

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil

##### 1. Ekstraksi Maserasi dan KLT

###### a. Determinasi Tanaman

###### 1). Daun Teh

Daun teh (*Camellia sinensis*) yang digunakan berasal dari daerah Merapi, Kaliurang, Yogyakarta. Sampel dilakukan determinasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa simplisia yang digunakan dalam penelitian ini asli dan sesuai. Dari hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan dalam penelitian ini benar merupakan tanaman daun teh (*Camellia sinensis*). Hasil determinasi dapat dibuktikan pada daftar lampiran 1.

###### 2). Kulit Jeruk Mandarin

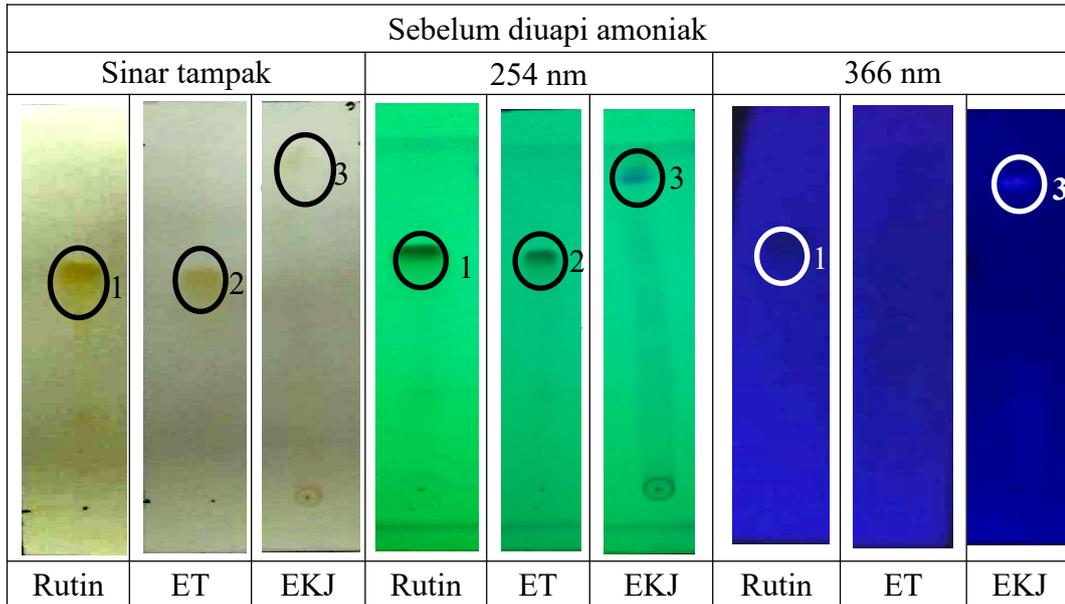
Kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Bantul Yogyakarta. Hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta menunjukkan tanaman yang digunakan adalah benar kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*). Data hasil determinasi dapat dilihat pada daftar lampiran 2.

## **b. Ekstraksi Metode Maserasi**

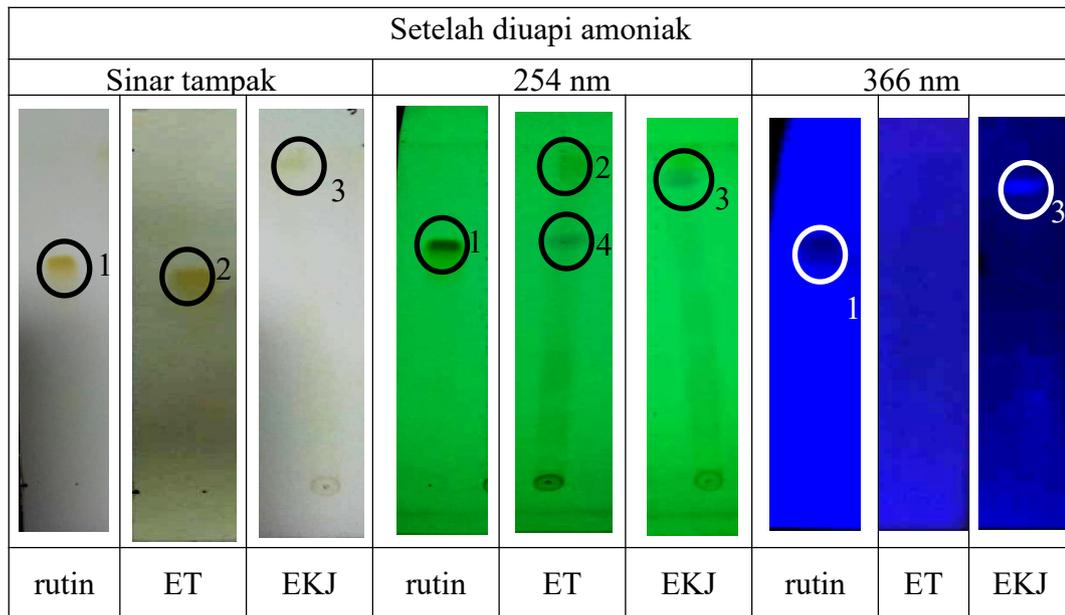
Menggunakan pelarut etanol 70% dari 10 kg serbuk kering daun teh dan 10 kg serbuk kering kulit jeruk mandarin dihasilkan ekstrak cair sebanyak 2.450 ml. Kemudian dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* didapatkan 27.3 gram ekstrak kental daun teh (ET) dengan warna hijau gelap dan 26.4 gram ekstrak kental kulit jeruk mandarin (EKJ) dengan warna hijau gelap kekuningan.

## **c. Kromatografi Lapis Tipis**

Fase diam yang digunakan dalam penelitian adalah silika gel GF<sub>254</sub> dan fase geraknya menggunakan pelarut campuran butanol : asam asetat : air (7:2:1). Digunakan fase diam silika gel karena merupakan penjerap polar yang paling sering digunakan, meskipun demikian silika gel juga banyak dijumpai dalam bentuk yang termodifikasi (Watson, 2009) dan fase gerak campuran butanol : asam asetat : air (7:2:1). Selain fase gerak tersebut telah dilakukan percobaan kromatografi lapis tipis menggunakan fase gerak yang sama dengan rasio perbandingan yang berbeda yaitu 5:3:2 dan 4:1:5. Dari plot yang dihasilkan fase gerak dengan perbandingan 7:2:1 menunjukkan hasil pemisahan yang optimal tanpa adanya *tailing*.



