
AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR (COSMOS CAUDATUS, KUNTH) TERHADAP SEL MCF-7 DAN KOMBINASINYA DENGAN EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH (PIPER BETLE) TERHADAP SEL T47D

CITOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *COSMOS CAUDATUS* KUNTH AGAINST MCF-7 CELL LINE AND THE COMBINATION WITH ETHANOLIC EXTRACT OF *PIPER BETLE* AGAINST T47D CELL LINE

¹⁾Peni Indrayudha* ²⁾ Retno Wahyuning Astuti, ³⁾Qurota Ayun Husna Farah

^{1,2,3)}Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Surakarta

Jl A Yani Tromol Pos I, Pabelan, Kartasura, Sukoharjo 57102

*Email: peni.indrayudha@ums.ac.id

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan salah satu jenis tumor ganas yang tumbuh dan berkembang secara terus-menerus pada sel-sel payudara. Agen terapi yang digunakan dalam pengobatan kanker secara berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan dan organ didalam tubuh. Diperlukan agen fitoterapi untuk membantu pengobatan atau bahkan mengurangi dosis obat yang digunakan. Daun sirih dan kenikir merupakan tanaman yang dapat digunakan dalam fitoterapi. Senyawa dalam tanaman daun sirih dan kenikir yaitu flavonoid dan fenolik. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui adanya efek sitotoksik ekstrak etanol daun kenikir, fraksi polar, semi polar dan nonpolarinya terhadap sel kanker payudara MCF-7, dan kombinasinya dengan daun sirih terhadap sel T47D. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT. Ekstrak daun sirih dan kenikir diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan 70%. Hasil rendemen yang didapatkan pada ekstrak daun sirih sebanyak 5,96% dan ekstrak kenikir sebanyak 6,26%. Adanya senyawa aktif flavonoid dan polifenol dalam tanaman, dibuktikan dengan uji kualitatif KLT menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat (7:3) pada fase diam berupa plat Silika GF254. Uji sitotoksik pada konsentrasi 300;150;75;37,5; dan 18,75 µg/mL ekstrak etanol daun kenikir dan tiga fraksinya menunjukkan tidak adanya efek sitotoksik terhadap sel MCF-7. Kemampuannya menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7 hanya sebesar 10%. Selanjutnya, pada uji aktivitas sitotoksik dengan seri konsentrasi (500; 250; 100; dan 50) µg/mL untuk ekstrak daun sirih dan (1000; 500; 250; dan 125) µg/mL untuk kenikir menunjukkan bahwa potensi ekstrak daun sirih terhadap sel kanker payudara T47D lebih besar dibandingkan dengan ekstrak kenikir. Diperoleh IC₅₀ sebesar 163,8 µg/mL untuk ekstrak daun sirih dan pada daun kenikir hanya memberikan penghambatan 44,24%. Hasil uji kombinasi menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas sel lebih dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak daun sirih, semakin besar konsentrasi ekstrak daun sirih yang diberikan semakin tinggi jumlah kematian sel.

Kata Kunci : Daun Sirih, Kenikir, sel T47D, sel MCF-7, MTT assay, Kombinasi.

PENDAHULUAN

Sel-sel kanker digambarkan sebagai bentuk kegagalan diferensiasi atau pematangan sel, sehingga sel tidak merespon proses normal yang mengatur pertumbuhan, proliferasi, dan fungsi fisiologis. Tumbuhnya kanker di dalam jaringan tubuh dapat diklasifikasikan menjadi jinak atau ganas. Sel kanker jinak tidak dapat menginvasi atau bermetastasis di jaringan, sedangkan pertumbuhan yang tidak terkendali dan menyebabkan kematian disebut sebagai sel kanker ganas. Penyakit kanker tetap mendominasi sebagai penyebab utama kematian di seluruh dunia. Penyakit seperti kanker paru, hati, dan payudara menjadi penyebab terbesar kematian setiap tahunnya yaitu 8,2 juta pada tahun 2012 dengan estimasi peningkatan hingga 23,6 juta pada tahun 2030 (Alldredge *et al.*, 2013; Kemenkes RI, 2015; dan Kemenkes RI, 2016).

Kanker payudara merupakan salah satu jenis tumor yang diklasifikasikan ganas, berawal dari sel-sel payudara yang tumbuh dan berkembang terus-menerus serta menyebar ke jaringan lain tanpa terkendali (Kemenkes RI, 2016). Berdasarkan data Kemenkes RI (2013), prevalensi kanker payudara di Indonesia sebesar 0,5% dengan jumlah tertinggi berada di Provinsi D.I. Yogyakarta sebesar 2,4%. Hal ini tergolong cukup tinggi untuk kategori penyakit ganas. Data WHO (2014) menyebutkan bahwa kasus kematian wanita akibat kanker payudara di Indonesia sebanyak 21,4% dari total populasi yaitu 247 juta penduduk. Faktor-faktor penyebab terjadinya kanker dikategorikan menjadi 3 yaitu: faktor genetik, faktor karsinogen seperti zat kimia dan radiasi, serta faktor gaya hidup yang tidak sehat.

