

## Pengaruh Fraksi Aktif Dari Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos Caudatus* Kunth) Terhadap Uji Sitotoksik, Apoptosis Dan Antiproliferasi Kanker Payudara Sel T47d Secara *In Vitro*

Robiatul Adawiyah<sup>1</sup>, Arum Setiawan<sup>2</sup>, Sri Nita<sup>3</sup>

Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia.

E-mail: [Robiatul8590@gmail.com](mailto:Robiatul8590@gmail.com)

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh daun kenikir terhadap uji sitotoksik, apoptosis dan antiproliferasi pada kanker payudara sel T47D secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan sampel sel T47D dengan konsentrasi ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi methanol daun kenikir 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml dan cisplatin 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml. Penilaian sitotoksik dengan menggunakan MTT assay, pemeriksaan apoptosis dengan menggunakan flowcytometry dan antiproliferasi dengan *doubling time* dan menggunakan SPSS 17,0 dengan one way Anova. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak yaitu senyawa terpenoid, tannin, dan flavonoid, fraksi n-heksan phenol dan terpenoid, fraksi methanol tannin dan fraksi etil asetat flavonoid. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak daun kenikir 237,9 µg/ml, fraksi n-heksan 433,8 µg/ml, fraksi etil asetat 120,6 µg/ml, fraksi methanol 241 µg/ml dan cisplatin 11,9 µg/ml. Pada Pemeriksaan apoptosis ekstrak memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sebesar 24,64 %, fraksi n-heksan 0,16 %, fraksi etil asetat 51,5 %, fraksi methanol 7, 81 % dan cisplatin 50,75 %. Ekstrak memiliki aktivitas antiproliferasi 46 jam, fraksi n-heksan 39 jam, fraksi etil asetat 56 jam, fraksi methanol 47 jam, kontrol sel 34 jam dan cisplatin pada 58 jam. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi aktif dari daun kenikir memiliki aktifitas sitotoksik, apoptosis dan antiproliferasi terhadap kanker payudara sel T47D.

Kata Kunci : Ekstrak, Fraksinasi, Daun kenikir, Sel T47D, Sitotoksik, Apoptosis, Antiproliferasi

### ABSTRACT

The purpose of this study to determine the effect of leaves kenikir to test cytotoxic, apoptosis and antiproliferasi on breast cancer T47D cell *in vitro*. This study used T47D cell samples with extract concentration, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and methanol fraction fraction of 500 µg / ml, 250 µg / ml, 125 µg / ml, 62,5 µg / ml and cisplatin 50 µg / ml, 25 µg / ml, 12,5 µg / ml, 6,25 µg / ml. Cytotoxic assessment using MTT assay, apoptosis examination using flowcytometry and antiproliferation with doubling time and using SPSS 17.0 with one way Anova. The results of this study indicate the presence of compounds contained in the extract of terpenoid compounds, tannins, and flavonoids, the fraction of n-hexane phenol and terpenoid, methanol fraction tannin and fraction of ethyl acetate flavonoids. IC<sub>50</sub> extract leaves 237,9 µg / ml, 433,8 µg / ml fraction of n-hexane, ethyl acetate fraction 120,6 µg / ml, methanol fraction 241 µg / ml and cisplatin 11,9 µg / ml. Examination of apoptosis extract has the ability to induce apoptosis of 24.64%, 0.16% n-hexane fraction, 51.5% ethyl acetate fraction, methanol fraction 7, 81% and cisplatin 50.75%. The extract had 46 hours antiproliferation activity, 39 hours n-hexane fraction, 56 hours of ethyl acetate fraction, 47 hours methanol fraction, 34-hour cell control and cisplatin at 58 hours. From this study it can be concluded that the active fraction of the kenikir leaves has cytotoxic activity, apoptosis and antiproliferation against T47D cell breast cancer.

Keywords : Fractionation, Kenikir Leaves, T47D Cells, Cytotoxic, Apoptosis, Antiproliferation

### PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan masalah dalam dunia kesehatan dengan jumlah insidensi lebih 5% setiap tahunnya. Pengobatan dengan kemoterapi dan radiasi memiliki banyak efek samping. Daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) merupakan tanaman tradisional yang

dapat mencegah dan mengobati penyakit kanker. Ekstrak daun kenikir mengandung flavonoid dan glikosida kuersetin. Berdasarkan hasil penelitian yang telah ada senyawa flavonoid diketahui mampu menginduksi terjadinya apoptosis<sup>1</sup>.