**Gambar 5.** Profil Kromatografi Lapis Tipis Rutin, ET, dan EKJ sebelum diuapi amoniak



**Gambar 6.** Profil Kromatografi Lapis Tipis Rutin, ET dan EDT setelah diuapi amoniak

Dengan deteksi menggunakan sinar tampak, UV 254 nm, 366 nm dapat menimbulkan spot yang dapat diamati pada gambar 5 dan 6.

**Tabel 3.** Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis EKJ dan ET

Nomor bercak	Ekstrak	Nilai Rf	Warna bercak (sebelum/sesudah diuapi)		
			Sinar tampak	254 nm	366 nm
1	Rutin	0,75	Kuning	Kuning kehijauan	tidak berpendar
2	ET	0,81	Kuning	Kuning kehijauan	-
3	EKJ	0,81	Kuning	Hijau kekuningan	berpendar
4	ET	0,76	-	Kuning kehijauan	-

Melalui uji identifikasi kromatografi lapis tipis ET dan EKJ mengandung senyawa flavonoid dengan Rf 0,81 dan 0,81 sedangkan Rf standar rutin 0,75. Dan juga dibuktikan melalui penguapan dengan amoniak menghasilkan intensitas warna kuning yang lebih pekat.

## 2. Uji Antioksidan DPPH

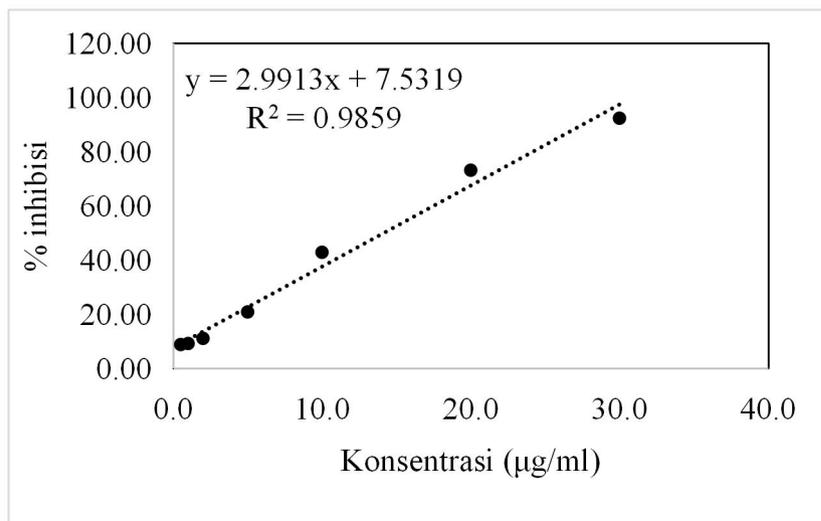
Sebagai pembanding dalam penentuan aktivitas antioksidan sampel, maka digunakan kontrol larutan DPPH 0,02 mM. Larutan kontrol DPPH 0,02 mM berfungsi dalam perhitungan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh perlakuan dan setelah reduksi. Sisa radikal DPPH kemudian yang terbaca pada alat spektrofotometer UV-Vis. Semakin besar selisih absorbansi sampel dengan kontrol maka semakin besar pula aktivitas antioksidan sampel. Data absorbansi hasil uji antioksidan DPPH dapat dilihat pada tabel 4 dan 5.

**Tabel 4.** Data prosentase inhibisi pembeding vitamin C

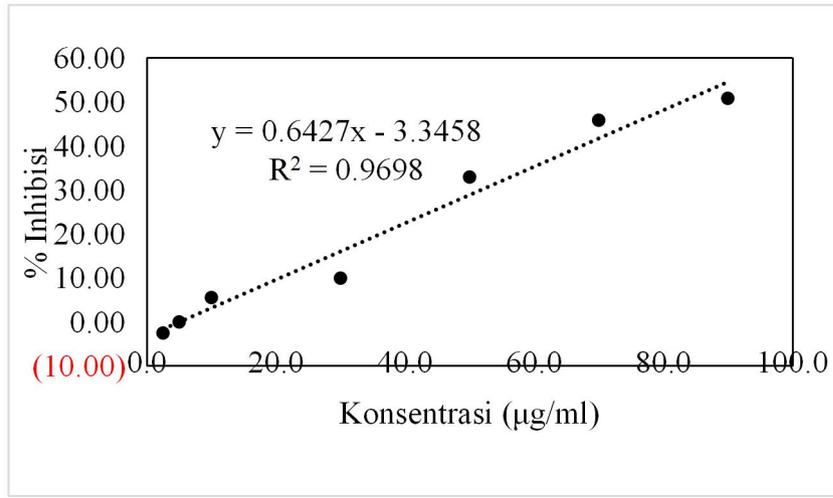
Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi rata-rata	Absorbansi blanko	% Inhibisi
0.5	0.641	0.702	8.73
1.0	0.638	0.702	9.11
2.0	0.625	0.702	11.01
5.0	0.557	0.702	20.76
10.0	0.402	0.702	42.76
20.0	0.189	0.702	73.04
30.0	0.055	0.702	92.22

**Tabel 5.** Data prosentase inhibisi sampel kombinasi EKJ dan ET

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi rata-rata	Absorbansi blanko	% Inhibisi
5.0	0.721	0.702	-2.61
7.5	0.703	0.702	-0.09
10.0	0.664	0.702	5.46
15.0	0.633	0.702	9.87
20.0	0.472	0.702	32.87
30.0	0.381	0.702	45.80
40.0	0.346	0.702	50.78



**Gambar 6.** Grafik Inhibisi Vitamin C



**Gambar 7.** Grafik Inhibisi Kombinasi ET dan EKJ

**Tabel 6.** Nilai IC<sub>50</sub>

Senyawa Uji	Persamaan regresi linier	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Keterangan
Vitamin C	$y=2.9913x+7.5319$ $R^2= 0.9859$	14.19	Sangat kuat
Kombinasi ET dan EKJ	$y=0.6427x-3.3458$ $R^2=0.9698$	83.00	Kuat

