

Upaya Penelusuran Aktivitas Sitotoksik dan Antioksidan Fraksi N-Heksan Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) terhadap Sel Kanker Payudara secara *In Vitro* dan *In Silico*

Windy Andriati Lubis, Rifki Febriansah
Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

INTISARI

Kanker payudara merupakan salah satu kanker penyebab kematian terbesar pada wanita di Indonesia. Penggunaan agen kemoterapi dalam pengobatan kanker payudara menimbulkan efek samping dan resistensi, untuk itu diperlukan pengobatan berbahan dasar dari alam sebagai agen kemopreventif salah satunya yaitu herba bandotan. Penelitian sebelumnya mengenai herba bandotan menggunakan berbagai fraksi dan sel kanker sehingga diperlukan penelusuran lebih lanjut mengenai herba bandotan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker fraksi n-heksan bandotan (FNB) secara *in vitro* pada sel MCF-7 dan *in silico* pada protein target HER-2.

Bandotan diekstraksi dengan metode maserasi yang kemudian difraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan dilanjutkan dengan evaporasi sehingga didapatkan fraksi kental n-heksan. Identifikasi kandungan senyawa pada bandotan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), untuk uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dengan menggunakan vitamin C sebagai pembandingnya dan uji sitotoksik menggunakan metode MTT *assay*, sedangkan untuk uji secara *in silico* menggunakan metode *docking* molekuler dengan mempersiapkan senyawa Ageratokromen terhadap protein target HER-2.

Hasil penelitian menunjukkan dari 1,2 kg bandotan diperoleh 1,7 gram FNB. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa Bandotan memiliki kandungan alkaloid dan steroid, aktivitas antioksidan FNB diperoleh nilai IC_{50} 493 $\mu\text{g/ml}$. Potensi sitotoksik FNB diukur terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 306 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan pada *docking* molekuler dapat dilihat dari kemampuan ageratokromen menghambat protein target HER-2 dengan afinitas -6,2 kkal/mol.

Dari hasil yang diperoleh dapat dikatakan bahwa FNB memiliki potensi lemah sebagai kemopreventif kanker payudara MCF-7.

Kata kunci : *Docking* molekuler, Fraksi n-heksan bandotan (*Ageratum conyzoides L.*), MCF-7, Uji antioksidan, Uji sitotoksik.

***Cytotoxic and Antioxidant Activity of N-Hexane Fraction Bandotan
(Ageratum Conyzoides L.) in Breast Cancer Cells Line
by In Vitro and In Silico***

Windy Andriati Lubis, Rifki Febriansah
School of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences,
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common cancers that causes the highest morbidity and mortality in woman at Indonesia. Some anticancer medicines are not efficient and also have many side effects then needed cancers treatment based on nature one of them use bandotan as chemopreventive agent. Previous research on bandotan used various fraction and cancer cells then it's necessary further research about bandotan as anticancer. This study aimed to analyze the cytotoxic activity of n-hexane fraction bandotan (NFB) in breast cancer cells MCF-7 in vitro and study the molecular mechanism of the active component NFB in silico, with the target protein HER-2.

Identification of the compounds content in bandotan by Thin Layer Chromatography (TLC). Antioxidant Test NFB measured by DPPH and cytotoxicity assay NFB performed with MTT, test carried out by molecular docking protein preparation and docking test compounds ageratochromene on HER-2.

Based on the research of 1.2 kg to obtain NFB concentrated 1.7 gram which will then be tested TLC, check the antioxidant and cytotoxic test. The test results of TLC showed that bandotan has alkaloid and steroid content, antioxidant activity of NFB showed with value of IC_{50} 493 μ g/ml and potential bandotan as a cytotoxic agent is mediated by the ability of ageratochromene inhibit HER-2 protein targets with affinity -6,2 kcal/mol. Cytotoxic potential of NFB with an IC_{50} value of NFB 306 μ g/ml to inhibit the growth of MCF-7 cells line.

From the result obtained can be said that NFB has a weak potential as chemopreventif for breast cancer MCF-7 cell line.

Keyword : *Bandotan (Ageratum conyzoides L.), Chemopreventive agent, HER-2, Molecular docking, MCF-7.*

1. Pendahuluan

Seluruh kematian di dunia, 12% diantaranya disebabkan oleh kanker payudara dan menjadi pembunuh nomor 2 setelah penyakit kardiovaskuler, hal ini diperkirakan akan bertambah tiap tahunnya (NCI, 2012). Ada berbagai macam jenis kanker yang telah teridentifikasi, salah satunya adalah kanker payudara. Pengobatan antikanker dapat dikatakan berhasil bila dosis yang digunakan sesuai sehingga dapat mematikan sel tumor dan tidak mengganggu sel normal berproliferasi (Departemen Farmakologi dan Terapi, 2008). Munculnya paradigma baru di dunia kedokteran modern, yaitu *back to nature*, menjadikan hal ini sebuah tantangan untuk menelusuri lebih lanjut pengembangan obat tradisional dan obat antikanker yang berasal dari tumbuh-tumbuhan khususnya, diharapkan antikanker yang dihasilkan lebih efektif dan memiliki efek samping yang tidak berbahaya (Rahmawati, *et al.*, 2008). Salah satu bahan alam yang kemungkinan dapat digunakan sebagai agen kemopreventif payudara adalah herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*).

