

**UJI AKTIVITAS KHEMOPREVENTIF FRAKSI N-HEKSAN BUNGA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D SECARA
IN VITRO DAN *IN SILICO***

**CHEMOPREVENTIVE ACTIVITY OF HEXANE ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)
FRACTION AGAINST T47D BREAST CANCER CELL BY *IN VITRO* AND *IN*
SILICO TEST**

Nabila Kaulika*

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
*nabilakaulika@gmail.com

ABSTRACT

Breast cancer ranks the highest percentage of new cases and deaths in women worldwide. Problems that arise from cancer treatment with chemotherapy are nonselective and severe side effects. The flowers of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) contain flavonoid compounds namely anthocyanin, one of which is cyanidin 3-O-glucoside. Previous research showed that roselle's aquadest extract was able to inhibit MCF-7 breast cancer cell growth. This study aims to explore the antioxidant and cytotoxic abilities of n-hexane roselle fraction to T47D breast cancer cells.

Roselle powder was extracted with 70% ethanol and followed by n-hexane fractionation to obtain N-Hexane Roselle Fraction (NRF). Identification of flavonoid compounds in the NRF using TLC method. The antioxidant ability of the NRF was analyzed using the DPPH method, in vitro cytotoxic tests on T47D breast cancer cells were carried out using the MTT assay method, followed by cell cycle testing with flowcytometry method. In silico test to determine the bond affinity between cyanidin 3-O-glucoside to HER2 and EGFR proteins was carried out by molecular docking method.

The results of the identification of compounds showed that NRF contained flavonoids. NRF has a weak antioxidant ability with an IC₅₀ value of 4259 µg/mL. NRF is quite toxic in T47D breast cancer cells with IC₅₀ values of 213 µg/mL and is able to inhibit the T47D cell cycle in G2/M phase. Cyanidin 3-O-glucoside has a strong bonding affinity with HER2 and EGFR protein of -8.1 and -8.2 kcal/mol respectively.

Keywords: cancer, cytotoxic, *Hibiscus sabdariffa*, in silico, in vitro

INTISARI

Kanker payudara menduduki peringkat tertinggi presentase kasus baru dan kematian pada wanita di seluruh dunia. Permasalahan yang timbul dari pengobatan kanker dengan kemoterapi ialah sifatnya yang tidak selektif dan efek samping berat yang ditimbulkan. Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung senyawa flavonoid yaitu antosianin, yang salah satunya dalam bentuk sianidin 3-O-glukosida. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak aquades bunga rosella mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini bertujuan untuk menelusuri kemampuan antioksidan dan sitotoksik fraksi n-heksan rosella pada sel kanker payudara T47D.

Serbuk bunga rosella diekstraksi dengan etanol 70% dan dilanjutkan fraksinasi dengan n-heksan sehingga diperoleh Fraksi N-Heksan Rosella (FNR). Identifikasi senyawa flavonoid pada FNR menggunakan metode KLT. Kemampuan antioksidan FNR dianalisis menggunakan metode DPPH, uji sitotoksik secara *in vitro* pada sel kanker payudara T47D dilakukan dengan metode MTT *assay*, dilanjutkan uji siklus sel dengan metode flowsitometri. Uji *in silico* untuk mengetahui afinitas ikatan antara sianidin 3-O-glukosida dengan protein HER2 dan EGFR dilakukan dengan metode *molecular docking*.

Hasil identifikasi senyawa menunjukkan pada FNR terdapat senyawa flavonoid. FNR memiliki kemampuan antioksidan lemah dengan nilai IC_{50} sebesar 4259 $\mu\text{g/mL}$. FNR bersifat cukup toksik pada sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 213 $\mu\text{g/mL}$ dan mampu menghambat siklus sel T47D pada fase G2/M. Sianidin 3-O-glukosida memiliki afinitas ikatan yang kuat dengan protein HER2 dan EGFR berturut-turut sebesar -8.1 dan -8.2 kcal/mol.

