

EFEK SINERGIS DOKSORUBISIN DAN KURKUMIN SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA SEL HELA DAN SEL VERO SECARA *IN VITRO*

Dika Khayatulisma¹

¹*Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta*
dika2000023132@webmail.uad.ac.id

Submitted :.....

Revised :.....

Accepted:.....

ABSTRAK

Kanker serviks menjadi penyebab utama kematian, oleh karena itu perlu adanya pengobatan yang tepat. Doksorubisin sebagai salah satu obat kanker dalam penggunaannya menimbulkan ketoksikan pada sel normal sehingga diperlukan kombinasi. Kurkumin memiliki efek antikanker sekaligus dapat mengurangi terjadinya ketoksikan pada sel normal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik, tingkat keamanan dan efek sinergisme dari doksorubisin dan kurkumin sebagai agen antikanker pada sel kanker serviks/sel HeLa dan sel Vero.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan sampel doksorubisin dan kurkumin kemudian dilakukan pengujian untuk menelusuri efek sitotoksik dengan parameter nilai IC_{50} , mencari nilai keamanan pada sel normal Vero dengan parameter nilai indeks selektivitas, dan mencari efek sinergis aktivitas senyawa terhadap sel kanker serviks dengan parameter nilai indeks kombinasi.

Berdasarkan analisis diketahui bahwa doksorubisin mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar $2,175 \pm 0,05 \mu M$. dan kurkumin sebesar $26,36 \pm 2,01 \mu M$. Uji sitotoksik terhadap sel Vero menghasilkan IC_{50} $16,572 \pm 5,56 \mu M$ pada doksorubisin dan kurkumin sebesar $172,218 \pm 19,92 \mu M$. Hasil selektivitas menghasilkan 7,617 untuk doksorubisin dan 6,532 untuk kurkumin. Hasil uji kombinasi menunjukkan konsentrasi 0,25 μM doksorubisin dan 26 μM kurkumin mempunyai efek sinergis dengan nilai indeks kombinasi sebesar 0,64 serta pada konsentrasi 0,5 μM doksorubisin dan 26 μM kurkumin diperoleh nilai indeks kombinasi sebesar 0,83 terhadap sel kanker serviks HeLa.

Berdasarkan hasil uji dapat disimpulkan bahwa kombinasi doksorubisin dan kurkumin memiliki efek sinergis terhadap sel HeLa.

Kata Kunci: Antikanker serviks, doksorubisin, kurkumin, MTT stopper

ABSTRAK

Cervical cancer is the main cause of death, therefore there is a need for appropriate treatment. Doxorubicin as a cancer drug, when used, causes toxicity in normal cells, so a combination is needed. Curcumin has anticancer effects and can reduce toxicity in normal cells. This study aims to determine the cytotoxic effect, safety level and synergistic effect of doxorubicin and curcumin as anticancer agents on cervical cancer cells/HeLa cells and Vero cells.

This research used an experimental method with samples of doxorubicin and curcumin and then tested to explore the cytotoxic effect with the IC_{50} value parameter, look for the safety value on normal Vero cells with the selectivity index value parameter, and look for the synergistic effect of compound activity on cervical cancer cells with the combination index value parameter.

Based on the analysis, it is known that doxorubicin has a cytotoxic effect on HeLa cells with an IC_{50} value of $2.175 \pm 0.05 \mu\text{M}$. and curcumin of $26.36 \pm 2.01 \mu\text{M}$. The cytotoxic test on Vero cells produced an IC_{50} of $16.572 \pm 5.56 \mu\text{M}$ on doxorubicin and curcumin of $172.218 \pm 19.92 \mu\text{M}$. The selectivity results were 7.617 for doxorubicin and 6.532 for curcumin. The results of the combination test showed that a concentration of $0.25 \mu\text{M}$ doxorubicin and $26 \mu\text{M}$ curcumin had a synergistic effect with a Combination Index value of 0.64 and at a concentration of $0.5 \mu\text{M}$ doxorubicin and $26 \mu\text{M}$ curcumin an Combination Index value of 0.83 was obtained on cells. HeLa cervical cancer.

Based on the test results, it can be concluded that the combination of doxorubicin and curcumin has a synergistic effect on HeLa cells.

Key words: Cervical anticancer, Doxorubicin, Curcumin, MTT stoper

PENDAHULUAN

Kanker serviks memasuki urutan ke-10 terbanyak dengan kasus baru sebanyak 604.127 dan angka kematian mencapai 341.831 pada wanita diseluruh dunia, sedangkan diindonesia kanker serviks memasuki urutan ke-2 dengan kasus baru mencapai 36.633 dan angka kematian sebesar 21.003 (Anonim, Indonesia Fact Sheet: Global Cancer Observatory, 2021). Kematian akibat kanker serviks menjadi tantangan klinis utama secara global, sehingga perlu adanya pencegahan agar prevalensi kasus kematian akibat kanker menurun. Pencegahan kanker dapat dilakukan dengan berbagai macam pengobatan kanker diantaranya radioterapi, pembedahan, dan kemoterapi dengan tujuan untuk manajemen kanker serviks yang lebih baik (Choi *et al.*, 2018).

Kemoterapi merupakan strategi utama dalam perawatan kanker serviks karena kemanjurannya yang tinggi dibandingkan dengan perawatan yang lain (Sun, 2017). Kemoterapi yang paling umum dilakukan yaitu menggunakan obat-obatan seperti doksorubisin karena memiliki efektivitas yang paling tinggi dengan tingkat keberhasilan kemoterapi sebesar 15-20%, akan tetapi doksorubisin memiliki efek samping yang cukup luas (Matyszewska *et al.*, 2021). Kegagalan yang sering terjadi pada saat menggunakan kemoterapi doksorubisin adalah terjadinya efek samping yang serius karena rendahnya selektivitas obat terhadap sel normal (Tacar *et al.*, 2013). Salah satu cara untuk meningkatkan efektivitas dari doksorubisin yaitu menggunakan ko-kemoterapi dari zat organik, diantaranya adalah kuersetin, resveratrol, dan kurkumin. (Hasyim *et al.*, 2023).

