



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS FARMASI

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5933150, Fax (031) 5935249  
Laman: <http://www.ff.unair.ac.id>, e-mail: [info@ff.unair.ac.id](mailto:info@ff.unair.ac.id)

**SURAT KEPUTUSAN**  
**DEKAN FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**NOMOR : 332/UN3.1.5/2021**

tentang

**PENETAPAN TIM PENGUJI UJIAN TERTUTUP DISERTASI**  
**MAHASISWA PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**  
**SEMESTER GASAL TAHUN 2021/2022**

**DEKAN FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

- Menimbang :
- Bahwa untuk penyelenggaraan Ujian Tertutup Disertasi Mahasiswa Program Doktor Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, perlu dibentuk Tim Penguji Ujian Tertutup Disertasi
  - Bahwa untuk keperluan tersebut di atas perlu diterbitkan Surat Keputusan Dekan
- Mengingat :
- Undang-Undang Republik Indonesia nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional
  - Undang-Undang nomor 14 tahun 2005, tentang Guru dan Dosen
  - Undang – Undang nomor 12 tahun 2012, tentang Pendidikan Tinggi
  - Peraturan Pemerintah nomor 57 tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga
  - Keputusan Menteri PTIP nomor 64 tahun 1965, tentang Pendirian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
  - Peraturan Pemerintah nomor 30 tahun 2006 tentang Penetapan Universitas Airlangga sebagai Badan Hukum Milik Negara
  - Peraturan Rektor Universitas Airlangga nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;
  - Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Airlangga Nomor 3/H3.MWA/K/2020 tentang Pengangkatan Rektor Universitas Airlangga Periode 2020-2025;
  - Keputusan Rektor Universitas Airlangga No. 726/UN3/2020, tentang Pengangkatan Dekan Fakultas, Direktur Sekolah Pascasarjana dan Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga Periode 2020-2025;
  - Keputusan Rektor Universitas Airlangga nomor : 1476/H3/KR/2009 tanggal 23 November 2009, tentang Pembukaan Program Studi Doktor Ilmu Farmasi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
  - Keputusan Rektor Universitas Airlangga nomor : 13/H3/PR/2011 tanggal 20 Juni 2011, tentang Pengelolaan Pendidikan Program Magister dan Program Doktor Universitas Airlangga
  - Keputusan Rektor Universitas Airlangga nomor : 20/H3/PR/2012 tanggal 05 Januari 2012 tentang Pelimpahan Pengelolaan Penyelenggaraan Pendidikan Program Doktor dari Program Pascasarjana ke Fakultas di Lingkungan Universitas Airlangga



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS FARMASI

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5933150, Fax (031) 5935249  
Laman: <http://www.ff.unair.ac.id>, e-mail: [info@ff.unair.ac.id](mailto:info@ff.unair.ac.id)

---

13. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 21 Tahun 2014 tanggal 30 Juni 2014, tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor (S3) Universitas Airlangga.

**MEMUTUSKAN**

- Menetapkan : Mengangkat Tim Penguji Ujian Tertutup Disertasi Mahasiswa Program Doktor Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Semester Gasal tahun 2021/2022 dengan susunan Ketua dan Anggota seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini;
- Pertama
- Kedua : Tim Penguji Ujian Tertutup Disertasi bertugas:
1. Memeriksa dan menilai Naskah Ujian Tertutup Disertasi yang diajukan oleh Calon Doktor sesuai dengan Pedoman Penilaian Ujian Tertutup Disertasi .
  2. Melaksanakan kegiatan Ujian Tertutup Disertasi Sesuai Dengan Pedoman Pelaksanaan Ujian Tertutup Disertasi
  3. Melaksanakan Evaluasi Ujian Tertutup Disertasi
- Ketiga : Biaya terkait dengan Surat Keputusan ini dibebankan pada RKAT Fakultas Farmasi Universitas Airlangga tahun Anggaran 2021
- Keempat : Surat Keputusan ini berlaku untuk Semester Gasal tahun 2021/2022 dengan ketentuan apabila dikemudian hari terdapat kekeliruan dan atau kekurangan akan diperbaiki sebagaimana mestinya

Ditetapkan : DI SURABAYA  
Pada tanggal : 28 Desember 2021  
Dekan,

Prof. apt. Junaidi Khotib, M.Kes., Ph.D  
NIP. 19701022 199512 1 001

Tembusan Yth. :

1. KPS. Doktor Ilmu Farmasi
2. Kabag. Akademik Fakultas Farmasi Unair
3. Ketua Departemen di Lingkungan Fakultas Farmasi Unair
4. Kasubag Keuangan & SDM Fakultas Farmasi Unair
5. Arsip



**LAMPIRAN SURAT KEPUTUSAN**

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Nomor : **332**/UN3.1.5/2021

Tanggal : 28 Desember 2021

**PENETAPAN TIM PENGUJI UJIAN TERTUTUP DISERTASI  
MAHASISWA PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
SEMESTER GASAL TAHUN AKADEMIK 2021/2022**

NO	NAMA PENGUJI	STATUS	NAMA/ NIM YANG DIUJI	JUDUL DISERTASI
1.	Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt	Ketua	<b>Joharman</b>	Aktivitas Senyawa Aktif Dari Kulit Buah Mundar (Garcinia forbesii. King) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dan Sel Kanker Hati HepG2 dan Pengaruhnya Terhadap Protein P53 dan BCl2
2.	Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS	Anggota	<b>Nim. 051417097303</b>	
3.	apt. Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D	Anggota		
4.	Prof. apt. Sismindari, SU., Ph.D	Penguji Luar		
5.	Prof. Dr. apt. Siswandono, MS	Anggota		
6.	Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS	Anggota		
7.	<b>apt. Rr. Retno Widyowati, M.Pharm., Ph.D</b>	<b>Anggota</b>		
8.	apt. Suciati, S.Si., M.Phil., Ph.D	Anggota		

Dekan,

Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D  
NIP. 19701022 199512 1 001



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**  
Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5933150, Fax (031) 5935249  
Laman: <http://s3if.ff.unair.ac.id>, e-mail: [doktor.if@ff.unair.ac.id](mailto:doktor.if@ff.unair.ac.id)

Nomor : 371/UN3.1.5/DIF/PPd/2021

17 Desember 2021

Lamp. : -

Hal : **Mohon kesediaan sebagai Panitia Ujian Disertasi Tertutup  
A.n. JOHARMAN**

Kepada, Yth :

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt. | Fakultas Farmasi Unair |
| 2. Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS.             | Fakultas Farmasi Unair |
| 3. apt. Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D       | Fakultas Farmasi Unair |
| 4. Prof. apt. Sismindari, SU., Ph.D           | Fakultas Farmasi UGM   |
| 5. Prof. Dr. apt. Siswandono, MS              | Fakultas Farmasi Unair |
| 6. Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo EW, MS      | Fakultas Farmasi Unair |
| 7. Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS           | Fakultas Farmasi Unair |
| 8. apt. Rr. Retno Widyowati, M.Pharm., Ph.D   | Fakultas Farmasi Unair |
| 9. apt. Suciati, S.Si., M.Phil., Ph.D         | Fakultas Farmasi Unair |

Dengan hormat,

Sehubungan akan dilaksanakan kegiatan Ujian Disertasi Tertutup dari Mahasiswa Program Doktor Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, sebagai berikut :

Nama : **JOHARMAN**

NIM : 051417097303

Judul : **Aktivitas Senyawa Aktif Dari Kulit Buah Mundar (Garcinia forbesii. King) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dan Sel Kanker Hati HepG2 dan Pengaruhnya Terhadap Protein P53 dan BCl2**

Promotor : Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS

Ko-Promotor : apt. Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D

Maka bersama ini kami mengharapkan kehadiran Bapak/Ibu dalam acara tersebut, yang akan dilaksanakan secara online pada :

Hari, tanggal : **Selasa, 28 Desember 2021**

Pukul : **09.00-12.00 WIB**

Tempat : **Online Zoom Meeting ID 977 3201 5056; Passcode: 234990  
<https://zoom.us/j/97732015056?pwd=dTZYUzAySmRCWU5tZ2Q4S2wxRHVmUT09>**

Berkaitan dengan hal tersebut diatas, kami mohon kesediaan Bapak/Ibu mengisi surat pernyataan kesediaan sebagai Panitia Ujian Tertutup melalui tautan berikut: <http://bit.ly/KesediaanPengujiS3IF>. Pernyataan kesediaan mohon dapat diisi sebelum pelaksanaan ujian.

Demikian atas perhatian dan kehadirannya, kami ucapkan terima kasih.



Koordinator Program Studi

Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si  
NIP. 19590805 198701 1 001

**NASKAH UJIAN DISERTASI TERTUTUP**

**DISERTASI**

**AKTIVITAS SENYAWA AKTIF DARI KULIT BUAH MUNDAR  
(*Garcinia forbesii* King) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7 DAN SEL KANKER HATI HEPG2 DAN PENGARUHNYA  
TERHADAP PROTEIN P53 DAN BCL2**



**JOHARMAN**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**DISERTASI**

**AKTIVITAS SENYAWA AKTIF DARI KULIT BUAH MUNDAR  
(*Garcinia forbesii* King) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7 DAN SEL KANKER HATI HEPG2 DAN PENGARUHNYA  
TERHADAP PROTEIN P53 DAN BCL2**

**JOHARMAN**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2021**

## **SURAT PERNYATAAN**

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga:

Nama : Joharman

NIM : 051417097303

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul:

**Aktivitas Senyawa Aktif Dari Kulit Buah Mundar (*Garcinia forbesii* King)  
Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 Dan Sel Kanker Hati HepG2 Dan  
Pengaruhnya Terhadap Protein P53 Dan Bcl2**

adalah benar-benar merupakan konsep pemikiran dan hasil karya ilmiah saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Disertasi ini merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 1 Desember 2021

Yang membuat pernyataan,

Joharman

## **SURAT PERNYATAAN**

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga:

Nama : Joharman

NIM : 051417097303

menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul :

**Aktivitas Senyawa Aktif Dari Kulit Buah Mundar (*Garcinia forbesii* King)  
Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 Dan Sel Kanker Hati HepG2 Dan  
Pengaruhnya Terhadap Protein P53 Dan Bcl2**

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet portal Garuda atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 1 Desember 2021

Yang membuat pernyataan,

Joharman



**AKTIVITAS SENYAWA AKTIF DARI KULIT BUAH MUNDAR  
(*Garcinia forbesii* King) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7 DAN SEL KANKER HATI HEPG2 DAN PENGARUHNYA  
TERHADAP PROTEIN P53 DAN BCL2**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Doktor Ilmu Farmasi  
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

**Oleh :  
Joharman  
NIM. 051417097303**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 15 Desember 2021**

**Oleh:**

**Promotor**



**Prof. Dr. apt. Sulardiman, MS.  
NIP. 196301091988101001**

**Ko-promotor**



**Drs. apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D  
NIP. 196308221989021002**

**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi Doktor Ilmu Farmasi**



**Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si  
NIP. 195908051987011001**

**Ujian Disertasi Tertutup  
Tanggal 28 Desember 2021**

---

**PANITIA PENGUJI DISERTASI**

- Ketua : Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto., M.Si.**
- Anggota : 1. Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS.**
- 2. Drs. apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D**
- 3. Prof. apt. Sismindari, SU., Ph.D**
- 4. Prof. Dr. apt. Siswandono, MS.**
- 5. Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS.**
- 6. Prof. Dr. apt. Bambang Projogo E. W., MS.**
- 7. apt. Rr. Retno Widyowati, M.Pharm., Ph.D**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

**Nomor: .....**

**Tanggal: .....**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji bagi Allah SWT, karena atas taufik dan hidayahNya jualah penulis dapat menyelesaikan disertasi ini, yang merupakan akhir dari rangkaian pendidikan Program Doktor Ilmu Farmasi yang penulis jalani di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Dengan selesainya penulisan disertasi ini, perkenankan penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada :

Orang tua penulis, isteri dan anak-anak yang telah banyak memberikan semangat dan dorongan, terutama doa yang tiada henti dipanjatkan agar penulis dapat berhasil menyelesaikan pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS. selaku promotor, yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, saran, nasehat dan dorongan semangat kepada penulis, yang juga dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran memberikan segenap ilmunya sejak awal hingga selesainya penyusunan naskah disertasi ini.

Drs. apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D selaku ko-promotor, yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, nasehat, dorongan semangat dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran sejak awal hingga selesainya penyusunan naskah disertasi ini.

Pemerintah Republik Indonesia cq. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan beasiswa untuk pendidikan S3 di Universitas Airlangga, dan dana hibah disertasi untuk penyelesaian penelitian disertasi ini.

Rektor Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Ketua Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Kepala Departemen Farmakognosi dan Fitokimia dan Kepala Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan dan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia dan Kimia Farmasi.

Kepala Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga, Kepala Departemen Parasitologi Universitas Gadjah Mada dan Kepala Primkoppol Puslabfor Polri, yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di laboratorium yang dipimpinnya.

Tim penguji : Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS., Drs. apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D, Prof. Dr. apt. Siswandono, MS., Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto., M.Si., Dr. rer.nat. apt. Mulja Hadi Santosa, MS., Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS., Prof. Dr. apt. Bambang Projogo E. W., MS. dan Prof. apt. Sismindari, SU., Ph.D, apt.

Rr. Retno Widyowati, M.Pharm., Ph.D yang dari awal ujian proposal hingga ujian terbuka telah memberikan banyak masukan dan saran demi perbaikan disertasi ini.

Terakhir kepada semua pihak yang tidak bisa disebut penulis satu persatu, yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan pendidikan S3 ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat ganda atas apa yang telah semua pihak berikan kepada penulis, dan semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat dan amal jariyah untuk kita semua, amin ya Robbal alamin

## RINGKASAN

### **AKTIVITAS SENYAWA AKTIF DARI KULIT BUAH MUNDAR (*Garcinia forbesii* King) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7 DAN SEL KANKER HATI HEPG2 DAN PENGARUHNYA TERHADAP PROTEIN P53 DAN BCL2**

Joharman

Pada tahun 2018 diperkirakan terdapat 18 juta kasus kanker di seluruh dunia, dan terjadi peningkatan hingga 19,2 juta kasus pada tahun 2020 dengan angka kejadian 10,1 juta pada laki-laki dan 9,2 juta pada perempuan. Kanker payudara menempati urutan pertama kasus kanker di dunia yaitu 11,7% dari keseluruhan kejadian kanker, sedangkan kanker hati menempati urutan kelima sebesar 6,3% dari keseluruhan angka kejadian kanker pada laki-laki.

Penyakit kanker di Indonesia menduduki peringkat ke-8 di Asia Tenggara dan peringkat ke-23 di Asia. Terjadi peningkatan prevalensi tumor/kanker yang pada tahun 2013 dengan angka kejadian 1,4 per 1000 penduduk mejadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018. Kanker payudara menempati urutan pertama angka kejadian yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk pada perempuan, sedangkan kanker hati menempati angka kejadian kedua terbesar pada laki-laki yaitu 12,4 per 100.000 penduduk.

Banyak obat kanker yang digunakan saat ini berasal dari tumbuhan. Beberapa hasil penelitian terdahulu mendapatkan bahwa senyawa-senyawa bahan alam bersifat anti kanker dapat berupa senyawa-senyawa dari golongan Flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Beberapa senyawa bahan alam yang sudah digunakan secara luas sebagai obat kanker adalah Taxol dari *Taxus brevifolia*, dan vinkristin dan vinblastin dari *Vinca rosea*.

Tanaman-tanaman genus *Garcinia* dari suku Clusiaceae tersebar luas sepanjang daerah tropical dan subtropical. Spesies dari genus *Garcinia* ini telah lama digunakan sebagai obat tradisional di banyak negara, dan banyak mengandung berbagai senyawa kimia dengan banyak aktivitas biologis, termasuk aktivitas antikanker.

*Garcinia forbesii* King merupakan salah satu tanaman dari genus *Garcinia* yang tumbuh di Indonesia. Tanaman dari suku Clusiaceae ini merupakan salah satu tanaman buah yang masih satu kerabat dengan manggis. Memiliki kulit buah berwarna merah muda sampai merah tua, dengan daging buah berwarna putih yang mirip sekali dengan daging buah manggis. Tanaman ini banyak tumbuh di pulau Kalimantan dan sebagian Malaysia. Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman ini diantaranya adalah telah diisolasi senyawa xanthon, 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone dan forbexanthone dari ranting tanaman ini. Penelitian lain

menyebutkan dari batang tanaman ini diisolasi rubraxanthone yang memiliki efek antibakteri.

Protein p53 berperan penting pada proses apoptosis, di mana p53 dapat menginduksi apoptosis, penghentian siklus sel, dan penuaan dalam sel. Penelitian tentang antikanker menyebutkan bahwa banyak kejadian kanker dikarenakan adanya mutasi dari protein p53 yang berperan dalam proses apoptosis. Selain protein p53, beberapa protein lain juga berperan dalam proses apoptosis, salah satu diantaranya adalah Bcl2. Peningkatan resistensi terhadap proses apoptosis dihubungkan dengan peningkatan protein Bcl2, dan keluarga Bcl2 yang berperan sebagai anti apoptosis yaitu Bcl2 dan BclX dapat menghambat proses apoptosis.

Selain secara *in vitro*, uji aktivitas antikanker dapat dilakukan menggunakan metode penambatan molekul (*molecular docking*). Penambatan molekul merupakan metode komputasi yang dapat memprediksi interaksi ikatan antar molekul, yang akan menghasilkan nilai yang dapat menggambarkan energi total ikatan antara protein dengan ligan. Interaksi ligan dengan protein terjadi hanya apabila terdapat kecocokan bentuk dan volume di antara molekul ligan dan situs aktif atau situsambat protein tersebut.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi senyawa dari kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) berdasarkan tuntunan aktivitas dari ekstrak, fraksi dan subfraksi, menentukan struktur senyawa hasil isolasi dan menguji aktivitasnya terhadap sel kanker payudara MCF7 dan sel kanker hati HepG2 secara *in vitro* dan *in silico*, serta melihat pengaruhnya terhadap ekspresi sel p53 dan Bcl2.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan 5 pelarut yaitu n-heksan, DCM, etil asetat, n-butanol dan air. Proses fraksinasi dan subfraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom. Proses isolasi menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Pengujian sitotoksik terhadap sel MCF7 dan HepG2 menggunakan metode Microtetrazolium (MTT). Pengujian pengaruh terhadap ekspresi sel p53 dan Bcl2 menggunakan metode *imunocytochemistry* (ICC). Pengujian *in silico* menggunakan protein struktur dari reseptor dengan PDB ID: 3ERT dan 2J6M yang merupakan *Breast Cancer active site receptor*, dan PDB ID: 1YWN dan 1M17 yang merupakan *Liver Cancer active site receptor*. Dan untuk elucidasi struktur digunakan metode identifikasi Spektroskopi massa, H-NMR, C-NMR dan HMBC.

Hasil uji sitotoksik terhadap ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan ( $IC_{50}$   $103,61 \pm 2,34$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak DCM ( $IC_{50}$   $397,61 \pm 28,05$   $\mu\text{g/mL}$ ), dan ekstrak etil asetat ( $IC_{50}$   $1.518,30 \pm 68,64$   $\mu\text{g/mL}$ ) secara berturut-turut pada sel kanker payudara MCF-7. Sedangkan terhadap sel kanker hati HepG2, ekstrak DCM ( $IC_{50}$   $79,80 \pm 1,23$   $\mu\text{g/mL}$ ) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksan ( $IC_{50}$   $83,23 \pm 4,26$   $\mu\text{g/mL}$ ), dan ekstrak etil asetat ( $IC_{50}$   $671,88 \pm 94,33$   $\mu\text{g/mL}$ ) secara berturut-turut. Ekstrak n-butanol dan air tidak menunjukkan potensi antikanker terhadap kedua sel tersebut yang diindikasikan dengan nilai  $IC_{50}$  yang sangat tinggi.

Hasil uji sitotoksik terhadap fraksi menunjukkan bahwa fraksi ND ( $IC_{50}$   $51,22 \pm 7,04$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan fraksi NA ( $IC_{50}$   $84,31 \pm 5,43$   $\mu\text{g/mL}$ ), fraksi NB ( $IC_{50}$   $97,14 \pm 2,28$   $\mu\text{g/mL}$ ) dan fraksi

NC ( $IC_{50}$  146,86 $\pm$ 12,45  $\mu$ g/mL) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Begitu pula terhadap sel kanker hati HepG2, fraksi ND ( $IC_{50}$  26,61 $\pm$ 1,23  $\mu$ g/mL) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan fraksi NA ( $IC_{50}$  30,77 $\pm$ 2,88  $\mu$ g/mL), fraksi NB ( $IC_{50}$  42,12 $\pm$ 0,82  $\mu$ g/mL) dan fraksi NC ( $IC_{50}$  41,65 $\pm$ 1,83  $\mu$ g/mL).

Hasil uji sitotoksik terhadap subfraksi menunjukkan bahwa subfraksi ND3 ( $IC_{50}$  21,26 $\pm$ 0,86  $\mu$ g/mL) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan subfraksi ND1 ( $IC_{50}$  tidak terukur) dan subfraksi ND2 ( $IC_{50}$  26,92 $\pm$ 2,62  $\mu$ g/mL) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Begitu pula terhadap sel kanker hati HepG2, subfraksi ND3 ( $IC_{50}$  23,69 $\pm$ 0,53  $\mu$ g/mL) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan subfraksi ND1 ( $IC_{50}$  tidak terukur) dan subfraksi ND2 ( $IC_{50}$  27,80 $\pm$ 1,76  $\mu$ g/mL). Berdasarkan hasil pengujian sitotoksik terhadap subfraksi, maka dilanjutkan proses pemisahan senyawa dari subfraksi ND3 menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP), dan diperoleh senyawa XND3 dan YND3.

Hasil identifikasi terhadap isolat YND3 dari kulit buah Mundar (*Garcinia forbesii* King.), disimpulkan senyawa tersebut diduga adalah 4',3,5,6 tetrametoksiflavan. Senyawa yang diduga 4',3,5,6 tetrametoksiflavan tersebut memiliki efek sitotoksik dengan  $IC_{50}$  5,03 $\pm$ 0,92  $\mu$ g/mL terhadap sel MCF7 dan 5,87 $\pm$ 0,43  $\mu$ g/mL terhadap sel HepG2, dan berdasarkan hasil uji imunositokimia, senyawa tersebut menunjukkan potensi apoptosis melalui jalur peningkatan p53 dan penghambatan Bcl2.

Berdasarkan uji *in silico* terhadap senyawa yang diduga 4',3,5,6 tetrametoksiflavan, menunjukkan potensi sitotoksik terhadap reseptor kanker payudara 3ERT dan 2J6M dengan konstanta inhibisi 1,07  $\mu$ M dan 132,41  $\mu$ M, dan terhadap reseptor kanker hati 1YWN dan 1M17 dengan konstanta inhibisi 7,15  $\mu$ M dan 2,54  $\mu$ M.

Saran dari penelitian yang telah dilakukan adalah menguji secara *in vivo* senyawa aktif yang diduga 4',3,5,6 tetrametoksiflavan terhadap sel kanker payudara dan sel kanker hati pada hewan coba; dan menguji secara *in silico* pengaruh senyawa aktif yang diduga 4',3,5,6 tetrametoksiflavan terhadap protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak (Bcl-2 associated killer), Bid (a novel BH3 domain-only death agonist) dan Bad (the Bcl-2 associated death molecule).



## SUMMARY

### **THE ACTIVITY OF THE ACTIVE COMPOUND FROM MUNDAR PERICARP (*Garcinia forbesii* King.) ON BREAST CANCER MCF-7 CELLS AND LIVER CANCER HEPG2 CELLS, AND ITS EFFECTS ON P53 AND BCL2 PROTEIN**

Joharman

In 2018, there are estimated 18 million cases of cancer around the world, and there is an increase of up to 19.2 million cases in 2020 with an incidence of 10.1 million in male and 9.2 million in female. Breast cancer ranks first in cancer cases in the world, around 11.7% of the total cancer incidence, while liver cancer ranks fifth around 6.3% of the total cancer incidence in male.

The cancer in Indonesia is ranked 8<sup>th</sup> in Southeast Asia and 23<sup>rd</sup> in Asia. There is an increase in the prevalence of tumors/cancer in 2013 with an incidence of 1.4 per 1000 population to 1.79 per 1000 population in 2018. Breast cancer ranks first in the incidence rate of 42.1 per 100,000 populations in female, meanwhile cancer liver is the second largest incidence rate in male, that is 12.4 per 100,000 populations.

Many of the cancer drugs in use today come from plants. Some of the results of previous research found that natural compounds that have anti-cancer properties can be in the form of compounds from the flavonoid, alkaloid and terpenoid groups. Several natural compounds that have been widely used as cancer drugs are Taxol from *Taxus brevifolia*, vincristine and vinblastine from *Vinca rosea*.

The plants of genus *Garcinia* from the Clusiaceae are widespread throughout tropical and subtropical areas. This species of the genus *Garcinia* has long been used as traditional medicine in many countries, and contains many chemical compounds with many biological activities, including anticancer activity.

The *Garcinia forbesii* King is a one of plants from the *Garcinia* genus that grows in Indonesia. This plant from the Clusiaceae is one of the fruit plants that has still kinship of the mangosteen. It has pink to dark red pericarp, with white flesh that is very similar to mangosteen's flesh. This plant grows a lot in the island of Borneo and a part of Malaysia. The researches that have been conducted to this plant are the xanthon, 1,3,7-trihydroxy-2- (3-methylbut-2-enyl) -xantone and forbexanthone compounds, that have been isolated from this plant's branches. Another research states that rubraxanthone has been isolated from the stem of this plant which has an antibacterial effect.

The p53 protein has an important role on the apoptotic process, that is, the p53 protein can induce the apoptosis, the termination of the cell cycle, and the aging in cells. The Research about anticancer states that many cancer cases are due to mutation of the p53 protein that play a role in the apoptosis process. In addition to the

p53 protein, several other proteins also play a role in the apoptosis process, one of them is Bcl2. The increase in resistance to the apoptotic process is related to an increase in the Bcl2 protein, and the Bcl2 family that roles as anti-apoptotic, namely Bcl2 and BclX that can preclude the apoptotic process.

In addition by using *in vitro* test, the test of anticancer activity can be conducted by using molecular docking method. The molecular docking is a computational method that can predict the bond interaction among molecules which results the value that describes the total bond energy between proteins and ligands. The interaction of ligands with proteins can occur if only there is a match in shape and volume between the ligand molecules and the active site or the bound site from that protein.

