

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi merupakan bagian dari identifikasi suatu tanaman. Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel dalam penelitian sesuai dengan yang diharapkan agar kesalahan pengambilan sampel dapat dihindarkan. Dari determinasi yang dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Unit II Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, dinyatakan bahwa sampel penelitian adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) (lampiran 3).

2. Ekstraksi

Buah mengkudu yang digunakan untuk penelitian dipanen dari pohon di sekitar LPPT Unit III Universitas Gadjah Mada, Bulak Sumur, Sleman. Buah yang terkumpul dicuci dan disortir untuk mengelompokkan buah yang akan digunakan. Buah yang dipilih adalah buah segar dan berwarna kuning namun teksturnya masih keras serta baunya belum menyengat. Sebanyak 10 kg buah mengkudu di potong tipis tanpa menghilangkan kulitnya kemudian dikeringkan. Pengerinan bertujuan mengurangi kadar air sehingga tidak mudah ditumbuhi jamur, dapat bertahan lama dan komposisi komponen kimia yang terkandung di dalamnya tidak mengalami perubahan (Halimah, 2010). Pengerinan dilakukan secara alami dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam bertujuan untuk menghindari kontak langsung dengan pancaran gelombang ultra violet karena

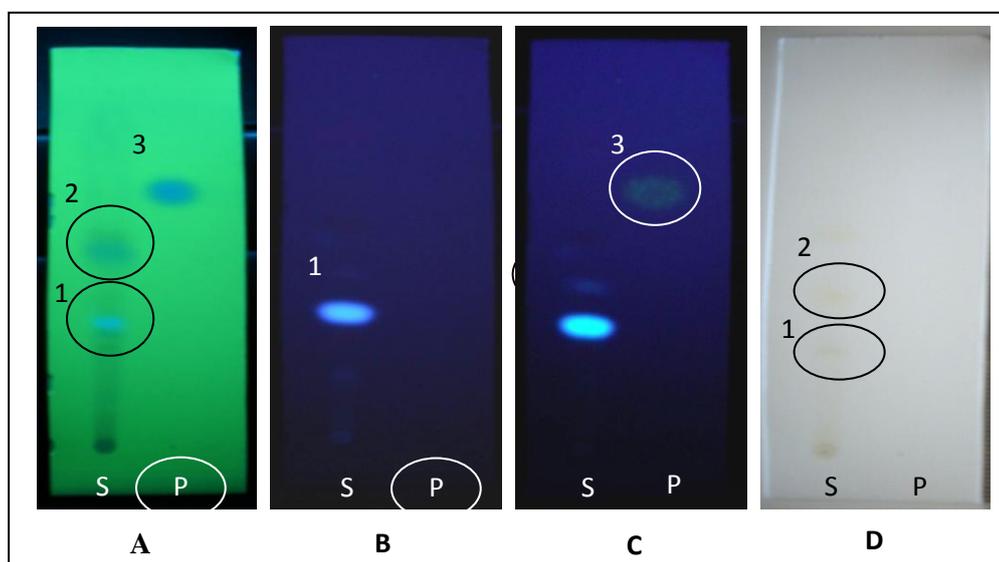
dapat menurunkan kualitas simplisia. Simplisia kering seberat 95,6 kg kemudian diserbukkan untuk memudahkan penyari menembus ke dalam sel, sehingga ekstraksi lebih sempurna. Serbuk yang diperoleh seberat 88,63 g siap dilakukan ekstraksi.

Ekstraksi adalah proses pemisahan kandungan senyawa dari suatu bahan dengan penyari yang sesuai. Penyari yang digunakan adalah etil asetat dengan perbandingan 1:10. Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang mudah menguap, tidak beracun dan tidak higroskopis. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian adalah maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan merendam serbuk sampel dalam suatu penyari dan dalam jangka waktu tertentu (Medicafarma, 2006). Penyari etil asetat akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel sehingga kandungan sel akan larut dalam penyari karena adanya proses difusi dimana terjadi perbedaan dosis antara larutan di dalam sel yang tinggi dengan di luar sel yang rendah sampai terjadi keseimbangan (Medicafarma, 2006). Maserasi dilakukan selama 5 hari, kemudian dilanjutkan remaserasi selama 2 hari. Maserat yang didapat kemudian dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Hasilnya berupa ekstrak etil asetat buah mengkudu sebanyak 16,6 g.

3. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk uji pendahuluan identifikasi kandungan senyawa suatu tanaman, dalam penelitian ini senyawa yang dituju adalah golongan kumarin. Sampel dan pembanding ditotolkan pada plat silika GF₂₅₄. Plat tersebut dimasukkan secara vertikal dalam bejana yang berisi eluen

yaitu heksan:etil asetat (93:7) dan ditunggu hingga eluen telah mencapai batas atas plat KLT. Kemudian plat disemprot dengan KOH etanolik. Pereaksi tersebut akan bekerja membuat suasana alkali sehingga dapat digunakan sebagai pendeteksi senyawa golongan kumarin (Machek, 1972). KOH merupakan pereaksi yang tidak spesifik. Selain kumarin, senyawa antraquinon dan antron dapat juga dideteksi dengan KOH. Pewarnaan merah menunjukkan senyawa antraquinon sedangkan pewarnaan kuning muncul jika terdeteksi senyawa antron (Wagner, *et al.*, 1984). Hasilnya diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Sinar UV 254 digunakan untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap sedangkan sinar UV 366 digunakan untuk menampakkan bercak yang berfluoresensi sehingga pada pengamatan terlihat bercak berpendar (memancarkan cahaya) (Laras, 2009).



Gambar 1. Profil KLT setelah penotolan ekstrak dan pembanding pada penyinaran UV 254 (A), UV 366 (B), UV 366 setelah disemprot KOH etanolik (C) dan sinar tampak (D). Sampel tampak berfluoresensi biru pada UV 254 dan UV 366. Keterangan : S: ekstrak, P: pembanding

Tabel 1. Harga *Rf* pada plat KLT

No. Spot	Harga <i>Rf</i>	Tampak	UV 254	UV 366
1	0,44	Coklat	Biru	Biru
2	0,75	Coklat	Biru	-
3	0,87	-	Biru	Hijau

Pengamatan pada sinar tampak bercak sampel terlihat berwarna coklat, sedangkan pembanding tak terlihat. Pengamatan pada sinar UV 254 bercak terlihat berwarna biru baik sampel maupun pembanding, sedangkan pada sinar UV 366 bercak sampel berfluoresensi biru terang. Suatu tanaman dikatakan mengandung kumarin ditandai dengan fluoresensi biru terang (Feigl, 1960). Machek (1972) menyatakan bila kumarin dibuat alkalis maka cincin lakton akan terbuka dan terbentuk anion asam kumarinat kemudian terjadi siklisasi menjadi lakton. Dengan adanya sinar UV, maka anion asam kumarinat akan mengalami isomerisasi menjadi bentuk trans yaitu anion asam-o-kumarat. Dengan adanya anion asam-o-kumarat, bercak terlihat berfluoresensi hijau, hijau biru, kuning atau coklat di bawah sinar UV 366. Berdasarkan hasil tersebut, terlihat sampel berpendar biru maka dapat dinyatakan bahwa golongan kumarin diduga terkandung dalam buah mengkudu dengan harga *Rf* 0,44.

4. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan untuk menentukan aktivitas toksik pada suatu sel kanker dalam hal ini dilakukan pada sel MCF-7 agar dapat diketahui potensi penghambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan EEtM dan Dox. Metode yang digunakan adalah *Microtetrazolium* (MTT) dimana metode ini menggunakan prinsip kolorimetri dengan mengukur aktivitas *dehidrogenase* mitokondria pada

sel-sel hidup yang memiliki kemampuan untuk mengkonversi MTT menjadi kristal formazan dan tidak larut air. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang didasarkan pada pemecahan formazan yang berwarna biru keunguan (Basmal, *et al.*, 2009). Jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (Junaedi, *et al.*, 2008)

a. Uji Sitotoksik Tunggal

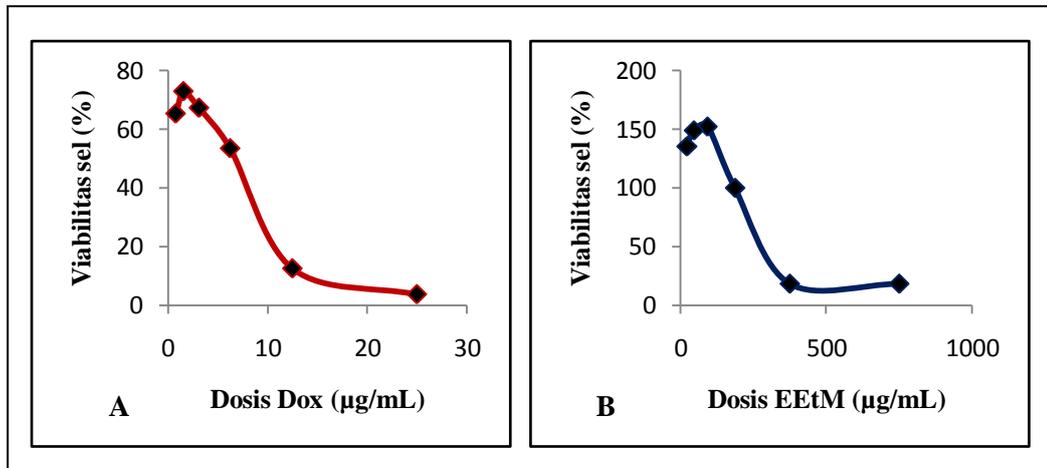
IC₅₀ merupakan parameter dari perlakuan tunggal berbagai dosis pada uji sitotoksik dimana nilainya berdasarkan penghambatan 50% pertumbuhan sel.

Tabel 2. Persen hidup sel MCF-7 dengan perlakuan EEtM

Rata-rata Absorbansi Kontrol		Dosis (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Persamaan
Sel	Media				
0,339	0,066	750	0,116 ± 0,003	18,314	y = - 0,199x + 144,6 r = 0,887 IC ₅₀ 475 µg/ml
		375	0,116 ± 0,009	18,437	
		187,5	0,339 ± 0,064	99,877	
		93,75	0,482 ± 0,055	152,258	
		46,88	0,472 ± 0,020	148,717	
		23,44	0,436 ± 0,032	135,409	

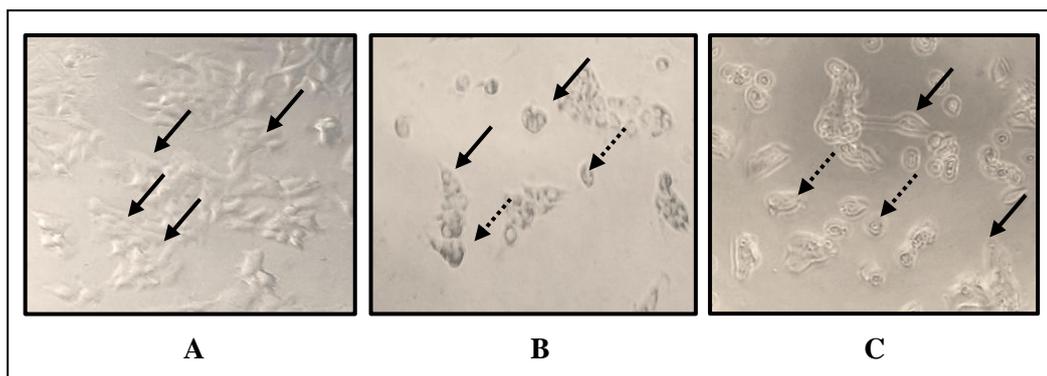
Tabel 3. Persen hidup sel MCF-7 dengan perlakuan Dox

Rata-rata Absorbansi Kontrol		Dosis (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Persamaan
Sel	Media				
0,339	0,066	25	0,076 ± 0,006	3,663	y = - 3,021x + 70,55 r = 0,933 IC ₅₀ 6,8 µg/ml
		12,5	0,100 ± 0,003	12,454	
		6,25	0,212 ± 0,017	53,357	
		3,125	0,249 ± 0,024	67,155	
		1,563	0,265 ± 0,004	73	
		0,782	0,244 ± 0,016	65,201	



Gambar 2. Efek perlakuan Dox (A) dan EEtM (B) tunggal terhadap viabilitas sel MCF-7. EEtM dan Dox diperlakukan terhadap sel MCF-7 dengan berbagai seri dosis. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO₂, bersuhu 37⁰C. Perhitungan jumlah sel hidup didasarkan pada metode MTT

Nilai IC₅₀ merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto, 2003). Dox dan EEtM menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7. Dox menurunkan viabilitas sel dengan nilai IC₅₀ sebesar 6,8 µg/mL sedangkan EEtM sebesar 475 µg/mL (**gambar 8**).



Gambar 3. Morfologi sel MCF-7 tanpa perlakuan (A), dengan perlakuan EEtM 750 µg/mL (B) dan Dox 6,25 µg/mL (C). Sel hidup tampak berbentuk daun sedangkan sel mati berbentuk bulat, keruh dan mengapung. Tampak pada perlakuan dengan EEtM dan Dox ditemukan sel mati.

Keterangan :Sel hidup → dan sel mati→

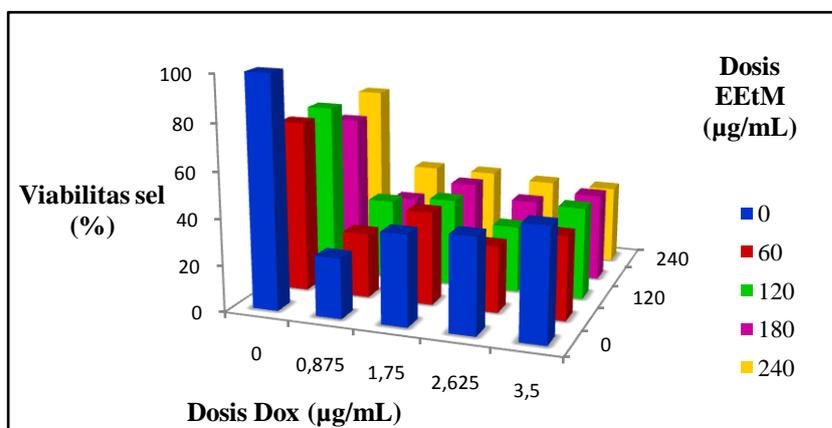
Aktivitas masing-masing sampel bersifat *dose dependent* artinya semakin tinggi dosis yang diberikan maka viabilitas sel semakin menurun. Ditunjukkan dengan gambar morfologi sel pada dosis tertinggi EEtM 750 $\mu\text{g/mL}$ banyak sel yang menyusut dari bentuk semula. Sel MCF-7 hidup tampak berbentuk daun dan tetap mengapung pada dasar sumuran (Meiyanto, *et al.*, 2011), sedangkan sel mati akan berbentuk bulat yang menandakan sel kehilangan permeabilitasnya, begitu juga dengan Dox pada dosis 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

b. Uji Sitotoksik Kombinasi

Parameter pada uji kombinasi adalah CI (*Combination Index*). Analisis CI menggambarkan efikasi kombinasi secara kuantitatif. CI digunakan untuk menentukan efek yang diberikan dua kombinasi senyawa dapat berupa efek sinergis, adiktif atau antagonis (CCRC, 2009).