Kurkumin merupakan senyawa yang berasal dari ekstraksi rimpang *curcuma longa.L* dan kunyit yang banyak digunakan sebagai aditif dan pigmen makanan, kurkumin telah diidentifikasi sebagai salah satu agen antikanker utama yang mengerahkan aktivitas antineoplastik dalam berbagai jenis sel kanker (Giordano & Tommonaro, 2019). Ditemukan bahwa kurkumin dapat mempengaruhi perkembangan kanker serviks melalui berbagai mekanisme seperti memicu apoptosis, anti-proliferasi, anti-metastasis, invasi sel tumor, dan menginduksi *autophagy* sel tumor (X. Zhang *et al.*, 2023). Dalam meningkatkan aktivitas antitumor doksorubisin, kurkumin mengatur ekspresi Bax, caspase-9, p53 dan p21, serta mengurangi ekspresi BCL-2 untuk merangsang apoptosis sehingga memicu kemanjuran doksorubisin dalam kemoterapi (Meiyanto *et al.*, 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh Namkaew, 2018 pemberian 5-50 μM kombinasi doksorubisin dan kurkumin menghasilkan penurunan viabilitas dan proliferasi sel neuroblastoma melalui induksi apoptosis, dengan efek penghambatan tertinggi pada dosis 50 μM (Namkaew, 2018). Pada penelitian lain aktivitas antikanker kombinasi doksorubisin dan kurkumin pada sel kanker lambung AGS lebih signifikan memberikan efek apoptosis dibandingkan dengan pengobatan kurkumin dan doksorubisin tunggal (Firouzi *et al.*, 2020).

Berdasarkan mekanisme aksi dari doksorubisin dan kurkumin tersebut, pentingnya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek sitotoksik tunggal maupun kombinasi

terhadap sel kanker serviks HeLa, serta mengetahui tingkat keamanan doksorubisin dan kurkumin terhadap sel normal Vero melalui parameter nilai indeks selektivitas. Pengujian aktivitas sitotoksik kombinasi dilakukan untuk mengetahui efek sinergisme kombinasi doksorubisin dan kurkumin terhadap sel kanker serviks HeLa menggunakan parameter nilai indeks kombinasi.

METODE PENELITIAN

Penelitian yang akan dirancang adalah penelitian eksperimental dengan zat aktif doksorubisin dan kurkumin yang efek sinergis aktivitas antikankernya diuji terhadap sel HeLa dan sel Vero di lab kultur in vitro Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan uji sitotoksik MTT. Izin etik penelitian ini dikeluarkan dari KEP UAD dengan nomor 012212203.

1. Alat

Alat yang digunakan adalah LAF (Labconco®), *incubator* CO₂ (Heraceus®), *microscope inverted* (Zeiss®), timbangan analitik (Sartorius®), mikropipet (Gilson®), tabung reaksi, 96-well plate (Nunc®), *sentrifuge* (Sorvall®), rak tabung, *conical tube*, *blue tip*, *yellow tip*, dan ELISA reader (Bio-Red®), *eppendorf tube*, Alat-alat gelas (Pyrex®), vortex (Labinco®), Haemositometer (Nebauer®).

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah doksorubisin, kurkumin (*MERCK-Shuchardt*), sel kanker serviks HeLa, sel Vero, DMEM, DMSO, MTT (Vybrant®), Larutan PBS pH 7,4 (Gibco®), SDS 10% dalam 0,1N HCl (UltraPure®), tisu, dan aluminium foil.

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Larutan Uji Sitotoksik Tunggal pada Sel HeLa dan Sel Vero

Konsentrasi larutan induk doksorubisin ($M_r = 543,5$) yang digunakan adalah $3670 \mu\text{M}$. Sebanyak $3,84 \text{ mg}$ kurkumin ($M_r = 368$) dilarutkan dalam 1 mL DMSO dalam *eppendorf tube* yang lain dengan bantuan vortex sehingga diperoleh konsentrasi ($10,000 \mu\text{M}$). Seri kadar larutan uji dibuat sehingga diperoleh:

- Konsentrasi doksorubisin sel HeLa yaitu 18,35; 9,17; 4,58; 2,30; 1,14; $0,57 \mu\text{M}$
- Konsentrasi doksorubisin sel Vero yaitu 100; 50; 25; 12,5; 6,25; $3,125 \mu\text{M}$
- Konsentrasi kurkumin sel HeLa dan sel Vero 400; 200; 100; 50; 25; $12,5 \mu\text{M/mL}$

2. Pembuatan Larutan Doksorubisin dan Kurkumin untuk Uji Kombinasi

Larutan induk doksorubisin ($3670 \mu\text{M}$) diambil sebanyak $0,54 \mu\text{L}$, dan ditambahkan media sebanyak $999,4 \mu\text{L}$ sehingga diperoleh konsentrasi $2 \mu\text{M}$. Larutan induk kurkumin ($10,000 \mu\text{M}$) diambil sebanyak $2,6 \mu\text{L}$ dan ditambahkan media $997,4 \mu\text{L}$ sehingga diperoleh konsentrasi $26 \mu\text{M}$, selanjutnya dilakukan pengenceran untuk doksorubisin dan kurkumin $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ kali sehingga diperoleh konsentrasi doksorubisin 4; 2; 1; $0,5 \mu\text{M}$ serta kurkumin 52; 26; 13; $6,5 \mu\text{M}$ (CCR C, 2017).

3. Panen Sel

Sel dipanen ketika kondisi sel telah konfluen, kemudian media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan PBS. Untuk melepaskan sel dari matrik, ditambahkan tripsin EDTA 0,25% sebanyak 3 mL dan didiamkan selama 3-5 menit agar tripsin EDTA dapat bekerja dengan baik. Sel dipindahkan kedalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer* dibawah mikroskop (CCRC, 2017).