Sel T47D merupakan salah satu jenis sel kanker payudara yang dapat tumbuh dan berkembang terus-menerus. Sel kanker ini bersifat sensitif terhadap pemberian doksorubisin (Burdall *et al.*, 2003 dan Zampieri *et al.*, 2002). Doksorubisin merupakan agen antitumor golongan antrasiklin yang dapat menghambat pembelahan sel dan

menginduksi kematian sel dengan interkalasi DNA, pembentukan radikal bebas, interaksi dengan intraseluler, serta penghambatan Topo IIA (Barzegar *et al.*, 2015).

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth) adalah agen antikanker yang telah diteliti memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara. Ekstrak etanol daun kenikir memiliki efek antioksidan yang menghambat pertumbuhan sel kanker akibat senyawa bioaktifnya seperti kuersetin, katekin dan asam klorogenat (Nurhayati *et al.*, 2018).

Berdasarkan penelitian Abas *et al.*, (2013) ekstrak metanol daun kenikir mengandung flavonoid dan glikosida kuersetin yang dapat berpotensi sebagai antikanker. Penelitian Mustafa *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa daun kenikir juga mengandung senyawa fenolik yang tinggi yaitu sebesar 704,21 mg GAE/g. Daun kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth) mengandung aktivitas antioksidan yang tinggi. Antioksidan dalam daun kenikir bermanfaat bagi kesehatan dan berpotensi mengurangi efek dari stres oksidatif. Stres oksidatif berkaitan dengan inisiasi dan perkembangan kanker dengan meningkatkan DNA mutasi, ketidakstabilan genom dan proliferasi sel (Cheng *et al.*, 2015).

Pebriana *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir dapat berpotensi sebagai obat antikanker. Ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos Caudatus*, Kunth) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC₅₀ sebesar 344,91 µg/mL. Fita *et al.*, (2015) melaporkan bahwa ekstrak metanol daun kenikir yang dikombinasi dengan doksorubisin memiliki efek sitotoksik yang lebih besar dalam menekan pertumbuhan sel kanker dibandingkan dengan uji sitotoksik bahan tunggal. Ekstraksi dan fraksinasi dari suatu ekstrak diperlukan untuk mengidentifikasi potensi aktivitasnya.

Daun sirih merupakan tanaman yang dengan mudah tumbuh. Aktivitas

utama dalam ekstrak sirih yaitu adanya konstituen fenolik klavibetol dan 4-alilpirokatekol (Rekha *et al.*, 2014). Penelitian Ng *et al.* (2014) mengatakan bahwa ekstrak daun sirih dan 4-alilpirokatekol secara signifikan dapat mengurangi dosis pemberian 5-FU serta meningkatkan efek sitotoksik terhadap sel kanker usus dengan IC₅₀ sebesar 200 µg/mL pada sel HT29 dan 187,5 µg/mL pada sel HCT116. Penelitian Fita dkk (2015) menunjukkan adanya pengkombinasian ekstrak metanol daun kenikir dan doksorubisin mampu menekan pertumbuhan sel kanker T47D disertai efek sinergis kuat.

Berdasarkan data-data penelitian tersebut, kedua tanaman memiliki senyawa aktif yang dapat menekan pertumbuhan sel kanker pada terapi pengkombinasian. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk pengembangan uji sitotoksik dengan menentukan aktivitas ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir terhadap sel MCF7 serta mengkombinasikannya dengan ekstrak daun sirih dalam mengurangi penggunaan agen terapi farmakologi pada pengobatan kanker payudara T47D.

METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), *rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Mammert), corong pisah, *chamber* KLT, alat-alat gelas, mikropipet (Socorex), vorteks (Maxi Mix II), pipet *Pasteur*, *cytotoxic safety cabinet* (Cytoculture ESCO), *counter* (Kenko), *hemositometer* (Marienfield Germany), inkubator CO₂ (Binder), mikroskop (Olympus), *ELISA reader* (Bio-tek ELX800), kamera Opti Lab.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah daun kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth) yang diperoleh dari Pasar Sidodadi Surakarta Jawa Tengah, Sel MCF-7 diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, etanol 96%, kertas saring, n-