Penelitian yang pernah dilakukan Lotulung (2001) <sup>2</sup>menunjukkan bahwa daun kenikir mengandung senyawa yang memiliki daya antioksidan yang cukup tinggi, dengan harga IC<sub>50</sub> yaitu 70 µg/ml. Kiran (2012)<sup>3</sup> melaporkan bahwa flavonoid yang diisolasi dari fraksi etil asetat dari ekstrak daun kenikir memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dan diamati adanya peningkatan ekspresi p53 dan Bax. Menurut Abas (2003) menyebutkan bahwa ekstrak daun kenikir mengandung flavonoid.. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis adalah dengan melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathway*, penurunan ekspresi gen Bcl-2

dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease<sup>4</sup>. Menurut Pan (2002)<sup>5</sup> Senyawa flavonoid dapat menginduksi terjadinya kerusakan DNA yang *irreversible*, terjadinya apoptosis pada sel T47D bisa melalui jalur p53 yang ditandai dengan adanya interaksi antara flavonoid dengan enzim Topoisomerase DNA. Pengamatan kinetika proliferasi sel dilakukan untuk mengetahui terjadinya penghambatan proliferasi sel yang dapat berupa *cell cycle arrest* maupun *cell cycle delay*. Terjadinya penghambatan proliferasi sel merupakan petunjuk adanya senyawa yang memiliki aktifitas kemoprevensi

## METODE

Simplisia daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) yang diambil dari Institute Pertanian Bogor dan diproses sehingga menjadi ekstrak dan dilanjutkan ke fraksinasi, sel T47D yang digunakan merupakan koleksi dari CCRC Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta, kemudian sel

T47D ditumbuhkan dalam media kultur RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), 1641 yang mengandung FBS (*Fetal Bovin Serum*) 10% penisilin-sterptomisin 1% dan fungizone 0,5% pemanenan sel dari *tissue culture disk* menggunakan tripsin – EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,25%.

### Jalan penelitian

#### Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi

Sampel di ekstraksi secara maserasi dengan cara direndam menggunakan 1 liter pelarut methanol selam 1 x 24jam. Ekstrak kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya menggunakan *ratory evaporator* sampai mengental dan didapatkan hasil 37 gram. Sebanyak 17 gram ekstrak kental daun kenikir dipisahkan untuk dilakukan uji aktifitas antikanker menggunakan sel T47D sisanya sebesar 20 gram dilanjutkan untuk proses fraksinasi. Proses Fraksinasi dilakukan dengan metode FCC (fraksi cair-cair) fraksi dimasukkan kedalam labu pemisah dengan menggunakan pelarut-pelarut menjadi 3 fraksi yaitu fraksi n-heksan, etil asetat, dan

fraksi methanol sebanyak 20 gram ekstrak daun kenikir dilarutkan dengan etanol sebanyak 100 ml, kemudian dicampurkan dengan aquadest 250 ml. setelah itu dicampurkan dengan larutan N-heksan sebanyak 6 x 250 ml, kemudian dicampurkan dengan etil asetat sebanyak 6 x 250 ml sehingga dihasilkan fraksi n-heksan, etil asetat dan methanol, lalu dilakukan proses selanjutnya dengan *Ratory evavoratory* untuk pengentalan sehingga didapatkan hasilnya berbentuk pasta. Sehingga diperoleh 3 fraksi n-heksan, etil asetat dan methanol lalu timbang botol fraksi kosong dikurangi botol fraksi yang sudah diisi untuk mengetahui berat fraksi.

