata, sedangkan di Bali disebut sirkaya, di Sumbawa disebut srikaya kebo, dan nagametawata di Sumba. Masyarakat Bima menyebut tanaman Srikaya sebagai garoso, dan disebut atis di daerah Suiawesi Utara, Ternate, dan Tidore, sedangkan di Halmahera tanaman Srikaya disebut atisi dan hirikaya (Achmad dkk., 2007).

Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dikenal oleh masyarakat Alor Utara di Nusa Tenggara Timur sebagai tanaman obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Bagian daun dari tumbuhan ini digunakan untuk mengatasi batuk, rematik, gangguan pencernaan (diare, disentri, perut kembung, penyakit kulit (borok, bisul, kudis), menambah stamina, serta pereda demam (Usman, 2011).

2.1.1. Taksonomi *Annona squamosa*

Berdasarkan *review* dari Bhattacharya and Chakraverty (2016) taksonomi tanaman srikaya diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Ranaies
Famili	: Annonaceae
Genus	: Annona
Spesies	: <i>Annona squamosa</i>

Tanaman srikaya memiliki ciri-ciri morfologi batang yang gilik, percabangan simpodial, ujung rebah, dan kulit batang berwarna coklat muda. Daun tanaman srikaya berupa daun tunggal berseling, helaiannya berbentuk elips

memanjang sampai bentuk lanset, berujung tumpul sampai meruncing pendek. Panjang daun berkisar antara 6-17 cm, lebar 2,5-7,5 cm dengan tepi daun rata, gundul, daunnya berwarna hijau mengkilat

2.1.2. Kandungan Bahan Aktif *Annona squamosa*

Daun srikaya mengandung tanin, fenolik, polifenol, glikosida, saponin, karbohidrat, protein, protein, fitosterol, asam amino, alkaloid, dan flavonoid (Kalidindi *et al.*, 2015). Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder golongan polifenol yang mempunyai 15 atom karbon. Kuersetin adalah salah satu golongan flavonoid yang sangat populer karena kemampuannya dalam menghambat tumor dan memiliki antioksidan (Ariani dkk., 2008).

Potensi senyawa alkaloid sebagai antikanker diduga melalui tahapan awal dalam menghambat enzim DNA topoisomerase II dan terjadi proses ikatan antar enzim dengan DNA sel kanker semakin lama sehingga akan terbentuk *protein linked DNA breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi DNA sel kanker dan menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Sukardiman dkk., 2006).

Tannin memiliki sifat antioksidan yang lebih tinggi daripada vitamin E dan C serta lebih stabil. Sifat tanin yang demikian menjadi senyawa yang mampu mencegah penyakit degeneratif seperti kanker (Suarni dan Subagio, 2013). Potensi tanin sebagai antikanker adalah berperan sebagai antiproliferatif sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan memblokir fase S dari siklus sel. Tanin dapat menginduksi apoptosis dan menghambat proses angiogenesis (Mustafida dkk., 2014).

Potensi senyawa terpenoid dalam fungsinya sebagai antikanker adalah dapat memblokir siklus sel pada fase G2/M dengan menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat. Pada tahap selanjutnya akan terjadi penghambatan proliferasi sel dan pemacuan apoptosis (Windarti, 2013).

Senyawa saponin telah diketahui dapat meningkatkan ekspresi *p53*, memicu *G1 cell cycle arrest* menghambat pembentukan *bcl-2* yang diekspresikan terlalu tinggi dan menginduksi *caspase-3* yang diekspresikan terlalu rendah, sehingga akan memicu sel untuk apoptosis (Fitria dkk., 2011).

2.1.3. Manfaat *Annona squamosa*

Ekstrak daun srikaya pernah dilaporkan dapat menjadi terapi untuk penyakit jantung, diabetes, kanker (Sobiya *et al.*, 2009), antibakteri (Simon *et al.*, 2016) anti jamur dan antioksidan (Kalidindi *et al.*, 2015). Ekstrak daun srikaya juga pernah dilaporkan sebagai bahan yang efektif dalam terapi kanker payudara secara *in vitro* (Vivek *et al.*, 2012). Infusa daun srikaya juga dianggap efektif dalam kasus prolapsus ani pada anak-anak, disentri dan kasus kesulitan bicara atau gagap (Gajalakshmi *et al.*, 2011).

2.2. Teknologi Nano Partikel

Nanoteknologi merupakan ilmu dan rekayasa dalam menciptakan material struktur, fungsional dan piranti alam skala nanometer. Nanoteknologi menghasilkan partikel dengan ukuran 1×10^{-9} dengan skala ukuran partikel adalah 0.1-300 nm. Nanopartikel merupakan dasar bagi sistem penghantaran obat yang dapat diuraikan tubuh dan tidak toksik. Kesesuaian bentuk sediaan nanopartikel dengan jaringan target dan penyakit diperlukan untuk memperoleh sistem yang dapat memberikan hasil terapi yang optimal (Martien dkk., 2012). Beberapa hasil penelitian nanopartikel herbal menunjukkan bioavailabilitas dan sifat fungsional lainnya meningkat secara signifikan. Penerapan teknologi ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan aktivitas fungsional dan bioavailabilitas dari senyawa. Nanopartikel herbal dapat meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan dan pelepasan obat 74 kali lebih tinggi. Selain itu juga sudah diteliti bahwa nanoemulsi minyak dalam air (O/W) kurkumin menggunakan MCT sebagai fase minyak menunjukkan peningkatan kemampuannya sebagai anti radang (Dewandari dkk., 2013). Nanopartikel memiliki luas permukaan yang berlipat ganda, semakin meningkatnya luas permukaan maka peluang terjadinya reaksi kimia dan aktivitas biologinya akan semakin meningkat. Kemampuan nanopartikel dalam menembus sel-sel disebut bioavailabilitas. Sifat-sifat lain dari nanopartikel yang dapat mempengaruhi toksisitasnya adalah komposisi kimia,

bentuk, struktur permukaan, muatan permukaan, sifat katalitiknya dan kemampuan agregasi dengan benda lain (Winarno *and* Fernandez, 2010).

2.3. Kanker Koion

Kanker kolon atau kanker usus besar adalah suatu bentuk keganasan yang terdapat pada saluran pencernaan bawah (kolon, rektum, dan appendik), bagian sistem pencernaan atau yang disebut juga traktus gastrointestinal, lebih jelasnya koion berada di bagian proksimal usus besar dan rektum di bagian distal sekitar 5-7 cm di atas anus. Kolon dan rektum mempunyai fungsi untuk menghasilkan energi bagi tubuh dan membuang zat-zat yang tidak berguna. Kanker ini berasal dari sel glandula yang terdapat di lapisan dinding kolon dan rektum (Fleming *et al.*, 2012).

2.3.1 Etiopatogenesis Kanker Kolon

Pada kebanyakan kasus, kanker kolon berkembang perlahan-lahan selama beberapa tahun. Sebelum menjadi kanker, perkembangan dimulai dari polip nonkarsinomatous yang selanjutnya berubah menjadi kanker. Polip merupakan jaringan yang tumbuh pada kolon atau rektum. Beberapa jenis polip disebut polip adenomatous atau adenoma yang paling sering menjadi kanker. Terdapat jenis lain dari polip yang disebut polip hiperplastik atau polip inflamasi. Apabila polip hiperplastik tumbuh pada kolon asenden atau sisi sebelah kanan maka dapat terjadi kanker. Hal lain yang menjadi prekanker adalah displasia, yang biasanya terdapat pada penderita kolitis ulserativa di mana terjadi inflamasi yang terus-menerus pada kolon. Begitu sebuah kanker terbentuk dari polip, maka akan tumbuh dari mukosa dinding kolon atau rektum kemudian menembus dinding dan sel kanker akan tumbuh menyebar melalui aliran darah dan limfa yang akan menyebar ke seluruh tubuh yang disebut metastasis (Machado, *et al.*, 2016)

2.3.2. Sel *WiDr*

Sel *WiDr* merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel *WiDr* merupakan turunan sel kanker koion yang lain yakni sel HT-29. Salah satu model sel kanker kolon yang biasa digunakan dalam pengujian obat terapi yaitu sel *WiDr*. *WiDr* adalah sel yang

digunakan untuk uji antikanker kolon secara *in vitro* (Turan *et al.*, 2017). Salah satu karakteristik sel *WiDr* adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi dalam memacu proliferasi sel *WiDr* (Palozza *et al.*, 2005) dan merupakan suatu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-*flurouracil* (5-FU) (Giovannetti *et al.*, 2007) oleh karena itu perlu pengembangan lebih lanjut terapi untuk kanker kolon.

BAB3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis potensi agen antikanker pada daun srikaya terhadap *WiDr cells* secara *in vitro*.

3.1.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya dalam meningkatkan sitotoksitas *WiDr cells* secara *in vitro*.
2. Menganalisis pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya dalam meningkatkan ekspresi *caspase-3* *WiDr cells* secara *in vitro*.
3. Menganalisis pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya dalam meningkatkan indeks apoptosis *WiDr cells* secara *in vitro*.

3.2. Manfaat Penelitian

3.2.1. Manfaat Teoritis

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah akan kemampuan sitotoksitas suatu bahan herbal dan proses apoptosis yang ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi *caspase-3* dan indeks apoptosis pada sel *WiDr cells* setelah pemberian nanopartikel ekstrak daun srikaya

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat penelitian ini secara praktis adalah sebagai berikut:

1. Nanopartikel ekstrak daun srikaya dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon dengan cara apoptosis melalui peningkatan ekspresi *caspase-3*.
2. Sebagai salah satu tanaman yang bisa digunakan sebagai terapi antikanker yang bisa diambil dari alam mengingat tanaman srikaya banyak tumbuh di Indonesia.



BAB 4 METODE PENELITIAN

TAHUN 1.

4.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman srikaya dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan.

4.2. Ekstraksi Daun Srikaya

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut air. Daun Srikaya sebanyak 3 kg dicuci bersih kemudian di oven pada suhu $<50^{\circ}$ C. Pengeringan dilakukan selama 3 hari, sampai daun benar-benar kering. Daun yang sudah kering selanjutnya dibuat serbuk kering (simplisia) dengan cara dihancurkan menggunakan blender. Serbuk kering daun srikaya dimasukkan dalam maserator, sebanyak 1 kg bubuk daun srikaya dimaserasi dengan etanol 96 % (5 L) untuk sediaan satu minggu dengan suhu ruangan, 37° C. Supernatan diambil dan kemudian di saring dengan dengan *whatman no. 1* kertas penyaring dalam penguap vakum. Hasil saringan lalu diupakan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 45° C. Ekstrak kemudian dikeringkan dengan tekanan menurun lalu disimpan pada suhu $0-4^{\circ}$ C dan siap digunakan untuk perlakuan (Setiawan *et al.*, 2017).