Kata kunci : *Hibiscus sabdariffa*, *in silico*, *in vitro*, kanker, sitotoksik

PENDAHULUAN

Kanker payudara menduduki peringkat tertinggi presentase kasus baru dan kematian pada wanita di seluruh dunia. Setiap tahunnya, terdapat 43,3% kasus baru dengan presentase kematian sebesar 12,9% akibat kanker payudara (IARC, 2012). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar 2013, kanker payudara menjadi penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia (Depkes RI, 2013). Terapi yang saat ini banyak digunakan untuk pengobatan kanker antara lain dengan metode pembedahan, radiasi, dan kemoterapi. Mekanisme kerja agen kemoterapi sebagai antikanker bersifat tidak selektif, karena tidak hanya merusak DNA sel kanker, namun juga pada sel yang normal (Dai et al., 2004). Permasalahan yang juga timbul dari pengobatan kanker dengan kemoterapi yaitu banyaknya efek samping yang ditimbulkan. (Rollando, 2017). Hal ini menjadikan perlunya pengembangan serta penelitian lebih lanjut mengenai obat-obat kanker dengan menggunakan bahan-bahan alami. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan menjadi obat antikanker adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Bagian tanaman ini yang sering dimanfaatkan oleh masyarakat ialah kelopak bunganya. Secara empiris rosella berkhasiat sebagai antikolesterol, antihipertensi, antibakteri dan antiseptik (Syahrana dkk, 2017). Berdasarkan penelitian Ewansih (2014), pada ekstrak n-heksan rosella mengandung senyawa flavonoid dan fenol. Kandungan flavonoid pada bunga rosella terdapat dalam beberapa bentuk, salah satunya ialah antosianin. Penelitian yang dilakukan Obouayeba *et al* pada tahun 2015 menunjukkan kandungan antosianin dari bunga rosella antara lain sianidin, delphinidin, malvidin, sianidin 3-O-glukosida, delphinidin 3-O-glukosida, dan malvidin 3-O-glukosida. Penelitian ini akan menelusuri khasiat antikanker dari Fraksi N-heksan Rosella

(FNR), dengan mengetahui aktivitas antioksidan, sitotoksik, dan penghambatan siklus sel dari FNR terhadap sel kanker payudara T47D. Metode untuk identifikasi senyawa yang terkandung dalam FNR dilakukan dengan metode KLT. Uji sitotoksik FNR menggunakan metode MTT *assay* pada sel T47D kemudian dilanjutkan uji siklus sel menggunakan metode flowsitometri. Uji antioksidan FNR dilakukan dengan metode DPPH (*1-1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Uji *in silico* dilakukan dengan menggunakan *molecular docking*, untuk mengetahui interaksi antara protein target HER2 dan EGFR dengan senyawa sianidin 3-O-glukosida dari bunga rosella. Penelitian ini diharapkan dapat mendukung penelitian sebelumnya, dan dapat menjadi referensi terkait manfaat bunga rosella.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 1 kg serbuk simplisia bunga rosella diekstraksi menggunakan 10 L etanol 70% dengan metode maserasi selama 5 hari, dilanjutkan remaserasi selama 2 hari. Ekstrak etanol bunga rosella kemudian difraksinasi partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya fraksi n-heksan dievaporasi menggunakan rotary evaporation dengan suhu 60°C untuk memekatkan fraksi.

Identifikasi Senyawa Metode KLT

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menotolkan larutan sampel uji yaitu FNR (*Hibiscus sabdariffa* L.) pada plat silika gel GF₂₅₄, kemudian dielusi dengan fase gerak kloroform. Plat silika yang sudah dielusi selanjutnya diberi uap amonia dan diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Diamati warna spot yang tertera dan dihitung nilai R_f.

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengambil masing-masing 5 ml dari

seri konsentrasi FNR dan larutan pembanding quersetin, selanjutnya ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan didiamkan selama operating time di ruang tertutup. Absorbansi sampel FNR dan pembanding quersetin dibaca dengan panjang gelombang maksimum DPPH, selanjutnya nilai absorbansi diolah menjadi presentase inhibisi untuk kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} .

Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Sel T47D dengan kepadatan 5×10^3 sel/100 μ l Media Kultur (MK) didistribusikan ke dalam 96 *well plate* dengan 3 sumuran kosong untuk diisi media kontrol, dan diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi MK yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 50 μ l PBS. Selanjutnya pada masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ l reagen MTT 5mg/ml, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Sel yang hidup atau bertahan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah inkubasi, ditambahkan larutan stopper SDS dalam HCl 0,1% 200 μ l untuk melarutkan kristal formazan. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri

Sel T47D dengan kepadatan 5×10^5 sel/sumuran didistribusikan dalam 6 *well plate* masing-masing sebanyak 1000 μ l untuk perlakuan dan kontrol sel. Konsentrasi FNR yang dibuat ialah $\frac{1}{2} IC_{50}$ dan IC_{50} dengan volume masing-masing 500 μ L. Serta konsentrasi agen kemoterapi Doxorubicin dengan konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$ dan IC_{50} . Kemudian diinkubasi selama 24 jam.

MK dari sumuran diambil dan ditransfer ke konikal. Setelah sel terlepas, ditransfer ke dalam konikal yang berisi MK. Konikal disentrifus dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. MK dibuang, pellet sel dicuci dengan 500 μ L PBS dingin, disentrifus kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama.

Buang PBS, dan teteskan 500 μ L alkohol 70% untuk memfiksasi sel. Konikal kemudian disimpan pada suhu ruang 37°C selama 30 menit, dan disentrifus kembali selama 5 menit. Alkohol dibuang dan selanjutnya ditambahkan reagen flowsitometri Suspensi sel ditransfer ke dalam flowsito-tube, kemudian dilakukan pembacaan profil siklus sel.

Molecular Docking

Molecular docking dengan menggunakan *Autodock Vina*, dipastikan semua berkas yang akan digunakan berada pada folder yang sama. Pertama, membuat dokumen baru dan diberi nama *conf.txt*. Kemudian mengisi formulir dengan menuliskan protein 3pp0.pdbqt (HER2) dan Im17.pdbqt (EGFR) ligan dituliskan dengan ligan.pdbqt, sedangkan *center_x,y,z* dan *size_x,y,z* dituliskan sesuai dengan nilai yang tertera pada grid box, selanjutnya disimpan pada folder yang sama. Nilai RMSD ditentukan dengan cara mengisi *Command Prompt Windows* dengan kode dan ditunggu hingga proses selesai yang kemudian akan muncul beberapa konformasi. Setiap konformasi menunjukkan nilai afinitas RMSD. Konformasi yang dipilih pada penelitian ini yaitu yang memiliki nilai $< 2 \text{ \AA}$. Kemudian berkas *output.pdbqt* dipecah menjadi beberapa berkas terpisah sesuai pada masing-masing konformasi. DS Visualizer digunakan untuk visualisasi hasil docking. Berkas dengan format .pdbqt sebelumnya diubah dengan menggunakan Open Babel sehingga menjadi .pdb. Visualisasi hasil docking bertujuan untuk mengetahui posisi dan gambaran ikatan antara protein dan ligan secara 3 dimensi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

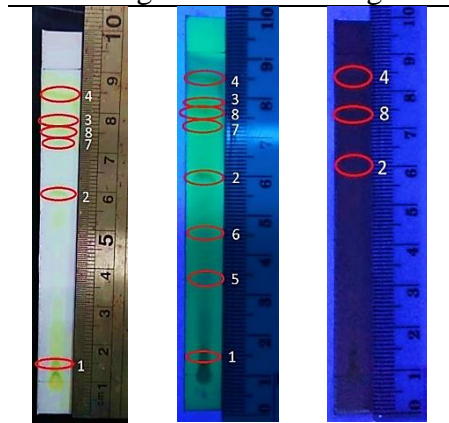
Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan dan diperoleh ekstrak cair sebanyak 7 L selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan

pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Fraksi n-heksan rosella (FNR) yang diperoleh sebanyak 6,3 L kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator. Kemudian didapatkan fraksi kental rosella sebanyak 3.875 gram dengan presentase rendemen 0.3%.

