

**PENGARUH EKSTRAK METANOLIK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth.)
TERHADAP PEMACUAN APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA**

**APOPTOTIC EFFECT OF KENIKIR LEAVES (*Cosmos caudatus* Kunth.)
METHANOLIC EXTRACT ON BREAST CANCER CELL LINE**

**Ratna Budhi Pebriana*, Bantari Wisynu Kusuma Wardhani*, Esti Widayanti*,
Nur Latifah Sri Wijayanti*, Titi Ratna Wijayanti*, Sugeng Riyanto** dan Edy Meiyanto****

**Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta*

***Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Farmasi UGM*

ABSTRAK

*Ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) diketahui mengandung flavonoid dan glikosida kuersetin yang memiliki potensi sebagai antikanker. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui apakah ekstrak metanolik daun kenikir mampu memacu apoptosis sel kanker payudara T47D. Daun kenikir yang telah dikeringkan diekstraksi dengan metanol menggunakan alat Soxhlet. Hasil ekstraksi dipisahkan dengan rotary evaporator, kemudian diuji sitotoksiknya terhadap sel T47D menggunakan metode MTT. Konsentrasi ekstrak yang digunakan sebesar 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 dan 5 µg/ml dengan waktu inkubasi selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan terjadinya apoptosis dengan metode double staining. Nilai IC₅₀ ekstrak metanolik daun kenikir yang diperoleh sebesar 344,91 µg/ml. Uji double staining menunjukkan adanya sel yang mengalami apoptosis. Berdasarkan hasil tersebut, maka ekstrak metanolik daun kenikir terbukti bersifat sitotoksik serta memiliki kemungkinan dalam memacu apoptosis sel kanker payudara T47D. Hal ini dapat dijadikan dasar pengembangan tanaman ini sebagai agen antikanker dengan target aksi spesifik.*

Kata kunci: daun kenikir, ekstrak metanolik, sel T47D, apoptosis

ABSTRACT

*It has been known that methanolic extract of kenikir (*Cosmos daudatus* Kunth) contain on some aglicone flavonoids and quercetine glycoside. Those have been reported have potential as anticancer. This experiment was designed to know whether methanolic extract of *C. caudatus* leaves has capability of apoptotic stimulation on breast cancer cell line T47D. Dried leaves were extracted through Soxhlet extractor by using methanol and dried under vacuo and reduced pressure. Obtained extract was examined its cytotoxic effect on T47D by using MTT method. A series of tested concentration ranging from 500, 400, 300, 100, 50, 25, and 5 µg/ml and underwent incubation for 24 hours. Apoptotic observation was performed by double staining method. This experiment showed that IC₅₀ of the extract is 344.91 5 µg/ml. From the double staining test we identified some cell were suffering apoptosis. So from both facts, methanolic extract of *C. caudatus* has cytotoxic effect and has capability of stimulating apoptosis on T47D cells. For these reasons it can be used a basis for developing this plant for anticancer agent with a specific target.*

Key words: kenikir leaves, methanolic extract, T47D cells, apoptosis

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyebab kematian yang cukup tinggi pada wanita di dunia. Setiap tahun terdapat lebih dari 1,1 juta wanita penderita kanker payudara yang baru dengan 410.000 kematian (1,6% dari seluruh kematian wanita di dunia). Oleh karena itu, kanker payudara ini telah menjadi masalah urgent dalam dunia kesehatan dengan peningkatan insidensi lebih dari 5% setiap tahunnya (Anderson, *et al.*, 2006).

Cosmos caudatus Kunth. atau yang lebih dikenal dengan nama kenikir merupakan salah

satu sayuran yang sering dikonsumsi sebagai lalapan. Secara tradisional daun kenikir berkhasiat sebagai obat penambah nafsu makan, penguat tulang, lemah lambung dan pengusir serangga. Penelitian yang dilakukan oleh Lotulung *et al.*, (2001), menunjukkan bahwa daun kenikir mengandung senyawa yang memiliki daya antioksidan yang cukup tinggi, dengan harga IC₅₀ sebesar 70 mg/L. Abas *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa ekstrak metanolik daun kenikir mengandung flavonoid dan glikosida kuersetin.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah

ada, senyawa flavonoid diketahui mampu menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram dan berperan penting dalam proses perkembangan kanker. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis adalah melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease (Ren, *et al.*, 2003). Kuersetin memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sel kanker kolon Caco-2 dan HT-29 serta sel kanker leukemia HL-60 dengan cara menstimulasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria (Taraphdar, 2001). Berdasarkan hal tersebut maka ekstrak metanolik daun kenikir diduga dapat memacu apoptosis sel kanker payudara.