The purpose of this research is to isolate the compound from the mundar pericarp (*Garcinia forbesii* King) based on the activity guidance of the extract, fraction and subfraction, to determine the structure of the isolated compound result and to test its activity to MCF7 breast cancer cells and HepG2 liver cancer cells by using *in vitro* and *in silico* test, and to observe its effect to the expression of p53 and Bcl2 cells.

The extraction process is conducted by using a multilevel maceration method using 5 solvents. They are n-hexane, DCM, ethyl acetate, n-butanol and water. The fractionation and subfractionation processes are conducted by using the column chromatography method. The isolation process is using the Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) method. The Cytotoxic test of MCF7 to HepG2 cells is using the Microtetrazolium (MTT) method. The effect test to p53 and Bcl2 cell expression is using the immunocytochemistry (ICC) method. The test of *in silico* is using the structural proteins from the receptors with PDB ID: 3ERT and 2J6M which are Breast Cancer active site receptors. And PDB ID: 1YWN and 1M17 which are Liver Cancer active site receptors. And for structural elucidation, is used identification methods mass spectroscopy, H-NMR, C-NMR and HMBC.

The result of the cytotoxic test to the extract shows that the n-hexane extract ( $IC_{50}$   $103.61 \pm 2.34$   $\mu\text{g/mL}$ ) has higher anticancer potential than the DCM extract ( $IC_{50}$   $397.61 \pm 28.06$   $\mu\text{g/mL}$ ), and ethyl acetate extract ( $IC_{50}$   $1,518.30 \pm 68.64$   $\mu\text{g/mL}$ ) consecutively to MCF-7 breast cancer cells. Whereas for HepG2 liver cancer cells, DCM extract ( $IC_{50}$   $79.80 \pm 1.23$   $\mu\text{g/mL}$ ) shows a higher anticancer potential than n-hexane extract ( $IC_{50}$   $83.23 \pm 4.26$   $\mu\text{g/mL}$ ), and ethyl acetate extract ( $IC_{50}$   $671.88 \pm 94.33$   $\mu\text{g/mL}$ ) consecutively. The n-butanol extract and water do not show anticancer potential to those two cells that indicated as the very high  $IC_{50}$  value.

The result of the cytotoxic test to the fraction shows that the ND fraction ( $IC_{50}$   $51.22 \pm 7.04$   $\mu\text{g/mL}$ ) has a higher anticancer potential than the NA fraction ( $IC_{50}$   $84.31 \pm 5.43$   $\mu\text{g/mL}$ ), the NB fraction ( $IC_{50}$   $97.14 \pm 2.28$   $\mu\text{g/mL}$ ) and the NC fraction ( $IC_{50}$   $146.86 \pm 12.45$   $\mu\text{g/mL}$ ) to MCF-7 breast cancer cells. Likewise on HepG2 liver cancer cells, the ND fraction ( $IC_{50}$   $26.61 \pm 1.23$   $\mu\text{g/mL}$ ) shows a higher anticancer potential than the NA fraction ( $IC_{50}$   $30.77 \pm 2.88$   $\mu\text{g/mL}$ ), the NB fraction ( $IC_{50}$   $42.12 \pm 0.82$   $\mu\text{g/mL}$ ) and the NC fraction ( $IC_{50}$   $41.66 \pm 1.83$   $\mu\text{g/mL}$ ).

The result of cytotoxic test to subfraction shows that ND3 subfraction ( $IC_{50}$   $21.26 \pm 0.86$   $\mu\text{g/mL}$ ) has a higher anticancer potential than ND1 subfraction

(unmeasured  $IC_{50}$ ) and ND2 subfraction ( $IC_{50} 26.98 \pm 2.62 \mu\text{g/mL}$ ) to MCF-7 breast cancer cells. Likewise for HepG2 liver cancer cells, ND3 subfraction ( $IC_{50} 23.69 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$ ) shows a higher anticancer potential than ND1 subfraction (unmeasured  $IC_{50}$ ) and ND2 subfraction ( $IC_{50} 27.80 \pm 1.76 \mu\text{g/mL}$ ). Based on the cytotoxic test results to subfraction, then the process of separating compounds from the ND3 subfraction is continued by using the Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) method, and this process produces XND3 and YND3 compounds.

The identification result of the YND3 isolate from the mundar pericarp (*Garcinia forbesii* King), concluded that the compound is assumed 4',3,5,6 tetramethoxyflavone. The assumed compound of 4',5,6,7 tetramethoxyflavone, has a cytotoxic effect with  $IC_{50} 5.03 \pm 0.92 \mu\text{g/mL}$  to MCF7 cells and  $5.87 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$  against HepG2 cells, and based on the result of immunocytochemistry test, that compound shows the potential for apoptosis through the p53 enhancement way and Bcl2 inhibition.

Based on in silico testing, the isolated compound assumed to be 4',3,5,6 tetramethoxyflavone showed cytotoxic potentials on the breast cancer receptors 3ERT and 2J6M with inhibitory constants of  $1.07 \mu\text{M}$  and  $132.41 \mu\text{M}$ , respectively, and on the liver cancer receptors 1YWN and 1M17 with inhibitory constants of  $7.15 \mu\text{M}$  and  $2.54 \mu\text{M}$ , respectively.

It is suggested that further studies can be conducted based on this study to assess the in vivo effect of the active compound assumed to be 4',3,5,6 tetramethoxyflavone on breast and liver cancer cells in experimental animals; and to assess its effect on pro-apoptotic proteins, such as Bax, Bak (Bcl-2 associated killer), Bid (BH3 domain-only death agonist), and Bad (Bcl-2 associated death molecule) in silico.

## ABSTRACT

### THE ACTIVITY OF THE ACTIVE COMPOUND FROM MUNDAR PERICARP (*Garcinia forbesii* King.) ON BREAST CANCER MCF-7 CELLS AND LIVER CANCER HEPG2 CELLS, AND ITS EFFECTS ON P53 AND BCL2 PROTEIN

Joharman

The species of the *Garcinia* genus has long been used as traditional medicine in many countries, and contains many chemical compounds with many biological activities, including anticancer activity. *Garcinia forbesii* King. is one of plants from the *Garcinia* genus that grows in Indonesia.

This research aims to isolate compounds from mundar pericarp (*Garcinia forbesii* King.) based on the activity guidance of extracts, fractions and subfractions, to determine the structure of isolated compounds result and to test their activity to MCF7 breast cancer and HepG2 liver cancer cells by using in vitro and in silico test, and to know its effect to p53 and Bcl2 cell expression.

The extraction process is conducted by using the multilevel maceration method using 5 solvents, namely n-hexane, DCM, ethyl acetate, n-butanol and water. The fractionation and subfractionation processes are using the column chromatography method. The isolation process is using the Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) method. The cytotoxic test to MCF7 and HepG2 cells is using the Microtetrazolium (MTT) method. The effect test to p53 and Bcl2 cell expression is using the immunocytochemistry (ICC) method. In silico test is using structural proteins from the receptors with PDB ID: 3ERT and 2J6M which are breast cancer active site receptors, and PDB ID: 1YWN and 1M17 which are liver cancer active site receptors. And for the structural elucidation, it is using mass spectroscopy identification methods, H-NMR, C-NMR and HMBC.

The isolation result is obtained YND3 compound which is after being identified, it is concluded that the compound is identical with 4',3,5,6 tetramethoxyflavone. The assumed compound of 4',3,5,6 tetramethoxyflavone, has a cytotoxic effect with IC<sub>50</sub> 5.03±0.92 µg/mL to MCF7 cells and 5.87±0.43 µg/mL to HepG2 cells, and based on the result of immunocytochemistry test, that compound shows the potential for apoptosis through the p53 enhancement pathway and Bcl2 inhibition.

Based on in silico testing, the isolated compound assumed to be 4',3,5,6 tetramethoxyflavone showed cytotoxic potentials on the breast cancer receptors 3ERT and 2J6M with inhibitory constants of 1.07 µM and 132.41 µM, respectively, and on

the liver cancer receptors 1YWN and 1M17 with inhibitory constants of 7.15  $\mu\text{M}$  and 2.54  $\mu\text{M}$ , respectively.

**Key word** : *Garcinia forbesii* King.; 4',3,5,6 tetramethoxyflavone; cytotoxicity; apoptosis

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Surat Pernyataan Bebas Plagiat .....	iii
Surat Pernyataan Persetujuan Diunggah Secara Elektronik .....	iv
Prasyarat Gelar .....	v
Lembar Pengesahan .....	vi
Penetapan Panitia Penguji .....	vii
Ucapan Terima Kasih .....	viii
Ringkasan .....	x
<i>Summary</i> .....	xiii
<i>Abstract</i> .....	xvi
DAFTAR ISI .....	xviii
DAFTAR TABEL .....	xx
DAFTAR GAMBAR .....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Mundar ( <i>Garcinia forbesii</i> King.) .....	8
2.2 <i>Garcinia</i> .....	11
2.3 Karsinogenesis .....	12
2.4 Jenis-Jenis Kanker .....	16
2.5 Lokasi Kanker .....	17
2.6 Etiologi .....	21
2.7 Patofisiologi .....	23
2.8 MCF-7 dan HepG2 <i>cell line</i> .....	27
2.9 Ekstraksi dan Isolasi .....	29
2.10 Mekanisme dan Regulasi Apoptosis .....	33
2.11 Uji <i>Microtetrazolium</i> (MTT) .....	39
2.12 Spektroskopi LC-MS/MS .....	40
2.13 Spektroskopi <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR) .....	45
2.14 Penambatan Molekul ( <i>Molecular Docking</i> ) .....	50
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....	53
3.1 Kerangka Konseptual .....	53
3.2 Hipotesis .....	56
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	58

4.1 Jenis Penelitian .....	58
4.2 Variabel Penelitian .....	58
4.3 Definisi Operasional .....	59
4.4 Rancangan Penelitian .....	61
4.5 Ekstraksi .....	62
4.6 Pengujian Sitotoksik Metode <i>Microtetrazolium</i> (MTT) .....	63
4.7 Isolasi .....	66
4.8 Elusidasi Struktur .....	68
4.9 <i>Molecular Docking</i> .....	72
4.10 Uji Imunitokimia .....	73
<b>BAB 5 DATA DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>77</b>
5.1 Bahan Penelitian Buah dan Kulit Buah .....	77
5.2 Hasil Ekstraksi dan Uji Sitotoksik Estrak .....	78
5.3 Hasil Fraksinasi dan Uji Sitotoksik Fraksi .....	79
5.4 Hasil Subfraksinasi dan Uji Sitotoksik Subfraksi .....	80
5.5 Hasil Isolasi dan Uji Sitotoksik Isalat .....	81
5.6 Hasil Identifikasi Senyawa .....	82
5.7 Hasil Uji Imunitokimia .....	92
5.8 Hasil Uji Penambatan Molekul .....	94
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>100</b>
6.1 Sampel Buah dan Kulit Buah .....	100
6.2 Ekstraksi, Fraksinasi dan Uji Sitotoksik .....	100
6.3 Isolasi, Identifikasi Senyawa dan Uji Sitotoksik .....	102
6.4 Uji Imunitokimia .....	106
6.5 Uji Penambatan Molekul ( <i>Molecular Docking</i> ) .....	107
6.6 Senyawa 4',3,5,6 tetrametoksiflavon .....	111
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>113</b>
7.1 Kesimpulan .....	113
7.2 Saran .....	114
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>115</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel 2.1	Tanaman Genus <i>Garcinia</i> yang mengandung senyawa aktif dengan efek antikanker.....	11
Tabel 5.1	Berat buah dan kulit buah .....	77
Tabel 5.2	Hasil ekstraksi dari 502 gram serbuk kering kulit buah .....	78
Tabel 5.3	Hasil uji sitotoksik ekstrak .....	78
Tabel 5.4	Hasil uji sitotoksik 4 fraksi dari ekstrak n-heksan .....	80
Tabel 5.5	Hasil uji sitotoksik 3 subfraksi dari fraksi ND .....	81
Tabel 5.6	Hasil uji sitotoksik isolat dari subfraksi ND3 dan Doxorubisin.....	82
Tabel 5.7	Geseran kimia $^1\text{H}$ dan $^{13}\text{C}$ NMR isolat YND <sub>3</sub> , senyawa 3 (gambar 5.11) dan senyawa 12 (gambar 5.12) .....	89
Tabel 5.8	Korelasi antara $^1\text{H}$ dan $^{13}\text{C}$ pada spektrum HMBC .....	91
Tabel 5.9	Prosentasi sel yang mengekspresikan p52 dan Bcl2 .....	94
Tabel 5.10	Uji statistik SPSS .....	95
Tabel 5.11	Nilai <i>root square mean deviation</i> (RSMD) ligan asli .....	96
Tabel 5.12	Penambatan molekul isolat 4',3,5,6 tetrametoksiflavon terhadap reseptor kanker payudara dan reseptor kanker hati	97



## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Foto tanaman dan buah Mundar ( <i>Garcinia forbesii</i> King) ...	9
Gambar 2.2	Struktur kimia 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone .....	10
Gambar 2.3	Struktur kimia forbexanthone .....	10
Gambar 2.4	Struktur kimia rubraxanathone .....	10
Gambar 5.1	Profil KLT fraksi hasil kromatografi kolom .....	79
Gambar 5.2	Profil KLT subfraksi hasil kromatografi kolom .....	80
Gambar 5.3	Profil KLT isolat senyawa XND3 dan YND3 .....	81
Gambar 5.4	Profil kromatogram LCMS-QTOF senyawa XND3 .....	82
Gambar 5.5	Analisis massa senyawa XND3 .....	83
Gambar 5.6	Profil kromatogram LCMS-QTOF senyawa YND3 .....	83
Gambar 5.7	Analisis massa senyawa YND3 .....	84
Gambar 5.8	Spektrum <sup>1</sup> HNMR senyawa YND3 .....	85
Gambar 5.9	Spektrum <sup>13</sup> CNMR senyawa YND3 .....	86
Gambar 5.10	Spektrum HMBC senyawa YND3 .....	86
Gambar 5.11	Struktur molekul 7-((3-metilbut-2-en-1-yl)oksi),3,5,3',4'-tetrametoksiflavon .....	90
Gambar 5.12	Struktur molekul 4',3,5,6,7,8-heksametoksiflavon.....	90
Gambar 5.13	Korelasi pada spektrum HMBC .....	92
Gambar 5.14	Struktur molekul 4',3,5,6 tetrametoksiflavon .....	92
Gambar 5.15	Pengamatan salah satu lapang pandang ekspresi p53 oleh sel MCF7 dan HepG2 untuk kontrol, XND3 dan YND3 .....	93
Gambar 5.16	Pengamatan salah satu lapang pandang ekspresi Bcl2 oleh sel MCF7 dan HepG2 untuk kontrol, XND3 dan YND3 .....	93
Gambar 5.17	Interaksi antara ligan dan reseptor 3ERT .....	97
Gambar 5.18	Interaksi antara ligan dan reseptor 2J6M .....	98
Gambar 5.19	Interaksi antara ligan dan reseptor 1YWN .....	98
Gambar 5.20	Interaksi antara ligan dan reseptor 1M17 .....	99
Gambar 6.1	Struktur molekul 4',3,5,6 tetrametoksiflavon .....	105

## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran-1	Identifikasi Tanaman Mundar ( <i>Garcinia forbesii</i> King.) ...	124
Lampiran-2	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian ekstrak n-heksan, DCM, etil asetat, n-butanol dan air terhadap sel MCF7 .....	125
Lampiran-3	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian ekstrak n-heksan, DCM, etil asetat, n-butanol dan air terhadap sel HepG2 .....	126
Lampiran-4	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian fraksi NA, NB, NC dan ND terhadap sel MCF7 .....	127
Lampiran-5	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian fraksi NA, NB, NC dan ND terhadap sel HepG2 .....	128
Lampiran-6	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian subfraksi ND1, ND2 dan ND3 terhadap sel MCF7 .....	129
Lampiran-7	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian subfraksi ND1, ND2 dan ND3 terhadap sel HepG2 .....	130
Lampiran-8	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian isolat XND3, YND3 dan doxorubicin terhadap sel MCF7 .....	131
Lampiran-9	Foto <i>plate</i> dan hasil elisa pengujian isolat XND3, YND3 dan doxorubicin terhadap sel HepG2 .....	132
Lampiran-10	Uji statistik ekspresi p53 oleh sel MCF7 dan HepG2 .....	133
Lampiran-11	<i>Post hoc test</i> LSD dan Duncan ekspresi p53 .....	134
Lampiran-12	Uji statistik ekspresi Bcl2 oleh sel MCF7 dan HepG2 .....	135
Lampiran-13	<i>Post hoc test</i> LSD dan Duncan ekspresi Bcl2 .....	136
Lampiran-14	<i>Breast cancer active site receptor</i> (3ERT dan 2J6M), dan <i>Liver cancer active site receptor</i> (1YWN dan 1M17) .....	137

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

CNMR	= <i>Carbon Nuclear Magnetic Resonance</i>
EA	= Ekstrak air
EB	= Ekstrak n-butanol
ED	= Ekstrak diklorometana
EE	= Ekstrak etil asetat
ELISA	= <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EN	= Ekstrak n-heksan
HDI	= <i>Hydrogen Deficiency Index</i>
HMBC	= <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HNMR	= <i>Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance</i>
IC	= <i>Inhibition Concentration</i>
MCF7	= <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MTT	= <i>Microtetrazolium</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pada tahun 2018 diperkirakan terdapat 18 juta kasus kanker di seluruh dunia, dan terjadi peningkatan hingga 19,2 juta kasus pada tahun 2020 dengan angka kejadian 10,1 juta pada laki-laki dan 9,2 juta pada perempuan. Kanker payudara menempati urutan pertama kasus kanker di dunia yaitu 11,7% dari keseluruhan kejadian kanker, sedangkan kanker hati menempati urutan kelima sebesar 6,3% dari keseluruhan angka kejadian kanker pada laki-laki (WCRF, 2020).

Penyakit kanker di Indonesia menduduki peringkat ke-8 di Asia Tenggara dan peringkat ke-23 di Asia. Terjadi peningkatan prevalensi tumor/kanker yang pada tahun 2013 dengan angka kejadian 1,4 per 1000 penduduk mejadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018. Kanker payudara menempati urutan pertama angka kejadian yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk pada perempuan, sedangkan kanker hati menempati angka kejadian kedua terbesar pada laki-laki yaitu 12,4 per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2019)

Pada dasarnya kanker merupakan penyakit sel yang dicirikan dengan perubahan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel. Sel-sel yang mengalami transformasi neoplastis umumnya mengekspresi antigen-antigen permukaan sel yang tampak seperti tipe janin (*fetal*) normal, memiliki tanda-tanda nyata lainnya seperti tidak terjadi maturitas, dan mungkin memperlihatkan abnormalitas-abnormalitas kromosom baik kualitas maupun kuantitasnya, termasuk

berbagai translokasi dan penampilan sekuens-sekuens gen teramplifikasi. Sel-sel yang demikian ini, mengalami proliferasi secara berlebihan dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menginvasi struktur-struktur normal di sekitarnya (Katzung, 2004).

Selain prosedur baku secara medis, banyak cara yang dilakukan penderita untuk mencari kesembuhan dari penyakit kanker, salah satunya dengan menggunakan tanaman obat (Rejitha dkk, 2007). Banyak jenis tanaman obat yang sudah lama dikenal sebagai obat anti kanker, dan beberapa di antaranya sudah diisolasi kandungannya (Kardinan dan Taryono, 2003). Salah satu strategi untuk pengembangan obat kanker adalah dengan menemukan senyawa-senyawa yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen pengatur pertumbuhan dan proliferasi sel (Katzung, 2004).

Banyak obat kanker yang digunakan saat ini berasal dari tumbuhan. Beberapa hasil penelitian terdahulu mendapatkan bahwa senyawa-senyawa bahan alam bersifat anti kanker dapat berupa senyawa-senyawa dari golongan Flavonoid, alkaloid dan terpenoid (Zhang *et al*, 2016; Irshad *et al.*, 2010). Beberapa senyawa bahan alam yang sudah digunakan secara luas sebagai obat kanker adalah Taxol dari *Taxus brevifolia* (Weaver, 2014) dan vinkristin dan vinblastin dari *Vinca rosea* (Irshad *et al.*, 2010). Banyak juga senyawa-senyawa yang diisolasi dari bahan alam yang memiliki aktivitas antikanker, misalnya 7-epiclusionone yang merupakan golongan benzophenon dari *Garcinia brasiliensis* (Sales *et al.*, 2015); Wallichinanes A-E yang merupakan golongan lanostanes dari *Garcinia wallichii* Choisy (Hongthong *et al.*,

2016); dan Nujiangexathone A yang merupakan golongan xanthone dari *Garcinia nujiangensis* (Zhang *et al.*, 2016).

Spesies-spesies dari genus *Garcinia* diketahui banyak mengandung senyawa golongan flavanoid, benzophenon, lanostane, xanthon dan terpenoid, yang menunjukkan aktivitas antikanker. Tanaman-tanaman genus *Garcinia* dari suku Clusiaceae tersebar luas sepanjang daerah tropical dan subtropical. Spesies dari genus *Garcinia* ini telah lama digunakan sebagai obat tradisional di banyak negara, dan banyak mengandung berbagai senyawa kimia dengan banyak aktivitas biologis, termasuk aktivitas antikanker (Bhaswati *et al.*, 2016; Bakar *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian pendahuluan tentang aktivitas antikanker telah dilakukan terhadap beberapa spesies *Garcinia*. Berbagai tanaman dari genus *Garcinia* memiliki efek sitotoksik, misalnya akar *Garcinia cowa* (Kaennakam *et al.*, 2015), kulit batang *Garcinia ovalifolia* (Pieme *et al.*, 2015) dan *Garcinia cylindrocarpa* (Sukandar *et al.*, 2016), daun *Garcinia njuangensis* (Zhang *et al.*, 2016), buah *Garcinia wallichii* (Hongthong *et al.*, 2016), kulit buah *Garcinia mangostana* (Chaverri *et al.*, 2008), *Garcinia brasiliensis* (Sales *et al.*, 2015), dan *Garcinia dulcis* (Bakar *et al.*, 2015). Buah, daging buah dan biji *Garcinia dulcis* juga mengandung senyawa aktif berefek apoptosis terhadap sel kanker hati HepG2 (Bakar *et al.*, 2015). Kulit buah *Garcinia mangostana* memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker nasofaring CNE1, CNE2, SUNE1 and HONE1; sel kanker paru A549 dan GLC82; sel kanker payudara MCF-7; dan sel kanker hati Bel-7402 (Xu *et al.*, 2015) dan Hep-G2 (Chang *et al.*, 2013).

*Garcinia forbesii* King merupakan salah satu tanaman dari genus *Garcinia* yang tumbuh di Indonesia. Tanaman dari suku Clusiaceae ini merupakan salah satu

tanaman buah yang masih satu kerabat dengan manggis. Memiliki kulit buah berwarna merah muda sampai merah tua, dengan daging buah berwarna putih yang mirip sekali dengan daging buah manggis. Tanaman ini banyak tumbuh di pulau Kalimantan dan sebagian Malaysia (Lim, 2012).

Bagian tanaman mundar yang digunakan oleh masyarakat hanyalah daging buahnya, belum ada pemanfaatan bagian lain dari tanaman ini seperti kulit batang, daun dan kulit buah. Kulit buah mundar merupakan bagian yang terbuang percuma saat musim buah ini tiba. Kulit buahnya agak tebal dan berair, dengan getah berwarna kuning. Dengan melimpahnya jumlah kulit buah mundar ini, terutama saat musimnya tiba, kiranya perlu dilakukan penelitian untuk pemanfaatan kulit buah mundar sebagai antikanker.

Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman ini diantaranya adalah telah diisolasi senyawa xanthon, 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone dan forbexanthone dari ranting tanaman ini (Harrison *et al.*, 1993). Penelitian lain menyebutkan dari batang tanaman ini diisolasi rubraxanthone yang memiliki efek antibakteri (Alen *et al.*, 2008).

Pada uji pendahuluan terhadap ekstrak etanol daun, kulit batang, kayu, dan kulit buah *Garcinia forbesii* King, didapatkan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> 246,89 µg/ml untuk daun, 458,32 µg/ml untuk kulit batang, 152,74 µg/ml untuk kayu dan 60,11 µg/ml untuk kulit buah. Sedangkan terhadap sel kanker hati HepG2, diperoleh nilai IC<sub>50</sub> 90,91 µg/ml untuk daun, 3.127,32 µg/ml untuk kulit batang, 111,71 µg/ml untuk kayu dan 50,4 µg/ml untuk kulit buah. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak etanol kulit buah *Garcinia*

*forbesii* King memiliki efek sitotoksik yang paling bagus dibandingkan dengan bagian tanaman lainnya, baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 maupun sel kanker hati HepG2 (Joharman, 2017)

Protein p53 berperan penting pada proses apoptosis, di mana p53 dapat menginduksi apoptosis, penghentian siklus sel, dan penuaan dalam sel (Liu *et al.*, 2019) Penelitian tentang antikanker menyebutkan bahwa banyak kejadian kanker dikarenakan adanya mutasi dari protein p53 yang berperan dalam proses apoptosis (Zilfou and Scott, 2009). Selain protein p53, beberapa protein lain juga berperan dalam proses apoptosis, salah satu diantaranya adalah Bcl2. Peningkatan resistensi terhadap proses apoptosis dihubungkan dengan peningkatan protein Bcl2 (Perini *et al.*, 2018), dan keluarga Bcl2 yang berperan sebagai anti apoptosis yaitu Bcl2 dan BclX dapat menghambat proses apoptosis (Willis *et al.*, 2003).

Selain secara *in vitro*, uji aktivitas antikanker dapat dilakukan menggunakan metode penambatan molekul (*molecular docking*). Penambatan molekul merupakan metode komputasi yang dapat memprediksi interaksi ikatan antar molekul, yang akan menghasilkan nilai yang dapat menggambarkan energi total ikatan antara protein dengan ligan (Purnomo, 2011). Interaksi ligan dengan protein terjadi hanya apabila terdapat kecocokan bentuk dan volume di antara molekul ligan dan situs aktif atau situsambat protein tersebut (Motiejunas and Wade, 2006).