4. Uji Sitotoksik Tunggal Pada sel HeLa dan Uji Tingkat keamanan Sel Vero

Penentuan aktivitas sitotoksik dilakukan dengan cara sebanyak $100 \mu\text{l}$ sel HeLa dengan konsentrasi $10^5/\text{mL}$ ditransfer ke dalam sumuran. Doksorubisin dan kurkumin dengan seri konsentrasi yang berbeda ditambahkan $100 \mu\text{l}$ pada tiap sumuran dalam plate sesuai peta perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Plate kemudian dikeluarkan dari inkubator dan sel dicuci dengan PBS. Reagen MTT sebanyak $100 \mu\text{l}$ ditambahkan

dalam tiap sumuran yang berisi sampel perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam. Sel yang hidup akan menunjukkan warna ungu karena bereaksi dengan MTT. kondisi sel diamati menggunakan mikroskop inverted, untuk menghentikan reaksi MTT ditambahkan sebanyak 100 µl SDS 10% reagen stopper pada tiap sumuran. Plate diinkubasi pada suhu kamar selama semalam dalam kondisi dibungkus aluminium foil. Absorbansi sel dibaca menggunakan ELISA reader dan nilai IC₅₀ dihitung sebagai parameter sitotoksik (CCRC,2017).

5. Uji Penentuan Indeks Kombinasi

Penentuan indeks kombinasi dilakukan dengan cara sebanyak 100 µl sel HeLa dengan konsentrasi 10⁵/mL ditransfer ke dalam sumuran. Untuk kontrol media disisakan sumuran kosong, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel. Selanjutnya sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Apabila sel sudah mencapai 80% konfluen, medium pada tiap sumuran dibuang dan sel dicuci dengan PBS. Perlakuan sampel pada uji indeks kombinasi dilakukan dengan menambahkan 50 uL kurkumin dengan konsentrasi IC₅₀ 1/2, 1/4, 1/8 dan kuersetin dengan konsentrasi IC₅₀ 1/2, 1/4, 1/8.

Tabel I. Konsentrasi doksorubisin dan kurkumin pada uji kombinasi

Perbandingan Ke-	Konsentrasi (µM)	
	Doksorubisin	Kurkumin
1	2	26
2	1	13
3	0,5	6,5
4	0,25	3,25

Kemudian *Plate* diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C dalam kondisi yang sudah dilembabkan 5% CO₂/95% udara atmosfer. Media sel dibuang dan tiap sumuran dicuci dengan 100 µl PBS. Reagen MTT sebanyak 100 µl ditambahkan pada tiap sumuran dan diinkubasi selama 2-4 jam. Sel yang hidup akan menunjukkan warna ungu karena bereaksi dengan MTT, Absorbansi sel dibaca menggunakan ELISA *reader* dan dihitung nilai indeks kombinasinya sebagai parameter efek sinergisme antikanker (CCRC, 2017).

Analisis Data

1. Analisis IC₅₀ doksorubisin dan kurkumin

Setelah mendapatkan absorbansi dilakukan perhitungan viabilitas sel dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Selanjutnya setelah mendapatkan prosentase sel hidup kemudian membuat grafik hasil log konsentrasi vs prosentase sel hidup, dari grafik tersebut dicari persamaan regresi liniernya. Jika nilai r pada regresi linier lebih besar dari r tabel maka persamaan regresi linier dapat digunakan untuk mencari IC₅₀. Selanjutnya masukkan nilai 50 %, yang mana nilai tersebut adalah nilai y yang akan dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y=bx +a$ sehingga didapatkan perhitungan x nya, kemudian hitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga x yang diperoleh adalah hasil nilai IC₅₀ (CCRC,2017). Apabila nilai IC₅₀ lebih dari sama dengan 50% hal tersebut menandakan adanya aktivitas sitotoksik (CCRC,2017). Setelah mengetahui IC₅₀ dilanjutkan uji untuk mencari indeks kombinasi.

2. Analisis Data Indeks Selektivitas

Selektivitas Doksorubisin dan Kurkumin dapat dilihat dari nilai *Selectivity Index* (SI) yang didapatkan dengan membandingkan IC₅₀ sel Vero terhadap IC₅₀ sel kanker serviks HeLa. Sampel yang memiliki nilai selektivitas yang tinggi dalam membunuh sel kanker ditandai

dengan hasil nilai $SI > 3$. Indeks selektivitas dapat dihitung menggunakan rumus berikut (CCRC, 2017):

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ Sel Vero}}{IC_{50} \text{ Sel HeLa}}$$

3. Analisis Data Indeks Kombinasi

Setelah mendapatkan absorbansi dilakukan perhitungan viabilitas sel dengan rumus sebagai berikut (CCRC, 2017):

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Setelah mendapatkan prosentase sel hidup kemudian membuat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup kemudian dicari persamaan regresi linier dengan memasukkan nilai y (viabilitas sel pada perlakuan kombinasi), kemudian dicari x nya lalu hitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga didapatkan konsentrasi kombinasi yang memberikan efek yang setara dengan konsentrasi tunggal. Rumus yang digunakan untuk mencari indeks kombinasi, yaitu:

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$$

Dimana Dx_1 , Dx_2 adalah besar konsentrasi kombinasi yang memberikan efek yang setara dengan konsentrasi tunggal Doksorubisin dan kurkumin. $D1$ dan $D2$ merupakan konsentrasi dari kombinasi kedua senyawa yang memberikan efek sama. Hasil dari perhitungan dapat diinterpretasikan berdasarkan **Tabel II** (Tong *et al.*, 2015):