### Penentuan golongan senyawa

Prosedur uji KLT yang dilakukan sebagai berikut ekstrak, Fraksi n-heksan, etil asetat, methanol, dengan menggunakan konsentrasi 1% ditotolkan pada *plate silica gel* F<sub>254</sub> ukuran *plate silica* yaitu (1 cm x 6 cm) kemudian dikembangkan dengan eluen sampai diujung *plate silica gel* F<sub>254</sub> lalu dikeluarkan dan dibiarkan mengering. *Plate silica gel* F<sub>254</sub> kemudian disemprotkan dengan Cairan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, kemudian diletakkan diatas *hot plate*. Kemudian Amati bercak warna yang muncul Jika berwarna biru mengandung Steroid / Terpenoid, kuning tua mengandung Flavonoid, coklat mengandung Tannin dan Ungu mengandung Phenol.

### Uji Apoptosis dengan Flowcitometry

Uji aktifitas apoptosis pada daun kenikir terhadap sel T47D dilakukan pemanenan sel T47D sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran kemudian ditanam dalam 6 *well plate* dengan masing-masing dimasukkan sebanyak 2000  $\mu\text{g/ml}$  MK (media kultur). Kemudian diinkubasi sel siap untuk diberi perlakuan. Sel kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1200 rpm

### Uji Antiproliferasi dengan Teknik Doubling Time

*Doubling Time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. Untuk preparasi dan panen sel sama seperti uji sitotoksik, hanya saja sel yang digunakan sejumlah  $5 \times 10^3$  sel/sumuran diinkubasi dalam 96 *well* dengan konsentrasi nilai  $1/2$  IC<sub>50</sub> atau setengah dari nilai Konsentrasi Ekstrak 237,9  $\mu\text{g/ml}$ , Fraksi

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) kanker payudara sel T47D dengan metode MTT.

Uji sitotoksik memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan

### Uji sitotoksik dengan metode MTT

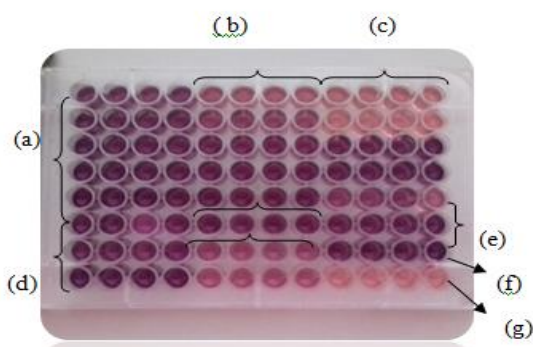
Ekstrak dan masing-masing Fraksi daun kenikir seberat  $\pm 10$  mg. yang sudah ditimbang ditambahkan larutan DMSO sebanyak  $\pm 10 \mu\text{l}$  kemudian dibuat 4 seri konsentrasi untuk ekstrak dan masing-masing fraksi (500 $\mu\text{g/ml}$ , 250 $\mu\text{g/ml}$ , 125 $\mu\text{g/ml}$ , 62,5 $\mu\text{g/ml}$ ) cisplatin konsentrasi (50 $\mu\text{g/ml}$ , 25 $\mu\text{g/ml}$ , 12,5 $\mu\text{g/ml}$ , 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ) memasukkan media DMEM sebanyak 1000  $\mu\text{l}$ . setiap kadar konsentrasi yang telah dibuat lalu diujikan pada sel kanker payudara T47D. Setelah sel yang diberikan perlakuan pada setiap konsentrasi lalu sel diinkubasi dalam inkubator CCRC selama  $\pm 24$  jam.

dengan waktu 10 menit. Kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan dengan reagen Annexin V dan PI (Propidium Iodida) lalu dibaca dengan menggunakan flowcytometry. Selanjutnya ditambahkan Reagen Annexin dan Propodium Iodine dari dan inkubasi selama 10-15 menit kemudian lakukan proses analisis apoptosis dengan *flowcytometry*.

N-Heksan 433,8  $\mu\text{g/ml}$ , Fraksi Etil Asetat 120,6  $\mu\text{g/ml}$ , Fraksi Methanol 241  $\mu\text{g/ml}$  dan Cisplatin 11,9  $\mu\text{g/ml}$ . Setelah diberikan perlakuan, maka sel diinkubasi dalam incubator CCRC pada 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi sel hidup yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm.

sel mampu bertahan hidup. Sel yang hidup ditandai dengan warna yang terang dan berbentuk lonjong sedangkan sel yang mati menjadi mengkerut dan ditandai dengan warna yang lebih gelap dari sel hidup<sup>6</sup>.