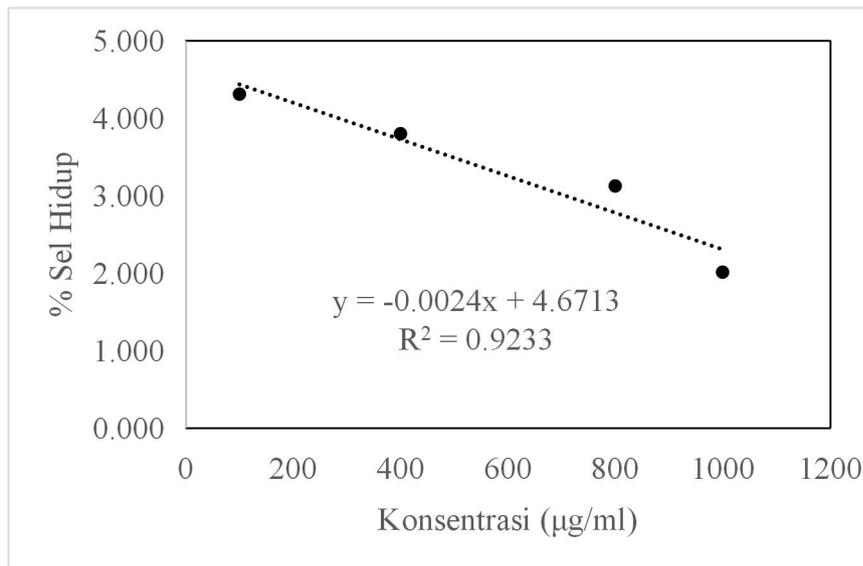
### 3. Uji Sitotoksik MTT *Assay*

Dilakukan uji sitotoksik untuk mengetahui aktivitasnya terhadap sel kanker

T47D dengan diberi perlakuan kombinasi ET dan EKJ.

**Tabel 7.** Data % Sel Hidup Setelah Perlakuan Kombinasi ET EKJ

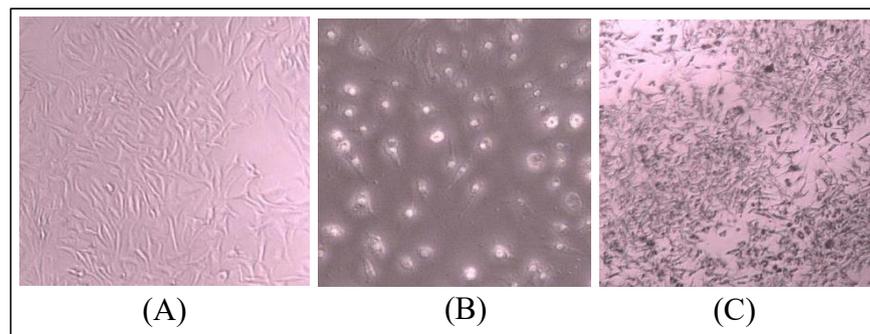
Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rata-rata Absorbansi sampel	Standar Deviasi	%Sel Hidup
100	0.130	0.014	4.308
400	0.128	0.003	3.798
800	0.124	0.002	3.122
1000	0.118	0.001	2.009
Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel	0.663	
	Media	0.103	
Persamaan	$y = -0.0024x + 4.6713$ $R^2 = 0.9233$ <b><math>IC_{50}=1888,69 \mu\text{g/ml}</math></b>		



**Gambar 8.** Grafik % Sel Hidup T47D Setelah diberi Perlakuan Kombinasi ET dan EKJ

Berdasarkan hasil uji sitotoksik kombinasi ET dan EKJ pada konsentrasi terendah yaitu 100 µg/ml dapat membunuh 95,692% sel T47D (100 - 4,308%), sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 1000 µg/ml dapat membunuh 97,99% sel kanker T47D (100 - 2,009%). Nilai IC<sub>50</sub> yang didapat dari kombinasi ET dan EKJ sebesar 1888,69 µg/ml dengan persamaan  $y = -0.0024x + 4.6713$  dan  $r^2 = 0.9233$ . Sedangkan IC<sub>50</sub> agen kemoterapi doxorubicin sebesar 15nM (Junedi *et al.*, 2010).

Pada uji sitotoksik, juga dilakukan pengamatan morfologi sel sebelum diberi perlakuan dengan setelah diberi perlakuan kombinasi ET dan EKJ. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted*. Perubahan morfologi terlihat jelas pada perubahan bentuk sel yang mula-mula berbentuk panjang lonjong dengan ujung lancip di kedua sisi, setelah perlakuan bentuknya berubah menjadi tidak beraturan.



**Gambar 9.** Perubahan morfologi sel T47D (A) Sebelum diberi perlakuan (B) Sesaat setelah diberi perlakuan (C) Setelah diberi perlakuan dan di inkubasi

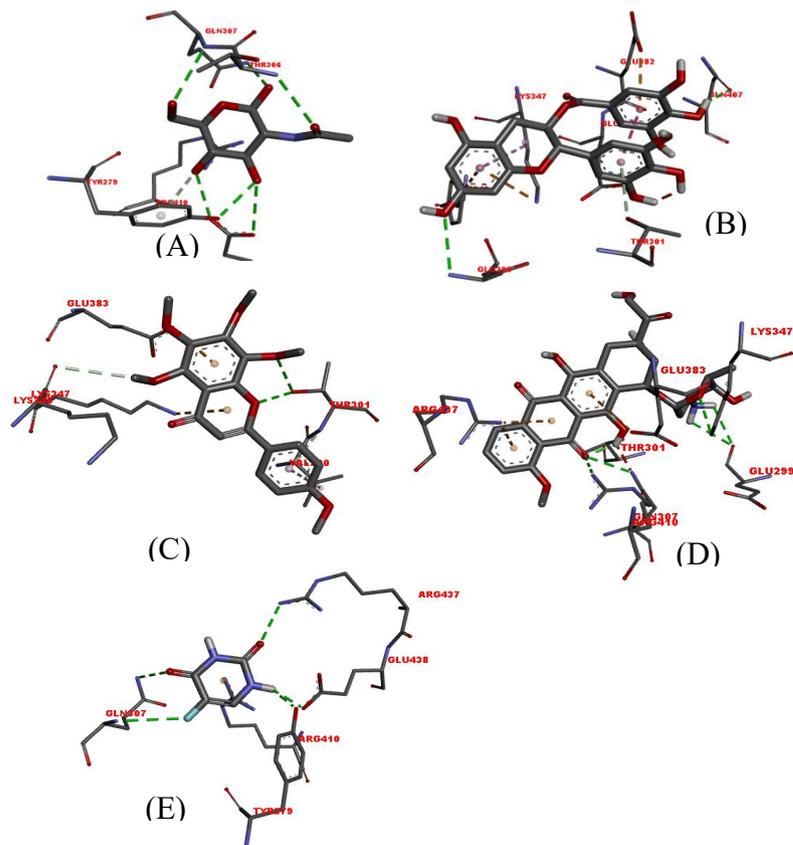
#### 4. *Molecular Docking*

Penambatan molekuler dilakukan menggunakan aplikasi *Autodock Vina* kemudian *Open babel* dan divisualisasikan bentuk strukturnya secara 2

