

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK RUMPUT LIDAH ULAR (*Hedyotis  
diffusa* WILLD.) DAN DOKSORUBISIN TERHADAP VIABILITAS**

**SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

**Rika Parasayu**

**NIM 145070501111005**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK RUMPUT LIDAH ULAR (*Hedyotis diffusa* WILLD.) DAN DOKSORUBISIN TERHADAP VIABILITAS SEL**

**KANKER PAYUDARA MCF-7**

Oleh:

**Rika Parasayu**  
**145070501111005**

Telah diuji pada  
Hari : Senin  
Tanggal : 9 Juli 2018  
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D  
NIP. 196701231996011001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

Dra. Diana Lyrawati, M.S., Ph.D., Apt  
NIP. 2016099210192001

Oktavia Rahayu A, S.Farm., M.Biomed  
NIP. 2016099210192001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si  
NIP. 195408231981032001

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Esa atas berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul **“Efek Kombinasi Ekstrak Rumpuk Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan Doksorubisin terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara MCF-7”**.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu penyelesaiannya, antara lain:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) yang telah memberikan kesempatan penulis untuk menempuh pendidikan di FKUB.
2. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi yang telah membimbing penulis selama menuntut ilmu di Program Studi Sarjana Farmasi FKUB.
3. Dra. Diana Lyrawati, M.S., Ph.D., Apt, selaku dosen pembimbing I yang dengan sabar telah memberikan arahan, bimbingan, dan saran-saran yang membangun dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
4. Oktavia Rahayu A., S.Farm., M.Biomed, selaku dosen pembimbing II dan ketua tim penelitian yang dengan sabar telah memberikan arahan, bimbingan, dan saran-saran yang membangun dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
5. dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D, selaku penguji yang telah memberikan banyak masukan.
6. Ayuk Lawuningtyas H., M. Farm., Apt., selaku ketua tim Tugas Akhir Program Studi Sarjana Farmasi FKUB.
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu tahap persiapan penelitian dan urusan administrasi.

8. Bunga Prihartini, S.Si., Analis serta Petugas Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Farmasi FKUB yang telah memberikan arahan dan bantuan selama penelitian.

9. Yang tercinta Ayah Ri'in, Ibu Sunarti serta adik Ryan T., yang selalu memberikan motivasi, dukungan, dan doa serta kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.

10. Billy K., Dian F., dan Margareta P.K., sebagai teman seperjuangan dalam penelitian yang selalu memberikan dukungan dan semangat dalam penyusunan Tugas Akhir.

11. Adisti Mega, Fitri Al Vianita, Ika Ilmia, Nindi Eka Sari, dan Adibah Nur Maisaroh, yang selalu menjadi pendengar, penasihat, pendukung, dan penyemangat penulis.

12. Keluarga Besar HMF Aecus Prospisio Reinkarnasi, Meroket, dan Regenerasi yang telah memberikan pengalaman dan pembelajaran yang sangat luar biasa, terutama untuk BPI dan BPH HMF Regenerasi, Billy, Adibah, Dian, Jovana, Azizah, Arya, Nuke, Kiki, Gita, dan Zulfa.

13. Teman-teman Farmasi dan FKUB 2014 yang selalu mendukung, berbagi ilmu, cerita, dan canda tawa.

14. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Tugas Akhir ini masih terdapat kekurangan dan membutuhkan kritik maupun saran untuk perbaikan.

Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Malang, 13 Juli 2018

Penulis

## ABSTRAK

Parasayu, Rika. 2018. **Efek Kombinasi Ekstrak Rumpun Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan Doksorubisin terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara MCF-7**. Tugas Akhir. Program Studi Sarjana Farmasi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dra. Diana Lyrawati, M. S., Ph. D., Apt. (2) Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Penggunaan doksorubisin sebagai kemoterapi kanker payudara sering kali dibatasi akibat toksisitasnya terhadap jantung. Rumpun lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) merupakan obat bahan alam yang banyak diresepkan dalam herbal Cina untuk pengobatan kanker payudara. *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin dikombinasikan sehingga dapat menurunkan dosis doksorubisin yang digunakan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin, efek kombinasi yang ditimbulkan, serta kombinasi konsentrasi yang dapat menimbulkan efek sinergis. *Hedyotis diffusa* Willd. diekstraksi dengan metode maserasi dalam pelarut etanol 80%. Kultur sel MCF-7 diberikan perlakuan dengan 7 seri konsentrasi selama 24 jam, kemudian nilai  $IC_{50}$  diukur menggunakan metode MTT. Kombinasi diberikan dengan konsentrasi  $1/2 IC_{50}$ ,  $3/8 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ , dan  $1/8 IC_{50}$  kemudian dihitung nilai CI. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. sebesar  $930 \pm 30,143 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0001$ ) dan doksorubisin sebesar  $490 \pm 83,293 \text{ nM}$  ( $p < 0,0001$ ). Kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin didapatkan efek sinergis pada kombinasi konsentrasi doksorubisin 61 nM dengan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. 116  $\mu\text{g/ml}$  dan 232  $\mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin mampu menimbulkan efek sinergis berdasarkan nilai CI.

Kata kunci: *Hedyotis diffusa* Willd., Doksorubisin, Viabilitas, *Combination Index*

## ABSTRACT

Parasayu, Rika. 2018. **Combination Effect of Snake Tongue Grass (*Hedyotis diffusa* Willd.) and Doxorubicin on The Viability of Breast Cancer Cell MCF-7**. Final Assignment. Pharmacy Program. Faculty of Medicine. Brawijaya University. Supervisors: (1) Dra. Diana Lyrawati, M. S., Ph. D., Apt. (2) Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Doxorubicin as chemotherapy for breast cancer is often limited due to its toxicity to the heart. Snake tongue grass (*Hedyotis diffusa* Willd.) is a herbal medicine prescribed in China as breast cancer treatment. *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin was combined to decrease doxorubicin's dose used. In this study, we investigated IC<sub>50</sub> value of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin, their combination effects, and the concentrations that can have synergistic effects. *Hedyotis diffusa* Willd. was extracted using maceration method in 80% ethanol solvent. MCF-7 cell cultures were treated with 7 series concentrations for 24 hours, then IC<sub>50</sub> values were measured using MTT assay. The concentrations used for combination assay were 1/2 IC<sub>50</sub>, 3/8 IC<sub>50</sub>, 1/4 IC<sub>50</sub>, and 1/8 IC<sub>50</sub> then CI value was calculated. The IC<sub>50</sub> value of *Hedyotis diffusa* Willd. was 930 ± 30.143 µg/ml ( $p < 0.0001$ ) and doxorubicin was 490 ± 83,293 nM ( $p < 0.0001$ ). The combination of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin showed a synergistic effect on the concentration combination of doxorubicin was 61 nM and *Hedyotis diffusa* Willd. was 116 µg/ml and 232 µg/ml. Based on these results, the combination of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin causes synergistic effects based on CI values.

Keywords: *Hedyotis diffusa* Willd., Doxorubicin, Viability, Combination Index

## DAFTAR ISI

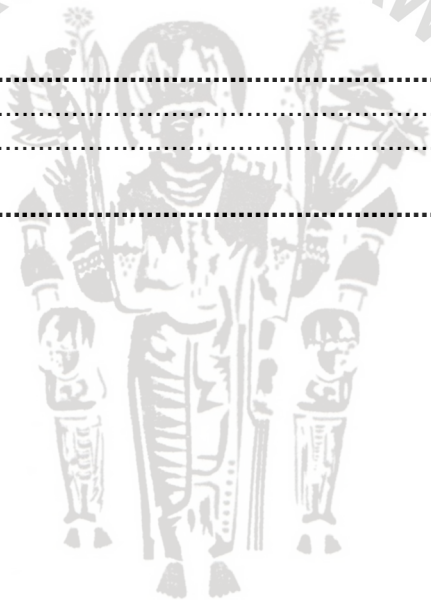
Halaman

Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak .....	v
<i>Abstract</i> .....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	x
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Singkatan .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat .....	4
1.4.1 Manfaat Akademis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Kanker Payudara .....	5
2.1.1 Definisi .....	5
2.1.2 Epidemiologi .....	5
2.1.3 Patofisiologi .....	6
2.2 <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. ....	7
2.2.1 Taksonomi .....	7
2.2.2 Morfologi dan Habitat .....	8
2.2.3 Kandungan Kimia .....	9
2.3 Doksorubisin .....	10
2.3.1 Deskripsi .....	10
2.3.2 Mekanisme Kerja .....	11
2.4 <i>Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7)</i> .....	13
2.5 Interaksi Obat .....	14
2.6 <i>Combination Index (CI)</i> .....	15
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	18
3.2 Hipotesis Penelitian .....	20

<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b>	<b>21</b>
4.1 Rancangan Penelitian	21
4.2 Subjek Penelitian	21
4.3 Variabel Penelitian	21
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	22
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	22
4.5.1 Ekstraksi Rumput Lidah Ular	22
4.5.2 Kultur Sel	22
4.5.3 Uji Sitotoksik Tunggal	23
4.5.4 Uji Sitotoksik Kombinasi	23
4.6 Definisi Operasional	24
4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data	25
4.7.1 Skema Prosedur Penelitian	25
4.7.2 Ekstraksi Herba Rumput Lidah Ular ( <i>Hedyotis Herba</i> )	26
4.7.3 Kultur Sel	27
4.7.3.1 Preparasi Media Kultur <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	27
4.7.3.2 Preparasi Media Kultur Lengkap (MK)	28
4.7.3.3 Preparasi Media <i>Serum Free</i> (SF)	29
4.7.3.4 Preparasi Media <i>Cryo</i>	30
4.7.3.5 Penumbuhan Sel ( <i>Cell Thawing</i> )	31
4.7.3.6 Pengantian Media	32
4.7.3.7 Pemanenan Sel	33
4.7.3.8 Perhitungan Sel	34
4.7.3.9 Subkultur Sel	35
4.7.3.10 <i>Cryopreservation</i>	36
4.7.4 Uji Sitotoksik Tunggal	37
4.7.4.1 Preparasi Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD)	37
4.7.4.2 Preparasi Doksorubisin (DOX)	38
4.7.4.3 Preparasi MTT	38
4.7.4.4 <i>Platting</i> Sel	39
4.7.4.5 Pemaparan Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX)	40
4.7.4.6 Uji MTT	42
4.7.5 Uji Sitotoksik Kombinasi	43
4.7.5.1 Preparasi Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD)	43
4.7.5.2 Preparasi Doksorubisin (DOX)	44
4.7.5.3 <i>Platting</i> Sel	44
4.7.5.4 Pemaparan Kombinasi Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX)	45
4.7.5.5 Uji MTT	47
4.8 Pengumpulan Data	49
<b>BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA</b>	<b>50</b>
5.1 Hasil Ekstraksi <i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	50
5.2 Hasil Optimasi Jumlah Sel dan Waktu Inkubasi Sel	50
5.3 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal	51
5.3.1 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD)	52



5.3.2	Hasil Uji Sitotoksik Tunggal Doksorubisin (DOX) .....	53
5.4	Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi .....	57
<b>BAB 6. PEMBAHASAN .....</b>		<b>59</b>
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian .....	59
6.1.1	Ekstraksi <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. ....	59
6.1.2	Efek Sitotoksik Tunggal Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX) .....	60
6.1.2.1	Pengaruh Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) terhadap Viabilitas Sel .....	60
6.1.2.2	Pengaruh Doksorubisin (DOX) terhadap Viabilitas Sel .....	61
6.1.3	Efek Kombinasi Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX) .....	62
6.2	Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian .....	64
6.3	Keterbatasan Penelitian .....	64
<b>BAB 7. PENUTUP .....</b>		<b>65</b>
7.1	Kesimpulan .....	65
7.2	Saran .....	65
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>67</b>



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Senyawa Fitokimia Rumput Lidah Ular .....	9
Tabel 4.1 Interpretasi Nilai <i>Combination Index</i> .....	48
Tabel 5.1 Hasil CI Kombinasi EHD dan DOX .....	58



## DAFTAR GAMBAR

Halaman

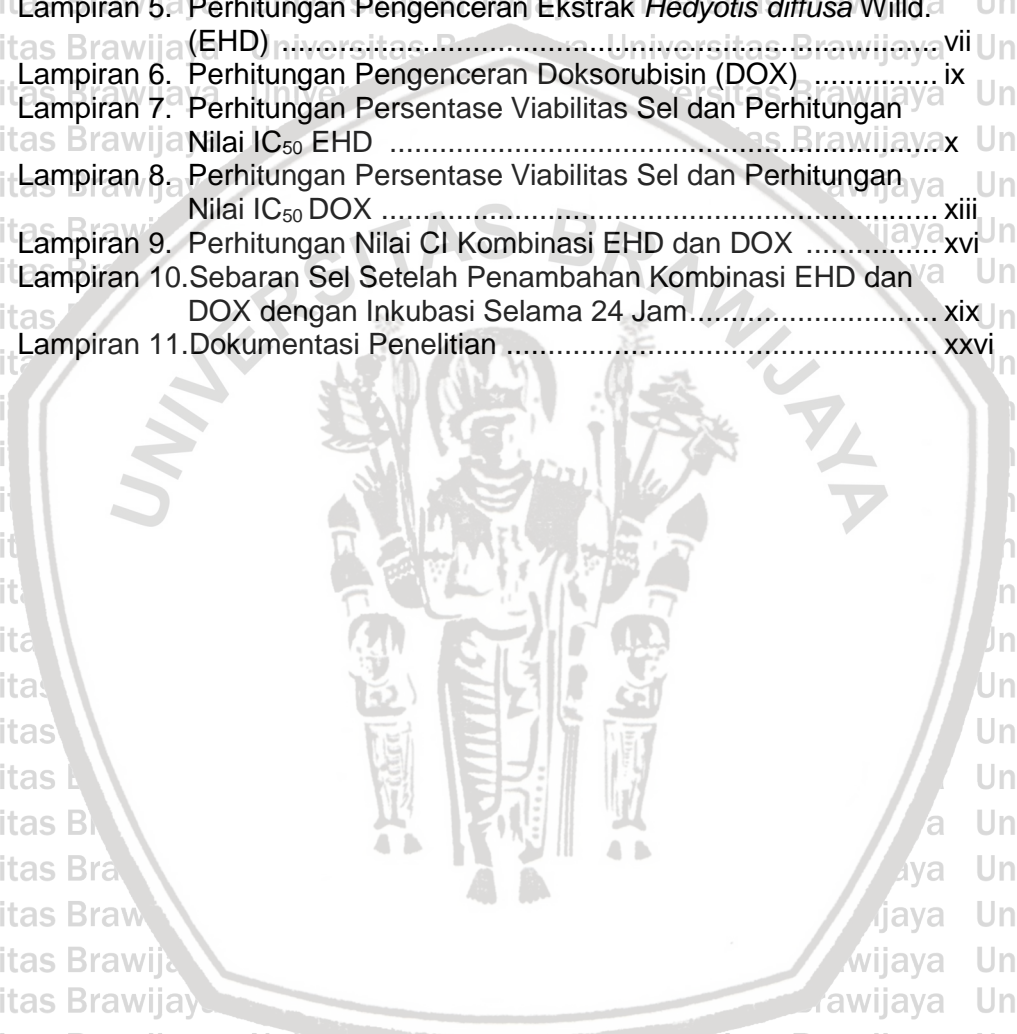
Gambar 2.1 Rumput Lidah Ular .....	7
Gambar 2.2 Struktur Molekul Doksorubisin ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ) .....	11
Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Doksorubisin .....	12
Gambar 2.4 Morfologi Sel MCF-7 .....	14
Gambar 2.5 Isobologram <i>Combination Index</i> .....	16
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	18
Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian .....	25
Gambar 4.2 Hemositometer .....	35
Gambar 4.3 Desain <i>Well Plate</i> Uji Sitotoksik Tunggal .....	41
Gambar 4.4 Desain <i>Well Plate</i> Uji Sitotoksik Kombinasi .....	46
Gambar 5.1 Pengamatan Sebaran Sel pada Optimasi Jumlah Penanaman Sel dan Waktu Inkubasi Sel .....	51
Gambar 5.2 Grafik Pengaruh Pemberian EHD terhadap Viabilitas Sel .....	52
Gambar 5.3 Sebaran Sel Setelah Inkubasi Selama 24 Jam dengan Penambahan EHD .....	54
Gambar 5.4 Grafik Pengaruh Pemberian DOX terhadap Viabilitas Sel .....	55
Gambar 5.5 Sebaran Sel Setelah Inkubasi Selama 24 Jam dengan Penambahan DOX .....	56
Gambar 5.6 Grafik Pengaruh Pemberian Kombinasi EHD dan DOX terhadap Viabilitas Sel .....	57
Gambar 8.1 Grafik Pengaruh Pemberian EHD pada Konsentrasi 800-1500 $\mu\text{g/ml}$ terhadap Viabilitas Sel .....	x
Gambar 8.2 Grafik Pengaruh Pemberian EHD pada Konsentrasi 300-1400 $\mu\text{g/ml}$ terhadap Viabilitas Sel .....	xi
Gambar 8.3 Grafik Pengaruh Pemberian EHD pada Konsentrasi 600-1400 $\mu\text{g/ml}$ terhadap Viabilitas Sel .....	xii
Gambar 8.4 Grafik Pengaruh Pemberian DOX pada Konsentrasi 100-500 nM terhadap Viabilitas Sel .....	xiii
Gambar 8.5 Grafik Pengaruh Pemberian DOX pada Konsentrasi 100-1000 nM terhadap Viabilitas Sel .....	xiv
Gambar 8.6 Grafik Pengaruh Pemberian DOX pada Konsentrasi 100-1000 nM terhadap Viabilitas Sel .....	xv