heksan, etil asetat, akuades, dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) (Invitrogen), *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Gibco), *Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid* (trypsin-EDTA) (Sigma), media kultur *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma) yang berisi *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco) 10% v/v sebagai faktor pertumbuhan yang penting untuk pembelahan sel; penisilin-streptomisin (Gibco) 1% v/v untuk mencegah kontaminasi bakteri dan *fungizone* (Gibco) 500 µL sebagai anti jamur, Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% dalam 0,01 N HCl (Promega), metotreksat (Kalbe), *conical tube*, *96-well plate* (Iwaki), *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, eppendorf, plat silika gel GF₂₅₄ (Merck), reagen sitroborat, reagen FeCl₃, reagen Liebermann-Burchard, reagen Dragendorf dan reagen vanilin-H₂SO₄.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun kenikir sebanyak 500 gram direndam di dalam benjana maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 Liter. Serbuk daun kenikir direndam selama 3 hari dengan pengadukan setiap harinya sebanyak satu kali dengan batang pengaduk. Remaserasi dilakukan sebanyak satu kali. Serbuk daun sirih sebanyak 500 gram direndam dalam bejana maserasi yang berisi etanol 70% dengan volume 1,25 L untuk serbuk daun sirih. Proses maserasi berlangsung selama 72 jam.

Filtrat disaring dengan corong *Buchner* yang telah diberi kertas saring, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan perputaran 150 rpm dan suhu 60°C kemudian diletakkan di atas *waterbath* (60°C) untuk membentuk ekstrak kental.

Fraksinasi

Lima gram ekstrak daun kenikir dilarutkan dengan akuades:etanol sebanyak 50 mL dengan perbandingan 1:4. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan alat corong

pisah. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah dan dipartisi dengan n-heksan sebanyak 50 mL. Setelah ditambah n-heksan kedalam corong pisah maka akan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan n-heksan dan lapisan akuades, lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan n-heksan ditampung ke dalam erlenmeyer sedangkan lapisan akuades dimasukkan kedalam corong pisah untuk dipartisi kembali. Partisi dengan n-heksan diulang lima kali. Fraksi akuades dari partisi sebelumnya dimasukkan kedalam corong pisah dan dipartisi dengan etil asetat sebanyak 50 mL hingga terbentuk dua lapisan, lapisan dipisahkan. Lapisan etil asetat ditampung dan lapisan akuades dimasukan kedalam corong pisah untuk partisi kembali hingga empat kali. Lapisan terakhir (akuades:etanol) sebagai fraksi polar ditampung. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan perputaran 90 rpm dan suhu 60°C kemudian dikentalkan dengan *waterbath* (60°C). Untuk fraksi etanol hanya dikentalkan pada *waterbath*. Setelah didapatkan fraksi dengan kepolaran yang berbeda yaitu fraksi polar, semi polar dan polar selanjutnya diuji aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7.

Uji Sitotoksik

Sel MCF-7 yang telah konfluen siap untuk dipanen. Media kultur DMEM diambil menggunakan pipet *pasteur* kemudian sel MCF-7 dicuci dengan PBS sebanyak 5 mL, diratakan dan diambil kembali menggunakan pipet *pasteur*. Sebanyak 500 μ L tripsin-EDTA ditambahkan dan diinkubasi selama 5 menit. Media DMEM ditambahkan sebanyak 5 mL, selanjutnya diresuspensi menggunakan mikropipet. Diamati dibawah mikroskop jika masih ada sel MCF-7 yang bergerombol maka dilakukan resuspensi kembali. Sel MCF-7 dipindahkan ke *conical tube*. Sebanyak 10 μ L sel MCF-7 dipipetkan ke *hemositometer*, sel dihitung dibawah mikroskop dengan bantuan counter. Jumlah sel MCF-7 dihitung pada setiap kamar *hemositometer* dengan kepadatan sel 1×10^4

setiap sumuran. Volume panen sel yang ditransfer didapat dari jumlah total sel yang diperlukan dibagi dengan jumlah sel terhitung. Diambil sejumlah volume panen sel yang akan ditransfer kemudian ditambahkan sampai 10 mL dengan media DMEM. Sebanyak 100 μ L sel MCF-7 dimasukkan ke sumuran *96-well plate*. Untuk kontrol media tidak diisi sel MCF-7. Sel MCF-7 kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂.