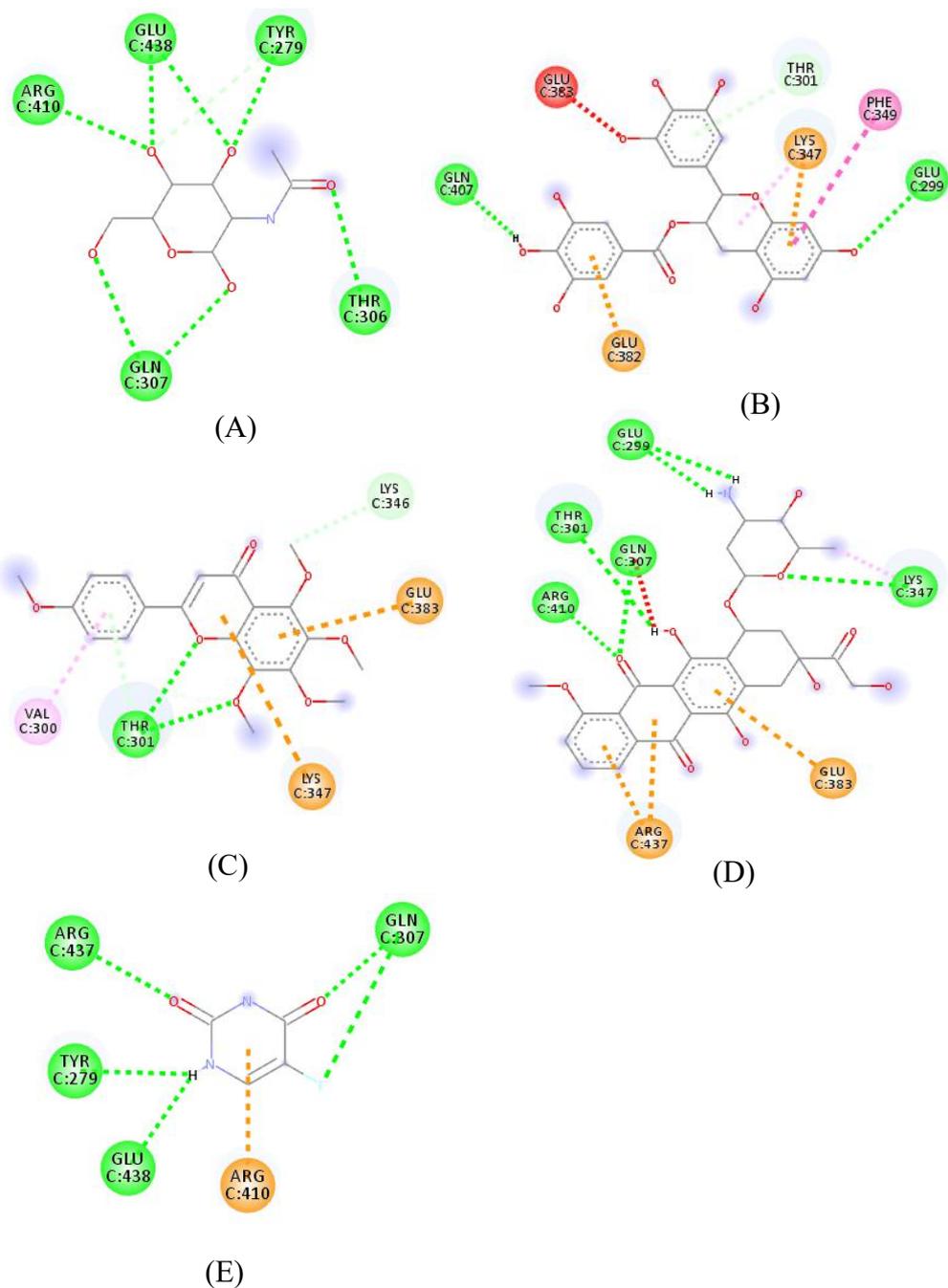
dimensi dan 3 dimensi dengan aplikasi *DS Visualizer*. Data hasil *molecular docking* pada tabel 18.

**Tabel 8.** Hasil *molecular docking* antara ligan dan reseptor HER2

Nama Senyawa	Nilai RMSD	Score Docking	Konformasi
<i>Native ligand</i>	1.957	-4.9	7
EGCG	1.343	-6.6	2
Tangeretin	1.197	-5.0	4
Doxorubicin	1.542	-6.1	4
5-Fluorouracil	1.576	-4.5	3



**Gambar 9.** Struktur 3D hasil optimasi geometri : (A) *Native ligand* (B)EGCG (C) Tangeretin (D) Doxorubicin (E) 5-Fluorouracil



**Gambar 11. Interaksi 2 Dimensi Senyawa Uji pada target HER2 dalam *pocket atom* :** (A)Native Ligand (B)EGCG (C)Tangeretin (D)Doxorubicin (E)5-Fluorouracil

**Tabel 9.** Hasil Interpretasi Interaksi dan Jenis Ikatan Berbagai Ligan pada HER2

Senyawa	Jenis Ikatan	Residu asam amino yang berikatan
<i>Native Ligand</i>	7 ikatan hidrogen	TYR 279, GLU 438, GLU 438, ARG 410, GLN 307, GLN 307, THR 306
	1 ikatan hidrogen donor phi	TYR 279
Ligan Uji (EGCG)	2 ikatan hidrogen	GLN 407, GLU 299
	1 <i>unfavorable acceptor-acceptor</i>	GLU 383
	1 ikatan hidrogen donor phi	THR 301
	2 ikatan phi	GLU 382, LYS 347
	1 gugus alkil	LYS 347
Ligan Uji (Tangeretin)	1 ikatan phi-phi	PHE 349
	2 ikatan hidrokarbon	THR 301, LYS 346
	2 ikatan hidrogen	THR 301, THR 301
	2 ikatan phi	LYS 347, GLU 383
	1 gugus alkil	VAL 300
Ligan Pembanding (Doxorubicin)	6 ikatan hidrogen	LYS 347, GLU 299, GLU 299, GLN 307, THR 301, ARG 410
	1 <i>unfavorable</i> donor-donor	GLN 307
	3 ikatan phi	ARG 437, ARG 437
	1 gugus alkil	GLU 383 LYS 347
Ligan pembanding (5-Fluorouracil)	5 ikatan hidrogen	ARG 437, TYR 279, GLU 438, GLN 307, GLN 307
	1 ikatan kation phi	ARG 401

### 5. Tablet *Effervescent*

Pembuatan sediaan tablet *effervescent* kombinasi ekstrak teh dan kulit jeruk mandarin dengan metode granulasi basah dan pemisahan antara granul asam dan granul basa. Menggunakan formulasi penelitian Mis Bakhul Munir (2012) karena sama-sama menggunakan bahan dasar ekstrak etanolik

kemudian dengan beberapa modifikasi bahan tambahan. Pemanis manitol diganti menggunakan sakarin, mg stearat ditambahkan sebagai bahan penghancur, laktosa sebagai pengisi, dan talk digunakan sebagai pelicin.