Tabel 4. Persen hidup sel MCF-7 dengan perlakuan EEtM-Dox

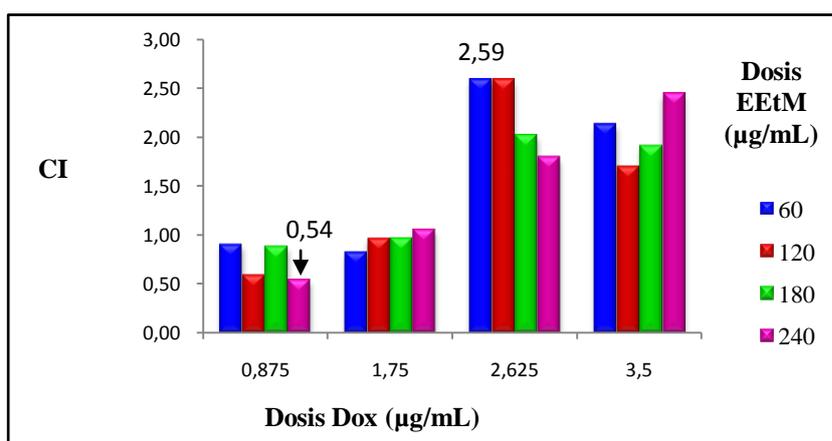
		<i>Doxorubicin</i> ($\mu\text{g/mL}$)				
		0	0,875	1,75	2,625	3,5
EEtM ($\mu\text{g/mL}$)	0	100	25,98	39,11	41,25	48,52
	60	74,02	28,12	40,32	28,77	36,22
	120	74,95	34,92	37,99	28,86	39,94
	180	63,87	28,58	38,08	32,68	38,08
	240	71,97	36,87	36,78	34,64	34,26



Gambar 4. Profil viabilitas sel MCF-7 dengan perlakuan kombinasi EEtM-Dox pada berbagai seri dosis. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO₂, bersuhu 37⁰C. Perhitungan jumlah sel hidup didasarkan pada metode MTT.

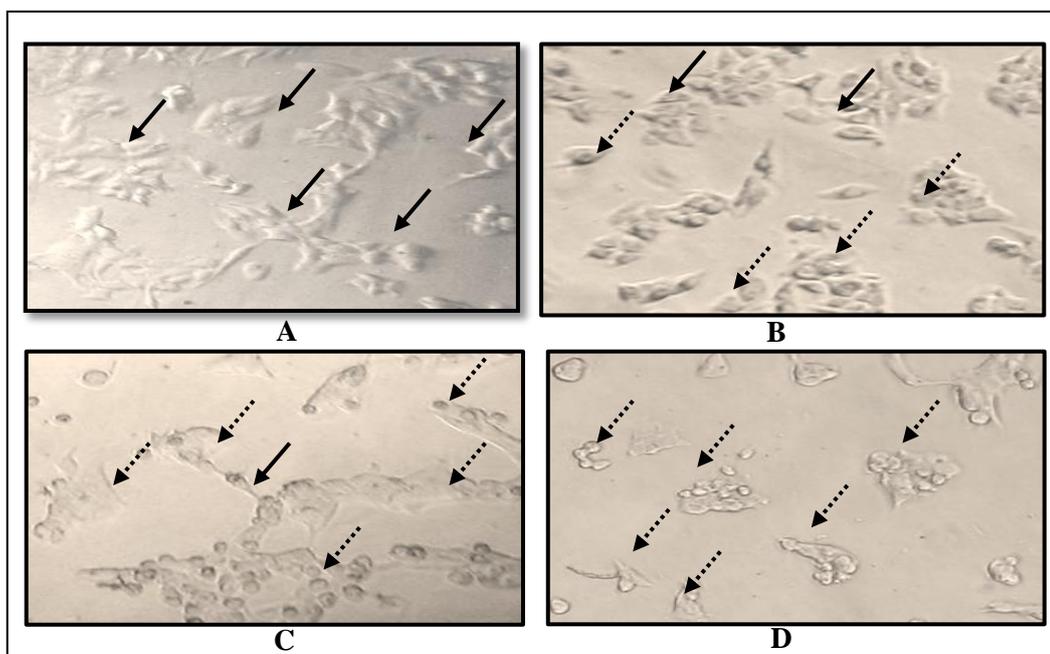
Tabel 5. Harga indeks kombinasi perlakuan EEtM-Dox

		<i>Doxorubicin (µg/mL)</i>			
		0,875	1,75	2,625	3,5
EEtM (µg/mL)	60	0,90	0,83	2,59	2,13
	120	0,59	0,97	2,58	1,69
	180	0,88	0,97	2,02	1,91
	240	0,54	1,06	1,79	2,44



Gambar 5. Profil indeks kombinasi pada perlakuan EEtM-Dox dengan berbagai seri dosis pada sel MCF-7. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO₂, bersuhu 37⁰C. Perhitungan jumlah sel hidup didasarkan pada metode MTT.

Untuk mengetahui aktivitas EEtM sebagai ko-kemoterapi Dox pada sel MCF-7 maka diberikan perlakuan kombinasi dengan dosis $1/2$, $3/8$, $1/4$, $1/8$ IC_{50} . Dikatakan memiliki aktivitas sinergis apabila nilai CI dibawah 0,9, sedangkan nilai 0,9-1,1 memiliki aktivitas adiktif. Jika nilai menunjukkan diatas 1,1 maka senyawa tersebut memiliki aktivitas antagonis. Berdasarkan perhitungan, nilai CI terbaik berada pada kombinasi Dox $0,875 \mu\text{g/mL}$ dan EEtM $240 \mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar 0,54. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi memiliki efek sinergis pada dosis Dox $1/8$ IC_{50} ($0,875 \mu\text{g/mL}$) dan EEtM $1/2$ IC_{50} ($240 \mu\text{g/mL}$).



Gambar 6. Morfologi sel MCF-7 tanpa perlakuan (A), dengan perlakuan EEtM $240 \mu\text{g/mL}$ (B), Dox $0,875 \mu\text{g/mL}$ (C) dan kombinasi (D). Sel hidup tampak berbentuk daun sedangkan sel mati berbentuk bulat, keruh dan mengapung. Tampak pada perlakuan kombinasi EEtM-Dox ditemukan sel mati yang lebih banyak dibanding pada perlakuan tunggal.