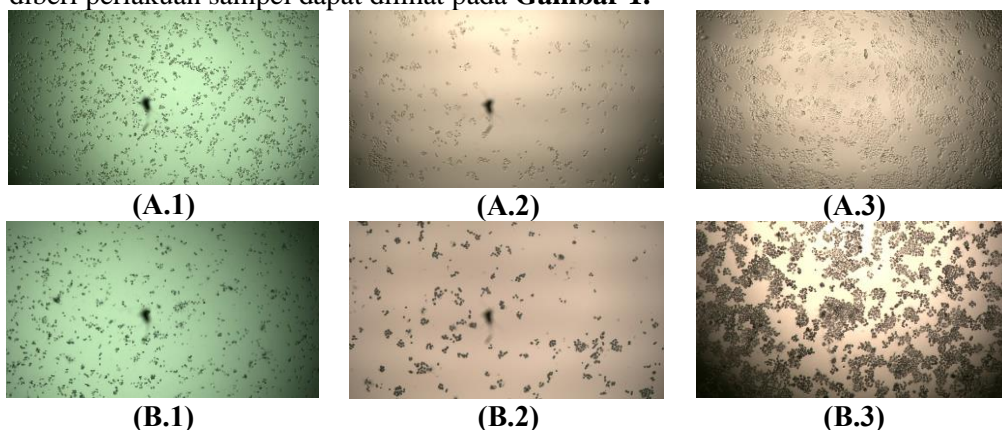
Tabel II. Interpretasi Nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
<0,1	Efek sinergis sangat kuat
0,1-0,3	Efek sinergis kuat
0,3-0,7	Efek sinergis
0,7-0,9	Efek sinergis ringan-sedang
0,9-1,1	Mendekati efek aditif
1,1-1,45	Efek antagonis ringan-sedang
1,45-3,3	Efek antagonis
>3,3	Efek antagonis kuat-sangat kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Aktivitas Sitotoksik pada sel HeLa

Parameter uji sitotoksik adalah IC_{50} yang merupakan konsentrasi doksorubisin dan kurkumin yang mampu mematikan sel sebesar 50% dari populasi, selain itu untuk mengetahui efek sitotoksik suatu senyawa dilakukan pengamatan morfologi sel HeLa yang diamati menggunakan mikroskop inverted. Perubahan morfologi sel HeLa setelah diberi perlakuan sampel dapat dilihat pada **Gambar 1**.



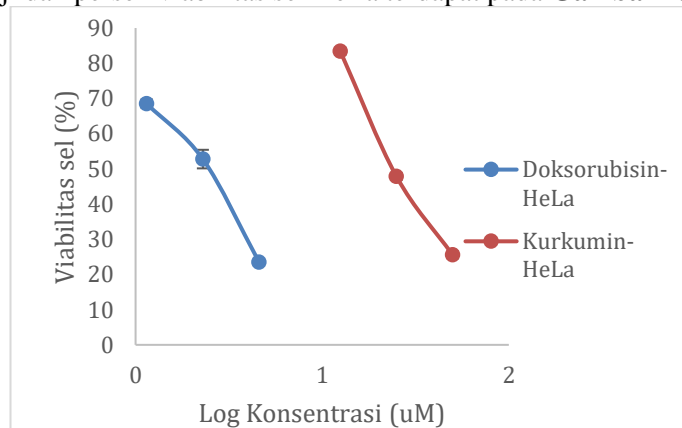
Gambar 1. Perubahan morfologi sel HeLa (A) sebelum diberi reagen MTT, (B) Setelah diberi reagen MTT, (1) Doksorubisin, (2) Kurkumin, (3) Kontrol Sel.

Gambar perubahan morfologi sel HeLa tersebut memberikan gambaran bahwa telah terjadi kematian sel akibat perlakuan sampel. Sedangkan pada pemberian MTT bentuk sel terdapat serabut hitam yang menunjukkan telah terbentuknya kristal formazan yang menandakan sel yang hidup. Variasi konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu doksorubisin (4,45; 2,30; 1,14 μM) pada sel HeLa, (100; 25; 3,125 μM) pada sel Vero, serta kurkumin (50; 25; 12,5 μM) pada sel HeLa dan Vero. Setelah didapatkan nilai absorbansi masing-masing sampel, selanjutnya menghitung viabilitas pada sel HeLa yang dapat dilihat pada **Tabel III**.

Tabel III. Viabilitas sel HeLa dengan perlakuan Doksorubisin dan Kurkumin.

Sampel	Konsentrasi (μM)	Log Konsentrasi	Viabilitas sel (%)			Rata-rata
			R1	R2	R3	
Doksorubisin	4,58	0,66	23,09	24,51	22,93	23,51 \pm 0,87
	2,29	0,36	53,00	55,27	50,01	52,76 \pm 2,63
	1,14	0,06	69,65	67,18	68,68	68,50 \pm 1,24
Kurkumin	50	1,70	26,87	21,36	28,40	25,54 \pm 3,70
	25	1,40	48,95	44,53	50,01	47,83 \pm 2,90
	12,5	1,09	92,37	81,10	76,74	83,40 \pm 8,06

Kriteria yang digunakan untuk mengkategorikan sitotoksitas doksorubisin dan kurkumin berdasarkan protokol US *National Cancer Institute* (NCI) adalah jika IC_{50} yang diperoleh adalah 20 $\mu\text{g/mL}$ = sangat sitotoksik, IC_{50} berkisar antara 21-200 $\mu\text{g/mL}$ = sitotoksik sedang, IC_{50} 201-300 $\mu\text{g/mL}$ = sitotoksik lemah dan jika $\text{IC}_{50} > 501$ $\mu\text{g/mL}$ maka suatu senyawa tidak memiliki sitotoksitas, (Sajjadi et al., 2015). Seri konsentrasi yang digunakan (4,58; 2,29; 1,14 μM) untuk doksorubisin dan (50; 25; 12,5) untuk kurkumin. Hubungan antara log konsentrasi larutan uji dan persen viabilitas sel HeLa terdapat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Grafik Hubungan log konsentrasi vs % viabilitas sel HeLa

Pada Grafik diatas dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi senyawa uji yang diberikan maka presentase sel hidup akan semakin sedikit, begitupun sebaliknya. Hasil dari perhitungan IC_{50} menggunakan aplikasi *Microsoft Excel* untuk doksorubisin adalah $2,18 \pm 0,05$ μM . Pada penelitian lain didapatkan nilai IC_{50} doksorubisin pada uji sitotoksik terhadap sel HeLa sebesar 1 μM dengan menggunakan konsentrasi 0,03125 – 5 μM (Arianingrum et al., 2017). Berikutnya IC_{50} kurkumin yang didapatkan adalah $26,36 \pm 2,0$ μM . Dari hasil penelitian, doksorubisin memiliki IC_{50} yang lebih rendah, yaitu $2,175 \pm 0,05$ μM dibandingkan dengan kurkumin dengan nilai IC_{50} sebesar $26,363 \pm 2,01$ μM , akan tetapi hasil dari kedua senyawa tersebut termasuk dalam kategori senyawa sitotoksik kuat.