Berdasarkan kesamaan genus dengan beberapa *Garcinia* yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker, dan hasil dari uji pendahuluan, maka kiranya perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah mundar tersebut, dan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara



MCF-7 dan sel kanker hati HepG2 secara *in vitro* dan *in silico*, serta pengaruhnya terhadap protein p53 dan Bcl2.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- 1.2.1 Ekstrak, fraksi dan subfraksi apakah dari kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker hati HepG2?
- 1.2.2 Bagaimanakah struktur kimia senyawa aktif yang terdapat pada subfraksi aktif dari kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King)?
- 1.2.3 Apakah senyawa kimia yang terkandung dalam subfraksi aktif memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 sel kanker hati HepG2?
- 1.2.4 Apakah senyawa kimia yang terkandung dalam subfraksi aktif memiliki pengaruh terhadap p53 dan Bcl2?
- 1.2.5 Bagaimanakah interaksi antara senyawa aktif dengan *active site reseptor* kanker payudara MCF-7 hati HepG2 berdasarkan uji *in silico* ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

- 1.3.1 Menentukan efek sitotoksik ekstrak *n*-heksan, etil asetat, diklorometan, *n*-butanol dan air serta fraksi-fraksi dan subfraksi-subfraksi dari ekstrak aktif dari kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) terhadap sel kanker payudara MCF-7 sel kanker hati HepG2 berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>.
- 1.3.2 Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa dari subfraksi aktif kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King).

- 1.3.3 Menentukan efek sitotoksik senyawa dari subfraksi aktif kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) terhadap sel kanker payudara MCF-7 sel kanker hati HepG2 berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>.
- 1.3.4 Menentukan pengaruh senyawa dari subfraksi aktif kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) terhadap protein p53 dan Bcl2.
- 1.3.5 Menentukan interaksi antara senyawa aktif dengan *active site reseptor* kanker payudara MCF-7 hati HepG2 berdasarkan uji *in silico*.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

. Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah efek sitotoksik *in vitro* dan *in silico* dari kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker hati HepG2, dan senyawa aktif yang bertanggung jawab, serta pengaruhnya terhadap protein p53 dan Bcl2

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Mundar (*Garcinia forbesii* King)**

##### 2.1.1 Klasifikasi tanaman (Mudiana, 2017)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Anak kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Theales
Suku	: Clusiaceae
Marga	: <i>Garcinia</i>
Jenis	: <i>Garcinia forbesii</i> King

##### 2.1.2 Nama Lain (Lim, 2012)

- Kandis, mundar (Sumatera)
- Bunoh, itan, mundar (Kalimantan)
- Kandis, Assam roi (Malaysia)

##### 2.1.3 Morfologi Tanaman (Lim, 2012)

Mundar (*Garcinia forbesii* King) merupakan salah satu tanaman buah yang masih satu kerabat dengan manggis. Tanaman keras/tahunan (perennial) dengan ketinggian pohon 7 – 15 m. Bentuk buahnya bundar, berwarna merah cerah, berkulit buah lunak. Bunga dan buah menempel di ranting/dahan. Daging buah berwarna putih, dengan rasa asam manis, semakin dekat ke biji

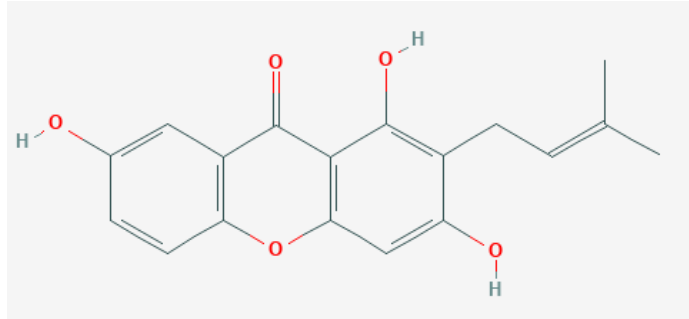
akan terasa asam segar. Berat setiap buahnya berkisar 40-60 gram. Kulitnya berasa asam dengan getah khas seperti getah manggis berwarna kuning. Aroma juga mirip sekali dengan buah manggis. Mundar memiliki ukuran buah yang lebih kecil dari manggis (diameter 2-3 cm, lingkar 8-10 cm). Dalam 1 buah terdapat 4-5 keping biji.



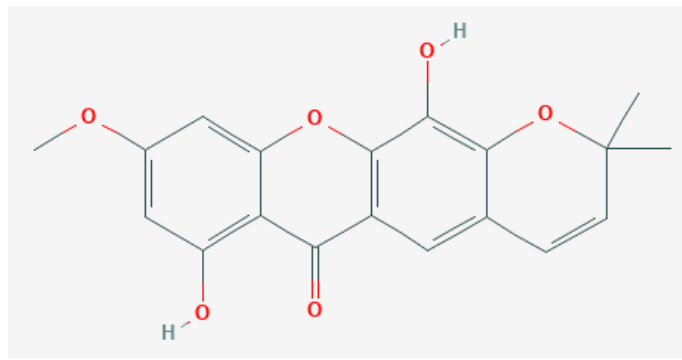
**Gambar 2.1** Foto tanaman dan buah Mundar (*Garcinia forbesii* King)

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

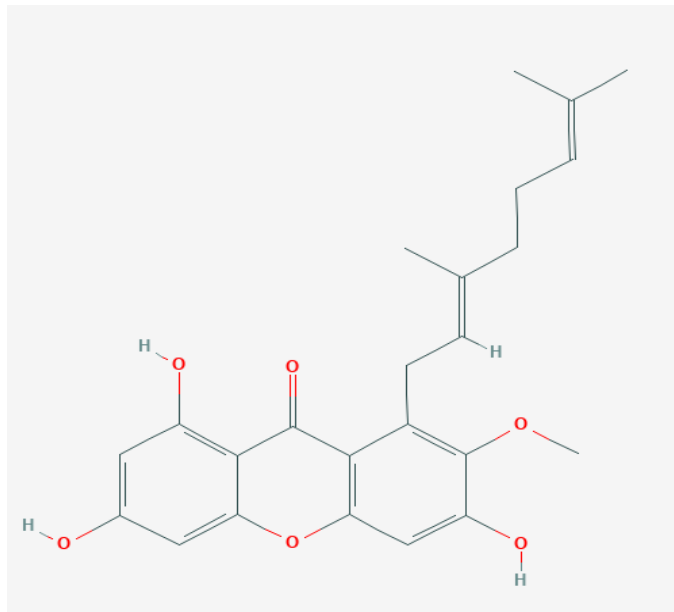
Beberapa penelitian menyebutkan ranting tanaman ini mengandung 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone dan forbexanthone (Harrison *et al.*, 1993). Penelitian lain menyebutkan dari batang tanaman ini diisolasi rubraxanathone (Alen *et al.*, 2008).



Gambar 2.2 Struktur kimia 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone



Gambar 2.3 Struktur kimia forbesxanthone



Gambar 2.4 Struktur kimia rubraxanthone

### 2.1.5 Kegunaan

Dari batang tanaman ini diisolasi rubraxanathone yang memiliki efek antibakteri (Alen *et al.*, 2008).

## 2.2 Garcinia

Tanaman-tanaman genus *Garcinia* dari suku *Clusiaceae* tersebar luas sepanjang daerah tropis dan subtropis. Spesies dari genus *Garcinia* ini telah lama digunakan sebagai obat tradisional di banyak negara, dan banyak mengandung berbagai senyawa kimia dengan banyak aktivitas biologis. Karena itu, telah banyak dilakukan penelitian terhadap tanaman dari genus ini sebagai kandidat obat baru.

Berbagai golongan senyawa dari genus ini telah diisolasi, seperti triterpen, flavonoid, benzofenon, xanton dan biphenil. Beberapa tanaman dari genus *Garcinia* yang mengandung senyawa aktif dengan efek antikanker ditunjukkan pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Tanaman Genus *Garcinia* yang mengandung senyawa aktif dengan efek antikanker

<b>Nama Tanaman</b>	<b>Zat Aktif/Sampel</b>	<b>Efek Antikanker</b>	<b>Pustaka</b>
<i>G. brasiliensis</i>	7-epiclusianone 7-epiclusianone	Glioblastoma <i>A549 cell line</i>	Sales <i>et al.</i> , 2015 Ionta <i>et al.</i> , 2015
<i>G. dulcis</i>	Ekstrak buah	<i>HepG2 cell line</i>	Bakar <i>et al.</i> , 2015
<i>G. schomburgkiana</i>	Ekstrak buah	<i>HeLa cell line</i>	Le <i>et al.</i> , 2016
<i>G. wallichii</i>	Wallichinanes A-E	P-388, KB, HT-29, MCF-7, A-549, ASK, CL, Hek-293 <i>cell line</i>	Hongthong <i>et al.</i> , 2016

<i>G. magostana</i>	$\alpha$ -mangostin	22Rv1 prostate cancer cells	Li <i>et al.</i> , 2014
	$\gamma$ -mangostin	HepG2 cell line	Chang <i>et al.</i> , 2013
	$\alpha$ -mangostin	HCT116 cell line	Aisha <i>et al.</i> , 2012
<i>G. cowa</i>	Kaennacowanols A-C	HeLa cell line	Kaennakam <i>et al.</i> , 2015
<i>G. nujiangensis</i>	Nujiangexathone A	HeLa dan SiHa cell line	Zhang <i>et al.</i> , 2016
<i>G. cylindrocarpa</i>	Cylindroxanthones A-C	KB cell line	Sukandar <i>et al.</i> , 2016

### 2.3 Karsinogenesis

Kanker merupakan suatu kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan melakukan invasi serta menyebar dari tempat asal sel tersebut ke tempat lain dalam tubuh. Ada tiga proses yang mempengaruhi jumlah sel secara keseluruhan pada makhluk hidup, yaitu proliferasi, eliminasi sel melalui kematian sel yang terprogram dan fase inaktif selama proses diferensiasi yang berguna untuk memberikan kesempatan bagi sel untuk melakukan perbaikan bagi penyimpangan yang terjadi. Sel kanker pada umumnya memiliki gangguan pada gen pengatur siklus yang mempengaruhi proliferasi sel yang tidak terkontrol tersebut (Kastan, 1997).

Karsinogenesis merupakan proses pembentukan sel karsinoma yang patogenesisnya secara molekuler merupakan penyakit genetik. Berbagai faktor (multifaktorial) mempengaruhi proses ini yang menyerang tubuh secara bertahap (multistage) baik pada tingkat fenotip maupun genotip. Perubahan sel normal menjadi

sel kanker melalui 3 tahap yaitu insiasi, promosi dan proresi (Mc Donald dan Ford, 1997).

Pada tahap insiasi terdapat faktor insiator yang memulai pertumbuhan sel abnormal menjadi seperti radiasi, bahan kimia mutagenik, virus, mutasi spontan. Selanjutnya pada tahap promosi sel yang terinisiasi akan dipacu untuk membelah oleh substansi yang dapat berupa karsinogen atau oleh bahan promotif (*promoting agent*). Substansi ini diperkirakan mempengaruhi diferensiasi sel sehingga tidak terjadi diferensiasi sesuai dengan fungsinya, yang biasanya terjadi pada sel normal setelah sel membelah. Pada tahap progresi ditandai dengan adanya invasi sel ganas ke membrane basalis atau kapsul. Perubahan genetic lebih lanjut diperlukan agar sel tumor dapat bermetastasis (Bast *et al.*, 1998; Mc Donald dan Ford, 1997 ).

Kerusakan materi genetik pada karsinogenesis dapat terjadi pada tingkat kromosom, yaitu kelainan struktur dan jumlah kromosom atau pada tingkat gen yaitu kelainan struktur atau fungsi (misalnya metilasi, aktivitas, telomerase). Kerusakan materi dapat berupa delesi (*deletion*). Delesi adalah hilangnya satu segmen kromosom gen dari *coding* dan *non coding region*. Kerusakan materi yang lain adalah berupa translokasi yaitu sebagian dari suatu kromosom lepas dan menempel pada kromosom lainnya. Kerusakan ini umumnya didapat (*acquired*) dan terjadi pada sel somatic tapi juga ada yang diturunkan dan menjadi predisposisi kanker. Gangguan dapat juga terjadi secara primer yaitu awal perkembangan tumor maupun secara sekunder yaitu terjadi belakangan (Kastan, 1997).

Perubahan salah satu atau keseluruhan dari tiga gen pengatur yang dijumpai pada semua sel dapat menyebabkan transformasi sel normal menjadi sel kanker pada



tingkat molekuler. Tiga gen pengatur itu adalah proto-onkogen yang menghasilkan protein pertumbuhan, gen supresor yang menghasilkan protein yang menghambat pertumbuhan sel dan gen apoptosis yang menghasilkan bahan yang memprogram kematian sel (Tamborini *et al.*, 2008).

Selain itu masih ada gen yang ikut mempengaruhi proses karsinogenesis, yaitu gen yang berperan dalam proses repair DNA. Gen ini mempengaruhi proliferasi atau daya tahan sel dengan mempengaruhi kemampuan organism tersebut untuk memperbaiki kerusakan non lethal yang terjadi pada gen lain, termasuk proto-onkogen, gen supresor dan gen apoptosis. Kerusakan pada gen ini dapat menyebabkan timbulnya mutasi pada genom dan kemudian menimbulkan transformasi neoplasma. *Gen DNA repair* ini harus mengalami inaktivasi pada kedua alelnya untuk menyebabkan ketidakstabilan genom, sehingga *gen DNA repair* ini seringkali dikelompokkan sebagai gen supresor (Tamborini *et al.*, 2008).

Agen yang termasuk dalam proto onkogen adalah gen yang memproduksi: 1) faktor pertumbuhan (*growth factor*), 2) reseptor faktor pertumbuhan (*growth-factor receptor*); 3) Kinase reseptor (*receptor kinase*); 4) transduser sinyal (*signal transducer*); 5) faktor transkripsi (transcription) dan 6) protein nucleus (*nuclear protein*) (Bast 1998; Tamborini *et al.*, 2008). Proto onkogen bisa berubah menjadi onkogenik akibat transduksi virus (*viral oncogenes, v-oncs*) atau akibat dari pengaruh yang mengubah perilaku sel in situ, sehingga menjadi *cellular oncogenes* (c-ones). Perubahan yang dialami proto onkogen menjadi onkogen selalu bersifat mengaktivasi, artinya mereka menstimulai suatu fungsi sel yang mengakibatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel. Onkogen menghasilkan protein yang disebut

onkoprotein, yang mirip produk normal dari proto onkogen. Yang membedakannya adalah tidak adanya unsur yang penting untuk pengendalian, serta produksinya oleh sel yang mengalami transformasi tidak dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan atau sinyal eksternal lainnya. Pada kondisi yang normal, proliferasi sel melalui tahapan sebagai berikut:

- Terikatnya faktor pertumbuhan pada reseptor spesifik membran sel.
- Aktivasi reseptor faktor pertumbuhan yang bersifat sementara dan terbatas, yang kemudian akan mengaktifasi beberapa protein transduksi sinyal pada bagian dalam membran plasma.
- Transmisi sinyal transduksi melintasi sitosol menuju inti melalui *second messenger*.
- Induksi dan aktivasi faktor pengendali pada inti yang menginisiasi transkripsi DNA.
- Sel kemudian memasuki siklus sel menghasilkan pembelahan sel (Pusztai., 1996).

Onkogen dan onkoprotein merupakan bentuk penyimpangan dari tahapan, dan produk yang terlibat dalam protein proliferasi tersebut mengakibatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel yang mengarah kepada neoplasma. Aktivasi onkogen merangsang produksi reseptor faktor pertumbuhan yang tidak sempurna, yang memberi isyarat pertumbuhan terus-menerus meskipun tidak ada rangsang dari luar. Proses proliferasi yang tidak terkendali tanpa diiringi maturasi sel dapat mengakibatkan gangguan diferensiasi sel. Pada tahap selanjutnya gangguan diferensiasi sel akan mencerminkan progresivitas sel menjadi ganas (Sudiana, 2008).

## 2.4 Jenis-Jenis Kanker

### 1) Karsinoma

Merupakan jenis kanker yang berasal dari sel yang melapisi permukaan tubuh atau permukaan saluran tubuh, misalnya jaringan epitel seperti sel kulit, testis, ovarium, kelenjar mukus, sel melanin, payudara, leher rahim, kolon, rektum, lambung, pankreas, dan esofagus.

### 2) Limfoma

Merupakan kanker yang berasal dari jaringan yang membentuk darah, misalnya jaringan limfe, lakteal, limfa, berbagai kelenjar limfe, timus dan sumsum tulang. Limfoma spesifik antara lain adalah penyakit hodgkin (kanker kelenjar limfe dan limfa)

### 3) Leukimia

Leukimia tidak membentuk massa tumor, tetapi memenuhi pembuluh darah dan mengganggu fungsi sel darah normal.

### 4) Sarkoma

Merupakan kanker jaringan penunjang yang berada di bawah permukaan tubuh seperti jaringan ikat, termasuk sel – sel yang ditemukan di otot dan tulang.

### 5) Glioma

Merupakan kanker susunan saraf, misalnya sel – sel glia (jaringan penunjang) disusunan saraf pusat.

## 6) Karsinoma insitu

Ini adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan sel epitel abnormal yang masih terbatas di daerah tertentu sehingga masih dianggap lesi prainvasif (kalian/luka yang belum menyebar).

## 2.5 Lokasi kanker

### 1) Kanker kolorektal

Tanda dan gejala kanker kolon pada lansia dapat meliputi perdarahan rektal, darah merah atau hitam dalam feces, perubahan kebiasaan BAB (konstipasi atau diare, feses yang mengecil). Tumor dalam kolon kanan dapat menjadi besar dan dapat menyebabkan nyeri tumpul yang samar – samar dan rasa tidak nyaman pada abdomen. Tumor dalam kolon kiri cenderung lebih kecil dan lebih berinfiltrasi, dengan perdarahan dan kemungkinan obstruksi usus.

### 2) Kanker paru

Resiko kanker paru 10 kali lebih tinggi pada perokok dari pada orang yang tidak merokok. Tingginya mortalitas akibat kanker paru sebagian disebabkan karena diagnosis yang terlambat, biologis tumor yang agresif, seringnya metastasis ke otak dan organ – organ vital yang lain, dan tidak efektifnya pengobatan konvensional. Tidak seperti kanker payudara, deteksi dini kanker paru tidak menjamin kesempatan yang baik untuk penyembuhan. Gejala batuk yang menetap, batuk dengan sputum berdarah, atau kesulitan bernapas dapat mengindikasikan kanker paru. Keletihan dan

kehilangan berat badan secara tiba – tiba sering merupakan gejala dari penyakit yang lebih lanjut.

### 3) Kanker payudara

Selain adanya massa, tanda – tanda kanker yang lain adalah retraksi kulit atau adanya lubang kecil pada kulit dan adanya perubahan kontur payudara dari yang biasanya. Sekresi serosanguinosa dari puting susu (jarang) pada wanita yang berusia lebih dari 50 tahun sering dikaitkan dengan kanker payudara. Pemeriksaan tambahan yang perlu dilakukan jika ditemukan benjolan atau jika mamogram mencurigakan atau kedua – duanya dapat meliputi aspirasi cairan dari kista, ultrasonografi pada area tersebut, dan biopsi lesi.

### 4) Kanker ginekologik

Kanker ovarium sebagai kanker ginekologi yang paling sering meningkat dengan bertambahnya usia. Faktor resiko yang berhubungan dengan kanker ini termasuk riwayat keluarga dengan kanker ovarium dan infertilitas. Pembesaran pinggul dan rasa tidak nyaman pada abdomen adalah gejala yang mungkin terjadi pada kanker ovarium.

### 5) Kanker prostat

Kanker prostat adalah penyebab kedua kanker pada pria lansia dan merupakan penyebab ketiga kematian akibat kanker pada pria yang berusia 65 tahun atau lebih. Gejala – gejala tidak terjadi sampai kanker telah menyerang daerah sekitarnya atau telah menyebar dan pada umumnya termasuk kesulitan

dalam berkemih, hematuria, dan nyeri punggung atau tulang,

#### 6) Kanker kulit

Pemeriksaan kulit seseorang secara mandiri dapat berguna untuk deteksi dini lesi kulit yang mencurigakan yang mungkin merupakan kanker atau premalignan. Adanya perubahan pada kulit dan tahi lalat harus dikaji. Kanker kulit yang paling serius melanoma maligna, lebih mematikan pada lansia dan telah meningkat secara dramatis pada orang yang berusia 65 tahun dan lebih dalam waktu 20 tahun terakhir ini.

#### 7) Kanker gastrointestinal

Berbagai macam tumor GI adalah penyebab morbiditas dan mortalitas yang penting pada populasi lansia.

##### a) Kanker lambung

Gejala-gejalanya biasanya terjadi setelah penyakit berada pada tahap lanjut dan termasuk nyeri epigastrik, penurunan berat badan, rasa penuh pada lambung setelah makan sejumlah kecil makanan dan hematemesis. Intervensi pembedahan pada umumnya merupakan satu-satunya kemungkinan untuk penyembuhan kanker lambung.

##### b) Kanker pancreas

Penggunaan tembakau dan pankreatitis kronis adalah faktor resiko yang penting. Penapisan rutin tidak dianjurkan dan gejala-gejala mungkin tidak spesifik. Pembedahan mungkin dapat menyembuhkan, tetapi kemoterapi dan radiasi lebih sering digunakan untuk upaya paliatif.

c) Kanker esophagus

Kesulitan menelan dan nyeri epigastrik adalah gejala potensial dari kanker esophagus. Kanker yang berhubungan dengan tembakau ini lebih sering terjadi pada mereka yang berusia 60-an dan 70-an. Intervensi pembedahan mungkin dapat menyembuhkan tetapi sebagian besar pasien mendapatkan kemoterapi atau terapi radiasi untuk upaya paliatif.

d) Kanker kandung kemih

Hematuria, sering berkemih, dan kesulitan dalam berkemih yang merupakan gejala umum infeksi kandung kemih, juga dapat menjadi gejala – gejala kanker kandung kemih. Pasien yang bergejala memerlukan suatu pemeriksaan termasuk pemeriksaan sistoskopi kandung kemih, termasuk biopsy. Penggunaan tembakau juga merupakan faktor resiko untuk kanker ini.

8) Kanker kepala dan leher

Kanker ini sering terjadi pada lansia terutama pada pria lansia. Konsumsi alkohol dan penggunaan tembakau merupakan faktor resiko yang penting. Pengkajian rongga mulut sangat penting. Kesulitan menelan, suara serak, massa pada leher, atau terjadinya lesi baru dalam daerah mulut harus dikaji lebih lanjut. Pembedahan dan terapi radiasi mungkin menyembuhkan tetapi dapat mengakibatkan morbiditas dan distres psikologis yang signifikan.

## 2.6 Etiologi

Penyebab kanker biasanya tidak dapat diketahui secara pasti, karena merupakan gabungan dari sekumpulan faktor, genetik dan lingkungan. Namun ada beberapa faktor yang diduga meningkatkan resiko kanker, sebagai berikut :

### 1. Faktor Keturunan

Faktor genetik menyebabkan beberapa keluarga memiliki resiko lebih tinggi menderita kanker tertentu dibandingkan keluarga lainnya.

### 2. Faktor Lingkungan

Merokok meningkatkan resiko terjadinya kanker paru-paru, mulut, laring (pita suara), dan kandung kemih. Faktor lingkungan lainnya, yaitu Sinar Ultraviolet matahari serta radiasi ionisasi (yang merupakan karsinogenik) digunakan dalam sinar rontgen dihasilkan dari pembangkit listrik tenaga nuklir dan ledakan bom atom hingga menjangkau jarak sangat jauh.

### 3. Faktor Makanan Berbahan Kimia

Makanan juga dapat menjadi faktor risiko penting lain penyebab kanker, terutama kanker pada saluran pencernaan. Seperti makanan junkfood, snack, dan makanan yang mengandung bahan kimia.

### 4. Faktor Terserang Virus

Virus yang dicurigai dapat menyebabkan kanker antara lain :

- a. Virus Papilloma
- b. Virus Sitomegalo
- c. Virus Hepatitis B
- d. Virus Epstein – Bar



- e. Virus Retro pada manusia misalnya virus HIV menyebabkan limfoma dan kanker darah lainnya.

## 5. Infeksi

Parasit Schistosoma (bilharzia) dapat menyebabkan kanker kandung kemih karena terjadinya iritasi menahun pada kandung kemih.

## 6. Faktor Perilaku

Perilaku yang dimaksud adalah merokok dan mengkonsumsi makanan yang banyak mengandung lemak dan daging yang diawetkan juga peminum minuman beralkohol. Selain itu, perilaku seksual yaitu melakukan hubungan intim diusia dini dan sering ganti pasangan.

## 7. Gangguan Keseimbangan Hormonal

Hormon estrogen berfungsi merangsang pertumbuhan sel yang cenderung mendorong terjadinya kanker, sedangkan progesteron melindungi terjadinya pertumbuhan sel yang berlebihan. Ada kecenderungan bahwa kelebihan hormon estrogen dan kekurangan progesteron menyebabkan meningkatnya risiko kanker payudara, kanker leher rahim, kanker rahim dan kanker prostat dan buah zakar pada pria.

## 8. Faktor Kejiwaan

Stres berat dapat menyebabkan gangguan keseimbangan seluler tubuh. Keadaan tegang terus menerus dapat mempengaruhi sel, dimana sel jadi hiperaktif dan berubah sifat menjadi ganas sehingga menyebabkan kanker.

## 9. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atom, atau molekul yang mempunyai electron bebas tidak berpasangan dilingkaran luarnya. Sumber-sumber radikal bebas yaitu : 1) Radikal bebas terbentuk sebagai produk sampingan dari proses metabolisme; 2) Radikal bebas masuk ke dalam tubuh dalam bentuk racun-racun kimiawi dari makanan, minuman, udara yang terpolusi, dan sinar ultraviolet dari matahari; 3) Radikal bebas diproduksi secara berlebihan pada waktu kita makan berlebihan (berdampak pada proses metabolisme) atau bila kita dalam keadaan stress berlebihan, baik stress secara fisik, psikologis, maupun biologis.

### **2.7 Patofisiologi**

Patofisiologi Penyakit Kanker adalah kelas penyakit beragam yang sangat berbeda dalam hal penyebab dan biologisnya. Setiap organisme, bahkan tumbuhan, bisa terkena kanker. Hampir semua kanker yang dikenal muncul secara bertahap, saat kecacatan bertumpuk di dalam sel kanker dan sel anak-anaknya (lihat bagian mekanisme untuk jenis cacat yang umum).