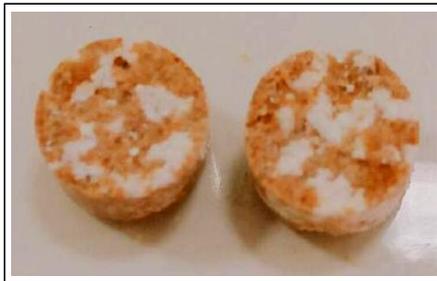
**Tabel 10.** Formulasi Tablet Effervescent

Bahan (per tablet 1000 mg)	Berat (mg)
Granul ekstrak	40
Asam sitrat	85.8
Asam tartat	217.7
Na Bikarbonat	344.5
Laktosa	109
PVP	10
Sakarin	50
Mg Stearat	9
Talk	70

Dilakukan pengeringan kombinasi ET dan EKJ menggunakan laktosa dengan perbandingan 1:2 kemudian ditambahkan pelarut etanol 70%.



**Gambar 11.** Serbuk ekstrak setelah pengeringan



**Gambar 13.** Tablet *Effervescent*

**Tabel 11.** Evaluasi Tablet *Effervescent*

No	Nama Uji	Nilai	Nilai Standar	Keterangan
1	Penampilan fisik			
	Bentuk	Tabung	-	
	Diameter	1 cm	-	
	Ketebalan	0,5 cm	-	
	Warna	Coklat	-	
	Permukaan	Tidak homogen		
2	Kekerasan	0.24 kgf	8-12 kgf	Tidak sesuai
3	Uji pH	5.52	6-7	Tidak Sesuai
4	Uji waktu larut	3.15 menit	<5 menit	Sesuai

Formulasi granul asam dan basa dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 40°Celsius. Kemudian dicampur secara homogen dan dikempa lalu dilakukan evaluasi tablet *effervescent* yang meliputi uji pemeriksaan fisik tablet, uji kekerasan tablet, dan uji waktu larut. Data pengamatan uji dapat dilihat pada tabel 11.

## **B. Pembahasan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas kombinasi ekstrak daun teh dan kulit jeruk mandarin sebagai antioksidan dan aktifitas sitotoksik melalui beberapa uji diantaranya uji identifikasi kromatografi lapis tipis, uji antioksidan DPPH, uji sitotoksik MTT *Assay* dan penambatan molekuler kemudian kombinasi ekstrak dibuat dalam sediaan tablet *effervescent*.

### **1. Ekstraksi Maserasi**

Metode ekstraksi maserasi dipilih dalam penelitian ini karena pengerjaannya mudah, murah dan tidak membutuhkan banyak alat. Namun prosesnya cukup lama sehingga memerlukan waktu yang lebih panjang dibandingkan metode ekstraksi yang lain. Prinsip kerja dari metode ekstraksi maserasi ini adalah memisahkan senyawa aktif berdasarkan perbedaan kepolaran (*like dissolves like*) (Pratiwi, 2009).

Prosedur kerja dalam maserasi dengan cara merendam sampel menggunakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai dengan perbandingan tertentu. Proses perendaman bertujuan agar pelarut menembus ke dalam dinding sel juga rongga sel kemudian menarik senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Hal ini terjadi secara berulang terus menerus hingga tercapai keseimbangan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel (Pratiwi, 2009)

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah serbuk daun teh (*Camellia sinensis*) dan serbuk kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*). Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%, karena pelarut ini selektif dapat mengekstraksi hampir seluruh senyawa bahan alam yang terdapat pada tumbuhan (Anonim, 1989). 10 kg serbuk teh dan 10 kg serbuk kulit jeruk mandarin direndam dengan pelarut etanol 70% masing-masing dalam chamber kemudian diaduk-aduk secara berkala selama 4 hari. Setelah 4 hari kemudian hasil rendaman disaring menggunakan kertas saring, lalu pelarut diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental. Prinsip kerja *rotary vacuum evaporator* adalah memekatkan suatu konsentrasi larutan dengan cara penurunan tekanan pada labu alas bulat kemudian diputar secara terus menerus sehingga pelarut dapat menguap dengan cepat di bawah titik didihnya, sehingga zat aktif yang terkandung tidak rusak oleh adanya suhu (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 2. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dalam penelitian ini digunakan untuk tujuan analitik kualitatif yaitu untuk menganalisis senyawa organik dalam jumlah kecil. Pada penelitian ini, uji KLT digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan ekstrak etanolik daun teh.

Fase diam yang digunakan dalam penelitian adalah silika gel GF254 dan fase geraknya menggunakan pelarut campuran butanol : asam asetat : air

(7:2:1). Digunakan fase diam silika gel karena merupakan penjerap polar yang paling sering digunakan (Watson, 2009) dan fase gerak menggunakan campuran butanol : asam asetat : air (7:2:1) karena ketiganya merupakan pelarut polar yang masing-masing memiliki polarity index butanol 4, asam asetat 6.2, dan air 9. Polarity index adalah suatu parameter dari sylinder parameter, semakin besar nilai polarity index maka semakin polar hingga yang dapat memisahkan senyawa flavonoid dan glikosida dari bahan alam (Gibbons, 2006). Kemudian sebagai pembanding menggunakan senyawa rutin yang merupakan aglikon dari quersetin. Quersetin merupakan kelas flavonoid yang memiliki aktivitas biologis yang sangat kuat, jika vitamin C memiliki nilai 1 sedangkan Quersetin memiliki nilai 4,7 dalam hal aktivitas sebagai antioksidan (Sugrani *et al.*, 2009).

Setelah fase gerak jenuh, lakukan penotolan larutan sampel pada masing-masing silika gel yang sudah ditandai masing-masing 3 totolan sampel. Penotolan sampel dilakukan secara bertahap dengan pengeringan pada setiap totolan (Ganjar dan Rohman, 2007) Kemudian dimasukkan kedalam chamber KLT berisi fase gerak yang sudah jenuh. Tunggu hingga proses elusidasi (pengembangan) selesai.

