

Synergistic Effects of Doxorubicin and Cardenolid Glycosides of *Calotropis Gigantea* Root on Cervical Cancer Hela Cell Line

Efek Sinergisme Doxorubisin dengan Glikosida Kardenolid dari Akar *Calotropis Gigantea* pada Sel Kanker Serviks Hela

Roihatul Mutiah^{1*}, Risma Aprinda Kristanti², Siti Maimunah³

^{1,3} Departemen Biologi Farmasi, Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

²Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Cardenolid glycosides (CGs) has been known has high anticancer activity against several types of cancers, for example, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, melanoma, neuroblastoma, myeloma and leukemia in the in vitro and in vivo research. The aim of our study was to know the synergistic potency of CGs improving the efficacy of doxorubicin in cervical cancer. Activities from combination of doxorubicin and CGs was measured by MTT colorimetric methode. Combination Index was used as combination efficacy parameter. The results showed that the IC₅₀ of CGs was 1,023 µg/mL. CGs demonstrated selective activity in inhibiting the growth of HeLa cells by selectivity index > 3 (241.9). Combination test for CGs and Doxorubicin showed strong synergistic effect in doses 200 ug/mL Doxorubicin and 1.79 ug/mL CGs. The synergistic effect has been shown by 10 combination doses for the doses below the IC₅₀. CGs increases the efficacy of Doxorubicin for the doses below the IC₅₀, thus CGs can be recommended as co chemotherapy in cervical cancer treatment.

Keywords: Co-chemotherapy, Cardenolid glycosides (CGs), Calotropis gigantea, HeLa Cells Line

ABSTRAK

Senyawa Glikosida Cardenolid (CGs) telah diketahui mempunyai aktivitas antikanker yang tinggi pada beberapa tipe kanker payudara, paru, prostat, melanoma,neuroblastoma, myeloma dan leukemia secara in vitro dan in vivo. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap potensi sinergistik senyawa CGs dalam meningkatkan efikasi doksorubisin pada kanker serviks. Aktivitas kombinasi senyawa doksorubisin dan glikosida cardenolid diukur dengan metode kolorimetri MTT. Indeks kombinasi digunakan sebagai parameter efikasi kombinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa IC₅₀ senyawa CGs adalah 1,023µg/mL. CGs menunjukkan aktivitas yang selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dengan selectivity Index >3 (241.9). Hasil uji kombinasi CGs dan doxorubisin menunjukkan efek sinergis kuat pada dosis doxorubisin 200 ug/mL dan CGs 1.79 ug/mL. Efek sinergis ditunjukkan oleh 10 dosis kombinasi pada dosis di bawah IC₅₀. CGs dapat meningkatkan efikasi doxorubisin pada dosis di bawah IC₅₀. Sehingga CGs dapat direkomendasikan sebagai ko kemoterapi pada pengobatan kanker servik.

Kata kunci : Ko-kemoterapi, Glikosida cardenolid, Calotropis gigantea, HeLa Cells Line

PENDAHULUAN

Kanker servik atau kanker leher rahim merupakan penyakit kanker yang menjadi penyebab kematian kedua pada wanita setelah kanker payudara. Insidensi penyakit kanker servik mencapai 445.000 kasus pada tahun 2012 (American Cancer Society, 2015). Kanker serviks disebabkan oleh infeksi virus HPV yang ditularkan secara seksual. Beberapa usaha pengobatan

terhadap kanker telah dilakukan secara intensif yaitu dengan kemoterapi, radioterapi, dan pembedahan. Namun belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker tersebut, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena

Correspondence author: Roihatul Mutiah
Email : roihah@farmasi.uin-malang.ac.id

resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi (Tacar *et al.*, 2013).

Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penggunaan agen ko-kemoterapi dari bahan alam yang menghasilkan efek sinergis dengan agen kemoterapi serta dapat menghambat laju resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapi dapat menjadi jawaban permasalahan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji kombinasi Doxorubisin dan glikosida cardenolid dari akar *Calotropis gigantea* terhadap sel kanker leher Rahim HeLa Cells Line.