4.3. Skrining Fitokimia

4.3.1. Skrining alkaloid

Pengujian senyawa golongan alkaloid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Nanopartikel ekstrak daun srikaya sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 4 ml etanol 96% menggunakan penggetar ultrasonik. Kemudian nanopartikel ekstrak ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 4 μ l. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, kloroform-metanol (9:1) sebagai fase gerak, dan pereaksi Dragendrof sebagai penampak noda. Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam nanopartikel ekstrak.

4.3.2. Skrining flavonoid

Pengujian senyawa golongan flavonoid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Nanopartikel ekstrak daun srikaya sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% menggunakan penggetar ultrasonik. Kemudian nanopartikel ekstrak ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 25 µl. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, kloroform-metanol (9:1) sebagai fase gerak, dan uap ammonia, UV 366 nm dan 254 nm sebagai penampak noda. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif dengan penampak noda uap ammonia.

4.3.4. Skrining terpenoid dan steroid

Pengujian senyawa golongan terpenoid dan steroid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Sedikit nanopartikel ekstrak daun srikaya ditambah beberapa tetes n-heksana, kemudian divortex selama 3 menit, lalu selanjutnya ditotolkan pada fase diam. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, n-heksana-etil asetat (4:1) sebagai fase gerak, dan anisaldehyda asam sulfat sebagai penampak noda. Adanya terpenoid/steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu.

4.3.5. Skrining saponin

Skrining senyawa golongan saponin menggunakan uji buih. Larutan nanopartikel ekstrak daun srikaya sebanyak 0,3 gram ditambah air 10 ml dan dikocok kuat selama 30 detik. Uji buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi buih 1-10 cm di atas permukaan dan saat ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang.

4.4. Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Daun Srikaya (Gelasi Ionik)

Pembuatan nanopartikel kitosan-ekstrak herbal, dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak daun srikaya dalam tabung duran. Ekstrak herbal kemudian dilarutkan dalam 35 ml etanol dan dicampur dengan 15 ml akuades dalam gelas beker 2000 mL, kemudian ditambahkan dengan 100 mL larutan yang terdiri dari 0,1 gram kitosan dalam 100 ml larutan asam asetat glasial 1 %.

Selanjutnya secara bertahap ke dalam campuran tersebut ditambahkan larutan yang terdiri dari 0,035 gram NaTPP dalam 350 ml aquades, disertai pengadukan pada kecepatan yang stabil selama 2 jam dengan *magnetic stirrer*. Setelah semua bahan tercampur, dilakukan pengadukan lagi dengan *magnetic stirrer* selama kurang lebih 2 jam pada kecepatan yang stabil. Komposisi perbandingan kitosan dan NaTPP pada larutan yang dibuat adalah 8:1. Suspensi nanopartikel kitosan-NaTPP daun srikaya kemudian dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Pellet yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* untuk menjaga kestabilan sampel dan diencerkan kembali dengan DMSO pada saat perlakuan.

4.5. Analisis Ukuran Partikel NEDS

Larutan ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya sebanyak 2-3 tetes dianalisis menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk mengetahui distribusi ukuran partikel. Pemeriksaan ukuran partikel dilakukan dengan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS) dengan menggunakan *Zetasizer* pada rentang 0,1 sampai 10.000 nm.

4.6. Kultur Sel

Sel kanker *WiDr* didapatkan dari koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada yang ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM (*Dulbecco's Modified Engle's Medium*) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%.

4.7. Uji Sitotoksik

Metode ini didasarkan pada reaksi reduksi reagen MTT yang dikatalisis oleh enzim suksinat dehidrogenase yang dikandung oleh sel hidup. Pada pengujian aktivitas beberapa nanopartikel ekstrak daun srikaya terhadap sel *WiDr*, nanopartikel ekstrak dilarutkan dengan media DMSO konsentrasi 100 µg/mL. Lima nanopartikel ekstrak dan ekstrak kental dari daun srikaya. L dengan rangkaian tingkatan konsentrasi mulai 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL dan 400 µg/mL.

Sel *WiDr* yang telah ditumbuhkan pada *flask* T25 dilakukan subkultur ke 96 *well tissue culture plate* dengan media penumbuh DMEM sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ dan diinkubasi selama 24 jam pada kondisi 5% CO_2 dan suhu 37°C dengan jumlah kepadatan sel sebanyak 5×10^3 sel/*well*. Setelah diinkubasi media yang ada di dalam *well* dibuang dan diberikan terapi menggunakan sampel yang sudah dilarutkan dalam media komplit sesuai dosis yang sudah ditentukan sebanyak 1000 $\mu\text{L}/\text{well}$ dan diinkubasi lagi selama 24 jam. Selanjutnya buang media komplit yang ada dalam *well* dan digantikan dengan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada kondisi 5% CO_2 dan suhu 37°C . Kemudian dilakukan pengamatan terhadap formazan yang terbentuk dibawah mikroskop *inverted* dan ditambahkan SDS 1% sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ untuk melisis sel hidup sehingga formazannya terbaca, karena formazen merupakan produk intraseluler dari reaksi enzimatik MTT. Selanjutnya dilakukan pembacaan *optical density* (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi dari hasil pembacaan ELISA dikonversikan dalam persen inhibisi sel menurut persamaan rumus.

4.8. Uji Imunositokimia

Pengecatan imunositokimia untuk ekspresi *caspase-3* pada sel *WiDr* dilakukan pada 7 kelompok perlakuan (kontrol sel, NEDS IC_{50} , NEDS 2IC_{50} , NEDS 4IC_{50} , EDS IC_{50} , EDSB 2IC_{50} dan EDS 4IC_{50}). Metode ini menggunakan *microplate* 24 sumuran. Sel *WiDr* dan media komplit DMEM sebanyak 200 μL dengan jumlah 1×10^4 sel/*well* dan diinkubasi selama 24 jam pada kondisi 5% CO_2 dan suhu 37°C . Selanjutnya media DMEM dibuang ditambahkan nanopartikel ekstrak dan ekstrak dari daun srikaya sesuai dosis, kemudian diinkubasi dengan inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, media dibuang lagi dan difiksasi dengan methanol sebanyak 200 μL didiamkan pada suhu 37°C selama 10 menit serta dicuci dengan air kran sebanyak 3x dan dilanjutkan dengan pencucian dengan PBS yang didiamkan terlebih dahulu selama 5 menit.

Sisa PBS dibuang dan ditambahkan *blocking solution* (H_2O_2) 30% dengan methanol (1:9) sebanyak 10 ml dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan air kran dan preparat dibilas dengan PBS. Kemudian preparat ditambahkan dengan *blocking serum* sebanyak 20 μ l dan diinkubasi selama 10 menit di dalam nampan basah, selanjutnya ditambahkan antibodi caspase-3 sebanyak 50 μ l dan diinkubasi selama 1 jam dalam nampan basah. Dicuci dengan PBS sebanyak 2x dan ditambahkan biotktin (Ab sekunder) sebanyak 30 μ l dan diinkubasi dalam nampan basah selama 20 menit. Selanjutnya dan ditambahkan streptavidin sebanyak 30 μ l dan diinkubasi dalam nampan basah selama 10 menit. Preparat dicuci lagi dengan PBS sebanyak 2x dan ditambah dengan substrat (1000 μ l buffer sustrat dan 10 μ l diaminobenzinidine) sebanyak 30 μ l kemudian dicuci dengan air kran untuk membersihkan substrat dan ditambahkan warna *hematoxylin* dan dibiarkan selama 3 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian ditiriskan dan ditetesi dengan mounting media. Tutup preparat dengan coverslip dan terakhir dilakukan pengamatan ekspresi *caspase-3*. Penilaian ekspresi *caspase-3* dilakukan dengan 4 lapangan pandang yang berbeda dengan pembesaran 400x dari tiap-tiap kelompok perlakuan.

4.9. Uji Induksi Apoptosis

Uji induksi apoptosis untuk mengetahui sel apoptosis pada sel *WiDr* dilakukan pada 7 kelompok perlakuan (kontrol sel, NEDS IC_{50} , NEDS $2IC_{50}$, NEDS $4IC_{50}$, EDS IC_{50} , EDS $2IC_{50}$ dan EDS $4IC_{50}$). Metode ini menggunakan *microplate* 24 sumuran. Kultur sel *WiDr* yang telah konfluen dipanen dan distribusikan dengan konsentrasi 5×10^4 sel/sumuran dalam 100 μ L media DMEM ke dalam *plate 24 well* yang telah diberi *cover slip*. Setelah itu sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% agar sel teradaptasi dan normal kembali. Selanjutnya *treatment* sampel terhadap sel *WiDr* dengan ekstrak daun srikaya dan dan nanopartikel ekstrak daun srikaya sesuai konsentrasi. Selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam ke dalam inkubator CO₂ 5%. Pada akhir inkubasi media kultur DMEM dibuang dengan hati-hati dan dicuci menggunakan PBS, kemudian *cover slip* yang memuat sel dipindahkan ke atas objek gelas lalu

ditetesi dengan pereaksi tunel (Terdiri dari 5 μ L enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* dan 45 μ L *fuorescin-dUTP*) sebanyak 50 μ L. Inkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit di dalam *moist chamber* kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan diinkubasi kembali dengan *Rnase solution* pada suhu 37° C selama 30 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. Inkubasi kembali dengan larutan propidium iodide pada suhu ruang selama 10 menit. Cuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. Hasil diamati dengan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 1000x.