METODE PENELITIAN

Bahan: bagian daun dari tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) yang diambil dari Moyudan, Sleman, Yogyakarta. Diambil daun secara acak yang masih segar dan tidak berpenyakit, sel T47D yang digunakan merupakan koleksi CCRC, Fakultas Farmasi, UGM. Sel T47D ditumbuhkan pada media kultur yang memiliki komposisi RPMI 1640 (Gibco), FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (Gibco) dan penisilin, streptomisin 1% (Gibco).

Jalan Penelitian

Pembuatan Ekstrak

Daun tanaman *Cosmos caudatus* Kunth. dicuci dengan air mengalir, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu maksimum 40°C. Setelah kering simplisia tersebut diblender, lalu diayak B₃₀. Serbuk kering kemudian diekstrak dengan penyari metanol p.a. (Merck) menggunakan alat Soxhlet. Ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* (Heidolph WB 2000) hingga konsistensinya kental.

Uji Sitotoksik

Ekstrak kental daun kenikir diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D menggunakan metode MTT. Sel T47D yang sebelumnya disimpan dalam tangki nitrogen disubkultur pada media kultur hingga siap digunakan untuk uji. Sejumlah 1×10^4 sel didistribusikan ke dalam sumuran pada *96 well plate* (Nunc) dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% (Heraeus) bersuhu 37°C selama semalam. Ekstrak uji yang sudah dilarutkan dalam *co-solvent* DMSO (Sigma) ditambahkan ke dalam sumuran dengan delapan seri kadar yaitu 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 dan 5 µg/ml selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak

dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS (Sigma). Pada masing-masing sumuran lalu ditambahkan 100 µl media kultur dan 10 µl MTT (Sigma) konsentrasi 5 mg/ml. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01N (Merck), lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan *ELISA reader* (Anthos 2001) pada panjang gelombang 550 nm.

Pengecatan DNA

Cover slip (Thermanox® Plastic Coverslips) dimasukkan ke dalam *24 well plate* (Nunc), kemudian sejumlah 5×10^4 sel ditanam di atasnya dan dibiarkan selama 30 menit agar sel dapat menempel pada *cover slip*. Sel kemudian ditambah dengan media sebanyak 300 µl dan diinkubasi semalam dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37°C. Selanjutnya ke dalam *well* ditambah larutan uji dengan konsentrasi 200 µg/ml, 300 µg/ml dan 400 µg/ml lalu diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dibuang lalu *cover slip* diambil dan diletakkan pada *object glass*. *Cover slip* ditambah dengan 10 µl 1X *Working Solution* akridin oranye-etidium bromida (BD) dan segera diamati di bawah mikroskop fluoresens (Axiolab).

Analisis Data

Pada uji sitotoksik, hasil pembacaan absorbansi dengan *ELISA reader* dikonversikan ke dalam bentuk % sel hidup dengan cara sebagai berikut:

% Sel Hidup =

$$\frac{\text{Absorbansi Sel Perlakuan} - \text{Absorbansi Media}}{\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi Media}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup, dapat dihitung harga IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi linier yang merupakan hubungan antara % sel hidup vs kadar ekstrak metanolik daun kenikir. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin poten ekstrak tersebut dalam menghambat pertumbuhan sel T47D.