Kemudian deteksi bercak KLT menggunakan detektor UV 254 nm akan menimbulkan bercak warna hijau dan 366 nm akan menimbulkan bercak warna ungu pada komponen yang menyerap cahaya. Pembacaan nilai Rf dengan menggunakan densitometer.

Deteksi senyawa flavonoid pada KLT juga dilakukan dengan menguapi plat KLT menggunakan larutan amoniak. Kemudian dilihat pada sinar tampak. Intensitas warna kuning menjadi lebih pekat mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid. Hal tersebut dikarenakan reaksi antara senyawa flavonoid dan uap amoniak membentuk struktur kinoid di cincin B, sehingga membuat ikatan rangkap terkonjugasi lebih panjang dan intensitas warna semakin pekat (Kumalasari dan Sulistyani, 2011).

Adanya senyawa flavonoid dibanding dengan nilai Rf senyawa standar (rutin). Perbandingan rutin memiliki Rf 0,75, sedangkan sampel ekstrak teh dan ekstrak kulit jeruk mandarin memiliki Rf 0,81 hal ini menunjukkan bahwa ekstrak teh dan ekstrak kulit jeruk mandarin mengandung senyawa flavonoid.

Pada deteksi dengan sinar tampak dan sinar UV 254 nm, sampel ekstrak kulit jeruk dan daun teh menunjukkan warna hijau kekuningan menimbulkan *tailing*, beberapa penyebab hingga terjadi *tailing* yaitu jumlah penotolan yang berlebih pada tiap sampel akibatnya tidak semua senyawa dapat berinteraksi secara sempurna pada fase diam. Belum tercapainya kejenuhan fase gerak sehingga reaksi tidak bisa maksimal, terdapat beberapa senyawa pada sampel yang struktur kimianya mirip sehingga sulit untuk dipisahkan. Perbedaan nilai Rf antara sampel dan standar disebabkan oleh kualitas pelarut yang tidak baik, lapisan yang terlalu tebal, teknik

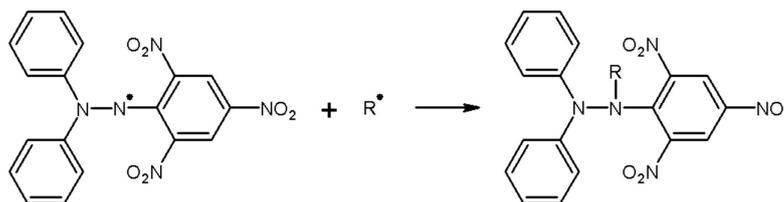
pengembangan (elusi), dan kurang jenuhnya ruang kromatografi (Sunyoto dan Agustina, 2013).

### 3. Uji Antioksidan DPPH

Prinsip metode antioksidan DPPH adalah dengan melihat perubahan warna sampel saat direaksikan menggunakan reagen DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Reagen DPPH yang memiliki kromofor dapat menimbulkan warna ungu bila dilihat secara visibel, bila direaksikan dengan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan maka akan warna ungu akan memudar menjadi warna kuning (Dehpour *et al.*, 2009).

Perubahan intensitas warna ungu dalam uji antioksidan dapat terjadi karena senyawa antiradikal akan menangkap elektron dari ikatan rangkap terkonjugasi dari radikal DPPH, sehingga radikal DPPH kehilangan elektron tersebut untuk beresonansi. Senyawa tersebut tereduksi dan mengakibatkan intensitas warnanya segera memudar menjadi kuning yang kemudian dapat dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer (Dehpour *et al.*, 2009).

Sampel yang digunakan pada uji antioksidan DPPH ini adalah kombinasi ekstrak teh dan ekstrak kulit jeruk mandarin. Perubahan warna pada sampel kemudian dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada lambda 514 nm. Standar senyawa antioksidan yang digunakan adalah menggunakan rutin karena rutin dikenal sebagai antioksidan yang kuat dengan mekanisme menangkap senyawa serta mencegah terjadinya reaksi berantai.



DPPH non radikal

DPPH radikal

**Gambar 13.** Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan (Pokorny, dkk. 2001)

Nilai  $IC_{50}$  senyawa vitamin C sebesar 14,87  $\mu\text{g/ml}$ . Sedangkan  $IC_{50}$  kombinasi ET dan EKJ sebesar 83,00  $\mu\text{g/ml}$ , lebih lemah kekuatannya dalam menangkap radikal dibandingkan dengan senyawa kontrol vitamin C. Hal ini disebabkan karena masih dalam bentuk ekstrak belum dalam fraksi sehingga jumlah senyawa aktif yang dapat menghambat aktifitas radikal masih kecil. Namun menurut Mardawati *et. al.* (2008),  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$  dapat digolongkan sebagai antioksidan yang kuat, sehingga kombinasi EKJ dan ET berpotensi kuat dalam aktifitas penangkapan senyawa radikal.

Menurut penelitian Abdul (2005) uji antioksidan ekstrak kemuning (*Murraya paniculata (L) Jack*) menghasilkan  $IC_{50}$  sebesar 126,17  $\mu\text{g/ml}$  dan penelitian Stevi (2012) uji antioksidan ekstrak kering kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) sebesar 44,49  $\mu\text{g/ml}$ . Maka kombinasi EKJ dan ET berpotensi lebih kuat dalam menghambat aktifitas radikal dibandingkan ekstrak kemuning namun lebih lemah bila dibandingkan ekstrak kering kulit buah manggis.

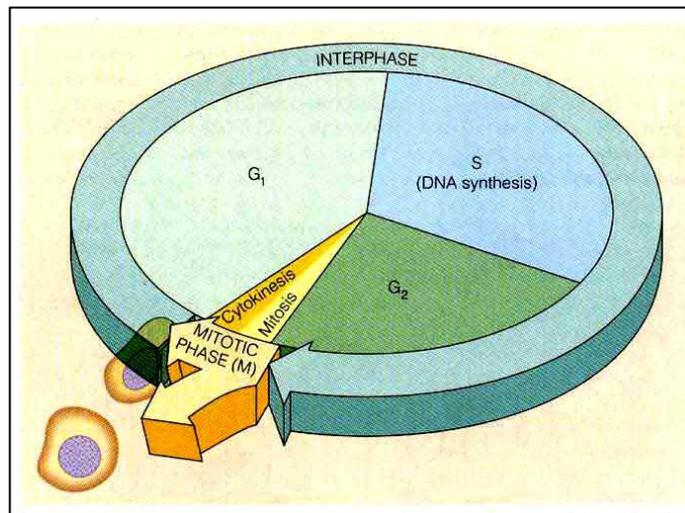
#### 4. Uji Sitotoksik MTT Assay

Prinsip kerja metode uji sitotoksik MTT *assay* adalah dengan reduksi garam kuning tetrazolium MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid*) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Intensitas warna ungu pada setiap sumuran menggambarkan banyak jumlah sel hidup. Semakin tinggi intensitas warna ungu maka jumlah sel yang masih hidup dalam tiap sumur semakin banyak. Penambahan reagen *stopper* yang bersifat detergenik berfungsi untuk melarutkan kristal berwarna. Kemudian absorbansinya diukur menggunakan *ELISA reader*. Absorbansi yang diperoleh berbanding lurus dengan persen sel hidup, sehingga semakin besar absorbansi maka jumlah sel kanker yang masih hidup juga semakin banyak (CCRC, 2009).