Bandotan secara empiris dimanfaatkan sebagai analgesik, antibakteri, antiinflamasi, diuretika dan tumor Rahim (Wijayakusuma dan Dalimarta, 1994). Penelitian lebih lanjut mengenai herba bandotan akan dikembangkan dengan mengetahui efek antikanker dari senyawa yang terkandung pada fraksi n-heksan bandotan karena belum ada penelitian sebelumnya yang menggunakan fraksi n-heksan bandotan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa pada fraksi n-heksan Bandotan dan aktivitas fraksi n-heksan sebagai antioksidan dan antikanker.

2. Metode

2.1 Determinasi Tanaman

Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang digunakan dalam penelitian ini diterminasi di Farmasi Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, dari 1,2 kg bubuk simplisia bandotan yang dimaserasi dengan etanol 70% perbandingan 1:10 selama 5 hari dan diremaserasi selama 2 hari. Kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan untuk memisahkan ekstrak bandotan berdasarkan polaritas perbandingan 1: 1 selanjutnya dievaporasi dengan evaporator (60°C; 100 rpm) dan *waterbath* (60°C) untuk mendapatkan fraksi n-heksan bandotan terkonsentrasi.

2.3 Identifikasi Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji yang dilakukan yaitu fraksi n-heksan bandotan ditotolkan dengan bantuan pipa kapiler pada pelat silica gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam, kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala berisi fase gerak. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform, kemudian dilihat hasilnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH)

Larutkan 15,8 mg 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dalam 25 ml metanol (0,4 mM), buat larutan kontrol dengan melarutkan 1 ml DPPH

dalam 100 ml metanol. Timbang 20 mg sampel dan 5 mg vitamin C sebagai perbandingan kemudian larutkan sampel dalam metanol 20 ml (1000 µg / ml) dan vitamin C dalam metanol 100 ml (50 µg / ml). Kemudian buat seri konsentrasi 100; 200; 300; 400; 500 µg / ml untuk sampel NFB dan 1; 2; 3; 4; 5 µg / ml untuk vitamin C. Ambillah 5 ml untuk setiap konsentrasi sampel dan vitamin C lalu tambahkan 1 ml DPPH setelah itu *vortex* untuk menghomogenkan kemudian inkubasi di ruangan gelap selama 30 menit. Penyerapan masing-masing larutan dapat dibaca dengan panjang gelombang 517 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

2.5 Uji Sitotoksik dengan metode MTT assay

Siapkan larutan NFB dengan konsentrasi 105 µg / ml dan beberapa seri konsentrasi. Sel dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumurann didistribusikan ke dalam 96 *plat well* dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di bagian bawah sumur. Kemudian, media diambil, dicuci dengan PBS dan kemudian ditambahkan media kultur 100 µL yang hanya mengandung 0,2% DMSO (kontrol) atau sampel uji tunggal NFB yang diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel telah dibuang, dicuci dengan 100 µL PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumur ditambahkan media kultur 100 µL yang mengandung MTT 5 mg / ml, diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup bereaksi dengan MTT untuk membentuk kristal *formazan* ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT

dikeluarkan, dicuci PBS dan kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam 0,1% HCl 200 μ L untuk melarutkan kristal *formazan*. Guncang dengan *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan pembaca ELISA pada panjang gelombang 595 nm. Nilai serapan diubah menjadi % sel hidup kemudian hitung nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linier.

