

---

**EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR  
(*Cosmos caudatus*, Kunth) DAN DOKSORUBISIN TERHADAP  
SEL KANKER PAYUDARA T47D SECARA IN-VITRO DAN IN-SILICO**

**Fera Elia Fita, Dewi Listianingsih, Yunita Ayu Hapsari, Raka Galih Pradana, Erika  
Indah S. dan Ibrahim Arifin**

Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

e-mail: [veve.difi@yahoo.com](mailto:veve.difi@yahoo.com)

**ABSTRACT**

Doxorubicin is chemotherapeutic agents used widely for breast cancer therapy. The use of doxorubicin may cause cardio toxicity and multi-drug resistance. In order to overcome this side effect, a combined therapy using the methanol extracts of kenikir leaves is developed. The purposes of this study are to measure the cytotoxic effect of methanol extracts of kenikir leaves and doxorubicin combination treatment against T47D breast cancer cell growth in-vitro and in-silico, as well as determining the optimal dose combination that produces the most potent cytotoxic effects. The extraction of kenikir leaves is performed with soxhletation method. The cytotoxicity assay on the T47D breast cancer cells is carried out using MTT assay. The result of this research shows that the value of  $IC_{50}$  methanol extracts of kenikir leaves is  $778.05\mu\text{g/mL}$ . The treatment of the methanol extracts of kenikir leaves and doxorubicin combination treatment results in a strong synergy at the concentration  $130\mu\text{g/mL}$  ( $-41\text{ nM}$ );  $195\mu\text{g/mL}$  ( $-41\text{ nM}$ ) and  $130\mu\text{g/mL}$  ( $-27.33\text{ nM}$ ) with the value of Combination Index 0.2; 0.3 and 0.3 respectively. The result of in-silico test shows that the bond energies of aglycone flavonoid and quercetin glycoside on Bcl-2 are  $-63.3359$  and  $-67.0414$ .

**Key words:** Kenikir leaves extract, doxorubicin, T47D cells, molecular docking

**PENDAHULUAN**

Kanker Payudara telah dikenal luas sebagai kanker yang paling mematikan (Arifin dkk., 2012). Hasil penelitian yang dilakukan oleh American Cancer Society (2013) menunjukkan bahwa pada tahun 2013, angka kejadian kanker payudara di Amerika Serikat sebanyak 232.340 dimana 39.620 wanita dan 410 pria, diantaranya meninggal dunia. Data yang dipublikasikan oleh World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa pada tahun 2011 kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 atau 1,4% dari total kematian (WHO, 2011).

Sampai saat ini, pilihan utama terapi kanker payudara dilakukan dengan menggunakan agen kemoterapi (Drummond, 2007), salah satu diantaranya yang dikenal paling luas adalah doxorubisin (Childs dkk., 2001; Bapsy dan Sahoo, 2004). Penggunaan doxorubisin dosis tinggi berisiko menimbulkan kardiotoxicitas yang dapat menyebabkan kematian (Singal dkk., 2001; Schlatner dkk., 2006). Selain itu, penggunaan doxorubisin dapat meningkatkan terjadinya *multi drug resistance* (MDR) (Popov, 2005).

Pengatasan efek samping doxorubisin dilakukan melalui melalui pendekatan penggunaan kombinasi kemoterapi (kokemoterapi). Salah satu bahan alam atau herbal yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kokemoterapi adalah ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth.). Penelitian yang dilakukan oleh Pebriana dkk. (2008) melaporkan bahwa ekstrak metanol daun kenikir memiliki aktivitas memacu kematian sel T47D melalui mekanisme apoptosis, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Kandungan flavonoid glikosida kuersetin dalam ekstrak metanol daun kenikir dilaporkan memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan  $IC_{50}$   $344,91\mu\text{g/mL}$  (Pebriana dkk., 2008).

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengukur efek sitotoksik kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dengan doxorubisin terhadap pertumbuhan sel kanker payudara T47D secara in-vitro dan in-silico dan menentukan dosis kombinasi yang menghasilkan efek sitotoksik yang paling kuat.