Disiapkan sel T47D konfluen 80%, karena jika kurang dari 80% maka sel dapat seluruhnya mati pada saat diberi perlakuan sampel, bila konsentrasi terlalu rendah maka nilai absorbansinya dapat tidak valid. Selain itu jika konfluen lebih dari 80%, sel akan terlalu padat, sehingga sel dalam sumuran akan terlalu banyak. Media pertumbuhan sel T47D menggunakan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang ditambah dengan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% sebanyak 10 mL berfungsi untuk memberi nutrisi

pada sel dan penisilin-streptomisin 1% berguna sebagai antimikroba agar sel tidak tercemar mikroba.

Dari penelitian yang dilakukan dengan pemberian perlakuan menunjukkan bahwa kombinasi ET dan EKJ terhadap sel kanker payudara T47D memiliki potensi yang lemah dalam menghambat viabilitas sel kanker dengan  $IC_{50}$  sebesar 1888,69  $\mu\text{g/ml}$ .



**Gambar 15.** Mekanisme Siklus Sel (Campbell *et al.*, 1999)

Mekanisme siklus sel yaitu dimulai dengan masuknya sel dari fase  $G_0$  menuju fase  $G_1$  akibat stimulus *growth factor*, kemudian menyebabkan hiperfosforilasi protein retinoblastoma (pRb) dan DNA menjadi longgar lalu masuk ke *restriction point* lalu fase S untuk melakukan replikasi DNA. Bila terjadi kerusakan saat sintesis dapat diperbaiki terlebih dahulu sebelum akhirnya masuk ke fase M. *Restriction point* adalah titik dimana terjadi hiperfosforilasi yang menyebabkan inhibitor p27, suatu gen pengekspresi p53

(gen apoptosis) terdegradasi. Pada titik ini terjadi perbaikan DNA yang rusak, bila kerusakan DNA sudah parah dan tidak bisa diperbaiki, maka akan segera dieliminasi ke fase  $G_0$  (Vermeulen *et al.*, 2003).

Pada sel kanker gen p53 inilah yang terjadi mutasi. Mekanisme flavonoid tangeretin sebagai agen kemopreventif dengan menginduksi *cell cycle G<sub>1</sub> arrest* saat sel berada pada *restriction point* (Morley, 2007).

## 5. *Molecular Docking*

*Molecular docking* adalah suatu metode komputasi (*in silico*) menggunakan aplikasi komputer yang berfungsi untuk menentukan perkiraan interaksi antara senyawa uji dengan ligan secara cepat dan efisien. Prinsip kerja *molecular docking* yaitu dengan penambatan ligan pada senyawa target. Ligan adalah molekul sederhana dalam suatu senyawa kompleks yang berperan sebagai pendonor elektron agar terbentuk ikatan kompleks yang akan berefek biologis. Senyawa target dapat berupa *binding site*, protein dan enzim (Utama, 2003).

Parameter keluaran dari hasil *molecular docking* adalah nilai *score docking*. Nilai *score docking* adalah suatu nilai yang menunjukkan besarnya energi yang dibutuhkan senyawa uji berinteraksi dengan senyawa target, semakin rendah nilai *score docking* maka semakin kecil pula energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu ikatan dan semakin stabil juga interaksi yang dihasilkan (Purnomo, 2011).

Senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini sebagai ligan antara lain *native ligand*, EGCG (*epigallocatechin gallate*), tangeretin, agen kemoterapi yaitu doxorubicin dan 5-fluorouracil. Kemudian ligan-ligan tersebut ditambatkan dengan suatu protein target. Protein target yang digunakan sebagai senyawa target adalah HER2 yang memiliki peran dalam pertumbuhan pada sel payudara yaitu dengan mekanisme diferensiasi dan proliferasi (Kumar,2005).

Kode protein HER2 yang digunakan adalah 1N8Z. Protein HER2 dengan kode ini diklasifikasikan bekerja pada enzim tranferase dan terdapat pada organisme *Homo sapiens*. HER2 (erbB2) merupakan protoonkogen yang terdapat pada kanker payudara. Tingginya kadar protein HER2 pada sel kanker payudara merupakan pertanda keadaan yang buruk (Kumar, 2005).

Melalui hasil *score docking*, dipilih konformasi terbaik tiap senyawa uji dengan melihat nilai *score docking* terendah. Nilai *score docking* berhubungan dengan jumlah energi yang dibutuhkan suatu ligan untuk mengikat suatu senyawa target. Semakin rendah *score docking*, semakin sedikit energi yang dibutuhkan, semakin stabil pula ikatan yang dihasilkan. Senyawa ligan berinteraksi dengan protein target melalui suatu ikatan, dapat berupa ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik (Kartasasmita *et. al*, 2009)

Analisis dilakukan dengan cara membandingkan nilai *score docking* ligan uji dengan *native ligand*. Parameter *scoring* dipengaruhi oleh kekuatan

ikatan, jenis ikatan, dan kesesuaian pose dengan *native ligand*. Data hasil *molekular docking* dapat dilihat pada tabel 8.

Protein senyawa EGCG pada konformasi 7 yang terdapat pada teh (*Camellia sinensis*) memiliki nilai *score docking* paling rendah diantara senyawa uji yang lain, kemudian agen kemoterapi doxorubicin, lalu senyawa flavonoid tangeretine yang terkandung dalam kulit jeruk mandarin nilainya sedikit lebih rendah dari senyawa ligan. Namun agen kemoterapi 5-fluorouracil justru memiliki nilai *score docking* yang lebih tinggi dibanding *native ligand* (Tabel 8).