Sel T47D yang diberi perlakuan bahan uji akan mengalami perubahan warna yang ditunjukkan dengan warna ungu adalah sel hidup dan berwarna merah muda sel yang mati. Uji sitotoksik digunakan untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru dari bahan alam yang berpotensi sebagai obat antikanker. Dari percobaan uji sitotoksik memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Sel yang hidup ditandai dengan warna yang terang dan berbentuk lonjong sedangkan sel yang mati menjadi mengkerut dan ditandai dengan warna yang lebih gelap dari sel hidup (Doyle & Griffiths, 2000).



Gambar 1 Hasil proses MTT sel T47D dengan ekstrak dan fraksi daun kenikir (a) Ekstrak (b) Fraksi Methanol (c) Etil Asetat (d) Fraksi N-Heksan (e) Cisplatin (f) Kontrol sel T47D (g) Kontrol media

**Analisis Nilai IC<sub>50</sub>**

Nilai IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui tingkat potensi sitotoksitas<sup>7</sup>. Grafik garisnya terbentuk antara konsentrasi bahan uji yaitu dengan memasukkan nilai persen viabilitas pada masing-masing bahan uji sebagai nilai (y) dan nilai seri konsentrasi sebagai nilai (x)

Data absorbansi yang didapatkan menunjukkan bahwa Ekstrak, Fraksi n-heksan, Fraksi etil asetat dan Fraksi methanol daun kenikir memiliki pengaruh pada sel

Gambar 2 Grafik viabilitas Daun kenikir pada sel T47D (1) fraksi aktif (etil asetat) (2) Cisplatin

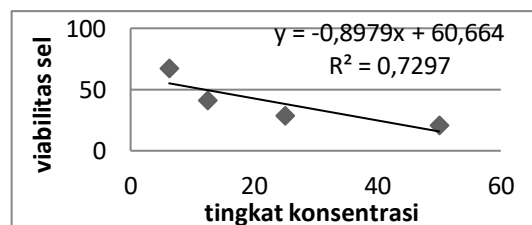
Gambar 2 menjelaskan semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin rendah nilai viabilitas sel T47D

T47D dan dapat digunakan sebagai obat anti kanker. Nilai IC<sub>50</sub> yang didapatkan dari elissa reader yaitu Ekstrak Daun Kenikir terhadap Sel T47D adalah 237,9 µg/ml, Fraksi N-Heksan 433,8 µg/ml, Fraksi Etil Asetat 120,6 µg/ml, Fraksi Methanol 241 µg/ml, dan Cisplatin 11,9 µg/ml.

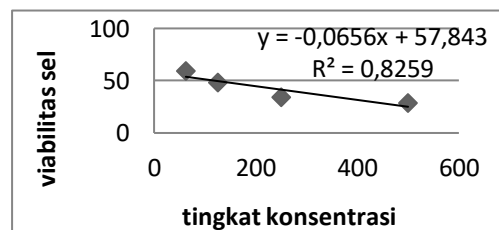
Klasifikasi aktifitas sitotoksik Ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan kategori sangat aktif jika nilai IC<sub>50</sub> ≤ 10 µg/ml dan kategori aktif pada nilai IC<sub>50</sub> 100-500 µg/ml. Weerapreeyakul (2012). Berdasarkan klasifikasi tersebut maka Fraksi Etil Asetat yang memiliki nilai IC<sub>50</sub> 120,6 µg/ml memberikan kategori cukup aktif yang baik untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Tabel 1 Nilai Absorbansi Uji sitotoksik Fraksi aktif daun kenikir Pada sel T47D kanker Payudara

Bahan Uji Konsentrasi (µg/ml)	Nilai Absorbansi				Viabilitas % sel Hidup	Nilai IC <sub>50</sub>
	I	II	III	IV		
Etil Asetat						
500	0,379	0,381	0,390	0,378	28,5	
250	0,431	0,411	0,419	0,407	33,9	
125	0,499	0,514	0,523	0,508	48,2	120,6
62,5	0,581	0,583	0,586	0,582	59,3	



(1)