---

---

Sinergisitas ekstrak metanol daun kenikir terhadap doksorubisin secara *in-silico* ditunjukkan dengan mengkaji kemampuan senyawa flavonoid glikosida kuersetin dan kuersetin dalam memacu apoptosis sel kanker payudara T47D melalui stimulasi sitokrom C dari mitokondria dengan berikatan pada protein Bcl-2 dan Bcl-XL. Efek sinergisitas secara *in-vitro* dilihat dari nilai *Combination Index* (CI) yang diperoleh dari uji sitotoksitas kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin pada sel kanker payudara T47D.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.), metanol, kultur sel kanker payudara T47D (koleksi CCRC, Fakultas Farmasi UGM), media yang mengandung RPMI 1640 (Gibco), media penumbuh yang mengandung FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (Gibco) dan penisilin-streptomisin 1% (Gibco), DMSO (Sigma), ekstrak metanol daun kenikir, doksorubisin (Sigma), aquadest, reagen MTT (Sigma), dan reagen *stopper* berupa SDS 10% dalam HCl 0,01N (Merck). Senyawa glikosida kuersetin digambar dengan *MarvinSketch*, struktur kompleks protein Bcl-2 dan Bcl-XL diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) didownload dari situs <http://www.rcsb.org/pdb>.

### Alat Penelitian

Seperangkat alat gelas, pemanas, seperangkat alat sokletasi, corong pisah, dan *rotary evaporator* (Heidolph), mikroskop fluoresens (Axiolab), mikroskop cahaya, ELISA reader (Anthos 2001), *treated tissue culture dish* diameter 10 cm, 96 *well-plate* (Nunc), sentrifug, *sentrifuge tube*, *object-glass*, mikropipet, *conical tube*, *yellow-tip*, *blue-tip*, pinset, vortex, dan kamera digital. PC, *software* PLANTS 1.1 manual, Co-PendriveLinux-KDE, YASARA dan *MarvinSketch*.

### Uji In-Silico

Optimasi geometri senyawa glikosida kuersetin dibuat dalam bentuk struktur 3D menggunakan program *MarvinSketch*. Protein dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand* selanjutnya dipilih untuk proses berikutnya. *Native ligand* kemudian dihilangkan dengan program YASARA untuk menyediakan ruang (*pocket/cavity*). Ruang ini yang akan digunakan dalam analisis interaksi ligan dan protein dalam uji *in silico*.

*Native ligand* selanjutnya dipasangkan kembali pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program PLANTS. *Root Mean Square Distances* (RMSD) dari interaksi *native ligand* dengan proteinnya dianalisis. Jika nilai RMSD kurang dari 2,0 angstrom ( $^{\circ}\text{A}$ ), protokol diterima dan docking senyawa uji pada protein target dapat dilakukan. Jika nilai RMSD  $\geq 2,0^{\circ}\text{A}$ , maka digunakan protein dengan kode (PDB ID) lain.

Aglikon kuersetin ditambahkan pada protein Bcl-2 dan Bcl-XL yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program PLANTS. Hasil analisis akan menunjukkan senyawa dengan konformasi yang memiliki energi terendah untuk berikatan dengan protein target. Visualisasi residu asam amino yang berinteraksi dengan *ligand* diolah dengan menggunakan program MOE (Purnomo, 2011).

### Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kenikir

Daun kenikir yang telah dicuci bersih dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga memenuhi persyaratan kadar air simplisia secara umum, yaitu <10% (Depkes RI, 1979). Simplisia yang sudah kering kemudian diserbuk hingga halus dan diayak dengan pengayak B<sub>30</sub>. Serbuk daun kenikir diekstraksi dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*.

### Uji Sitotoksik

Larutan uji ekstrak metanol daun kenikir dilarutkan dengan dimetil sulfoksid (DMSO) dan dibuat seri konsentrasi (1000, 850, 700, 550, 400, 250, dan 100)  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan seri konsentrasi doksorubisin dibuat (250, 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 dan 2,5) nM. Sel T47D yang sebelumnya disimpan dalam tangki nitrogen disubkultur pada media kultur hingga siap digunakan

---

untuk uji. Sejumlah  $1 \times 10^4$  sel didistribusikan ke dalam sumuran pada 96 *well plate* dan diinkubasi dalam  $\text{CO}_2$  5% dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  selama semalam. Langkah dalam pengujian tunggal maupun kombinasi yaitu larutan uji ditambahkan dalam sumuran untuk selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Media dibuang, kemudian tiap sumuran dicuci dengan PBS lalu ditambahkan media kultur sebanyak  $100 \mu\text{L}$  dan  $10 \mu\text{L}$  MTT dengan konsentrasi  $5 \text{ mg/mL}$ . Sel kembali diinkubasi selama 4-6 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% bersuhu  $37^\circ\text{C}$ . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* berupa SDS 10% dalam HCl 0,01N (Merck) lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang  $550 \text{ nm}$  kemudian dilakukan pengolahan data untuk mendapat nilai  $\text{IC}_{50}$  (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai  $\text{IC}_{50}$  yang diperoleh dari pengujian tunggal digunakan untuk menentukan konsentrasi kombinasi antara ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin dengan perbandingan  $\frac{1}{2}, \frac{1}{3}, \frac{1}{4}, \frac{1}{6}$ .