BAB 5 HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

TAHUN 1.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Determinasi Daun Srikaya

Determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Pasuruan dengan cara mencocokkan tanaman pada kunci determinasi menurut Backer (1963). Tujuan determinasi tanaman adalah untuk memastikan identitas tanaman yang diteliti agar terhindar dari kesalahan dalam pengambilan tanaman dan menjaga kemurnian bahan dari tercampurnya dengan tanaman lain. Hasil determinasi tersebut menyatakan bahwa tanaman yang diteliti adalah benar memiliki ciri-ciri sebagaimana *Annona squamosa L.*

5.1.2. Skrining Fitokimia EDS dan NEDS

Hasil skrining fitokimia yang dilakukan di Unit Layanan Penelitian (ULP) Fakultas Farmasi UNAIR dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil skrining daun srikaya

Hasil skrining		
	EDS	NEDS
Flavonoid	+	+
Terpenoid	+	+
Alkaloid	+	+
Saponin	+	+
Steroid	+	+

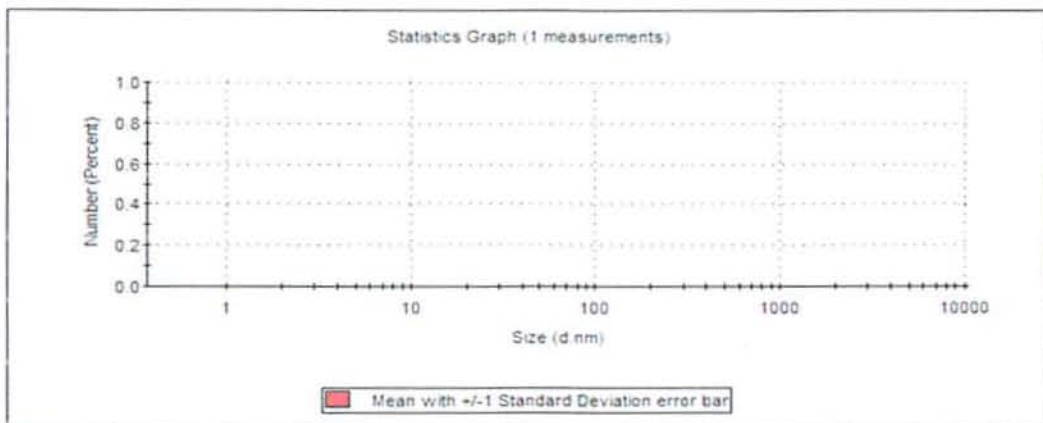
Keterangan: (+) = positif

Berdasarkan tabel 5.1 hasil skrining fitokimia ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya mengandung flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin dan steroid.

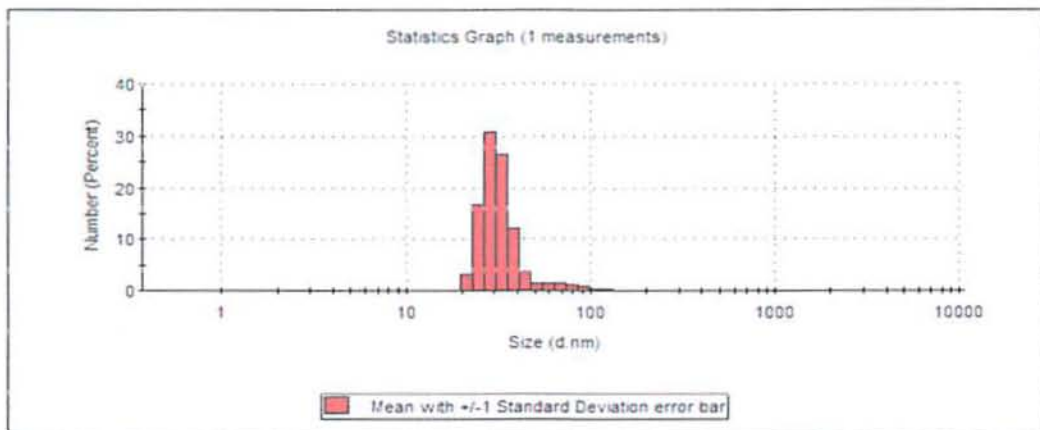
5.1.3. Pemeriksaan Ukuran Partikel NEDS dan EDS

Untuk mengetahui sebaran ukuran partikel pada ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya digunakan *particle size analyzer* (PSA) di Laboratorium Zat Padat, Fakultas MIPA, ITS.

Hasil pemeriksaan sebaran ukuran partikel pada EDS dan NEDS dapat dijelaskan bahwa sebaran ukuran partikel EDS lebih dari 1000 nm atau 10 μm sebanyak 100 % dibuktikan dengan tidak terlihatnya persebaran ukuran partikel di bawah 1000 nm (Gambar 5.1), sedangkan NEDS memiliki persebaran ukuran partikel yang homogen di mana ukuran partikel dibawah 100 nm sebesar 99,2 % (Gambar 5.2.). Jika persebaran ukuran partikel dibandingkan antara EDS dan NEDS maka pembuatan nanopartikel ekstrak daun srikaya sudah berhasil. Grafik hasil dari distribusi ukuran partikel EDS dan NEDS dapat dilihat pada gambar 5.1 dan gambar 5.2.



Gambar 5.1 Grafik persebaran ukuran partikel EDS



Gambar 5.2 Grafik persebaran ukuran partikel NEDS

5.1.4. Uji Sitotoksitas Sel *WiDr* yang Diterapi dengan EDS dan NEDS

Uji sitotoksitas dilakukan untuk memperoleh kadar ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya yang membunuh 50% sel *WiDr* dalam sumuran (IC_{50}). Pemeriksaan hasil pengukuran nilai *optical density* (OD) EDS dan NEDS dengan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 nm dapat dilihat pada tabel 5.2.

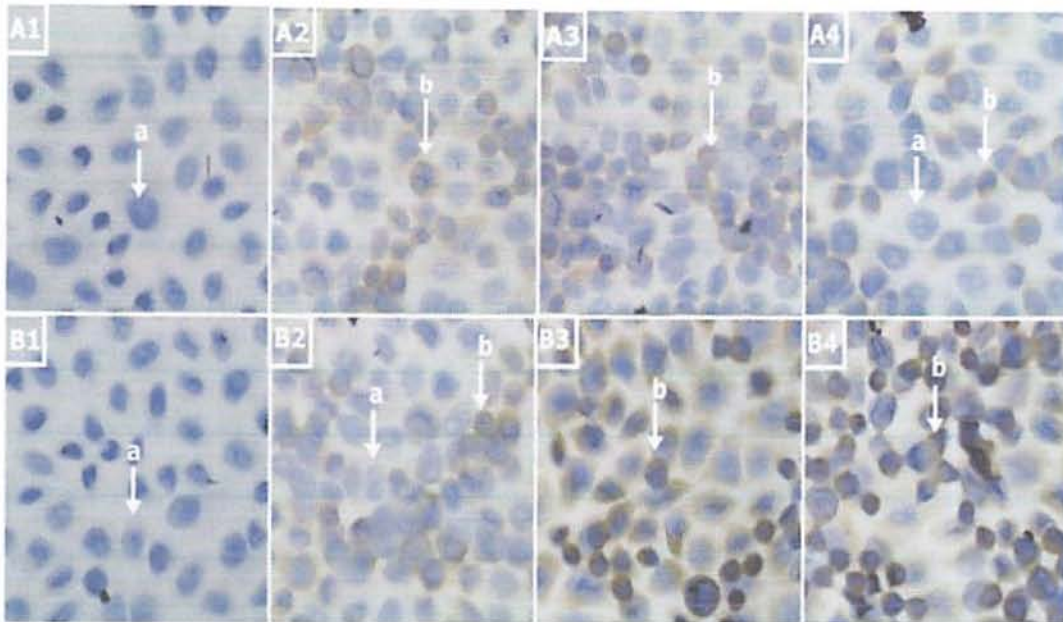
Tabel 5.2 Hasil uji MTT sel *WiDr* yang diterapi dengan EDS dan NEDS

No	Dosis terapi ($\mu\text{g/ml}$)	Kematian Sel dengan terapi EDS (%)	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Kematian sel dengan terapi NEDS (%)	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	25	39,03	162,42	37,23	197,23
2	50	41,54		39,67	
3	100	46,15		44,45	
4	200	58,78		55,89	
5	400	62,14		59,76	
6	Kontrol (-)	0	0	0	0

Berdasarkan tabel 5.2. dapat diketahui bahwa kematian sel *WiDr* tertinggi terdapat pada pemberian terapi EDS dengan dosis 400 $\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 62,14 % sel mati dan untuk kelompok NEDS dengan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 59,76 % sel mati. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan persamaan linier dengan *microsoft excel*, dan diperoleh hasil IC_{50} dari ekstrak daun srikaya adalah 162,42 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan IC_{50} dari nanopartikel ekstrak daun srikaya adalah 197,23 $\mu\text{g/ml}$.

5.1.5. Pemeriksaan Ekspresi *Caspase-3* Sel *WiDr* yang Diterapi dengan EDS dan NEDS

Pemeriksaan *caspase-3* sel *WiDr* yang diterapi dengan ekstrak daun srikaya dan nano partikel ekstrak daun srikaya yang diamati menggunakan *light microscope* dengan perbesaran 400 kali dapat dilihat pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Sel *WiDr* dengan pengecatan imunositokimia Ab *caspase-3*; huruf “a” menunjukkan sel imunonegatif (tidak sedang mengalami apoptosis) ditandai sitoplasma berwarna biru; huruf “b” menunjukkan sel imunopositif (apoptosis) dengan sitoplasma berwarna coklat; A1 dan B1) kontrol; A2) EDS IC_{50} ; A3) EDS $2IC_{50}$; A4) EDS $4IC_{50}$; B2) NEDS IC_{50} ; B3) NEDS $2IC_{50}$; B4) NEDS $4IC_{50}$

Hasil persentase ekspresi *caspase-3* sel *WiDr* yang diberi ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya disajikan dalam tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rata-rata dan simpangan baku ekspresi *caspase-3* sel *WiDr* yang diterapi dengan EDS dan NEDS

Dosis	Ekspresi <i>caspase-3</i> EDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)	Ekspresi <i>caspase-3</i> NEDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)
Kontrol (P0)	$0^a \pm 0,00$	$0^a \pm 0,00$
IC_{50} (P1)	$67,50^c \pm 0,58$	$53,00^b \pm 0,82$
$2 IC_{50}$ (P2)	$68,75^c \pm 0,50$	$80,75^c \pm 0,96$
$4 IC_{50}$ (P3)	$40,75^b \pm 0,96$	$82,75^c \pm 1,50$