Sel MCF-7 yang telah ditanam di *96-well plate* diinkubasi hingga konfluen sehingga siap untuk diberi perlakuan. Ekstrak etanol daun kenikir, fraksi polar, semi polar, dan non polar ditimbang sebanyak 10 mg dan dimasukkan dalam eppendorf. Kemudian dilarutkan dengan 100 μ L DMSO dan ditambahkan dengan media kultur DMEM hingga 1 mL. Larutan tersebut diambil 100 μ L dan ditambahkan media kultur DMEM hingga 1 mL di eppendorf lain untuk dilakukan pengenceran sehingga konsentrasi ekstrak etanol daun kenikir dan tiga fraksinya sebesar 1000 ppm. Sampel ekstrak daun kenikir dan ketiga fraksinya dibuat dengan seri konsentrasi 300; 150; 75; 37,5; dan 18,75 μ g/mL. Seri konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok 1000 ppm. Plate yang sebelumnya sudah mengalami penanaman sel diambil dari inkubator CO₂ dan dibawa menuju LAF. Plate dibalik diatas tempat pembuangan dan ditiriskan sisa cairan diatas tisu sambil ditekan. Sebanyak 100 μ L sampel ekstrak etanol daun kenikir dan tiga fraksinya dimasukkan ke dalam sumuran *96-well plate* sesuai dengan peta sumuran. Kontrol media, kontrol sel, kontrol pelarut dan kontrol positif juga dimasukkan ke dalam sumuran *96-well plate* kemudian diinkubasi selama 48 jam. Kontrol media terdiri dari 100 μ L media kultur DMEM (tanpa sel MCF-7), kontrol sel terdiri dari sel MCF-7 yang ditambahkan dengan 100 μ L DMEM, kontrol pelarut mengandung sel MCF-7, DMSO sebanyak 1,5 μ L dan 498,5 μ L DMEM yang diisi pada sumuran sebanyak 100 μ L sedangkan kontrol positif

yaitu metotreksat dengan konsentrasi 4544,4 µg/mL yang diisi sebanyak 100 µL di tiga sumuran. Media kultur yang mengandung sampel yang telah diinkubasi kemudian dibuang, selanjutnya ditambahkan reagen MTT sebanyak 100 µL dan diinkubasi kembali selama 2 jam. Kristal formazan yang terbentuk diamati di bawah mikroskop dan didokumentasikan. Ditambahkan sebanyak 100 µL reagen *stopper* berupa larutan SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Selanjutnya 96-well plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi selama semalam pada suhu kamar ditempat yang gelap. Kemudian absorbansi dibaca di ELISA reader pada λ550 nm untuk selanjutnya ditentukan persen penghambatannya.

Jumlah persentase sel hidup dapat dihitung menggunakan rumus:

Apabila nilai absorbansi kontrol pelarut lebih kecil dari absorbansi kontrol sel, maka rumus yang digunakan yaitu:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

Untuk uji kombinasi antara ekstrak daun sirih dan ekstrak kenikir menggunakan sel T47D. Larutan stok dibuat dengan cara menimbang masing-masing 10 mg ekstrak etanol daun sirih dan kenikir dengan saksama di dalam *eppendorf*, kemudian dilarutkan dalam 100 µL DMSO dan dihomogenkan 5 menit dengan *vortex*, selanjutnya ditambahkan media RPMI 900 µL dan dihomogenkan kembali menggunakan *vortex* selama 5 menit. Dibuat larutan dengan seri kadar (500; 250; 100; dan 50) µg/mL untuk ekstrak sirih, dan seri kadar (1000; 500; 250; dan 125) µg/mL untuk ekstrak kenikir. Untuk uji kombinasi dilakukan dengan mengambil 50 µL dari masing-masing seri konsentrasi ekstrak.

Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dalam media penumbuh RPMI. Sel yang telah 80% konfluen dipanen dan didistribusikan sel ke dalam sumuran

96-well microplate sebanyak 100 µL, 6 sumuran dikosongkan untuk kontrol media. Larutan uji dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 100 µL. Kelompok kombinasi dilakukan dengan memasukkan masing-masing sebanyak 50 µL seri konsentrasi larutan uji kedua ekstrak ke dalam masing-masing sumuran (triplo). Untuk kelompok tunggal, dimasukkan seri konsentrasi larutan uji sebanyak 100 µL (triplo). Disiapkan reagen MTT kemudian tiap sumuran ditambah 100 µL MTT termasuk kontrol media. Dilakukan inkubasi selama 2-4 jam hingga terbentuk formazan. Selanjutnya, 100 µL pereaksi *stopper* SDS 10% (dalam 0,1 N HCl) ditambahkan untuk melarutkan kristal formazan dan sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Dilakukan pembacaan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Hasil absorbansi dihitung persentase sel hidup, analisis IC₅₀, dan indeks kombinasi.

Uji Kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Larutan stok 1% dibuat dengan menimbang sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak dilarutkan dalam etanol 70% sebanyak 1 mL. Masing-masing larutan stok dari daun sirih dan kenikir ditotolkan pada plat silika GF₂₅₄ dan dielusikan pada bejana KLT yang telah dijenuhkan dengan fase gerak n-heksana:etil asetat (7:3). Hasil elusi ditampakkan pada UV₂₅₄ dan UV₃₆₆ dengan penambahan reagen semprot yaitu sitroborat, untuk deteksi flavonoid, sedangkan FeCl₃ untuk deteksi fenolik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Dihasilkan ekstrak dari maserasi sebanyak 24,18 gram dan hasil dari remaserasi adalah 11,00 gram sehingga ekstrak yang didapatkan sebanyak 35,18 gram. Total rendemen ekstrak yang didapat adalah 7,03% yang dihitung terhadap jumlah ekstrak yang didapat dibagi dengan 500 gram simplisia daun kenikir yang digunakan kemudian dikalikan dengan 100%.