Analisis adanya apoptosis pada metode *double staining* didasarkan pada pengamatan warna fluoresen yang dihasilkan oleh sel. Fluoresensi hijau yang seragam pada inti dihasilkan oleh sel hidup yang masih memiliki membran yang sempurna, sedangkan fluoresensi hijau terang dihasilkan oleh sel yang mengalami apoptosis fase awal. Sel yang mengalami apoptosis fase akhir akan berfluore-

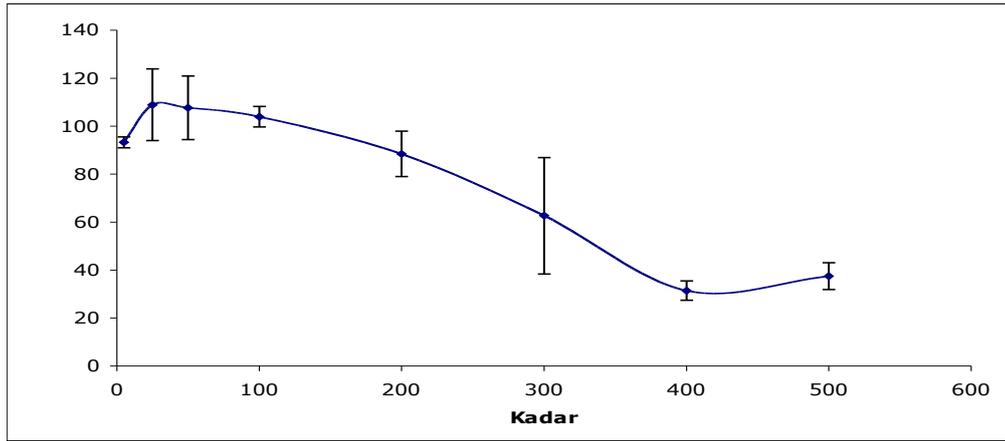
sensi oranye pada inti. Fluoresensi oranye yang seragam terjadi pada sel yang mengalami nekrosis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

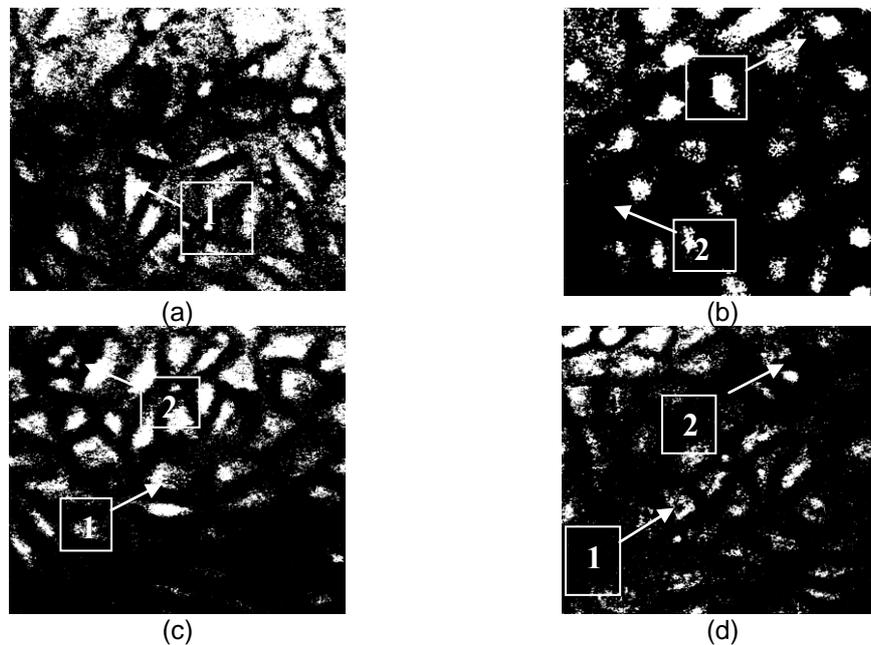
Uji sitotoksik ekstrak metanolik daun kenikir terhadap sel kanker payudara T47D memberikan hasil berupa penurunan % sel hidup seiring dengan peningkatan kadar (Gambar 1). Dari kurva tersebut dibuat persamaan regresi linier dengan tanpa mengikutsertakan data pada kadar 5 dan 500 µg/ml. Persamaan regresi linier yang didapatkan

adalah $y = -0.2042x + 120.43$ dengan harga $R^2 = 0,9569$. Nilai IC_{50} dihitung secara intrapolasi menggunakan persamaan tersebut sehingga dihasilkan angka 344,91 µg/ml.