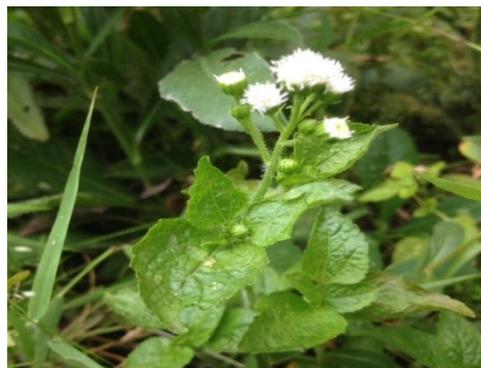
2.6 Molekular *Docking*

Molekular *Docking* dimulai dengan mengunduh semua aplikasi yang dibutuhkan dan menguji senyawa aktif (ageratokromen dan doksorubisin diunduh di Pubchem.com) dan protein target HER-2 dapat diunduh di Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) dengan ID 3PP0. Persiapan protein target lebih lanjut dengan aplikasi *DS Visualizer*. Protein HER-2 (PDB ID 3PP0) disimpan dengan nama file 3PP0 dengan aplikasi *DS Visualizer* yang diubah menjadi format .pdb dengan aplikasi *Open Babel*. Setiap senyawa yang didapat 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda. Protokol *docking* yang valid adalah protokol *docking* yang menghasilkan konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å, kemudian konformasi disambungkan sampai afinitas energi atau skor *docking* diperoleh. Visualisasi menggunakan *DS Visualizer* untuk *Define Ligand* dan *Ligand Interaction* sehingga akan terlihat posisi ikatan yang jelas dari uji senyawa aktif dan protein HER-2 kemudian diberi label asam amino yang berikatan dengan senyawa aktif. Senyawa yang memiliki potensi penghambatan yang baik terhadap protein HER-2 adalah senyawa dengan afinitas terendah atau skor *docking* terendah.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel yang diuji. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang diujikan merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dan termasuk ke dalam suku *Asteraceae*.



Gambar 1. Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*)

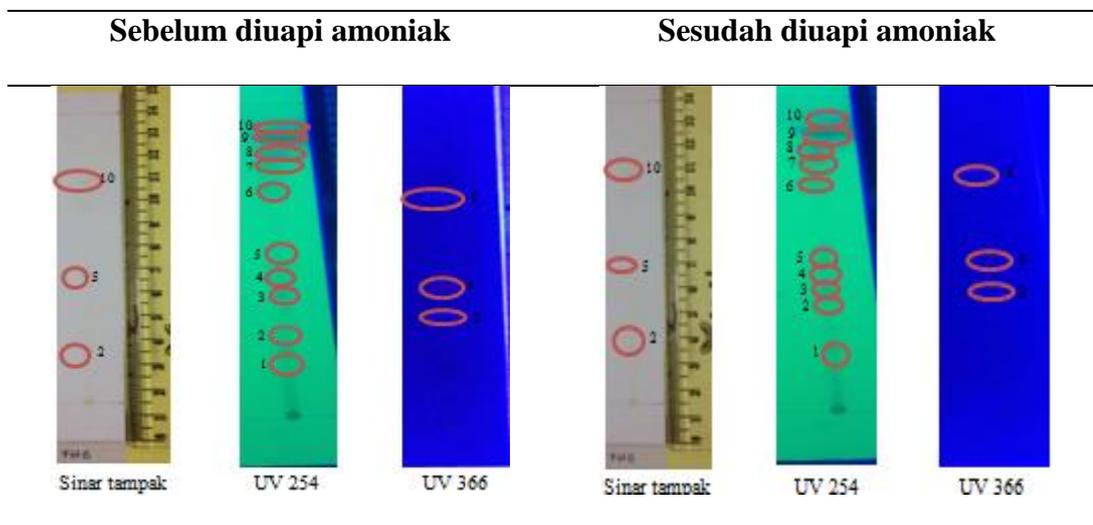
3.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan sehingga didapatkan ekstrak cair sebanyak 8.82 L dan kemudian difraksinasi dengan metode partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Dari 1.1 L ekstrak etanol dan 1.1 L n-heksan menghasilkan 1 L Fraksi N-heksan Bandotan (FNB) yang kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* dan didapatkan sebanyak 1.5 gram FNB dengan menghasilkan rendemen 1.03 %.

3.3 Identifikasi Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Untuk mengetahui senyawa yang terdapat dalam sampel FNB dilakukan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi tersebut.

Identifikasi dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), plat silika gel GF254 yang merupakan fase diamnya sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform.



Gambar 2. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada pengamatan kromatogram memperlihatkan adanya warna yang samar pada pengamatan secara visibel sebelum dan setelah diuapi amoniak pada sampel FNB sedangkan pada pengamatan di bawah sinar UV 254 dan UV 366 nm menunjukkan 10 bercak pada sampel FNB dan menunjukkan adanya *fluoresensi* kuning dan merah (Gambar 1), nilai Rf dan warna bercak pada pengamatan KLT dapat dilihat pada tabel 1. Fraksi n-heksan bandotan mengandung alkaloid pada bercak nomor 1, 2, 8, 9 dan 10 serta mengandung steroid pada bercak nomor 6 dengan warna bercak yaitu kuning pada pengamatan UV 366 nm.