Identifikasi Senyawa Metode KLT

Tabel 1. Pengamatan Kromatogram



Berdasarkan hasil uji identifikasi kromatogram, FNR diduga mengandung senyawa flavonoid pada bercak no 2, 4, dan 8. Hal ini berdasarkan pada warna bercak yang muncul menunjukkan warna kuning kehijauan pada sinar tampak dan UV 254 nm, serta menunjukkan warna ungu pada pengamatan dengan UV 366 nm. Menurut Intisar (1996), flavonoid pada bercak no 2 dan 4 ditandai dengan pendaran berwarna hijau kecoklatan pada UV 254 nm menunjukkan terdapatnya kandungan flavonoid glikosida. Sedangkan pada bercak no 8 dengan pendaran ungu setelah diuapi amonia pada UV 366 nm menunjukkan adanya kandungan isoflavon. Berdasarkan penelitian sebelumnya, hasil uji identifikasi juga diduga mengandung senyawa quersetin, yang ditunjukkan pada bercak no 3 dengan nilai Rf 0,85.

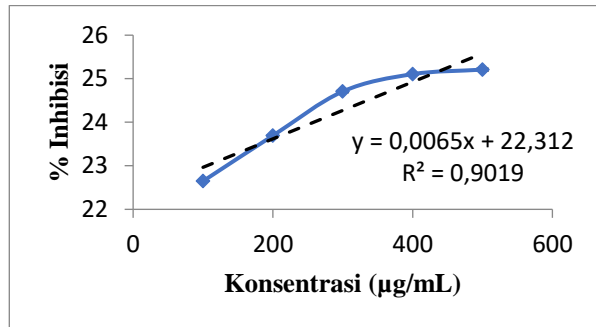
Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Kemampuan antioksidan dari FNR dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Pada penelitian ini digunakan seri konsentrasi FNR sebesar 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/mL. Nilai absorbansi yang didapatkan kemudian

dihitung menjadi presentase inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol Negatif} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Kemudian diperoleh grafik hubungan antara presentase inhibisi dengan konsentrasi yang digunakan (gambar 1).



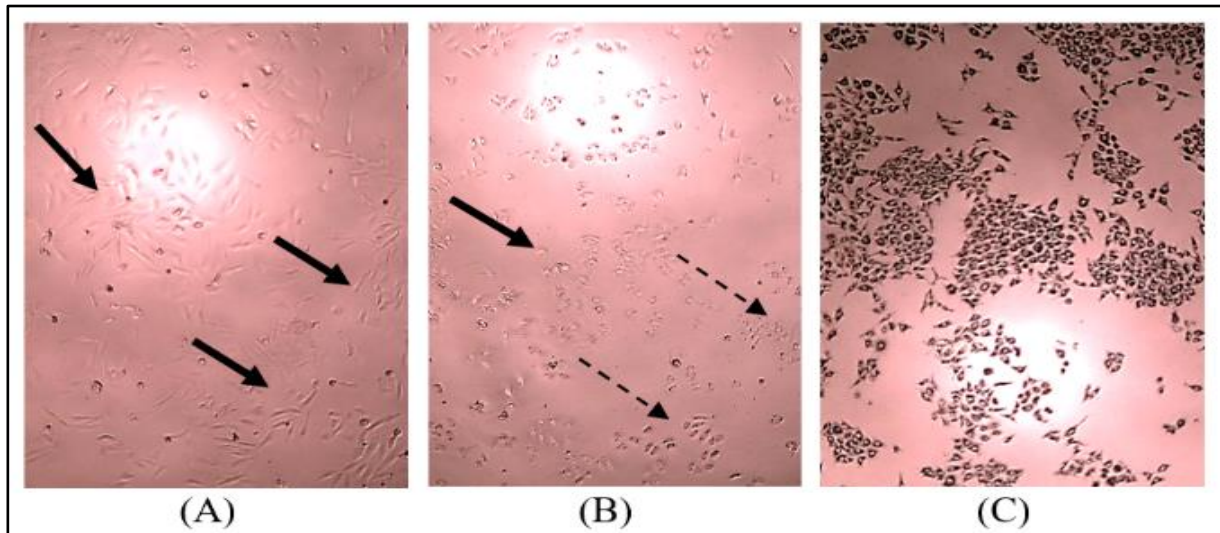
Gambar 1. Grafik Inhibisi FNR

Berdasarkan persamaan regresi linear yang diperoleh, selanjutnya dilakukan perhitungan IC₅₀. Hasil nilai IC₅₀ dari FNR sebesar 4259 µg/mL dan merupakan antioksidan lemah.

Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Pada penelitian ini digunakan seri konsentrasi FNR sebesar 250; 125; 62.5; dan 31.25 µg/mL. Morfologi sel kanker payudara T47D diamati setelah diberikan perlakuan FNR selama 24 jam (gambar 2).

Sel T47D mengalami perubahan morfologi, dari yang semula berbentuk panjang, lonjong dan menyudut di bagian ujungnya, menjadi tidak beraturan dan kepadatannya menurun. Sel yang hidup memiliki karakteristik berwarna cerah dan memiliki kepadatan tinggi, sedangkan sel yang mati ditandai dengan warna yang lebih gelap, bentuk yang tidak beraturan dan kepadatannya rendah (Pratama, 2016). Sehingga dapat dikatakan bahwa FNR mampu menghambat pertumbuhan sel T47D yang ditandai dari perubahan morfologi sel menjadi tidak beraturan. Sel yang telah diberi perlakuan FNR dan reagen MTT selanjutnya diberi reagen *stopper* untuk melarutkan kristal formazan, dan dilakukan perhitungan absorbansi dengan ELISA reader.

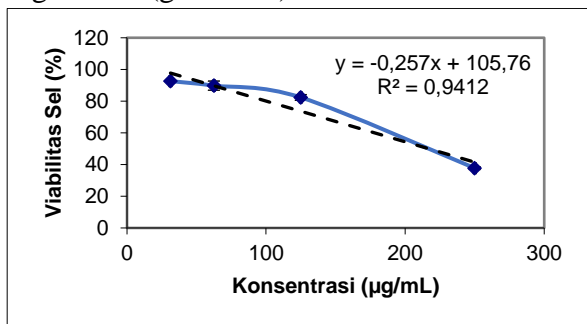


Gambar 2. Morfologi Sel (A) Sebelum (B) Sesaat Setelah diberi Perlakuan (C) Setelah diberi Perlakuan dan diinkubasi Serta Penambahan Reagen MTT. (—) Sel Hidup (---) Sel Mati

Absorbansi yang diperoleh dihitung menjadi presentase viabilitas sel dengan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Abs sel dengan perlakuan} - \text{abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol media sel} - \text{abs kontrol media}} \times 100\%$$

Kemudian diperoleh grafik hubungan antara viabilitas sel dengan konsentrasi yang digunakan (gambar 3).



Gambar 3. Grafik Presentase Sel Hidup dengan Perlakuan FNR

Berdasarkan persamaan regresi linear yang didapat, dilakukan perhitungan IC_{50} . Nilai IC_{50} dari FNR sebesar $213 \mu\text{g/mL}$ sehingga bersifat cukup toksik terhadap sel kanker T47D.

Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri

Uji ini bertujuan untuk mengetahui fase daur sel yang terhambat pertumbuhannya setelah diberi perlakuan FNR. Hasil menunjukkan penghambatan siklus sel T47D yang diberi perlakuan FNR terjadi pada fase G2/M atau pada fase sintesis protein dan preparasi untuk mitosis. FNR menyebabkan akumulasi sel