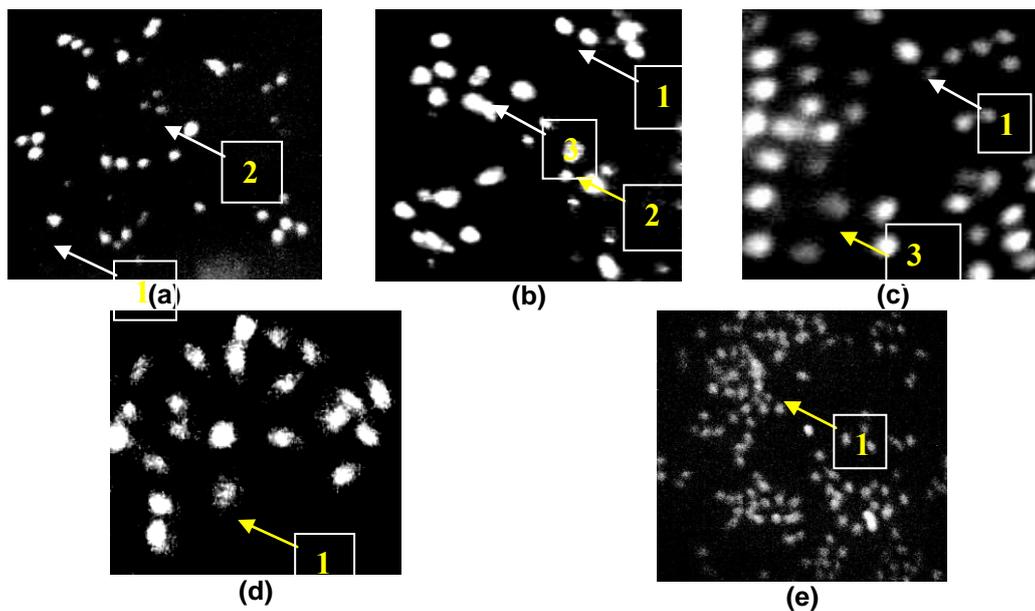
Pada pengamatan morfologi sel T47D yang tidak diberi perlakuan ditemukan bentuk helaian daun yang melekat pada dasar sumuran. Adanya perlakuan dengan ekstrak uji dapat menyebabkan perubahan morfologi sel T47D. Sel yang mati berbentuk bulat, tampak keruh dan mengapung (Gambar 2).



Gambar 1—Kurva % sel hidup T47D vs kadar ekstrak metanolik daun kenikir. Ekstrak metanolik daun kenikir diperlakukan terhadap sel T47D dengan kadar 500 µg/ml, 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml dan 50 µg/ml, 25 µg/ml, 5 µg/ml. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ bersuhu 37°C. Penghitungan jumlah sel yang hidup didasarkan pada metode MTT.



Gambar 2—Morfologi sel T47D setelah inkubasi 24 jam. Sel tanpa perlakuan (a), sel dengan perlakuan ekstrak metanolik daun kenikir konsentrasi 500 µg/ml (b) 200 µg/ml (c) dan 50 µg/ml (d). Sel hidup tampak berbentuk daun atau bulatan terang, sedangkan sel mati berbentuk bulat, tampak keruh dan mengapung. Tampak pada perlakuan dengan ekstrak metanolik daun kenikir ditemukan sel mati. Keterangan: (1) Sel mati, (2) Sel hidup.



Gambar 3—Morfologi sel T47D akibat perlakuan ekstrak (a) konsentrasi 200µg/ml (b) 300 µg/ml (c) 400 µg/ml (d) kontrol pelarut dan (e) kontrol sel, setelah pengecatan dengan menggunakan *double staining* akridin oranye-etidium bromida. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop fluoresens. Sel hidup berbentuk daun atau bulatan dengan warna hijau yang seragam. Sel nekrosis berwarna oranye yang seragam Sedangkan sel apoptosis memiliki bentuk yang tidak teratur dengan warna oranye yang tidak seragam. Pada kelompok perlakuan tampak sel yang mati, baik karena apoptosis maupun nekrosis. Keterangan: 1. sel hidup, 2. nekrosis, 3. apoptosis