Setiap hal yang bereplikasi memiliki kemungkinan cacat (mutasi). Kecuali jika pencegahan dan perbaikan kecatatan ditangani dengan baik, kecacatan itu akan tetap ada, dan mungkin diwariskan ke sel anak/(daughter cell). Biasanya, tubuh melakukan penjagaan terhadap kanker dengan berbagai metoda, seperti apoptosis, molekul pembantu (beberapa polimerase DNA), penuaan/(senescence), dan lain-lain. Namun, metoda koreksi-kecatatan ini sering kali gagal, terutama di dalam lingkungan yang membuat kecatatan lebih mungkin untuk muncul dan menyebar. Sebagai contohnya, lingkungan tersebut mengandung bahan-bahan yang merusak, disebut

dengan bahan karsinogen, cedera berkala (fisik, panas, dan lain-lain), atau lingkungan yang membuat sel tidak mungkin bertahan, seperti hipoksia. Karena itu, kanker adalah penyakit progresif, dan berbagai kecacatan progresif ini perlahan berakumulasi hingga sel mulai bertindak berkebalikan dengan fungsi seharusnya di dalam organisme. Kecacatan sel, sebagai penyebab kanker, biasanya bisa memperkuat dirinya sendiri (self-amplifying), pada akhirnya akan berlipat ganda secara eksponensial. Sebagai contohnya :

- Mutasi dalam perlengkapan perbaikan-kecacatan bisa menyebabkan sel dan sel anangnya mengakumulasi kecacatan dengan lebih cepat.
- Mutasi dalam perlengkapan pembuat sinyal (endokrin) bisa mengirimkan sinyal penyebab-kecacatan kepada sel di sekitarnya.
- Mutasi bisa menyebabkan sel menjadi neoplastik, membuat sel bermigrasi dan merusak sel yang lebih sehat.
- Mutasi bisa menyebabkan sel menjadi kekal (immortal), lihat telomeres, membuat sel rusak bisa membuat sel sehat rusak selamanya.

*The six hallmark of cancer* ( 6 Karakter sel kanker) (Pecorino, 2005) adalah sebagai berikut :

1. *Growth signal autonomy:*

- Sel normal memerlukan sinyal eksternal untuk pertumbuhan dan pembelahannya
- Sel kanker mampu memproduksi growth factors dan growth factor receptors sendiri.

- Dalam proliferasinya sel kanker tidak tergantung pada sinyal pertumbuhan normal.
- Mutasi yang dimilikinya memungkinkan sel kanker untuk memperpendek *Growth Factor pathways* .

2. *Evasion Growth inhibitory signals* :

- Sel normal merespon sinyal penghambatan pertumbuhan untuk mencapai homeostasis. Jadi ada waktu tertentu bagi sel normal untuk proliferasi dan istirahat.
- Sel kanker tidak mengenal dan tidak merespon sinyal penghambatan pertumbuhan.
- Keadaan ini banyak disebabkan adanya mutasi pada beberapa gen pada sel kanker.

3. *Evasion of Apoptosis Signals* :

- Sel normal akan dikurangi jumlahnya dengan mekanisme apoptosis, bila ada kerusakan DNA yang tidak bisa lagi direparasi.
- Sel kanker tidak peka terhadap sinyal apoptosis (padahal sel kanker membawa akumulative DNA error yang sifatnya irreversible)
- Kegagalan sel kanker dalam merespon sinyal apoptosis lebih disebabkan karena mutasinya gen-gen regulator apoptosis dan gen-gen sinyal apoptosis.

4. *Unlimited replicative potential* :

- Sel normal mengenal dan mampu menghentikan pembelahan selnya bila sudah mencapai jumlah tertentu dan mencapai pendewasaan. Penghitungan jumlah sel

ini ditentukan oleh pemendekan telomere pada kromosom yang akan berlangsung setiap ada replikasi DNA.

- Sel kanker memiliki mekanisme tertentu untuk tetap menjaga telomere tetap panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri.
- Kecacatan dalam regulasi pemendekan telomere inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki unlimited replicative potential.

5. *Angiogenesis (formation of blood vessels)* :

- Sel normal memiliki ketergantungan terhadap pembuluh darah untuk mendapatkan suplai oksigen dan nutrient yang diperlukan untuk hidup. Namun, arsitektur pembuluh darah sel normal lebih seherhana atau konstan sampai dengan sel itu dewasa.
- Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah baru ini diperlukan untuk survival sel kanker dan ekspansi ke bagian lain dari tubuh (metastase).

6. *Invasion and metastasis* :

- Normal sel memiliki kepatuhan untuk tidak berpindah ke lokasi lain di dalam tubuh.
- Perpindahan sel kanker dari lokasi primernya ke lokasi sekunder atau tertiernya merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker
- Mutasi memungkinkan peningkatan aktivitas enzim-enzim yang terlibat invasi sel kanker (MMPs)

- Mutasi juga memungkinkan berkurangnya atau hilangnya adesi antar sel oleh molekul-molekul adisi sel, meningkatnya attachment, degradasi dan migrasi.

## **2.8 MCF7 dan HepG2 cell line**

MCF-7 adalah model sel kanker payudara manusia dengan reseptor estrogen, progesteron dan glukokortikoid. Sel ini berasal dari efusi pleura dari kanker payudara seorang wanita Kaukasia berusia 69 tahun (adenokarsinoma) pada tahun 1970 oleh Dr Soule dari Michigan Cancer Foundation, Detroit, MI. Sel MCF-7 berguna untuk pengujian kanker payudara *in vitro* karena mereka mempertahankan beberapa karakteristik ideal khusus untuk epitel mammae, seperti pemrosesan estrogen, dalam bentuk estradiol, melalui reseptor estrogen dalam sitoplasma sel, yang merupakan hormon pertama yang merespon garis sel kanker payudara. Sifat uniknya berguna untuk terapi eksperimental. Sel ini juga sensitif terhadap sitokeratin. Ketika tumbuh secara *in vitro*, sel-sel tersebut mampu membentuk kubah dan sel-sel mirip epitel tumbuh dalam lapisan tunggal (Camarillo *et al.*, 2014).

Sel-sel dikultur dalam media campuran 90% RPMI 1640, 10% serum FBS (ATTC, Manassas, VA) dan 1% Penicillin/Streptomycin. Sel-sel ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Untuk elektroporasi, sel dicuci dua kali menggunakan PBS dengan pH 7,4 dan dibiarkan dalam media 199 bebas serum (Invitrogen) selama 24 jam. Sel dipisahkan dari labu inkubasi dengan larutan tripsin/EDTA (ATCC) 0,25%. Hemositometer digunakan untuk mendapatkan konsentrasi akhir 1x10<sup>6</sup> sel/mL. Alikuot 750 L dalam kuvet 0,4 cm digunakan untuk

elektroporasi dengan menambahkan media RPMI 1640 dengan 10% serum janin sapi (Camarillo *et al.*, 2014).

HepG2 adalah garis sel kanker yang terdiri dari sel karsinoma hati manusia, berasal dari jaringan hati pria Kaukasia berusia 15 tahun yang memiliki karsinoma hepatoseluler berdiferensiasi baik, yang merupakan kanker paling umum kelima di seluruh dunia. Garis sel HepG2 umumnya digunakan dalam metabolisme obat dan studi hepatotoksitas. Sel-sel HepG2 menunjukkan morfologi seperti epitel dengan jumlah modal khromosom 55. Sel ini juga non-tumorigenik dan memiliki tingkat proliferasi yang tinggi (Donato *et al.*, 2015).

Sel HepG2 memiliki sifat melekat dan tumbuh sebagai lapisan tunggal dalam agregat kecil. HepG2 dapat tumbuh dengan baik dalam skala besar dan dirangsang dengan hormon pertumbuhan manusia. Sel ini juga mampu mensekresi banyak protein plasma, seperti transferin, fibrinogen, plasminogen dan albumin. Selain itu, sel HepG2 adalah model *in vitro* yang ideal untuk mempelajari dinamika intraseluler dari domain permukaan sel, seperti kanalikuli empedu dan protein membran sinusoidal dan lipid dalam hepatosit manusia. Mempelajari dinamika seperti itu berkontribusi untuk lebih memahami penyakit hati tertentu yang dihasilkan dari distribusi protein permukaan sel yang salah (Donato *et al.*, 2015).

Media sel untuk HepG2 adalah *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) dilengkapi dengan 10% FBS; DMEM dan RPMI1640 juga merupakan alternatif yang bekerja dengan baik. Aspirasi dan tambahkan media kultur segar setiap 2-3 hari. Waktu penggandaan sel HepG2 adalah 48 jam.

- Bilas sel monolayer dengan 1x PBS dua kali dan tambahkan larutan Trypsin-EDTA 0,05% yang telah dipanaskan sebelumnya (37°C) untuk menutupi bagian bawah labu; inkubasi selama 5 – 7 menit.
- Saat sel terlepas, netralkan tripsin dengan menambahkan 4x volume media pertumbuhan lengkap dengan 10% FBS dan suspensikan kembali sel secara perlahan dengan pipet.
- Untuk menghindari penggumpalan, jangan agitasi sel dengan mengocok labu sambil menunggu pelepasan.
- Pisahkan sel 1:4 setiap 3 hari atau 1:8 setiap 6 hari.

Kultur harus diinkubasi pada suhu 37°C pada tekanan atmosfer yang dilembabkan dengan 5% CO<sub>2</sub> (Donato *et al.*, 2015).

## **2.9 Ekstraksi dan Isolasi** (Harborne, 1984; Kristanti dkk., 2008).

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi atau komponen kimia dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi dapat dibedakan berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dan berdasarkan proses pelaksanaan ekstraksi.

Dalam proses ekstraksi padat-cair diperlukan kontak yang sangat lama antara pelarut dan padatan. Oleh karena itu, ekstraksi berkesinambungan biasanya lebih dipilih daripada metode ekstraksi bertahap.

Maserasi adalah suatu contoh metode ekstraksi padat-cair yang bertahap yang dilakukan dengan jalan membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut. Proses perendaman dalam usaha mengekstraksi suatu substansi dari bahan alam ini dapat



dilakukan tanpa pemanasan, dengan pemanasan atau bahkan pada suhu pendidihan. Salah satu keuntungan metode maserasi adalah cepat, terutama jika maserasi dilakukan pada suhu didih pelarut.

Metode ekstraksi padat-cair yang berkesinambungan memerlukan waktu yang lebih lama dalam pelaksanaannya dengan metode ekstraksi bertahap, tetapi metode ini memiliki kelebihan bahwa hasil ekstraksinya biasanya lebih sempurna. Contoh metode ekstraksi berkesinambungan adalah perkolasi atau liksiviasi, soxletasi dan distilasi uap air. Perkolasi adalah suatu metode yang dilakukan dengan jalan melewatkan pelarut secara perlahan-lahan sehingga pelarut tersebut bisa menembus sampel bahan yang biasanya ditampung dalam suatu bahan kertas yang agak tebal dan berpori dan berbentuk seperti kantong atau ditampung dalam kantong yang terbuat dari kertas saring. Soxlet merupakan contoh alat yang sengaja dibuat untuk melakukan ekstraksi padat-cair yang berkesinambungan.

Distilasi adalah suatu proses yang terdiri dari beberapa tahap yaitu mengubah suatu senyawa menjadi bentuk uapnya, mengkondensasikan uap yang terbentuk dan menampung hasil kondensasi (kondensat) ke dalam suatu penampung. Dengan cara ini, maka suatu campuran dengan titik didih yang berbeda dapat dipisahkan. Dengan cara ini pula maka senyawa yang lebih mudah menguap (folatil) dengan mudah dapat dipisahkan dari senyawa yang sukar menguap (tidak folatil). Beberapa macam distilasi yang sering digunakan adalah distilasi sederhana, distilasi fraksi dan distilasi hampa udara.

Metode ekstraksi cairan super kritis menawarkan lebih banyak kelebihan dibandingkan dengan beberapa metode ekstraksi yang konvensional seperti

penggunaan pelarut yang hanya sedikit, selektivitas yang terkontrol dan dapat dihindarinya degradasi termal senyawa-senyawa yang terkandung dalam sampel.

Kromatografi adalah suatu metode fisik untuk pemisahan yang didasarkan atas perbedaan afinitas senyawa-senyawa yang sedang dianalisis terhadap 2 fasa yaitu fasa stasioner/diam dan fasa mobil/gerak. Jadi campuran senyawa-senyawa dapat mengalami adsorpsi dan desorpsi oleh fasa diam secara berturut-turut sehingga secara berurutan fasa gerak juga akan melarutkan senyawa-senyawa tersebut dan proses pemisahan dapat terjadi. Pemisahan dapat juga terjadi karena campuran senyawa memiliki kelarutan yang berbeda di antara dua fasa tersebut.

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) merupakan salah satu metode pemisahan yang memerlukan pembiayaan paling murah dan memakai peralatan paling dasar. Walaupun KLTP dapat memisahkan bahan dalam jumlah gram, sebagian besar pemakaian hanya dalam jumlah miligram. KLTP klasik memiliki beberapa kekurangan. Kekurangan yang utama adalah pengambilan senyawa dari pelat yang dilakukan melalui proses ekstraksi dari adsorben. Jika yang dikerok dari pelat adalah senyawa beracun, maka dapat timbul masalah. Kekurangan yang lain adalah waktu yang diperlukan dalam proses pemisahan yang cukup panjang dan adanya pencemar setelah proses ekstraksi senyawa dari adsorben. Untuk mengatasi beberapa masalah tersebut, beberapa pendekatan yang melibatkan kromatografi sentrifugal telah dicoba.

Kromatografi sentrifugal adalah kromatografi klasik dengan aliran fasa gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Contoh jenis kromatografi ini yang sering dipakai adalah kromatotron.

Kromatografi kolom juga merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Metode ini memungkinkan untuk melakukan pemisahan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat beberapa gram. Pada prinsipnya kromatografi kolom adalah suatu teknik yang pemisahan yang didasarkan pada peristiwa adsorpsi. Pada kromatografi kolom, hal-hal yang paling berperan dalam kesuksesan pemisahan adalah pemilihan adsorben dan eluen/pelarut, dimensi kolom yang digunakan serta kecepatan elusi yang dilakukan.

Kromatografi vakum cair merupakan salah satu kromatografi kolom khusus yang biasanya juga menggunakan silika gel sebagai adsorben. Alat yang digunakan adalah corong Buchner berkaca masir atau kolom pendek dengan diameter yang cukup besar. Berbeda halnya dengan kromatografi kolom yang menggunakan tekanan pada bagian atas kolom untuk meningkatkan laju aliran, pada kromatografi vakum cair, bagian atasnya terbuka sehingga untuk mengotak atik kolom atau untuk penggantian pelarut mudah dilakukan.

Senyawa bahan alam yang berbentuk padat hasil isolasi dari suatu tanaman sering terkontaminasi oleh pengotor meski kadang-kadang hanya dalam jumlah yang relatif kecil. Teknik umum yang sering digunakan untuk pemurnian senyawa tersebut adalah rekristalisasi yang didasarkan pada perbedaan kelarutan dalam keadaan panas atau dingin dalam suatu pelarut. Kualitas kristal yang diperoleh sangat bergantung pada kecepatan proses pendinginan larutan. Cara lain yang juga dipakai untuk pemurnian senyawa adalah metode destilasi.

## **2.10 Mekanisme dan Regulasi Apoptosis (Schlesinger, 2013; Kar, 2015)**

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi. Berbeda dengan nekrosis, yang merupakan bentuk kematian sel sebagai akibat sel yang terluka akut, apoptosis terjadi dalam proses yang diatur sedemikian rupa yang secara umum memberi keuntungan selama siklus kehidupan suatu organisme.

### **Fungsi apoptosis**

- a. Sel yang rusak atau terinfeksi. Apoptosis dapat terjadi secara langsung ketika sel yang rusak tidak bisa diperbaiki lagi atau terinfeksi oleh virus. Keputusan untuk melakukan apoptosis dapat berasal dari sel itu sendiri, dari jaringan di sekitarnya, atau dari sel yang merupakan bagian system imun. Jika kemampuan sel untuk ber-apoptosis rusak atau jika inisiasi apoptosis dihambat, sel yang rusak dapat terus membelah tanpa batas, berkembang menjadi kanker.
- b. Respon terhadap stress atau kerusakan DNA. Kondisi stress sebagaimana kerusakan DNA sel yang disebabkan senyawa toksik atau pemaparan sinar ultraviolet atau radiasi ionisasi (sinar gamma atau sinar X), dapat menginduksi sel untuk memulai proses apoptosis. Contohnya pada kerusakan genom dalam inti sel, adanya enzim PARP-1 memacu terjadinya apoptosis. Enzim ini memiliki peranan penting dalam menjaga integritas genom, tetapi aktivasinya secara berlebihan dapat menghabiskan ATP, sehingga dapat mengubah proses kematian sel menjadi nekrosis (kematian sel yang tidak terprogram).
- c. Homeostasis, adalah suatu keadaan keseimbangan dalam tubuh organisme yang dibutuhkan organisme hidup untuk menjaga keadaan internalnya dalam batas

tertentu. Homeostasis tercapai saat tingkat mitosis (proliferasi) dalam jaringan seimbang dengan kematian sel. Jika keseimbangan ini terganggu dapat terjadi :

- 1) sel membelah lebih cepat dari sel mati.
- 2) sel membelah lebih lambat dari sel mati.

### **Mekanisme apoptosis**

Mekanisme apoptosis sangat kompleks dan rumit. Secara garis besarnya apoptosis dibagi menjadi 4 tahap, yaitu :

1. Adanya signal kematian (penginduksi apoptosis).
2. Tahap integrasi atau pengaturan (transduksi signal, induksi gen apoptosis yang berhubungan, dll)
3. Tahap pelaksanaan apoptosis (degradasi DNA, pembongkaran sel, dll)
4. Fagositosis.

### **Signal Penginduksi Apoptosis**

Apoptosis tidak memerlukan suatu proses transkripsi atau translasi. *Molecular machine* yang dibutuhkan untuk kematian sel dianggap mengalami dormansi dan hanya memerlukan aktivasi yang cepat. Signal yang menginduksi apoptosis bias berasal dari ekstraseluler dan intraseluler. Signal ekstraseluler contohnya hormon. Hormon tiroksin menginduksi apoptosis pada ekor tadpole.

Apoptosis juga bisa dipicu oleh kurangnya signal yang dibutuhkan sel untuk bertahan hidup seperti growth factor, signal intraseluler misalnya radiasi ionisasi, kerusakan karena oksidasi radikal bebas, dan gangguan pada siklus sel. Kedua jalur penginduksi tersebut bertemu di dalam sel, berubah menjadi family protein pengeksekusi utama yang dikenal sebagai caspase. Sel yang berbeda memberikan

respon yang berbeda terhadap penginduksi apoptosis. Misalnya sel splenic limfosit akan mengalami apoptosis saat terpapar radiasi ionisasi, sedangkan sel myocyte tidak mengalami apoptosis untuk pemaparan yang sama.

#### Regulator Molekuler dari Apoptosis

Signal kematian dihubungkan dengan pelaksanaan apoptosis oleh tahap integrasi atau pengaturan. Pada tahap ini terdapat molekul regulator positif atau negatif yang dapat menghambat, memacu, mencegah apoptosis sehingga menentukan apakah sel tetap hidup atau mengalami apoptosis (mati).

Apoptosis diperantarai oleh famili protease yang disebut caspase, yang diaktifkan melalui proteolisis dari bentuk prekursor inaktifnya (zymogen). Caspase merupakan endoprotease yang memiliki sisi aktif Cys (C) dan membelah pada terminal C pada residu Asp, oleh karena itu dikenal sebagai Caspases (Cys containing Asp specific protease).

Saat ini telah ditemukan 13 anggota famili caspases pada manusia. Beberapa anggota famili caspase yang terlibat dalam apoptosis dibedakan menjadi 2 golongan. Golongan yang pertama terdiri dari caspase 8, 9,10 yang mengandung prodomain yang panjang pada terminal N, fungsinya sebagai inisiator dalam proses kematian sel. Golongan yang kedua terdiri dari caspase 3, 6, 7 yang mengandung prodomain yang pendek dan berfungsi sebagai efektor, membelah berbagai substrat yang mati yang pada akhirnya menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia yang tampak pada sel yang mengalami apoptosis.

Molekul efektor lain dalam apoptosis adalah Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) bersama sitokrom c mengambil procaspase 9 di ATP-dependent manner, dan menstimulasi proses perubahan procaspase 9 menjadi caspase 9.

Regulator apoptosis yang lain adalah anggota famili Bcl-2. Saat ini ada 18 anggota famili Bcl-2 yang telah diidentifikasi, dan dibagi ke dalam 3 grup berdasarkan strukturnya. Anggota grup pertama diwakili oleh Bcl-2 dan Bcl-xL yang berfungsi sebagai anti-apoptosis. Anggota grup kedua diwakili oleh Bax dan Bak (*Bcl-2 associated killer*), sebagaimana anggota grup yang ketiga yaitu Bid (*a novel BH3 domain-only death agonist*) dan Bad (*the Bcl-2 associated death molecule*), merupakan molekul pro-apoptosis.

ICE (*Interleukin Converting Enzim*) secara normal tidak terlibat dalam apoptosis, tetapi aktivasi tiruannya dalam sel mamalia, dapat mendorong ke arah tersebut. Masing-masing caspase mempunyai urutan yang sama, dirancang untuk membelah, maka menjadi jelas caspase membelah satu sama lain dalam suatu jalur mekanisme pengaktifan.

Dua rangkaian caspase saling melibatkan. Yang satunya menginisiasi proses aktivasi caspase lainnya. Pertanyaannya siapa yang mengaktifkan caspase yang pertama? Tampak meragukan, sampai peneliti menemukan bahwa caspase dapat diaktifkan jika mereka mengumpul pada konsentrasi kritik. Ini bisa terjadi oleh ikatan molekul signal bunuh diri di permukaan sel. Perubahan konformasi reseptor dapat mendorong ke arah agregasi dari molekul reseptor permukaan dengan serentak dengan agregasi caspases intraseluler reseptor agregasi.

Tahap Pelaksanaan Apoptosis

Sinyal apoptosis bisa terjadi secara intraseluler dan ekstraseluler. Jalur ekstrinsik (ekstraseluler) diinisiasi melalui stimulasi dari reseptor kematian (*death receptor*) sedangkan jalur intrinsik diinisiasi melalui pelepasan faktor signal dari mitokondria dalam sel.

Peristiwa apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari adanya pelepasan molekul signal yang disebut ligan oleh sel lain tetapi bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis. Ligan tersebut berikatan dengan death receptor yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. Death receptor yang terletak di permukaan sel adalah famili reseptor TNF (Tumor Necrosis Factor), yang meliputi TNF-R1, CD 95 (Fas), dan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligan (TRAIL)-R1 dan R2.

Ligan yang berikatan dengan reseptor tersebut akan mengakibatkan caspase inisiator 8 setelah membentuk trimer dengan adaptor FADD (*Fas Associated Death Domain*). Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan FADD disebut DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). CD 95, TRAIL-R1 dan R2 terikat dengan FADD, sedangkan TNF-R1 terikat secara tidak langsung melalui molekul adaptor lain, yaitu TNF-Reseptor Associated Death Domain protein (TRADD).

Stress mitokondria yang menginduksi apoptosis jalur intrinsik disebabkan oleh senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan, sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembrane mitokondria. Protein caspase-8 akan memotong anggota famili Bcl-2 yaitu Bid. Kemudian Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul proapoptotik seperti sitokrom



c, Smc/Diablo, Apoptosis Inducing Factor (AIF), dan omi/Htr2. dengan adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom c, APAF1 dan caspase 9 yang disebut apoptosom. Selanjutnya, caspase 9 akan mengaktifkan downstream procaspase-3.

Protein caspase 3 yang aktif memecah berbagai macam substrat, diantaranya enzim DNA repair seperti poly-ADP Ribose Polymerase (PARP) dan DNA protein kinase yaitu protein struktural seluler dan nukleus, termasuk aparatus mitotik inti, lamina nukleus, dan aktin serta endonuklease, seperti *Caspase-Aktivated Deoxyribonuklease Inhibitor* (ICAD) dan konstituen seluler lainnya. Selain itu, caspase 3 juga mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya, seperti procaspase-6 dan procaspase-7 yang memberikan amplifikasi terhadap kerusakan seluler.

Adanya seluler stres meningkatkan ekspresi dari protein p53 yang mengakibatkan terjadinya G1 arrest atau apoptosis. Anggota dari apoptosis Stimulating Protein p53 (ASPP) yaitu ASPP 1 dan ASPP 2 secara spesifik menstimulasi fungsi transaktivasi p53 pada promotor gen proapoptotik seperti Bax dan p53 Inducible Gene 3 (PIG 3), tapi tidak pada promotor gen yang menyebabkan cell cycle arrest, yaitu p21 dan MDM2.

#### Tahap Fagositosis

Sel yang terfragmentasi menjadi *apoptotic body* mengeluarkan signal “eat me” yang dikenali oleh fagosit. Ada 2 macam fagosit, yaitu :

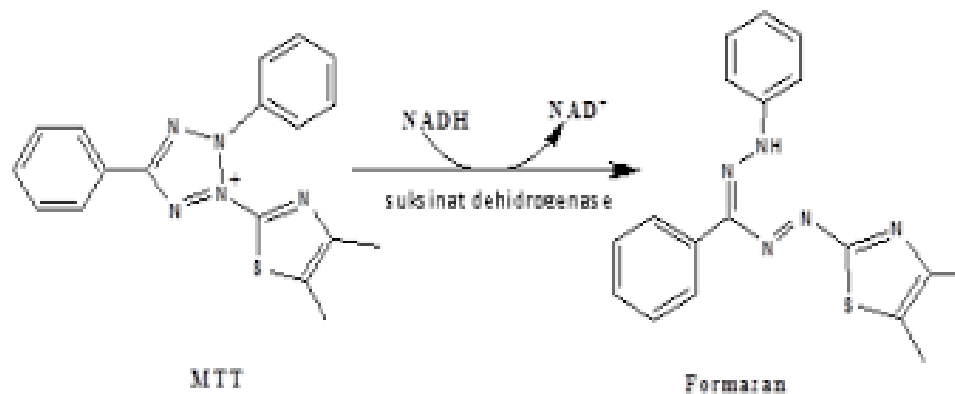
- Fagosit professional, contohnya sel makrofag.
- Fagosit semiprofesional, sel tetangga dari sel yang mengalami apoptosis.