Hal ini menunjukkan bahwa ikatan antara flavonoid EGCG dengan protein HER2 lebih stabil sehingga memiliki aktifitas inhibisi terhadap HER2 lebih tinggi bahkan dibandingkan dengan doxorubicin yang sudah dikenal sebagai agen kemoterapi kanker payudara. Flavonoid EGCG menghambat protein HER2 dengan mekanisme memicu terjadinya apoptosis p53 dan menghambat telomerase sel kanker MCF-7 (Mittal, 2004).

Sementara ikatan senyawa flavonoid tangeretin dengan protein HER2 dengan ligan aslinya memiliki stabilitas energi dalam aktivitas inhibisi yang hampir sama. Flavonoid tangeretin menghambat protein HER2 dengan mekanisme induksi proliferasi siklus sel fase G<sub>1</sub> (Morley, 2007).

Secara umum, senyawa polifenol (EGCG termasuk senyawa polifenol) memiliki beberapa mekanisme dalam aktifitasnya sebagai antikanker. Mekanisme yang pertama sebagai senyawa antioksidan yang

dapat melindungi sel dari kerusakan DNA akibat radikal bebas. Mekanisme yang kedua dengan memodulasi protein yang berperan dalam jalur transduksi signal seperti activator protein 1 (AP-1), mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3'-K), p70S6-K dan Akt. Mekanisme yang ketiga dengan cara mengurangi aktivitas dari *tyrosine kinase receptors* (PDGF-R $\beta$ , EGF-R) yaitu reseptor yang dapat memacu sel kanker. Mekanisme keempat yaitu dengan memicu terjadinya apoptosis sel kanker. Mekanisme yang kelima yaitu dengan cara memblok efluks p-glycoprotein (P-gp) sehingga dapat mengatasi resistensi terhadap obat-obat kemoterapi (Demeule M, *et al.*, 2002).

Sementara ikatan senyawa flavonoid tangeretin dengan protein HER2 dengan ligan aslinya memiliki stabilitas energi dalam aktivitas inhibisi yang sama. Flavonoid tangeretin menghambat protein HER2 dengan mekanisme induksi proliferasi siklus sel fase G<sub>1</sub> (Morley, 2007).

Hal tersebut dibuktikan melalui visualisasi 3D menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* 2017 antara ligan dan senyawa target. Hasil interpretasi interaksi dan jenis ikatan berbagai ligan pada HER2 dapat di lihat pada tabel 9.

Senyawa EGCG sebanding dengan doxorubicin yang mengikat sebanyak 7 ikatan yang berinteraksi pada asam amino *glutamine* pada posisi 407 (GLN 407), *glutamic acid* pada posisi 299 (GLU 299), *glutamic acid* pada posisi 383 (GLU 383), *threonine* pada posisi 301 (THR 301), *glutamic*

*acid* pada posisi 382 (GLU 382), *lysine* pada posisi 347 (LYS 347), dan *phenylalanine* pada posisi 349 (PHE 349) lebih banyak dibanding ligan asli yang hanya mengikat 5 ikatan.

Senyawa tangeretin berinteraksi dengan mengikat 6 ikatan yang berinteraksi pada asam amino *threonine* pada posisi 301 (THR 301), *lysine* pada posisi 346 (LYS 346), *lysine* pada posisi 347 (LYS 347), *glutamine* pada posisi 383 (GLU 383), dan *valine* pada posisi 300 (VAL 300).

Ligan 5-FU dan tangeretin mengikat 5 asam amino sama banyaknya dengan ligan asli. Semakin banyak ikatan yang terbentuk antara ligan dan protein target, maka potensi aktifitas suatu senyawa tersebut semakin kuat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa EGCG secara *in silico* potensinya kuat dalam aktifitas penghambatan terhadap protein HER2 dan senyawa tangeretin juga poten dalam inhibisi protein HER2, namun kekuatannya sebanding dengan ligan aslinya.

## 6. Formulasi Sediaan Tablet *Effervescent*

Dengan data penunjang uji antioksidan dan penambatan molekuler yang baik, maka penelitian dapat dilanjutkan dengan pembuatan tablet *effervescent* kombinasi ET dan EKJ

Pembuatan formulasi tablet *effervescent* kombinasi ET dan EKJ berdasarkan aktivitasnya sebagai antioksidan. Penggunaan kombinasi asam sitrat dan asam tartat sebagai bahan asam dan natrium bikarbonat sebagai bahan basa. Talk bertujuan sebagai pelicin (lubrikan) agar tidak melekat pada

*punch*. Mg stearat digunakan untuk bahan penghancur. Untuk pemanis menggunakan sakarin karena rasanya manis dan harganya yang relatif murah (Negara, 2011).

Berdasarkan uji evaluasi yang telah dilakukan, kadar air pada granul asam dan basa menunjukkan nilai 1,5% dalam arti terlalu kering untuk standar kadar air granul yang berkisar 2-5% sehingga pada saat pengempaan tablet mengalami *capping* atau mengelupas pada bagian luarnya. Suhu dan kelembaban sangat berpengaruh pada granul, lingkungan tempat pengerjaan formulasi memiliki suhu 26,7°C dan kelembaban 69%, jauh dari standar yang seharusnya (suhu maksimum 20°C, kelembaban <20%) (Lee, 2000).

Kemudian dilakukan uji pH larutan yaitu sebesar 5.52, tidak memenuhi standar yaitu antara 6-7 (Kailaku & Sumangat, 2012) dan uji kekerasan hanya sebesar 0,24 kgf tidak sesuai standar yang seharusnya antara 8-12 kgf. Sehingga tablet yang dihasilkan empuk dan sangat mudah hancur (Chabib, 2015). Hal tersebut disebabkan bisa karena kurangnya bahan pengikat yang digunakan, sehingga solusi untuk memperbaikinya perlu diberi tambahan zat pengikat ke dalam proses pembuatan granul asam dan granul basa sebelum dioven.

Hal yang membedakan antara tablet konvensional dan tablet *effervescent* adalah dalam hal uji waktu larut. Tablet dilarutkan ke dalam pelarut hingga melarut sepenuhnya. Tablet *effervescent* yang bagus sebaiknya

larut < 5 menit. Tablet yang diformulasikan memiliki waktu larut 3.15 menit, sehingga sesuai persyaratan.

Maka dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan pembuatan tablet *effervescent* kombinasi ekstrak daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* belum dapat diaplikasikan karena faktor lingkungan yaitu terlalu lembab dan suhu yang tinggi. Maka perlu optimasi kelembaban dan suhu ruangan terlebih dahulu agar memenuhi standar yang dibutuhkan (kelembaban <20% dan suhu maksimum 20°C) sebelum dilakukan tahap formulasi tablet *effervescent*