Calotropis gigantea merupakan tanaman obat tradisional yang tumbuh tersebar di Indonesia. Pembuktian secara ilmiah tentang aktivitas antikanker dari tanaman ini telah dilaporkan diantaranya Senyawa calotropin dari bagian akar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap Leukemia K562 dan *gastric cancer* 7901 (Wang *et al.*, 2008). Ekstrak metanol dan fraksi kloroform dari bagian bunga mempunyai aktivitas antitumor pada mencit *ascites carcinoma* (Habib, Aziz and Karim, 2010). Ekstrak methanol (ME) dan fraksi chloroform akar *Calotropis gigantea* mampu menghambat pertumbuhan *ascites carcinoma* 43.90% (20 mg ME/kg) dan 57.07% (40 mg CF/kg) (Habib and Karim, 2011) (Habib *et al.*, 2011). Telah dilaporkan pula potensi sitotoksik senyawa cardenolid dari daun terhadap sel kanker payudara MCF-7, sel kanker kulit KB, sel kanker paru NCL-H18 (Seeka and Sutthivaiyakit, 2010), potensi sitotoksik ekstrak diklorometan dari daun terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231, sel HeLa, sel kanker kolon HT-29, sel kanker ovarium SKOV-3, sel kanker hepar Hep-G2 (Wong *et al.*, 2011).

Pada penelitian sebelumnya juga dilaporkan oleh peneliti bahwa ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* mampu menghambat pertumbuhan fibrosarcoma secara *in vivo* pada dosis 100 dan 150 mg/kgbb dengan mekanisme peningkatan ekspresi caspase-3 (Mutiah *et al.*, 2016). Ekstrak akar *Calotropis gigantea* mempunyai aktivitas antikanker yang lebih tinggi dibanding bagian daun dan bagian bunga (Mutiah *et al.*, 2016). Fraksi etil asetat dari bagian daun (IC₅₀41.79 µg/mL) dan fraksi diklorometan (IC₅₀40.57 µg/mL) mempunyai aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibanding fraksi butanol (IC₅₀ 737.74 µg/mL) dan air (IC₅₀8493 µg/mL) (Mutiah *et al.*, 2017). Beberapa senyawa aktif antikanker dari akar *Calotropis gigantea* yang telah berhasil diisolasi oleh peneliti sebelumnya yaitu *calotropin*, *frugoside* (Wang *et al.*, 2008), *afroside*, *15b-hydroxycalotropin*, *15b-hydroxycalactin*,

calactin, *calotoxin*, *16a-hydroxycalactin*, *uscharin*, *coroglaucigenin*, *4'b,15b-dihydroxycalactin*, *15b-hydroxyuscharin*, *5b-hydroxycalactinic acid methyl ester*, *calactinic acid ethyl Ester*, *15b-hydroxycalactinic acid ethyl ester* (You *et al.*, 2013). Senyawa aktif tersebut sebagian besar tergolong senyawa glikosida cardenolid. *Cardenolide Glycosides (CGs)* adalah senyawa glikosida jantung hasil isolasi fraksi etil asetat akar *Calotropis gigantea* yang telah melalui beberapa proses pemisahan dengan ciri noda berwarna ungu pada penyempotan H₂SO₄ 10% pemanasan 105°C selama 5 menit. Pada penelitian ini dilakukan uji potensi senyawa glikosida cardenolid dalam meningkatkan efikasi doxorubisin pada kombinasi dosis di bawah IC₅₀.

METODOLOGI

Bahan Uji

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar *Calotropis gigantea* yang diambil dari kota Malang Jawa Timur. Determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Purwodadi Jawa Timur. Spesimen tanaman di simpan di laboratorium Farmakognosi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Bahan untuk ekstraksi dan isolasi

Pelarut yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi maserasi adalah etanol 70% (Merck), dan etil asetat p.a (Merck), Chloroform p.a (Merck), n-heksan p.a (Merck).