## DAFTAR SINGKATAN

<b>ATP</b>	: Adenosin trifosfat
<b>BRCA</b>	: <i>Breast Cancer Susceptibility</i>
<b>Caspase</b>	: <i>Cysteine-aspartic Proteases</i>
<b>CDK</b>	: <i>Cycline-Dependent Kinase</i>
<b>CI</b>	: <i>Combination Index</i>
<b>CK</b>	: <i>Cytokeratin</i>
<b>DMEM</b>	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>DOX</b>	: Doksorubisin
<b>EDTA</b>	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EHD</b>	: Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd.
<b>ELISA</b>	: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMA</b>	: <i>Epithelial Membrane Antigen</i>
<b>ER</b>	: <i>Estrogen receptor</i>
<b>FBS</b>	: <i>Foetal Bovine Serum</i>
<b>FDA</b>	: <i>Food and Drug Administration</i>
<b>GATA-3</b>	: <i>GATA Binding Protein 3</i>
<b>HPLC</b>	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IC</b>	: <i>Inhibition Concentration</i>
<b>JNK</b>	: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
<b>LAF</b>	: <i>Laminar Air Flow</i>
<b>MFGM</b>	: <i>Milk Fat Globule Membrane Antigen</i>
<b>MK</b>	: Media Kultur
<b>MTT</b>	: <i>3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide</i>
<b>PBS</b>	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
<b>PHSA</b>	: <i>Provincial Health Services Authority</i>
<b>PI3K/AKT</b>	: <i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase / Ak mouse Thymoma</i>
<b>PR</b>	: <i>Progesterone Receptor</i>
<b>RAS/MEK/ERK</b>	: <i>Ras/MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
<b>RPMI</b>	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RR</b>	: <i>Relative Risk</i>
<b>SDS</b>	: <i>Sodium Doecyl Sulfate</i>
<b>SF</b>	: <i>Serum Free</i>
<b>Topo-II</b>	: <i>Topoisomerase II</i>
<b>TUNEL</b>	: <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kelaikan Etik .....	i
Lampiran 2. <i>Product Sheet</i> MCF7 (ATCC, HTB-22) .....	ii
Lampiran 3. Determinasi Tanaman Rumput Lidah Ular .....	v
Lampiran 4. <i>Product Sheet</i> Doksorubisin .....	vi
Lampiran 5. Perhitungan Pengenceran Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. (EHD) .....	vii
Lampiran 6. Perhitungan Pengenceran Doksorubisin (DOX) .....	ix
Lampiran 7. Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan Nilai IC <sub>50</sub> EHD .....	x
Lampiran 8. Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan Nilai IC <sub>50</sub> DOX .....	xiii
Lampiran 9. Perhitungan Nilai CI Kombinasi EHD dan DOX .....	xvi
Lampiran 10. Sebaran Sel Setelah Penambahan Kombinasi EHD dan DOX dengan Inkubasi Selama 24 Jam .....	xix
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian .....	xxvi



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK RUMPUT LIDAH ULAR (*Hedyotis diffusa* WILLD.) DAN DOKSORUBISIN TERHADAP VIABILITAS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

Oleh:

Rika Parasayu

145070501111005

Telah diuji pada  
Hari : Senin  
Tanggal : 9 Juli 2018  
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D  
NIP. 196701231996011001

Pembimbing-I/Penguji-II,

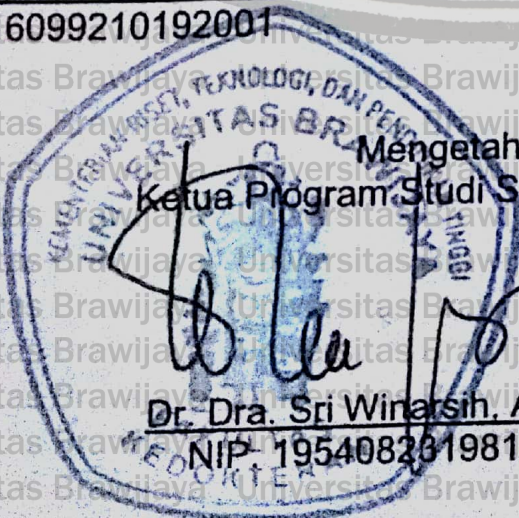
Dra. Diana Lyrawati, M.S., Ph.D., Apt  
NIP. 2016099210192001

Pembimbing-II/Penguji-III,

Oktavia Rahayu A.S.Farm., M.Biomed  
NIP. 2016099210192001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si  
NIP. 195408231981032001



## ABSTRAK

Parasayu, Rika. 2018. **Efek Kombinasi Ekstrak Rumpun Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan Doksorubisin terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara MCF-7**. Tugas Akhir. Program Studi Sarjana Farmasi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dra. Diana Lyrawati, M. S., Ph. D., Apt. (2) Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Penggunaan doksorubisin sebagai kemoterapi kanker payudara sering kali dibatasi akibat toksisitasnya terhadap jantung. Rumpun lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) merupakan obat bahan alam yang banyak diresepkan dalam herbal Cina untuk pengobatan kanker payudara. *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin dikombinasikan sehingga dapat menurunkan dosis doksorubisin yang digunakan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin, efek kombinasi yang ditimbulkan, serta kombinasi konsentrasi yang dapat menimbulkan efek sinergis. *Hedyotis diffusa* Willd. diekstraksi dengan metode maserasi dalam pelarut etanol 80%. Kultur sel MCF-7 diberikan perlakuan dengan 7 seri konsentrasi selama 24 jam, kemudian nilai  $IC_{50}$  diukur menggunakan metode MTT. Kombinasi diberikan dengan konsentrasi  $1/2 IC_{50}$ ,  $3/8 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ , dan  $1/8 IC_{50}$  kemudian dihitung nilai CI. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. sebesar  $930 \pm 30,143 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0001$ ) dan doksorubisin sebesar  $490 \pm 83,293 \text{ nM}$  ( $p < 0,0001$ ). Kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin didapatkan efek sinergis pada kombinasi konsentrasi doksorubisin 61 nM dengan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. 116  $\mu\text{g/ml}$  dan 232  $\mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin mampu menimbulkan efek sinergis berdasarkan nilai CI.

Kata kunci: *Hedyotis diffusa* Willd., Doksorubisin, Viabilitas, *Combination Index*

## ABSTRACT

Parasayu, Rika. 2018. **Combination Effect of Snake Tongue Grass (*Hedyotis diffusa* Willd.) and Doxorubicin on The Viability of Breast Cancer Cell MCF-7**. Final Assignment. Pharmacy Program. Faculty of Medicine. Brawijaya University. Supervisors: (1) Dra. Diana Lyrawati, M. S., Ph. D., Apt. (2) Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Doxorubicin as chemotherapy for breast cancer is often limited due to its toxicity to the heart. Snake tongue grass (*Hedyotis diffusa* Willd.) is a herbal medicine prescribed in China as breast cancer treatment. *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin was combined to decrease doxorubicin's dose used. In this study, we investigated IC<sub>50</sub> value of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin, their combination effects, and the concentrations that can have synergistic effects. *Hedyotis diffusa* Willd. was extracted using maceration method in 80% ethanol solvent. MCF-7 cell cultures were treated with 7 series concentrations for 24 hours, then IC<sub>50</sub> values were measured using MTT assay. The concentrations used for combination assay were 1/2 IC<sub>50</sub>, 3/8 IC<sub>50</sub>, 1/4 IC<sub>50</sub>, and 1/8 IC<sub>50</sub> then CI value was calculated. The IC<sub>50</sub> value of *Hedyotis diffusa* Willd. was 930 ± 30.143 µg/ml ( $p < 0.0001$ ) and doxorubicin was 490 ± 83,293 nM ( $p < 0.0001$ ). The combination of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin showed a synergistic effect on the concentration combination of doxorubicin was 61 nM and *Hedyotis diffusa* Willd. was 116 µg/ml and 232 µg/ml. Based on these results, the combination of *Hedyotis diffusa* Willd. and doxorubicin causes synergistic effects based on CI values.

Keywords: *Hedyotis diffusa* Willd., Doxorubicin, Viability, Combination Index



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker payudara adalah keganasan yang terjadi pada jaringan payudara yang dapat berasal dari lobulus ataupun epitel duktus, dimana kanker payudara termasuk salah satu jenis kanker terbanyak di Indonesia. Kanker payudara di Amerika menyerang hampir 92 dari 100.000 wanita, sedangkan di Indonesia kejadiannya mencapai 12 dari 100.000 wanita dengan angka kematian cukup tinggi yaitu mencapai 27 dari 100.000 wanita atau sekitar 18% (Kemenkes RI, 2009). Menurut *Population-based Cancer Registration in Indonesia*, kanker payudara menjadi kanker yang paling banyak terjadi pada wanita di tahun 2005-2007 dengan angka kejadian sebesar 18,6 per 100.000 wanita (Wahidin *et al.*, 2012). Selain itu, berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit pada tahun 2007, diketahui bahwa kanker payudara pada pasien rawat inap di Rumah Sakit seluruh Indonesia telah menjadi kasus nomor satu dengan angka kejadian sebesar 8.227 kasus atau 16,85%. Keadaan yang sama terjadi di Provinsi Jawa Timur dimana kanker payudara menjadi kasus nomor satu pada pasien rawat inap maupun pasien rawat jalan (Rahmatari, 2014).

Kebanyakan kanker payudara adalah adenokarsinoma yang dimulai pada jaringan kelenjar (American Cancer Society, 2018). Sel *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) merupakan lini sel kanker payudara yang diambil dari jaringan payudara pasien adenokarsinoma. Sel MCF-7 mempunyai karakteristik antara lain mengekspresikan *estrogen reseptor* (ER) positif, tidak mengekspresikan *caspase-3*,

dan hipertriploid (ATCC, 2008). Hipertriploid menyebabkan sel kanker berkembang dengan lebih cepat, sehingga diperlukan terapi berupa kemoterapi. Kemoterapi yang saat ini masih efektif penggunaannya untuk kanker payudara adalah doksorubisin.

Doksorubisin merupakan obat antrasiklin pertama yang diisolasi dari *Streptomyces peucetius* var. *caesius* pada 1970-an dan sering digunakan sebagai pengobatan dalam kanker termasuk kanker payudara, kanker paru-paru, kanker lambung, kanker rahim, serta kanker tiroid (Thorn *et al.*, 2011). Doksorubisin mempunyai kemampuan dalam menghambat pembelahan sel secara cepat dan memperlambat perkembangan penyakit yang telah diakui secara luas selama beberapa dekade (Tacar *et al.*, 2013).

Namun, penggunaan doksorubisin sendiri seringkali dibatasi akibat toksisitas terhadap jantung ditimbulkan yang tergantung pada akumulasi dosis yang digunakan (PHSA, 2017).

Terapi kanker payudara dapat dibantu dengan memanfaatkan bahan alamiah.

Penderita kanker menggunakan obat bahan alam sebagai pencegahan primer, pencegahan kambuhnya kanker, meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mengurangi efek samping akibat penggunaan pengobatan modern (Safarzadeh *et al.*, 2014). Pengobatan herbal Cina banyak meresepkan rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) untuk pasien kanker payudara dan kanker usus besar. Berdasarkan data statistik dari *National Health Insurance Research Database of Taiwan*, *Hedyotis diffusa* Willd. ini memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antikanker, imunomodulator, antioksidan, dan anti-inflamasi (Chen *et al.*, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2010) mengamati bahwa kandungan metil antrakuinon dari rumput lidah ular menginduksi apoptosis sel MCF-7 (Liu *et al.*, 2010).

Uraian diatas mendukung untuk dilakukan penelitian mengenai kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin yang diharapkan mampu memberikan efek yang sinergis sehingga dapat menurunkan dosis doksorubisin yang dibutuhkan, sehingga dapat menurunkan toksisitas doksorubisin. Efek kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin diukur menggunakan *combination index* (CI) dengan melihat perubahan viabilitas sel MCF-7, sehingga didapatkan dosis kombinasi yang tepat.

**1.2 Rumusan Masalah**

- 1.2.1 Apakah ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mempunyai efek sitotoksik berdasarkan nilai viabilitas sel pada kultur sel MCF-7?
- 1.2.2 Apakah kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mampu memberikan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan *combination index* (CI) pada kultur sel MCF-7?

**1.3 Tujuan Penelitian**

**1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan bahwa ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mampu memberikan efek sitotoksik pada kultur sel MCF-7.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Menentukan jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin yang mampu memberikan efek sitotoksik yang sinergis pada kultur sel MCF-7 berdasarkan *combination index* (CI).

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi yang berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang bahan alam dan biomedik terutama mengenai jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin yang memberikan interaksi sinergis terhadap sel kanker payudara.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Melalui penelitian ini diharapkan mahasiswa dapat berkontribusi dalam pengembangan obat bahan alam untuk terapi tambahan kanker payudara menggunakan kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Payudara

##### 2.1.1 Definisi

Kanker merupakan suatu proses penyakit yang ditandai oleh adanya proliferasi atau pembelahan sel yang tidak terkontrol sehingga menimbulkan adanya massa atau tumor (Wulandari, 2008). Kanker payudara merupakan keganasan di sel kelenjar, saluran kelenjar, ataupun jaringan penunjang pada payudara, dimana kanker payudara ini ditandai dengan adanya benjolan pada payudara yang bahkan pada stadium lanjut dapat menyebabkan rasa sakit (Sihombing & Saparudin, 2014). Kanker payudara sendiri termasuk dalam salah satu jenis kanker yang sering terjadi pada wanita, walaupun tidak menutup kemungkinan laki-laki juga dapat menderita kanker payudara. Namun, kasus kanker payudara pada pria sangat jarang terjadi (Rahmatari, 2014).

##### 2.1.2 Epidemiologi

Kanker yang paling sering terjadi didunia adalah kanker paru-paru yaitu sebesar 1,8 juta, kanker payudara sebesar 1,7 juta dan kanker kolorektum sebesar 1,4 juta. Kanker menyerang 12,7 juta orang dan 7,6 juta diantaranya meninggal di tahun 2008. Berdasarkan data GLOBOCAN 2012, sebanyak 56,8% kanker terjadi di negara berkembang dengan angka kematian 64,9% dan akan terus meningkat seiring dengan peningkatan pertumbuhan dan penuaan populasi secara global. Wanita yang didiagnosa mengalami kanker payudara di tahun 2012 sebesar 1,7 juta wanita dan

6,3 juta wanita hidup setelah didiagnosa mengalami kanker payudara selama 5 tahun.

Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering menyebabkan kematian pada wanita dengan jumlah kasus sebesar 522.000 wanita yang meninggal pada tahun 2012 pada 140 negara (IARC, 2013).

**2.1.3 Patofisiologi**

Kanker payudara biasanya terjadi akibat adanya interaksi antara lingkungan dan faktor genetik. Jalur PI3K/AKT (*Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase / Akt mouse thymoma*) dan RAS/MEK/ERK (*Ras/MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinases*) menjaga sel normal dari apoptosis. Saat gen yang mengkode jalur proteksi ini mengalami mutasi, sel menjadi tidak mampu untuk melakukan apoptosis saat sel tersebut tidak lagi dibutuhkan, dimana hal ini akan memicu perkembangan dari kanker. Mutasi ini dibuktikan secara eksperimental menggunakan paparan estrogen.

Adanya abnormalitas dalam faktor pertumbuhan dapat memfasilitasi pertumbuhan sel ganas. Ekspresi berlebih dari jaringan adiposa payudara leptinin dapat meningkatkan proliferasi sel kanker. Beberapa mutasi yang berkaitan dengan kanker seperti p53, *BRCA1* dan *BRCA2*, terjadi dalam mekanisme koreksi *Deoxyribonucleic acid (DNA)*

yang menyebabkan pembelahan tidak terkontrol dan metastase ke organ yang lebih jauh. Mutasi pada gen *BRCA1* dan *BRCA2* dapat mengganggu *cross link* DNA dan pemecahan rantai ganda DNA. *GATA-3 (GATA Binding Protein 3)* secara langsung mengontrol ekspresi dari reseptor estrogen (ER) dan gen lain yang berhubungan dengan diferensiasi epitel payudara. Kurangnya *GATA-3* menyebabkan hambatan dalam diferensiasi dan prognosis yang lemah sehingga meningkatkan invasi sel kanker dan metastase ke organ lain (Kabel & Baali, 2015).

Pemeriksaan imunohistokimia telah digunakan luas sebagai dasar pemilihan terapi hormonal dan *targeting therapy*. Imunohistokimia digunakan untuk mengkarakterisasi protein intraseluler atau sel permukaan di semua jaringan, mengetahui subtype tumor serta membedakan metastasis tumor primer. Kelenjar payudara normal terdiri dari tiga tipe sel yang mengekspresikan subset protein berbeda antara lain luminal, basal, dan myoepitel. Sel luminal mengekspresikan *cytokeratin* (CK) 7, CK 8, CK 18, CK 19, *epithelial membrane antigen* (EMA), *milk fat globule membrane antigen* (MFGM), *α-lactalbumin*, *estrogen receptor* (ER), dan *progesterone receptor* (PR). Sel myeloepitel mengekspresikan tipe sel basal CK dan marker spesifik yaitu aktin otot polos, kalponin, S100, dan p63. Sedangkan sel basal mengekspresikan CK 5, CK 6, CK 14, dan CK 17 (Zaha, 2014).

## 2.2 *Hedyotis diffusa* Willd.

### 2.2.1 Taksonomi



**Gambar 2.1 Rumpul Lidah Ular (Sumber: Dokumentasi Pribadi).**

Rumput lidah ular atau *Hedyotis diffusa* Willd. ini mempunyai nama lokal lidah-tiong di Jawa, daniri di Thailand dan *Bai Hua She She Cao* di Cina. (GBIF, 2017; IUCN, 2017). Berikut adalah taksonomi dari rumput lidah ular (Cho, 2011):

- Kingdom : Plantae
- Super divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Sub kelas : Asteridae
- Ordo : Gentianales
- Famili : Rubiaceae
- Genus : *Hedyotis*
- Spesies : *Hedyotis diffusa* Willd.
- Sinonim : *Oldenlandia diffusa* Willd.

**2.2.2 Morfologi dan Habitat**

Rumput lidah ular merupakan tumbuhan yang bercabang mencapai 50 cm dengan cabang yang ramping berada diatas tanah atau tumbuh naik keatas, cabangnya halus. Daunnya berbentuk elips atau linear seperti pisau pembedah yang panjangnya 1 sampai 3 cm. Tumbuhan ini mempunyai bunga berwarna putih yang berada pada ujung cabang sejumlah satu buah (*homostylous*) dengan panjang sekitar 3 mm. Buahnya berbentuk seperti kapsul, dan menyerupai telur yang panjangnya kurang lebih 4 mm (Rui-jiang et al., 2014; Stuart, 2014).

Rumput lidah ular ini dapat ditemui di negara-negara seperti Banglades, Butan, Cina, India, Indonesia, Jepang, Malaysia, Nepal, Filipina, Singapura, Sri Lanka,



Thailand. Tanaman ini mempunyai habitat di tempat berpasir, termasuk dataran rendah basah dan sawah (IUCN, 2017).

### 2.2.3 Kandungan Kimia

Penelitian-penelitian yang dilakukan pada *Hedyotis diffusa* Willd. telah menerangkan beberapa senyawa fitokimia, diantaranya dapat dilihat pada **Tabel 2.1** (Chen *et al.*, 2016).