Keterangan: **Sel hidup** \longrightarrow dan **sel mati** $\cdots\cdots\rightarrow$

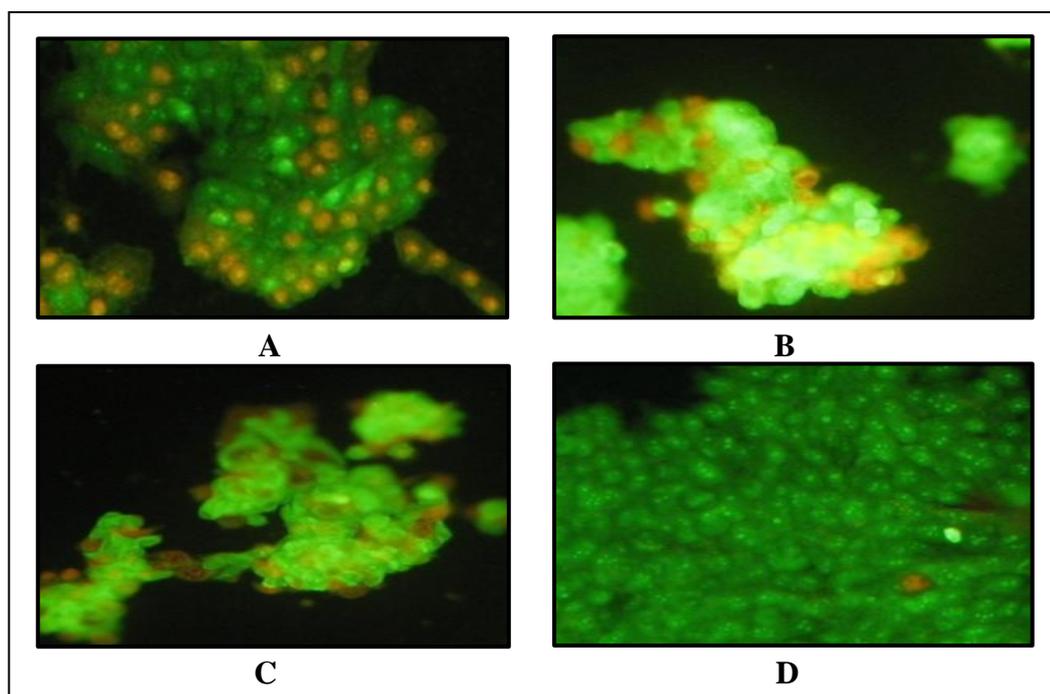
Pembuktian dilakukan dengan melihat hasil foto sel perbandingan antara kontrol sel, EEtM dan Dox tunggal serta kombinasi. Sel MCF-7 yang masih hidup

dapat dilihat pada kontrol sel memiliki bentuk runcing seperti daun dan mengapung di dasar sumuran (Meiyanto, *et al.*, 2011). Pada perlakuan EEtM 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ telah terdapat sel yang mati ditunjukkan dengan perubahan bentuk menjadi bulat dan tak beraturan. Perubahan bentuk sel juga terjadi pada perlakuan Dox 0,875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ namun sel yang mati lebih banyak dari ekstrak, kombinasi keduanya membuat sel yang mati bertambah banyak jika dibandingkan dengan perlakuan tunggal EEtM dan Dox.

5. Uji Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram dan penting dalam berbagai proses biologis, termasuk kontribusinya dalam penghilangan sel pada organisme dewasa (Wu, *et al.*, 2009). Pengujian dilakukan dengan metode *double staining* dimana sel dicat menggunakan akridin oranye dan etidium bromida. Sel yang mati akan ditunjukkan dengan fluoresensi merah sedangkan sel yang hidup akan berfluoresensi hijau.

Pada sel MCF-7, perlakuan EEtM dosis 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ memperlihatkan sel yang berfluoresensi merah seragam namun masih utuh berbentuk daun seperti pada kontrol sel, diduga sel belum terapoptosis secara sempurna. Sedangkan pada Dox 0,875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ jumlah sel yang berwarna merah terlihat sedikit dan tidak dominan. Pada saat perlakuan kombinasi, sel yang tampak merah lebih dominan dibanding perlakuan tunggal dan sudah berbentuk tak beraturan seperti kontrol sel lagi. Hal ini menunjukkan kemampuan EEtM dosis 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ meningkatkan sensitivitas sel sehingga pemacuan apoptosis oleh Dox dapat diperkuat.

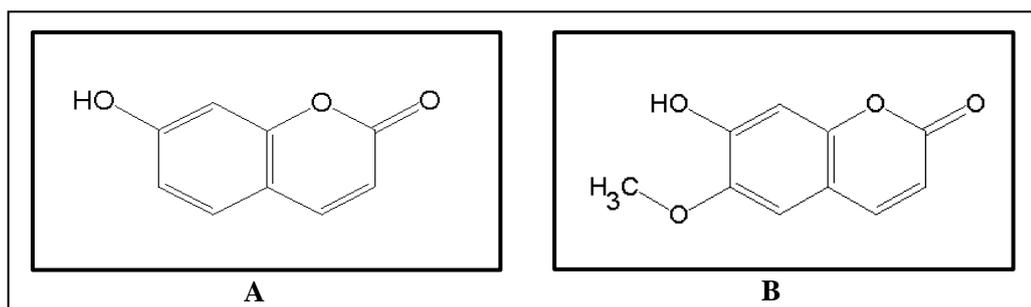


Gambar 7. Pemacuan apoptosis sel MCF-7 dengan perlakuan EEtM 240 $\mu\text{g/mL}$ (A), Dox 0,875 $\mu\text{g/mL}$ (B), Kombinasi (C) dan kontrol sel (D) setelah pengecatan dengan menggunakan *double staining* (akridin oranye dan etidium bromida). Pengamatan di bawah mikroskop fluoresen. Sel hidup berbentuk daun dengan warna hijau yang seragam, sedangkan sel apoptosis memiliki bentuk yang tidak teratur dengan warna merah yang tidak seragam. Pada perlakuan tampak sel mati karena apoptosis.

1. *Molecular Docking*

Molecular docking adalah metode komputasi yang bertujuan meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji *in-vitro* (Motiejunas dan Wade, 2006). Protein target pada penelitian ini adalah ER α dan Bcl-xl yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan kode 3ERT (*4-Hydroxytamoxifen*) untuk ER α dan 4FC (*4'-Fluoro-1,1'-Biphenyl-4-Carboxylic acid*) untuk kode Bcl-xl. Senyawa yang digunakan terkandung dalam EEtM yang diduga dapat menghambat ekspresi berlebihan dari protein tersebut adalah senyawa skopoletin dan umbeliferon yang keduanya merupakan senyawa turunan

kumarin. Pembandingnya adalah obat Dox. Senyawa yang telah diunduh dari situs RCSB PDB ditampilkan dalam jendela YASARA. Senyawa air harus dihilangkan agar dapat dipastikan yang berinteraksi adalah senyawa uji dan senyawa target, lalu dilakukan protonasi 3 dimensi untuk menambahkan muatan atom dan hidrogen pada senyawa. Data akan disimpan dalam file format mol2.