Adanya sel-sel fagosit ini dapat menjamin tidak timbulnya respon inflamasi setelah terjadinya apoptosis.

Sel fagosit juga harus dihilangkan setelah aktif bekerja. Sel imun aktif mulai mengekspresikan Fas beberapa hari setelah aktivasi, mentargetkannya untuk eliminasi. Beberapa sel yang stress dapat mengekspresikan Fas dan FasL lalu digunakan untuk bunuh diri. Akan tetapi sebagian besar hanya dapat mengekspresikan Fas, sedangkan FasL diekspresikan terutama oleh sel T aktif.

### **2.11 Uji *Microtetrazolium* (MTT) (Doyle and Griffihts, 2000).**

Metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (trypan blue) dan metode MTT. Uji MTT *assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Metode ini merupakan metode kolorimetrik dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan *ELISA reader*



Gambar 2.5 Prinsip Uji Sitotoksik Menggunakan Metode MTT assay

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC50. Nilai IC50 menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC50 dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC50 maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi % sel yang mampu bertahan dihidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik.

## 2.12 Spektroskopi LC-MS/MS (Suhartati, 2117; Williams, 2009)

*Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)* merupakan salah satu teknik analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* dengan kemampuan analisis massa (spektrometri massa). *Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-*

MS/MS) merupakan teknik yang digunakan untuk banyak aplikasi yang memiliki sensitifitas tinggi dan selektivitas. Suatu campuran senyawa akan dipisahkan dengan *liquid chromatography* (LC) kemudian diidentifikasi dan diukur dengan spektrometri massa.

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen – komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat.

### ***High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

HPLC merupakan metode pemisahan yang dikembangkan dari asas proses pemisahan adsorpsi dan partisi ke arah yang lebih luas yaitu proses pemisahan yang berdasarkan afinitas, filtrasi gel, dan ion yang berpasangan yang prosesnya tetap dilaksanakan di dalam kolom yang disertai pemakaian pelarut dengan tekanan tinggi. Dasar pemisahan HPLC adalah perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen sampel yang terjadi karena adanya perbedaan kesetimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak untuk senyawa-senyawa yang berbeda.

Prinsip kerja HPLC yaitu pemisahan komponen-komponen sampel dengan cara melewatkan sampel pada suatu kolom, yang selanjutnya dilakukan pengukuran

kadar masing-masing komponen-komponen tersebut dengan suatu detektor. Kerja detektor bermacam-macam, tetapi pada dasarnya membandingkan respon dari komponen sampel dengan respon dari larutan standar. Untuk analisis dengan HPLC diperlukan standar dengan tingkat kemurnian yang tinggi, biasanya disebut HPLC grade. Demikian pula dengan fase geraknya. Komponen HPLC terdiri dari: tandon (reservoir) cairan fase gerak, pompa, sistem injeksi, kolom, detektor dan komputer/integrator untuk pengolahan data.

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut.

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik atau dengan cara gradien. Elusi isokratik adalah sistem elusi yang dilakukan dengan satu macam atau lebih fase gerak dengan perbandingan tetap. Sedangkan elusi gradien adalah sistem elusi yang dilakukan dengan campuran fase gerak yang perbandingannya berubah-ubah dalam waktu tertentu (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi).

### ***Mass Spectrometer (MS)***

MS adalah instrumen yang menyusun molekul gas (ion) berdasarkan massanya. Ada beberapa jenis MS, tetapi semuanya harus memiliki komponen yang berfungsi:

- a. mengionisasi sampel;
- b. mengakselerasi ion di daerah listrik;
- c. mengdispersi ion sesuai massanya;
- d. mendeteksi ion untuk menghasilkan sinyal listrik yang sesuai.

MS tergantung pada aliran ion gas yang melewati daerah listrik dan medan magnet sampai ke detektor untuk dievakuasi. Tekanan dalam proses ionisasi tidak lebih dari  $10^{-3}$  Pa (sekitar  $10^{-5}$  torr). Hal ini membutuhkan pemompaan ion yang efisien dan berkelanjutan, selanjutnya ion ditangkap oleh nitrogen cair. Spektrometri massa bekerja dengan mengionisasi atom-atom atau molekul-molekul, kemudian menyeleksi dan mendeteksi ion-ion berdasarkan perbandingan massa terhadap muatannya. Komponen-komponen yang utama dalam proses ini adalah sumber ion untuk menghasilkan ion-ion dan penganalisis massa untuk menyeleksi ion-ion. Untuk massa dari ion yang akan ditentukan, ion tersebut harus melalui penganalisis massa untuk ke detektor.

Penghubung (interface) antara kromatografi cair dan spektrometri massa merupakan bagian yang sangat vital. Alat penghubung (interface) menggunakan teknik ionisasi dengan tekanan atmosfer API (*Atmospheric Pressure Ionization*).

Pengenalan tentang teknik ionisasi dengan tekanan atmosfer sangat memperluas jumlah dari campuran yang dapat dianalisis dengan LC/MS dengan sukses. Secara umum, teknik API yang digunakan adalah ESI (*Electrospray Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dan APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*). Secara umum, ESI (*Electrospray Ionization*) lebih disukai untuk campuran yang bersifat ion atau sangat polar, tidak stabil terhadap suhu tinggi atau yang memiliki berat molekul lebih dari 100. APCI dan APPI lebih cocok digunakan untuk campuran yang bersifat kurang polar.

Penganalisis massa atau mass analyzer memisahkan ion-ion berdasarkan pada perbandingan massa terhadap muatannya. Proses penyeleksian memiliki perbedaan tergantung pada jenis spektrometri massanya yaitu triple quadrupole, ion trap dan time of flight. Triple quadrupole merupakan jenis analisis massa yang menggunakan osilasi medan listrik yang digunakan untuk menyeleksi ion yang stabil atau tidak stabil yang melewati radio frequency (RF) quadrupole. Triple quadrupole merupakan jenis analisis massa yang terdiri dari dua pasang batang yang mana arus searah (DC) dan radio frequency (RF) diterapkan. Triple quadrupole memiliki tiga spektrometer massa quadrupole. Quadrupole pertama bertindak sebagai mass filter, yang mengirimkan ion masuk ke quadrupole kedua. Quadrupole kedua terdapat tempat terjadinya tumbukan dimana ion mengalami pemecahan. Quadrupole ketiga juga bertindak sebagai mass filter, yang mengirimkan ion hasil pemecahan ke detektor. Quadrupole mass filter dapat dioperasikan dalam mode scan atau SIM (*Select Ion Monitoring*). *Ion trap* (perangkap ion) merupakan sebuah perangkap ion tunggal yang

berfungsi sebagai penganalisis. Pada perangkat ion, ion yang terpilih dikeluarkan dari perangkat dan masuk ke dalam detektor. Analisis massa dan pemecahan terjadi di ruang yang sama. *Time of flight* (TOF) merupakan jenis penganalisis massa yang mempunyai rentang massa yang luas atau lebar dan pengukuran untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang tidak dikenal dapat dilakukan dengan sangat akurat dan dapat memisahkan campuran yang berbeda dengan nilai massa yang sama.

### **2.13. Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)** (Williams, 2009; Jenie, 2014)

Fenomena NMR pertama kali diamati pada tahun 1946 dan metode ini telah banyak diterapkan dalam kimia organik sejak sekitar tahun 1960. Metode ini telah berkembang terus dalam hal kekuatan dan fleksibilitasnya sejak tahun 1970-an dengan diperkenalkannya spektroskopi NMR *superconducting magnets* dan *Fourier Transform* (FT) secara berkala. Metode ini menjadi sangat cepat berkembang menjadi suatu disiplin ilmu yang terpisah secara mandiri, tetapi metode NMR masih dapat diterapkan pada sebagian besar masalah penentuan struktur tanpa bantuan seorang ahli.

Spektroskopi NMR mengandung muatan listrik yang pejal dan rumit, dimana kita harus menentukan elemen dasar. Kita harus ingat bahwa kita berhubungan dengan *intense magnetic field* (medan magnet yang kuat) yang dibutuhkan sangat besar, suplai tenaga dengan kontrol yang teliti, dan ketelitian kontrol frekuensi.



Pada tahun 1924, Pauli menduga bahwa inti atom mempunyai sifat spin dan momen magnetik. Bila inti diletakan dalam medan magnet, tingkat-tingkat energinya akan terurai. Bloch dan Purcell menunjukkan bahwa inti mengabsorpsi radiasi elektromagnetik pada medan magnet yang lebih kuat karena tingkat energi menginduksi gaya magnet.

Setiap inti dikelilingi oleh awan elektron yang selalu bergerak pada pengaruh medan magnet, elektron ini dipaksa bersirkulasi sedemikian rupa dalam usaha melawan medan magnet ini. Akibatnya, ini seakan-akan mendapat efek perlindungan (*shielding*) terhadap medan magnet luar. Dengan kata lain kuat medan atau frekuensi medan magnet harus ditambah agar inti dapat mengalami resonansi. Caranya yaitu dengan mengatur medan magnet melalui aliran arus searah yang akan menghasilkan sapuan (*sweeping*) pada periode yang sempit. Banyaknya medan yang ditambahkan dapat dikonversikan menjadi frekuensinya yang ekuivalen.

Nilai pergeseran kimia tergantung pada lingkungan kimia suatu proton, sedang lingkungan kimia suatu proton tergantung pada besar kecilnya efek perlindungan oleh elektron-elektron di lingkungan proton tersebut. Pergeseran kimia diukur dalam besaran medan atau frekuensi. Perbandingan perubahan frekuensi yang diperlukan terhadap frekuensi standar, dinyatakan dalam  $\delta$  ppm. Standar yang digunakan adalah zat yang protonnya mempunyai perlindungan sebesar mungkin untuk memudahkan perbandingan.

Makin besar nilai  $\delta$ , makin besar medan yang diperlukan untuk mengkompensasinya agar terjadi resonansi. Harga  $\delta$  dipengaruhi juga, diantaranya pelarut dan adanya jembatan hydrogen. Pergeseran kimia digunakan untuk identifikasi gugus fungsi dan dapat digunakan sebagai penolong untuk menentukan letak suatu gugus dalam penentuan stuktur molekul.

### **Spektrum H-NMR**

Spektroskopi NMR proton merupakan sarana untuk menentukan stuktur senyawa organik dengan mengukur momen magnet atom hidrogen. Pada kebanyakan senyawa, atom hidrogen terikat pada gugus yang berlainan ( seperti  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3-$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CHOH}-$  ) dan spektum NMR proton merupakan rekaman sejumlah atom hidrogen yang berada dalam lingkungan yang berlainan. Spektrum ini tidak dapat memberikan keterangan langsung mengenai sifat kerangka karbon molekul sehingga diperlukan spektrum NMR C-13.

Larutan cuplikan dalam dalam pelarut ditempatkan diantara kutub magnet yang kuat, dan proton mengalami pergeseran kimia yang berlainan sesuai dengan lingkungan molekulnya di dalam molekul. Ini diukur dalam radar NMR, biasanya tetrametilsilan (TMS), yaitu senyawa lembam yang ditambahkan ke dalam larutan cuplikan tanpa ada kemungkinan terjadinya reaksi kimia. Adapun pelarut yang biasanya digunakan yaitu karbontetraklorida, deuterokloroform, deuteriumoksida, deuterioaseton, atau dimetilsulfoksida terdeuterasi.

Spektroskopi NMR dapat digunakan sebagai alat sidik jari dan juga memberikan keterangan tentang jumlah setiap tipe hidrogen, juga memberikan keterangan tentang sifat lingkungan dari setiap atom hidrogen tersebut. Kegunaan yang besar dari resonansi magnet inti adalah karena tidak setiap proton dalam molekul beresonansi pada frekuensi yang identik sama. Hal ini disebabkan oleh kenyataan bahwa berbagai proton dalam molekul dikelilingi elektron dan menunjukkan sedikit perbedaan lingkungan elektronik dari satu proton ke proton lainnya. Proton-proton dilindungi oleh elektron-elektron disekelilingnya.

Spectrum NMR tidak hanya dapat membedakan beberapa banyak proton yang berbeda dalam molekul, tetapi ia juga mengungkapkan berapa banyak setiap tipe proton berbeda yang terkandung dalam molekulnya.

Langkah-langkah menginterpretasikan spektra NMR :

- jumlah sinyal, yang menerangkan tentang adanya beberapa macam perbedaan dari proton-proton yang terdapat dalam molekul
- kedudukan sinyal, yang menerangkan sesuatu tentang lingkungan elektronik dari setiap macam proton.
- intensitas sinyal, yang menerangkan tentang berapa banyak proton dari setiap macam proton yang ada.
- pemecahan (*splinting*) dari sebuah sinyal menjadi beberapa puncak, yang menerangkan tentang lingkungan dari sebuah proton dengan lainnya.

Pada spektrum H-NMR dalam elusidasi struktur perlu diperhatikan :

- Luas di bawah puncak yang biasanya dinyatakan dengan integrasi untuk melihat perbandingan jumlah proton pada masing-masing puncak.
- Terjadinya spin-spin splitting yang mengikuti segitiga pascal. Interaksi antara ikatan elektron yang mempunyai kencerungan berpasangan spin dari elektron dengan elektron lainnya pada proton yang berdekatan.
- Pergeseran kimia (chemical shift), yaitu kedudukan proton dalam spektrum tersebut.

### **Spektrum C-NMR**

Sinyal dari atom C<sup>13</sup> dalam alat NMR dapat dideteksi karena adanya sejumlah kecil atom karbon C-13 bersama-sama C-12. Momen magnet yang dihasilkan oleh C-13 lebih kecil, bila dibandingkan dengan momen magnet proton, berarti sinyalnya jauh lebih lemah.

Pelarut yang biasanya digunakan serupa dengan NMR proton, tetapi jangka resonansi C jauh lebih besar sehingga spektrum NMR-<sup>13</sup>C jauh lebih teresolusi. Umumnya setiap karbon dalam molekul dapat ditetapkan sinyalnya. Sama halnya seperti pada NMR proton, atom karbon penyulihannya berlainan akan menunjukkan geseran dalam jangka yang khas. Spectrum NMR <sup>13</sup>C pada hakikatnya merupakan pelengkap NMR proton.

Pada spektrum C-NMR dalam elusidasi struktur perlu diperhatikan :

- Luas di bawah puncak yang biasanya dinyatakan dengan integrasi untuk melihat perbandingan jumlah carbon yang ekuivalen secara magnetic pada masing-masing puncak.
- Terjadinya spin-spin splinting yang mengikuti segitiga pascal. Interaksi antara ikatan elektron yang mempunyai kencerungan berpasangan spin dari elektron dengan elektron lainnya pada proton yang diikat. Spin-spin splinting ini sering dihilangkan dengan cara di dekloping guna menghindari puncak-puncak yang tumpang tindih.
- Geseran kimia (*chemical shift*), yaitu kedudukan karbon dalam spektum tersebut juga menggambarkan letak dan kedudukan karbon dalam molekul.

#### **2.14 Penambatan Molekul (*Molecular Docking*) (Mukesh and Kumar, 2011)**

Dalam bidang pemodelan molekul, docking adalah metode untuk memprediksi orientasi yang lebih diutamakan dari suatu molekul ketika terikat satu sama lain untuk membentuk kompleks yang stabil. Informasi tentang orientasi ini dapat digunakan untuk memprediksi kekuatan hubungan atau afinitas ikatan antara dua molekul yang digunakan, misalnya fungsi penilaian.

Penambatan molekul adalah penggunaan komputer dalam memasang suatu molekul kecil pada reseptor (bagian ini sering didefinisikan sebagai sisi aktif dari enzim/protein) melalui representasi yang dihasilkan komputer. Suatu molekul dengan kelengkapan yang baik mengindikasikan bahwa molekul tersebut potensial sebagai pengikat yang baik. Hasil dari penambatan secara normal termasuk berbagai prediksi

afinitas molekul, yang meliputi ranking dari senyawa yang ditambahkan berdasarkan pada afinitasnya.

Interaksi obat dan reseptor adalah masalah kompleks. Banyak kekuatan yang terlibat dalam intermolekul yang tergabung diantaranya : hidrofobik, dispersi atau *Van der Waals*, ikatan hidrogen, dan elektrostatik. Kekuatan utama dalam pengikatan, nampak seperti interaksi hidrofobik, tetapi secara spesifik ikatan tersebut nampak seperti dikendalikan oleh ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik. Interaksi pemodelan intermolekul dalam suatu ligan-protein kompleks sangat sulit karena terdapat banyak derajat kebebasan dan pengetahuan yang tidak cukup dari efek pelarut dalam gabungan pengikatan.

Tingkat kesulitan komputasional *docking* meningkat sesuai pada metode berikut :

- a. *Rigid body docking*, dimana antara reseptor dan ligan bersifat kaku.
- b. *Flexible ligand docking*, dimana reseptor bersifat kaku dan ligan bersifat fleksibel atau dapat digerakkan ke segala arah.
- c. *Flexible docking*, dimana fleksibilitas reseptor dan ligan dapat dipertimbangkan.

Pada umumnya prosedur algoritma *docking* yang digunakan adalah model *flexible ligand docking*.

Skoring mengacu pada fakta dimana setiap prosedur *docking* harus dievaluasi dan kedudukan konfigurasi dibentuk oleh proses pencarian. Proses skoring berhubungan erat dengan eksperimen, pada *ab initio* kalkulasi ikatan energi bebas tidak mudah untuk diakses ke dalam komputasi. Sehingga diperkirakan fungsi skoring harus menggunakan model ikatan energi bebas dengan akurasi yang cukup

dan korelasi yang baik dengan eksperimen afinitas ikatan. Secara khusus, fungsi skoring harus dapat membedakan antara mode pengikatan *native* dan *non-native*.

Skoring terdiri dari 3 aspek relevan yang berbeda dalam *docking* dan desain, yaitu :

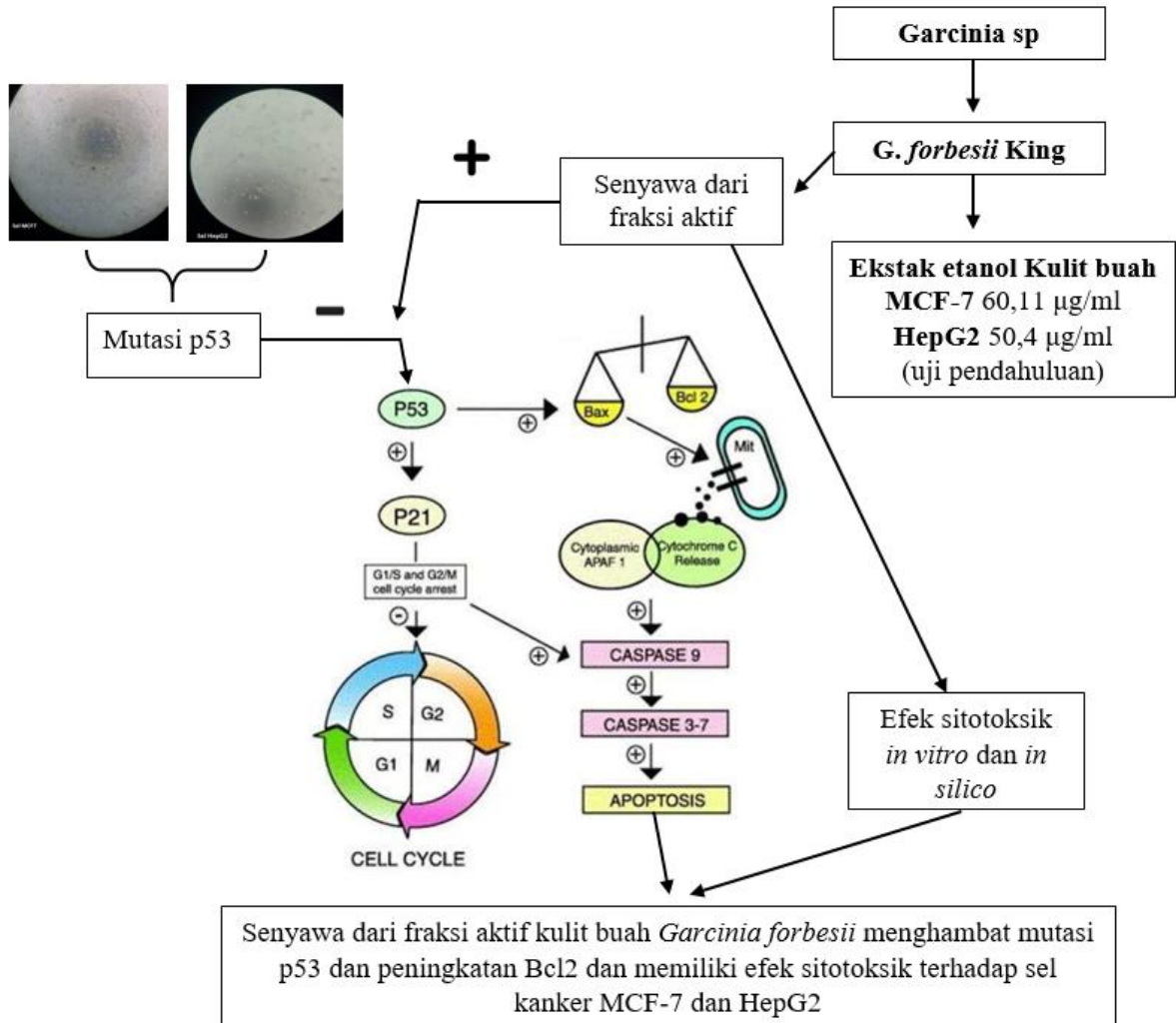
1. Kedudukan konfigurasi dihasilkan oleh pencarian *docking* untuk interaksi ligan dengan protein yang diberikan, aspek ini sangat penting dalam mendeteksi mode pengikatan terbaik dengan memperkirakan situasi secara eksperimen.
2. Kedudukan ligan berbeda terhadap afinitas ikatannya pada protein, hal tersebut memprioritaskan ligan pada afinitasnya, aspek ini sangat penting dalam skringing virtual.
3. Kedudukan satu atau ligan berbeda terhadap afinitas ikatan pada protein yang berbeda, aspek ini penting untuk mempertimbangkan selektifitas dan spesifitasnya.

Pengikatan selektif molekul kecil ligan pada protein spesifik ditentukan oleh factor struktur dan energi. Untuk ligan yang diinginkan dalam farmasi, ikatan ligan-protein biasanya timbul melalui interaksi non kovalen. Secara termodinamika, kekuatan interaksi antara protein dan ligan digambarkan dengan afinitas pengikatan atau energi bebas pengikatan.

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konseptual





Tanaman genus *Garcinia* dari suku Clusiaceae telah banyak diteliti efek sitotoksiknya terhadap sel kanker. Bagian tanaman yang memiliki efek dapat berupa akar, dahan, kulit batang, daun, buah dan kulit buah. Penelitian yang telah dilakukan terhadap genus ini antara lain :

- Efek sitotoksik dari beberapa senyawa golongan xanthon terhadap sel kanker nasofaring CNE1, CNE2, SUNE1 dan HONE1; sel kanker paru A549 dan GLC82; sel kanker payudara MCF-7; dan sel kanker hati Bel-7402 (Xu *et al.*, 2015).
- $\gamma$ -Mangostin dari *G. mangostana* memiliki efek antikanker terhadap sel kanker hati Hep-G2 (Chang *et al.*, 2013).
- Akar dari *Garcinia cowa* (Kaennakam *et al.*, 2015), dimana senyawa 17 dan 22 memperlihatkan efek sitotoksik terhadap sel KB dengan IC<sub>50</sub> 7,97  $\mu$ M dan 9,10  $\mu$ M, dan terhadap sel HeLa dengan IC<sub>50</sub> 9,34  $\mu$ M.
- Akar dan kulit batang dari *Garcinia ovalifolia* (Pieme *et al.*, 2015), menginduksi apoptosis sel HL-60 dengan IC<sub>50</sub> 76  $\mu$ g/mL.
- Kulit batang dari *Garcinia cylindrocarpa* (Sukandar *et al.*, 2015), memperlihatkan efek sitotoksik terhadap sel KB dengan IC<sub>50</sub> 2,36  $\mu$ M.
- Daun dari *Garcinia njuangensis* (Zhang *et al.*, 2016), memperlihatkan penekanan terhadap sel kanker SiHa dan HeLa.
- Buah *Garcinia schomburgkiana* (Le *et al.*, 2016), senyawa 1, 2, 4, 5 dan 9-11 memperlihatkan efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan IC<sub>50</sub> di bawah 10  $\mu$ M.

- Kulit buah dari *Garcinia brasiliensis* (Sales *et al.*, 2015), memperlihatkan efek antikanker terhadap sel glioblastoma dengan  $IC_{50}$   $23,00 \pm 0,32 \mu M$ .
- Tanaman *Garcinia dulcis* (Bakar *et al.*, 2015), bagian kulit buah, daging buah dan biji memperlihatkan efek sitotoksik terhadap sel HepG2 dengan  $IC_{50}$  masing-masing  $46,33 \pm 4,51 \mu M$ ,  $38,33 \pm 3,51 \mu M$ ,  $7,5 \pm 2,52 \mu M$ .
- Buah dari *Garcinia wallichii* (Hongthong *et al.*, 2016), senyawa 4 memperlihatkan efek sitotoksik terhadap beberapa sel kanker dengan  $IC_{50}$  antara  $3,9 \mu M$  hingga  $7,63 \mu M$ .

Tanaman mundar (*Garcinia Forbesii* King) yang juga merupakan bagian dari genus *Garcinia* dari suku Clusiaceae diduga kuat juga mengandung senyawa aktif yang memiliki efek sitotoksik. Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman ini diantaranya adalah telah diisolasi senyawa xanthones, 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone dan forbexanthone dari ranting tanaman ini (Harrison *et al.*, 1993). Penelitian lain menyebutkan dari batang tanaman ini diisolasi rubraxanthone yang memiliki efek antibakteri (Alen *et al.*, 2008).