Tabel 1. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis

Nomor Bercak	Nilai Rf	Warna Bercak			
		Sinar Tampak		UV 254	UV 366
		Tanpa Uap NH ₃	Dengan Uap NH ₃	Dengan/tanpa Uap NH ₃	Dengan/tanpa Uap NH ₃
1	0.2	Kuning tua	Kuning	Kuning	-
2	0.28	-	-	Kuning	Kuning
3	0.32	-	-	Ungu tua	-
4	0.33	-	-	Ungu muda	Merah
5	0.48	Hijau	Hijau	Ungu muda	-
6	0.68	-	-	Kuning	Kuning
7	0.76	-	-	Kuning	-
8	0.8	-	-	Ungu muda	-
9	0.84	-	-	Ungu tua	-
10	0.88	Kuning	Kuning	Kuning	-

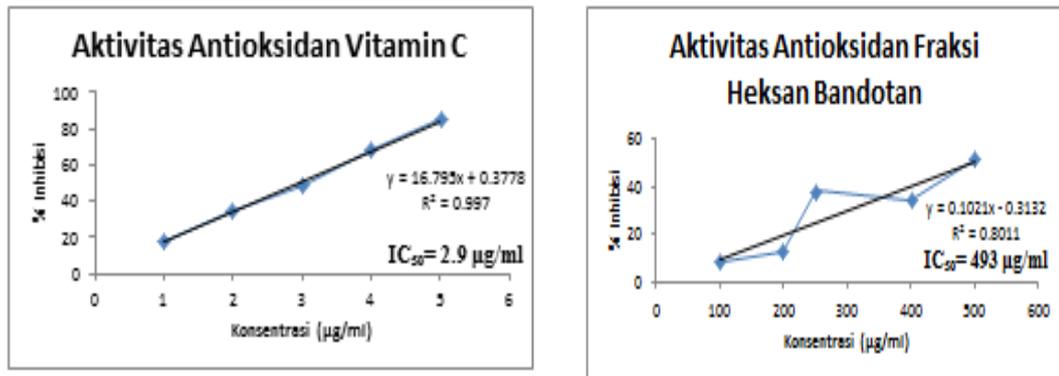
3.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil

(DPPH)

Daya antioksidan pada fraksi n-heksan bandotan dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Vitamin C dipilih sebagai pembanding dalam uji ini.

Tabel 2. Uji Aktivitas Antioksidan FNB

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Rerata % inhibisi
Vitamin C	1	17.80744
	2	34.53074
	3	48.19579
	4	68.47087
	5	84.81392
Fraksi FNB	100	8.42674
	200	12.94001
	250	38.48574
	400	34.77876
	500	51.8879



Gambar 3. Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan FNB terhadap DPPH.

Hasil perhitungan menunjukkan nilai IC_{50} Vitamin C sebesar 2.9 $\mu\text{g/ml}$ untuk nilai IC_{50} fraksi n-heksan bandotan yaitu 493 $\mu\text{g/ml}$.

3.5 Uji Sitotoksik dengan metode MTT assay

Berdasarkan hasil uji sitotoksik FNB, konsentrasi terendah yaitu 62.5 $\mu\text{g/ml}$ mampu membunuh 2.582 % sel MCF-7 (100-97.418%), sedangkan pada konsentrai tertinggi yaitu 500 $\mu\text{g/ml}$ mampu membunuh 98.269 % sel MCF-7 (100-1.731%). Adapun nilai IC_{50} fraksi n-heksan adalah 306 $\mu\text{g/ml}$ yang terletak antara kadar 250 $\mu\text{g/ml}$ dan 500 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 3). Linieritas yang tinggi menunjukkan penurunan viabilitas sel berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi mengikuti persamaan $y = -0.2264x + 119.23$. Sedangkan, hasil sitotoksik pada doxorubicin memberikan hasil IC_{50} sebesar 59 $\mu\text{g/ml}$ yang terletak antara kadar 25 $\mu\text{g/ml}$ dan 50 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4). Nilai IC_{50} Doxorubicin lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} FNB sehingga aktivitas sitotoksik FNB lebih rendah dari pada Doxorubicin karena membutuhkan dosis yang besar

untuk menghambat 50% viabilitas sel kanker payudara MCF-7. Pada konsentrasi terendah yaitu 6,25 µg/ml viabilitas sel kanker payudara MCF-7 sebesar 75,33%, sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 200 µg/ml viabilitas sel kanker payudara MCF-7 sebesar 4,53%.