Bahan untuk kultur sel

Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah sel *line* kanker servik HeLa. sel tersebut diperoleh dari *Cancer Chemoprevention Research Centre (CCRC)*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan dari Prof. Masasi Kawaichi, *laboratorium of Gene Function in Animal, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology*.

Sel HeLa dalam medium *Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)* ditambah dengan 10% *heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)*(PAA Laboratories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacalay Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacalay Tesque). Kemudian sel dikultur dalam inkubator, pada 5% CO₂, 95% O₂ suhu 37°C.

Bahan uji sitotoksik

Dimetil sulfoksida (DMSO) digunakan untuk melarutkan isolat CGs *Calotropis gigantea*. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini maksimal 1% dalam medium kultur. 0,025% tripsin dalam medium kultur digunakan untuk

memanen sel. *Phosphate buffer saline* (PBS) digunakan sebagai larutan penyangga pencuci. 3-(4,5-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium. (MTT) digunakan sebagai reagen yang bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase pada sel. Doxorubisin sebagai agen kemoterapi yang akan dikombinasikan dengan CGs.

Alat

Alat utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah maserator, evaporator, sentrifuse, tangki nitrogen cair, *CO₂-Jacketed Incubator*, mikroskop fase kontras, *Laminar Air Flow cabinet* (Nuair), *Elisa reader*.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Dimasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas, ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Di enaptuangkan dan di saring. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian di keringkan di desikator vakum dan selanjutnya dialiri gas N₂ untuk menghilangkan semua sisa pelarut pada ekstrak (BPOM, 2010). Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak etanol dengan pelarut kloroform, etil asetat, metanol dan air.

Isolasi dan identifikasi senyawa glikosida jantung

Terhadap fraksi etil asetat (F2) dilakukan pemisahan dengan metode *Vacuum Column Chromatography* (VLC) menggunakan fase diam silika gel G 60 (serbuk) dan fase gerak kloroform: metanol dengan penurunan gradien 10%, mulai dari kloroform 100%, kloroform: metanol (95:5), kloroform:metanol (90:10; 80:20; 70:30; 60:40, dan 50:50). Proses pemisahan F2 dengan metode (VLC) dihasilkan 7 sub-fraksi yaitu SF1-SF7. Selanjutnya SF4 dipilih untuk dipisahkan lebih lanjut dengan dasar pada pertimbangan banyaknya rendemen yang didapatkan dari SF4 dan hasil uji sitotoksik SF1-SF7 yang menunjukkan bahwa SF4 bersifat aktif terhadap sel kanker dengan IC₅₀ (14.31µg/mL) (Mutiah, 2017). Selanjutnya terhadap sub fraksi SF4 dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak gradien pelarut, yaitu campuran heksan dan etil asetat 4:1, selanjutnya campuran etil asetat

dan kloroform 9:1; kemudian dilanjutkan dengan campuran kloroform dan metanol 1:1 dan terakhir menggunakan methanol. Dari proses pemisahan ini dihasilkan 5 sub fraksi yaitu SF4.1, SF4.2, SF4.3, SF 4., SF 4.5. Terhadap SF 4.5 dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa glikosida jantung dengan metode KLT preparative dengan eluen chloroform:methanol (9:1), penampak noda H₂SO₄ 10%. Noda warna ungu menunjukkan positif Glikosida Cardenolid. Isolat yang diperoleh disebut isolat CGs.

Identifikasi senyawa Glikosida Jantung dengan metode UPLC/MS

Identifikasi isolat CGs menggunakan alat UP-LCMS/MS tipe alat ACQUITY UPLC I-Class (Waters) dengan detektor diode-array detector (DAD) 2996 (waters); kolom : Sunfire C18, p 50mm, diameter 2mm, ukuran partikel um (waters). Fase gerak: gradien asetonitril; air; asam formiat, flow rate 1mL/min, volum injeksi 10µL. MS system Xevo G2-S Qtof (waters), analyser: TOF dengan electrosprayer modus positif dan negative (ES+) (ES-); alir gas 794L/min.

Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT

Suspensi sel kanker servix (*HeLa cell Line*) sebanyak 100µL dengan kepadatan 3 x 10⁴ sel/100µL media didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate dan diinkubasikan selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100µL larutan uji pada berbagai seri konsentrasi. Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak crude glikosida jantung dan kombinasi dengan doxorubisin. Sebagai kontrol positif ditambahkan 100µL medium kultur, kemudian 100µL doxorubisin, pada berbagai seri konsentrasi ke dalam sumuran yang telah berisi 100µL suspensi sel kanker HeLa. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100µL medium kultur ke dalam sumuran yang berisi 100µL suspensi sel dan sebagai kontrol pelarut ditambahkan 100µL DMSO ke dalam sumuran yang berisi 100µL medium kultur dan 100µL suspensi sel dengan delusi yang sesuai dengan delusi konsentrasi larutan uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ dan 95% O₂. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang lalu ditambahkan 10 µL larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190µL medium RPMI 1640 komplet. Kemudian sel diinkubasi selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen stopper SDS (100µL). *Microplate* kemudian dibungkus dengan *tissue* dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu kamar dan ruangan gelap. Sel

yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Hasil pengujian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (CCRC UGM dalam Mutiah, 2014).

Analisis Data

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup:

$$\text{Prosentase (\%) sel hidup} = \frac{(\text{abs. perlakuan} - \text{abs. kontrol media})}{(\text{abs. kontrol sel} - \text{abs. kontrol media})} \times 100\%$$

Keterangan: Abs: absorbansi

Prosentase sel hidup dihitung untuk memperoleh nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sebanyak 50% dari populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksiknya. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit (*Statistic Product and Service Solution* (SPSS) 16.0 for windows). Sitotoksitas kombinasi ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara agen kemoterapi dengan isolat CGs, menggunakan persamaan:

$$\text{Combination Index/CI} = (D)1 / (Dx)1 + (D)2 / (Dx)2$$

Dimana D1 dan D2 adalah konsentrasi sampel yang digunakan dalam perlakuan kombinasi. (Dx)1 dan (Dx)2 adalah konsentrasi tunggal yang dapat menghasilkan efek sebesar yang diberikan perlakuan kombinasi (Reynold dan Maurer, 2005). Angka CI atau *Combination Index* yang diperoleh diinterpretasikan sebagai berikut: < 0.1 sinergis sangat kuat, 0.1-0.3 sinergis kuat, 0.3-0.7 sinergis, 0.7-0.9 sinergis ringan-sedang, 0.9-1.1 antagonis ringan-sedang, 1.45-3 antagonis, > antagonis kuat-sangat kuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap efek antikanker kombinasi doxorubisin dan isolat *Cardenolide Glycosides* (CGs) terhadap sel kanker servik HeLa. Kombinasi senyawa CGs dan doxorubisin diharapkan mempunyai efek sinergisme yang lebih besar dari penggunaan monoterapi. Dosis yang digunakan adalah dosis dibawah IC₅₀ sehingga penurunan dosis ini diharapkan juga dapat menurunkan efek samping agen kemoterapi khususnya doxorubisin. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak *Calotropis gigantea* dengan 5-Fluorourasil (dosis 62,5µg/mL, 125µg/mL) memberikan efek sinergisme terhadap sel kanker kolon WiDr dengan *Combination Index* 0.02

(Mutiah dkk, 2016). Berdasar pada penelitian tersebut peneliti ingin mengungkap efek sinergisme kombinasi isolat CGs dengan doxorubisin terhadap sel kanker HeLa. Pada uji sitotoksik CGs terhadap sel kanker HeLa didapatkan IC₅₀ pada konsentrasi 1.023 µg/ml (Tabel I).