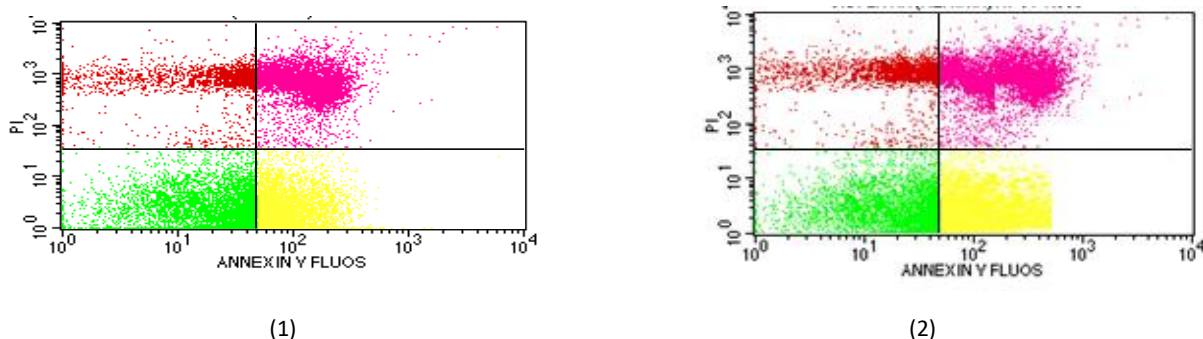


(2)

hal ini karena pengaruh dari Fraksi etil asetat yang diduga karena mengandung flavonoid.

Flavonoid telah diketahui memiliki aktifitas biologis sebagai antiinflamasi, antikanker dan antioksidan<sup>8</sup>.

#### Uji Apoptosis ekstrak dan fraksi daun kenikir kanker payudara sel T47D



Gambar 3. Analisis Apoptosis sel T47D (1) Fraksi aktif (etil asetat) (2) Cisplatin

Dari hasil flowcitometry didapatkan nilai persentase apoptosis yaitu ekstrak memiliki kemampuan menginduksi Apoptosis sebesar 24,64 %, Fraksi N-Heksan 0,16 %, Fraksi Etil Asetat 51,5 %, Fraksi Methanol 7,81 %, dan Cisplatin 50,75 %. Dari gambar 3 menjelaskan bahwa warna hijau adalah sel hidup, warna merah adalah sel yang mengalami nekrosis warna kuning menunjukkan sel yang mengalami apoptosis awal dan warna merah muda menunjukkan sel yang mengalami apoptosis akhir. Penggunaan pewarna *Propidium Iodide* (PI) digunakan untuk membedakan kematian sel akibat apoptosis maupun nekrosis melalui mekanisme interaksi dengan DNA.<sup>9</sup>

#### Uji Antiproliferasi Ekstrak dan Fraksi Daun kenikir terhadap sel T47D Kanker Payudara

*Doubling Time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. sel diinkubasi dalam 96 well dengan konsentrasi nilai  $1/2$  IC<sub>50</sub> kemudian sel diinkubasi pada 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam sehingga didapatkan nilai absorbansi dari elissa reader. Ekstrak daun kenikir memiliki aktivitas Antiproliferasi pada jam ke 45,8 Fraksi N-Heksan pada jam ke 39,1 Fraksi Etil Asetat pada jam ke 56,2 Fraksi Methanol pada jam ke 47,2 jam Cisplatin pada

Apoptosis itu sendiri adalah kematian sel yang terprogram dan berperan penting dalam proses perkembangan kanker. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis adalah dengan melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathway*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease. Ren (2003). Flavonoid memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sel kanker kolon Caco-2 dan HT-29 serta sel kanker leukemia HL-60 dengan cara menstimulasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria<sup>10</sup>

jam ke 58,5 dan Kontrol sel pada jam ke 33,8. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kiran (2012) melaporkan bahwa flavonoid yang diisolasi dari fraksi etil asetat dari ekstrak daun kenikir memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dan diamati adanya peningkatan ekspresi p53 dan Bax. Pengamatan kinetika proliferasi sel dilakukan untuk mengetahui terjadinya penghambatan proliferasi sel yang dapat berupa *cell cycle arrest* maupun *cell cycle delay*. Terjadinya penghambatan proliferasi sel merupakan petunjuk adanya senyawa yang memiliki aktifitas kemoprevensi. Meiyanto (2005). Flavonoid