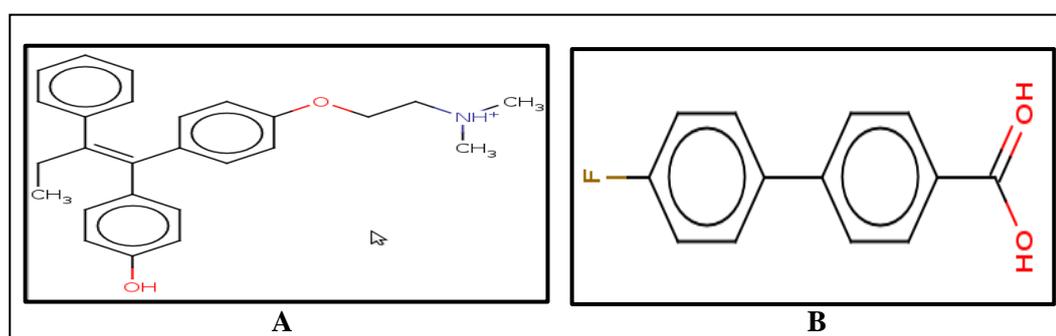


Gambar 8. Struktur 2D Skopoletin (A) dan Umbeliferon (B)

Senyawa yang akan diuji dipreparasi dengan membuat struktur 2 dimensi menggunakan *marvinsketch*. Kemudian dilakukan protonasi 3 dimensi untuk menambahkan muatan atom dan hidrogen pada senyawa uji dan dilakukan pencarian konformasi senyawa. Syarat suatu senyawa dapat dilakukan *docking* adalah senyawa tersebut harus memiliki 10 konformasi, maka dari itu yang digunakan dalam penelitian ini adalah skopoletin dan umbeliferon karena senyawa kumarin hanya memiliki 1 konformasi. Model senyawa ini disimpan dalam file format mol2.

Validasi metode *docking* yang dilakukan dengan men-*docking native ligand* pada *binding site*. Sehingga didapatkan nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) sebesar 1,725 Å untuk ER α dan 0,311 Å untuk Bcl-xl. Ini berarti keduanya memiliki nilai validitas tinggi yang dibuktikan dengan nilai RMSD < 2

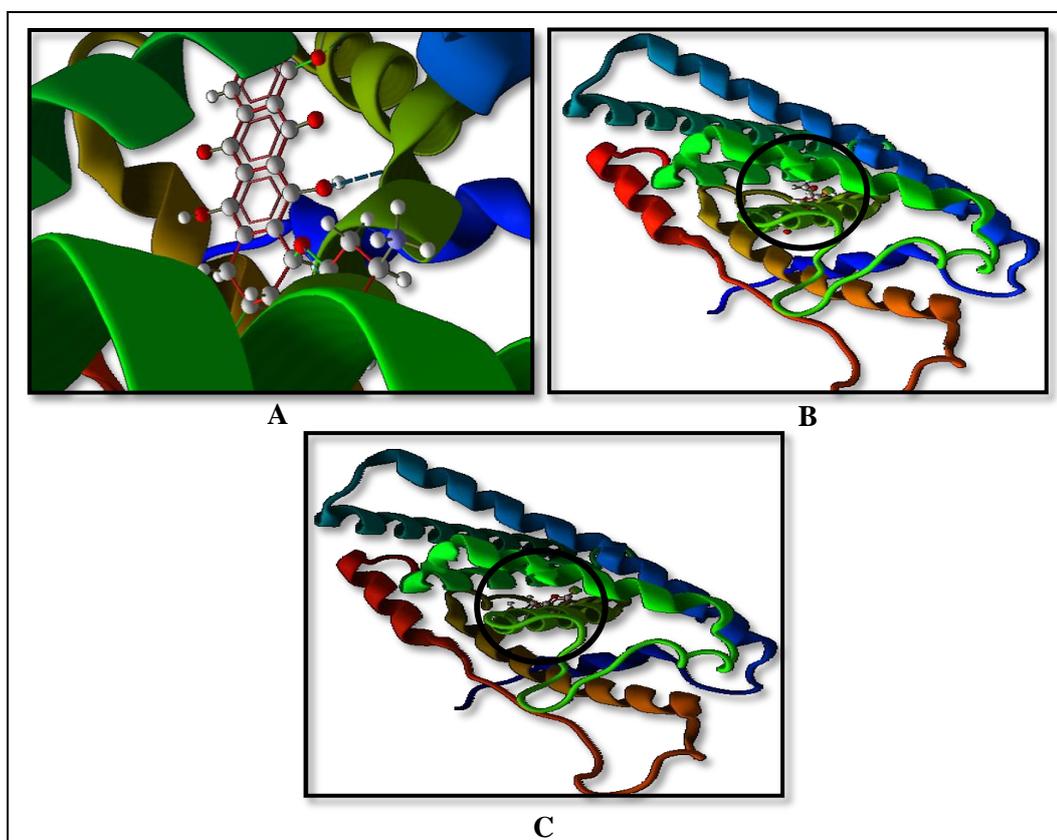
(Purnomo, 2011). Nilai tersebut menggambarkan posisi *ligand copy* yang mirip dengan *native ligand*. Molekul tersebut dianalisis *score docking* dimana molekul dengan nilai terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik. Visualisasi interaksinya menggunakan program MMV (*Molegro Molecular Viewer*). Analisis setelah *docking* dapat di bandingkan dengan *ligand uji* dan *native ligand* reseptor.



Gambar 9. Struktur *native ligand* ER α (3ERT) (A) dan Bcl-xl (4FC) (B)