### Analisa Data

Data absorbansi atau OD (*Optical Density*) yang diperoleh dari pembacaan ELISA pada masing-masing sumuran kemudian dikonversikan dalam persen viabilitas sel menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persen Viabilitas Sel} = \frac{\text{OD sel dengan perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100 \%$$

Selanjutnya, hasil perhitungan dianalisa secara statistika menggunakan software *Microsoft Excell 2007* untuk mendapatkan nilai  $\text{IC}_{50}$  dari perlakuan tunggal ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin. Daya sitotoksik sinergistik ditentukan dengan menghitung nilai CI (*Combination Index*) menggunakan rumus sebagai berikut (Reynolds dan Maurer, 2005):

$$\text{CI} = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

Konsentrasi masing-masing senyawa uji yang digunakan untuk uji kombinasi dinyatakan dalam  $D_1$  dan  $D_2$ , sedangkan konsentrasi dari senyawa tunggal yang diperoleh dari interpolasi persen viabilitas sel yang disebabkan oleh perlakuan kombinasi (X) pada persamaan regresi tunggal dinyatakan dalam  $D_{x1}$  dan  $D_{x2}$ . *Score docking* terendah menunjukkan afinitas reseptor-ligan terkuat karena paling stabil (membutuhkan energi paling kecil untuk berikatan).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kenikir dengan Doksorubisin terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara T47D secara *In Vitro*.

Uji *docking molecular* bertujuan untuk mengetahui mekanisme molekuler yang memperantarai efek apoptosis aglikon flavonoid dan glikosida kuersetin secara *in-silico*. Hasil validasi protein Bcl-2 (PDB ID 4LVT) menunjukkan bahwa protokol *docking molecular* dapat diterima yaitu dengan nilai RMSD  $< 2^\circ\text{A}$  (Purnomo, 2011). Hasil *docking molecular* menunjukkan bahwa energi ikatan antara aglikon flavonoid dan glikosida kuersetin terhadap Bcl-2 yaitu (-63,3359) dan (-67,0414). Doksorubisin digunakan sebagai pembanding dalam pengujian ini menunjukkan energi ikatan terhadap Bcl-2 sebesar -84,9083. Data percobaan yang diperoleh tersaji pada tabel I.

**Tabel I. Analisis *Docking Molecular* Etil *p*-metoksisinamat terhadap Protein Target Bcl-2**

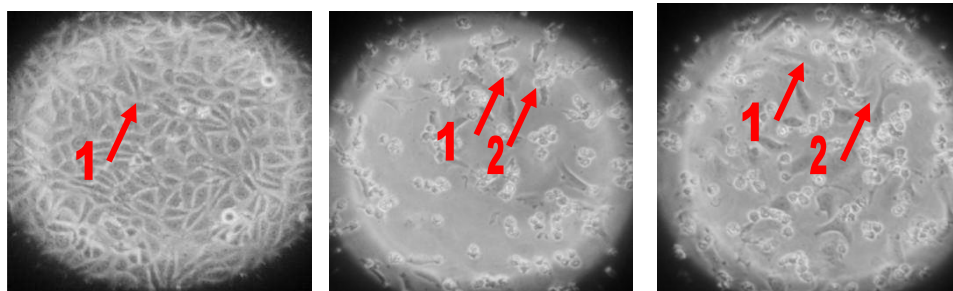
Keterangan	Energi Ikatan (kkal/mol) Aglikon Flavonoid dan Glikosida Kuersetin terhadap Protein Target Bcl-2 (PD ID 4LVT)
Aglikon Flavonoid	-63,3359
Glikosida Kuersetin	-67,0414
Dokso-rubisin	-84,9083

Keterangan = RMSD : 1, 5897  $^\circ\text{A}$

Semakin rendah energi yang digunakan untuk berikatan menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi semakin stabil. Hasil uji *docking molekular* dalam penelitian ini membuktikan bahwa energi ikatan glikosida kuersetin dengan protein Bcl-2 lebih kecil dibandingkan dengan aglikon flavonoid, namun lebih besar dibandingkan dengan doksorubisin. Hal ini dapat diartikan bahwa afinitas glikosida kuersetin terhadap protein Bcl-2 lebih rendah dibandingkan dengan doksorubisin, sehingga dapat diprediksi bahwa potensi glikosida kuersetin dalam memicu apoptosis sel kanker payudara T47D akan rendah bila diberikan secara tunggal. Oleh karena itu, penelitian ini merekomendasikan berbagai ekstrak tanaman yang mengandung senyawa aktif glikosida kuersetin (termasuk ekstrak metanol daun kenikir) harus diberikan dalam bentuk terapi kombinasi dengan doksorubisin pada terapi kanker payudara. Sementara itu, untuk protein Bcl-XL tidak ditemukan kode PDB yang sesuai dengan ligan berupa glikosida kuersetin.