**Tabel 2.1 Senyawa Fitokimia Rumput Lidah Ular**

Nama Golongan	Keterangan
Iridoid	32 jenis iridoid dan glukosida iridoid telah diisolasi, diantaranya <i>asperuloside</i> , <i>deacetyl asperuloside</i> , <i>asperuloside acid</i> , dan <i>deacetyl asperulosidic acid</i> . Iridoid mempunyai beberapa aktivitas seperti anti-oksidan, neuroprotektif, dan anti-inflamasi.
Triterpenoid	Terdiri dari arborinon, isoarborinon, <i>oleanolic acid</i> , dan <i>ursolic acid</i> .
Flavonoid	26 flavonoid telah diisolasi diantaranya kaempferol, kuarsetin, <i>chrysin</i> , <i>oroxilin</i> , dan wogonin.
Antrakuinon	Senyawa antrakuinon rumput lidah ular mempunyai karakteristik yaitu pada skeleton antrakuinon 9, 10 terdapat hidroksi, metil dan atau kelompok metoksi, seperti 2-hidroksi-3-metilantrakuinon.
Asam Fenol	23 senyawa asam fenol dan derivatnya telah berhasil diidentifikasi, diantaranya <i>caffeoyl hexoside</i> , <i>ferulic acid</i> , dan <i>p-Coumaric acid</i> .
Sterol	Hanya 4 sterol yang dapat diisolasi, diantaranya daukosterol, $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, dan stigmasterol-5,2-diene-3 $\beta$ .
Polisakarida	Hanya satu senyawa polisakarida yang dapat diisolasi yaitu ODP-1. Senyawa ini telah dilakukan uji aktivitas dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh.
Siklotida	Terdapat 3 senyawa yang telah diisolasi antara lain CD1, CD2, dan CD3.
Kumarin	Dua senyawa kumarin yang diidentifikasi yaitu 7-hidroksi-6-metoksi-kumarin dan eskuletin.
Alkaloid	Dua senyawa alkaloid yang berhasil diidentifikasi adalah <i>10(S)-hydroxy pheophytin a</i> dan <i>aurantiamide acetate</i> .

Dong *et al.* (2014) menyebutkan bahwa ekstrak alkaloid/flavonoid mempunyai aktivitas antitumor lebih besar daripada antrakuinon, glukosida iridoid, dan stigmasterol terhadap lini sel MCF-7 (Dong *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan Gu

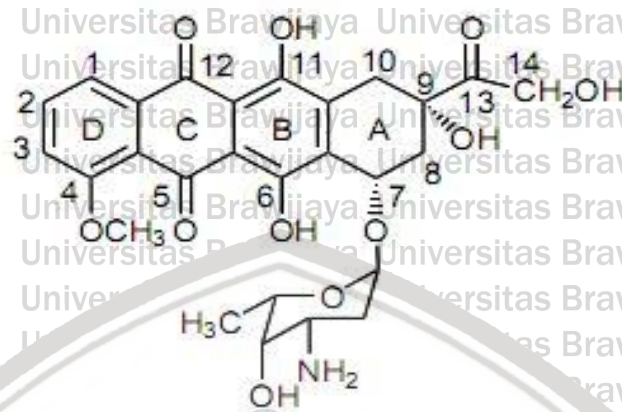
*et al.* (2012) mengisolasi *ursolic acid*, dan asam oleanolat dan ditemukan bahwa kedua senyawa ini efektif dalam menurunkan resistensi tamoksifen dari derivat lini sel MCF-7 yang resisten terhadap terapi anti-estrogen (Gu *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2010) melakukan penelitian untuk mengetahui mekanisme apoptosis yang dimediasi oleh metil antrakuinon pada lini sel MCF-7. Pada penelitian tersebut diketahui bahwa terjadi peningkatan persentase sel apoptosis, kalsium intraseluler, fosforilasi *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), dan aktivasi *calpain*. Selain itu terjadi penurunan membran potensial mitokondria dan sitokrom c yang dikeluarkan dari mitokondria ke sitosol. Metil antrakuinon juga diketahui secara kuat dapat mengaktifasi *caspase-4*, *caspase-9*, dan *caspase-7* pada lini sel MCF-7 (Liu *et al.*, 2010).

**2.3 Doksorubisin**

**2.3.1 Deskripsi**

Antibiotik antrasiklin yang pertama kali ditemukan dan diisolasi adalah daunorubisin pada awal tahun 1957 dari aktinobakteri *Streptomyces peucetius*. Pada akhir tahun 1969, ditemukan doksorubin, sebuah analog daunorubisin. Sejak saat itu, banyak dilakukan penelitian terkait farmakodinamik dan farmakokinetik dari doksorubisin (Lu, 2010). Struktur molekul doksorubisin dapat dilihat pada **Gambar**

**2.2.**



**Gambar 2.2. Struktur Molekul Doksorubisin ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ) (Lu, 2010).**

Doksorubisin tersusun dari nukleus naptasenkuinon yang berikatan melalui ikatan *glycosidic* pada cincin atom 7 ke amino gula, daunosamin.

Doksorubisin merupakan antibiotik antrasiklin yang diisolasi dari *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Doksorubisin mengikat asam nukleat, yang diduga terjadi akibat adanya interkalasi spesifik planar inti antrasiklin dengan DNA untai ganda.

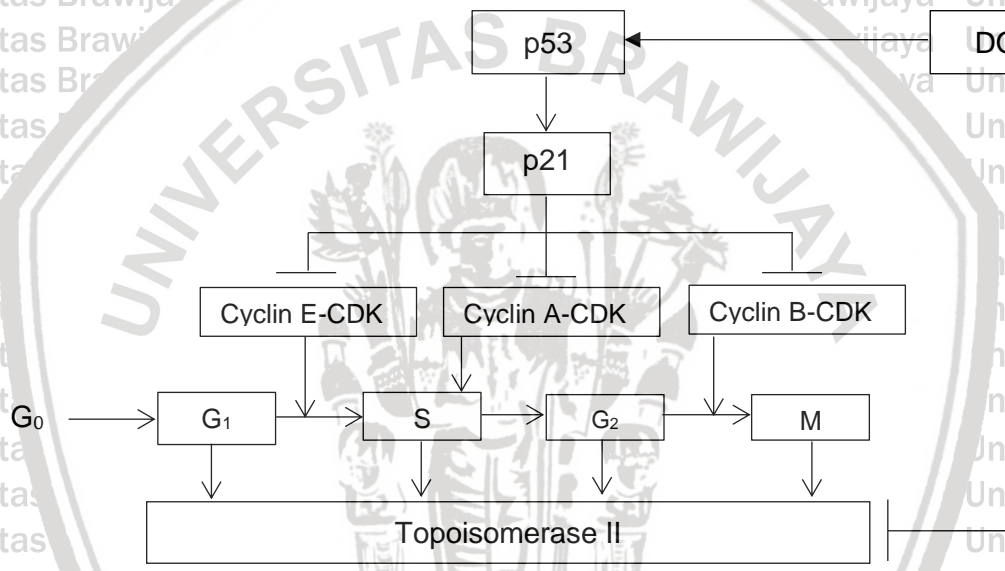
Cincin antrasiklin bersifat lipofilik, tetapi sistem cincin ini mengandung gugus hidroksil yang melimpah yang bersebelahan dengan gula amino sehingga menjadi hidrofilik.

Molekul ini bersifat amfoterik yang mengandung fungsi asam pada kelompok cincin fenol dan fungsi basa pada kelompok gula amino (FDA, 2003).

### 2.3.2 Mekanisme Kerja

Dua mekanisme yang telah diketahui dalam aktivitas antikanker doksorubisin antara lain dengan mengikat DNA secara langsung dengan interkalasi diantara pasangan basa pada untai DNA dan mengganggu perbaikan DNA yang dimediasi oleh topoisomerase II (topo II), serta pembentukan radikal bebas dan kerusakan membran sel DNA akibat kompleks yang terbentuk antara doksorubisin dan besi (Thorn *et al.*, 2011; PHSA, 2017).

Minotti *et al.* (2004) merangkumkan mekanisme kerja dari aktivitas antikanker doksorubisin meliputi hambatan pada topo II yang distimulasi oleh interkalasi DNA, kerusakan oksidatif oleh radikal bebas, apoptosis yang diinduksi oleh jalur protein penekan tumor p53 dan interkalasi dengan proteasom yang memediasi transport doksorubisin dalam nukleus (Lu, 2010). Mekanisme kerja doksorubisin dapat dilihat pada **Gambar 2.3.**



**Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Doksorubisin**

Doksorubisin menginduksi protein pensupresi tumor p53 sehingga p53 mengekspresikan p21 sebagai regulator sangat berperan penting terhadap regulasi siklus sel. Protein p21 akan menghambat kompleks cyclin-CDK sehingga menghambat sintesis DNA. Doksorubisin juga dapat menghambat enzim topoisomerase 2 yang berperan penting dalam perubahan topologis DNA. Dimodifikasi dari: Lu, 2010.

Hambatan topoisomerase II menyebabkan kerusakan untai ganda DNA dan kematian sel. Topoisomerase II merupakan enzim adenosin trifosfat (ATP)-*depending* yang mempunyai dua bentuk pada manusia yaitu topoisomerase II $\alpha$  dan topoisomerasi II $\beta$ . Interaksi antara doksorubisin dan DNA dapat menstabilisasi ikatan

kovalen yang dimediasi oleh formaldehida seluler yang berasal dari reaksi radikal bebas dari sumber karbon seperti lipid. Struktur kuinon doksorubisin dapat dioksidasi menjadi radikal semikuinon dengan penambahan satu elektron. Radikal semikuinon ini secara cepat bereaksi dengan oksigen untuk menghasilkan superoksida dan hydrogen peroksida yang menyebabkan kerusakan DNA (Yang *et al.*, 2014).

Doksorubisin dapat meningkatkan kadar gen penekan tumor p53. Akibatnya, regulasi *cyclin-dependent kinase* (CDK) meningkat dan menghambat protein p21, sehingga menghambat sintesis DNA. Pada jalur yang lain, doksorubisin secara langsung merusak mitokondria sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom c sehingga terjadi apoptosis dari sel kanker (Lu, 2010).

#### 2.4 **Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7)**

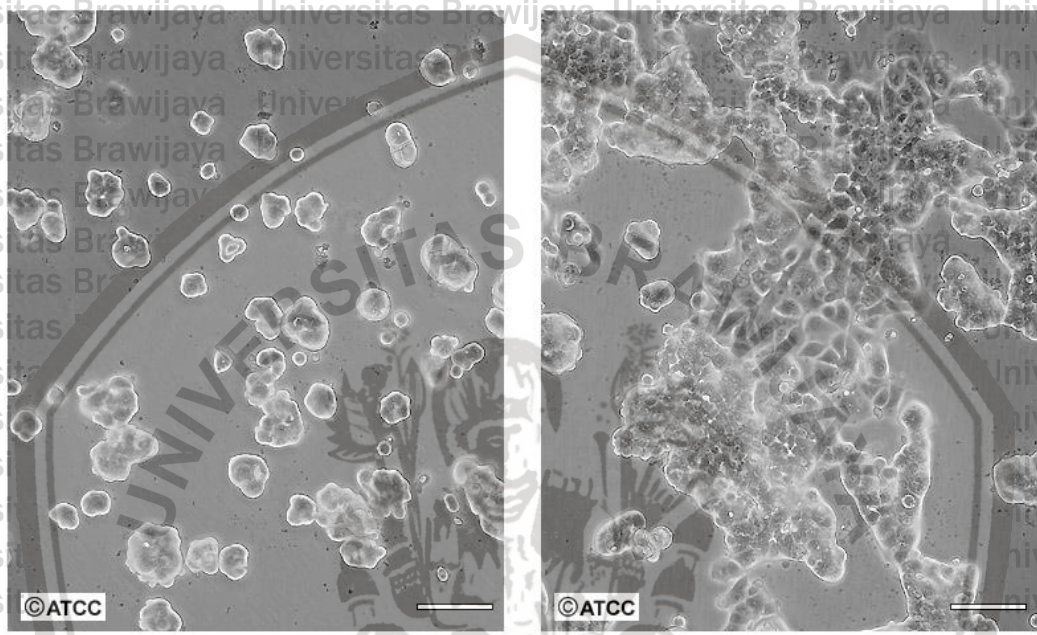
Sel MCF-7 merupakan sel yang diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara, dimana sel ini menyerupai sel epitel dan tumbuh secara *monolayer*. Sel MCF-7 ini sering atau umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara secara *in vitro*. Biakan dari sel MCF-7 ini mempunyai karakteristik-karakteristik tertentu pada epitel mammae, termasuk kemampuannya untuk memproduksi estradiol melalui reseptor dan sitoplasma (Widowati and Mudahar, 2009).

Sel MCF-7 diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berusia 69 tahun dengan golongan darah O dan rhesus positif. Sel ini dapat ditumbuhkan pada media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) atau *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung antibiotik Penisilin-Streptomisin 1% dan *Foetal*

*Bovine Serum* (FBS) 10% (Yunas *et al.*, 2017). Morfologi sel MCF-7 dapat dilihat pada

**Gambar 2.4.**

ATCC Number: **HTB-22**  
Designation: **MCF-7**



**Gambar 2.4 Morfologi Sel MCF-7 (ATCC, 2008).**

Morfologi sel MCF-7 dengan skala baris 100µm. Sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media *Eagle's Minimum Essential Medium* dengan insulin rekombinan manusia 0,01 mg/ml dan *Fetal Bovine Serum* 10%.

### 2.5 Interaksi Obat

Interaksi antara obat konvensional dengan obat bahan alam dapat meningkatkan atau menurunkan efek farmakologi dan efek toksik. Efek sinergis biasanya terjadi pada terapi jangka panjang seperti penggunaan obat bahan alam untuk menurunkan kadar glukosa darah pada pasien diabetes, secara teori dapat menyebabkan hipoglikemia jika digunakan bersama dengan obat konvensional.

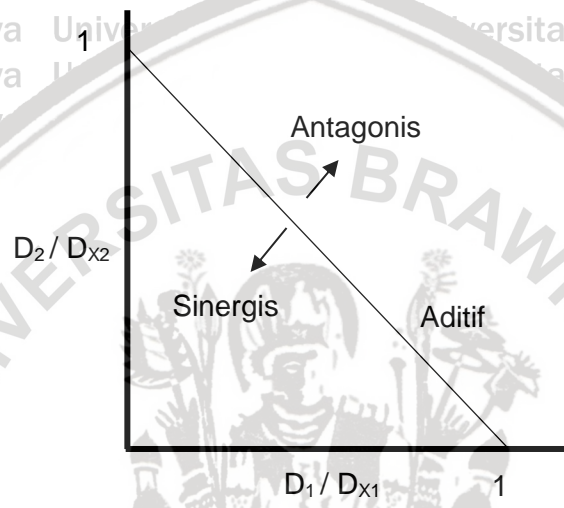
Interaksi obat didefinisikan sebagai adanya modifikasi yang disebabkan oleh senyawa eksogen dalam diagnosa, terapi, maupun aksi lain dari obat didalam tubuh.

Mekanisme interaksi obat secara umum dibagi menjadi dua yaitu farmakokinetik yang terdiri dari absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi; serta farmakodinamik yang terdiri dari sinergis, aditif dan antagonis. Adanya obat bahan alam dapat menurunkan/menaikkan absorpsi obat dalam tubuh dengan berbagai mekanisme. Pada proses distribusi obat, obat bahan alam erat kaitannya dengan ikatan protein plasma yang berpengaruh terhadap konsentrasi obat bebas didalam darah. Obat bahan alam dapat menginduksi/menghambat sitokrom P-450 sehingga dapat mempengaruhi proses metabolisme obat didalam tubuh (Ismail, 2009). Penggunaan obat bahan alam dan obat konvensional secara bersamaan yang menimbulkan efek yang lebih besar daripada jumlah efek dari kedua terapi tersebut, disebut dengan interaksi sinergis. Interaksi aditif terjadi apabila efek dari penggunaan obat bahan alam dan obat konvensional secara bersamaan menimbulkan efek yang sama dengan penjumlahan efek tiap-tiap terapi. Sedangkan interaksi antagonis terjadi saat efek dari penggunaan obat konvensional dengan obat bahan alam secara bersamaan menimbulkan efek yang kurang dari jumlah efek dari kedua terapi tersebut (Suprapti, 2008).

**2.6 Combination Index (CI)**

Kombinasi obat banyak digunakan untuk pengobatan penyakit seperti kanker dan *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS). Alasan utama kombinasi obat ini adalah untuk mendapatkan efek terapeutik yang sinergis, menurunkan dosis dan toksisitas, serta meminimalisir resistensi. Tahun 1984, Chou dan Talalay memperkenalkan konsep "*Combination Index*" (CI) yang secara kuantitatif menggambarkan efek sinergis, aditif, dan antagonis. Chou dan Talalay

mendefinisikan “*combination index*” menggunakan kombinasi dosis,  $d_1$  dari agen A dicampur dengan  $d_2$  dari agen B. Nilai  $CI < 1$  maka kombinasi dapat dideskripsikan sebagai sinergisme, jika  $CI > 1$  maka antagonisme dan jika  $CI = 1$  maka aditif. Grafik isobologram *combination index* dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



**Gambar 2.5 Isobologram *Combination Index* (Chou, 2010)**

Nilai  $CI = 1$  dideskripsikan sebagai efek aditif, nilai  $CI > 1$  dideskripsikan sebagai efek antagonis, dan nilai  $CI < 1$  dideskripsikan sebagai efek sinergis.

Analisa dosis-efek pada  $CI$  didasarkan pada hukum aksi-massa. Penentuan efek sinergis kombinasi obat berdasarkan hukum aksi-massa tidak tergantung dari mekanisme kerjanya. Hal ini dapat diakibatkan oleh minimnya pengetahuan mengenai mekanisme kerja suatu senyawa serta mode aksi suatu senyawa yang berbeda-beda.