Tabel 3. Persen Hidup sel MCF-7 dengan Perlakuan N-Heksan Bandotan

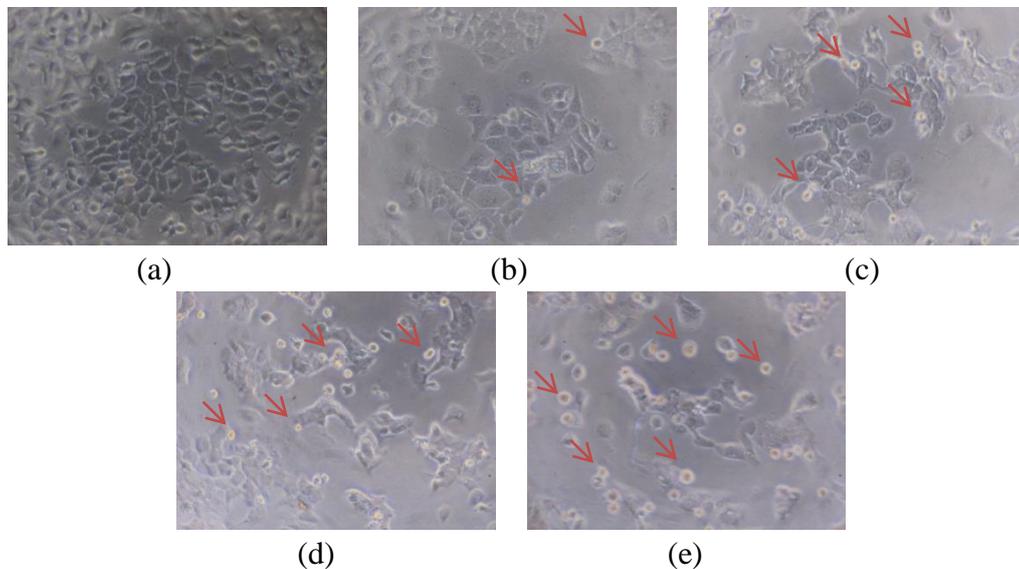
Absorbansi		Konsentrasi (µg/ml)	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi	Persamaan
Kontrol	Media				
0.0678	0.0918	500	1.730987514	0.695087895	y = -0.2264x + 119.23 R ² = 0.9715 IC ₅₀ = 306 µg/ml
		250	71.76503973	4.247057193	
		125	93.78547106	3.858416148	
		62.5	97.41770715	6.59564798	

Tabel 4. Persen Hidup sel MCF-7 dengan Perlakuan Doxorubicin

Absorbansi		Konsentrasi (µg/ml)	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi	Persamaan
Kontrol	Media				
0.0678	0.0918	200	4.531946508	0.210135745	y = -0.403x + 108.12 R ² = 0.921 IC ₅₀ = 59 µg/ml
		100	17.31054978	1.917308752	
		50	49.40564636	1.736006158	
		25	66.64190193	3.132714509	
		12.5	71.54531947	0.735475107	
		6.25	75.33432392	0.639102917	

Pada uji sitotoksik juga dilakukan pengamatan viabilitas sel dengan mikroskop *inverted* untuk mengetahui gambaran sel dan perubahan morfologinya setelah diberi perlakuan dengan sampel. Berdasarkan hasil pengamatan sel, sel MCF-7 pada perlakuan FNB terlihat perubahan morfologi maupun kerapatan sel. Pada konsentrasi 62.5 µg/ml memberikan gambaran morfologi sel dengan kerapatan yang tinggi, sedangkan pada konsentrasi 500 µg/ml menunjukkan kerapatan sel yang

lebih rendah dan mengalami pengkerutan sel, mengapung dan ukuran sel menjadi lebih kecil (Gambar 4).



Gambar 4. Gambaran morfologi sel MCF-7 di bawah mikroskop inverted setelah diberi perlakuan dengan sampel FNB (a) Kontrol sel (b) FNB 62.5 µg/ml (c) 125 µg/ml (d) 250 µg/ml (e) 500 µg/ml; perbesaran 100x; panah merah (→) menunjukkan perubahan morfologi.

3.6 Molekular *Docking*

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan secara *in silico* dengan molekuler *docking* menggunakan aplikasi Autodock Vina. Setiap senyawa uji akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda-beda sehingga dipilih konformasi dengan nilai RMSD <2 Å.

Tabel 5. Skor Docking Ageratokromen terhadap Protein Target HER-2

No.	Nama Senyawa	Nilai RMSD (<2.00 Å)	Skor Docking (kcal/mol)	Konformasi
1.	Ageratokromen	1.818 Å	-6.2	Konformasi ke-8
2.	<i>Native Ligand</i>	1.795 Å	-6.8	Konformasi ke-5
3.	<i>Native Ligand</i>	1.896 Å	-6.6	Konformasi ke-2
4.	Doxorubicin	1.572 Å	-6.9	Konformasi ke-2

Senyawa Ageratokromen dipilih konformasi yang ke-8 dengan nilai RMSD 1.818 Å dan skor *docking* -6.2 kcal/mol. Ligan asli (*Native Ligand*) memiliki nilai RMSD 1.795 Å dan 1.896 Å dan memiliki nilai skor *docking* -6.8 dan -6.6 kcal/mol masing-masing pada konformasi ke-5 dan ke-2, lebih rendah dari senyawa Ageratokromen. Doxorubicin memiliki nilai RMSD 1.572 Å dengan skor *docking* -6.9 kcal/mol pada konformasi ke-2, lebih rendah dari senyawa Ageratokromen dan lebih rendah dari ligan asli sehingga kestabilan interaksi senyawa Ageratokromen tidak lebih baik dari Doxorubicin dan ligan asli terhadap protein HER-2.