Tabel IV. Persamaan regresi linier dan nilai IC_{50} pada sel HeLa

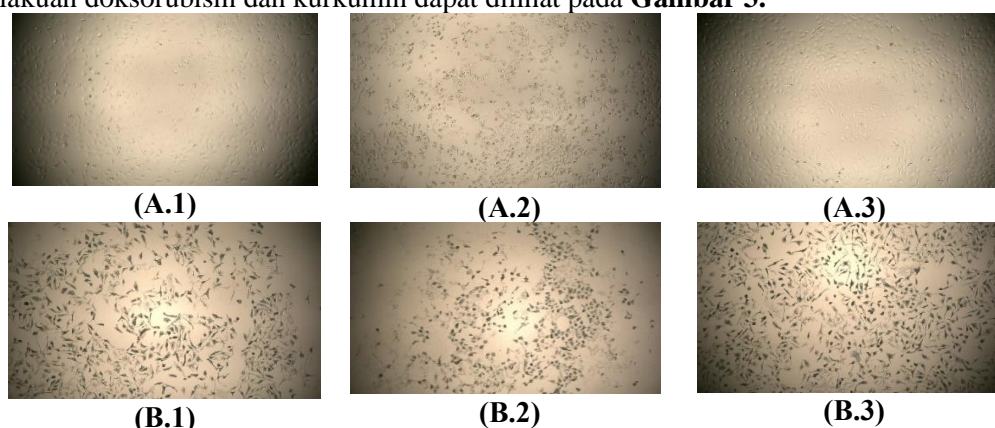
Sampel	Persamaan Linier	Regresi r	IC ₅₀ (μM)	Rata-rata
Doksorubisin	$y = 77,336x + 76,467$	0,982	2,199	2,175 ± 0,05
	$y = 70,867x + 74,541$		2,219	
	$y = 75,998x + 74,612$		2,107	
Kurkumin	$y = 108,79x + 208,15$	0,975	28,426	26,363 ± 2,01
	$y = 99,255x + 187,71$		24,402	
	$y = 80,305x + 163,98$		26,364	

Berdasarkan nilai IC₅₀ pada **Tabel IV** menunjukkan bahwa doksorubisin dan kurkumin bersifat sangat toksik terhadap sel HeLa. Efek toksik pada doksorubisin disebabkan karena doksorubisin dapat menghambat sintesis DNA, dengan cara merusak DNA didalam sel sehingga menyebabkan kematian pada sel (Meredith & Dass, 2016). Namun dengan adanya kerusakan DNA dapat menimbulkan efek samping yang signifikan, seperti mual, muntah, penurunan sistem imun, serta kebutakan (Kakotkin *et al.*, 2023). Dosis optimal, durasi pengobatan doksorubisin tergantung pada kondisi pasien, jenis dan stadium kanker yang diobati. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini dilanjutkan dengan uji selektivitas terhadap sel normal vero (Indrayanto *et al.*, 2021).

Analisis statistik regresi linier menggunakan aplikasi SPSS Versi 23 untuk menentukan taraf signifikansi dan mengetahui besarnya pengaruh variabel bebas (X) terhadap variabel terikat (Y), R hitung yang diperoleh pada doksorubisin dan kurkumin adalah 0,982 dan 0,975 keduanya memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan R tabel (0,666) sehingga terdapat korelasi antara log konsentrasi doksorubisin dan kurkumin terhadap persen viabilitas sel HeLa. Nilai signifikansi yang diperoleh sebesar 0,00 ($p < 0,05$) pada kedua senyawa yang menandakan bahwa log konsentrasi doksorubisin dan kurkumin berpengaruh terhadap perse viabilitas sel HeLa (Rosalina *et al.*, 2023).

B. Uji Aktivitas Sitotoksik Pada Sel Vero dan Uji Tingkat Keamanan

Uji selektivitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dari suatu senyawa antikanker terhadap sel normal vero serta memastikan sel kanker tidak terlindungi dengan mencari nilai IC₅₀ yang merupakan salah satu parameter untuk menentukan indeks selektivitas, dengan konsentrasi doksorubisin (100; 25; 3,125 μM) dan konsentrasi kurkumin yang digunakan (50; 25; 12,5 μM). Perubahan morfologi sel Vero dalam sumuran setelah diberi perlakuan doksorubisin dan kurkumin dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Perubahan morfologi sel Vero (A) Sebelum diberi reagen MTT, (B) Setelah diberi reagen MTT, (1) Doksorubisin, (2) Kurkumin, dan (3) Kontrol sel.

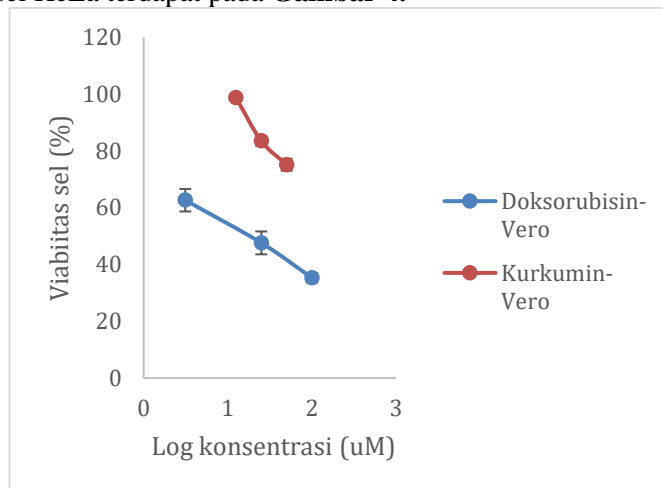
Berdasarkan pada **Gambar 3** terjadi perubahan morfologi sel Vero antar tiap perlakuan. Sel yang hidup akan tampak lonjong dan menempel pada dasar sumuran. Sedangkan sel yang mati akan berubah bentuknya menjadi bulat dan mengapung. Morfologi sel Vero yang diberikan perlakuan doksorubisin dan kurkumin terlihat adanya perubahan bentuk menjadi tidak beraturan, sedangkan pada kontrol sel tampak sehat serta berbentuk lonjong. Pada pemberian MTT bentuk sel terdapat serabut hitam yang menunjukkan telah

terbentuknya kristal formazan, yang menandakan sel yang hidup. Setelah melakukan pembacaan absorbansi sel hidup dengan *ELISA reader*, kemudian menghitung persen viabilitas sel Vero yang dapat dilihat pada **Tabel V**.