Fraksi polar, semi polar, dan non polar daun kenikir didapatkan dengan metode fraksinasi partisi cair-cair. Prinsip dari metode ini adalah memisahkan senyawa dengan kepolaran yang berbeda menggunakan pelarut yang tidak bercampur. Fraksinasi dilakukan dengan alat corong pisah. Larutan ekstrak dipartisi mulai dari non polar, semi polar dan polar (Saifudin, 2014). Hasil fraksi dari ekstrak daun kenikir menghasilkan fraksi non polar sebanyak 0,35 g dengan rendeman 7%, fraksi semi polar sebanyak 0,90 g dengan rendeman 18% dan fraksi polar sebanyak 0,89 g dengan rendeman 17,8%. Rendeman fraksi yang dihasilkan dihitung terhadap jumlah fraksi yang didapat dibagi dengan 5 g ekstrak daun kenikir yang digunakan kemudian dikalikan dengan 100%. Hasil ekstraksi dan fraksinasi ini digunakan untuk uji terhadap sel MCF7.

Selanjutnya dilakukan pula ekstraksi daun kenikir dan daun sirih menggunakan etanol 70%. Rendemen yang dihasilkan untuk daun kenikir adalah 5,96% (29,79g) dan ekstrak daun sirih sebesar 6,26% (31,31g). Hasil ekstraksi ini digunakan untuk uji dengan sel T47D.

Uji Sitotoksik

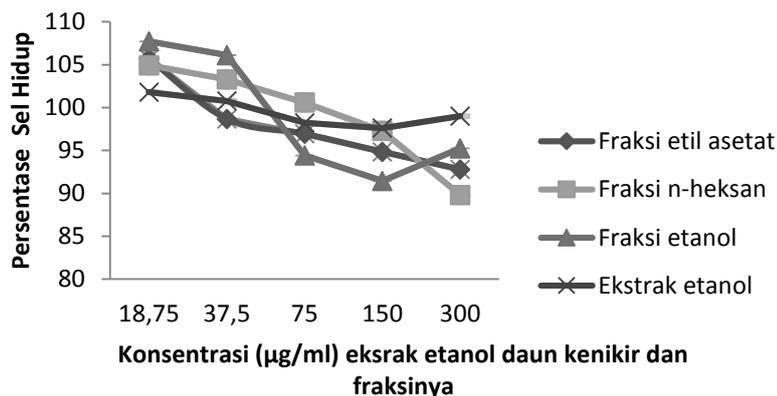
Konsentrasi ekstrak daun kenikir, fraksi polar, semi polar, dan non polar secara teori mempengaruhi persentase sel hidup. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka persentase sel hidup MCF-7 akan semakin menurun. Penelitian ini menunjukkan adanya *dose dependent response* karena jumlah sel hidup menurun dengan naiknya konsentrasi tetapi untuk konsentrasi 300 µg/mL pada ekstrak etanol daun kenikir memiliki persen sel hidup meningkat

menjadi 99,00% dari konsentrasi 150 µg/mL yang memiliki persen sel hidup sebesar 97,60% sedangkan pada fraksi etanol meningkat menjadi 95,25% dari konsentrasi 150 µg/mL yang memiliki persen sel hidup sebesar 91,45% (Tabel 1 dan Gambar 3). Melihat masih tingginya persen sel hidup maka uji sitotoksik ekstrak etanol dan fraksinya terhadap sel MCF-7 diulangi kembali dengan menaikkan konsentrasi menjadi 800; 400; 200; 100; 50 µg/mL. Percobaan uji sitotoksik yang kedua pada ekstrak etanol dan semua fraksinya tetap tidak mengalami penurunan persen sel hidup dengan naiknya konsentrasi (Tabel 1 dan Gambar 1).

Penelitian Pebriana *et al.*, (2008) mengatakan bahwa ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos Caudatus*, Kunth) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC₅₀ sebesar 344,91 µg/mL. Namun, pada penelitian ini ekstrak etanol daun kenikir dan fraksinya memiliki persentase sel hidup yang tinggi sehingga IC₅₀ tidak dapat ditentukan. Perbedaan pelarut yang digunakan pada penelitian sebelumnya berpengaruh pada senyawa aktif yang terlarut. Setiap pelarut memiliki sifat pelarut dan kemampuan yang berbeda-beda dalam melarutkan senyawa aktif tergantung pada senyawa yang akan diekstrak dan tingkat kepolarannya (Suryani *et al.*, 2016). Senyawa yang terlarut dalam daun kenikir diperkirakan lebih mudah terlarut dalam pelarut metanol dibandingkan dengan pelarut etanol 96%, sehingga kandungan senyawa yang aktif sebagai sitotoksik tidak terdapat dalam ekstrak etanol dan fraksinya atau kadarnya rendah.