4. Pembahasan

Ekstrak kental etanolik herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang didapatkan adalah sebanyak 8.82 L. Ekstrak etanolik yang digunakan untuk fraksinasi cair-cair hanya sebanyak 1,1 L. Fraksinasi cair-cair dilakukan untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar dengan senyawa yang bersifat nonpolar. Ketika proses fraksinasi, fraksi etanolik herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) berada pada lapisan bawah, sedangkan fraksi n-heksan herba bandotan (FNB) berada pada lapisan atas karena pelarut etanol memiliki massa jenis yang lebih besar. Ekstrak n-heksan bandotan menghasilkan rendemen 1,103 %. Hasil ini sesuai dengan teori, *Ageratum conyzoides L* mengandung lebih banyak senyawa polar daripada senyawa nonpolar (Okunade, 2002) senyawa polar akan banyak terlarut dalam ekstrak etanol

(*Polarity index* : 5.2) dibandingkan pelarut n-heksan dengan kepolaran yang lebih rendah (*Polarity index* : 0) (Torres, *et al.*, 2011).

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Gandjar dan Abdul Rohman, 2012). Fase gerak yang digunakan adalah kloroform yang menghasilkan pemisahan yang terbaik tanpa *tailing* setelah dilakukan uji dengan beberapa fase gerak dan fase diam yang digunakan adalah Silika Gel F₂₅₄. Berdasarkan hasil tersebut bercak pada nomor 1, 2, 7, 8, 9 dan 10 dengan Rf masing-masing 0,2, 0,28, 0,8, 0,84, dan 0,88 diduga fraksi n-heksan Bandotan mengandung senyawa alkaloid hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (2008). Alkaloid adalah senyawa yang tersusun dari atom nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam dan memiliki aktivitas sebagai antikanker (Marliana, *et al.*, 2004). Bercak nomor 2, 3, 4, 5, 7, 8 dan 10 tidak terlihat pada sinar tampak. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa fraksi n-heksan Bandotan memiliki kandungan steroid yang dapat dilihat pada nilai Rf 0,68 dengan warna kromatogram ungu muda dibawah pengamatan sinar UV 254 nm. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya bahwa *Ageratum conyzoides* L. mengandung senyawa steroid (Hayati, *et al.*, 2013).

Terdapat sekitar 20.000 reseptor HER-2 pada payudara normal dan pada permukaan sel kanker payudara reseptor HER-2 dapat berlipat ganda menjadi 1,5 juta reseptor (Nahta, *et al.*, 2006), ekspresi gen HER-2 yang meningkat menyebabkan peningkatan pula pada metastasis, proliferasi dan sel

payudara akan terinduksi angiogenesis. Reseptor HER-2 mampu membentuk heterodimer yang merupakan kombinasi antara reseptor HER-2 dengan berbagai reseptor lainnya maka terbentuk kompleks reseptor heterodimer dan sinyal *Growth Factor* akan dikirimkan ke bagian intraseluler melewati membrane sel dari nukleus dan gen HER-2 akan teraktivasi (Brennan, *et al.*, 2000). Reseptor HER-2 dipreparasi dengan Ageratokromen. Hasil validasi dengan *Autodock Vina* menunjukkan bahwa protokol *docking* Ageratokromen, doxorubicin dan ligan asli dapat diterima dengan nilai RMSD $<2 \text{ \AA}$. RMSD adalah nilai penyimpangan antara suatu konformasi ligan dengan pembandingnya, yaitu apabila penyimpangannya terlalu besar maka semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi ligand dan protein (Korb, *et al.*, 2006). Hasil molekuler *docking* menunjukkan bahwa *score docking* yang diperoleh yaitu Ageratokromen (-6.2 kcal/mol) lebih tinggi daripada pembandingnya doxorubicin (-6.9 kcal/mol) maupun ligan asli HER-2 dengan masing-masing -6.6 dan -6.8 kcal/mol membuktikan bahwa kestabilan ikatan ageratokromen dengan HER-2 tidak lebih baik daripada pembandingnya doxorubicin maupun ligan asli (Sanders, *et al.*, 2010). Hal ini dapat dikatakan bahwa energi yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan HER-2 lebih besar sehingga ikatan yang terbentuk kurang stabil dibandingkan dengan doxorubicin atau ligan asli. Peran Protein HER-2 pada proses proliferasi sel menggunakan jalur *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase* (P13K), Jalur *Kinase/Signal Transduction Activator transcription* (Jak/Stat) dan *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), diketahui ageratokromen dapat menghambat P13 kinase. Pada