Tabel III. Viabilitas sel Vero dengan perlakuan doksorubisin dan kurkumin

Sampel	Konsentrasi (μM)	Log Konsentrasi	Viabilitas sel (%)			Rata-rata
			R1	R2	R3	
Doksorubisin	100	2	34,76	37,16	33,98	$35,30 \pm 1,6$
	25	1,4	43,89	47,01	51,88	$47,59 \pm 4,0$
	3,125	0,5	58,13	64,04	65,67	$62,61 \pm 3,9$
Kurkumin	50	1,7	74,27	73,55	77,50	$75,10 \pm 2,1$
	25	1,4	81,95	83,19	85,28	$83,48 \pm 1,6$
	12,5	1,1	97,64	99,61	98,96	$98,74 \pm 1,0$

Nilai IC_{50} diperoleh dari antilog konsentrasi vs persen viabilitas dengan menggunakan metode persamaan regresi linier. Seri konsentrasi yang digunakan (100; 25; 3,125 μM) untuk doksorubisin dan (50; 25; 12,5) untuk kurkumin. Hubungan antara log konsentrasi larutan uji dan persen viabilitas sel HeLa terdapat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Grafik hubungan log konsentrasi vs % viabilitas sel HeLa

Hasil dari perhitungan IC_{50} menggunakan aplikasi *Microsoft Excel* untuk doksorubisin adalah $16,572 \pm 5,561 \mu\text{M}$. IC_{50} kurkumin yang didapatkan adalah $172,218 \pm 19,925 \mu\text{M}$, dapat disimpulkan bahwa doksorubisin bersifat toksik dengan kategori tinggi, sedangkan kurkumin bersifat toksik dengan kategori sedang pada sel vero. Nilai IC_{50} doksorubisin pada sel HeLa bersifat toksik, namun juga memiliki IC_{50} yang toksik terhadap sel normal Vero, Oleh karena itu perlu dilakukan adanya kombinasi dengan kokemoterapi dalam penelitian ini menggunakan senyawa kurkumin. Hasil uji sitotoksik doksorubisin dan kurkumin pada sel Vero dapat dilihat pada **Tabel VI**.

Tabel IVI. Hasil Uji sitotoksik doksorubisin dan kurkumin pada sel Vero

Sampel	Persamaan Linier	Regresi r	IC_{50} (μM)	Rata-rata
Doksorubisin	$y = -15,546x + 65,766$	0,969	10,331	$16,572 \pm 5,561$
	$y = -17,939x + 72,681$		18,378	
	$y = 20,597x + 77,236$		21,005	
Kurkumin	$y = 38,824x + 138,89$	0,977	194,788	$172,21 \pm 19,92$
	$y = 43,289x + 145,97$		164,801	
	$y = 39,657x + 137,09$		157,066	

kemudian dilanjutkan melakukan analisis ststistik regresi linier sederhana menggunakan program aplikasi SPSS Versi 23, R hitung yang diperoleh pada doksorubisin

dan kurkumin adalah 0,969 dan 0,977 keduanya memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan R tabel (0,666) dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara log konsentrasi doksorubisin dan kurkumin terhadap persen viabilitas sel Vero. Nilai signifikansi yang diperoleh sebesar 0,00 ($p < 0,05$) pada kedua senyawa yang menandakan bahwa log konsentrasi doksorubisin dan kurkumin berpengaruh terhadap persen viabilitas sel Vero (Hajarisman, 2022)

Tabel VI. Hasil indeks selektivitas doksorubisin dan kurkumin

Sampel	Sel	IC ₅₀	Rata-rata	Indeks selektivitas
Doksorubisin	HeLa	2,199	2,175 ± 0,05	7,617
		2,219		
		2,107		
Doksorubisin	Vero	10,33	16,57 ± 5,56	
		18,38		
		21,00		
Kurkumin	HeLa	28,42	26,36 ± 2,01	6,532
		24,40		
		26,26		
Kurkumin	Vero	194,78	172,21 ± 19,9	
		164,80		
		157,06		

Berdasarkan **Tabel VII** Indeks selektivitas pada sel vero dan HeLa senyawa doksorubisin sebesar 7,617 dan kurkumin sebesar 6,532. Nilai SI yang tinggi (>2) suatu senyawa menunjukkan adanya toksisitas selektif terhadap sel kanker ($SI = IC_{50}$ sel normal/ IC_{50} sel kanker) (Artun *et al.*, 2016). Hasil tersebut menunjukkan bahwa doksorubisin dan kurkumin selektif terhadap sel kanker HeLa, maka perlu dilakukan uji terkait kombinasi keduanya untuk menurunkan efek samping dari doksorubisin dengan menurunkan konsentrasinya.

C. Uji kombinasi

Setelah mengetahui IC₅₀ doksorubisin dan kurkumin, dilanjutkan uji kombinasi. Variasi konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksik kombinasi berdasarkan kelipatan hasil IC₅₀ yang didapatkan sebelumnya. Seri konsentrasi sampel untuk doksorubisin (2; 1; 0,5; 0,25 μ M) dan untuk kurkumin seri konsentrasi sampel kurkumin yang digunakan (26; 13; 6,5; 3,25 μ M). Sampel diberikan berdasarkan peta perlakuan yang telah dibuat. Perbandingan kombinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1:1.

Setelah pemberian MTT serta stopper, sumuran kemudian diinkubasi di tempat gelap dengan suhu ruang semalaman, absorbansi dibaca menggunakan ELISA reader dan data yang didapatkan diolah sehingga mendapatkan % viabilitas sel yang dapat dilihat pada tabel pada **Tabel VIII**.