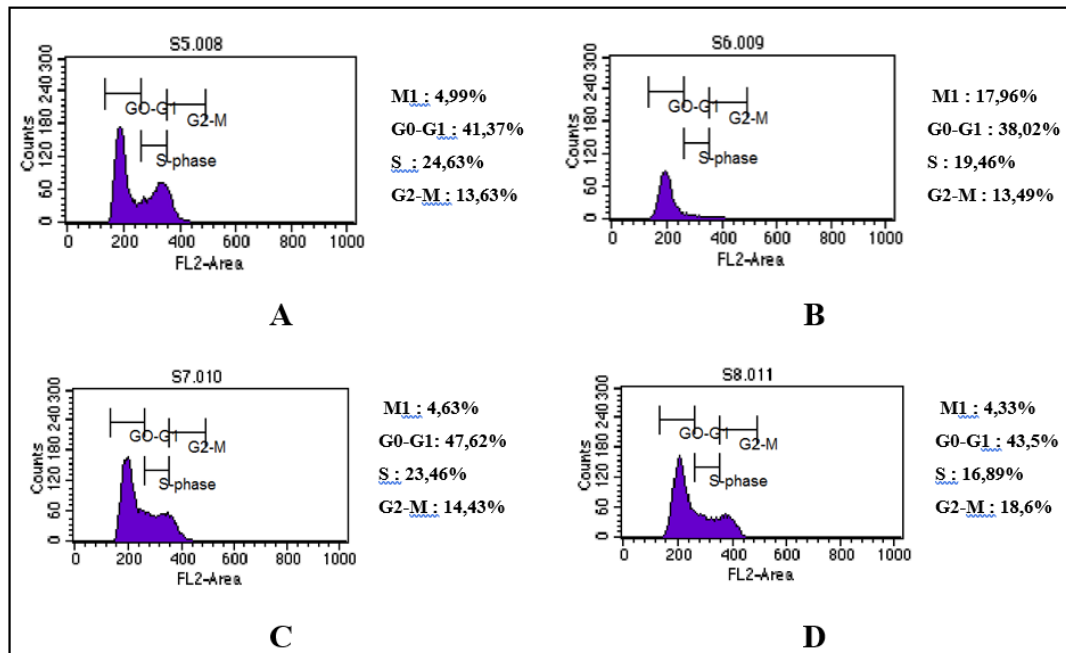
pada fase G2/M jika dibandingkan dengan kontrol sel. Sel yang terakumulasi pada fase G2/M mengalami peningkatan dari yang semula pada sel normal 13,63%, menjadi 14,43% dan 18,64% pada sel dengan perlakuan berturut-turut $\frac{1}{2}IC_{50}$ dan IC_{50} (gambar 4). Peningkatan jumlah sel pada fase G2/M menunjukkan adanya penghambatan siklus sel yang terjadi pada fase tersebut.

Molecular Docking

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Autodock Vina* dan *Open babel* kemudian divisualisasikan bentuk strukturnya secara 2 dimensi dan 3 dimensi dengan aplikasi *DS Visualizer*. Data hasil *molecular docking* dapat dilihat pada tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Hasil Molecular Docking Antara Ligan dan Protein HER2

Nama Senyawa	Nilai RMSD	Score Docking	Konformasi
<i>Native ligand-1</i>	1,484	-9,4	2
Sianidin 3-O-glukosida	1,132	-8,1	2
<i>Native ligand-2</i>	1,536	-7,0	2
Doxorubicin	1,619	-7,0	2



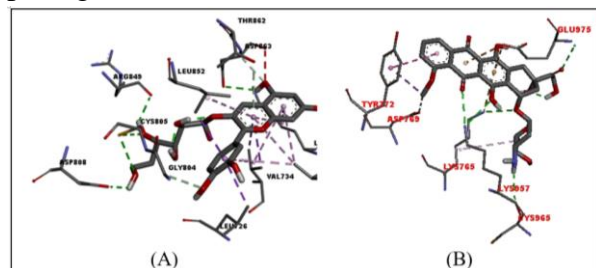
Gambar 4. Profil Siklus Sel T47D Menggunakan Flowsitometri pada (A) Kontrol Sel, (B) dengan Perlakuan Doxorubicin, (C) dengan Perlakuan FNR $\frac{1}{2}IC_{50}$, (D) Perlakuan FNR IC_{50}