Identifikasi isolat Isolat CGs menggunakan metode UP-LCMS/MS

Berdasarkan data kromatogram, pada waktu retensi 1.27 menit merupakan puncak tunggal dengan luas area yang dominan. Berdasarkan analisis UPLCMS/MS maka dapat diketahui bahwa senyawa yang teridentifikasi adalah senyawa dengan berat molekul 577.8150 yang terfragmentasi m/z 402.8871; m/z 301.9556; m/z144.9870 yang identik dengan senyawa oleandrin

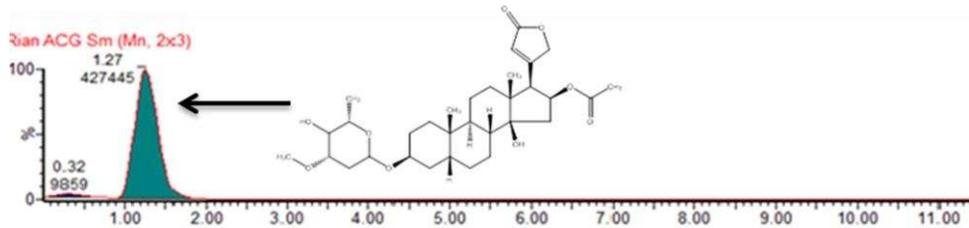
Uji aktivitas antikanker CGs terhadap sel HeLa

Terhadap isolat CGs dilakukan pengujian aktivitas antikanker (Tabel I) secara *in vitro* pada sel kanker HeLa dengan metode MTT assay.

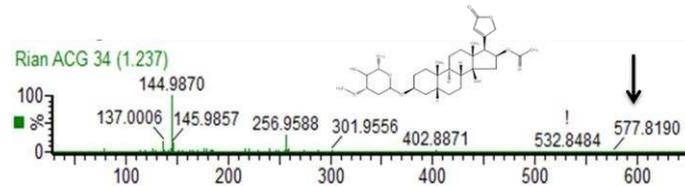
Berdasarkan data pada tabel tersebut di atas menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari isolat CGs memiliki rentang nilai IC₅₀ dibawah nilai yang disebutkan oleh NCI. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa isolat CGs efektif sebagai antikanker. Gambaran morfologi sel kanker HeLa akibat perlakuan isolat CGs disajikan pada gambar 4 di bawah ini.

Gambar 4. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel (aktifitas antikanker) karena perlakuan isolat CGs dengan berbagai konsentrasi pada sel kanker HeLa dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10⁴ sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 200x, sel hidup ditunjukkan oleh anak panah (a). Terjadi perubahan morfologi pada perlakuan isolat CGs yaitu berupa *blebbing* (b), membesar (d,c).

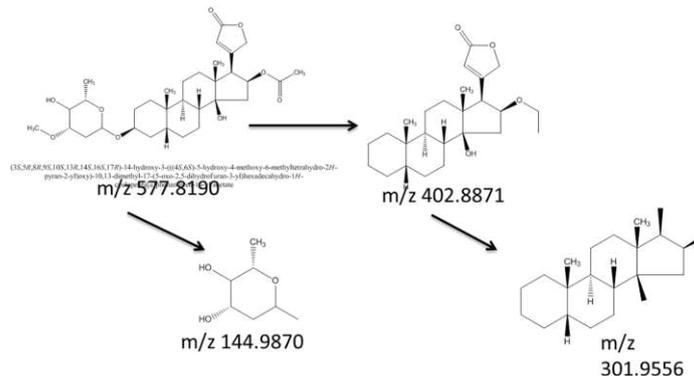
Berdasarkan pada gambar 4 menunjukkan bahwa perlakuan isolat CGs menyebabkan perubahan morfologi pada sel HeLa yang linier dengan peningkatan konsentrasi uji. Sel HeLa pada kontrol tampak berbentuk oval dengan sitosol jernih dan melekat pada dasar *Tissue Culture Dish* (TCD). Setelah perlakuan dosis 5,37ug/ml; 3,58 ug/ml; 1,79ug/ml sebagian sel tampak membulat dan terlepas dari TCD. Sel terlihat keruh dan kompak, tampak seperti mengalami kondensasi dan pengkerutan inti serta granulasi pada sitosol.



Gambar 1. Kromatogram UPLCMS/MS CGs (oleandrin) dengan fase diam *sunfire* C18 2x 50 mm column, dan fase gerak gradient Asetonitril:H₂O), *flow rate* 1 ml/min. Tanda panah menunjukkan puncak tunggal isolat CGs yang keluar pada waktu retensi 1.27 menit.