Apoptosis memiliki peranan penting dalam fenomena biologis, proses apoptosis yang tidak sempurna dapat menyebabkan timbulnya penyakit yang sangat bervariasi. Terlalu banyak apoptosis menyebabkan sel mengalami kekacauan, sebagaimana terlalu sedikit apoptosis juga menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol (kanker). Protein p53 berperan penting pada proses apoptosis, di mana p53 dapat menginduksi apoptosis, penghentian siklus sel, dan penuaan dalam sel (Liu, 2019) Penelitian tentang antikanker menyebutkan bahwa banyak kejadian kanker

dikarenakan adanya mutasi dari protein p53 yang berperan dalam proses apoptosis (Zilfou and Scott, 2009). Selain protein p53, beberapa protein lain juga berperan dalam proses apoptosis, salah satu diantaranya adalah Bcl2. Peningkatan resistensi terhadap proses apoptosis dihubungkan dengan peningkatan protein Bcl2 (Perini *et al.*, 2018), dan keluarga Bcl2 yang berperan sebagai anti apoptosis yaitu Bcl2 dan BclX dapat menghambat proses apoptosis (Willis *et al.*, 2003).

Pada uji pendahuluan terhadap ekstrak etanol kulit buah *Garcinia forbesii* King, didapatkan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> 60,11 µg/mL. Sedangkan terhadap sel kanker hati HepG2, diperoleh nilai IC<sub>50</sub> 50,4 µg/mL. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak etanol kulit buah *Garcinia forbesii* King memiliki efek sitotoksik baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 maupun sel kanker hati HepG2.

Berdasarkan kesamaan genus dengan beberapa *Garcinia* yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker, dan hasil dari uji pendahuluan, maka kiranya perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah mundar tersebut, dan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker hati HepG2 secara *in vitro* dan *in silico*, serta pengaruhnya terhadap protein p53 dan Bcl2.

### **3.2 Hipotesis**

Terdapat senyawa aktif dari kulit buah mundar (*Garcinia Forbesii* King) yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker

hati HepG2 secara *in vitro* dan *in silico*, dan memiliki pengaruh terhadap protein p53 dan Bcl2.

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental fitokimia-biomedik. Penelitian dititik beratkan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung pada kulit buah Mundar (*Garcinia forbesii* King) dan potensinya sebagai antikanker payudara MCF-7 dan kanker hati HepG2, serta pengaruhnya terhadap protein p53 dan Bcl2.

#### **4.2 Variabel Penelitian**

##### 4.2.1 Ekstraksi, Isolasi dan identifikasi

Variabel bebas :

- pelarut organik
- metode ekstraksi, fraksinasi, subfraksinasi dan isolasi
- metode identifikasi

Variabel terikat :

- rendamen dan berat ekstrak, fraksi, subfraksi dan isolat
- penampakan noda KLT
- struktur senyawa aktif

##### 4.2.2 Pengujian IC<sub>50</sub> dan imunositokimia

Variabel bebas

- sel kanker payudara MCF-7
- sel kanker hati HepG2

- protein p53

- protein Bcl2

Variabel terikat

- *Inhibitor Concentration 50* (IC<sub>50</sub>)

- jumlah protein sel p53

- jumlah protein sel Bcl2

#### 4.2.3 Penambatan molekul

Variabel bebas

- Reseptor kanker payudara

- Reseptor kanker hati

Variabel terikat

- Energi ikatan

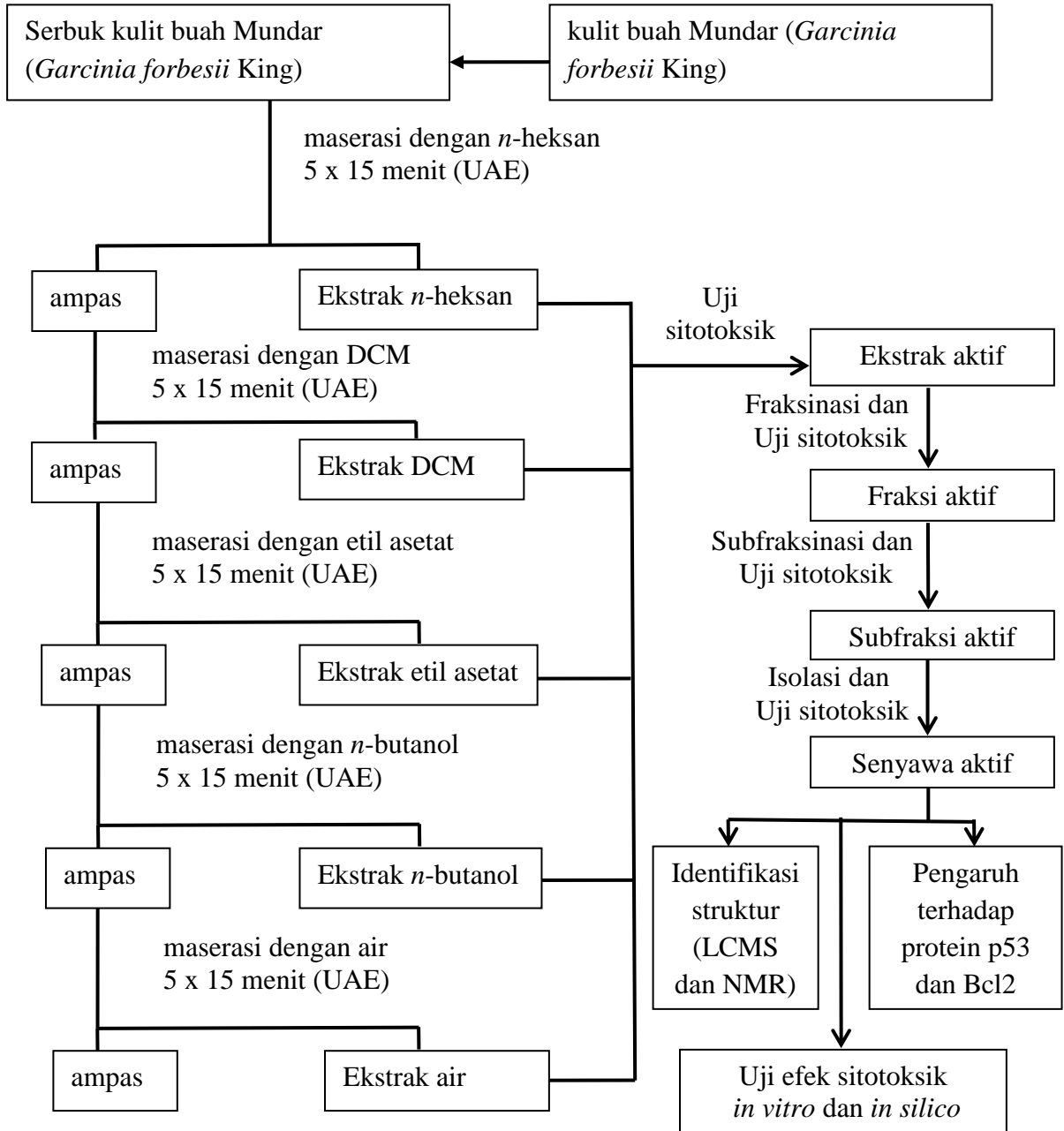
- Konstanta inhibisi

### 4.3 Definisi Operasional

1. Ekstrak *n*-heksan adalah fraksi yang diperoleh dari proses ekstraksi kulit buah Mundar (*Garcinia forbesii* King) menggunakan pelarut *n*-heksan dengan metode maserasi.
2. Ekstrak diklorometana adalah fraksi yang diperoleh dari proses ekstraksi ampas hasil ekstraksi *n*-heksan menggunakan pelarut diklorometana dengan metode maserasi.
3. Ekstrak etil asetat adalah fraksi yang diperoleh dari proses ekstraksi ampas hasil ekstraksi diklorometana menggunakan pelarut etil asetat dengan metode maserasi.

4. Ekstrak *n*-butanol adalah fraksi yang diperoleh dari proses ekstraksi ampas hasil ekstraksi etil asetat menggunakan pelarut *n*-butanol dengan metode maserasi.
5. Ekstrak air adalah fraksi yang diperoleh dari proses ekstraksi ampas hasil ekstraksi *n*-butanol menggunakan pelarut air dengan metode maserasi.
6. Senyawa aktif adalah senyawa murni yang diisolasi dari fraksi aktif yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan atau sel kanker hati HepG2.

#### 4.4 Rancangan Penelitian





#### 4.5 Ekstraksi

Kulit buah Mundar (*Garcinia forbesii* King) yang telah dideterminasi, dibersihkan dan dikeringanginkan, kemudian diserbukkan. Kulit buah yang telah diserbukkan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut *n*-heksan menggunakan alat *ultrasonic-assisted extraction* (UAE) selama 15 menit, dan diulangi beberapa kali dengan penggantian pelarut hingga pelarut terakhir hampir bening, filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak *n*-heksan. Berdasarkan laporan Sholihah dkk. (2017), UAE adalah metode ekstraksi menggunakan bantuan ultrasonik, dengan tujuan meningkatkan hasil dan mempercepat proses ekstraksi.

Ampas yang diperoleh dari sisa maserasi dengan *n*-heksan dimaserasi kembali menggunakan pelarut DCM menggunakan alat UAE selama 15 menit, dan diulangi beberapa kali dengan penggantian pelarut hingga pelarut terakhir hampir bening, filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak DCM.

Ampas yang diperoleh dari sisa maserasi dengan DCM dimaserasi kembali menggunakan pelarut etil asetat menggunakan alat UAE selama 15 menit, dan diulangi beberapa kali dengan penggantian pelarut hingga pelarut terakhir hampir bening, filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak etil asetat.

Ampas yang diperoleh dari sisa maserasi dengan etil asetat dimaserasi kembali menggunakan pelarut *n*-butanol menggunakan alat UAE selama 15 menit, dan diulangi beberapa kali dengan penggantian pelarut hingga pelarut terakhir hampir

bening, filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak *n*-butanol.

Ampas yang diperoleh dari sisa maserasi dengan *n*-butanol dimaserasi kembali menggunakan pelarut air menggunakan alat UAE selama 15 menit, dan diulangi beberapa kali dengan penggantian pelarut hingga pelarut terakhir hampir bening, filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak air.

Ekstrak *n*-heksan, DCM, etil asetat, *n*-butanol dan air masing-masing diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker hati HepG2.

#### **4.6 Pengujian Sitotoksik Metode Microtetrazolium (MTT)**

Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap fraksi *n*-heksan, DCM, etil asetat, *n*-butanol dan air, dan senyawa-senyawa dari hasil isolasi.

Prosedur pengujian sitotoksik metode MTT adalah sebagai berikut (Anonim, 2012) :

1. Ambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, amati kondisi sel. Gunakan kultur sel dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen.
2. Panen sel sesuai dengan protokol panen.
3. Hitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan MK sesuai kebutuhan mengikuti protokol penghitungan sel.
4. Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl. Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen.

5. Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel), untuk kontrol media.
6. Amati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan dokumentasikan.
7. Inkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam (agar sel *attach* kembali setelah panen).
8. Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal. Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan.
9. Setelah sel normal kembali, segera buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel.
10. Ambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>.
11. Buang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, kemudian tekan *plate* secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan.
12. Masukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* seperti no. 11. Tiriskan sisa cairan dengan tisu.
13. Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo).
14. Inkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam (waktu inkubasi total: 24-48 jam).

15. Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan. Semua kelompok perlakuan difoto kecuali kontrol media.
16. Siapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok MTT dalam PBS (50 mg/10ml), encerkan dengan MK ad 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). MTT bersifat karsinogen, Gunakan sarung tangan saat menggunakan reagen MTT.
17. Buang media sel, cuci PBS 1x (seperti pada no. 12), dan tambahkan reagen MTT 100  $\mu$ L ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Inkubasi dilakukan sampai terbentuk formazan.
18. Periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan *stopper* 100  $\mu$ L SDS 10% dalam 0,1 N HCl.
19. Bungkus *plate* dengan kertas atau alumunium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. *Plate* yang telah dibungkus jangan diletakkan di inkubator.
19. Hidupkan ELISA *reader*, tunggu proses *progressing* hingga selesai.
20. Buka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam ELISA *reader*. Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan  $\lambda=550-600$  nm
21. Matikan kembali ELISA *reader*. Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada *log book*. Setiap kali pembacaan di ELISA *reader*, catat di buku catatan pemakaian ELISA *reader*.

22. Buat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi. Konsentrasi sampel tidak dalam log untuk melihat profil sel hidup.
23. Hitung prosentase sel hidup dan analisis harga  $IC_{50}$  dengan Excell (Regresi linear dari log konsentrasi) atau SPSS (Probit/Logit).

#### **4.7 Isolasi**

Isolasi dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat pada fraksi yang memiliki efek sitotoksik pada sel kanker. Metode isolasi yang digunakan antara lain, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis preparatif.

##### 4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Urutan Prosedur Kerja Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- Disiapkan lempeng dengan lapisan fase diam silika gel F<sub>254</sub>, dipotong sesuai kebutuhan dan diaktifkan.
- Dilakukan penotolan larutan zat uji pada lempeng menggunakan pipa kapiler sejumlah volume yang sesuai.
- Dielusi menggunakan eluen yang sesuai
- Deteksi bercak komponen - komponen zat uji
- Bercak dari komponen zat yang berwarna dapat langsung di lihat
- Bercak dari komponen zat yang tidak berwarna, menggunakan penampak bercak lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

##### 4.7.2 Kromatografi Kolom

Ada beberapa tahapan yang perlu dilakukan dalam proses kromatografi kolom yaitu :

- Pemilihan Fase Gerak dan Fase Diam

Pemilihan fasa gerak dan fase diam didasarkan pada kepolaran zat yang akan dipisahkan. Fase diam yang digunakan bersifat polar yaitu silika gel. Sedangkan fase gerak dilakukan variasi kepolaran untuk menghasilkan pemisahan yang paling optimal, digunakan fase gerak dari yang bersifat non polar ke polar.

- *Packing* Kolom

*Packing* kolom dilakukan dengan cara basah, silika gel dicampurkan lebih dulu dengan fase gerak yang digunakan pada wadah terpisah, kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam kolom dengan cara bersamaan.

- Elusi

Proses ini mengalirkan sampel melalui fasa diam pada kolom menggunakan fase gerak dengan kecepatan tetesan  $\pm 10$  tetes/menit dan ditampung tiap 10 menit. Hasil dari elusi akan ditampung pada wadah terpisah.

#### 4.7.3 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

##### Urutan Prosedur Kerja Pada Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

- Disiapkan lempeng dengan lapisan fase diam silika gel RP18, dipotong sesuai kebutuhan dan diaktifkan.
- Dilakukan penotolan larutan zat uji berbentuk pita memanjang pada lempeng menggunakan pipet tetes sejumlah volume yang sesuai.
- Dielusi menggunakan eluen yang sesuai
- Ditandai masing-masing bercak berbentuk pita menggunakan penampak bercak lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm

- Masing-masing bercak dikeruk, dilarutkan dengan pelarut yang sesuai dan diambil bagian yang terlarut, dikeringkan dan dimurnikan menggunakan pelarut yang sesuai
- Dilakukan pengujian isolat menggunakan KLT untuk mengetahui kemurniannya
- Isolat siap untuk diuji lebih lanjut.

#### 4.8 Elusidasi Struktur

Identifikasi senyawa aktif hasil isolasi menggunakan beberapa metode identifikasi yaitu Spektroskopi massa, H-NMR, C-NMR dan HMBC.

##### 4.8.1 Analisis LC-MS/MS

Instrumen dan detail pengerjaan

Kromatografi

- Sistem LC: *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC)
- Kolom : C18 (1.8  $\mu\text{m}$  2.1x100 mm) HSS
- Temperatur : 50 °C (kolom), 25 °C (ruangan)
- Fase gerak : Air + 5 mM Amonium format (A) dan Asetonitril + 0,05% Asam format (B)
- Kecepatan aliran : 0,2 ml/menit, *running* selama 23 menit
- Volume injeksi : 5  $\mu\text{l}$  (disaring melalui *filter* jarum suntik 0,2  $\mu\text{m}$  terlebih dahulu)

Spektroskopi massa

- Sistem : ES (*electrospray ionization*)
- Mode : Mode Positif

- Rentang analisis massa : 50 – 1300 m/z
- Temperatur sumber : 100 °C
- Temperatur desolvasi : 350 °C
- *Cone gas flow* : 0 L/jam
- Aliran gas desolvasi : 793 L/jam
- *Collision energy* : 4 Volt (energi rendah)
- *Rampt Colision energy* : 25 – 50 volt (energi tinggi)

#### 4.8.2 Prosedur analisis proton <sup>1</sup>H-NMR

1. Preparasi sampel dengan cara sampel ±5 mg dilarutkan dalam 0,5 ml pelarut yang sesuai, larutan sampel ditempatkan dalam tabung NMR, tinggi sampel ±4 cm (3,8-4,2 cm).
2. Tabung NMR dimasukkan dalam *spinner*, diukur posisi tabung dengan *gauge*.
3. Tabung dalam *spinner* dimasukkan dalam magnet
4. Nama sampel dimasukkan (nama sampel dan no batch) dan dipilih jenis pelarut yang digunakan yaitu CdCl<sub>3</sub>
5. *Loading* sampel
6. *Spin* sampel (15 Hz)
7. Suhu diaktifkan pada 25°C
8. *Lock on*
9. Buka alat gradien *shim*: *shim Z1-Z6*, rentang 30%-70%, dikalkulasi, *start shimming*.
10. Setelah *shimming* lengkap, diatur pengerjaan untuk sampel, dipilih proton



11. Parameter disesuaikan sebagai berikut: *scan number* 8-16, *X\_sweep* 15
12. Pengerjaan dimulai
13. Dilakukan analisis spektra proton

#### 4.8.3 Prosedur analisis karbon $^{13}\text{C}$ -NMR

1. Preparasi sampel dengan cara sampel  $\pm 5$  mg dilarutkan dalam 0,5 ml pelarut yang sesuai, larutan sampel ditempatkan dalam tabung NMR, tinggi sampel  $\pm 4$  cm (3,8-4,2 cm).
2. Tabung NMR dimasukkan dalam *spinner*, diukur posisi tabung dengan *gauge*.
3. Tabung dalam *spinner* dimasukkan dalam magnet
4. Nama sampel dimasukkan (nama sampel dan no batch) dan dipilih jenis pelarut yang digunakan yaitu  $\text{CdCl}_3$
5. *Loading* sampel
6. *Spin* sampel (15 Hz)
7. Suhu diaktifkan pada  $25^\circ\text{C}$
8. *Lock on*
9. Buka alat gradien *shim*: *shim Z1-Z6*, rentang 30%-70%, dikalkulasi, *start shimming*.
10. Setelah *shimming* lengkap, diatur pengerjaan untuk sampel, dipilih karbon13
11. Parameter disesuaikan sebagai berikut: *scan number* 1000-1200, *X\_sweep* 15

12. Pengerjaan dimulai

13. Dilakukan analisis spektra karbon

#### 4.8.4 Prosedur analisis proton karbon HMBC

1. Preparasi sampel dengan cara sampel  $\pm 5$  mg dilarutkan dalam 0,5 ml pelarut yang sesuai, larutan sampel ditempatkan dalam tabung NMR, tinggi sampel  $\pm 4$  cm (3,8-4,2 cm).
2. Tabung NMR dimasukkan dalam *spinner*, diukur posisi tabung dengan *gauge*.
3. Tabung dalam *spinner* dimasukkan dalam magnet
4. Nama sampel dimasukkan (nama sampel dan no batch) dan dipilih jenis pelarut yang digunakan yaitu  $\text{CdCl}_2$
5. *Loading* sampel
6. *Spin* sampel (15 Hz)
7. Suhu diaktifkan pada  $25^\circ\text{C}$
8. *Lock on*
9. Buka alat gradien *shim*: *shim Z1-Z6*, rentang 30%-70%, dikalkulasi, *start shimming*.
10. Setelah *shimming* lengkap, diatur pengerjaan untuk sampel, dipilih proton karbon<sup>13</sup>
11. Parameter disesuaikan sebagai berikut: *scan number* 2000-2400, *X\_sweep* 15
12. Pengerjaan dimulai

13. Dilakukan analisis spektra proton karbon13

#### **4.9 Molekular Docking**

Analisis *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan *Autodock v4.2.6* dan *Autodock Tools* (<http://autodock.scrips.edu/>), *ChemOffice Pro v15.00* Perkin Elmer, *OpenBabel GUI*, *Discovery Studio Visualizer* dan *Phyton Molecular Viewer* (PMV 1.5.6).

Struktur protein dari masing-masing reseptor yang terdiri dari PDB ID: 3ERT, 2J6M, 1YWN dan 1M17 yang diperoleh dari protein data bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Ligan asli masing-masing reseptor dipisahkan menggunakan PMV 1.5.6, kemudian dihilangkan molekul airnya, dan ditambahkan hidrogen polar. Masing-masing reseptor dan ligan disimpan dengan format (.pdbqt) menggunakan *AutodockTools* dan *OpenBabel GUI* (Morris *et al.*, 2009) (Boyle *et al.*, 2011).

Struktur 2-dimensi senyawa ligan uji dibangun menggunakan *ChemDraw® Pro V15*, kemudian dikonversi kedalam bentuk 3-dimensi menggunakan *Chem3D® Pro v15*. Kemudian ligan uji diminimisasi menggunakan MMFF94 force field yang terdapat pada aplikasi *Chem3D® Pto v15*, kemudian disimpan dalam format .pdb (Wang *et al.*, 2015).

Analisis dan simulasi *molecular docking* dilakukan menggunakan *Autodock 4.2.6* terhadap senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavin terhadap beberapa reseptor dari kanker payudara dan hati. Simulasi *docking* dilakukan menggunakan parameter Lamarckian pada kondisi 0,02 (*mutation rate*), 0,80 (*crossover rate*), 150 (*population*

*size*), 1 (*ilitism*), 2500000 *energy evaluations*. Ukuran *grid box* masing-masing reseptor sebagai berikut 36 x 30 x 40 Å dengan *gridcenter* 30,93 x -1,913 x 24,067 Å untuk PDB ID 3ERT, 32 x 26 x 60 Å dengan *gridcenter* -52,126 x -0,469 x -18,944 Å untuk PDB ID 2J6M, 46 x 52 x 34 Å dengan *gridcenter* -0,42 x 35,735 x 15,793 Å untuk PDB ID 1YWN, dan 54 x 26 x 32 Å dengan *gridcenter* 21,697 x -0,022 x 52,186 Å untuk PDB ID 1M17, ligan diplot pada masing-masing reseptor pada jarak 0,375 Å. Kemudian hasil *docking* di visualisasikan menggunakan program Accelry Discovery Studio Visualizer 4.0 (BIOVA, 2020).

Berdasarkan hasil *docking* dari masing-masing ligan asli, kemudian dibandingkan antara sebelum dan setelah *docking* untuk memverifikasi nilai *root square mean deviation* (RSMD) berdasarkan nilai energi terendah dari atom-atom *backbone* dan interaksinya terhadap sisi aktif dari masing-masing reseptor, hasil *docking* dapat dinyatakan valid jika nilai RSMD lebih kecil dari 2 Å.

#### **4.10 Uji Imunositokimia**

*Paramount Detection Kit* dimaksudkan untuk penggunaan antibody primer tikus dan kelinci untuk mendeteksi keberadaan antigen pada jaringan manusia atau persiapan sel di bawah cahaya mikroskopis. Spesimen yang paling umum digunakan untuk sistem ini adalah: jaringan beku, jaringan paraffin yang tertanam, limfosit yang baru disiapkan dan sel kultur terfiksasi. Peroksidase horseradish (HRP) yang berlabel streptavidin dan sistem amplifikasi antibodi sekunder terbiotinilasi telah menjadi teknik standar dalam pewarnaan imunokimia. *Paramount Detection Kit*

menggunakan antibodi sekunder yang diserap manusia, dibiotinilasi, dan dimurnikan dengan afinitas yang bereaksi dengan antibodi primer yang disuplai pengguna yang terikat pada epitop spesifik antigen dalam jaringan atau sel. Peroksidase horseradish (HRP) yang berlabel streptavidin kemudian bereaksi dengan antibodi sekunder terbiotinilasi untuk membentuk biotin HRP-streptavidin yang kompleks. Kompleks enzim HRP streptavidin mengkatalisasi substrat/kromogen, 3,3'-diaminobenzidine (substrat DAB) atau 3-amino-9-ethylcarbazole (substrat AEC) membentuk endapan berwarna coklat (jika menggunakan DAB) atau endapan berwarna merah (jika menggunakan AEC) pada situs antigen. Kemudian antigen bisa divisualisasikan dibawah mikroskop. Dibandingkan dengan metode tradisional ABC yang menggunakan avidin. *Paramount Detection Kit* mendemonstrasikan kekuatan ikatan yang lebih kuat untuk mengikat biotin dan pewarnaan latar belakang yang tidak terlalu spesifik. Lebih tingginya sensitivitas dan rendahnya latar belakang memberikan *Paramount Detection Kit* tingkat sinyal kebisingan yang tinggi. Ditambah penyangga substrat, konsentrasi DAB dan penghentian peroksidasi.