Contohnya apabila suatu obat dapat meningkatkan atau menurunkan ekspresi gen tertentu yang tidak diketahui secara pasti apakah berdampak pada efek sinergisme kedua senyawa. *Combination index* dapat dikalkulasikan sebagai berikut (Chou, 2010; Le, 2014):



$$CI = \frac{D1}{Dx1} + \frac{D2}{Dx2}$$

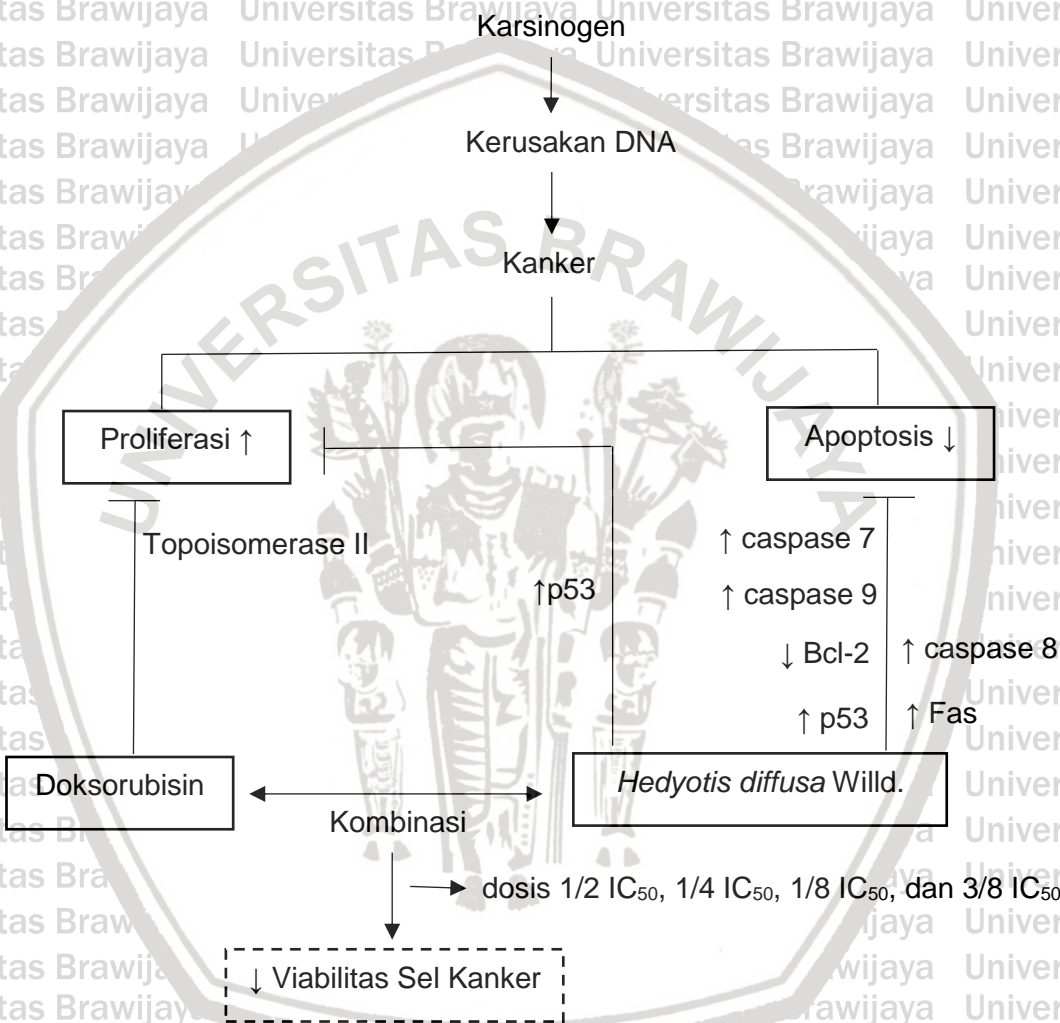
DX: Kombinasi terapi tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi. D1, D2: Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama.



### BAB 3

## KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

#### Keterangan:

- : menginduksi
- : menghambat
- ↔ : kombinasi
- : variabel yang tidak diteliti
- ▭ : variabel yang diteliti

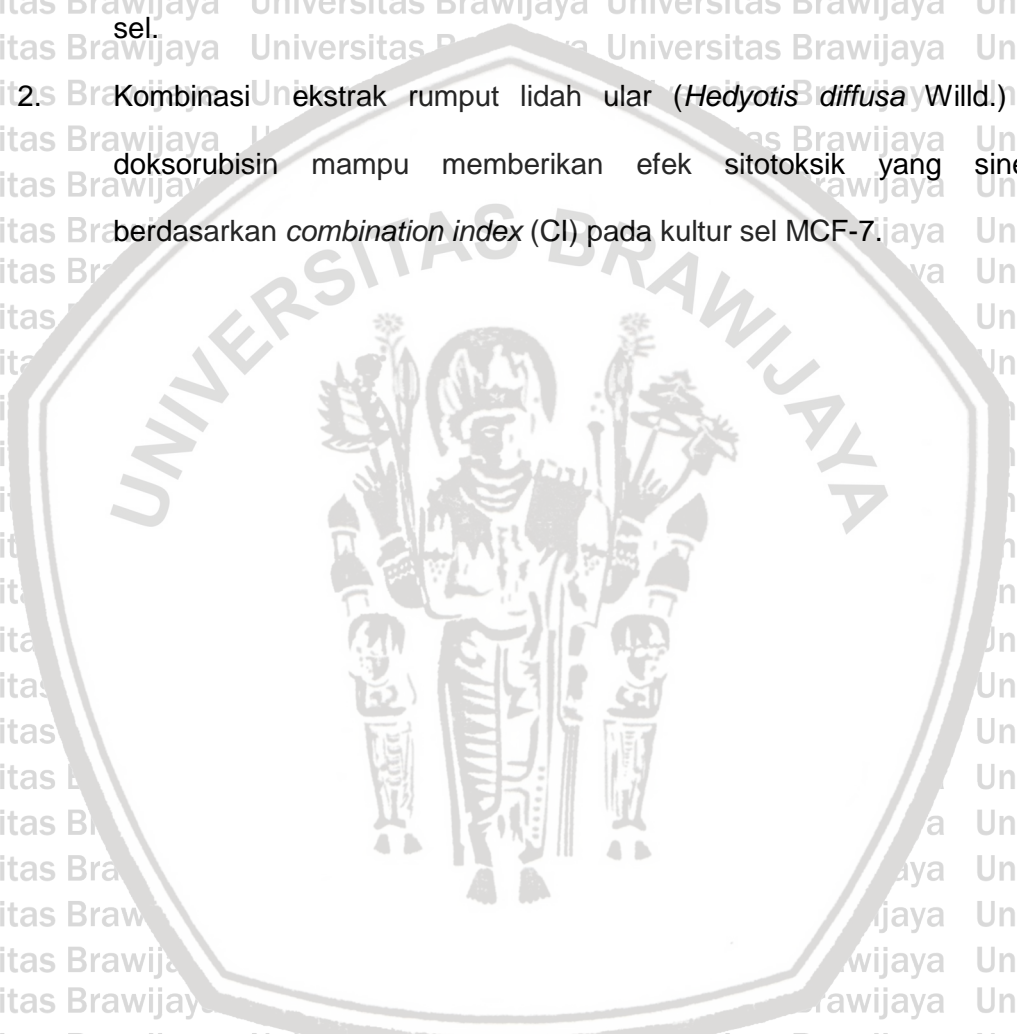
Adanya karsinogen dapat menyebabkan kerusakan DNA yang memicu terjadinya kanker. Kanker timbul karena adanya proliferasi sel yang tinggi dan apoptosis yang rendah. Dokсорubisin merupakan obat konvensional antikanker yang dapat menurunkan proliferasi sel dengan cara menghambat kerja dari enzim topoisomerase II yang berperan penting dalam perubahan bentuk topologis DNA selama proses replikasi dan transkripsi. *Hedyotis diffusa* Willd. merupakan obat bahan alam yang banyak dikembangkan di Cina sebagai terapi kanker dengan menginduksi protein pensupresi tumor p53 yang berperan penting dalam menjaga homeostasis sel dengan cara menginduksi ekspresi protein p21 sebagai regulator siklus sel. *Hedyotis diffusa* Willd. diketahui dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Pada jalur ekstrinsik yaitu dengan menginduksi ikatan antara FasR dan FasL. Pada apoptosis jalur ekstrinsik *Hedyotis diffusa* Willd. juga dapat mengaktifasi *caspase 8* sebagai *caspase* inisiator. *Hedyotis diffusa* Willd. diketahui dapat menyebabkan penurunan protein Bcl-2. Penurunan protein Bcl-2 sebagai protein anti-apoptosis ini dapat menginduksi adanya apoptosis pada jalur intrinsik. Pada apoptosis jalur intrinsik lainnya, *Hedyotis diffusa* Willd. diketahui dapat mengaktifasi *caspase* inisiator lainnya yaitu *caspase 9*, serta mengaktifasi *caspase* eksekutor yaitu *caspase 7*.

Pengobatan antikanker dengan obat konvensional banyak menimbulkan adanya resistensi dan toksisitas. Merujuk pada hal tersebut, dalam penelitian ini akan dilakukan kombinasi antara obat konvensional yaitu dokсорubisin dan obat bahan alam yaitu ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dengan beberapa dosis yang berbeda yaitu  $1/2 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ ,  $1/8 IC_{50}$ , dan  $3/8 IC_{50}$  kemudian diukur viabilitas sel kanker sehingga dapat diketahui jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi yang tepat untuk menghasilkan efek sinergis berdasarkan *Combination Index* (CI).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini antara lain:

1. Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mempunyai efek sitotoksik pada kultur sel MCF-7 berdasarkan viabilitas sel.
2. Kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mampu memberikan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan *combination index* (CI) pada kultur sel MCF-7.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain eksperimen murni (*true experimental design*) menggunakan *randomized post test only controlled group design* yang dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dengan doksorubisin yang menghasilkan efek sinergis terhadap kultur sel MCF-7. Surat kelaikan etik (**Lampiran 1**).

### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah lini sel kanker payudara MCF-7. Sel MCF-7 diperoleh dari Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (**Lampiran 2**).

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak rumput lidah ular dan doksorubisin. Variabel terikat yang digunakan adalah nilai *combination index* yang dihitung menggunakan dosis  $IC_{50}$  dari hasil uji MTT pada seri konsentrasi ekstrak yang berbeda yaitu  $1/2 IC_{50}$ ,  $3/8 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ , dan  $1/8 IC_{50}$ .

Variabel kontrol yang digunakan adalah sel MCF-7, waktu inkubasi, dan kondisi inkubasi yaitu  $37^{\circ}C \pm 5\% CO_2$ .

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di beberapa tempat. Proses ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Divisi Bahan Alam FKUB. Sedangkan kultur sel dan perlakuan terapi sel akan dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini akan dilakukan mulai dari Oktober 2017 hingga Mei 2018.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.7.5.1 Ekstraksi *Hedyotis diffusa* Willd.

Bahan yang dibutuhkan untuk ekstraksi yaitu herba rumput lidah ular dan etanol 80%. Herba rumput lidah ular didapatkan dari rumput lidah ular yang tumbuh liar dan telah diidentifikasi spesies oleh Balai Materia Medika (BMM) Kota Batu, Jawa Timur (**Lampiran 3**). Alat yang digunakan adalah toples (maseurator), *rotary evaporator*, batang pengaduk, spatel, *stirrer*, erlenmeyer, cawan porselen, oven, dan timbangan analitik.

##### 4.7.5.2 Kultur Sel

Bahan yang dibutuhkan untuk kultur sel antara lain sel MCF-7, alkohol 70%, Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B (#15240062, Gibco, New York, U.S.A), FBS (#10500064, Gibco, New York, U.S.A), *roswell park memorial institute* (RPMI) (#31800022, Gibco, New York, U.S.A), *Water For Injection* (WFI), HEPES (#40820004-5, Bioworld, Dublin, U.S.A), Natrium bikarbonat (#41900068-1, Bioworld, Dublin, U.S.A), Tripsin-EDTA (#25200056, Gibco, New York, U.S.A), DMSO (#102952, Merck, Darmstadt, Germany), *cryo tube* (Costar, New York, U.S.A), membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  (#16534-K, Sartorius, Goettingen, Germany), *flask* dengan luas permukaan 25  $\text{cm}^2$  (Costar, New York, U.S.A), *conical tube* 15 ml dan

50 ml (Falcon, New Jersey, U.S.A), botol Duran® 250 ml, *sprit* 10 ml (One Med, Sidoarjo, Indonesia), pipet volume 2 ml (#4021, Costar, New York, U.S.A), tip biru dan kuning (One Med, Sidoarjo, Indonesia), *handschoen*, spidol, kaca penutup, label, masker, aluminium foil, dan tissue. Alat yang dibutuhkan yaitu spatel, sentrifus (#LMC-3000, Biosan, Riga, Latvia), *accu jet*, inkubator yang dilengkapi tabung gas CO<sub>2</sub> (#CO-170, Innova, San Diego, U.S.A), *laminar air flow* (LAF) (#SafeFast Elite 212-D, Faster, Ferrara, Italy), mikroskop *inverted* (#IX71, Olympus, Tokyo, Japan), mikropipet, pH meter, hemositometer, *counter* serta timbangan analitik.

#### 4.7.5.3 Uji Sitotoksik Tunggal

Bahan yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik tunggal adalah DMSO, media kultur (MK), *Water for injection* (WFI), ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd., doksorubisin (#0215910105, MP Biomedicals, US) (**Lamprian 4**), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida (MTT) (#10059, Biotium, California, U.S.A), Media RPMI, tripsin-EDTA, media *serum free* (SF), tabung mikro, dan *conical tube*. Alat yang digunakan adalah mikropipet, *vortex*, timbangan, *sprit* 3 ml, membran filter 0,22 µm, *microplate reader*, *well plate* 96 (SPL, Gyeonggi-do, South Korea), dan LAF.

#### 4.7.5.4 Uji Sitotoksik Kombinasi

Bahan yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik tunggal adalah DMSO, MK, WFI, ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd., doksorubisin, MTT, Media RPMI, tripsin-EDTA, SF, tabung mikro, dan *conical tube*. Alat yang digunakan adalah mikropipet, *vortex*, timbangan, *sprit* 3 ml, membran filter 0,22 µm, *microplate reader*, *well plate* 96, dan LAF.

#### 4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini antara lain:

1. Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (HD) didapatkan melalui salah satu metode ekstraksi yaitu maserasi menggunakan etanol 80%.
2. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi simplisia yang menggunakan pelarut kemudian dilakukan pengocokan atau pengadukan serta penyaringan berulang kali dalam suhu ruang.
3. Prinsip metode MTT ialah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide) oleh sistem reduktase dalam mitokondria sel-sel yang hidup sehingga membentuk kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal formazan ungu yang kemudian absorbansinya akan diukur menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup. Intensitas warna ungu yang semakin besar, maka jumlah sel yang hidup semakin banyak.
4.  $IC_{50}$  merupakan dosis ekstrak yang didapatkan melalui pengujian MTT yang dapat menghambat perkembangan atau proliferasi sel MCF-7 sebesar 50%.
5. Viabilitas sel merupakan persentase sel yang hidup.

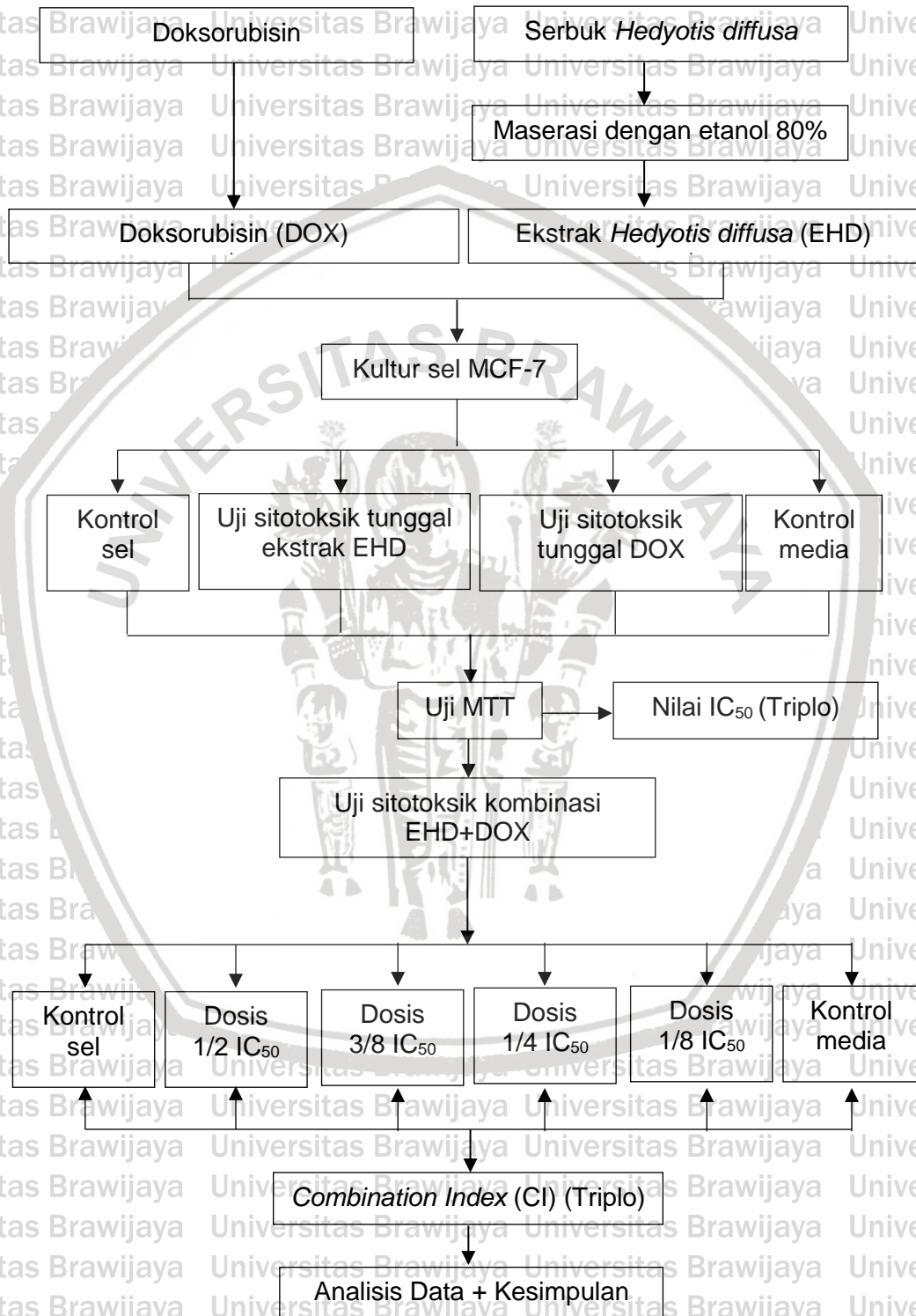
$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol} - \bar{x} \text{ absorbansi sampel}}{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

6. *Combination index* (CI) merupakan indeks yang menunjukkan interaksi yang terjadi dalam beberapa kombinasi.