Tabel 3. Hasil Molecular Docking Antara Ligan dan Protein EGFR

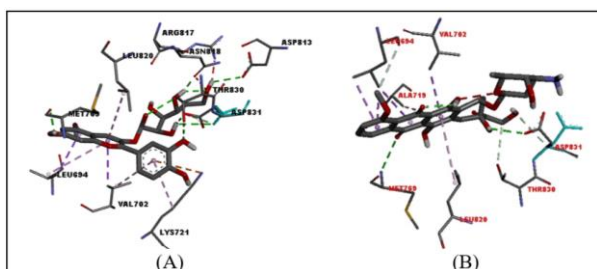
Nama Senyawa	Nilai RMSD	Score Docking	Konformasi
Native ligand-1	1,278	-7,2	2
Sianidin 3-O-glukosida	1,510	-8,2	5
Native ligand-2	1,545	-7,4	4
Doxorubicin	1,141	-10,0	2

Berdasarkan uji yang telah dilakukan, seluruh reseptor memiliki nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$, yang menunjukkan posisi ligan hasil docking dengan posisi aslinya tidak terlalu berbeda. Nilai dari energi ikatan bebas atau dari ligan sianidin 3-O-glukosida dan doxorubisin pada setiap reseptor berdasarkan *docking score* menunjukkan nilai yang negatif, hal ini menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi antara ligan dengan reseptor tidak membutuhkan energi yang terlalu besar sehingga akan terjadi secara spontan. Doxorubisin menunjukkan afinitas paling tinggi pada reseptor EGFR dengan nilai *docking score* -10,0 kcal/mol, dan sianidin 3-O-glukosida menunjukkan afinitas

paling tinggi pada reseptor HER2 dengan nilai *docking score* -8,1 kcal/mol. Berdasarkan hasil studi ini, dapat diketahui bahwa sianidin 3-O-glukosida dari bunga rosella dapat berikatan dengan reseptor HER2 dengan stabil dan lebih baik dibandingkan doxorubisin. Sedangkan pada reseptor EGFR, sianidin 3-O-glukosida juga dapat berikatan dengan stabil. Visualisasi interaksi sianidin 3-O-glukosida dan doxorubisin pada protein target ditunjukkan pada gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Struktur 3D Hasil Optimasi Geometri pada Protein HER2 (A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Doxorubisin



Gambar 6. Struktur 3D Hasil Optimasi Geometri pada Protein EGFR (A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Dokсорubisin

KESIMPULAN

Fraksi n-heksan rosella mengandung senyawa flavonoid berdasarkan uji dengan metode KLT, memiliki kemampuan antioksidan lemah dengan nilai IC_{50} 4259 $\mu\text{g/mL}$ berdasarkan metode DPPH.. Fraksi n-heksan rosella bersifat cukup toksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 213 $\mu\text{g/mL}$ berdasarkan uji dengan metode MTT assay dan mampu menghambat siklus sel kanker payudara T47D pada fase G2/M berdasarkan uji dengan metode flowsitometri. Senyawa sianidin pada rosella memiliki afinitas ikatan yang kuat dalam menghambat protein HER2 dan EGFR dengan nilai docking score -8,1 dan -8,2 berdasarkan *molecular docking*.

DAFTAR PUSTAKA

- Dai, M., Meiyanto, E., and Supardjan, A.M. 2004. Antiproliferative effect of Pentagamavunon-0 on Myeloma cells. Sains kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 2013, Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Nasional. Dirjen POM, Jakarta.
- Ewansiha JU, 2014. Evaluation of the antimicrobial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) leaf extracts and its phytochemical properties. Peak Journal of Medicinal Plant Research, 2(1): 1-5.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. Breast Cancer. Diakses pada 18 Mei 2018, dari <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
- Intisar, Mohammed Sirour. 1996. Phytochemical Studies of Flavonoids from

Polygonum glabrum L. of Sudan. Thesis. Sudan : University of Khartoum.

Obouayeba, Abba Pacome; Diarrassouba, Moussa; Souhamin, Eric Francis. 2015. Phytochemical Analysis, Purification and Identification of Hibiscus Anthocyanins. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological, June-August 2015; 3(2):156-168.

Pratama, Mohammad Rizki Fadhil. 2016. Molecular Docking of Anticancer Agents : Artemisinin and Derivates as HER2 Inhibitor. Palangka Raya : University of Palangkaraya.