Gambar 2. Spektra massa CGs (oleandrin) pada waktu retensi 1.27 menunjukkan m/z 577.8190 yang terfragmentasi pada m/z 402.8871; m/z 301.9556; m/z 144.9870.



Gambar 3. Gambar ilustrasi fragmentasi senyawa oleandrin

Uji aktifitas antikanker isolat CGs (glikosida cardenolid) terhadap sel Vero

Untuk mengetahui tingkat selektifitas senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa maka terhadap isolat CGs (glikosida cardenolid) dilakukan pengujian aktivitas antikanker (Tabel II) secara *in vitro* pada sel normal Vero dengan metode MTT assay.

Berdasarkan data pada tabel tersebut di atas menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari isolat CGs terhadap sel Vero adalah sebesar 247,48 ug/ml. Untuk mengetahui tingkat selektifitas senyawa maka dilakukan perhitungan selektifitas (Tabel III).

Berdasarkan tabel tersebut di atas dapat diketahui bahwa nilai SI isolat CGs adalah > 3. Ekstrak dikatakan selektif apabila nilai selektifitas indeks lebih besar dari 3 (Prayong *et al*, 2008). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa isolat CGs selektif dalam membunuh sel kanker hela.

Uji aktifitas ko-kemoterapi isolat CGs dengan doxorubisin

Terhadap isolat CGs dilakukan uji kombinasi dengan obat kemoterapi doxorubisin. Uji ini bertujuan untuk mengetahui efek sinergisme antara senyawa CGs (oleandrin) dengan doxorubisin. Hasil uji aktivitas kombinasi tersebut dalam menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa disajikan pada tabel di bawah ini:

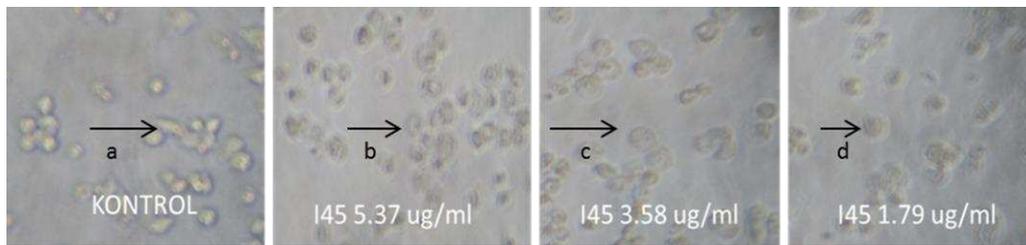
Hasil uji kombinasi ini menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi isolat CGs dan doxorubisin menghasilkan efek yang lebih besar dibandingkan dengan efek senyawa tunggal dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hal ini tentu saja menjadi harapan bagi terapi kanker yang mempunyai masalah rumit terkait dengan resistensi dan efek samping sejalan dengan peningkatan dosis.

Gambar 5. pengaruh perlakuan kombinasi isolat CGs dan DOX terhadap pertumbuhan sel kanker HeLa. Perlakuan kombinasi CGs dan DOX

Tabel I. Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai IC₅₀ isolat CGs pada sel kanker servik Hela

No	Isolat	Rata-rata % viabilitas sel Hela ± SD* Pada konsentrasi uji (µg/mL)						IC ₅₀ (µg/mL) ± SD*
		0.4475	0.895	1.79	3.58	5.37	7.15	
1	Isolat	57.05±0.6	48.48±4.9	47.19±0.7	38.32±0.0	43.2±0.1	35.75±0.1	1.023±0.03
	CGs45	9	7	3	2	0	4	5

*Nilai rata-rata dan Simpangan Deviasi dengan 3 kali replikasi



Gambar 4. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel (aktifitas antikanker) karena perlakuan isolat CGs dengan berbagai konsentrasi pada sel kanker Hela dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10⁴ sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 200x, sel hidup ditunjukkan oleh anak panah (a). Terjadi perubahan morfologi pada perlakuan isolat CGs yaitu berupa *blebbing* (b), membesar (d,c).