yang terkandung didalam fraksi etil asetat yang memiliki efek antiproliferatif terhadap sel T47D. Penghambatan ini didasarkan pada penghambatan pada proses transduksi sinyal dari faktor pertumbuhan maupun faktor-faktor lain yang dapat menginduksi pertumbuhan sel<sup>xi</sup>. Dari hasil diatas menunjukkan bahwa fraksi aktif daun kenikir memiliki pengaruh antiproliferasi pada kanker payudara sel T47D.

#### ANALISIS STATISTIC

Uji statistic yang digunakan dalam uji antiproliferasi sel T47D yaitu dengan menggunakan *OneWay Anova* yang dilanjutkan dengan uji *LSD*. Hasil uji Anova menunjukkan  $p=0,001$  ( $p<0,05$ ) sehingga ada

perbedaan yang signifikan antara kelompok bahan uji terhadap nilai *doubling time*. Kesimpulan dari uji Post hoc adalah fraksi Etil Asetat tidak ada beda terhadap Cisplatin dengan nilai  $p = 0,999$  ( $p>0,05$ ) dan Fraksi Etil Asetat memiliki aktifitas sitotoksik yang baik dibandingkan dengan ekstrak, fraksi n-heksan, dan fraksi methanol.

#### KESIMPULAN

Ekstrak, Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Methanol dari Daun Kenikir memiliki pengaruh Sitotoksik, Apoptosis dan Antiproliferasi pada Sel T47D Kanker Payudara

#### DAFTAR PUSTAKA

- <sup>1</sup> Abas F, Shaari K, Lajis NH, Israf DA, dan Kalsom YU. Antioksidative and radical scavenging properties of the constituents isolated from *Cosmos caudatus* Kunth. *Nat. Prod. Sciences*. 2003. vol.80-83.
- <sup>2</sup> Lotulung PDN, Minarti dan kardonno LBS, Penapisan Aktivitas Antibakteri, Antioksidan dan Toksisitas Terhadap larva Udang *Aetmia Salina* Ekstrak Tumbuhan Asteraceae. 2001.
- <sup>3</sup> Kiran. Efek fraksi etil asetat daun kenikir pada uji sitotoksik sel T47D dan terhadap peningkatan ekspresi p53 dan Bax. *Journal, Kefarmasian Universitas Ahmad Dahlan*. 2012 vol: 12 (3) 201-225.
- <sup>4</sup> Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu, L, Flavonoids : *Journal Anticancer Agent, Medicinal Research reviews*. 2003. 23(4),519-534
- <sup>5</sup> Pan. Apoptosis and Flavonid of cancer cell T47D and enzim interaction.
- Journal.Biomedical Research*. 2002. vol. 100-108.
- <sup>6</sup> Doyle A, and Griffiths JB, Cell and Tissue Culture For Medical Research, *Jhon Willey and Sons Ltd*, New York. 2000.
- <sup>7</sup> Weerapreeyakul. *Metode regresi Linear IC<sub>50</sub>*. : Jakarta, Pustaka Jaya Utama. 2012.
- <sup>8</sup> Middleton EJr, dan Kandaaswami C, 1993. The Impact Of Plain Flavonoids on Mammalian Biology: Implications For Imunity, Imflammation and cancer, in: Harborne,JB, The Flavonoids : *Advance in Research since 1986*, London
- <sup>9</sup> Zhang. Morphologycal.apoptosis methods *Assessment of apoptosis. Toxicologic Pathology* : 44-498-511. 2011.
- <sup>10</sup> Taraphdar, Amit, K., Madhumita, Roy, dan Bhattacharya, R.K., Natural Product as

---

inducers of apoptosis : implication for cancer therapy and prevention, *Current science*. 2001

*Jurnal Ilmu KeFarmasian Indonesia*  
vol.(2) 7-11. 2002

- <sup>xi</sup> Sudarsono, Khasiat buah naga merah terhadap antiproliferasi sel abnormal.