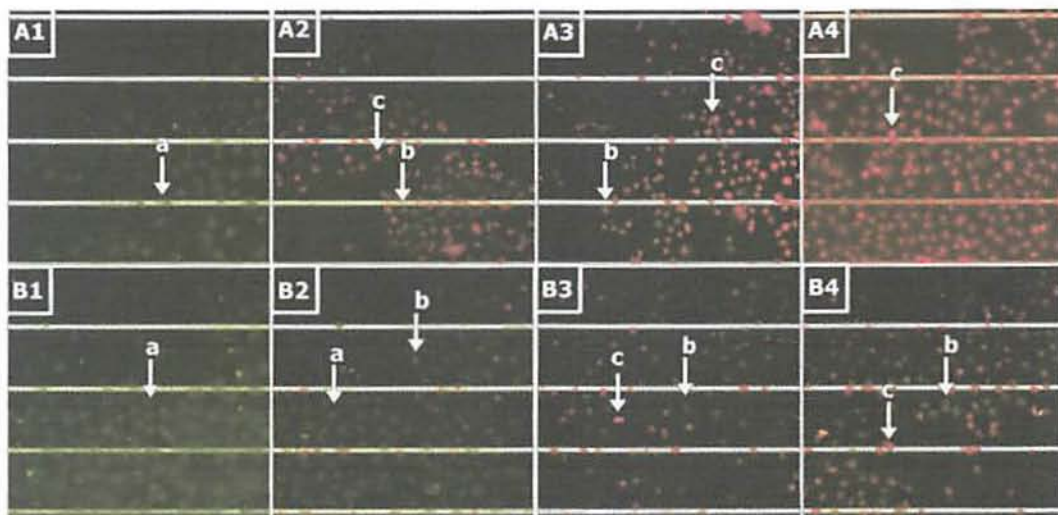
Keterangan: Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 5.3 dapat diketahui bahwa kelompok P0 tanpa pemberian ekstrak daun srikaya menunjukkan tidak adanya persentase ekspresi *caspase-3* yang terekspresi, hal ini menunjukkan bahwa semua sel dalam

kelompok P0 hidup dan tidak ada yang mengalami apoptosis. Hasil kelompok P0 berbeda nyata dengan dengan P1, P2 dan P3 dalam masing-masing kelompok pemberian EDS maupun NEDS. Pada kelompok P1 EDS menunjukkan hasil ekspresi *caspase-3* sebesar $67,50 \pm 0,58 \%$, hasil P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok P2, namun berbeda nyata dengan kelompok P3, sedangkan pada kelompok P1 NEDS sebesar $53,00 \pm 0,82 \%$, hasil P1 berbeda nyata dengan kelompok P2 dan P3. Pada kelompok P2 EDS menunjukkan hasil ekspresi *caspase-3* sebesar $68,75 \pm 50 \%$ dan menunjukkan hasil ekspresi *caspase-3* tertinggi pada kelompok EDS, hasil P2 berbeda nyata dengan kelompok P3, sedangkan pada kelompok P2 NEDS sebesar $80,75 \pm 0,96 \%$. hasil P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3. Pada kelompok P3 EDS menunjukkan hasil ekspresi *caspase-3* terendah sebesar $40,75 \pm 0,96 \%$, pada kelompok P3 NEDS menunjukkan hasil ekspresi *caspase-3* tertinggi sebesar $82,75 \pm 1,50 \%$.

5.1.6. Pemeriksaan Apoptosis Uji Tunel dengan EDS dan NEDS

Pemeriksaan apoptosis sel *WiDr* yang diterapi dengan ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya yang diamati menggunakan mikroskop flouresen dengan perbesaran 1000 kali dapat dilihat pada gambar 5.4



Gambar 5.4 Sel *WiDr* dengan pengecatan tunel; huruf “a” menunjukkan sel masih hidup ditandai sel berwarna hijau; huruf “b” menunjukkan sel imunopositif (apoptosis) dengan sitoplasma berwarna oranye; huruf “c” menunjukkan sel nekrosis ditandai dengan warna merah; A1 dan B1) kontrol; A2) EDS IC_{50} ; A3) EDS $2IC_{50}$; A4) EDS $4IC_{50}$; B2) NEDS IC_{50} ; B3) NEDS $2IC_{50}$; B4) NEDS $4IC_{50}$

Hasil persentase apoptosis sel *WiDr* yang diberi ekstrak daun srikaya dan nanopartikel ekstrak daun srikaya disajikan dalam tabel 5.4.

Tabel 5.4 Rata-rata dan simpangan baku apoptosis dan nekrosis sel *WiDr* yang diterapi dengan EDS dan NEDS

Dosis	Sel Apoptosis EDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)	Sel Apoptosis NEDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)	Sel Nekrosis EDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)	Sel Nekrosis NEDS (%) ($\bar{X} \pm SB$)
Kontrol (P0)	$0^a \pm 0,00$	$0^a \pm 0,00$	$0^a \pm 0,00$	$0^a \pm 0,00$
IC ₅₀ (P1)	$60,50^c \pm 0,58$	$51,00^b \pm 0,82$	$34,50^b \pm 0,57$	$0^a \pm 0,00$
2 IC ₅₀ (P2)	$61,25^c \pm 0,96$	$79,25^c \pm 0,50$	$39,35^c \pm 0,5$	$15,25^b \pm 0,5$
4 IC ₅₀ (P3)	$39,50^b \pm 0,58$	$80,25^c \pm 0,50$	$51,25^d \pm 0,95$	$17,50^c \pm 0,57$

Keterangan: Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 5.4. dapat diketahui bahwa kelompok P0 tanpa pemberian ekstrak daun srikaya menunjukkan tidak adanya persentase apoptosis, hal ini menunjukkan bahwa semua sel dalam kelompok P0 hidup dan tidak ada yang mengalami apoptosis. Hasil kelompok P0 berbeda nyata dengan dengan P1, P2 dan P3 dalam masing-masing kelompok pemberian EDS maupun NEDS. Pada kelompok P1 EDS menunjukkan hasil apoptosis sebesar $60,50 \pm 0,58$ %, hasil P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok P2, namun berbeda nyata dengan kelompok P3, sedangkan pada kelompok P1 NEDS sebesar $51,00 \pm 0,82$ %, hasil P1 berbeda nyata dengan kelompok P2 dan P3. Pada kelompok P2 EDS menunjukkan hasil apoptosis sebesar $61,25 \pm 0,96$ % dan menunjukkan hasil apoptosis tertinggi pada kelompok EDS, hasil P2 berbeda nyata dengan kelompok P3, sedangkan pada kelompok P2 NEDS sebesar $79,25 \pm 0,50$ %, hasil P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3. Pada kelompok P3 EDS menunjukkan hasil apoptosis terendah sebesar $39,50 \pm 0,58$ %, sedangkan pada kelompok P3 NEDS menunjukkan hasil apoptosis tertinggi sebesar $80,25 \pm 0,50$ %.

5.2. Luaran yang Dicapai

Luaran yang dicapai dari hasil penelitian ini adalah:

- 1. Hasil IC₅₀ dari penelitian ini dapat dijadikan rujukan penelitian selanjutnya**
- 2. Jurnal Internasional : *Draft* artikel ilmiah (terlampir)**
- 3. Seminar Internasional : *The 2nd Veterinary Medicine International Conference*, July 4 -5 2018, Universitas Airlangga (sertifikat terlampir)**

BAB VI RECANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Nano-daun srikaya yang dibuat masih perlu dilakukan peneitian lebih lanjut sebelum nantinya digunakan untuk terapi kanker kolon,

Tahun 2 :

1. Penggunaan bahan aktif *Annona squamosa*
2. Uji sitotoksik, apoptosis lanjutan dengan bahan aktif

Tahun 3:

1. Uji Preklinik *Annona squamosa* secara *in vivo* pada *rat* yang dibuat kanker



BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Nanopartikel ekstrak daun srikaya bersifat sitotoksik pada *WiDr cells* dengan IC_{50} sebesar 198,23 $\mu\text{g/ml}$.
2. Nanopartikel ekstrak daun srikaya meningkatkan ekspresi *caspase-3* pada *WiDr cells*
3. Nanopartikel ekstrak daun srikaya meningkatkan indeks apoptosis pada *WiDr cells*

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian bahan aktif *Annona squamosa* sebagai antikanker
2. Perlu dilakukan uji preklinik ekstrak *Annona squamosa* secara *in vivo* pada rat

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Syah, Y.M., Yuliyawaty, L.D., Mujahidin, D. 2007. Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-Tumbuhan Obat Indonesia. ITB. Bandung.
- Ariani, S. R. D., Susilowati, E., Susanti E. V. H & Setiyani. 2008. Uji aktivitas ekstrak metanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) sebagai antifertilitas kontrasepsi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Indonesian Journal of Chemistry. 8 (2): 264-270.
- Bhattacharya, A. And Chakraverty, R. 2016. The pharmacological properties of *Annona squamosa* Linn. : a review. *Intr. J.Pharm. and Engineering.* 4(2): 692 – 699.
- Chandrasinghe, P.C., Ediriweera, D.S., Hewavisenthi, J., Kumaraage, S.K., Fernando, F.R., Deen, K.I. 2017. Colorectal cancer burden and trends in a south asian cohort: experience from a regional tertiary care center in sri lanka. *Biomed. Central Res.* 10 : 535.
- Creixell, M. and Peppas, N.A. 2012. Co-delivery of siRNA and Therapeutic Agents Using Nanocarriers to Overcome Cancer Resistance. *J Nanotoday.* 7: 367-379.
- Darvin, P., Baeg, S.J., Joung, Y.H., Kang, D.Y., Byun, H.J., Park, J.U., Yang, Y.M. 2015. Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. *Intr. J. Oncology.* doi . ijo.2015.3098
- Dewandari, K.T., Yuliani, S. dan Yasni, S. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah. *J Pascapanen.* Vol 10.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *Int. J. Cancer.* 136: 359-386.
- Fitria, M., Armandari, I., Septhea, D.B., Hermawan, A., Ikawati, M., Meiyanto, E. 2011. Ekstrak etanolik herba ciplukan berefek sitotoksik dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatischev, S.F., Wang, H.L. 2012. Colorectal carcinoma: pathologic aspect. *J. Gastrointest. Oncol.* 3(3) : 153 – 173.
- Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., Ferreira, C.G., van Houten, V.M.M. and Brakenhoff, R.H., 2007, Changes in the status of p53 affect drug sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibitors by altering TS levels. *British J. Can.* 96 :769-775.
- Gopinadh, G. 2015. Cancer characteristics and its causes. *J. of Medical and Health Sciences.* 4(1): 2319 -2322.
- Jafari, N.J., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H., Hamedi, H. 2017. The effect of chitosan coating incorporation with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *J. Food Procs. and presev.* 42 (1) :133-136.