Tabel 1. Pengaruh perlakuan ekstrak dan ketiga fraksinya terhadap sel MCF-7

| i ($\mu\text{g/mL}$) | Konsentras i | Log Konsentras k | Persentase sel hidup | | |
|---------------------------|-----------------|------------------------|----------------------|-------------------|--|
| | | | Ekstra Etanol | Fraks i Etanol | Fraks i Etanol Fraks i Etil Asetat N-Heksan |
| 18,75 | 1,273 | | 101,79 % | 107,70 % | 105,69 % 104,91 % |
| 37,5 | 1,574 | | 100,78 % | 106,12 % | 98,66 % 103,28 % |
| 75 | 1,875 | | 98,23 % | 94,43 % | 96,93 % 100,58 % |
| 150 | 2,176 | | 97,60 % | 91,45 % | 94,84 % 97,27 % |
| 300 | 2,477 | | 99,00 % | 95,25 % | 92,78 % 89,81 % |



Gambar 1. Kurva konsentrasi ekstrak etanol kenikir dan fraksinya versus persentase sel hidup MCF-7

Uji sitotoksik dilanjutkan pada sel T47D. Ekstrak tunggal daun sirih menunjukkan persentase penghambatan yang cukup besar terhadap sel kanker T47D. Hasil ini berdasarkan data yang telah dilakukan pada

penelitian (Tabel 2). Semakin tingginya konsentrasi ekstrak daun sirih yang diberikan, menunjukkan semakin rendahnya persentase kehidupan sel kanker tersebut (Tabel 2).

Tabel 1. Persentase Sel Hidup T47D terhadap Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Sel Hidup (%) | | | Rata-rata Sel Hidup (%) | SD |
|-------------------------------------|---------------|--------|-------|----------------------------|------|
| | I | II | III | | |
| 500 | 8,74 | 8,46 | 13,07 | 10,09 | 2,59 |
| 250 | 17,26 | 18,94 | 16,71 | 17,64 | 1,16 |
| 100 | 77,80 | 72,76 | 72,90 | 74,49 | 2,87 |
| 50 | 109,11 | 107,43 | 95,55 | 104,03 | 7,39 |

Pengujian sitotoksik ekstrak daun sirih tersebut menunjukkan IC_{50} sebesar 163,8 $\mu\text{g/mL}$. Dibandingkan dengan Ng *et al.*, (2014), telah diuji aktivitas 4-alilpirokatekol dan ekstrak daun sirih dengan kombinasi 5-FU pada sel kanker usus yang menunjukkan hasil IC_{50} sebesar 200 $\mu\text{g/mL}$ pada sel HT29 dan 187,5 $\mu\text{g/mL}$ pada sel HCT116 yang tidak jauh berbeda dengan pengujian pada sel kanker T47D ini. Hal ini membuktikan bahwa senyawa aktif

dalam tanaman daun sirih tunggal mampu mengimbangi aktivitas yang dihasilkan dari kombinasi ekstrak daun sirih dan antikanker 5-FU.

Optimasi konsentrasi dilakukan pada ekstrak kenikir, hal ini bertujuan untuk mengetahui respon yang ditimbulkan ketika sel kanker T47D diberikan dalam konsentrasi yang berbeda. Pada pemberian konsentrasi ekstrak kenikir hingga 500 $\mu\text{g/mL}$ hanya menunjukkan penghambatan

pertumbuhan sel sebesar 6,45%. Setelah dilakukan optimasi dengan menaikkan konsentrasi sampai 1000 µg/mL menunjukkan peningkatan persentase penghambatan meskipun nilainya kurang

dari 50% yaitu 44,24%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kenikir tidak cukup mampu menghambat pertumbuhan sel kanker T47D (Tabel 3).