proses proliferasi sel protein HER-2 melalui protein Raf terlibat dan melewati berbagai jalur sinyal terinduksi. Ageratokromen dapat merusak atau mendegradasi protein HER-2 dengan mekanisme yang masih belum diketahui, sehingga proliferasi sel dapat dihambat. Protein HER-2 dapat mengaktifkan protein Ras, Raf, MAPK, selanjutnya terjadi peningkatan proliferasi sel dengan mengaktifkan faktor transkripsi. Proses proliferasi tidak berlanjut ke nukleus dikarenakan terjadi penurunan aktivitas protein Ras, Raf dan MAPK yang disebabkan oleh kerusakan pada protein HER-2 oleh ageratokromen. Reseptor estrogen yang terdapat pada nukleus, sitoplasma dan membrane sel berjumlah sekitar 70% pada sel kanker payudara. Reseptor estrogen positif berperan penting dalam proliferasi sel pada kanker payudara (Chen, 2008).

Jenis ikatan yang terbentuk antara asam amino dan senyawa uji antara lain adalah ikatan kovalen dan ikatan *Van Der Waals*, dimana ikatan kovalen lebih kuat daripada ikatan yang lainnya. Selain itu, ikatan kovalen adalah satu-satunya ikatan yang *irreversible* sehingga memberikan kontribusi terbesar dalam penurunan energi afinitas ikatan dibandingkan ikatan hidrogen dan *Van Der Waals* (Patrick, 2001). Ikatan kovalen cenderung terbentuk dari residu ionik, asam amino polar membentuk ikatan hidrogen, sedangkan asam amino aromatik dan hidrofobik biasanya membentuk ikatan *Van Der Waals*, sehingga ikatan dengan residu ionik memberikan kontribusi terbesar terhadap penurunan energi afinitas senyawa uji karena membentuk ikatan kovalen (Schneider, *et al.*, 2008). Berdasarkan nilai energi afinitas dan visualisasi

docking, maka senyawa Ageratokromen memiliki potensi ikatan yang lebih kuat dan stabil terhadap protein HER-2.

Daya antioksidan fraksi FNB dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan yang dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus % inhibisi. Suatu persamaan regresi linier didapat dari hubungan nilai % inhibisi dengan konsentrasi vitamin C dan fraksi FNB yang dihubungkan dan selanjutnya didapatkan nilai IC_{50} berupa sumbu x dengan cara memasukkan nilai 50 pada sumbu y kedalam persamaan regresi linier yang telah diperoleh. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai IC_{50} pada vitamin C sebesar 2,9 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai IC_{50} pada fraksi FNB adalah 493 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} yang terlalu besar atau daya antioksidan yang kecil diduga disebabkan karena senyawa flavonoid yang mengikat gugus samping yang dapat menghambat aktivitas antioksidan tidak terkandung pada fraksi n-heksan, sehingga flavonoid tidak dapat menyumbangkan hidrogen dan elektron kepada DPPH (Harborne, 1987; Budilaksono *et al.*, 2014). Walaupun, nilai IC_{50} dari ketiga fraksi masuk ke dalam katagori lemah jika dilihat dari tingkat aktivitas antioksidan menurut Ariyanto (2006) ($>150 \mu\text{g/mL}$), namun nilai IC_{50} 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan masih berpotensi sebagai antioksidan (Molyneux, 2004; Pranata, 2013).

Hasil penelitian uji sitotoksik tunggal menunjukkan bahwa FNB memiliki potensi yang rendah dalam menghambat viabilitas sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} 306 $\mu\text{g/ml}$ lebih tinggi dibandingkan dengan

IC₅₀ obat kanker pembandingnya yaitu doxorubicin dengan IC₅₀ 145 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam FNB memiliki potensi yang cukup toksik sebagai agen kemopreventif dengan nilai IC₅₀ >100 µg/ml. Hal ini menunjukkan keterkaitan dengan hasil *docking* molekuler bahwa senyawa yang terkandung dalam FNB memiliki potensi yang lemah sebagai agen kemopreventif dibandingkan dengan doxorubicin. Pengamatan hasil uji tunggal viabilitas sel MCF-7 setelah diberi perlakuan dengan FNB dilakukan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui perubahan morfologi sel MCF-7 sebelum dan setelah diberi perlakuan. Pengamatan sel yang di uji dengan FNB pada kadar yang terendah 62.5 µg/ml menunjukkan terjadinya perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk dari sel yang cenderung sedikit lonjong, berwarna abu-abu dan ada batas yang jelas antara inti sel dan cairan sel menjadi berbentuk bulat atau tidak beraturan (pengecilan ukuran sel), berwarna lebih terang dan inti selnya tidak terlihat. Perubahan morfologi sel diperkirakan terkait dengan mekanisme bahan yang diujikan. Senyawa Ageratokromen memiliki aktivitas antikanker yang tinggi pula melalui uji in vitro terhadap *Ageratum conyzoides* (Nataru, *et al.*, 2014).