- Kalidindi, N., Negarasankote, V.T., Negapally, V.J., Ramaiah, N., Sathyanarayana, S., Bharat, K. 2015. Antifungal and Antioxidant Activities of Organic and Aqueous Extract of *Annona Squamosa* Linn. Leaves. *J. Food and Drug Analysis*. 23:795-802.
- Kemenkes RI. 2015. Infodatin: Situasi Penyakit Kanker. Pusat Data dan Informasi. Kementerian Kesehatan RI. 1 - 6.
- Liu, H., Lv, L., Yang, K. 2015. Chemotherapy targeting cancer stem cells. *Am. J. Cancer Res*. 5(3) : 880 – 893.
- Machado, V.F., Feitosa, M.R. Rocha, J. 2016. A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. *J. Coloproctology*. 36(1): 53-57.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm*. 385: 113-142.
- Mustafida, R Y., Al Munawir., dan Dewi, R. 2014. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2 (1): 4-8.
- Navarro, M., Nicolas, A., Ferrandez, A., Lanas, A. 2017. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: an update. *World J. Gastroenterol*. 23(20): 3632-3642.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navara, P., Ranelletti, F.O. 2005. Carotene downregulates the steady-state and heregulin a induced COX-2 pathways in colon cancer cells. *J. Nutr*. 135: 129-136.
- Shu, G., Yue, L., Zhao, W., Xu, C., Yang, J., Wang, S., Yang, X. 2015. Isoliquinoline, a bioactive alkaloid derived from embryos of *Nelumbo nucifera*, induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through suppression of NF- κ B signalling. *J. Agri. Food. Chem*. 63(40): 8793 – 8803.
- Srivastava, S., Somasagara, R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S.K., Srivastava, M., Choudhary, B., Raghavan, S.C. 2016. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrest cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci. Reports*. 6 : 240-249.
- Suarni dan Subagio, H. 2013. Potensi pengembangan jagung dan sorgum sebagai sumber pangan fungsional. *J. Litbang Pert*. 32(2): 47- 55.
- Sukardiman, Ekasari, W., Hapsari, P.P. 2006. Aktivitas antikanker dan induksi apoptosis fraksi klorofom daun pepaya terhadap kultur sel kanker mieloma. *Media Kedokteran Hewan*. 22 (2): 104 -111.
- Turan, I., Demir, S., Klininc, K., Yaman, S., Misir, S., Kara, H. 2017. Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *J. of Pharm. Analysis*. doi j.jpha.12.005.
- Union of international cancer. 2012. Cancer declaration. <http://www.cing.ac.cy/images/media/file/UICC%20Cancer%20decalartion.pdf>. [diakses pada tanggal. 3 Januari 2018].
- Usman, M.H. 2011. Etnobotani pemanfaatan tumbuhan obat oleh masyarakat Kecamatan Alor Tengah Utara Kabupaten Alor Nusa Tenggara Timur [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.

- Wang, D.S., Rizwani, G.H., Gou, H., Ahmed, M., Hassan, S.Z., Chen Z.S., Xu, R.H. 2014. *Annona squamosa* Linn: cytotoxic activity found in leaf extract against human tumor cell lines. *J. Pharm. Sci.* 27(5): 1559 – 1563.
- Windarti, I., Andini, N. 2013. The potency of ambon banana (*Musa sapientum*) fruit peel as the chemopreventive and co-chemotherapy agent in breast cancer. Medical Faculty of Lampung university. ISSN 2337-3776.
- World Health Organization. 2017. Cancer intervention technical briefing. <http://www.who.int/ncds/governance/cancers.pdf?ua=1> . [diakses pada tanggal 3 Januari 2018].
- Xu, X., Li, T., Fong, C.M.V., Chen, X., Wang, Y., Huang, M., Lu, J. 2016. Saponins from chinese medicines as anticancer agents. *J. Molecules.* 21 : 1326
- Zheng, T., Que, Z., Jiao, L., Kang, Y., Gong, Y., Yao, J., Ma, C., Bi, L., Dong, Q., Zhao, X., Xu, L. 2017. Herbal formula YYJD inhibit tumor growth by inducing cell cycle arrest and senescence in lung cancer. *Sci. Rep.* 7 : 4984.

LAMPIRAN

1. Lampiran Draft Artikel Ilmiah

In Vitro Evaluation of Nanochitosan-*Annona squamosa* Leaf Extract as Anti- Colon Cancer Agent

Amaq Fadholly¹, Annise Proboningrat¹, Regina P.D. Iskandar²,
Fedik A. Rantam³, Sri A. Sudjarwo⁴

¹Doctoral student, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

²Doctoral student, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, ³Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

⁴Department of Veterinary Basic Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

*Corresponding Author: Sri Agus Sudjarwo; ags158@yahoo.com

Abstract

Background: Colorectal cancer is the third in incidence after lung and breast cancers and accounts for almost 10% of total cancer and almost 8% cancer deaths. Therapeutic strategies against cancer are still leading research for new drug discovery. Today, bioactive phytochemicals of herbal plant could be improved become herbal nanoparticles as one of solution to reduce cancer activity.

Objectives: This project had been designed to prepare nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs) to enhance their bioactivities as anticancer agent on WiDr cells and investigated the relationship due to their ability induce apoptosis and cell cycle arrest. **Methods:** NCAs was made using ionotropic gelation and continued particle size analyzer (PSA) to analyze distribution of NCAs. Anticancer activity were performed by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Immunocytochemistry assay to evaluate the caspase-3 number of WiDr cells and continued induction of apoptosis assay. Cell cycle arrest was also analyzed by flowcytometry using propidium iodide (PI). **Results:** The average size of NCAs were obtained 30,7 nm. The NCAs showed potent cytotoxicity with IC₅₀ 292,39 µg/ml and up-regulate caspase-3 expression. The NCAs caused cell cycle arrest at the G2/M phase on WiDr cells. **Conclusion:** Our data suggest NCAs as a potential chemotherapeutic agent against WiDr cells with mechanism of apoptosis. Further studies are needed to obtain the concentration of NCAs which can selectively suppress WiDr cells through *in vivo* study.

Keywords : *Annona squamosa*, colon, cancer, apoptosis

INTRODUCTION

Cancer has emerged as one of the most strongest disease of deaths since many years ago. It is caused of many factorial by uncontrolled division cellular and metastasis (Gautam et al., 2014). Approximately, 7.6 millions people die from cancer annually and is expected to increase around 13.1 millions in 2030 (WHO, 2017). Colon cancer is one of cancer which has high mortality in both of male and female (Torre et al., 2015). The cases of colorectal cancer were published in 2012, it showed 106.480 cases of colon cancer and 40.340 of rectal cancer and there were 50.830 deaths of colorectal cancer in 2009 (NCI, 2013).

Chemopreventive is a strategy to eliminate cancer selectively. It could be controlling to block carcinogenesis process in stages of promotion and progression (Rosas et al., 2014). Many studies assessed chemopreventive agent could use botanical products. It would take many advantages as cancer prevention because the capacity to delight as a bioactive compound or in combination with chemotherapies (Jaganathan et al., 2014). Today, more than 5000 bioactive compound have been identified and still continuously increasing for the new one. These novel phytomedicines have shown running as anticancer drug candidate in *in vitro* models. In 1997 The American Institute of Cancer Research has explained if we consume high intake of vegetables and fruits it would be correlates with a low risk of tumor incident (Adorjan and Buchbauer, 2010).

Commonly, *Annona squamosa* is called as custard apple in english and belonging to Annonaceae family and it is considered drug plant for cardiac disease, diabetes and cancer (Sobiya et al., 2009). The past studies showed a infusion of leaves are sniffed to overcome hysteria, fainting and decoction to dysentery (Gajalakshmi et al., 2011). Phytochemical screening of leaf extract showed the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, glycosides, phenolic, terpenoids and steroids (Pawaskar and Sasangan, 2017). *Annona squamosa* have been reported in the discovery of new Annonaceous acetogenin, called as (2,4-cis and trans)-squamolone, (2,4-cis and trans)-9-oxo-asimicinone, bullacin B (Hopp et al., 1998). Acetogenins have been isolated from the fruit pulp, seeds, twigs, roots, stems, leaves and bark of many plants in the Annonaceae family. Acetogenins have potent anti-neoplastic, parasitocidal, pesticidal and antimicrobial activities (Chatrou et al., 2012). Acetogenins isolated from *Annona squamosa* seeds reported cytotoxic activity through inhibited proliferation on HL-60 cells, induced apoptosis by the activation of caspase-3 and also against 9KB, A549, HT-29, 9ASK tumour cells (Ruppercht et al., 1986). In the past studies showed that annonacin isolated from seed of *Annona reticulata* have cytotoxic effect to T24 bladder cancer cells (Yuan et al., 2003). Annonacin of *Annona muricata* was reported induced apoptotic cell death in a caspase-3 (Yap et al., 2017) and green biosynthesis of silver nanoparticles of *Annona squamosa* leaf extract were reported have cytotoxic effect and induction of apoptosis on MCF-7 cells (Vivek et al., 2012).

Today, nanotechnology is a promising approach to enhance the bioavailability of herbal medicine, in addition of variable size and shape making advantages in clinical medicines (Chingnupituk, 2011). Nanotechnology have a size of less

than 100 nanometer. Non-toxic biopolymer material is one of nanoparticle colloidal is expected to protect bioactive compound in releasing like polyphenol. A carrier material like the combination of chitosan and sodium tripolyphosphate (Na-TPP) is used to protect, stabilize and control the release of the core. Hydrophilic polymer like chitosan can easily cross-link with Na-TPP as poly anions to control the release of the drug (Dhudani and Kosaraju, 2010). Chitosan is a biodegradable and biocompatible polymer and available in a wide range of molecular weights and deacetylation degrees. Chitosan presents mucoadhesive, immunostimulating, antimicrobial and wound-healing properties (Agnihotri et al., 2004).

Apoptosis induction and cell cycle arrest have become indicator of anticancer sign for cancer cells. Therefore, this project had been designed to prepare nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract to enhance their bioactivities as anticancer agent on WiDr cells and investigated the relationship due to their ability induce apoptosis and cell cycle arrest.

MATERIALS DAN METHODS

Experimental Procedures

This project was started with the preparation of nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs) and continued with particle size analyzer to evaluate the distribution of NCAs. We prepared four concentration of NCAs (50, 100, 200, 400 µg/ml in DMSO) and given on WiDr cells to determine the IC₅₀ value continued with analysis of caspase-3 expression, induction of apoptosis and cell cycle arrest.

Materials

Chitosan, methanol, ethanol 96%, glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany), sodium triphosphate (TPP), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco, NY, USA), fetal bovine serum (FBS) (Rocky Mountain Biologicals, Inc., USA), Hepes (Sigma Aldrich, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, USA), fungizone, phosphate buffer saline (PBS), trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, USA), 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), SDS, HCl 0,1 N, RNase (BD Bioscience, San Diego, CA), propidium iodide, triton-x 100 (pro GC-Merck), H₂O₂, caspase-3 antibody (Sigma Aldrich, USA), Mayer-Haematoxylin Eosin, entellan (Merck) and aquadest.

Preparation of *Annona squamosa* leaf extract

Annona squamosa leaves were collected from Lumajang, East Java province of Indonesia in Mei 2018. The plant material was identified at Indonesian Institute of Science, Pasuruan, Indonesia. The rest of the specimen have been collected for future stock. The leaves were cleaned and chopped into small pieces and shade dried. They were powdered using mechanical blender and passed through the coarse sieve (0.2 mm). The powdered was macerated with ethanol 96% for 72 h at 37°C. The extracted was evaporated in waterbath at 60°C. The residue was stored in a refrigerator 0-4°C.

Preparation of Nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs)

The method of ionic gelation were prepared of chitosan (0.1 % w/v) was dissolved in acetic acid (0,25 % v/v) and sodium tripolyphosphate (0.84 % w/v). *Annona squamosa* leaf extract (1 g) was dissolved in 50 ml distilled water and add 100 ml chitosan in acetic acid followed 350 ml sodium tripolyphosphate drop wise in the solution stirring condition at room temperature. It was stirred for 2 h followed by centrifuge 6000 rpm for 30 min and supernatant was collected and dried. The powder was then dissolved in DMSO for culture cells treatment.