#### **Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kenikir dengan Doksorubisin terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara T47D secara In Vitro**

Data yang dihasilkan dari uji sitotoksik dalam penelitian ini kombinasi adalah persentase jumlah sel kanker T47D yang masih hidup (% viabilitas sel) setelah tambahkan seri konsentrasi ekstrak metanol daun kenikir, seri konsentrasi doksorubisin dan kombinasinya. Semakin rendah nilai % viabilitas sel menandakan bahwa bahan uji semakin potent dalam menginduksi kematian sel kanker payudara T47D secara in vitro. Morfologi sel kanker T47D setelah direndam dalam ekstrak metanol daun kenikir selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 1. Hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak metanol daun kenikir mampu membunuh sel kanker payudara T47D (gambar 1C). Sel kanker T47D yang masih hidup berbentuk helaian daun (1). Kematian sel kanker T47D dapat diamati dari perubahan morfologi sel. Morfologi sel kanker T47D yang mati berbentuk bulat, tampak keruh dan mengapung (2)

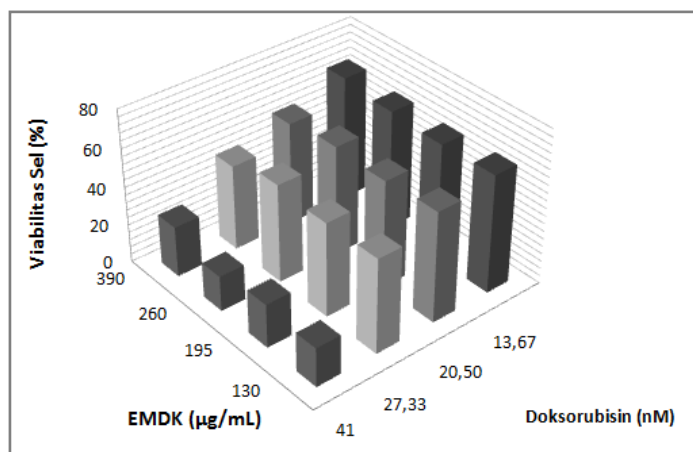


**Gambar 1. Morfologi sel kanker payudara setelah inkubasi selama 24 jam.** Kontrol sel T47D (A); Doksorubisin konsentrasi 250 nM (B); Ekstrak Metanol Daun Kenikir konsentrasi 1.000 µg/mL (C). Sel Hidup (1) dan Sel Mati (2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menekan viabilitas sel kanker payudara T47D dibandingkan pengujian sitotoksik bahan uji secara tunggal. Persentase viabilitas sel kanker payudara T47D yang dihasilkan dari pengujian efek sitotoksik kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin dapat dilihat pada gambar 2. Hasil analisa data menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin konsentrasi 130 µg/mL-41 nM; 195 µg/mL-41 nM; dan 130 µg/mL-27,33 nM menghasilkan efek sinergis kuat dengan nilai indek kombinasi 0,2 ; 0,3 ; dan 0,3 (tabel II).

Aktivitas sinergisme kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin, kemungkinan dihasilkan dari target aksi yang berbeda oleh kedua senyawa tersebut dalam memacu apoptosis sel kanker payudara T47D. Mekanisme aksi doksorubisin yaitu melibatkan ikatan dengan DNA melalui interkalasi diantara pasangan basa serta menghambat sintesis DNA dan RNA melalui pengacauan *template* dan halangan sterik. Mekanisme aksi yang lain melibatkan ikatan dengan lipid membran sel, hal ini akan mengubah berbagai fungsi selular dan berinteraksi dengan topoisomerase II membentuk kompleks pemotong DNA (Rock dan DeMichele, 2003). Sedangkan ekstrak metanol daun kenikir diketahui mengandung senyawa flavonoid dan glikosida kuersetin. Glikosida kuersetin termasuk dalam golongan flavonoid yang mampu mengatur siklus sel kanker

dengan mengikat beberapa target, misalnya dengan pengeblokan siklus sel pada fase G2/M atau pada transisi G1/S. Pengeblokan pada siklus G1/S melalui *up-regulation* di p21, p27, dan p53. Secara khusus, p21 menghambat Cdk2-cyclin akibat penghambatan CDK2 *dependent* fosforilasi pRb dan penyerapan E2F1 sehingga transkripsi gen dan fase S akan terhambat. Dalam kondisi tertentu p27 mampu menghambat kompleks Cdk4-cyclin D dan CDK6-cyclin D. Tumor supresor p53 mampu mengkodekan inhibitor siklus sel dan memacu apoptosis. Selain berperan dalam siklus sel, kuersetin mampu menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria, yaitu kuersetin mampu mengganggu MMP sehingga memicu pelepasan sitokrom c dalam sitoplasma serta pengaktifan caspase-3 dan caspase-7 (Gibellini dkk., 2011).