5. Kesimpulan

Berdasarkan uji KLT Fraksi n-heksan bandotan mengandung senyawa golongan alkaloid. Aktivitas antioksidan Fraksi N-heksan bandotan memiliki potensi lemah dengan IC₅₀ 493 µg/ml. Aktivitas sitotoksik Fraksi N-heksan bandotan terhadap sel kanker payudara MCF-7 memiliki potensi yang lemah dengan IC₅₀ 306 µg/ml. Senyawa ageratokromen memiliki potensi dalam

menghambat ekspresi protein HER-2 melalui *molecular docking* dengan *score docking* -6.2 kcal/mol.

6. Saran

Perlu dilakukan uji aktivitas sitotoksik fraksi lain maupun isolasi senyawa berkhasiat herba bandotan untuk mendapatkan fraksi maupun isolat dengan efektivitas yang lebih baik dari FNB terhadap sel kanker payudara MCF-7. Uji pendahuluan dengan KLT dapat dilanjutkan dengan HPLC atau KLT-densitometri untuk mengetahui kadar masing-masing senyawa maupun golongan senyawa dalam FNB.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LP3M Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Kemenristek DIKTI.

Daftar Pustaka

- Brennan PJ, Kumogami T, Berezov A, Murali R, Greene MI., 2000, *HER2/Neu : Mechanisms of Dimerization or Oligomerization*. United State. EBSCO Information Service.
- Budilaksono, W., Wahdaningsih S., & Fahrurroji, A., 2014, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Iemarierei Britton* dan *Rose*) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN.*, 1 (1).
- Chen C, Chen G and Chen W., 2008, Molecular Simulation of Her2/neu Degradation by Inhibiting HSP. *Journal of Chemical Society*, 137(40), 12760-12763.
- Departemen Farmakologi dan Terapi., 2008, *Farmakologi dan Terapi Edisi V*. Jakarta. Fakultas Kedokteran UI.
- Gandjar, I.G. & Abdul Rohman., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta, Pustaka Pelajar.
- Harbone, J.B., 1997, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Ketiga*. Penerjemah: Padmawinata K, Soediro I. Bandung. ITB.
- Hayati, Nur., Berlianti, Nindha Ayu., 2013, Peningkatan aktivitas dan Hasil Belajar Mahasiswa Universitas Hasyim Asy'ari Melalui Pembelajaran

- Discovery Terbimbing, Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*, 2(3), 206-214.
- Korb, O., Stutzle, T., Exner, T.E., 2006, *PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Marliana, S.D.; Suryanti, V. dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS. *Jurnal Biofarmasi* 3 (1): 26-31 ISSN: 1693-2242.
- Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Sci Technol.*, 26 (2), 211-219.
- Nahta R, Estefa F., 2006, HER2 Therapy: Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance. Texas. *Journal Med Plant Res*, 121(32), 17505-17513.
- Nataru, S., Pulicheria, Y., Gaddala, B., 2014, A review on Medical Plant as a Potential Source for Cancer, *Int. Journal Pharm. Sci. Rev. Res.*, 26(1), 235-248.
- NCI., 2012. *Breast Cancer*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast.html> diakses pada 10 Mei 2016.
- Okunade, Al., 2002, *Review Ageratum conyzoides L. (Asteraceae)*. Washington DC. Fitoterapia.
- Patrick, G., 2001, *Instant Notes in Medical Chemistry*. Oxford: BIOS scientific Publisher.
- Pranata, R., 2013, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Kulit Buah Naga Merah (*Hylocecerus Lemairei Britton* dan *Rose*) Menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *Skripsi*, Universitas Tanjungpura, Pontianak.
- Rahmawati, Kadek., Kurnijasanti, R., Hamid, IS., 2008, Efek Sitotoksik In Vitro dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap Kultur Sel Kanker Meloma, *Journal Penelit. Med. Eksakta.*, 7(1), 48-54.
- Sanders, C.R., 2010, Biomolecular Ligand-Receptor Binding Studies: *Theory, Practice, and Analysis* dari web http://structbio.vanderbilt.edu/sanders/Binding_Principles_2010.pdf di akses tanggal 18 Juni 2017 pukul 00.10 WIB.
- Schneider, G., & Baringhaus, K.-H., 2008, *Molecular Design: Concepts and Applications*. Germany. WILEY-VCH.
- Torres, Luis.G., Velasquez, Angelica., Marco A., Brito, Arias., 2011, Ca-alginate spheres behavior in presence of some solvents and water-solvent mixtures. Mexico. *Inj Advance in Bioscience and Biotechnology*, 2(1), 8-12.
- Wijayakusuma, H., Dalimartha, S., 1994, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia, Jilid II*, Jakarta, Pustaka Kartini.