Reagen	Tata Cara Penggunaan	Waktu Inkubasi (menit)
1. Reagen 1: <i>Paramount Block</i>	a. Gunakan 2 tetes (100 $\mu$ L) atau secukupnya isi dari <i>Paramount Block</i> untuk menutup bagian jaringan dan melindunginya. b. Bilas kacanya dengan air yang mengalir.	10 menit
2. Pra perawatan HIER: mengacu pada antibodi spesifikasi lembaran.	a. <i>Heat Induced Epitope Retrieval</i> (HIER) mungkin diperlukan untuk antibodi primer yang disarankan. b. Cuci dengan PBS 3 kali.	
3. Reagen 2: <i>Paramount</i>	a. Tambahkan 2 tetes atau secukupnya	20 menit

<i>Ostlum Blocker</i>	isi dari reagen <i>Paramount Ostlum Blocker</i> untuk menutup bagian jaringan dan melindunginya secara sempurna. b. Jangan dibilas.	
4. Antibodi primer: Pemeriksa perlu mengoptimalkan waktu pencairan dan perlindungan.	a. Gunakan 2 tetes atau secukupnya isi dari antibodi primer untuk menutup bagian jaringan secara sempurna. Melindungi dengan menggunakan protokol yang sudah direkomendasikan oleh pabrik. b. Bilas dengan PBS 3 kali.	30-60 menit
5. Reagen 3: Bersiap menggunakan <i>Paramount Secondary Link</i>	a. Gunakan 2 tetes atau secukupnya isi dari <i>Paramount Secondary Link</i> untuk menutup bagian jaringan dan melindunginya secara sempurna. b. Bilas dengan PBS 3 kali.	30 menit
6. Reagen 4: Bersiap menggunakan <i>Paramount HRP</i>	a. Gunakan 2 tetes atau secukupnya isi dari <i>Paramount HRP</i> untuk menutup bagian jaringan dan melindunginya secara sempurna. b. Bilas dengan PBS 3 kali.	30 menit
7. Reagen 5: <i>Paramount DAB Buffer</i> 6: <i>Paramount DAB concentrate</i>	a. Tambahkan 1 atau 2 tetes (sekitar 30-50 $\mu$ L untuk sensitivitas dan kontras yang lebih tinggi) dari <i>DAB concentrate</i> (reagen 6) pada 1ml <i>DAB buffer</i> (reagen 5). Aduk rata. b. Tambahkan 2 tetes (100 $\mu$ L) atau secukupnya isi dari DAB sebelum pencampuran untuk menutup jaringan secara sempurna. Melindungi selama 5 menit. Gunakan solusi DAB yang sudah disiapkan dalam 5 jam. c. ketika warna yang sesuai berkembang, bilas dengan hati hati menggunakan air yang mengalir selama 1-2 menit.	5-10 menit
8. Hematoxylin: Dialirkan oleh pengguna	a. <i>Counterstain</i> dengan menggunakan 2 tetes atau secukupnya untuk menutupi jaringan secara sempurna dan tunggu sekitar 10-20 detik. b. Bilas sampai bersih dengan air yang mengalir selama 1-2 menit. c. Letakkan kaca pada PBS sampai	

	menunjukkan warna biru (selama 30-60 detik).	
--	--	--

## BAB 5

### DATA DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Bahan Penelitian Buah dan Kulit Buah

Hasil pengumpulan sampel buah dan kulit buah ditunjukkan pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Berat buah dan kulit buah

Replikasi	I (100)	II (100)	III (100)	Rata-rata/ 100 buah	SD
Berat buah (kg)	4,265	4,310	4,235	4,270	0,0377
Berat basah kulit buah (kg)	2,760	2,805	2,750	2,772	0,0293
Berat kering kulit buah (gram)	326	333	328	329	3,6056
Rendamen dari buah (%)	7,644	7,726	7,745	7,705	0,0537
Berat terbesar	66 gram				
Berat terkecil	35 gram				

Pengumpulan sampel dilakukan sebanyak 3 kali yang masing-masing berjumlah 100 buah dengan total berat keseluruhan adalah 12,81 kg. Dari 300 buah yang dikumpulkan diperoleh buah terbesar dengan berat 66 gram dan buah terkecil dengan berat 35 gram. Kulit buah yang dipisahkan dari daging buah diperoleh sebanyak 8,315 kg, yang setelah dikeringanginkan diperoleh berat kering kulit buah sebanyak 987 gram, dengan rendamen 7,705% dari berat buah dan 11,87% dari berat basah kulit buah.



## 5.2 Hasil Ekstraksi dan Uji Sitotoksik Ekstrak

Hasil ekstraksi serbuk kulit buah ditunjukkan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil ekstraksi dari 502 gram serbuk kering kulit buah

	<b>EN</b>	<b>ED</b>	<b>EE</b>	<b>EB</b>	<b>EA</b>
Identitas	Ektrak n-heksan	Ektrak DCM	Ektrak Etil asetat	Ektrak n-butanol	Ektrak Air
Berat ekstrak	36 gram	5 gram	45 gram	85 gram	97 gram
Rendamen	7,171%	0,996%	8,964%	16,932%	19,323%
Organoleptis	Kering menggumpal, coklat hitam	Kering menggumpal, coklat hitam	Kental, coklat hitam	Kental, coklat hitam	Kental, merah hitam

EN : Ekstrak n-heksan; ED : Ekstrak DCM; EE : Ekstrak etil asetat; EB : Ekstrak n-butanol; EA : Ekstrak air

Sebanyak 502 gram serbuk kering kulit buah diekstraksi bertingkat menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksan, diklorometana(DCM), etil asetat, n-butanol dan air secara berturut-turut. Hasil ekstraksi diperoleh 36 gram ekstrak n-heksan (7,171%), 5 gram ekstrak DCM (0,996%), 45 gram ekstrak etil asetat (8,964%), 85 gram ekstrak n-butanol (16,932%) dan 97 gram ekstrak air (19,323%). Hasil uji sitotoksik ekstrak ditunjukkan pada tabel 5.3

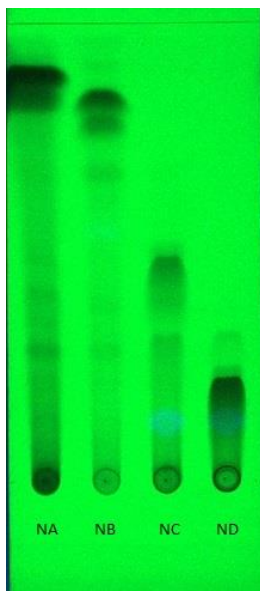
Tabel 5.3 Hasil uji sitotoksik ekstrak

	IC <sub>50</sub> terhadap MCF7 (µg/ml)					IC <sub>50</sub> terhadap HepG2 (µg/ml)				
	I	II	III	$\bar{X}$	SD	I	II	III	$\bar{X}$	SD
EN	101,83	102,73	106,26	103,61	2,34	78,93	83,32	87,44	83,23	4,26
ED	375,41	429,14	388,28	397,61	28,05	80,29	80,70	78,40	79,80	1,23
EE	-	-	-	-	-	720,07	732,38	563,18	671,88	94,33
EB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : tidak terukur; EN : Ekstrak n-heksan; ED : Ekstrak DCM; EE : Ekstrak etil asetat; EB : Ekstrak n-butanol; EA : Ekstrak air

### 5.3 Hasil Fraksinasi dan Uji Sitotoksik Fraksi

Fraksinasi ekstrak n-heksan menggunakan metode kromatografi kolom dengan kecepatan tetesan  $\pm 10$  tetes/menit dan ditampung tiap 10 menit/vial, menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 4:1 (200 ml), n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 1:1 (200 ml), dan etil asetat:metanol dengan perbandingan 1:1 (100 ml), sehingga diperoleh 58 vial. Profil KLT yang sama digabungkan sehingga diperoleh 4 profil KLT yang berbeda, seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.1



Keterangan :

- NA : Fraksi n-heksan A (vial 1-14)
- NB : Fraksi n-heksan B (vial 15-22)
- NC : Fraksi n-heksan C (vial 23-38)
- ND : Fraksi n-heksan D (vial 39-58)
- Eluen : n-heksan:etil asetat (4:1)

Gambar 5.1 Profil KLT hasil kromatografi kolom, fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksan:etil asetat (4:1), pengamatan menggunakan UV<sub>254</sub>

Hasil uji sitotoksik 4 fraksi dari ekstrak n-heksan ditunjukkan pada tabel 5.4

Tabel 5.4 Hasil uji sitotoksik 4 fraksi dari ekstrak n-heksan

	IC <sub>50</sub> terhadap MCF7 (µg/ml)					IC <sub>50</sub> terhadap HepG2 (µg/ml)				
	I	II	III	$\bar{X}$	SD	I	II	III	$\bar{X}$	SD
NA	86,91	87,95	78,07	84,31	5,43	33,23	27,60	31,47	30,77	2,88
NB	98,37	94,51	98,53	97,14	2,28	42,83	41,23	42,29	42,12	0,82
NC	135,39	145,08	160,09	146,85	12,45	39,83	43,48	41,64	41,66	1,83
ND	47,41	46,90	59,34	51,22	7,04	25,74	28,02	26,06	26,61	1,23

NA:fraksi n-heksan A; NB:fraksi n-heksan B; NC:fraksi n-heksan C; ND:fraksi n-heksan D

#### 5.4 Hasil Subfraksinasi dan Uji Sitotoksik subfraksi

Subfraksinasi fraksi ND menggunakan metode kromatografi kolom dengan kecepatan tetesan  $\pm 10$  tetes/menit dan ditampung tiap 10 menit/vial, menggunakan fase gerak n-heksan:etilasetat dengan perbandingan 1:1 (200 ml), n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 1:2 (200 ml), dan etil asetat:metanol dengan perbandingan 1:1 (100 ml), sehingga diperoleh 61 vial. Profil KLT yang sama digabungkan sehingga diperoleh 3 profil KLT yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.2



Keterangan :

ND1 : Subfraksi n-heksan D1 (vial 3-31)

ND2 : Subfraksi n-heksan D2 (vial 32-39)

ND3 : Subfraksi n-heksan D3 (vial 40-61)

Eluen : n-heksan:etil asetat (3:2)

Gambar 5.2. Profil KLT hasil kromatografi kolom, fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak n-heksan:etil asetat (3:2), pengamatan menggunakan UV<sub>254</sub>

Hasil uji sitotoksik 3 subfraksi dari fraksi n-heksan D ditunjukkan pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Hasil uji sitotoksik 3 subfraksi dari fraksi ND

	IC <sub>50</sub> terhadap MCF7 (µg/ml)					IC <sub>50</sub> terhadap HepG2 (µg/ml)				
	I	II	III	$\bar{X}$	SD	I	II	III	$\bar{X}$	SD
ND1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ND2	29,58	24,34	26,83	26,92	2,62	26,92	26,65	29,82	27,80	1,76
ND3	20,92	19,64	21,26	21,26	0,86	24,30	23,34	23,44	23,69	0,53

ND1:subfraksi n-heksanD1; ND2:subfraksi n-heksanD2; ND3:subfraksi n-heksanD3

### 5.5 Hasil Isolasi dan Uji Sitotoksik Isolat

Isolasi senyawa dari subfraksi ND3 dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan plat RP18 dengan fase gerak asetonitril:metanol (2:1), diperoleh 2 isolat dengan kode XND3 dan YND3. Profil KLT isolat ditunjukkan pada gambar 5.3



Gambar 5.3 Profil KLT isolat senyawa XND3 dan YND3, fase diam silika gel RP18 dan fase gerak asetonitril:metanol (2:1), pengamatan menggunakan UV<sub>366</sub>

Uji sitotoksik isolat XND3 dan YND3 ditunjukkan pada tabel 5.6

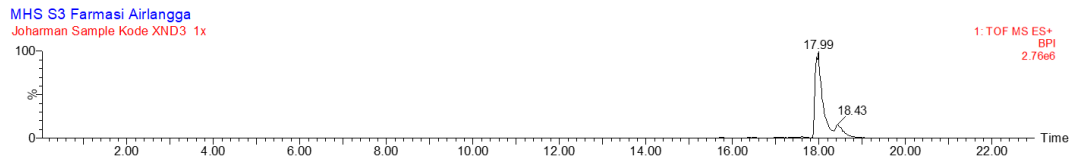
Tabel 5.6 Hasil uji sitotoksik isolat dari subfraksi ND3 dan Doxorubisin

Sampel	IC <sub>50</sub> terhadap MCF7 (µg/ml)					IC <sub>50</sub> terhadap HepG2 (µg/ml)				
	I	II	III	$\bar{X}$	SD	I	II	III	$\bar{X}$	SD
XND3	11,50	10,71	11,17	11,13	0,39	8,32	7,50	8,15	7,99	0,43
YND3	5,14	4,06	5,89	5,03	0,92	6,24	5,40	5,97	5,87	0,43
Doxorubicin	8,74	9,11	7,29	8,38	0,96	5,10	5,10	5,15	5,12	0,03

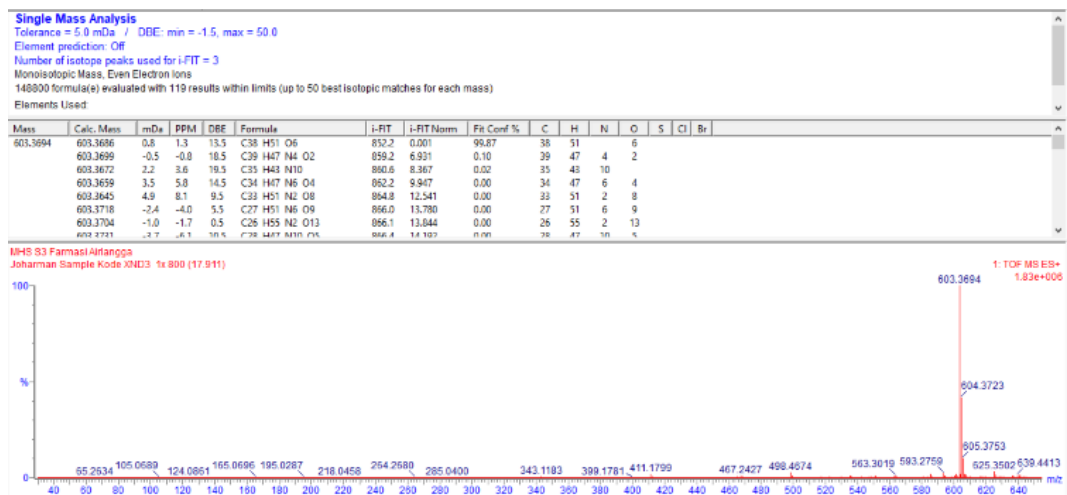
## 5.6. Hasil Identifikasi Senyawa

### 5.6.1 Identifikasi senyawa XND3

Berdasarkan profil kromatogram LCMS-QTOF, senyawa XND3 memberikan puncak pada waktu retensi 17,99 menit. Ditinjau dari spektrum massa, senyawa XND3 memiliki massa 602,3686 sehingga senyawa XND3 identik dengan rumus molekul C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub>. Profil kromatogram dan analisis massa senyawa XND3 ditunjukkan pada gambar 5.4 dan 5.5



Gambar 5.4 Profil kromatogram LCMS-QTOF senyawa XND3

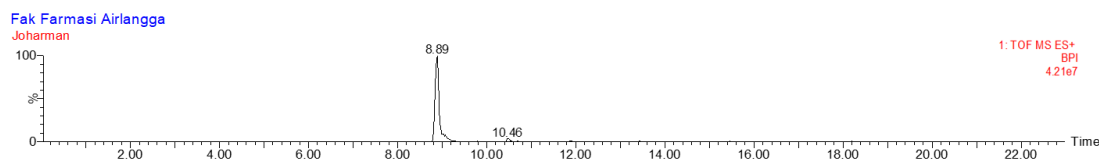


Gambar 5.5 Analisis massa senyawa XND3

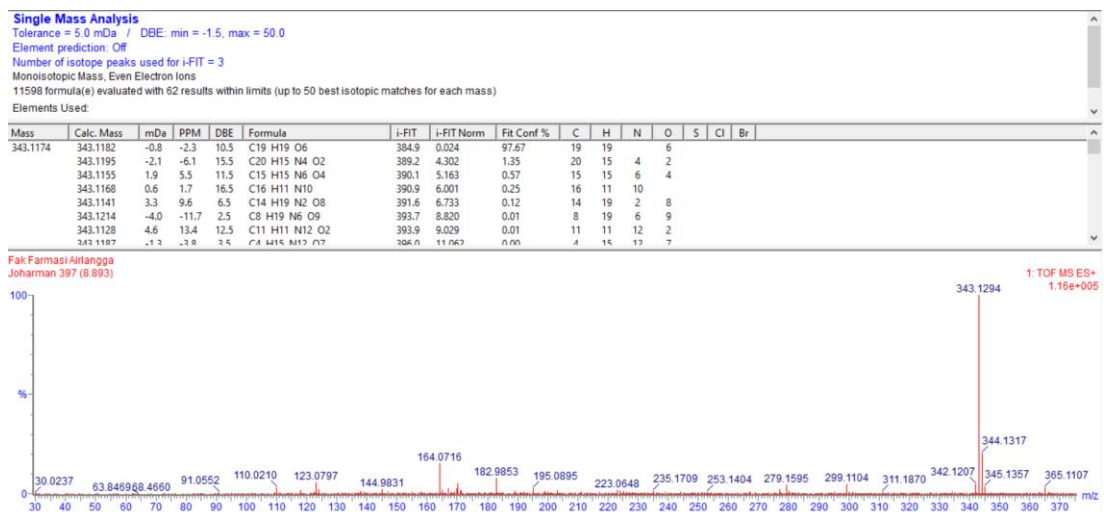
Dikarenakan jumlah isolat XND3 yang sangat kecil (<5mg) menjadikan hasil pengujian spektroskopi NMR tidak memperlihatkan hasil yang mencukupi untuk dapat menentukan rumus struktur senyawa tersebut, sehingga identifikasi struktur hanya dilanjutkan terhadap isolat YND3.

### 5.6.2 Identifikasi senyawa YND3

Berdasarkan profil kromatogram LCMS-QTOF, senyawa YND3 memberikan puncak pada waktu retensi 8,89 menit. Ditinjau dari spektum massa, senyawa YND3 memiliki massa 342,1182 sehingga senyawa YND3 identik dengan rumus molekul  $C_{19}H_{18}O_6$ . Profil kromatogram dan analisis massa senyawa YND3 ditunjukkan pada gambar 5.6 dan 5.7



Gambar 5.6 Profil kromatogram LCMS-QTOF senyawa YND3

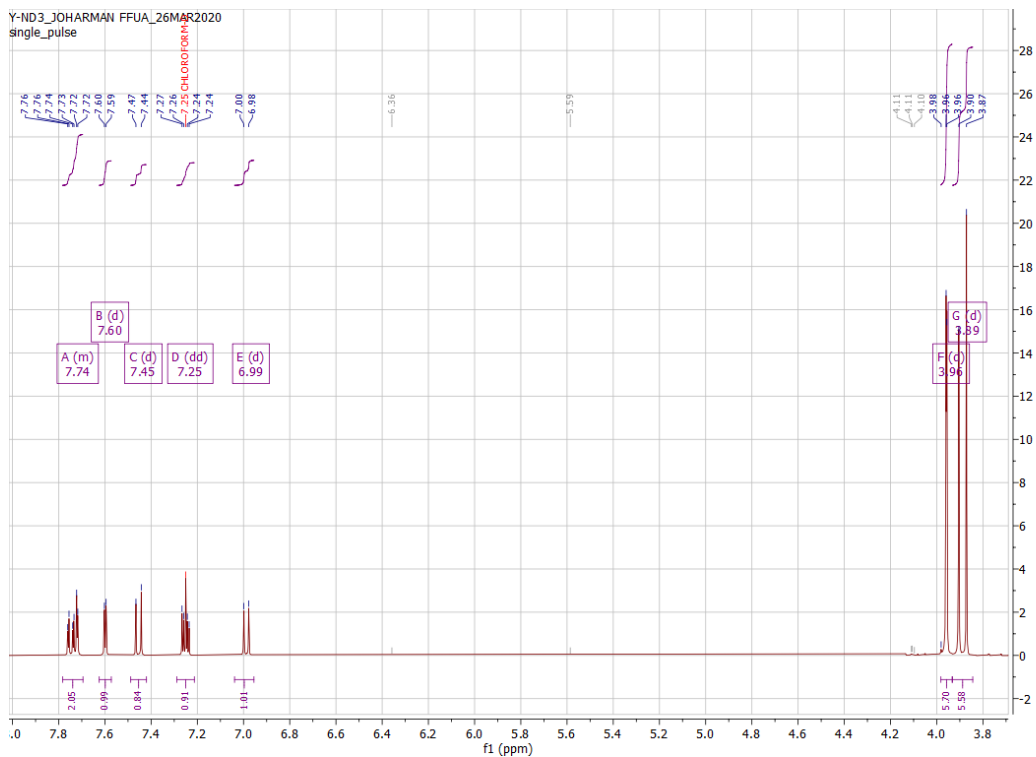


Gambar 5.7 Analisis massa senyawa YND3

Analisis  $^1\text{H}$ NMR senyawa YND3 menunjukkan geseran kimia sebagai berikut :

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  7.78 – 7.69 (m, 2H), 7.60 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J = 9.1, 3.2$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 3.96 (d,  $J = 1.2$  Hz, 6H), 3.89 (d,  $J = 13.3$  Hz, 6H).

dengan spektrum ditunjukkan pada gambar 5.8



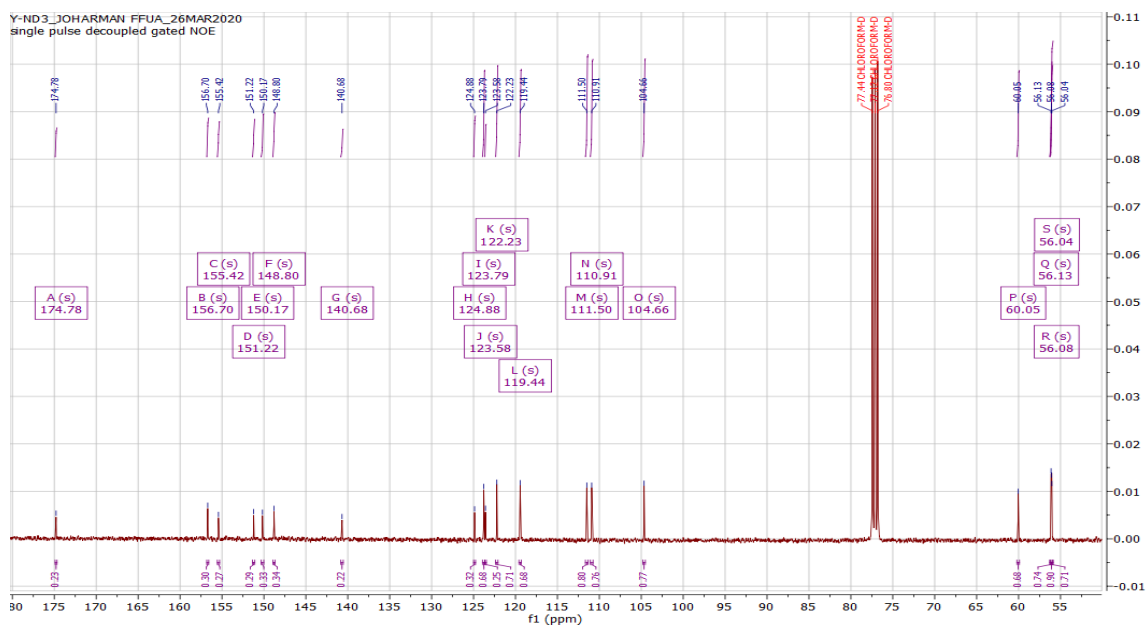
Gambar 5.8 Spektrum  $^1\text{H}$ NMR senyawa YND3

Analisis  $^{13}\text{C}$ NMR senyawa YND3 menunjukkan geseran kimia sebagai berikut :

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  174.78, 156.70, 155.42, 151.22, 150.17, 148.80, 140.68, 124.88, 123.79, 123.58, 122.23, 119.44, 111.50, 110.91, 104.66, 60.05, 56.13, 56.08, 56.04.

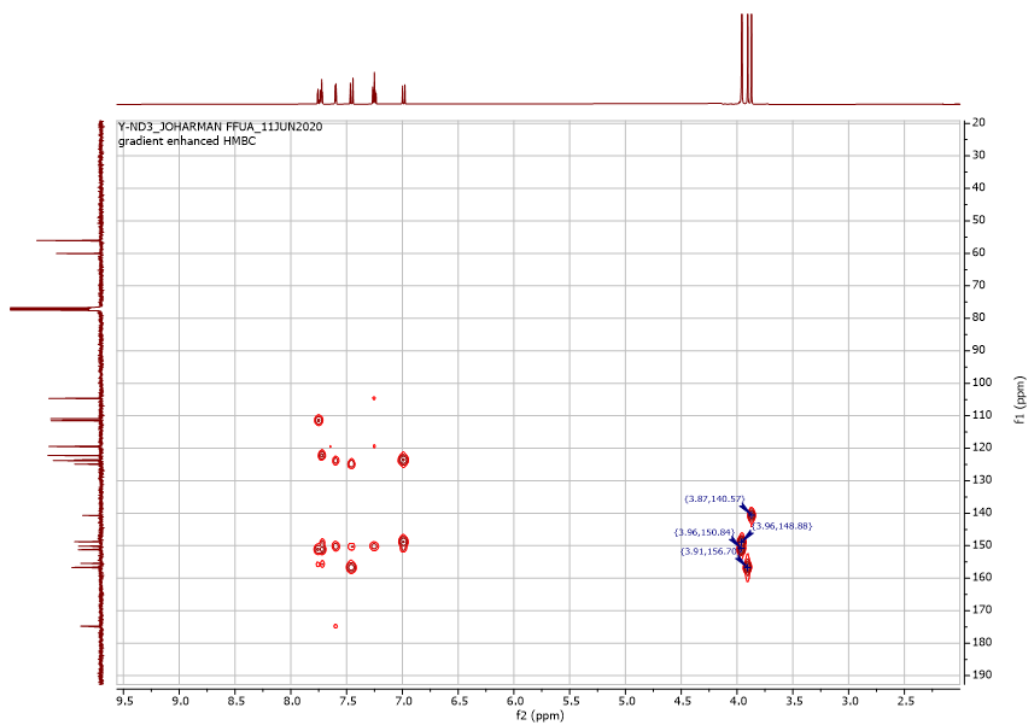
dengan spektrum ditunjukkan pada gambar 5.9





Gambar 5.9 Spektrum  $^{13}\text{C}$ NMR senyawa YND3

Analisis HMBC menunjukkan korelasi antara atom karbon dan hidrogen seperti terlihat pada gambar 5.10



Gambar 5.10 Spektrum HMBC senyawa YND3

Hasil perhitungan HDI (Hydrogen Deficiency Index) diperoleh hasil sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\text{HDI} &= \frac{1}{2}(2C+2-H) \\ &= \frac{1}{2}(2(19)+2-18) \\ &= 11\end{aligned}$$

Isolat Y-ND3 memiliki HDI 11 yang artinya senyawa ini memiliki 11 cincin dan atau ikatan rangkap, karena 1 nilai HDI mewakili 1 ikatan rangkap 2 atau 1 cincin. Geseran kimia ( $\delta$ ) proton pada 3,96 Hz 6H dan 3,89 Hz 6H identik dengan gugus methoxy (-OCH<sub>3</sub>), artinya senyawa ini memiliki 4 gugus -OCH<sub>3</sub>. Senyawa yang memiliki 11 HDI dan dan memiliki 4 gugus -OCH<sub>3</sub> yang pernah diisolasi dari tanaman memiliki inti flavone yaitu tetrametoksiflavon (Zhou *et al.*, 2011).