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Gambar Skema Prosedur Penelitian

#### 4.7.2 Ekstraksi *Hedyotis diffusa* Willd.

Ekstraksi *Hedyotis diffusa* ini dilakukan dengan metode maserasi. Tahap-tahap yang diperlukan adalah sebagai berikut:

- a. Ditimbang serbuk kering rumput lidah ular sebanyak 160 gram.
- b. Direndam dalam etanol 80% dengan perbandingan 1:10 (1,6 L etanol) untuk 3 kali maserasi.
- c. Direndam dalam etanol 800 ml selama 30 menit disertai pengadukan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 rpm.
- d. Didiamkan selama 24 jam dalam toples (maserator) yang tertutup rapat.
- e. Disaring untuk memisahkan maserat menggunakan vakum, corong *Buchner* dan kertas saring.
- f. Maserat ditampung dalam erlemeyer.
- g. Residu di re-maserasi sebanyak 2x menggunakan @ 400 ml etanol 80%.
- h. Semua maserat ditampung, dicampur dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putar sebesar 30 rpm.
- i. Cawan porselen kosong ditimbang sebelum digunakan sebagai wadah ekstrak.
- j. Ekstrak pekat yang dihasilkan dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C hingga terbentuk pasta.
- k. Ditimbang kembali ekstrak setelah dikeringkan.
- l. Dihitung % rendemen menggunakan rumus dibawah ini.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{(\text{berat ekstrak} - \text{berat cawan kosong})}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

### 4.7.3 Kultur Sel MCF-7

#### 4.7.3.1 Preparasi Media Kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

- |    |   |           |
|----|---|-----------|
| a. | RPMI                                    | 2,6 gram  |
| b. | Natrium Bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) | 0,5 gram  |
| c. | HEPES                                   | 0,55 gram |
| d. | <i>Water for Injection</i> (WFI)        | ad 250 ml |

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media RPMI adalah sebagai berikut:

- Ditimbang 2,6 gram serbuk RPMI menggunakan neraca analitik.
- Dimasukkan serbuk RPMI kedalam botol Duran<sup>®</sup> 250 ml.
- Ditambahkan WFI untuk melarutkan serbuk RPMI dan dikocok hingga homogen.
- Ditimbang 0,5 gram serbuk  $\text{NaHCO}_3$  menggunakan neraca analitik.
- Ditambahkan serbuk  $\text{NaHCO}_3$  ke dalam botol Duran<sup>®</sup> (c) dan dikocok ad homogen.
- Ditimbang 0,55 gram HEPES menggunakan neraca analitik.
- Ditambahkan HEPES ke dalam botol Duran<sup>®</sup> (e) dan dikocok ad homogen.
- Ditambahkan WFI ad 250 ml kedalam botol Duran<sup>®</sup> (g) dan dikocok ad homogen.
- Diukur pH RPMI menggunakan pH meter.
- Diadjust pH dengan menambahkan HCl 1 M dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga pH berada dalam rentang 7,0 - 7,4.
- Difilter media RPMI menggunakan *sput* dan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dalam *laminar air-flow* (LAF).

- l. Dimasukkan media RPMI ke dalam botol Duran® 250 ml steril.
- m. Botol Duran® 250 ml dibungkus menggunakan aluminium foil.
- n. Diberi label pada botol berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- o. Disimpan media RPMI dalam lemari pendingin suhu 4°C.

#### 4.7.3.2 Preparasi Media Kultur Lengkap (MK)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

- a. 1% Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B      0,5 ml
- b. 10% FBS      5 ml
- c. Media RPMI      ad 50 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media adalah sebagai berikut:

- a. Diambil media RPMI dari dalam lemari pendingin suhu 4°C.
- b. Diambil Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B, dan FBS dari dalam freezer -20°C.
- c. Dikondisikan Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B, FBS, dan media RPMI pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 50 ml, *sputit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, dan tip biru.
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Diambil 0,5 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B menggunakan mikropipet.
- g. Dimasukkan (f) ke dalam *conical tube* 50 ml.
- h. Diambil 5 ml FBS menggunakan *sputit* 10 ml.

- i. Difilter (h) menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
- j. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.
- k. Difilter (j) menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  ad 50 ml dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml (i).
- l. Dikocok (k) ad homogen.
- m. Diberi label pada *conical tube* berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- n. Disimpan MK dalam lemari pendingin suhu 4°C.

#### 4.7.3.3 Preparasi Media *Serum Free* (SF)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

- a. 1% Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B 0,5 ml
- b. Media RPMI ad 50 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media adalah sebagai berikut:

- a. Diambil media RPMI dari dalam lemari pendingin suhu 4°C.
- b. Diambil Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B dari *freezer* -20°C.
- c. Dikondisikan Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B, dan media RPMI pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 50 ml, *sprit* 10 ml, membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ , mikropipet, dan tip biru.
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Diambil 0,5 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
- g. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.

- h. Difilter (g) menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  ad 50 ml dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml (f).
- i. Dikocok (h) ad homogen.
- j. Diberi label pada *conical tube* berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- m. Disimpan SF dalam lemari pendingin suhu 4°C.

#### 4.7.3.4 Preparasi Media Cryo

Komposisi media yang digunakan yaitu:

- a. 10% DMSO                      1 ml
- b. MK                                      ad 10 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media adalah sebagai berikut:

- a. Diambil MK dari dalam lemari pendingin suhu 4°C.
- b. Dikondisikan MK pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- c. Disiapkan DMSO, *sprit* 10 ml, membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ , mikropipet, tip biru, dan *conical tube* 15 ml.
- d. Disemprot (b) dan (c) menggunakan alcohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil 1 ml DMSO menggunakan mikropipet.
- f. Dimasukkan DMSO ke dalam *conical tube* 15 ml.
- g. Diambil MK ad 10 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter (g) menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
- i. Dikocok (h) ad homogen.
- j. Diberi label pada *conical tube* berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.

- k. Disimpan media *cryo* dalam lemari pendingin suhu 4°C.

#### 4.7.3.5 Penumbuhan Sel (*Cell Thawing*)

Prosedur penumbuhan sel MCF-7 adalah sebagai berikut:

- a. Diambil MK dari dalam lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- b. Diambil ampul (*cryo tube*) berisi sel MCF-7 dari dalam *Mr. Frosty* pada freezer -80°C.
- c. Dicairkan sel dalam ampul dengan cara digosok menggunakan tangan.
- d. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, tip kuning, dan *flask*.
- e. Disemprot (a), (b), (c), dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Diambil 8 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- g. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan ke dalam *flask*.
- h. Dihitung volume sel yang dibutuhkan untuk penumbuhan 200.000 sel.  

$$\text{Volume sel yang dibutuhkan} = \frac{200.000 \text{ sel} \times \text{volume sel dalam ampul}}{\text{jumlah sel dalam ampul}}$$
- i. Diambil sel MCF-7 menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *flask* (g).
- j. Digoyang-goyangkan *flask* ad homogen.
- k. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x.
- l. Diberi label pada *flask* berupa nama sel, tanggal penumbuhan, jumlah pasase, dan nama peneliti.

- m. Disemprot *flask* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ .

#### 4.7.3.6 Penggantian Media

Prosedur penggantian media kultur adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *flask* berisi sel dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$  kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Diambil SF dan MK dari dalam lemari pendingin  $4^{\circ}\text{C}$  dan dikondisikan pada suhu ruang.
- c. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter  $0,22 \mu\text{m}$ , dan wadah pembuangan.
- d. Disemprot (a), (b), dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Dibuang media lama dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
- f. Diambil 2 ml SF menggunakan *sprit* 10 ml.
- g. Difilter SF menggunakan membran filter  $0,22 \mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- h. Digoyang-goyangkan *flask* ke kanan dan ke kiri untuk membersihkan sel.
- i. Dibuang SF dalam *flask* ke dalam wadah pembuangan.
- j. Diulangi prosedur (f-i) kembali.
- k. Diambil 5 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml
- l. Difilter MK menggunakan membran filter  $0,22 \mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- m. Dihomogenkan MK kemudian diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif menggunakan mikroskop *inverted*.
- n. *Flask* disemprot menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ .



#### 4.7.3.7 Pemanenan Sel

Prosedur pemanenan sel adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *flask* berisi sel dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* (pemanenan sel dilakukan apabila sel konfluen 80%).
- b. Diambil SF, MK dari dalam lemari pendingin  $4^{\circ}\text{C}$  dan dikondisikan pada suhu ruang.
- c. Diambil tripsin-EDTA dari dalam *freezer*  $-20^{\circ}\text{C}$  dan dikondisikan pada suhu ruang.
- d. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ , *conical tube* 15 ml, pipet ukur 2 ml, *accu jet*, dan wadah pembuangan.
- e. Disemprot (a), (b), (c), dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Dibuang media lama dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
- g. Diambil 2 ml SF menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter SF menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- i. Digoyang-goyangkan *flask* ke kanan dan ke kiri untuk membersihkan sel.
- j. Dibuang SF dalam *flask* ke dalam wadah pembuangan.
- f. Diulangi prosedur (g-j) kembali.
- g. Diambil 2 ml tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter tripsin-EDTA menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- i. Diinkubasi *flask* (h) dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  selama 5 menit.
- j. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.

- k. Diresuspensikan sel dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga sel terlepas satu sama lain.
- l. Diambil 5 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- m. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.
- n. Dimasukkan sel kedalam *conical tube* 15 ml (m) dan dihomogenkan.
- o. Disentrifugasi sel (n) dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.
- p. Dibuang supernatan kedalam wadah pembuangan.
- q. Diambil MK ad 1 ml menggunakan *sprit* 10 ml dan dimasukkan kedalam *conical tube* (p) dengan difilter menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ .
- r. Diresuspensi pellet dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga homogen.

#### 4.7.3.8 Perhitungan Sel

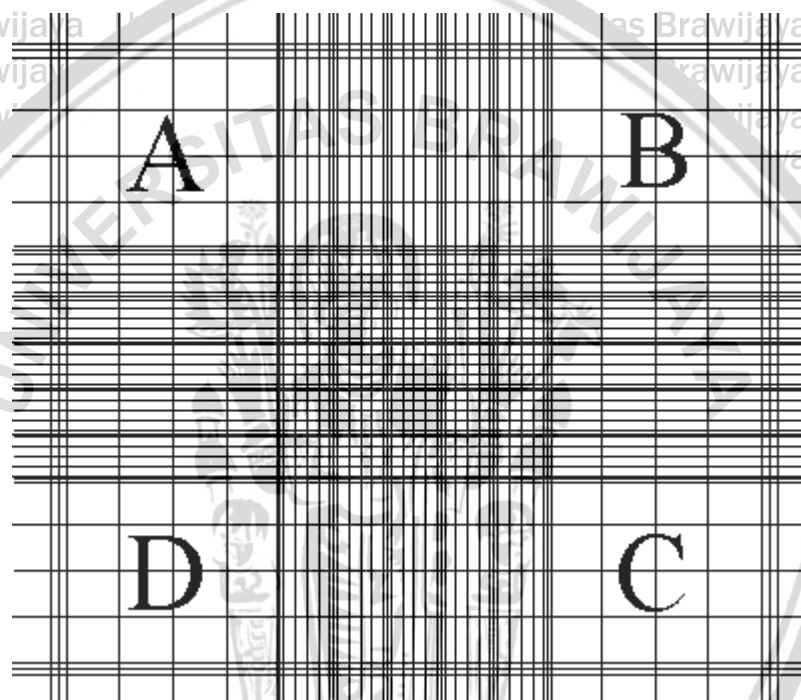
Prosedur perhitungan sel adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
- b. Disiapkan mikropipet, tip kuning, dan tabung mikro.
- c. Disemprot (b) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- d. Diambil 10  $\mu\text{l}$  panen sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro.
- e. Diambil 10  $\mu\text{l}$  *tripan-blue* menggunakan mikropipet dan ditambahkan ke dalam tabung mikro (d) kemudian dihomogenkan.
- f. Diambil 10  $\mu\text{l}$  (e) menggunakan mikropipet dan dipipetkan ke hemositometer.

g. Dihitung jumlah sel menggunakan mikroskop *inverted* dan *counter*. Sel yang gelap (sel mati) dan sel yang berada diluar batas sebelah atas dan kanan tidak dihitung. Sel dibatas kiri dan bawah dihitung.

h. Dihitung jumlah sel dalam 4 kamar hemositometer menggunakan rumus dibawah ini. Gambar hemositometer dapat dilihat pada Gambar 4.2.

$$\text{Jumlah sel terhitung/ml} = \frac{\text{Jumlah sel kamar A+B+C+D}}{4} \times 10^4 \times 2$$



Gambar 4.2 Hemositometer

#### 4.7.3.9 Subkultur Sel

Prosedur subkultur sel adalah sebagai berikut:

- Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
- Diambil MK dari lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
- Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, *flask*, mikropipet, dan tip kuning.
- Disemprot (b) dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.

e. Dihitung volume sel yang dibutuhkan untuk subkultur 200.000 sel.

$$\text{Volume yang dibutuhkan} = \frac{200.000}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

f. Diambil 5 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.

g. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan dimasukkan ke dalam *flask*.

h. Diambil sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *flask* (g).

i. Dihomogenkan sel dan diamati menggunakan mikroskop *inverted*.

j. Diberi label *flask* berupa nama sel, jumlah pasase, tanggal subkultur, dan nama peneliti. *Flask* dapat digunakan maksimal 3x pemakaian.

k. Disemprot alkohol 70% *flask* dan diinkubasi dalam inkubator 37°C  $\pm$  5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.7.3.10 Cryopreservation

Prosedur *cryopreservation* adalah sebagai berikut:

a. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.

b. Diambil media *cryo* dari lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.

c. Disiapkan *cryo tube*, *sprit* 10 ml, membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ , pipet ukur 2 ml, *accu jet*, *conical tube* 15 ml, dan wadah pembuangan.

d. Disemprot (b) dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.

e. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.

f. Disentrifugasi sel dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.

g. Dibuang supernatan (f) ke dalam wadah pembuangan.

h. Diambil 1,5 ml media *cryo* menggunakan *sprit* 10 ml.

- i. Difilter media *cryo* menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml (g).
- j. Diresuspensikan sel dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga homogen.
- k. Dituang sel kedalam *cryo tube*.
- l. Diberi label *cryo tube* berupa nama sel, jumlah pasase, tanggal *cryopreservation*, nama peneliti, dan jumlah sel.
- m. Disimpan *cryo tube* ke dalam *Mr. Frosty* pada suhu -80°C.

#### 4.7.4 Uji Sitotoksik Tunggal

##### 4.7.4.1 Preparasi Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD)

Prosedur preparasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) adalah sebagai berikut:

- a. Dibuat 7 seri konsentrasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dengan rumus (Lampiran 5):

$$f = n^{-1} \sqrt{(Dt/Dr)}$$

Keterangan:

- n = banyaknya seri konsentrasi
- Dt = konsentrasi tertinggi
- Dr = konsentrasi terendah

- b. Ditimbang 5 mg ekstrak dalam tabung mikro menggunakan neraca analitik.
- c. Dilarutkan ekstrak menggunakan DMSO 20x (100 µl) dengan di *vortex*.
- d. Ditambahkan MK ad 1 ml dalam tabung mikro (c) kemudian di *vortex* ad larut.
- e. Dilakukan pengenceran pada konsentrasi tertinggi dalam *conical tube* 15 ml.

- f. Difilter ekstrak (e) menggunakan membran filter 0,22 µm dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
- g. Dilakukan pengenceran 6 seri konsentrasi lainnya dalam *conical tube* 15 ml steril.

#### 4.7.4.2 Preparasi Dokсорubisin (DOX)

Prosedur preparasi dokсорubisin (DOX) adalah sebagai berikut:

- a. Dibuat 7 seri konsentrasi dokсорubisin dengan rumus (**Lampiran 6**):

$$f = \frac{n-1}{n} \sqrt{\frac{Dt}{Dr}}$$

Keterangan:

- n = banyaknya seri konsentrasi  
Dt = konsentrasi tertinggi  
Dr = konsentrasi terendah

- b. Ditimbang 0,1 mg serbuk dokсорubisin dalam *conical tube* 15 ml menggunakan neraca analitik.
- c. Dilarutkan dokсорubisin menggunakan WFI ad 10 ml.
- d. Dilakukan pengenceran larutan sub stok dokсорubisin 5000 dan 10000 Nm menggunakan WFI.
- e. Dilakukan pengenceran pada konsentrasi tertinggi dalam *conical tube* 15 ml.
- f. Difilter dokсорubisin (e) menggunakan membran filter 0,22 µm dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
- g. dilakukan pengenceran 6 seri konsentrasi lainnya dalam *conical tube* 15 ml steril.

#### 4.7.4.3 Preparasi MTT

Prosedur preparasi MTT adalah sebagai berikut:

- a. Ditimbang 50 mg serbuk MTT menggunakan neraca analitik.

- b. Disiapkan PBS, *conical tube* 15 ml yang terbungkus aluminium foil, *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, dan tip biru.
- c. Disemprot (b) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- d. Dimasukkan serbuk MTT ke dalam *conical tube* 15 ml yang terbungkus aluminium foil.
- e. Diambil PBS ad 10 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
- f. Difilter PBS menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan *conical tube* (d) sedikit demi sedikit dengan di vortex.
- g. Diberi label pada *conical tube* berupa larutan stok MTT, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- h. Diambil 1 ml larutan stok MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan *conical tube* 15 ml.
- i. Diambil 9 ml media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.
- j. Difilter media RPMI menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan *conical tube* (h).
- k. Dihomogenkan larutan MTT.

#### 4.7.4.4 *Platting Sel*

Prosedur *platting sel* adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan perhitungan sel sesuai dengan protokol perhitungan sel.
- b. Dihitung volume sel yang dibutuhkan untuk *platting sel* 8000 sel

@sumuran.

$$8000 \text{ sel} \times 60 \text{ sumuran} = 480.000 \text{ sel}$$

$$\text{volume yang dibutuhkan} = \frac{480.000}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

- c. Dikeluarkan MK dari lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 15 ml, *sputit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, tip kuning, dan *well plate* 96.
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Dimasukkan sel ke dalam *conical tube* 15 ml.
- g. Diambil MK ad 10 ml menggunakan *sputit* 10 ml.
- h. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan *conical tube* (f).
- i. Dihomogenkan sel.
- j. Diambil 100 µl sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam @ sumuran *well plate*.
- k. Diamati *well plate* menggunakan mikroskop *inverted*.
- l. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C ± 5%CO<sub>2</sub>.