Tabel VII. Persen Viabilitas sel pada Uji Sitotoksik Kombinasi

		Viabilitas sel (%)			
		R1	R2	R3	Rata-rata
Doksorubisin tunggal (μM)	2 μ M	53,354	46,657	51,274	50,428 ± 3,43
	1 μ M	53,454	53,722	54,434	53,870 ± 0,51
	0,5 μ M	68,163	67,833	76,100	70,698 ± 4,68
	0,25 μ M	77,173	76,981	82,420	78,858 ± 3,09
Kurkumin tunggal (μM)	26 μ M	68,314	69,762	73,429	70,502 ± 2,64
	13 μ M	75,593	79,101	77,741	77,478 ± 1,77
	6,5 μ M	78,669	83,236	82,524	81,476 ± 2,46

Efek Sinergis Doksorubisin dan Kurkumin Sebagai Agen Antikanker Pada Sel HeLa dan Sel Vero Secara In Vitro (Dika Khayatulisma, 2024)

	3,25 μ M	82,316	82,943	85,056	83,438 \pm 1,44
Kurkumin (26 μM)	Dox 2 μ M	43,167	39,059	40,328	40,851 \pm 2,1
	Dox 1 μ M	53,354	50,000	55,918	53,91 \pm 2,97
	Dox 0,5 μ M	54,749	54,480	58,659	55,63 \pm 2,34
Kurkumin (13 μM)	Dox 0,25 μ M	54,749	54,618	55,272	54,880 \pm 0,35
	Dox 2 μ M	46,663	46,192	52,008	48,288 \pm 3,23
	Dox 1 μ M	59,422	59,493	63,286	60,734 \pm 2,21
	Dox 0,5 μ M	68,264	70,055	68,471	68,930 \pm 0,98
Kurkumin (6,5 μM)	Dox 0,25 μ M	71,054	71,123	74,494	72,224 \pm 1,97
	Dox 2 μ M	49,874	47,915	48,341	48,710 \pm 1,03
	Dox 1 μ M	66,347	68,763	69,256	68,122 \pm 1,56
	Dox 0,5 μ M	69,507	69,349	70,740	69,865 \pm 0,76
Kurkumin (3,25 μM)	Dox 0,25 μ M	72,617	74,828	75,122	74,189 \pm 1,37
	Dox 2 μ M	51,084	48,880	50,419	50,128 \pm 1,13
	Dox 1 μ M	71,844	73,036	73,568	72,816 \pm 0,88
	Dox 0,5 μ M	71,995	72,002	73,429	72,475 \pm 0,83
	Dox 0,25 μ M	73,828	75,741	75,960	75,176 \pm 1,17

Setelah didapatkan % viabilitas sel selanjutnya diolah kembali untuk mengetahui nilai indeks kombinasi dari kombinasi doksorubisin dan kurkumin, indeks kombinasi digunakan untuk mengetahui efek yang diberikan dari kombinasi kedua senyawa seperti efek sinergis, aditif, maupun antagonis. Hasil kombinasi indeks pada **Tabel IX**.

Tabel IX. Indeks kombinasi doksorubisin dan kurkumin

Konsentrasi Kombinasi		Indeks Kombinasi	Kategori Efek
Doksorubisin (μM)	Kurkumin (μM)		
2	26	1,10 \pm 0,07	Antagonis ringan-sedang
2	13	1,16 \pm 0,11	Antagonis ringan-sedang
2	6,5	1,07 \pm 0,07	Mendekati efek aditif
2	3,25	1,07 \pm 0,05	Mendekati efek aditif
1	26	1,03 \pm 0,03	Mendekati efek aditif
1	13	1,12 \pm 0,07	Antagonis ringan-sedang
1	6,5	1,61 \pm 0,17	Antagonis
1	3,25	2,72 \pm 0,09	Antagonis
0,5	26	0,83 \pm 0,01	Sinergis ringan-sedang
0,5	13	1,22 \pm 0,17	Antagonis ringan-sedang
0,5	6,5	1,09 \pm 0,06	Mendekati efek aditif
0,5	3,25	1,37 \pm 1,13	Antagonis ringan-sedang
0,25	26	0,64 \pm 0,06	Sinergis
0,25	13	1,17 \pm 0,14	Antagonis ringan-sedang
0,25	6,5	1,19 \pm 0,07	Antagonis ringan-sedang
0,25	3,25	1,30 \pm 0,06	Antagonis ringan-sedang

Hasil perhitungan nilai indeks kombinasi diperoleh dari 16 kombinasi kurkumin dan doksorubisin terhadap sel HeLa pada konsentrasi kurkumin 26 μ M/ml dan doksorubisin 0,25 μ M/ml adalah 0,64 serta pada konsentrasi kurkumin 26 μ M/ml dan doksorubisin 0,5 μ M/ml adalah 0,83. Interpretasi dari nilai indeks kombinasi adalah doksorubisin dan kurkumin mempunyai efek sinergis terhadap sel HeLa. Hasil dari penelitian ini adalah kombinasi doksorubisin dengan kurkumin dapat menurunkan konsentrasi doksorubisin dalam membunuh

sel HeLa dengan selektivitas tinggi. Berdasarkan penelitian sebelumnya apabila indeks kombinasi <1 maka kombinasi kedua senyawa tersebut memiliki efek sinergis (N. Zhang et al., 2016). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Firouzi, 2020 bahwa kombinasi kurkumin dan doksorubisin menunjukkan efek sinergis dalam meningkatkan aktivitas antikanker pada sel adenokarsinoma lambung (Firouzi Amoodizaj et al., 2020). Selain itu pada penelitian lain doksorubisin dan kurkumin memiliki efek sinergis terhadap sel MCF-7 pada konsentrasi kombinasi kurkumin $14,361 \mu\text{M}$ dan doksorubisin $0,143 \mu\text{M}$ yang memiliki indeks kombinasi sebesar 0,43 (Sarkar et al., 2023).