Pada pengecatan DNA terlihat adanya fluoresensi hijau terang pada kontrol sel (Gambar 3). Warna hijau terang yang seragam pada nukleus dimiliki oleh sel hidup yang masih memiliki membran sel yang utuh (McGahon, *et al.*, 1995). Sedangkan pada sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak metanolik daun kenikir menunjukkan warna yang tidak seragam yaitu warna hijau bercampur oranye yang mengindikasikan terjadinya apoptosis. Hal tersebut terjadi karena sel mulai mengalami *membran blebbing*, sehingga etidium bromid mulai masuk ke dalam sel. Beberapa sel mengalami kondensasi inti yang ditunjukkan dengan adanya warna kekuningan pada nukleus. Hal ini menandakan adanya peristiwa *early apoptosis*.

Berdasarkan hasil uji sitotoksik, ekstrak metanolik daun kenikir memiliki nilai IC_{50} yang relatif tinggi terhadap sel T47D. Namun, pengamatan morfologi sel setelah perlakuan menunjukkan adanya fenomena kematian sel. Hal tersebut diperkuat dengan hasil pengecatan DNA yang mengindikasikan bahwa kematian sel yang terjadi disebabkan oleh peristiwa apoptosis.

Potensi ekstrak metanolik daun kenikir dalam memacu apoptosis sel kemungkinan disebabkan oleh senyawa flavonoid dan

glikosida kuersetin yang dikandungnya. Flavonoid dapat memacu apoptosis melalui beberapa mekanisme antara lain penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak serta aktivasi endonuklease (Ren, *et al.*, 2003). Kuersetin memiliki kemampuan memacu apoptosis sel kanker kolon Caco-2 dan HT-29 serta sel kanker leukemia HL-60 dengan cara memstimulasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria (Taraphdar, 2001). Kuersetin juga menunjukkan efek sinergis dengan *cisplatin* secara *in vitro* dan *in vivo* melalui penghambatan PKC (Hofmann *et al.*, 1988 *cit* Middleton dan Kandaswami, 1993).

Topoisomerase merupakan suatu enzim yang berfungsi memotong DNA yang berilitan ketat akibat pembukaan *double strand* DNA oleh enzim helikase, memutar balik dan kemudian menyambungkan lagi. Enzim tersebut bekerja pada saat perpanjangan replikasi DNA (Sismindari, 2002). Jika terjadi penghambatan terhadap aktivitas topoisomerase, akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA terpotong, sehingga menghasilkan kerusakan *double strand* DNA yang permanen (Beck *et al.*, 2001). Kerusakan DNA akan mengaktifasi p53 dan

memicu apoptosis.

Bax, Bak, Bcl2 dan Bcl-xl adalah *family* protein Bcl-2. Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 dan Bcl-xl merupakan protein antiapoptosis (King, 2000). Bcl2 menempel pada membran luar mitokondria sehingga menghalangi pelepasan sitokrom c sedangkan Bcl-xl berikatan dengan Apaf-1 (Nunez, *et al.*, 1998). Sitokrom c dan Apaf-1 diperlukan dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsik dengan cara mengaktifasi caspase 9 (Saleh, *et al.*, 1999). Fungsi bertahan hidup tersebut diimbangi oleh fungsi kematian sel yang diperantarai oleh Bax dan Bak. Bax dapat berikatan dengan membran luar mitokondria sehingga menginduksi pengeluaran sitokrom c dari mitokondria sedangkan Bak dapat berikatan dengan Bcl-xl sehingga membebaskan Apaf-1 (Nunez, *et al.*, 1998). Apabila ekspresi Bax atau Bak dinaikkan dan Bcl-2 atau Bcl-xl diturunkan, maka akan terjadi regulasi sel ke arah kematian melalui apoptosis.