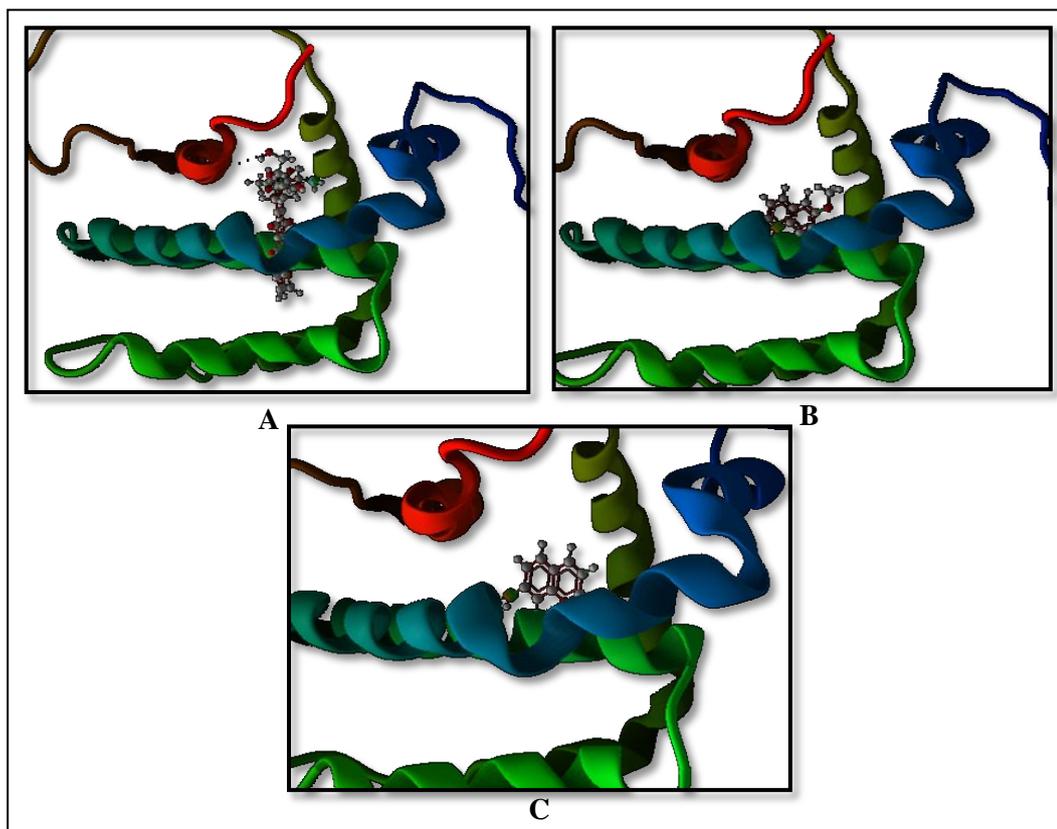
Tabel 6. *Score Molecular Docking*

	RSMD	Native Ligand	Energi Ikatan (kcal/mol)		
			Doxorubicin	Skopoletin	Umbeliferon
ERα	1,725 A	-104	-82,992	-59,385	-66,302
Protein terdekat			Met 388, Ala 382, Gly 390, Ile 386, Ser 456, Ile 389	Glu 385, Gly 390	Glu 385, Ile 514, Ile 386, Ile 389, Leu 387, Lys 449
Jarak terdekat			1,33A (Met 388)	1,33A (Glu 385)	1,60 A (Glu 385)
Bcl-xl	0,311 A	-83,615	-77,567	-73,858	-71,989
Protein terdekat			Leu 94, Val 145, Phe 148, Ser 149, Phe 150	Ser 149, Ile 144, Phe 148	Phe 148, Gly 152, Ser 149, Val 145
Jarak terdekat			0,10 A (Leu 94)	1,61 A (Ser 149)	1,80 A (Phe 148)



Gambar 10. Ikatan ER α dengan Dox (A), Skopoletin (B) dan Umbeliferon (C)

Dari ketiga sampel tersebut, Dox memiliki skor *docking* yang paling rendah. Ikatan antara Dox dan ER α menghasilkan skor *docking* yaitu -82,992, sedangkan umbeliferon sebesar -66,302 dan skopoletin -59,385 dengan ini menunjukkan bahwa umbeliferon memiliki energi ikatan yang mendekati Dox dalam mengikat ER α dan lebih berpotensi untuk menghambat perkembangan ER α dibandingkan skopoletin. Namun ikatan ER α dengan ligan aslinya lebih stabil dan kuat karena menghasilkan skor paling rendah dibandingkan ketiga sampel yaitu sebesar -104.



Gambar 11. Ikatan Bcl-xl dengan Dox (A), Skopoletin (B) dan Umbeliferon (C)

Pada ikatan dengan reseptor Bcl-xl, skopoletin memiliki skor yang lebih rendah daripada umbeliferon yaitu sebesar -73,858 dan -71,989. Sedangkan ikatan dengan Dox menghasilkan skor sebesar -77,567. Ikatan ligan asli dengan Bcl-xl dinyatakan lebih kuat karena menghasilkan skor yang paling kecil dibandingkan ketiga sampel yaitu sebesar -83,615. Meskipun belum mampu mengungguli nilai skor dari ligan asli, namun kedua senyawa turunan kumarin yang terkandung pada buah mengkudu tersebut memiliki afinitas yang mendekati Dox dalam menghambat reseptor proliferasi sel dan menyebabkan apoptosis sel.

B. Pembahasan

Penelitian ini membahas mengenai aktivitas senyawa golongan kumarin yang terkandung dalam EEtM sebagai agen ko-kemoterapi dengan Dox pada kanker payudara melalui *MTT assay* dan *double staining*. Dox adalah golongan antibiotik yang bekerja sitostatik termasuk dalam turunan antibiotik antrasiklin yang merupakan terapi adjuvant untuk kanker payudara. Dox merupakan agen kemoterapi yang aktif mengobati kanker payudara pada fase metastatik dan menghasilkan respon 50% sampai 60% sebelum memperoleh kemoterapi pada tahap metastatik (Dipiro, *et al.*, 2005). Meskipun demikian, efek samping Dox yang harus diwaspadai yaitu toksisitas jantung (Minotti, *et al.*, 2004) dan resiko resistensi membuatnya menjadi terbatas untuk digunakan (Meiyanto, *et al.*, 2008).

Salah satu pengatasan resiko resistensi yaitu dengan agen ko-kemoterapi. Agen ko-kemoterapi adalah senyawa kemoprevensi nontoksik dikombinasikan dengan agen kemoterapi untuk meningkatkan efikasi dengan menurunkan toksisitasnya terhadap jaringan normal (Jenie dan Meiyanto, 2009), biasanya diperoleh dari tumbuhan herbal. Senyawa yang dipilih adalah golongan kumarin yang terkandung dalam EEtM. Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktivitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, antikoagulan darah, antimikroba dan menunjukkan aktivitas menghambat efek karsinogen (Syarif, *et al.*, 2009). Pada pengujian kualitatif dengan metode KLT terdapat bercak yang diduga kumarin terkandung pada tanaman buah mengkudu dengan nilai *Rf* sebesar 0,44.

Pengujian juga dilakukan secara *in vitro* dengan metode MTT *assay* pada perlakuan tunggal dan kombinasi dengan Dox. Metode MTT dipilih karena lebih sensitif dibandingkan dengan metode sitotoksik lain (Fotakis dan Timbrell, 2006), berdasarkan prinsip perubahan suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi di mitokondria aktif menjadi formazan (Doyle dan Griffiths, 2000) mampu dideteksi dengan reagen MTT. EEtM perlakuan tunggal pada MCF-7 menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 475 $\mu\text{g/mL}$, penelitian sebelumnya pada uji sitotoksik dengan ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel MCF-7 mendapatkan nilai IC_{50} sebesar 1117 $\mu\text{g/ml}$ (Bintang, *et al.*, 2013) dan fraksi kloroform buah mengkudu pada sel MCF-7 sebesar 516 $\mu\text{g/ml}$ (Hapsari, *et al.*, 2014). Nilai yang diperoleh menunjukkan tingkat IC_{50} yang lebih baik dari sebelumnya karena terkait penggunaan pelarut atau formulasi sehingga senyawa yang dituju lebih spesifik meskipun masih memperlihatkan aktivitas sitotoksik yang lemah. Namun demikian, tidak menutup kemungkinan EEtM dapat dijadikan alternatif ko-kemoterapi. Sedangkan pada perlakuan tunggal Dox diperoleh IC_{50} sebesar 6,8 $\mu\text{g/mL}$ atau 11.724 nM, sel MCF-7 memiliki sifat kurang sensitif terhadap agen kemoterapi Dox. Hal ini ditunjukkan pada nilai IC_{50} yang relatif tinggi. Nilai tersebut jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan sel kanker yang sensitif terhadap Dox yaitu T47D yang memiliki IC_{50} sebesar 43 nM (Jenie and Meiyanto, 2006). Resistensi MCF-7 terhadap Dox kemungkinan diperantarai oleh peningkatan ekspresi Pgp yang memompa Dox keluar dari sel seperti halnya pada sel kanker lainnya (Gyorffy, *et al.*, 2008; Frank, *et al.*, 2005). Pgp kependekan dari *pleiotrophic* dan *glycoprotein* yang merupakan protein transport pada

membrane plasma dan bekerja memindahkan molekul obat keluar sel kanker melewati membrane plasma dengan membutuhkan energi dari hidrolisis ATP (*adenosine triphospat*). Maka dari itu diperlukan agen ko-kemoterapi untuk meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap Dox.