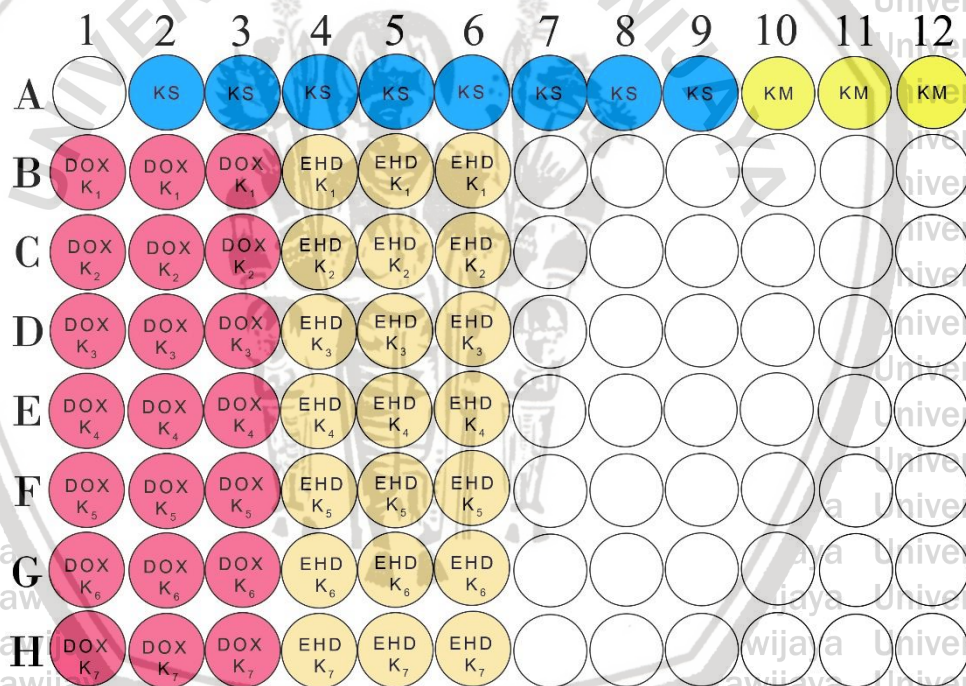
#### 4.7.4.5 Pemaparan Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX)

Prosedur pemaparan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan doksorubisin (DOX) adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *well plate* dari inkubator 37°C ± 5%CO<sub>2</sub> kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Diambil MK dari lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.



- c. Disiapkan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd.(EHD), doksorubisin (DOX), *sput* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.
- d. Disemprot (a), (b), dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil media lama dalam sumuran *well plate* menggunakan *sput* 10 ml kemudian dibuang.
- f. Diambil 100  $\mu$ l EHD, DOX, dan MK menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam @sumuran *well plate*. Desain *well plate* dapat dilihat pada **Gambar 4.3**.



**Gambar 4.3 Desain Well Plate Uji Sitotoksik Tunggal.**

Keterangan:

- Dimasukkan @100  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai kontrol sel (KS).
- Dimasukkan @100  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang tidak berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai kontrol media (KM).
- Dimasukkan @100  $\mu$ l seri konsentrasi doksorubisin (DOX) dan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo).

- g. Diamati *well plate* menggunakan mikroskop *inverted*.

- h. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ .

#### 4.7.4.6 Uji MTT

Prosedur uji MTT adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *well plate* dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  dan diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Disiapkan larutan MTT, *sputit* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.
- c. Disemprot (a) dan (b) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- d. Diambil larutan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD), doksorubisin (DOX), dan MK dari sumuran *well plate* menggunakan *sputit* 10 ml kemudian dibuang.
- e. Diambil 100 $\mu\text{l}$  larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumuran *well plate*.
- f. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ .
- g. Dikeluarkan *well plate* dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- h. Disiapkan DMSO, *sputit* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.
- i. Disemprot (g) dan (h) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- j. Diambil larutan MTT dalam sumuran *well plate* menggunakan *sputit* 10 ml kemudian dibuang.

- k. Diambil 100 $\mu$ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumuran *well plate*.
- l. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator 37°C  $\pm$  5%CO<sub>2</sub>.
- m. Dibaca absorbansi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm.
- n. Dihitung persentase viabilitas sel menggunakan rumus:
- $$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol} - \bar{x} \text{ absorbansi sampel}}{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol}} \times 100\%$$
- o. Dihitung regresi linear (konsentrasi, viabilitas sel).
- p. Dihitung nilai IC<sub>50</sub> dari *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin.

#### 4.7.5 Uji Sitotoksik Kombinasi

##### 4.7.5.1 Preparasi Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD)

Prosedur preparasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan perhitungan dosis ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) yaitu sebesar 1/2 IC<sub>50</sub>, 1/4 IC<sub>50</sub>, 1/8 IC<sub>50</sub>, dan 3/8 IC<sub>50</sub>.
- b. Ditimbang 50 mg ekstrak dalam tabung mikro menggunakan neraca analitik.
- c. Dilarutkan ekstrak menggunakan DMSO 20x (1 ml) dengan di *vortex*.
- d. Dilakukan perhitungan pengenceran ekstrak dengan volume @sumuran *well plate* 50 $\mu$ l.  
50 $\mu$ l x 24 sumuran = 1200  $\mu$ l.
- e. Dilakukan pengenceran pada dosis tertinggi dalam *conical tube* 15 ml.
- f. Difilter ekstrak (e) menggunakan membran filter 0,22  $\mu$ m dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.

- g. Dilakukan pengenceran 3 dosis lainnya dalam *conical tube* 15 ml steril.

#### 4.7.5.2 Preparasi Doksorubisin (DOX)

Prosedur preparasi doksorubisin (DOX) adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan perhitungan dosis doksorubisin (DOX) yaitu sebesar  $1/2 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ ,  $1/8 IC_{50}$ , dan  $3/8 IC_{50}$ .
- b. Ditimbang 0,1 mg serbuk doksorubisin dalam *conical tube* 15 ml menggunakan neraca analitik.
- c. Dilarutkan doksorubisin menggunakan WFI ad 10 ml.
- d. Dilakukan pengenceran larutan sub stok doksorubisin 5000 dan 10000 nM menggunakan WFI.
- e. Dilakukan perhitungan pengenceran ekstrak dengan volume @sumuran *well plate* 50 $\mu$ l.  
 $50\mu\text{l} \times 24 \text{ sumuran} = 1200 \mu\text{l}$
- f. Dilakukan pengenceran pada dosis tertinggi dalam *conical tube* 15 ml.
- g. Difilter doksorubisin (f) menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
- h. Dilakukan pengenceran 3 dosis lainnya dalam *conical tube* 15 ml steril.

#### 4.7.5.3 *Platting* Sel

Prosedur *platting* sel adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan perhitungan sel sesuai dengan protokol perhitungan sel.
- b. Dihitung volume sel yang dibutuhkan untuk *platting* sel 8000 sel @sumuran.

$$8000 \text{ sel} \times 100 \text{ sumuran} = 800.000 \text{ sel}$$

$$\text{volume yang dibutuhkan} = \frac{800.000}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

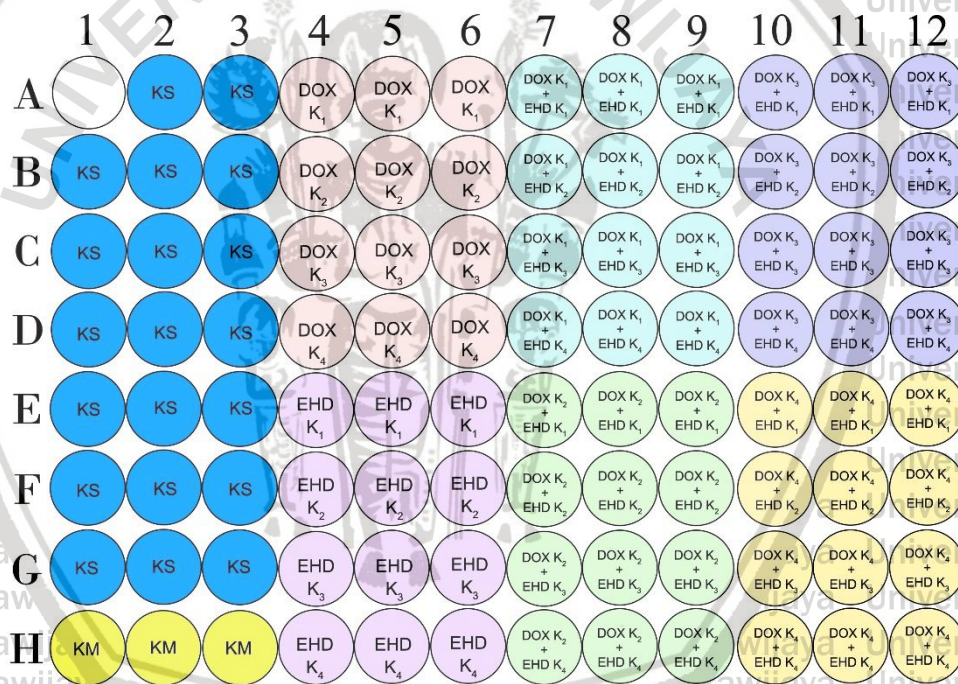
- c. Dikeluarkan MK dari lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 15 ml, *sputit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, tip kuning, dan *well plate* 96.
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Dimasukkan sel ke dalam *conical tube* 15 ml.
- g. Diambil MK ad 10 ml menggunakan *sputit* 10 ml.
- h. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan *conical tube* (f).
- i. Dihomogenkan sel.
- j. Diambil 100 µl sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam @ sumuran *well plate*.
- k. Diamati *well plate* menggunakan mikroskop *inverted*.
- l. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C ± 5%CO<sub>2</sub>.

#### 4.7.5.4 Pemaparan Kombinasi Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX)

Prosedur pemaparan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan doksorubisin (DOX) adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *well plate* dari inkubator 37°C ± 5%CO<sub>2</sub> kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Diambil MK dari lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.

- c. Disiapkan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD), doksorubisin (DOX), *spuit* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.
- d. Disemprot (a), (b), dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil media lama dalam sumuran *well plate* menggunakan *spuit* 10 ml kemudian dibuang.
- f. Diambil 50  $\mu$ l EHD, DOX, dan MK menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam @sumuran *well plate*. Desain *well plate* dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.



**Gambar 4.4 Desain Well Plate Uji Sitotoksik Kombinasi.**

Keterangan:

- Dimasukkan @100  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai kontrol sel (KS).
- Dimasukkan @100  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang tidak berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai kontrol media (KM).
- Dimasukkan @50  $\mu$ l dosis doksorubisin (DOX) ditambah dengan @50  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai dosis tunggal DOX.
- Dimasukkan @50  $\mu$ l dosis ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) ditambah dengan @50  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai dosis tunggal EHD.

- Dimasukkan @50  $\mu$ l dosis doksorubisin (DOX) ditambahkan dengan @50 $\mu$ l dosis ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) ke dalam sumuran yang berisi sel dengan replikasi 3 kali (triplo) sebagai dosis kombinasi DOX-EHD.
- g. Dihomogenkan dengan diketuk-ketuk dan digerakkan seperti angka 8.
- h. Diamati *well plate* menggunakan mikroskop *inverted*.
- i. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ .

#### 4.7.5.5 Uji MTT

Prosedur uji MTT adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *well plate* dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  dan diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Disiapkan larutan MTT, *sput* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.
- c. Disemprot (a) dan (b) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- d. Diambil larutan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd., doksorubisin, dan MK dari sumuran *well plate* menggunakan *sput* 10 ml kemudian dibuang.
- e. Diambil 100 $\mu$ l larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well plate*.
- f. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ .
- g. Dikeluarkan *well plate* dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$  kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- h. Disiapkan DMSO, *sput* 10 ml, wadah pembuangan, mikropipet, dan tip kuning.

- i. Disemprot (g) dan (h) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- j. Diambil larutan MTT dalam sumuran *well plate* menggunakan *sprit* 10 ml kemudian dibuang.
- k. Diambil 100 $\mu$ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumuran *well plate*.
- l. Disemprot *well plate* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator 37°C  $\pm$  5%CO<sub>2</sub>.
- m. Dibaca absorbansi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm.
- n. Dihitung persentase viabilitas sel menggunakan rumus:
- $$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol} - \bar{x} \text{ absorbansi sampel}}{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol}} \times 100\%$$
- o. Dihitung nilai *Combination Index* (CI) berdasarkan regresi linear IC<sub>50</sub> dan dilakukan interpretasi nilai CI sesuai dengan Tabel 4.1

$$CI = \frac{D1}{Dx1} + \frac{D2}{Dx2}$$

Keterangan:

DX: Kombinasi terapi tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi (D)1, (D)2: Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama.

**Tabel 4.1 Interpretasi Nilai *Combination Index* (Bijnsdorp et al., 2011).**

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,85	efek sinergis sedang
0,85 – 0,9	efek sinergis ringan
0,9 – 1,1	mendekati efek aditif
1,1 – 1,2	efek antagonis ringan
1,2 – 1,45	efek antagonis sedang
1,45 – 3,3	efek antagonis
3,3 - 10	efek antagonis kuat
>10	efek antagonis sangat kuat



#### 4.8 Pengumpulan Data

Data hasil penelitian akan didapatkan persentase viabilitas sel, nilai  $IC_{50}$  ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan doksorubisin (DOX), serta nilai *combination index* (CI). Persentase viabilitas sel didapatkan dari uji sitotoksik tunggal dan kombinasi. Nilai  $IC_{50}$  EHD dan DOX didapatkan dari uji sitotoksik tunggal dan akan digunakan sebagai acuan dosis yang akan digunakan untuk uji sitotoksik kombinasi. Nilai *combination index* (CI) didapatkan dari uji sitotoksik kombinasi sehingga dapat diinterpretasikan jenis interaksi yang terjadi dan dosis kombinasi yang dapat menghasilkan efek sinergis. Grafik uji sitotoksik tunggal divisualisasikan menggunakan aplikasi *GraphPad Prism* versi 7.0, sedangkan grafik uji sitotoksik kombinasi divisualisasikan menggunakan aplikasi *Origin* versi 2018b.



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Ekstraksi Rumpuk Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.)

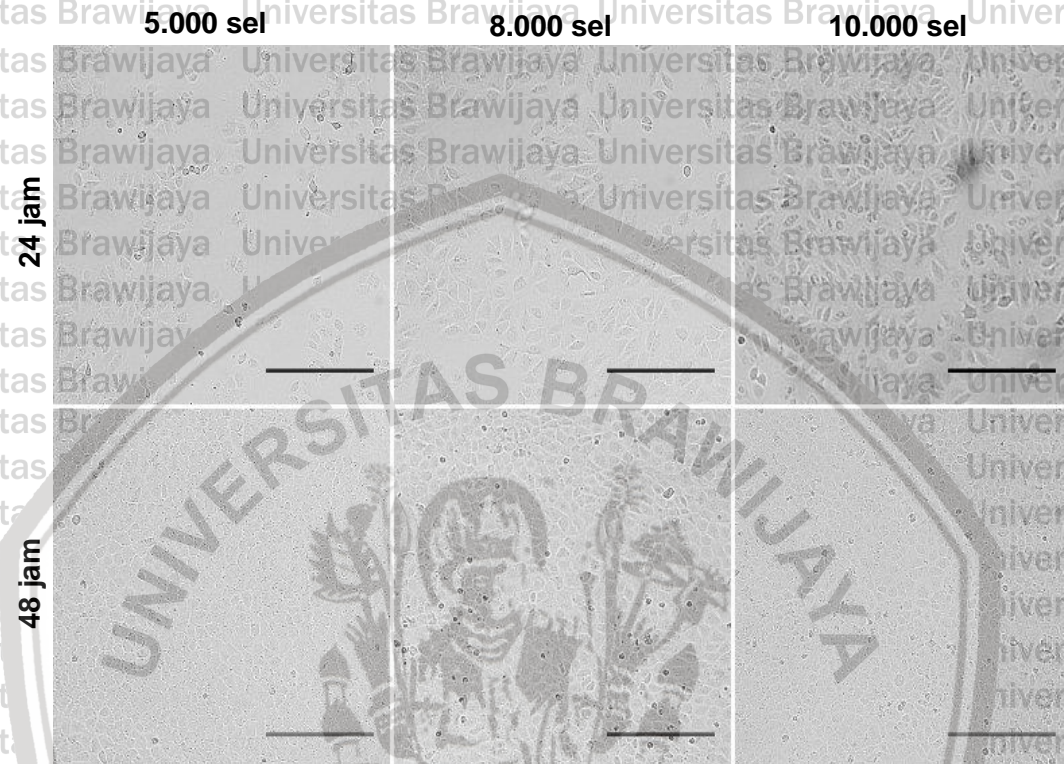
Rumpuk lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) diekstraksi menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut tertentu di wadah tertutup pada suhu ruang selama jangka waktu minimal 3 hari. Proses ini bertujuan untuk merusak dinding sel tumbuhan sehingga dapat melepaskan senyawa fitokimia terlarut (Azwanida, 2015). Serbuk simplisia yang digunakan sebesar 160,05 gram dengan menggunakan pelarut etanol 80% dengan perbandingan 1:10 yang terbagi dalam 3 kali proses maserasi. Maserat yang dihasilkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan kecepatan putar 30 rpm hingga terbentuk ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian di oven pada suhu 45°C agar terbentuk ekstrak yang lebih padat. Ekstrak yang dihasilkan berbentuk pasta dan berwarna coklat kehitaman dengan berat ekstrak sebesar 11,65 gram dengan persentase rendemen yaitu 7,28%.

#### 5.2 Hasil Optimasi Jumlah Penanaman Sel dan Waktu Inkubasi Sel untuk

##### *Platting*

Optimasi jumlah sel dan waktu inkubasi sel dilakukan untuk mendapatkan konfluen sel sebesar 60-70%. Hal ini dikarenakan apabila konfluen sel terlalu besar dapat menyebabkan sel tidak mempunyai ruang untuk membelah diri dan kesulitan untuk bernafas sehingga dapat mempengaruhi viabilitas sel. Optimasi ini

dilakukan dengan melakukan penanaman sel dengan jumlah sel 5.000, 8.000, dan 10.000 serta inkubasi sel selama 24 dan 48 jam (**Gambar 5.1**).



**Gambar 5.1 Pengamatan Sebaran Sel pada Optimasi Jumlah Penanaman Sel dan Waktu Inkubasi Sel.** Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100 kali dan skala garis 10  $\mu\text{m}$ . Waktu inkubasi sel selama 24 jam menunjukkan konfluen sel sebesar 50-85%, sedangkan inkubasi sel selama 48 jam menunjukkan konfluen sel 100%. Inkubasi sel selama 24 jam dengan penanaman sel sebanyak 5.000 sel menunjukkan konfluen sel sebesar 50-60%, sedangkan 8.000 sel menunjukkan konfluen sel 60-70%, dan 10.000 sel menunjukkan konfluen sel yaitu 80-85%.