Tabel II. Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai IC₅₀ isolat CGs pada sel normal Vero

Isolat	Rata-rata % viabilitas sel Vero ± SD* pada konsentrasi uji (µg/mL)							IC ₅₀ (µg/mL) ± SD*
	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	
Isolat	82.50±	63.52±	69.03±	69.03±	68.15±	47.13±	11.28±	247.48±
CGs45	0.65	1.23	0.89	0.56	1.67	2.34	2.36	0.56

*Nilai rata-rata dan Simpangan Deviasi dengan 3 kali replikasi

Tabel III. SI (*selectivity Index*) isolat CGS terhadap sel Kanker Hela

No	bahan	Hela IC ₅₀ (µg/mL)	Vero IC ₅₀ (µg/mL)	SI (<i>selectivity Index</i>)	Keterangan
1	Isolat 4.5	1.023	247.48	241.9	Selektif*

*Nilai rata-rata dan Simpangan Deviasi dengan 3 kali replikasi

Tabel IV. aktivitas antikanker kombinasi isolat CGs dan doxorubisin terhadap Viabilitas sel HeLa

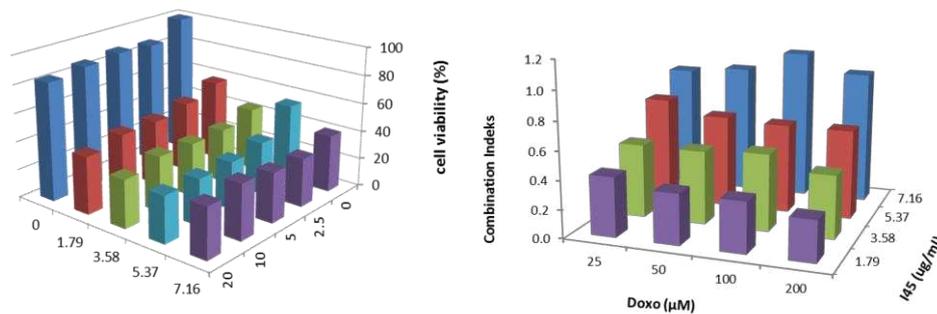
CGs (µg/mL)	Viabilitas sel % ± SD*			
	Doxorubicin (25 µg/mL)	Doxorubicin (50 µg/mL)	Doxorubicin (100 µg/mL)	Doxorubicin (200 µg/mL)
1.79	50.7±5.54	45.90±1.64	45.75±2.61	40.39±2.76
3.58	38.65±0.85	37.85±1.98	39.00±1.83	33.83±7.60
5.37	36.91±0.65	33.53±1.28	32.64±1.19	32.59±1.19
7.16	33.98 ± 0.34	35.02±2.83	38.65±4.42	35.47±2.33

*Nilai rata-rata dan Simpangan Deviasi dengan 3 kali replikasi

Tabel V. Indek kombinasi Ko kemoterapi isolat CGs dan doxorubisin terhadap sel HeLa

CGs45(ug/mL)	Indeks kombinasi*			
	Doxorubicin (25 ug/ml)	Doxorubicin (50 ug/mL)	Doxorubicin (100 ug/mL)	Doxorubicin (200 ug/mL)
1.79	0.42	0.35	0.35	0.29
3.58	0.52	0.52	0.54	0.44
5.37	0.74	0.65	0.63	0.63
7.16	0.88	0.92	1.06	0.94

*Combination Index, < 0.1 sinergis sangat kuat, 0.1-0.3 sinergis kuat, 0.3-0.7 sinergis, 0.7-0.9 sinergis ringan-sedang, 0.9-1.1 antagonis ringan-sedang, 1.45-3.3 antagonis, > antagonis kuat-sangat kuat.