Particle size analysis of NCAs

Dynamic light scattering (DLS) method was performed to measure the particle size distribution of NCAs using Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., UK).

Cell culture of WiDr cells

WiDr cells were collected from Parasitology Laboratory, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. Cells were cultured in DMEM media and supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum, 3 % streptomycin-penicillin and 1 % fungizone in 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were maintained in 25 cm² flask with 7 ml media and harvested using 0.25 trpsine-EDTA after reaching 80% on confluency.

Cytotoxic assay of NCAs on WiDr cells

The cytotoxicity of WiDr cells were challanged by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were cultured in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well with 100 μ l of volume and incubated at 37°C, 5% CO₂ for overnight. Cells were added with various concentration of NCAs for 24 h. Then, the media were removed and 100 μ L of DMEM and 10 μ L MTT (5 mg MTT/mL solution) were added to every single well. The plates were incubated for 4 h. Control cells just received only media without NCAs samples. The crystal of formazan which formed in viable cells were solubilized with 100 μ L of SDS-stopper HCl 0.1 N. The absorbance 595 nm was measured by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader. Each number showed the mean of triplicate experiments. The difference absorbance both treated and untreated groups were calculated to determine cell viability. The cytotoxic dose of 50% cell deaths (IC₅₀) was determined from analysis probit.

Imunochemistry assay to evaluate caspase-3 expression

WiDr cells were cultured in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and incubated for 24 h. The cells were treated with 100, 200, 400 μ g of NCAs for 24 h. Cells were plated in poly-L-lisin slides. Cells were fixed with metanol for 3 min, permeabilized for 3 min in PBS, blocked in 2% BSA for a hour and stained with monoclonal antibody caspase-3 for a hour then washed with PBS for 3 x 3 minutes and stained with bionylated secondary antibody for a hour. Incubated with HRP-streptavidin for 10 minutes, added DAB for 5 minutes, washed with

aquadest, then counterstained with hematoxilin for 20 seconds and the last mounted on glass slides.

Apoptosis observasion on WiDr cells

WiDr cells were cultured in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and incubated for 24 h. The cells were treated with 100, 200, 400 μg of NCAs for 24 h. The medium was removed and washed using FBS. Coverslips were taken and put on the glass slide before added with 10 μl acridine orange-ethidium bromide and left for 15 minutes. It was then observed under the fluorescence microscope.

Cell cycle arrest analysis of WiDr cells

WiDr cells were cultured in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/ml and added with 100, 200, and 400 μg of NCAs for 24 h. The distribution of cell cycle phase were determined of treated and untreated cells. They were harvested and washed twice with PBS (pH 7,4) then centrifuged at 600 rpm for 5 min. Cells pellet was washed twice with PBS and resuspended with 0.5 ml PI/RNase detection kit then incubated at 37°C for 15 min. The distribution of cell cycle phases were determined by flow cytometry (Becton Dickinson FACS Calibur) by analyzing with minimum 20.000 cells/sample. The percentage of G0/G1, S and G2/M phase were analyzed by ModFit LT 3.0 cell cycle analysis software (Becton Dickinson).

Statistical Analysis

This experiments were repated three times and expressed as mean \pm SD. Statistical difference were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) and followed by Tukey HSD. Statistical analysis were considered significant if $P < 0.05$

RESULTS

Particle size analysis of NCAs

Particle size analyzer resulted the avarage of NCAs were obatined 30,7 nm shown in figure 1 and nanoparticles ditribution shown in table 1. This value was strenghtned by previous research showed that nanoparticles were prepared by the ionic gelation method are 40 -110 nm (Antoniou et al., 2015). The NCAs showed that particles distribution under 100 nm was 99,2 %.

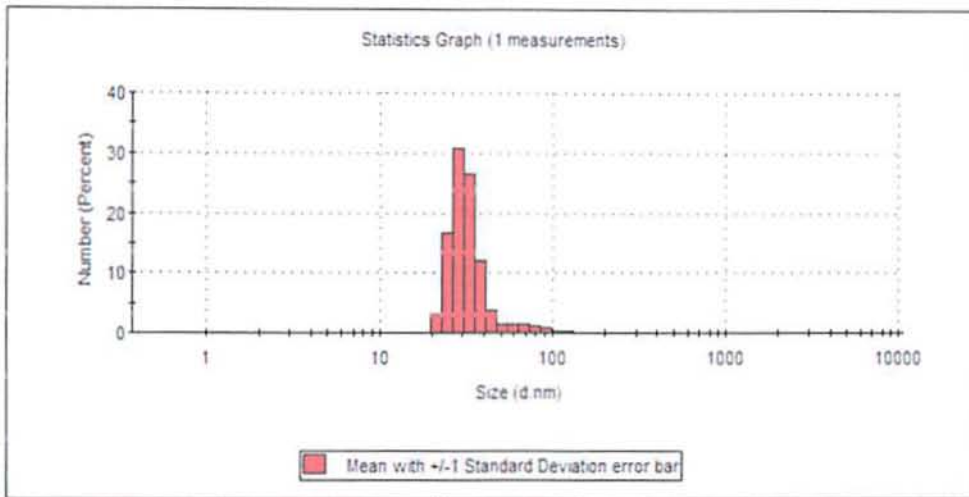


Figure 1. Size distribution of nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs)
IC₅₀ value of NCAs on WiDr cells

The anticancer activity of nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs) were evaluated *in vitro* against WiDr cells after 24 h exposure and the IC₅₀ values were determined from a graph of cell viability measured over a range of concentrations specifically 50, 100, 200, 400 µg/ml against WiDr cells. The result showed that at concentration 50 to 400 µg/ml NCAs could inhibit the cells growth. The results of cytotoxicity assay showed NCAs have the highest inhibition of WiDr cells at 58,07 %

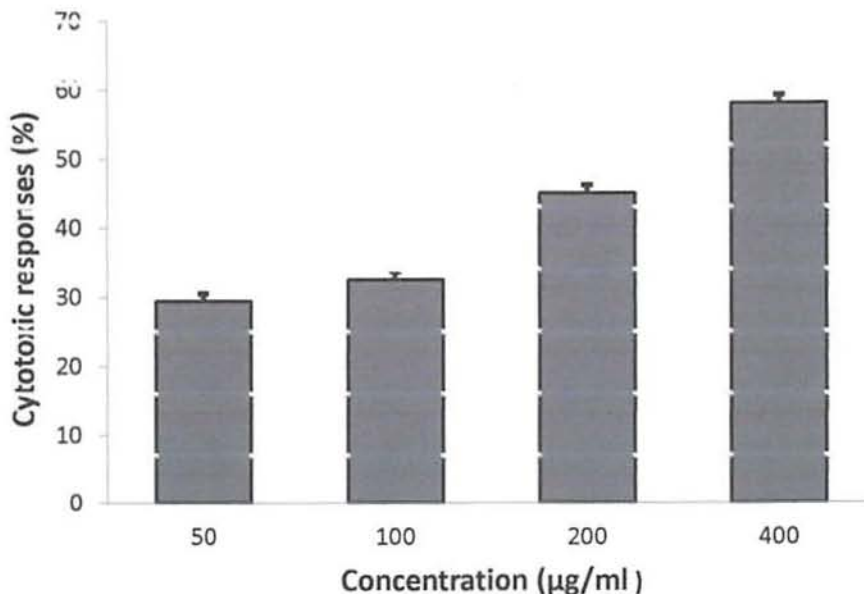


Figure 2. Cytotoxic responses of NCAs on WiDr cells. The value was analyzed with probit analysis. Tabulated values are mean \pm standard deviation (SD) of three replicates.

NCA-induced caspase-3 expression on WiDr cells

To investigate whether apoptosis was mediated by caspase-3, we added the three concentrations (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) of NCAs on WiDr cells. The result showed a rapid enhancement of caspase-3 activity after treatment for 24 h (figure 3). At a concentration 200 $\mu\text{g/ml}$, a slight but not significant increase in the activity was achieved ($P > 0.05$) if compared with 100 $\mu\text{g/ml}$.

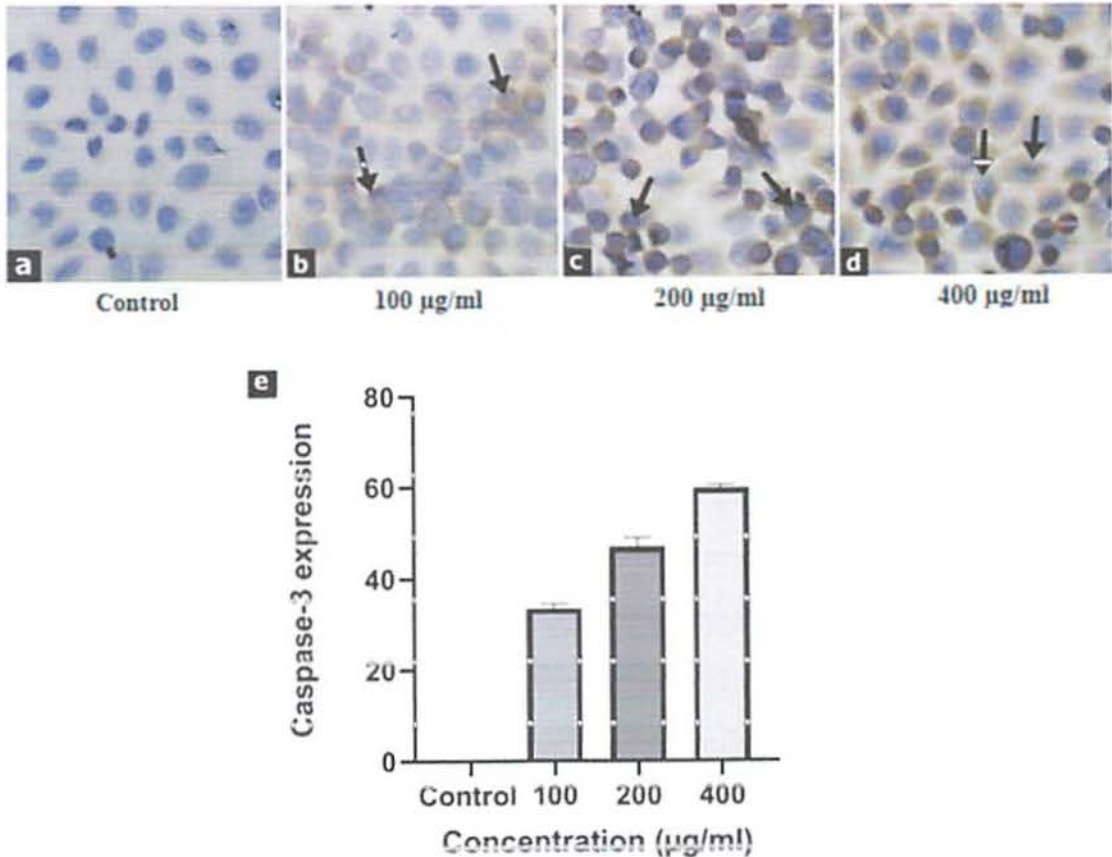


Figure 3. Effect the NCAs on caspase-3 on WiDr cells (400x), untreated group (a), caspase-3 expression (black arrow) shown in brown colour in cytoplasm of nuclei of the group treated 100 $\mu\text{g/ml}$ (b), 200 $\mu\text{g/ml}$ (c), 400 $\mu\text{g/ml}$ (d) bar represents expression of caspase-3 score treated NCAs on WiDr cells. (*) indicates $P < 0.05$.