Berdasarkan optimasi jumlah penanaman sel dan waktu inkubasi sel yang telah dilakukan, jumlah sel yang ditanam untuk *plating* dalam penelitian ini sebesar 8.000 sel dengan waktu inkubasi selama 24 jam dengan konfluen sel sebesar 60-70%.

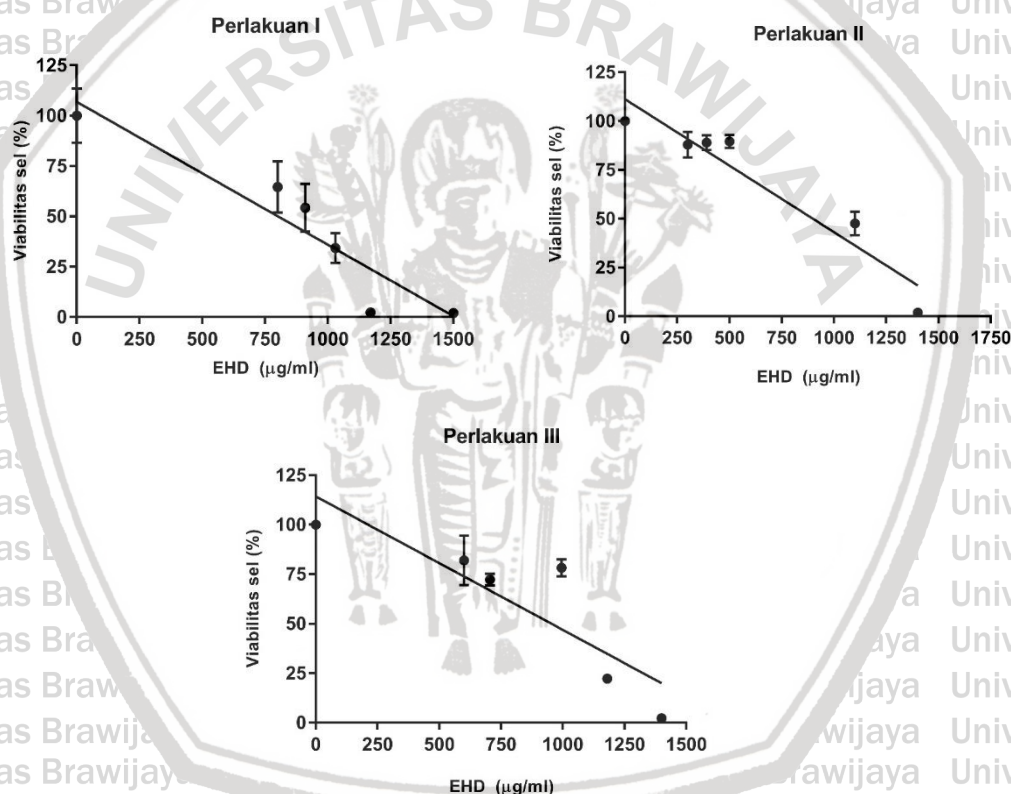
### 5.3 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal

Uji sitotoksik tunggal ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan doksorubisin (DOX) perlu dilakukan sebelum uji kombinasi dengan tujuan untuk

melihat efek sitotoksik dari *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin terhadap viabilitas sel serta menentukan nilai  $IC_{50}$ . Uji ini dilakukan menggunakan metode MTT assay untuk melihat viabilitas sel.

### 5.3.1 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD)

Hasil uji sitotoksik tunggal didapatkan bahwa pemberian ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) berpengaruh terhadap viabilitas sel. Kenaikan konsentrasi EHD sebanding dengan penurunan persentase viabilitas sel (**Gambar 5.2**).



**Gambar 5.2 Grafik Pengaruh Pemberian EHD terhadap Viabilitas Sel.**

Pengaruh pemberian EHD terhadap viabilitas sel dilakukan dengan pemaparan ekstrak selama 24 jam pada 8000 sel yang telah diinkubasi selama 24 jam sebelumnya. Viabilitas sel diukur menggunakan metode MTT assay dengan pembacaan absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Data menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan dan kontrol. (**Perlakuan I**)  $p=0,0056$  ; (**Perlakuan II**)  $p=0,0031$  ; dan (**Perlakuan III**)  $p=0,023$ . EHD = Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd.

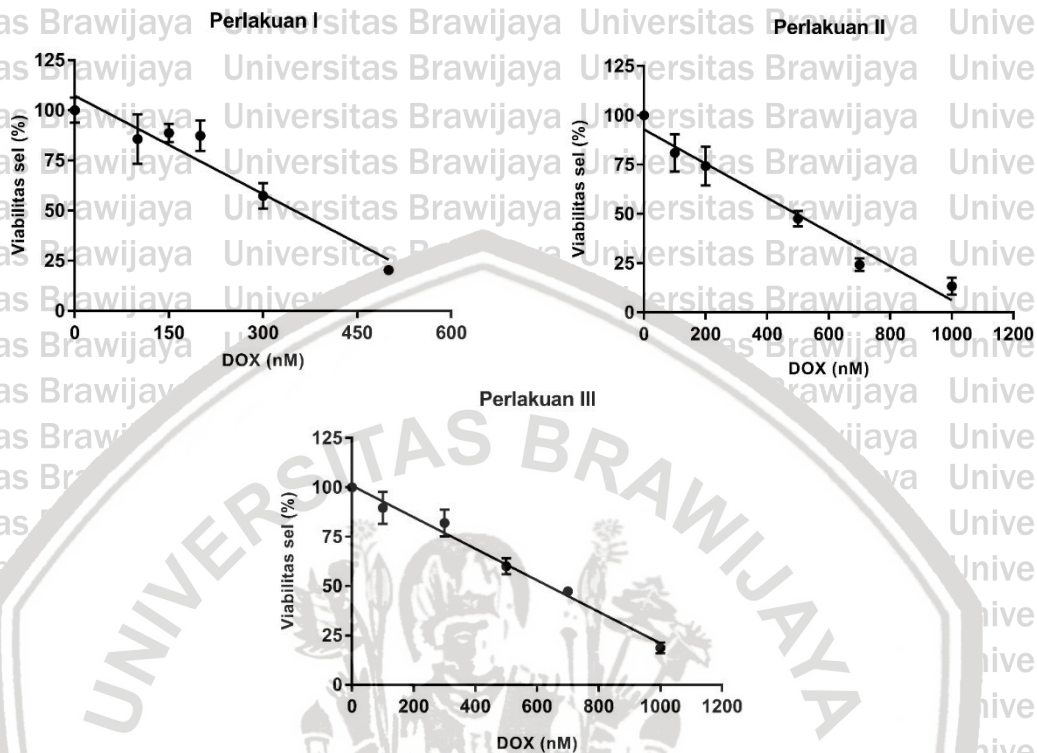
Nilai  $IC_{50}$  EHD pada uji sitotoksik tunggal didapatkan dari tiga perlakuan melalui perhitungan regresi linear. Regresi linear pada perlakuan I adalah  $y = -0,0956x + 134,88$  ( $R^2=0,8119$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 888  $\mu\text{g/ml}$ . Regresi linear pada perlakuan II adalah  $y = -0,0769x + 120,18$  ( $R^2=0,9301$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 988  $\mu\text{g/ml}$ . Sedangkan regresi linear pada perlakuan III adalah  $y = -0,0997x + 148,51$  ( $R^2=0,8077$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 913  $\mu\text{g/ml}$ . Rata-rata nilai  $IC_{50}$  EHD didapatkan  $930 \pm 30,143$   $\mu\text{g/ml}$  (**Lampiran 7**). Pemberian EHD terhadap sel MCF-7 dengan inkubasi selama 24 jam menyebabkan perubahan sebaran sel (**Gambar 5.3**).

### 5.3.2 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal Doksorubisin (DOX)

Pemberian doksorubisin (DOX) pada sel MCF-7 menyebabkan penurunan viabilitas sel. Tingginya konsentrasi doksorubisin yang diberikan sebanding dengan penurunan persentase viabilitas sel (**Gambar 5.4**). Penentuan nilai  $IC_{50}$  DOX dihitung menggunakan regresi linear yang didapatkan pada uji sitotoksik tunggal dengan perlakuan sebanyak 3 kali. Regresi linear pada perlakuan I adalah  $y = -0,183x + 113,55$  ( $R^2=0,9431$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 350 nM. Regresi linear pada perlakuan II adalah  $y = -0,0798x + 87,907$  ( $R^2=0,9773$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 480 nM. Sedangkan regresi linear pada perlakuan III adalah  $y = -0,0799x + 101,34$  ( $R^2=0,9876$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 640 nM. Rata-rata nilai  $IC_{50}$  DOX didapatkan  $490 \pm 83,293$  nM (**Lampiran 8**).



**Gambar 5.3** Sebaran Sel Setelah Inkubasi Selama 24 Jam dengan Penambahan EHD. Perubahan sebaran sel setelah inkubasi selama 24 jam dengan penambahan EHD diamati menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x dan skala baris 10 µm. Pemberian EHD menyebabkan sel secara perlahan melebar kemudian terlepas dari dasar sumuran *plate* dan berbentuk bulat. Pemberian EHD dengan konsentrasi yang lebih tinggi menyebabkan sel berbentuk tidak beraturan. EHD = Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd.



**Gambar 5.4 Grafik Pengaruh Pembaran DOX terhadap Viabilitas Sel.** Pengaruh pemberian doksorubisin terhadap viabilitas sel dilakukan dengan pemapan sel selama 24 jam pada 8000 sel yang telah diinkubasi selama 24 jam sebelumnya. Viabilitas sel diukur menggunakan metode MTT assay dengan pembacaan absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Data menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan dan kontrol. (**Perlakuan I**)  $p=0,0019$  ; (**Perlakuan II**)  $p=0,0004$  ; dan (**Perlakuan III**)  $p<0,0001$ . DOX = Doksorubisin.

Sebaran sel MCF-7 berubah saat diberikan DOX dengan inkubasi selama 24 jam. Perubahan sebaran sel diamati menggunakan mikroskop *inverted* (Gambar 5.5).

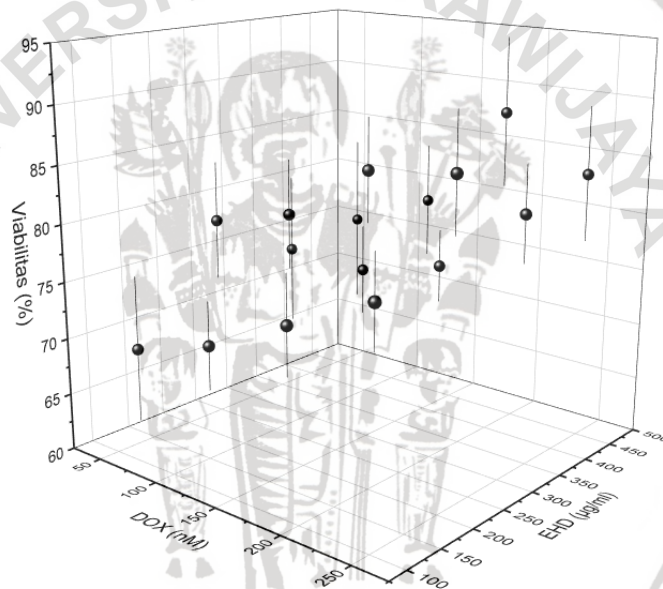


**Gambar 5.5 Sebaran Sel Setelah Inkubasi Selama 24 Jam dengan Penambahan DOX.** Perubahan sebaran sel setelah inkubasi selama 24 jam dengan penambahan DOX diamati menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x dan skala baris 10  $\mu\text{m}$ . Pemberian DOX pada konsentrasi rendah, menyebabkan sel melebar kemudian pada konsentrasi yang lebih tinggi, sel terlepas dari dasar sumuran *plate* dan berbentuk bulat. DOX = Doksorubisin.



#### 5.4 Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi

Uji sitotoksik kombinasi EHD dan DOX digunakan dosis sebesar  $1/2 IC_{50}$ ,  $3/8 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ , dan  $1/8 IC_{50}$ . Dosis yang digunakan untuk EHD yaitu 116  $\mu\text{g/ml}$ , 232  $\mu\text{g/ml}$ , 349  $\mu\text{g/ml}$ , dan 465  $\mu\text{g/ml}$ . Dosis yang digunakan untuk DOX yaitu sebesar 61 nM, 123 nM, 184 nM, dan 245 nM. Pada uji sitotoksik kombinasi didapatkan persentase viabilitas sel sehingga dapat dihitung nilai *combination index* (CI) dengan replikasi sebanyak 3 kali (**Lampiran 9**). Pemberian kombinasi EHD dan DOX berpengaruh terhadap viabilitas sel (**Gambar 5.6**)



**Gambar 5.6 Grafik Pengaruh Pemberian Kombinasi EHD dan DOX terhadap Viabilitas Sel.** Pengaruh pemberian kombinasi EHD dan DOX terhadap viabilitas sel dilakukan dengan pemaparan selama 24 jam pada 8000 sel yang telah diinkubasi selama 24 jam sebelumnya. Viabilitas sel diukur menggunakan metode MTT assay dengan pembacaan absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Uji sitotoksik kombinasi ini dilakukan 3 kali replikasi sehingga didapatkan rata-rata viabilitas sel. Data menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kombinasi dosis ( $p=0,987$ ). EHD = Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd.; DOX = Dokсорubisin.

Penambahan EHD dan DOX dengan inkubasi selama 24 jam menyebabkan perubahan sebaran sel yang diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Sel yang mengalami kematian terlepas dari dasar sumuran *plate* dan

berbentuk bulat, sedangkan sel yang hidup masih menempel pada dasar sumuran *plate* (**Lampiran 10**).

Efek yang dihasilkan dari kombinasi EHD dan DOX yaitu efek sinergis, aditif, dan antagonis (**Tabel 5.1**). Kombinasi dosis yang mempunyai efek sinergis adalah kombinasi DOX 61 nM dengan EHD 116 µg/ml dan 232 µg/ml dengan nilai CI yaitu 0,437 dan 0,631. Efek sinergis ringan ditunjukkan oleh kombinasi dosis DOX 123 nM dan EHD 123 µg/ml serta dosis DOX 61 nM dan EHD 349 µg/ml. Kombinasi DOX 184 nM dan EHD 116 µg/ml serta DOX 123 nM dan EHD 232 µg/ml menimbulkan efek aditif. Efek antagonis ditunjukkan oleh kombinasi dosis lainnya.

**Tabel 5.1 Hasil CI Kombinasi EHD dan DOX**

Terapi	Dosis	DOX (nM)				
		61	123	184	245	
EHD (µg/ml)	116	Replikasi 1	0,362	0,848	0,985	1,313
		Replikasi 2	0,388	0,717	0,903	1,172
		Replikasi 3	0,562	1,008	1,274	1,626
		<b>Rata-rata</b>	<b>0,437</b>	<b>0,858</b>	<b>1,054</b>	<b>1,370</b>
	232	Replikasi 1	0,609	0,975	1,137	1,495
		Replikasi 2	0,529	0,975	1,069	1,461
		Replikasi 3	0,754	1,446	1,483	2,221
		<b>Rata-rata</b>	<b>0,631</b>	<b>1,001</b>	<b>1,230</b>	<b>1,726</b>
	349	Replikasi 1	0,731	1,247	1,368	2,106
		Replikasi 2	0,770	1,455	1,339	2,168
		Replikasi 3	1,180	1,887	1,695	3,398
		<b>Rata-rata</b>	<b>0,894</b>	<b>1,530</b>	<b>1,467</b>	<b>2,557</b>
465	Replikasi 1	1,031	1,552	1,614	2,080	
	Replikasi 2	0,909	1,677	1,614	1,946	
	Replikasi 3	1,656	2,775	2,920	3,519	
	<b>Rata-rata</b>	<b>1,199</b>	<b>2,001</b>	<b>2,049</b>	<b>2,515</b>	

**Keterangan :** Interpretasi nilai CI yaitu efek sinergis (0,3-0,7); efek sinergis sedang (0,7-0,85); efek sinergis ringan (0,85-0,9); efek aditif (0,9-1,1); efek antagonis ringan (1,1-1,2); efek antagonis sedang (1,2-1,45); efek antagonis (1,45-3,3) (Bijnsdorp *et al.*, 2011). EHD = Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd.; DOX = Doksorubisin.

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

#### **6.1 Pembahasan Hasil Penelitian**

Pengobatan kanker payudara dapat dilakukan melalui operasi, kemoterapi maupun terapi tambahan. Kemoterapi yang banyak digunakan dan efektif saat ini adalah doksorubisin. Penggunaan doksorubisin perlu dipantau mengingat batasan dosis akumulasi yang dapat menyebabkan toksisitas pada jantung (PHSA, 2017). Salah satu cara untuk menurunkan toksisitas doksorubisin adalah dengan menurunkan dosis doksorubisin yang digunakan melalui kombinasinya dengan suatu agen antikanker lainnya. Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) banyak diresepkan dalam pengobatan herbal Cina untuk terapi kanker payudara dan usus besar (Chen *et al.*, 2016). Sehingga pada penelitian ini dilakukan kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin untuk mengetahui efek sitotoksik yang terjadi terhadap sel MCF-7.

##### **6.1.1 Ekstraksi Rumput Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.)**

Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) (EHD) diambil dari *Hedyotis* Herba yang dibuat menjadi serbuk. Hal ini dilakukan karena serbuk mempunyai ukuran partikel yang kecil dan homogen sehingga dapat meningkatkan luas permukaan simplisia yang kontak dengan pelarut ekstraksi.

Ekstraksi *Hedyotis diffusa* Willd. dilakukan menggunakan metode maserasi, karena maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana dan mudah dilakukan serta dapat dilakukan untuk mengeluarkan senyawa fitokimia yang tidak diketahui karakteristiknya seperti tidak tahan terhadap suhu tinggi. Maserasi

simplisia *Hedyotis diffusa* Willd. menggunakan pelarut etanol 80% karena etanol dapat mengekstraksi senyawa yang bersifat polar maupun non polar. Etanol memiliki dua gugus dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu gugus alkil yang bersifat non polar dan gugus hidroksil yang bersifat polar, sehingga etanol dapat mengekstraksi senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Kristiani *et al.*, 2014). Senyawa polar yang terkandung dalam *Hedyotis diffusa* Willd. meliputi flavonoid dan asam fenol, sedangkan senyawa semi polar meliputi alkaloid, sterol, dan kumarin, serta senyawa non polar yaitu minyak atsiri.