Gambar 5. pengaruh perlakuan kombinasi isolat CGs dan DOX terhadap pertumbuhan sel kanker HeLa. Perlakuan kombinasi CGs dan DOX memberikan efek sinergis kuat dan sinergis. . Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplit tanpa atau dengan diberi perlakuan kombinasi dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Viabilitas sel ditentukan dengan metode MTT. Hasil analisis ini merupakan representasi dari dua experiment yang berbeda, masing-masing dengan (3) replikasi.

memberikan efek sinergis kuat dan sinergis. Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplit tanpa atau dengan diberi perlakuan kombinasi dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Viabilitas sel ditentukan dengan metode MTT. Hasil analisis ini merupakan representasi dari dua experiment yang berbeda, masing-masing dengan (3) replikasi.

KESIMPULAN

Hasil Uji kombinasi antara senyawa Glikosida cardenolid (CGs) dan doxorubisin pada dosis di bawah IC_{50} menunjukkan bahwa 10 dosis kombinasi memberikan efek sinergis dan satu dosis kombinasi menunjukkan efek sinergis kuat yaitu pada dosis doxorubisin 200 ug/ml dan CGs 1.79 ug/ml.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DIKTIS Kemenag atas pembiayaan penelitian ini pada skema Hibah Integrasi Keilmuan tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society (2015) 'Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition.', *American Cancer Society*, (800), pp. 1-64.

Habib, M. R., Aziz, M. A. and Karim, M. R. (2010) 'Inhibition of Ehrlich's ascites carcinoma by ethyl acetate extract from the flower of *Calotropis gigantea* L. in mice', *Journal of Applied Biomedicine*, 8(1), pp. 47-54.

Habib, M. R. and Karim, M. R. (2011) 'Evaluation of antitumour activity of *Calotropis gigantea* L. root bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice.', *Asian Pacific journal of tropical medicine*. Hainan Medical College, 4(10), pp. 786-90.

Mutiah R. (2014). *Pengembangan Fitofarmaka antikanker "Panduan Teknik Pengembangan Obat Herbal Indonesia Menjadi Fitofarmaka*. Uin Maliki Press. ISBN: 978-602-1190-26-5. pp 50-70

Muti, R., Griana, T. P., Ula, Q. N. and Andhyarto, Y. (2016) 'The Effect of *Calotropis gigantea* Leaves Extract on Fibrosarcoma Growth

- and Caspase 3 Expression .' *International Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 8(3), pp. 167-171.
- Muti, R., Sukardiman, Widyawaruyanti, A. and Zulaikah, S. (2016) 'Comparison of Ethanol Extract from Roots , Leaves , and Flowers of *Calotropis gigantea*. *Alchemy*, 18, pp. 1-4.
- Mutiah, R., Sukardiman, Widyawaruyanti A, (2017) 'Cytotoxic Effect Of Crude Extract And Fraction From *Calotropis Gigantea* Leaves On Human Colon Cancer Widr Cell Lines., *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9 (1), pp. 83-86 .
- Mutiah R. (2017). *Aktivitas Dan Mekanisme Bahan Aktif Antikanker Dari Fraksi Etil Asetat Akar Calotrophis Gigantea (L.) W.T Aiton Secara In Vitro Terhadap Sel Kanker Kolon Widr*. Disertasi .Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Seeka, C. and Sutthivaiyakit, S. (2010). Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*.', *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 58(5), pp. 725-728.
- Tacar O, Sriamornsak P, and Dass CR. (2013). Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65(2), pp. 157-170.
- Wang, Z.-N., Wang, M.-Y., Mei, W.-L., Han, Z. and Dai, H.-F. (2008) 'A new cytotoxic pregnanone from *Calotropis gigantea*.', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(12), pp. 3033-3039.
- Wong, S. K., Lim, Y. Y., Abdullah, N. R. and Nordin, F. J. (2011) 'Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species.', *BMC complementary and alternative medicine*. BioMed Central Ltd, 11(1), p. 3.
- You, H., Lei, M., Song, W., Chen, H., Meng, Y., Guo, D. and Liu, X. (2013) 'Cytotoxic cardenolides from the root bark of *Calotropis gigantea*', *Steroids*. Elsevier Inc., 78(10), pp. 1029-1034.