Tabel 3. Persentase Sel Hidup T47D terhadap Konsentrasi Ekstrak Kenikir setelah Optimasi

| Konsentrasi (µg/mL) | % Sel Hidup | | | | Rata-rata % Sel Hidup |
|------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------------------------|
| | I | II | III | IV | |
| 1000 | 55,16 | 55,03 | 56,62 | 56,22 | 55,76 |
| 500 | 106,90 | 97,61 | 101,46 | 100,53 | 101,63 |
| 250 | 112,07 | 111,14 | 118,84 | 113,27 | 113,83 |
| 125 | 115,52 | 105,44 | 107,30 | 111,94 | 110,05 |

Doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif terhadap pertumbuhan sel kanker T47D. Penelitian menunjukkan pemberian doksorubisin dengan konsentrasi 50 nM (0,272 µg/mL) dan 100 nM (0,544 µg/mL) menunjukkan persentase penghambatan lebih dari 50%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fita (2015) sebelumnya, IC₅₀ diperoleh pada ekstrak kenikir yang dikombinasi dengan Doksorubisin sebagai agen terapi antikanker tidak lebih dari 200 µg/mL dengan konsentrasi doksorubisin kurang dari 0,27 µg/mL. Pada hasil penelitian ini, konsentrasi ekstrak kenikir ini tidak menunjukkan adanya penghambatan 50% populasi.

Selanjutnya dilakukan pengujian ekstrak kombinasi dengan kedua ekstrak tanaman bertujuan untuk mengetahui potensi kombinasi ekstrak berdasarkan sinergitas. Evaluasi sinergisme suatu senyawa dapat dihitung dengan indeks kombinasi (*Combination Index*) dari data viabilitas sel. Data viabilitas sel menunjukkan persentase sel hidup terhadap pemberian ekstrak daun sirih dan kenikir. Data viabilitas sel ditampilkan dalam Tabel 4, viabilitas sel terendah terdapat pada kombinasi ekstrak daun sirih dengan kenikir pada konsentrasi 500 µg/mL dan 250 µg/mL.

Tabel 4. Viabilitas Sel T47D pada Perlakuan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sirih dan Kenikir

| Ekstrak (µg/mL) | Daun Sirih | | | | Rata-rata | |
|--------------------|------------|-------|-------|--------|-----------|-------|
| | 500 | 250 | 100 | 50 | | |
| Kenikir | 500 | 13,35 | 62,88 | 93,73 | 97,88 | 66,96 |
| | 250 | 13,02 | 52,35 | 91,40 | 105,10 | 65,47 |
| | 100 | 18,71 | 61,91 | 95,22 | 107,57 | 70,85 |
| | 50 | 20,67 | 52,49 | 105,15 | 106,41 | 71,18 |
| Rata-rata | | 16,44 | 57,41 | 96,38 | 104,24 | |

Tabel 4 menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas sel lebih dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak daun sirih, semakin

besar konsentrasi ekstrak daun sirih yang diberikan makin semakin tinggi jumlah kematian sel. Sementara dengan pemberian

ekstrak kenikir, pada konsentrasi 50 µg/mL mampu menghambat kehidupan sel 28,82%. Berdasarkan indeks kombinasi, kedua ekstrak yaitu daun sirih dan kenikir menunjukkan aktivitas masing-masing terhadap sel kanker payudara T47D tersebut.

Identifikasi Golongan Senyawa

Hasil identifikasi senyawa dengan pereaksi semprot menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kenikir mengandung fenolik, flavonoid, saponin dan alkaloid. Fraksi non polar dan semipolar

mengandung fenolik dan flavonoid. Fraksi polar mengandung fenolik, flavonoid dan saponin. Meskipun hasil identifikasi menunjukkan adanya golongan senyawa yang terlarut dalam ekstrak dan fraksinya namun senyawa-senyawa tersebut tidak memiliki efek sitotoksik.

Hasil KLT ekstrak daun sirih menunjukkan adanya kandungan fenolik ditunjukkan dengan bercak kehitaman dan disemprot reagen FeCl₃. Flavonoid tersebut tampak berupa bercak kuning yang diperjelas dengan tambahan reagen semprot sitroborat.

KESIMPULAN

Hasil uji sitotoksik dengan metode MTT *assay* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth), fraksi polar, semi polar dan non polar tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF7. Tingginya persentase sel hidup menyebabkan IC₅₀ tidak dapat dihitung. Adapun hasil uji sitotoksik ekstrak etanol daun sirih (*Piper betel*) dan kenikir terhadap sel T47D menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki aktivitas penghambatan sel kanker yang lebih besar daripada ekstrak etanol kenikir. Kombinasi kedua ekstrak menunjukkan aktivitas masing-masing terhadap sel kanker T47D. Identifikasi senyawa metabolit dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan beberapa kandungan yang ada pada ekstrak etanol 96% daun kenikir seperti fenolik, flavonoid, saponin dan alkaloid. Fraksi non polar dan semi polar mengandung fenolik dan flavonoid sedangkan fraksi polar mengandung fenolik, flavonoid dan saponin. Penggunaan pelarut etanol 70% juga menunjukkan adanya kandungan flavonoid dan fenolik dalam ekstrak daun kenikir dan daun sirih.