NCA's induced apoptosis on WiDr cells

To evaluate apoptosis induction of NCA's on WiDr cells, we investigated apoptotic assay using double staining method. The result due to cytotoxic assay, and caspase-3 expression were parallel with this method. All cells in untreated group showed green fluorescence meant there were no cell death. Orange fluorescence cell meant as apoptotic cells that loss cell membrane permeability then turn on apoptotic bodies and several nuclear cells were fragmented shown in figure 4.

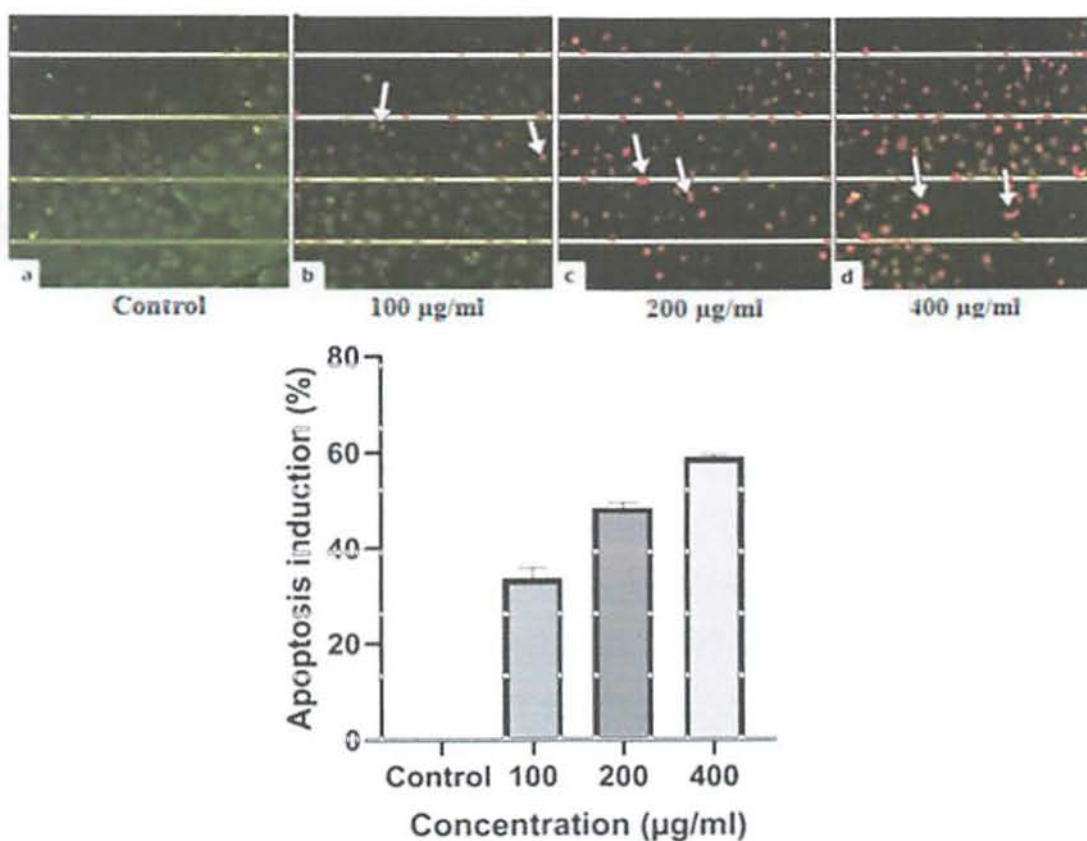


Figure 4. Effect the NCA's on apoptosis induction on WiDr cells (400x), untreated group showed green color (a), apoptotic cells showed orange-red color (white arrow) of the group treated 100 µg/ml (b), 200 µg/ml (c), 400 (d) bar represents apoptosis induction score treated NCA's on WiDr cells.

NCA's induced G2/M phase on WiDr cells

NCA's were prepared to further investigated by flow cytometry to analyze the cell cycle arrest treated with 100, 200 and 400 μg of NCA's for 24 h. Cell cycle arrest may mediated induction of apoptosis and showed the inhibition of cell proliferation. The cell cycle analysis indicated NCA's induced G2/M cell cycle arrest as the concentration increased.

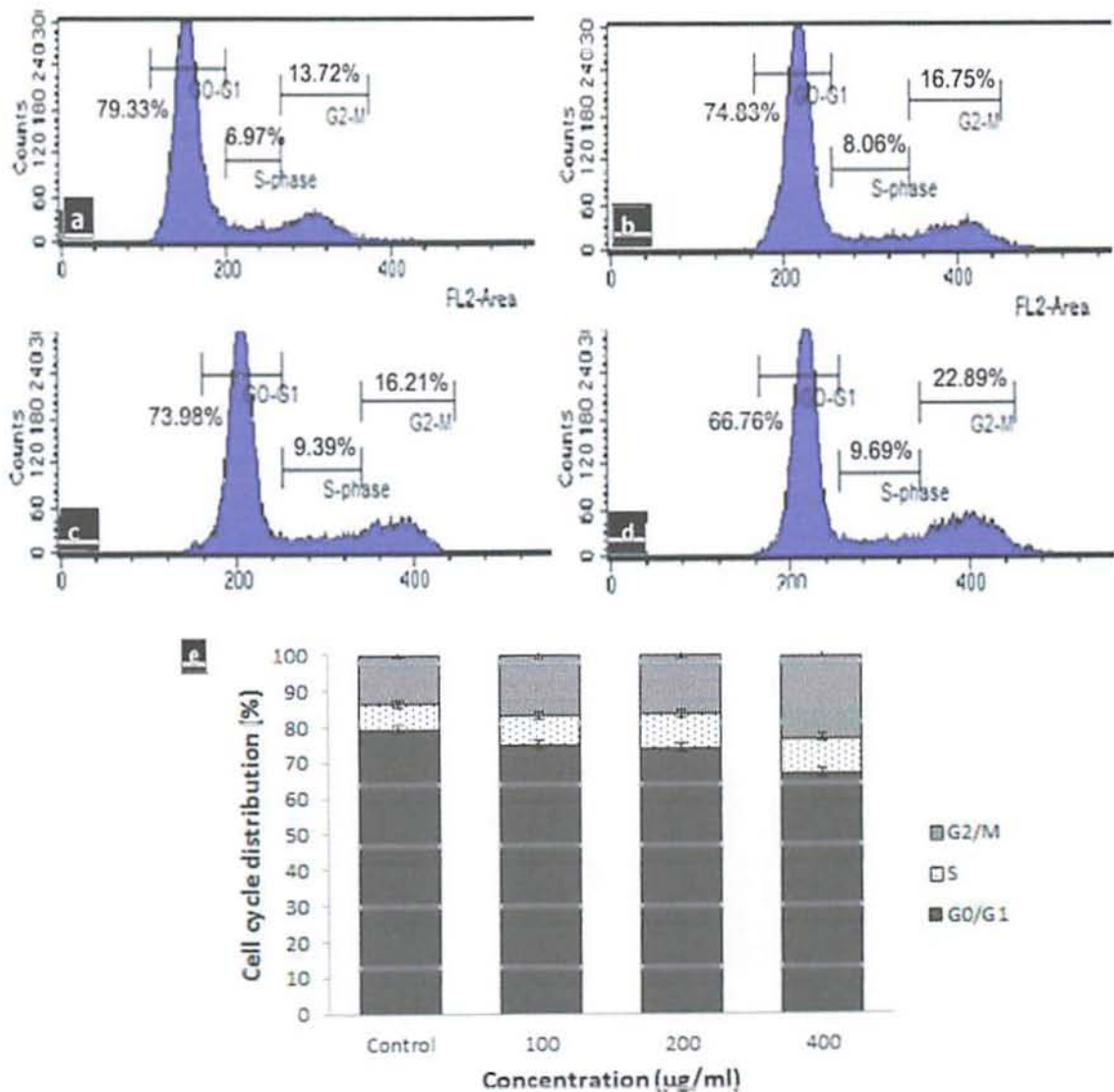


Figure 5. Effect the NCA's on cell cycle distribution on WiDr cells. Flow cytometry histogram of cell cycle untreated group (a), group treated 100 $\mu\text{g/ml}$ (b), 200 $\mu\text{g/ml}$ (c), 400 $\mu\text{g/ml}$ (d), graph of analysis of cells number (%) each cell cycle phase relative to total phase (e). For examples, G0/G1 is calculated as percentage of the number cells in the G0/G1 population relative to the number of total cells.

As shown in figure 5, growth inhibition was associated with significant cell cycle arrest in G2/M phase. Arrest in G2/M was associated with a concomitant decrease in the cells percentage in G0/G1 phase while in the S phase cells remained at almost at the same levels. When exposed to 400 µg/ml, the cell population of WiDr cells both in the S and G2/M phases were 9.69% and 22.89%, respectively they increased compared with the control group.

DISCUSSION

Cancer is a multistep process that occurs over an extended period of time, started with initiation then promotion and progression (Pandurangan et al., 2013). The best treatment for colorectal cancer depend on many factors, including health status of patient, tumor size and its location (Marley and Nan, 2016). If cancer only in single polyp, it can be cut during a colonoscopy but if it has a larger area resection may include the partial or total removal of the colon when it is not mention, the other treatment like chemoteraphy can be best choice to use drugs to avoid cancer growth or kill cancer cells (Breikopft at al., 2014).