Penelitian dilanjutkan dengan uji kombinasi Dox-EEtM. Dosis yang digunakan dipilih berdasarkan nilai IC_{50} perlakuan tunggal yaitu 1/2, 3/8, 1/4, 1/8 IC_{50} sehingga Dox dan EEtM berturut turut dengan dosis 3,5 $\mu\text{g/mL}$, 2,625 $\mu\text{g/mL}$, 1,75 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,875 $\mu\text{g/mL}$ serta dosis 240 $\mu\text{g/mL}$, 180 $\mu\text{g/mL}$, 120 $\mu\text{g/mL}$ dan 60 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan bahwa dosis EEtM pada kombinasi berbanding terbalik dengan % viabilitas sel (**gambar 9**). Semakin besar dosis EEtM yang diberikan, semakin kecil % viabilitas sel. Ini artinya semakin tinggi dosis EEtM maka semakin kecil jumlah sel yang hidup. Hal tersebut juga berlaku pada nilai CI, semakin besar dosis EEtM dalam kombinasi maka semakin kecil nilai CInya (**gambar 10**). Tetapi pada kombinasi, efek EEtM lebih dominan ditunjukkan dengan meningkatnya viabilitas sel seiring dengan meningkatnya dosis Dox. Pada perbandingan kombinasi yang lebih besar justru menunjukkan aktivitas antagonis kemungkinan karena dengan peningkatan dosis keduanya juga berdampak pada peningkatan sifat saling menghambat. Nilai kombinasi (CI) yang terbaik pada kombinasi dengan dosis 0,875 $\mu\text{g/mL}$ dan 240 $\mu\text{g/mL}$ yaitu 0,54. Nilai CI kurang dari 0,9 menunjukkan sinergisme perlakuan kombinasi, sedangkan nilai 0,9-1,1 memiliki aktivitas adiktif. Jika nilai menunjukkan diatas 1,1 maka senyawa tersebut memiliki aktivitas antagonis. (Reynolds dan Maurer, 2005). Sinergis adalah aktivitas dimana efek dua sampel

yang diberikan bersama-sama hasilnya lebih toksik terhadap sel MCF-7 daripada jumlah efek kedua sampel tersebut, adiktif adalah efek dua sampel yang diberikan bersama-sama yang hasil akhirnya merupakan jumlah masing-masing sampel tersebut dan antagonis adalah efek dua sampel yang diberikan bersama-sama yang hasil akhirnya kurang dari jumlah efek kedua sampel tersebut. Kombinasi Dox-EEtM pada dosis tersebut menunjukkan aktivitas sinergis dalam meningkatkan kematian sel. Hal ini senada dengan penelitian yang dilakukan Andi (2009) yang mengungkapkan bahwa kombinasi ekstrak etanolik buah mengkudu dengan Dox bersifat sinergis. Kombinasi Dox-EEtM juga menyebabkan perubahan morfologi sel yang terlihat jelas dibandingkan dengan perlakuan tunggal (**gambar 11**) ditandai dengan jumlah sel menyusut dari bentuk aslinya yang semakin banyak pada perlakuan kombinasi.

Suatu senyawa dapat bersifat toksik pada sel kanker yang pada akhirnya menimbulkan kematian sel dengan beberapa mekanisme yang berbeda yaitu melalui efek antiproliferasi, inhibisi siklus sel, inhibisi angiogenesis, pengrusakan sel secara langsung yang menyebabkan nekrosis serta induksi apoptosis (Ren, *et al.*, 2003). Salah satu cara untuk menelusuri mekanismenya yaitu melalui pengujian apoptosis dengan metode *double staining*. *Double staining* adalah salah satu metode kolorimetri dengan akridin oranye dan etidium bromida yang akan berinteraksi pada nukleus sel diamati menggunakan mikroskop fluoresen. Berdasarkan hasil uji menunjukkan sel-sel yang diberi perlakuan dengan Dox-EEtM mengalami fluoresensi berwarna merah yang menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran sel. Dox-EEtM dapat menginduksi apoptosis lebih baik

daripada perlakuan tunggal dari masing–masing senyawa terlihat dari morfologi sel yang terfragmentasi (**gambar 12**). Hal ini mengindikasikan bahwa salah satu mekanisme Dox-EEtM dalam menyebabkan kematian sel kanker payudara MCF-7 adalah melalui induksi apoptosis. Proses kematian sel melalui apoptosis tidak menimbulkan respon inflamasi (Gewies, 2003) dan mengurangi efek samping pada pasien (Herbert, 2003). Pada umumnya penggunaan Dox pada kanker payudara memerlukan dosis tinggi dan menimbulkan efek samping seperti mual, muntah, kerontokan rambut, resiko resistensi serta ketoksikan pada jantung. Aktivitas sinergis dengan EEtM diharapkan dapat menurunkan penggunaan dosis Dox untuk memperoleh potensi yang sama. Sehingga dosis penggunaan lebih kecil, efek samping dapat ditekan dan resiko resistensi dapat diminimalkan.

Dox dapat menginduksi DNA *strand break* atau pemecahan untai ganda DNA pada sel dan menghambat topoisomerase II sehingga memicu terjadinya apoptosis (Bruton, *et al.*, 2005). Sedangkan kumarin dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi reseptor TNF- α R dan juga melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, pelepasan sitokrom c dimana terjadi penurunan ekspresi gen Rb dan Bcl-2 serta peningkatan ekspresi gen p53 (Ren, *et al.*, 2003). Kumarin juga dapat menghambat proses angiogenesis pada sel kanker (Seokjoon, *et al.*, 2006). Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang dibutuhkan untuk mempertahankan pertumbuhan dan metastase dari sel-sel kanker. Penghambatan angiogenesis mengakibatkan hambatan pada distribusi nutrisi dan oksigen ke sel kanker juga akan terhambat (Raffi, 2002). Sehingga dimungkinkan terjadi sinergisitas Dox dan EEtM pada sel

MCF-7 terjadi melalui mekanisme penghambatan topoisomerase II. Topoisomerase merupakan enzim yang memotong DNA sehingga mengakibatkan pembukaan *double strand* DNA oleh enzim helikase. Enzim tersebut bekerja pada perpanjangan replikasi DNA (Sismindari, 2012). Jika terjadi penghambatan topoisomerase maka akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA terpotong sehingga menghasilkan kerusakan *double strand* DNA yang permanen (Beck, *et al.*, 2001). Kerusakan DNA akan mengaktifasi p53 dan memicu apoptosis. Namun sel MCF-7 resisten terhadap Dox. Hal ini dapat terjadi karena adanya peningkatan ekspresi *P-glycoprotein* dan ekspresi Bcl-2 (Davis, *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini juga dilakukan pencarian aktivitas molekuler terhadap reseptor yang menginduksi terjadinya kanker payudara yaitu reseptor ER α yang berperan dalam proses proliferasi sel dan Bcl-xl yang berperan dalam antiapoptosis sel. Estrogen memiliki peran penting pada perkembangan kanker payudara karena estrogen adalah hormon yang meningkatkan aktivitas mitosis pada sel-sel epitel payudara yang juga berarti meningkatkan resiko kanker payudara dengan memicu pertumbuhan, proliferasi dan metastase kanker payudara (Ikawati, 2008). Estrogen menstimulasi pertumbuhan sel kanker payudara (Gruber, *et al.*, 2002) dengan diferensiasi saluran epitelium, menginduksi aktivitas mitosis saluran sel silindris dan menstimulasi pertumbuhan jaringan penyambung. Estrogen dimetabolisme oleh enzim sitokrom P₄₅₀ dengan cara hidroksilasi menjadi produk seperti 2-,4-,16 α -hidroksiestradiol, kemudian dioksidasi oleh semikuinon. Semikuinon akan teroksidasi menjadi kuinon dengan