**Gambar 2.** Efek perlakuan kombinasi ekstrak metanol daun kenikir dengan doksorubisin terhadap viabilitas sel kanker payudara T47D.

**Tabel II.** Nilai *Combination Index* (CI) Ekstrak Metanol Daun Kenikir dan Doksorubisin pada Sel Kanker Payudara T47D

Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Kenikir (µg/mL)	Nilai CI			
	Konsentrasi Doksorubisin (nM)			
	41	27,33	20,50	13,67
390	0,6	0,9	1,1	2,2
260	0,4	0,7	0,9	1,2
195	0,3	0,5	0,6	0,8
130	0,2	0,3	0,4	0,5

### KESIMPULAN

Hasil uji *docking molecular* membuktikan bahwa energi ikatan antara glikosida kuersetin dengan protein Bcl-2 lebih kecil dibandingkan aglikon flavonoid, namun lebih besar dibandingkan doksorubisin. Ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin mampu menghasilkan efek sitotoksik sinergis kuat pada konsentrasi 130 µg/mL-41 nM ; 195 µg/mL -41 nM ; dan 130 µg/mL-27,33 nM, dengan nilai indek kombinasi berturut-turut 0,2 ; 0,3 ; dan 0,3.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Ditjen DIKTI melalui program PKM-P tahun 2015.

### DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society, 2013, *Cancer Fact and Figure 2013*, American Cancer Society; Atlanta

- Arifin I., Hermawan A., Ikawati M., Haryanti S., Anindyajati and Meiyanto E., 2012, Ursolic Acid Enhances Doxorubicin Cytotoxicity on MCF-7 Cells Mediated by G2/M Arrest, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, **3**(3), 410-418
- Bapsy P.P. and Sahoo T.P., 2004, Recent Advances in the Management of Metastatic Breast Cancer, *Indian Journal Of Medical & Paediatric Oncology*, **25**(2), 19-27
- Childs A.C., Phaneuf S.L., Dirks A.J., Phillips, T. and Leeuwenburgh, 2002, Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte Apoptosis, as Well as Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2 : Bax Ratio, *Cancer Research*, **62**, 4592-4598
- Depkes RI, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, 151-152, 673, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Doyle A. and Griffiths J.B., 2000, *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, 402-418, John Wiley and Sons Ltd, New York
- Gibellini L., Marcello P., Milena N.J.P., Montagna, S.D.B., Erika R., Linda B., Edwin L.C. and Andrea C., 2011, Quercetin and Cancer Chemoprevention, *Hindawi Publishing Corporation*, No. 591356
- Pebriana R.B., Wardhani B.W.K., Widayanti E., Wijayanti N.L.S., Wijayanti T.R., Riyanto S., dan Meiyanto E., 2008, Pengaruh Ekstrak Metanolik Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap Pemacuan Apoptosis Sel Kanker Payudara, *Pharmacoin*, **9**(1), 21-26
- Popov I., 2005, Signal Transduction Inhibition, *Archive of Oncology*, **13**, 48-50
- Purnomo H., 2011, *Kimia Komputasi: Molecular Docking PLANTS Penambahan Molekul PLANTS [Protein-Ligand-Ant-System] ("Ilmu Semut")*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Reynolds C.P. and Maurer B.J., 2005, Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models, *Methods in Molecular Medicine*, **110**, 173-183
- Rock E. and DeMichele A., 2003, Nutritional Approaches to Late Toxicities of Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Survivors, American Society for Nutritional Sciences, *J. Nutr.*, **133**, 3785-3793
- Schlattner M.T., Zaugg M., Zuppinger C., Wallimann T., and Schlattner U., 2006, New Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity, The Critical Role of Cellular Energetics, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **41**, 389-405
- Singal P.K., Iliskovic N., Li, T. and Kaur K., 2001, Heart Failure Due to Doxorubicin, *Kuwait Medical Journal*, **33**(2), 111-115
- WHO, 2011, *World Health Rankings*, World Health Organization, United Nations
-