Anticancer drugs were approved in about 1940-2002, approximately 54% were derived natural products. One of successful anticancer drugs originally derived from plants is vinca alkaloids from *Catharanthus roseus* and terpene paclitaxel from *Taxus baccata* (Li-Weber, 2009). *Annona squamosa* is one of the potential plant can be used as anticancer drug for any cancer like breast cancer (MCF-7 cells), it was treated using silver nanoparticles extract from *ammona squamosa* leaf (Vivek et al., 2012). Plants are still promising source anticancer chemotherapeutic agent. In this study the cytotoxic effect nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract (NCAs) against WiDr cells were investigated. Our result showed the nanoparticles offer alternatives improve therapeutic value while avoid toxicity by releasing bioactive compound spesifically to target by spesific chemical and pathophysiological settings (Martinez-Ballesta et al., 2018). Particle size have been main factor for optimazing activity of in vitro and increase the bioavailability of uncontrolable molecules (Onodera et al., 2015). This study present NCAs have IC₅₀ 292,39 µg/ml. It may be caused from the acetogenin efect that can inhibit proliferation of the cancer cells.

The result of caspase-3 expression in imunocytochemistry showed that the increasing doses followed by increasing the amount of caspase-3 expression. Caspase-3 is one of the marker that showed cells become apoptosis in early stage (Gunther et al., 2017). Apoptosis is normal physiological process to eliminate unctrolled growth of cells and maintain homeostasis in healty tissue (Huang and Freter, 2015). Mitochondria is vital organel in activation of intrinsic pathway of apoptosis. In the present study, we observed damage of mitochndrial membrane potential after the treatment. The pathway is activated by a various of extra and intarcellular stress, including oxidative stress and cytotoxic drugs. The pathway is dominated by family of bcl-2 protein, which led to release of cytochrom-c from the mitochondria, then bind together with procaspase-9, and apaf-1 contribute to make apoptosome formation and activation caspase-9, thus finally activation of procaspase-3 to caspase-3 (Shakeri et al., 2017). These result further demonstrate that induction of apoptosis of WiDr cells may be achieved by the molecular mechanism of the cytochrome-c and dATP-mediated activation of APAF-1.

Cancer and many human diseases are known have disturbances in the several phases of cell cyle. Carcinogenesis is a process to control may regulatory factors of checkpoints to

lost or arrested. The checkpoint of cell cycle are important control mechanism to execute of cell cycle activity. However, there are several chemopreventive phytochemicals could restore and alter regulatory checkpoints through inducing cell cycle arrest. Recent investigations suggest anticancer agents arrest the cell cycle at the G0/G1, S or G2/M phase and induce apoptosis of cells (Liu et al., 2012). In the present study, an increase percentage of cells in the G2/M with a decrease in G0/G1 phase was observed to occur in dose dependent manner while the percentages of S phase remained at almost the same level but increase at 200 µg both in NEAqs and EEAqs in the colon cancer cells. In the past studies showed that annonacin isolated from seed of *Annona reticulata* have cytotoxic effect to T24 bladder cancer cells by arresting in G0/G1 phase. It induced apoptotic cell death of cancer cells by upregulating bax and bad expression and increasing caspase-3 activities and procaspase-3 cleavage (Yuan et al., 2003) but in other study showed that annonacin of *Annona muricata* induced apoptotic cell death in a caspase-3 related pathway and arrest cell cycle in G2/M phase on endometrial cancer cells (Yap et al., 2017), Interestingly, it related with our current study showed that *Annona squamosa* leaf have cytotoxic effect, induce apoptosis in caspase-3 and arrest cell cycle in G2/M phase. Cycle progression is controlled by several CDKs and their cyclin partners, CDK1 and CDK2 are activated primarily associated with cyclin A and cyclin B in the cycle of cell division (Canavese et al., 2012). It could be attention that a key regulator of the G2/M transition of the cell cycle is a complex of CDC1/CDK2 and the cyclin B (Nigg, 1995). If CDC1/CDK-2 were inhibited, it would be expected as an arrest at the G2/M transition.

However, apoptosis induction on WiDr cells may be occur via up-regulation of pro-apoptotic proteins and inhibition of NFκB, AP1, and their target genes (Kwon et al., 2010), decreased protein expression involved in the G0/G1 and antiapoptotic proteins and decrease in membrane potential caused by releasing cytochrome-c of mitochondrial and activation of caspase-3 (Chuang et al., 2007). But future investigation is need to understand further the mode of action of nanoparticles extract of *Annona squamosa* leaf.

CONCLUSION

Nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract is one of potential candidate as anticancer drug. Modification treatment by nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract inhibited the growth of WiDr cells. It also induced apoptosis as increasing caspase-3 expression and cell cycle arrest at G2/M phase transition. Therefore, a relevant basis for developing Nanochitosan-*Annona squamosa* leaf extract as a potential chemotherapeutic agent against WiDr cells as anticancer with mechanism of apoptosis and nevertheless, further studies are warranted to evaluate its potential anti-proliferative and anti-carcinogenic activities through in vivo study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by PMDSU Grant Funds 1341/UN3.14/LT/2018 from the Ministry of Research, Technology and Higher Education (KEMENRISTEKDIKTI) of The Republic of Indonesia.

REFERENCES

1. Adorjan, B., Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragrance J.* 25, 407–426.
2. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. *J. control release.* 100(1): 5- 28.
3. Breitkopf CR, Asiedu GB, Egginton J, Sinicrope P, Opyrchal SM, Howell LA, Patten C, Boardman L. An investigation of the colorectal cancer experience and receptivity to family-based cancer prevention programs. *Support Care Cancer.* 2014;22:2517–25.
4. Canavese M, Santo L, Raje N. 2012. Cyclin dependent kinases in cancer: Potential for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther.* 13:451–457. doi: 10.4161/cbt.19589.
5. Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Erkens, R.H.J., Couvreur, T.L.P., Neubig, K.M., Abbot, J.R. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *169: 5–40*
6. Chingunpituk J. Nanosuspension technology for drug delivery. *Walailak J Sci Technol.* 2011;4:139–153.
7. Chuang JY, Huang YF, and Lu, HF. 2007. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria and caspase-3 dependent mechanism and NFκB down-regulation. *In Vivo.* 21(6):1003–1009.
8. Dhudani AR, and Kosaraju SL. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers.* 2010; 81:243–48.
9. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010 in press.
10. Gautam, N., Mantha, A.K., Mittal, S., 2014. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed Res. Int.* 2014, 23.
11. Gajalakshmi S, Divya R, Divya V, Deepika Mythili S, Sathivelu A. Pharmacological activities of *Annona squamosa*: a review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2011; 10(3):24–29.
12. Gunther, A., Luczak, V., Abel, T., Baumann, A. 2017. Caspase-3 and GFAP as early markers for apoptosis and astrogliosis in shRNA-induced hippocampal cytotoxicity. *J. Exp. Biol.* 15(220): 1400–1404. Doi: 10.1242/jeb.154583
13. Hopp, C., Alali, F.Q., Gu, Z., McLaughlin, J.L. 1998. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from bark of *Annona squamosa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 6 : 569–575.
14. Huang, C. and Freter, C. 2015. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16(1): 924–949.
15. Jaganathan SK, Vellayappan MV, Narasimhan G, Su-priyanto E (2014) Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. *World*

- Journal of Gastro-enterology 20 (16): 4618-4625. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4618.
16. Kwon H, Hwang J, So J, Lee C, Sahoo A, Ryu J, Jeon W, Ko B, Im C, Lee S, Park Z, Im S. 2010. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF κ B and AP1. *BMC Cancer*. 10:392.
 17. Liu R, M, LiY B, Zhong JJ. 2012. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*. 681:23-33.
 18. Li-Weber, M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat. Rev.* 2009, 35, 57–68. [CrossRef] [PubMed]
 19. Marley, A.R. and Nan, H. 2016. Epidemiology of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 7(3): 105-114.
 20. Martinez-Ballesta, M., Gil-Izquierdo, A., Garcia-Viguera, C., Dominguez-Perles, R. 2018. Nanoparticles and controlled delivery for bioactive compounds: outlining challenges for new “smart-foods” for health”. *Foods*. 7(72). Doi:10.3390/foods7050072.
 21. National Cancer Institute (NCI). Database Colon and Rectal Cancer. The National Institutes of Health; 2013.
 22. Nigg EA. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*.17:471–480. doi: 10.1002/bies.950170603.
 23. Pandey, N. and Barvey, D. 2011. Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa* Linn. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*. 2(4): 2229-3701
 24. Priyadarsini RV, Murugan RS, SriPriya P, karunagaran D, Nagini S. 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondria mediated apoptosis in human cervical cancer (Hela) cells. *Free Radical Research*, 44(6): 624-34.
 25. Onodera, T., Kuriyama, I., Andoh, T., Ichikawa, H., Sakamoto, Y., Lee-Hiraiwa, E., Mizushima, Y. 2015. Influence of particles size on the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory and anti-allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. *InteR. J. of molecular medicine*. 35 : 1720-1728.
 26. Pandurangan AK, Dharmalingam P, Sadagopan SK, Ramar M, Munusamy A, Ganapasam S. 2013. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt/ β -catenin/GSK-3 β signaling. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 32:131–139.
 27. Pawasakar, S.M., and Sasangan K.C. 2017. Preliminary phytochemical and *In vitro*-antimicrobial analysis of *Annona squamosa* Linn leaf extract. *J. Pharm. Sci and Res*. 9(5): 618 – 623.
 28. Rosas C, Sinning M, Ferreira A et al. (2014) Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. *Biological Research* 4 (1): 27. doi: 10.1186/0717-6287-47-2.

29. Rupprecht, J.K., C.J. Chang, J.M. Cassady, J.L. McLaughlin, K.L. Mikolajczak, and D. Weisleder. 1986. Asimicin, a new cytotoxic and pesticidal acetogenin from the paw paw, *Asimina triloba*. *Heterocycles* 24:1197-1201.
30. Shakeri, R., Kheirollahi, A., Davoodi, J. 2017. Apaf-1: regulation and function in cell death. *Biochemie*. 135 : 111-125. Doi:10.1016/j.biochi.2017.02.001.
31. Sobiya, R., Jannet V., Aiyavu, C, Panneerselvam. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver injury in swiss albino mice. *International Journal of Integrative Biology*. 2009; 5(3):182-186.
32. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. (2015) Global Cancer Statistics. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 65: 87- 107. doi: 10.3322/caac.20107.
33. Vivek, R., Thangam, R., Muthuchelian, K., Gunasekaran, P., Kaveri, K., Kannan, S. 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Process Biochemistry*. 47 : 2405 – 2410.
34. Yap, C.V., Subramaniam, K.S., Khor, S.W., Chung, I. 2017. Annonacin exert antitumor activity through induction of apoptosis and extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Pharmacognosy Research*. 9(4): 378-383. Doi : 10.4103/pr.pr_19_17
35. Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Yeh YT, Kao YH, Lin KH. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sci*. 72:2853-61
36. World Health Organization. Fact sheet no 297. 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Accessed 19 Jun 2018.

2. Lampiran Sertifikat Seminar Internasional