### **6.1.2 Efek Sitotoksik Tunggal Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan Doksorubisin (DOX)**

Viabilitas sel diukur menggunakan metode 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide (MTT). Sel hidup akan mengubah MTT menjadi produk formazan berwarna ungu dengan absorbansi maksimum mendekati 570 nm. Pembentukan warna ini kemudian dijadikan marker untuk melihat viabilitas sel (Riss *et al.*, 2016).

#### **6.1.2.1 Pengaruh Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) terhadap Viabilitas**

##### **Sel**

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) mampu menurunkan viabilitas sel. Konsentrasi EHD sebesar 300-1500 µg/ml mampu menurunkan viabilitas sel hingga 2-90%. Nilai IC<sub>50</sub> diukur sebanyak 3 kali perlakuan dan didapatkan rata-rata sebesar 930 ± 30,143 µg/ml. Nilai IC<sub>50</sub> > 501 µg/ml menunjukkan bahwa EHD tidak mempunyai efek antikanker terhadap lini sel kanker payudara MCF-7 pada penghambatan proliferasi sel berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> (Srisawat *et al.*, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2010) membuktikan bahwa senyawa metilantrokuinon *Hedyotis diffusa* Willd. mampu menginduksi apoptosis pada lini sel kanker payudara MCF-7. Metilantrokuinon dari *Hedyotis diffusa* Willd. dapat menginduksi peningkatan kalsium bebas intraseluler dalam sel MCF-7. Akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam mitokondria menyebabkan penurunan potensial membran mitokondria sehingga terjadi pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma dan terjadi aktivasi caspase-9. Selain itu, dalam penelitian ini juga diketahui bahwa terjadi aktivasi caspase-4 dan caspase-7. Metilantrokuinon *Hedyotis diffusa* Willd. dapat menginduksi fosforilasi JNK yang meregulasi protein Bcl-2 dan Bax sehingga terjadi induksi apoptosis (Liu *et al.*, 2010).

#### 6.1.2.2 Pengaruh Doksorubisin (DOX) terhadap Viabilitas Sel

Doksorubisin merupakan obat konvensional antikanker yang banyak digunakan untuk terapi kanker payudara. Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian DOX mampu menurunkan viabilitas sel. Konsentrasi DOX sebesar 100-1000 nM mampu menurunkan viabilitas sel hingga 13-90%. Nilai  $\text{IC}_{50}$  diukur sebanyak 3 kali perlakuan dan didapatkan rata-rata sebesar  $490 \pm 83,293$  nM.

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi yang bekerja melalui hambatan topoisomerase II, pembentukan radikal bebas, dan induksi protein p53. Topoisomerase II merupakan enzim yang berperan penting dalam perubahan bentuk topologis DNA dalam proses replikasi dan transkripsi. Struktur kuinon DOX dapat dioksidasi menjadi radikal semikuinon yang secara cepat bereaksi dengan oksigen sehingga menghasilkan superoksida dan hydrogen peroksida yang menyebabkan kerusakan DNA. Protein p53 merupakan protein pensupresi tumor yang menjaga homeostasis dengan mengekspresikan protein p21 sebagai regulator siklus sel (Lu, 2010 ; Yang *et al.*, 2014).

### 6.1.3 Efek Kombinasi Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. (EHD) dan Dokсорubisin (DOX)

Efek pemberian kombinasi EHD dan DOX diukur menggunakan *combination index* (CI) sehingga dapat disimpulkan jenis interaksi sitotoksik yang terjadi. CI merupakan indeks yang menggambarkan interaksi farmakodinamik secara kuantitatif meliputi sinergis, aditif, dan antagonis (Chou, 2010). Dosis kombinasi EHD dan DOX yang digunakan yaitu sebesar  $1/2 IC_{50}$ ,  $3/8 IC_{50}$ ,  $1/4 IC_{50}$ , dan  $1/8 IC_{50}$ . Dosis EHD yang digunakan yaitu 116  $\mu\text{g/ml}$ , 232  $\mu\text{g/ml}$ , 349  $\mu\text{g/ml}$ , dan 465  $\mu\text{g/ml}$ . Dosis DOX yang digunakan yaitu 61 nM, 123 nM, 184 nM, dan 245 nM. Penelitian ini membuktikan bahwa kombinasi EHD dan DOX mampu memberikan efek sinergis berdasarkan *combination index*. Kombinasi dosis yang mempunyai efek sinergis adalah kombinasi DOX 61 nM dengan EHD 116  $\mu\text{g/ml}$  dan 232  $\mu\text{g/ml}$  dengan nilai CI yaitu 0,437 dan 0,631. Efek sinergis ringan ditunjukkan oleh kombinasi dosis DOX 123 nM dan EHD 123  $\mu\text{g/ml}$  serta dosis DOX 61 nM dan EHD 349  $\mu\text{g/ml}$ . Kombinasi DOX 184 nM dan EHD 116  $\mu\text{g/ml}$  serta DOX 123 nM dan EHD 232  $\mu\text{g/ml}$  menimbulkan efek aditif. Efek antagonis ditunjukkan oleh kombinasi dosis lainnya.

Efek sinergis yang dihasilkan dari kombinasi EHD dan DOX dapat ditimbulkan karena efek farmakologis dari kedua senyawa tersebut yang sama yaitu efek antikanker. Dalam penelitian ini diketahui bahwa EHD dan DOX masing-masing mempunyai efek sitotoksik yang dapat dilihat melalui penurunan viabilitas sel. Namun, efek sinergis yang dihasilkan bergantung pada dosis kombinasi EHD dan DOX. Kombinasi EHD dan DOX juga dapat menimbulkan efek antagonis. Hal ini dapat disebabkan dikarenakan adanya efek farmakologis lain dari EHD yang berbanding terbalik dengan mekanisme aksi DOX sebagai obat antikanker.

Penelitian yang dilakukan oleh Lu *et al.* (2000) didapatkan bahwa senyawa flavonoid dan iridoid *Hedyotis diffusa* Willd. mempunyai efek antioksidan dengan efek sebagai anion superoksida scavengers dan anti-lipid peroksidasi minor (Chen *et al.*, 2016). Salah satu mekanisme aksi DOX sebagai obat antikanker adalah melalui pembentukan radikal bebas (Lu, 2010).

*Hedyotis diffusa* Willd. menjadi herbal yang paling banyak diresepkan untuk pengobatan kanker payudara di Taiwan pada tahun 2008 (Yeh *et al.*, 2014).

Pengobatan kanker di Cina menggunakan *Hedyotis diffusa* Willd. dengan dosis 30-40 gram dekokta (Shu-De, 2003). Dalam kombinasi EHD dan DOX hanya dibutuhkan dosis EHD sebesar 116 µg/ml atau 348 mg pada volume distribusi plasma 3 liter, sehingga dibutuhkan 4,78 gram simplisia untuk rute injeksi intravena.

Dosis doksorubisin yang digunakan sebagai agen terapi tunggal adalah 60-75 mg/m<sup>2</sup> yang diadministrasikan melalui injeksi intravena pada interval waktu 21 hari (FDA, 2003) atau 103,80-129,75 mg pada luas permukaan tubuh 1,73 m<sup>2</sup>.

Sedangkan dosis doksorubisin yang digunakan sebagai kombinasi siklofosamid untuk terapi kanker payudara adalah 60 mg/m<sup>2</sup> yang diadministrasikan melalui injeksi intravena (PHSA, 2018) atau 103,80 mg pada luas permukaan tubuh 1,73 m<sup>2</sup>. Dalam kombinasi EHD dan DOX dibutuhkan dosis doksorubisin sebesar 61 nM atau 0,03538 µg/ml, sehingga dibutuhkan dosis doksorubisin 0,106 mg pada volume distribusi plasma 3 liter. Hal ini membuktikan bahwa dosis doksorubisin yang dibutuhkan untuk terapi kanker payudara jauh lebih rendah apabila dikombinasikan dengan EHD dibandingkan penggunaannya sebagai agen terapi tunggal maupun sebagai kombinasi dengan siklofosamid.

Rendahnya dosis doksorubisin yang digunakan, dapat menurunkan resiko terjadinya efek samping yang ditimbulkan. Doksorubisin dapat menyebabkan terjadinya gagal jantung kongestif dengan probabilitas 1,5% pada dosis akumulasi sebesar 300 mg/m<sup>2</sup> dan resiko akan meningkat secara cepat dengan dosis akumulasi lebih dari 400 mg/m<sup>2</sup> (FDA 2003).

## 6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dapat dikembangkan sebagai terapi tambahan kanker payudara. Dalam penelitian ini ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dikombinasikan dengan obat antikanker doksorubisin untuk terapi adenokarsinoma. Kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan doksorubisin ini diharapkan mampu memberikan efek sinergis sehingga dapat menurunkan resiko efek samping obat, serta dapat mengurangi resiko resistensi.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini meliputi:

1. Tidak dilakukannya uji secara kualitatif dan kuantitatif mengenai kandungan senyawa fitokimia dalam ekstrak.
2. Uji kandungan etanol dalam ekstrak.
3. Uji toksisitas ekstrak terhadap sel normal.



## BAB 7 PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah:

1. Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) tidak mempunyai efek antikanker pada jalur penghambatan proliferasi sel, sedangkan doksorubisin mempunyai efek antikanker pada jalur penghambatan proliferasi sel berdasarkan nilai  $IC_{50}$  pada kultur sel MCF-7.
2. Kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin mampu memberikan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan *combination index* (CI) dengan dosis doksorubisin 61 nM dan ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) 116  $\mu\text{g/ml}$  dan 232  $\mu\text{g/ml}$  dengan nilai CI sebesar 0,437 dan 0,631.

### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji secara kualitatif dan kuantitatif mengenai senyawa fitokimia yang terkandung di dalam ekstrak. Uji secara kualitatif dapat dilakukan melalui skrining senyawa fitokimia, sedangkan uji secara kuantitatif dilakukan dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Uji kualitatif dan kuantitatif senyawa fitokimia ini dilakukan untuk standarisasi ekstrak sehingga mutu ekstrak terjaga.
2. Perlu dilakukan uji kandungan etanol dalam ekstrak karena etanol dapat bersifat toksik terhadap sel. Etanol sejumlah kandungannya dalam ekstrak diberikan pada sel dan digunakan sebagai kontrol.

3. Perlu dilakukan uji toksisitas ekstrak terhadap sel normal menggunakan sel fibroblas sebagai kontrol.
4. Penelitian dapat dikembangkan dengan meneliti lebih lanjut mengenai peningkatan sensitivitas doksorubisin dengan pemberian kombinasi bersama ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. menggunakan lini sel kanker payudara MDA-MB-231/DR (MDA-MB-231/*Doxorubicin resistant*).
5. Penelitian dapat dikembangkan dengan meneliti lebih lanjut mengenai apoptosis sel pada pemberian ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan doksorubisin menggunakan *flow cytometry* dengan *Annexin V* dan *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling* (TUNEL) assay.



## DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society, 2018. Chemotherapy for Breast Cancer. *Treating Breast Cancer*, (Online), ([www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html](http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html)), diakses 30 Mei 2018).

Astuti, Y. 2013. *Asuhan Keperawatan pada Ny.C dengan Perawatan Luka Kanker Payudara di RSPAD Gatot Soebroto*. PhD. Thesis, Universitas Indonesia.

ATCC. 2008. MCF7 (ATCC HTB-22), (Online), ([www.atcc.org/Product/All/HTB-22.aspx](http://www.atcc.org/Product/All/HTB-22.aspx)), diakses 23 Maret 2018).

Azwanida, N.N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* 4 (3): 1-6.

Bijnsdorp, I.V., Giovannetti, E. and Peters, G.J. 2011. Analysis of Drug Interaction. *Methods in Molecular Biology* 731 (35) : 1-14.

Chen, R., He, J., Tong, X., Tang, L. and Liu, M. 2016. The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): a Review on Phytochemistry, Pharmacology, Quality Control and Pharmacokinetics. *Molecules* 21: 1-4.

Chou, T.C. 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using The Chou-Talalay Method. *Cancer Research* 70 (2): 440-446.

Cho, W. 2011. *Evidence-based Anticancer Materia Medica*, Springer, Berlin, p.179-192.

Dong, Q., Ling, B., Gao, B., Maley, J., Sammynaiken, R. and Yang, J. 2014. *Hedyotis diffusa* Water Extract Diminished the Cytotoxic Effects of Chemotherapy Drugs against Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Natural Product Communication* 9 (5): 699-700.

FDA. 2003. Doxorubicin PI USA, (Online), ([www.fda.gov/UCM199635](http://www.fda.gov/UCM199635)), diakses 12 Desember 2017).

GBIF. 2017. *Hedyotis diffusa* Willd., (Online), ([www.gbif.org/species/7610303](http://www.gbif.org/species/7610303), diakses 12 Desember 2017).

Gu, G., Barone, I., Gelsomino, L., Giordano, C., Bonofiglio, D., Statti, G., Menichini, F., Catalano, S. and Ando, S. 2012. *Oldenlandia diffusa* Extracts Exert Antiproliferative and Apoptotic Effects on Human Breast Cancer Cells Through ER $\alpha$ /Sp1-mediated p53 Activation. *Journal of Cellular Physiology* 227: 3363-3372.

IARC. 2013. *Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises to 14.1 Million New Cases in 2012 : Marked Increase in Breast Cancers Must Be Addressed.*

Ismail, M.Y.M. 2009. Herb-Drug Interaction and Patient Counseling. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals Sciences* 1: 151-161.

IUCN. 2017. *Oldenlandia diffusa* (Snake Needle Grass, Spreading Hedyotis), (Online), ([www.iucnredlist.org/details/199702/0](http://www.iucnredlist.org/details/199702/0), diakses 12 Desember 2017).

Kabel, A.M. and Baali, F.H. 2015. Breast Cancer : Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Journal of Cancer Research and Treatment* 3: 28-33.

Kemkes RI. 2009. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Komite Penanggulangan Kanker Nasional, Jakarta, hal 1-50.

Kristiani, V., Halim, F.I., Indraswati, N. and Irawaty, W. 2014. *Ekstraksi Senyawa Fenolik Dari Rambut Jagung Sebagai Antioksidan Alami. Pengaruh Konsentrasi Etanol Dan Waktu Maserasi*. Tugas Akhir. Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.

Le, C. 2014. Experiment Designs for The Assessment of Drug Combination Synergism. *Austin Biometrics and Biostatistics* 1: 1-6.

Liu, Z., Liu, M. and Lin, J. 2010. Methyl Anthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd. Induces Ca<sup>2+</sup>-mediated Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Toxicol In Vitro* 24: 142-147.

Lu, F. 2010. *Pharmacodynamics, Pharmacokinetics and Pharmacogenetics of Doxorubicin in Singaporean Breast Cancer Patients*. PhD. Thesis, National University of Singapore.

PHSA. 2017. Drug Name: Doxorubicin. *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual* 5: 1-12.

PHSA. 2018. BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Therapy for Breast Cancer Using Dose Dense Therapy: Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel and Trastuzumab (Herceptin). *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual Summary BRAJACTTG*, p. 1-7.

Rahmatari, A. 2014. Anggapan Kesehatan yang Dirasakan Wanita Usia Subur dalam Memeriksa Payudara Sejak Dini. *Jurnal Berkala Epidemiologi* 2: 309-320.

Ramli, M. 2015. Update Breast Cancer Management. *Majalah Kedokteran Andalas* 38: 40.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J. and Minor, L. 2016. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, p. 1-31.

Rui-jiang, W., Shu-jun, D. and Qi, L. 2014. Nomenclature Clarification of the Traditional Chinese Medicine Baihua-sheshecao and its Adulterants Based on Molecular and Morphological Evidence. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 22: 431-442.

Safarzadeh, E., Shotorbani, S.S. and Bbaradaran, B. 2014. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4: 421-427.

Shah, R., Rosso, K. and Nathason, D. 2014. Pathogenesis, Prevention, Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 5: 283-298.

Shu-De, Jiao., 2003. *Ten Lectures on The Use of Medicinals from the Personal Experience of Jiao Shu-De*, Paradigm Publications, New Mexico, p. 519.

Sihombing, M. and Saparudin, A.N. 2014. Faktor Risiko Tumor Payudara pada Perempuan Umur 25-65 Tahun di Lima Kelurahan Kecamatan Bogor Tengah. *Pusat Teknologi Kesehatan Dan Epidemiologi Klinik Badan Penelitian Dan Pengembangan, Kementerian Kesehatan RI* 1: 10.

Srisawat, T., Chumkaew, P., Heed-Chim, W., Sukpondma, Y. and Kanokwiroon, K. 2013. Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extract of *Vatica diospyroides* Symington Type LS. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February* 12 (1): 71-76.

Stuart, A. 2014. Ulasiman-kalat. *Philipp. Med. Plants*, (Online), ([www.stuartxchange.org/UlasimanKalat.html](http://www.stuartxchange.org/UlasimanKalat.html)), diakses 12 Desember 2017).

Suprpti, H. 2008. *Interaksi Obat*. PhD. Thesis, University of Wijaya Kusuma Surabaya.

Tacar, O., Sriamornsak, P and Dass, C.R. 2013. Doxorubicin : an Update on Anticancer Molecular Action. *Journal of Pharmacy And Pharmacology* 65: 157-170.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E. and Altman, R.B. 2011. Doxorubicin Pathways : Pharmacodynamics and Adverse Effect. *Pharmacogenet Genomics* 21: 440-446.

Wahidin, M., Noviani, R., Hermawan, S., Andriani, V., Ardian, A. and Djarir, H. 2012. Population-Based Cancer Registration in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13: 1709-1710.

Widowati, L. and Mudahar, H. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium Flagelliforme* (Lood) Bi) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 In Vitro. *Jurnal Media Litbang Kesehatan* 19: 3-8.

Wulandari, R.D. 2008. Genetika Kanker. *Genetika Medik* 1-7.

Yang, F., Teves, S.S., Kemp, C.J. and Henikoff, S. 2014. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer* 1845: 84-89.

Yeh, Yuan-Chieh., Chen, Hsing-Yu., Yang, Sien-Hung., Lin, Yi-Hsien., Chiu, Jen-Hwey., Lin, Yi-Hsuan. and Chen, Jiun-Liang. 2014. *Hedyotis diffusa* Combined with *Scutellaria barbata* Are the Core Treatment of Chinese Herbal Medicine Used for Breast Cancer Patients: A Population-Based Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014:1-9.

Yunas, S.R., Handayani, S. and Hermawan, A. 2017. Sel MCF-7. *Cancer Chemoprevention Research Center*, (Online), ([http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id=1234](http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=1234), diakses 12 Desember 2017).

Zaha, D.C. 2014. Significance of Immunohistochemistry in Breast Cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 5 (3): 382-392.