melepaskan anion radikal superoksida dan radikal hidroksil yang akan bertanggung jawab terhadap terjadinya karsinogenesis dari steroid ini (Sanchez-Barcelo, 2005). Terdapat dua subtipe reseptor estrogen yaitu ER α dan ER β . Perbedaan keduanya terletak pada dosisnya dalam organ tubuh manusia. ER α ditemukan pada sel kanker payudara, epitel ovarium, endometrium, hepar, adiposa, otot skeletal dan hipotalamus, sedangkan ER β banyak terdapat di ovarium, testis, prostat dan region lain di otak seperti sistem limbik, serebelum, dan korteks serebra (Gustafsson, 1999). Sehingga dengan pengikatan reseptor tersebut akan menghambat penyimpangan yang mengakibatkan proliferasi sel yang abnormal. Aktivasi reseptor estrogen berperan dalam aktivasi beberapa onkoprotein seperti Ras, Myc, dan CycD1 (Foster, *et al.*, 2001). Protein Myc merupakan protein faktor transkripsi yang penting untuk pertumbuhan, sedangkan CycD1 merupakan protein penting dalam kelangsungan *cell cycle progression* sehingga adanya aktivasi tersebut akan mengakibatkan perkembangan kanker yang dipercepat (Hanahan dan Weinberg, 2000). Estrogen juga mempunyai peran terkait resistensi sel MCF-7 terhadap Dox. Stimulasi estrogen ternyata meningkatkan dosis protein transporter *P-glycoprotein* (Pgp) pada MCF-7 namun tidak demikian pada sel T47D karena diduga subtipe dari reseptor estrogen yang diekspresikan oleh kedua sel berbeda (Zampieri, *et al.*, 2002). Sel MCF-7 mengekspresikan ER α sedangkan T47D mengekspresikan ER β . Pgp inilah yang membuat sel MCF-7 resisten terhadap Dox karena Pgp yang terletak di permukaan membran plasma sel akan memompa Dox keluar dari sel (Gyorffy, *et al.*, 2008). Sehingga penghambatan terhadap ER α akan meningkatkan sensitifitas

sel MCF-7 terhadap Dox dan menghambat proliferasi sel. Senyawa skopoletin dan umbeliferon berpotensi dalam mengikat ER α dengan skor *docking* sebesar -59,385 dan -66,302 serta ikatan ER α dengan Dox sebesar -82,992, sedangkan ikatan ER α dengan ligan asli sebesar -104. Ini berarti ikatan ER α dengan ligan asli lebih stabil dan kuat dibandingkan ikatan ER α dengan skopoletin, umbeliferon dan Dox. Dox berada pada ER α dengan protein terdekat yaitu Met 388, Ala 382, Gly 390, Ile 386, Ser 456 dan Ile 389. Jarak terdekatnya sebesar 1,33 A dari protein Met 388. Skopoletin berada pada ER α dengan protein terdekat yaitu Glu 385 dan Gly 390, dengan jarak 1,33 A dari Glu 385. Sedangkan protein terdekat umbeliferon pada ER α yaitu Glu 385, Ile 514, Ile 386, Ile 389, Leu 387 dan Lys 449, dengan jarak terdekat sebesar 1,60 A dari Glu 385.

Target protein selain ER α adalah Bcl-xl (*B cell lymphoma-xl*). Bcl-xl adalah homolog dari Bcl-2, dimana keduanya berfungsi sebagai antiapoptosis. Resistensi akibat kemoterapi diantaranya diakibatkan oleh peningkatan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl (Herr dan Debatin, 2001). Bcl-2 dan Bcl-xl telah dilaporkan diekspresi di dalam sel duktus payudara normal dan juga terlibat di dalam pengaturan hormon kejadian hiperplasia (Tronccone, *et al.*, 1995; Ioachim, *et al.*, 2000). Protein antiapoptosis juga mampu menginaktivasi protein proapoptosis seperti Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w dan Mcl-1 mampu berikatan dengan Bax, sedangkan yang mampu berikatan dengan Bak (*Bcl-2 associated killer*) adalah Bcl-xl dan Mcl-1. Bax berfungsi melepaskan sitokrom c dari mitokondria masuk ke dalam sitoplasma untuk mengaktifkan Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) yang akan menyebabkan kaskade caspase sampai terjadi apoptosis namun Bcl-2 dan Bcl-xl

hadir dengan menghambat pelepasan sitokrom c dan Apaf-1 sehingga apoptosis tidak berlangsung (Adams dan Cory, 1998). Semakin banyak protein Bcl-xl dihambat maka akan semakin banyak pula protein Bax dan Bak yang diaktivasi sehingga akan menyebabkan apoptosis sel kanker. Dalam penelitian ini skopoletin dan umbeliferon berpotensi mengikat Bcl-xl dengan skor -73,858 dan -71,989 serta Dox yang mampu mengikat Bcl-xl dengan skor -77,567, sedangkan ikatan ligan asli dengan Bcl-xl menghasilkan skor -83,615. Ini berarti ikatan ligan asli dengan Bcl-xl lebih stabil dan kuat. Namun ikatan Bcl-xl dengan skopoletin dan umbeliferon mampu menyamai energi ikatan Bcl-xl dengan Dox. Dox berada pada Bcl-xl dengan protein terdekat yaitu Leu 94, Val 145, Phe 148, Ser 149 dan Phe 150. Jarak terdekatnya sebesar 0,10 Å dari protein Leu 94. Skopoletin berada pada Bcl-xl dengan protein terdekat yaitu Ser 149, Ile 144 dan Phe 148, dengan jarak 1,61 Å dari Ser 149. Sedangkan protein terdekat umbeliferon pada Bcl-xl yaitu Glu Phe 148, Gly 152, Ser 149 dan Val 145, dengan jarak terdekat sebesar 1,80 Å dari Phe 148.

Kumarin yang terkandung dalam EEtM berpotensi lemah dalam menyebabkan sitotoksik pada sel kanker payudara. Namun EEtM memiliki aktivitas sinergis dengan kombinasi Dox dan mampu memacu apoptosis sel. EEtM juga berpotensi mengikat protein proliferasi dan antiapoptosis sel. Berdasarkan ke lima hasil uji yang diperoleh, maka dapat disimpulkan EEtM memiliki potensi kuat digunakan sebagai ko-kemoterapi Dox yang selanjutnya dapat dikembangkan untuk pengobatan. Penelitian ini juga membuktikan bahwa tanaman liar yang tersedia melimpah di alam ataupun di tepi jalan yang sepertinya

tidak ada manfaatnya ternyata memiliki khasiat sebagai tanaman obat. Selain buah mengkudu, juga terdapat bahan alam yang dapat digunakan sebagai pendamping Dox seperti pinang (Meiyanto, Susidarti, *et al.*, 2008), kulit jeruk nipis (Meiyanto, *et al.*, 2008) dan lain sebagainya. Hal ini juga menunjukkan akan kebenaran ayat suci Al-Quran yang menjelaskan bahwa segala yang diciptakan oleh Allah SWT di alam ini tidak ada yang sia-sia dan pasti memiliki manfaat. Sehingga penelusuran dan pengembangan akan hal itu dapat memberikan kemaslahatan bagi kehidupan manusia.