PERSANTUNAN

Terima kasih kepada UMS yang telah membiayai sebagian penelitian ini melalui skema PID Kolaboratif dan Ibu Rela Religia yang telah membantu kultur sel T47D dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abas F., Shaari K., Lajis N.H., Israf D.A. and Kalsom Y.U., 2003, Antioxidative and Radical Scavenging Properties of the Constituents Isolated from *Cosmos caudatus* Kunth, *Natural Product Sciences*, 9 (4), 245–248.
- Akram M., Iqbal M., Daniyal M. and Khan A.U., 2017, Awareness and current knowledge of breast cancer, *Biological Research*, 50:33.
- Allredge B.K., Corelli R.L., Ernst M.E., Guglielmo B.J., Jacobson P.A., Kradjan W.A., et al., 2013, *Koda-Kimble & Young's Applied Therapeutics The Clinical Use of Drugs*, 10th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, United States of America.
- Barzegar E., Fouladdel S., Movahhed T.K., Ghahremani M.H., Ostad S.N. and Azizi E., 2015, Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines, *Iran J Basic Med Sci*, 18 (4).
- Buchori L., 2007, Pembuatan Gula Non Karsinogenik Non Kalori, *Reaktor*, 11 (2), 57–60.

- Burdall E.S., Hanby M.A., Landsdown R.J.M. and Speirs V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5 (2): 89-95.
- Cheng S., Barakatun-Nisak M.Y., Anthony J. and Ismail A., 2015, Potential medicinal benefits of *Cosmos caudatus* (Ulam Raja): A scoping review. *J. Res. Med Sci.* 20 (10), 1000-1006.
- Fita F.L., Listianingsih D., Hapsari Y.A., Pradana R.G., S Erika I., dan Arifin, I., 2015, Efek Sitotoksik Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*, Kunth) dan Dokso-rubisin Terhadap Sel Kanker Payudara T47d Secara In-Vitro Dan In-Silico, *Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal Sebagai Alternatif Medicine*, Semarang: Fakultas Farmasi Wahid Hasyim Semarang.
- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G. and Rakesh D.D., 2008, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, ICS-UNINDO, Italy.
- Kemenkes RI, 2013, *Situasi Penyakit Kanker*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kemenkes RI, 2015, *Situasi Penyakit Kanker*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kemenkes RI, 2016, *Info Datin-Bulan-Peduli-Kanker-Payudara-2016*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Meiyanto E., 2009, Prosedur tetap, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta*, 6–9.
- Mustafa R.A., Hamid A.A., Mohamed S. and Bakar F.A., 2010, Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants, *Journal of Food Science*, 75 (1), 28–35.
- Ng P. L., Rajab N. F., Then S. M., Anum Y., Yusof M., Zurinah W., Looi M. L., 2014, Piper betle leaf extract enhances the cytotoxicity effect of 5-fluorouracil in inhibiting the growth of, *15*(8), 692–700. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300303>
- Nurhayati B., Rahayu I.G., Rinaldi S.F., Zaini W.S, Afifah E., Arymwardana S., Kusuma H.S.W., Rizal. and Widowati W., 2018, The Antioxidant and Cytotoxic Effects of *Cosmos caudatus* Ethanolic Extract on Cervical Cancer, *The Indonesian Biomedical Journal*, 10 (3).
- Pebriana R.B., Wardhani B.W.K., Widayanti E., Wijayanti N.L.S., Wijayanti T.R., Riyanto S. and Meiyanto E., 2008, Pengaruh Ekstrak Metanolik Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap Pemacu Apoptosis Sel Kanker Payudara, *Pharmakon*, 9 (1), 21–26.
- Purnama N., 2017, Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Tumbuhan Daun Sirih (Piper betle L.), *Prosiding Seminar Nasional MIPA III*, 437–441.
- Rekha V.P.B., Kollipara M., Gupta B.R.S.S.S., Bharath Y. and Pulicherla K.K., 2014, A Review on Piper betle L.: Nature's Promising Medicinal Reservoir., *American Journal of Ethnomedicine*, 1 (5), 276–289.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori Konsep dan Teknik Pemurnian*, Deepublish, Yogyakarta.
- Suryani N.C., Permana D.G.M. and Jambe A.A.G.N., 2016, Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Total Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan EkstrakDaun Matoa (*Pometia*

-
- pinnata*), Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Bali.
- Wagner H. and Blatt S., 1996, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography*, Springer-Varleg, Berlin.
- WHO, 2014, *Cancer Country Profiles*, World Health Organization, United Nations
- Widyaratna A., 2016, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.), Ciplukan (*Physalis angulata* L.), dan Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) Terhadap Sel, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Yuliani R., Indrayudha P. and Rahmi S.S., 2011, Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Pharmakon*, 12 (2), 50–54.
- Zampieri L., Bianchi P., Ruff P. dan Arbuthnot P., 2002, Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer, *Anticancer Research*, 22 (4): 2253-9.