Setelah mendapatkan nilai index kombinasi, selanjutnya dilakukan uji statistik untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuan. Pertama dilakukan Uji *Kruskal-Wallis*. *Kruskal-Wallis* merupakan alternatif lain dari uji ANOVA. *Kruskal-Wallis*. Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa nilai sig 0,000, artinya pada tiap perlakuan baik pemberian doksorubisin dan kurkumin kombinasi memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) memiliki perbedaan yang bermakna pada tiap konsentrasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* yang untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa kelompok yang memiliki perbedaan bermakna terhadap semua perlakuan adalah kelompok dengan kombinasi ($26 \mu\text{M}$ & $0,5 \mu\text{M}$), kombinasi ($6,5 \mu\text{M}$ & $1 \mu\text{M}$), serta kombinasi ($3,25 \mu\text{M}$ & $1 \mu\text{M}$).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, nilai IC_{50} sel HeLa dari doksorubisin dan kurkumin bersifat sitotoksik kuat dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah $2,175 \pm 0,05$ dan $26,262 \pm 2,01$, nilai IC_{50} sel Vero dari doksorubisin bersifat sitotoksik kuat dengan nilai IC_{50} ($16,572 \pm 5,56$), sedangkan kurkumin bersifat sitotoksik sedang nilai IC_{50} ($172,21 \pm 19,92$). Kombinasi doksorubisin dan kurkumin menghasilkan efek sinergis terhadap sel kanker serviks/sel HeLa dengan nilai indeks kombinasi 0,64 dan efek sinergis sedang dengan nilai indeks kombinasi 0,83.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Dr. apt. Laela Hayu Narani, M.Si., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan arahan selama penelitian berlangsung hingga karya ini ditulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Arianingrum, R., Arty, I. S., & Atun, S. (2017). Synergistic combination of fluoro chalcone and doksorubisin on HeLa cervical cancer cells by inducing apoptosis. *AIP Conference Proceedings*, 1823(March 2017), 1–8. <https://doi.org/10.1063/1.4978185>
- Artun, F. T., Karagoz, A., Ozcan, G., Melikoglu, G., Anil, S., & Sutlupinar, N. (2016). Anticancer plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *J Buon*, 21(3), 720–725. <https://www.jbuon.com/archive/21-3-720.pdf>
- CCRC. (2017). *Indonesian Society for Cancer Chemoprevention* (E. Meiyanto, R. Jenie, Istighfari, A. Hermawan, S. Handayani, H. Putri, & R. Utomo, Yudi (eds.)).
- Choi, Y. J., Gurunathan, S., & Kim, J. H. (2018). Graphene oxide-silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): A novel approach for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030710>
- Firouzi Amoodizaj, F., Baghaeifar, S., Taheri, E., Farhoudi Sefidan Jadid, M., Safi, M., Seyyed Sani, N., Hajazimian, S., Isazadeh, A., & Shanehbandi, D. (2020). Enhanced anticancer potency of doksorubisin in combination with curcumin in gastric adenocarcinoma. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(6). <https://doi.org/10.1002/jbt.22486>
- Giordano, A., & Tommonaro, G. (2019). Curcumin and cancer. *Nutrients*, 11(10).

- <https://doi.org/10.3390/nu11102376>
- Hasyim, R. M. S., Yuniarti, L., & Andriane, Y. (2023). EFEK ANTIKANKER DAN KEMOTERAPI NANOPARTIKEL ALGINAT EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) DENGAN DOKSORUBISIN PADA KULTUR SEL KANKER SERVIKS UTERI (HeLa). *Bandung Conference Series: Medical Science*, 3(1), 113–122. <https://doi.org/10.29313/bcsms.v3i1.5741>
- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (1st ed., Vol. 46). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>
- Kakotkin, V. V., Semina, E. V., Zadorkina, T. G., & Agapov, M. A. (2023). Prevention Strategies and Early Diagnosis of Cervical Cancer: Current State and Prospects. *Diagnostics*, 13(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040610>
- Matyszewska, D., Nazaruk, E., & Campbell, R. A. (2021). Interactions of anticancer drugs doksorubisin and idarubicin with lipid monolayers: New insight into the composition, structure and morphology. *Journal of Colloid and Interface Science*, 581, 403–416. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.092>
- Meiyanto, E., Putri, D. D. P., Susidarti, R. A., Murwanti, R., Sardjiman, Fitriasari, A., Husnaa, U., Purnomo, H., & Kawaichi, M. (2014). Curcumin and its analogues (PGV-0 and PGV-1) enhance sensitivity of resistant MCF-7 cells to doksorubisin through inhibition of HER2 and NF- κ B activation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1), 179–184. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.1.179>
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doksorubisin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729–741. <https://doi.org/10.1111/jphp.12539>
- Sajjadi, S. E., Ghanadian, M., Haghghi, M., & Mouhebat, L. (2015). Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 15–19.
- Sarkar, E., Khan, A., Ahmad, R., Misra, A., Dua, K., Mahdi, A. A., & Raza, T. (2023). *Synergism of Curcumin and Doksorubisin Proves an Effective Anticancer Therapeutics Against Breast Cancer: An in vitro Study*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3147856/v1>
- Sun, Yong Wang, Mingyue Cai, Liteng Lin, Xiaoyan Chen, Zhong Cao, Kangshun Zhu, dan X. S. (2017). Codelivery of sorafenib and GPC3 siRNA with PEI-modified liposomes for hepatoma therapy. *Biomaterials Science*, 5(12), 2468–2479.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doksorubisin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Tong, P., Coombes, K. R., Johnson, F. M., Byers, L. A., Diao, L., Liu, D. D., Lee, J. J., Heymach, J. V., & Wang, J. (2015). Drexplorer: A tool to explore dose-response relationships and drug-drug interactions. *Bioinformatics*, 31(10), 1692–1694. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv028>
- Zhang, N., Fu, J. N., & Chou, T. C. (2016). Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelson with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: Experimental design and data analysis using the combination index method. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 97–104.
- Zhang, X., Zhu, L., Wang, X., Zhang, H., Wang, L., & Xia, L. (2023). Basic research on curcumin in cervical cancer: Progress and perspectives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 162, 114590. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114590>