Protein Kinase C (PKC) merupakan suatu protein yang berfungsi mengkatalis fosforilasi banyak jenis protein seluler dan mengaktifkannya (Meiyanto, 2002). Protein tersebut diperlukan perannya dalam proses transduksi sinyal melalui *second messenger*. Pada transduksi sinyal terjadi penerusan pesan yang berupa rangsang dari luar melalui menuju ke inti sel untuk mempengaruhi ekspresi gen guna memberikan tanggapan sesuai dengan kebutuhan lingkungan (Meiyanto, 2002). Adanya penghambatan pada PKC akan menyebabkan jalur transduksi sinyal terhambat sehingga tidak terjadi ekspresi gen yang dikehendaki dan sel mati. Pada kanker payudara, PKC berperan sebagai modulator transkripsi dari *Vascular Endothelial Growth*

Factor (VEGF). VEGF akan menstimulasi adanya proses angiogenesis yang penting bagi pertumbuhan sel kanker (Yance, 2005). Bila angiogenesis terhambat, maka sel akan kekurangan nutrisi dan mengalami kematian.

Endonuklease merupakan enzim yang berfungsi melakukan pemotongan genom DNA (Franks and Teich, 1997) sehingga terjadi fragmentasi. Selain itu, juga melakukan pemecahan komponen seluler. Adanya aktivasi terhadap enzim ini akan memperbesar kemungkinan suatu sel untuk melakukan apoptosis.

Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak metanolik daun kenikir memiliki aktivitas dalam memacu kematian sel T47D melalui mekanisme apoptosis, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai antikanker dengan target aksi spesifik. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui senyawa aktif dalam ekstrak yang bertanggung jawab terhadap mekanisme pemacuan apoptosis sel T47D. Selanjutnya, dilakukan penelusuran terhadap mekanisme aksi senyawa untuk mengetahui targetnya dalam pemacuan apoptosis sel kanker payudara.

KESIMPULAN

Ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) memiliki sifat sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC₅₀ sebesar 344,91 µg/ml serta memiliki kemungkinan dalam pemacuan apoptosis melalui berbagai macam kemungkinan mekanisme.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada DIKTI atas bantuan dana yang diberikan dalam penelitian ini

DAFTAR ACUAN

- Abas, F., Shaari, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., dan Kalsom, Y.U., Antioxidative and radical scavenging properties of the constituents isolated from *Cosmos caudatus* Kunth., *Nat. Prod. Sciences*, **9**(4), 245–248
- Beck, W.T., Mo, Y.Y., dan Bhat, U.G., 2001, Cytotoxic signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II, *Biochemical Society*, **29**(6), 702–703
- Doyle, A. and Griffiths, J.B., 2000, *Cell and Tissue Culture For Medical Research*, John Willey and Sons Ltd., New York
- Franks, L.M., and Teich, N.M., 1997, *Introduction to the Cellular and Molecular of Cancer*, 3rd Ed., Oxford University Press, New York
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd Ed., Pearson Education Limited, London
- Lotulung, P.D.N., Minarti dan Kardono, L.B.S., 2005, Penapisan Aktivitas Antibakteri, Antioksidan dan Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Ekstrak Tumbuhan Asteraceae, *Abstrak*, Pusat Penelitian Kimia LIPI

Meiyanto, Edy, 2002, Signal Transduksi-Cell Cycle-Transposon, *Bahan Kuliah Biologi Molekuler*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Middleton, E.Jr., dan Kandaswami, C., 1993, The Impact of plant flavonoids on mammalian biology : implications for immunity, inflammation and cancer, in: Harborne, J.B., *The Flavonoids : Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall, London

Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., dan Inohara, N., 1998, Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Onc.*, 17, 3237–3245

McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., Green, D. R., 1995, The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro, in: Schwartz, L. M., Osborne, B. A., *Cell Death, Methods In Cell Biology*, Vol. 46, Academic Press, San Diego

Taraphdar, Amit, K., Madhumita, Roy, dan Bhattacharya, R.K., 2001, Natural products as inducers of apoptosis : Implication for cancer therapy and prevention, *Current Science*, **80**(11), 1391

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Reviews*, 23 (4), 519–534

Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., dan Alnemri, E.S., 1999, Cytochrome c and dATP-mediated Oligomerization of Apaf-1 Is a Prerequisite for Procaspase-9 Activation, *J. Bio. Chem.*, **274**(25), 1794–1796

Sismindari, 2002, *Handout Kuliah Biologi Molekuler*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Yance, Donald, 2005, Botanicals that Inhibit Angiogenesis and/or Enhance Nonspecific Biological Immune Response, *A Novel Approach to Cancer Treatment*, 15