Ditinjau dari spektrum <sup>1</sup>H NMR, jumlah proton dan nilai  $\delta$  pada senyawa Y-ND3 adalah : posisi  $\delta = 3,96$  (d, 6H) 2 gugus metoksi (-OCH<sub>3</sub>);  $\delta = 3,89$  (d, 6H) 2 gugus metoksi (-OCH<sub>3</sub>);  $\delta = 7,69-7,78/C2'$  dan  $C6'$  (m, 2H) masing-masing 1 atom H pada cincin aromatik (=CH-C);  $\delta = 7,60/C3'$  (d, 1H) 1 atom H pada cincin aromatik (=CH-C);  $\delta = 7,45/C5'$  (d 1H) 1 atom H pada cincin aromatik (=CH-C);  $\delta = 7,25/C8$  (d, 1H) 1 atom H pada cincin aromatik (=CH-C);  $\delta = 6,99/C7$  (d 1H) 1 atom H pada cincin aromatik (=CH-C).

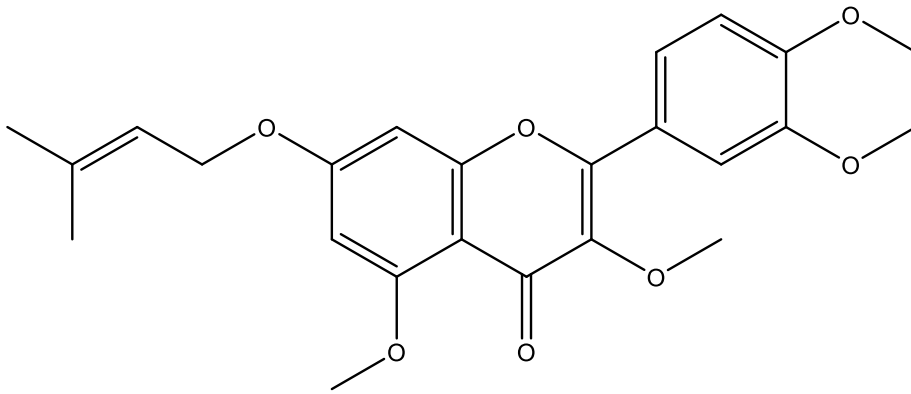
Ditinjau dari spectrum <sup>13</sup>CNMR dan nilai  $\delta$ , menunjukkan jenis karbon pada senyawa Y-ND3 adalah :  $\delta = 56,04, 56,08, 56,13, 60,05$  adalah 4 gugus methoxy (-OCH<sub>3</sub>);  $\delta = 104,66/C8$  adalah CH pada cincin aromatik (=CH-C);  $\delta = 110,91/C5'$

adalah CH pada cincin aromatik ( $=\text{CH}-\text{C}$ );  $\delta = 111,50/\text{C}3'$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=\text{CH}-\text{C}$ );  $\delta = 119,44/\text{C}7$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=\text{CH}-\text{C}$ );  $\delta = 122,23/\text{C}1'$  adalah C pada cincin aromatik ( $>\text{C}=\text{C}$ );  $\delta = 123,58/\text{C}6'$  CH pada benzene ( $=\text{CH}-\text{C}$ );  $\delta = 123,79/\text{C}2'$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=\text{CH}-\text{C}$ );  $\delta = 124,88/\text{C}10$  adalah C pada cincin aromatik ( $>\text{C}=\text{C}$ );  $\delta = 140,68/\text{C}3$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq\text{C}-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 148,80/\text{C}6$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq\text{C}-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 150,17/\text{C}9$  adalah C pada cincin aromatik ( $>\text{C}=\text{C}$ );  $\delta = 156,70/\text{C}4'$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq\text{C}-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 151,22/\text{C}5$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq\text{C}-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 155,42/\text{C}2$  adalah C pada cincin aromatik ( $>\text{C}=\text{C}$ );  $\delta = 174,78/\text{C}4$  adalah C karbonil ( $>\text{C}=\text{O}$ ).

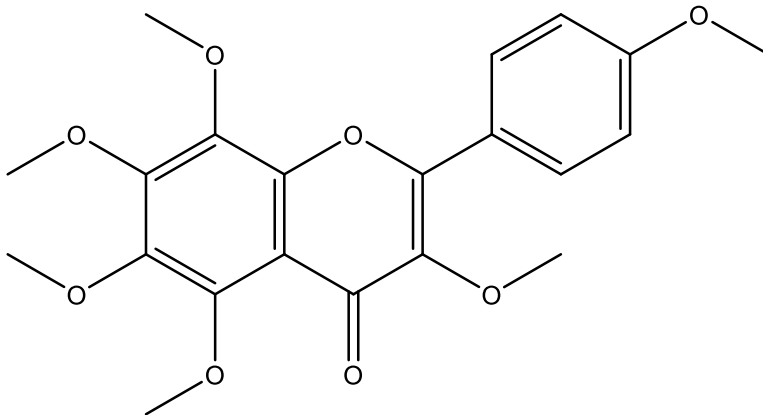
Geseran kimia  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR isolat YND3 dibandingkan dengan beberapa literatur ditunjukkan pada tabel 5.7

Tabel 5.7 Geseran kimia  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR isolat YND<sub>3</sub>, 7-((3-metilbut-2-en-1-yl)oksi),3,5,3',4'-tetrametoksiflavon (gambar 5.11) dan 4',3,5,6,7,8-heksametoksiflavon (gambar 5.12), pelarut CDCl<sub>3</sub>.

No	YND <sub>3</sub>		7-((3-metilbut-2-en-1-yl)oksi),3,5,3',4'-tetrametoksiflavon (Higa <i>et al.</i> , 2012)		4',3,5,6,7,8-heksametoksiflavon (Chen <i>et al.</i> , 1998; Sugiyama <i>et al.</i> , 1993)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	155,42	-	155,7	-	151,3	-
3	140,68	-	141,1	-	140,7	-
4	174,78	-	174,0	-	174,0	-
5	151,22	-	160,9	-	143,9	-
6	148,80	-	96,0*	6,35 (d, 2,0)	138,0	-
7	104,66	6,99 (d,1H)	162,8*	-	153,5*	-
8	119,44	7,25 (d,1H)	93,1	6,49 (d, 2,0)	138,0*	-
9	150,17	-	158,6	-	148,2	-
10	124,88	-	109,5	-	115,2	-
1'	122,23	-	123,2	-	123,4	-
2'	123,79	7,78-7,69 (m,1H)	111,2	7,67-7,69 (m)	130,0	8,14 (d,1H)
3'	110,91	7,60 (d,1H)	148,6*	-	114,2	7,04 (d,1H)
4'	156,70	-	150,8	-	161,5	-
5'	111,50	7,45 (d,1H)	110,7	6,96 (d, 8,5)	114,2	7,04 (d,1H)
6'	123,58	7,78-7,69 (m,1H)	121,4	7,67-7,69 (m)	130,0	8,14 (d,1H)
OCH <sub>3</sub> -C3	56,13	3,89 (d,3H)	56,3	3,85 (s)	62,4	3,87
OCH <sub>3</sub> -C5	56,04	3,96 (d,6H)	55,9	3,93 (s)	62,1	3,95
OCH <sub>3</sub> -C6	56,08		-	-	61,9	3,97
OCH <sub>3</sub> -C7	-	-	-	-	61,7	4,00
OCH <sub>3</sub> -C8	-	-	-	-	58,0	4,09
OCH <sub>3</sub> -C3'	-	-	56,0	3,95 (s)	-	-
OCH <sub>3</sub> -C4'	60,05	3,89 (d,3H)	59,9	3,95 (s)	55,0	3,90



Gambar 5.11 Struktur molekul 7-((3-metilbut-2-en-1-yl)oksi),3,5,3',4'-tetrametoksiflavon (Higa *et al.*, 2012).

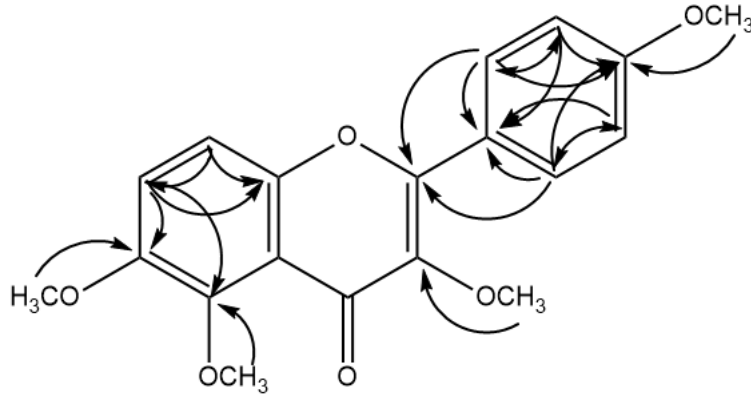


Gambar 5.12 Struktur molekul 4',3,5,6,7,8-heksametoksiflavon (Chen *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 1993).

Korelasi antara  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  pada spektrum HMBC ditunjukkan pada tabel 5.8 dan gambar 5.13

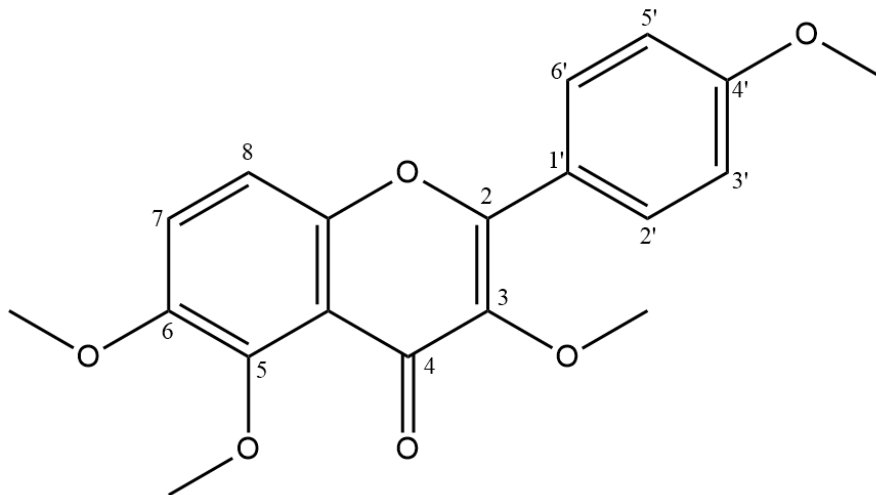
Tabel 5.8 Korelasi antara  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  pada spektrum HMBC

$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
H7 6,99	C5 151,22 C6 148,80 C9 150,17
H5' 7,45	C6' 123,58 C1' 122,23 C4' 156,70
H3' 7,60	C2' 123,79
H8 7,25	C7 104,66 C9 150,17
H2' 7,78-7,69	C3' 110,91 C1' 122,23 C4' 156,70 C2 155,42
H6' 7,78-7,69	C5' 111,50 C1' 122,23 C4' 156,70 C2 155,42
O-C-H <sub>3</sub> 3,89	C3 140,68
O-C-H <sub>3</sub> 3,96	C5 151,22
O-C-H <sub>3</sub> 3,96	C6 148,80
O-C-H <sub>3</sub> 3,89	C4' 156,70



Gambar 5.13 Korelasi pada spektrum HMBC

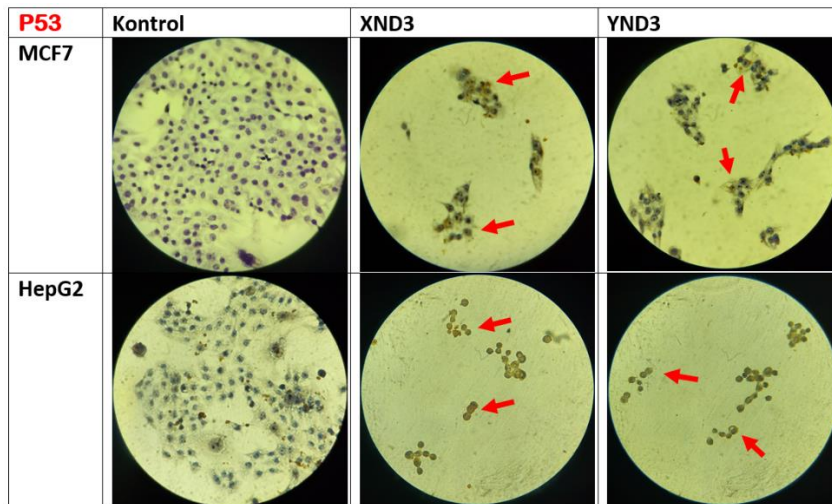
Berdasarkan perbandingan geseran kimia  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dari senyawa YND<sub>3</sub> yang dibandingkan dengan geseran kimia senyawa 7-((3-metilbut-2-en-1-yl)oksi),3,5,3',4'-tetrametoksiflavinon dan 4',3,5,6,7,8-heksametoksiflavinon, dan juga korelasi pada spektrum HMBC, senyawa YND<sub>3</sub> identik dengan senyawa 4',3,5,6, tetramethoxyflavone, dengan rumus struktur ditunjukkan pada gambar 5.14.



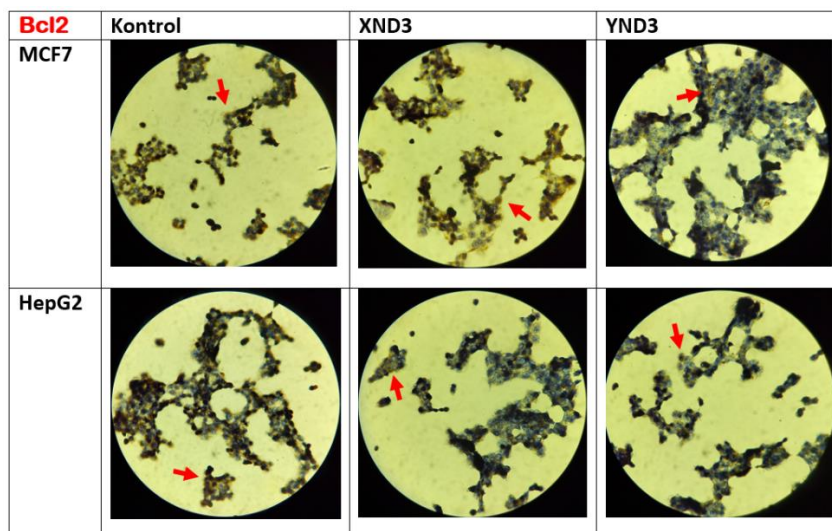
Gambar 5.14 Struktur molekul 4',3,5,6 tetrametoksiflavinon

## 5.7 Hasil Uji Imunositokimia

Pengujian imunositokimia yang dilakukan meliputi pengamatan ekspresi protein p53 dan Bcl2 oleh sel kanker MCF7 dan HepG2. Hasil pengamatan ditunjukkan pada gambar 5.15 dan 5.16



Gambar 5.15 Pengamatan salah satu lapang pandang ekspresi p53 oleh sel MCF7 dan HepG2 untuk kontrol, XND3 dan YND3



Gambar 5.16 Pengamatan salah satu lapang pandang ekspresi Bcl2 oleh sel MCF7 dan HepG2 untuk kontrol, XND3 dan YND3



Prosentasi jumlah sel yang mengekspresikan p53 dan Bcl2 dibandingkan dengan kontrol disajikan pada tabel 5.9

Tabel 5.9 Prosentasi sel yang mengekspresikan p53 dan Bcl2

Uji	Sel Kanker		Kontrol (%)	XND3 (%)	YND3 (%)
<b>P53</b>	<b>MCF7</b>	1	2,19	31,25	16,42
		2	4,35	38,78	26,79
		3	2,31	58,54	31,82
		4	5,41	43,18	21,05
		$\bar{X}$	<b>8,76</b>	<b>42,94</b>	<b>24,02</b>
	<b>HepG2</b>	1	11,27	68,75	52,78
		2	9,60	72,73	66,67
		3	6,47	80,65	72,22
		4	9,50	72,41	54,29
		$\bar{X}$	<b>9,21</b>	<b>73,64</b>	<b>61,49</b>
<b>Bcl2</b>	<b>MCF7</b>	1	20,16	20,57	12,21
		2	25,37	23,39	9,39
		3	18,86	25,98	16,36
		4	24,55	21,38	16,00
		$\bar{X}$	<b>22,24</b>	<b>22,83</b>	<b>13,49</b>
	<b>HepG2</b>	1	28,13	11,46	12,23
		2	32,56	17,69	12,40
		3	36,26	14,19	10,34
		4	35,15	17,53	9,93
		$\bar{X}$	<b>33,03</b>	<b>15,22</b>	<b>11,23</b>

Data yang diperoleh kemudian diuji statistik menggunakan IBM SPSS Statistic 23 dan diperoleh hasil yang disajikan pada tabel 5.10

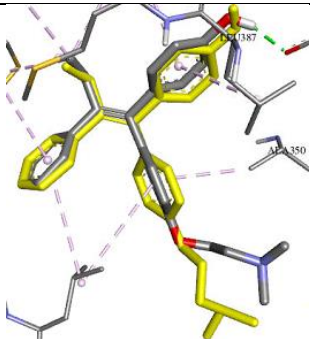
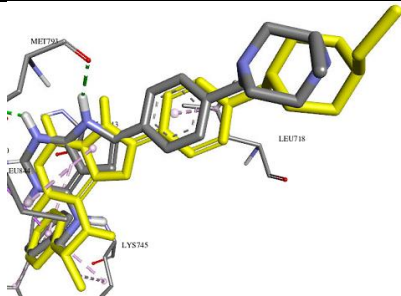
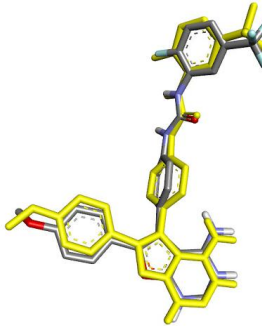
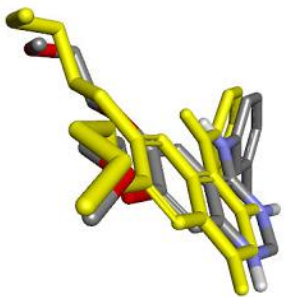
Tabel 5.10 Uji statistik SPSS

Uji	Sel Kanker	Perbedaan	Uji lanjutan LSD	Uji lanjutan Duncan
P53	MCF7	Kontrol vs XND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		Kontrol vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		XND3 vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
	HepG2	Kontrol vs XND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		Kontrol vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		XND3 vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
Bcl2	MCF7	Kontrol vs XND3	tidak berbeda nyata	tidak berbeda nyata
		Kontrol vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		XND3 vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
	HepG2	Kontrol vs XND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		Kontrol vs YND3	berbeda nyata	berbeda nyata
		XND3 vs YND3	tidak berbeda nyata	tidak berbeda nyata

### 5.8 Hasil Uji Penambatan Molekul

Sebelum dilakukan penambatan molekul terhadap isolat 4',3,5,6-tetrametoksiflavan, dilakukan terlebih dahulu docking dari masing-masing ligan asli untuk memvalidasi metode *in silico*. Berdasarkan hasil docking dari masing-masing ligan asli, kemudian dibandingkan antara sebelum dan setelah docking untuk memverifikasi nilai *root square mean deviation* (RSMD) berdasarkan nilai energi terendah dari atom-atom *backbone*, dan interaksinya terhadap sisi aktif dari masing-masing reseptor dapat ditunjukkan pada Tabel 5.11, hasil docking dapat dinyatakan valid jika nilai RSMD lebih kecil dari 2 Å.

Tabel 5.11 Nilai *root square mean deviation* (RSMD) ligan asli

No	PDB ID	Posisi Redocking	RSMD	Ligan Asli
1	3ERT		1,052 Å	4-hydroxytamoxifen
2	2J6M		1,008 Å	gefinitib
3	1YWN		0,601 Å	4-anilinoquinazoline
4	1M17		1,387 Å	4-amino-furo[2,3-d]pyrimidine

Penambatan molekul isolat 4',3,5,6-tetrametoksiflavin terhadap reseptor kanker payudara 3ERT dan 2J6M, dan terhadap reseptor kanker hati 1YWN dan 1M17 memberikan hasil seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.12

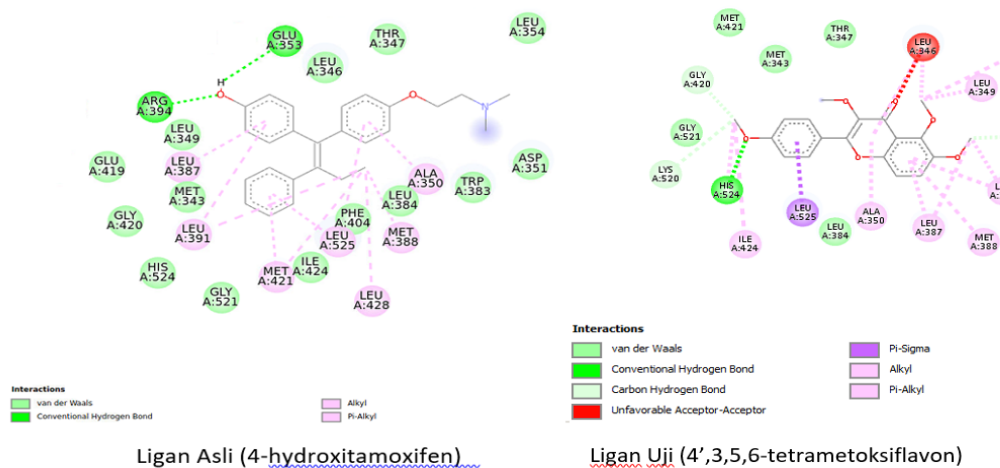
Tabel 5.12 Penambatan molekul isolat 4',3,5,6-tetrametoksiflavin terhadap reseptor kanker payudara dan reseptor kanker hati

Ligan	Reseptor kanker payudara			
	3ERT		2J6M	
	Energi ikatan	Konstanta inhibisi	Energi ikatan	Konstanta inhibisi
4-hidroksitamoxifen	-11,87 kcal/mol	1,99 nM		
gefinitib			-9,74 kcal/mol	73,07 nM
4',3,5,6-tetrametoksiflavin	-8,15 kcal/mol	1,07 μM	-5,29 kcal/mol	132,41 μM

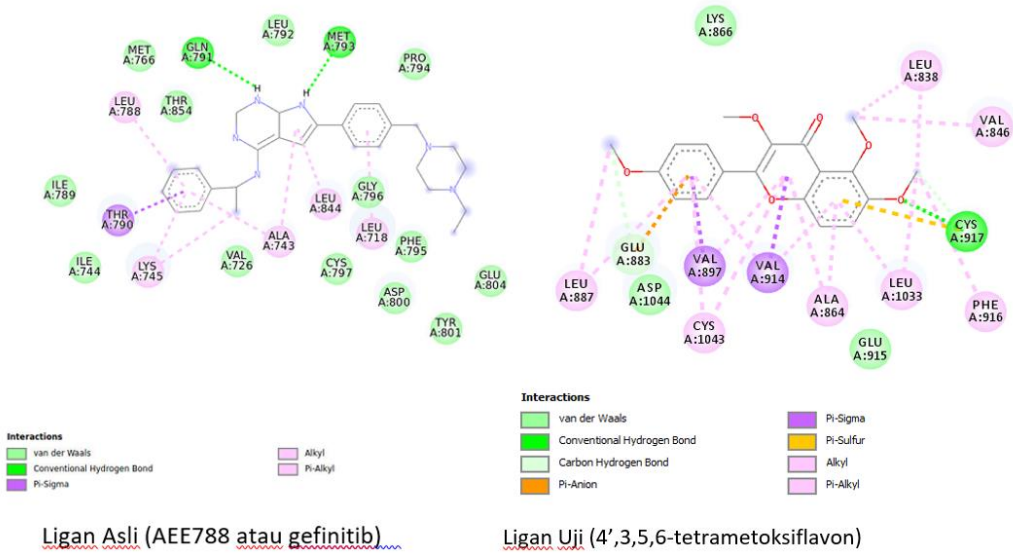
  

Ligan	Reseptor kanker hati			
	1YWN		1M17	
	Energi ikatan	Konstanta inhibisi	Energi ikatan	Konstanta inhibisi
4-amino-furo[2,3-d]pyrimide	-10,64 kcal/mol	15,96 nM		
4-anilinoquinazoline			-5,89 kcal/mol	47,85 μM
4',3,5,6-tetrametoksiflavin	-7,02 kcal/mol	7,15 μM	-7,63 kcal/mol	2,54 μM

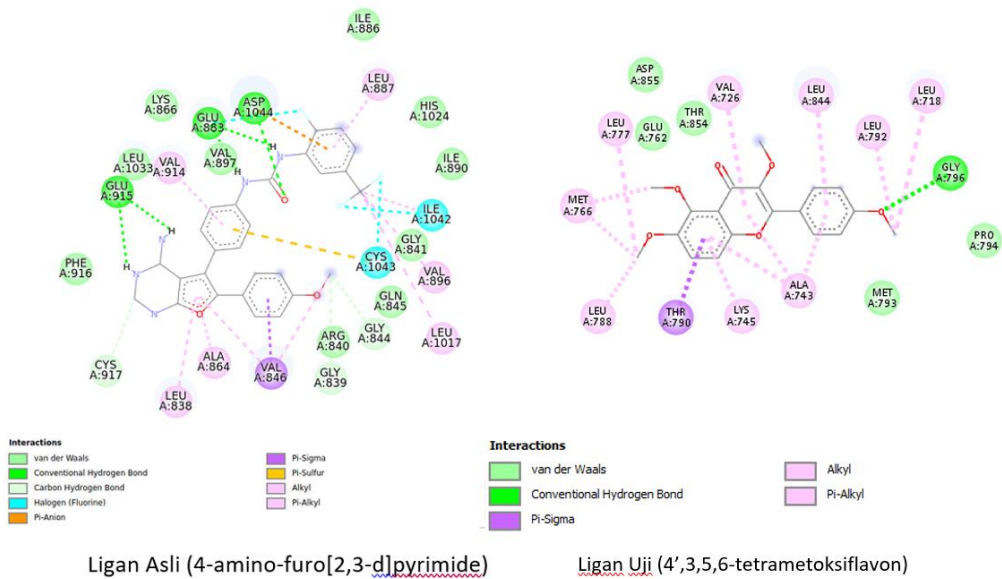
Interaksi antara ligan asli dan 4',3,5,6-tetrametoksiflavin dengan reseptor dapat ditunjukkan pada Gambar 5.17, 5.18, 5.19 dan 5.20.



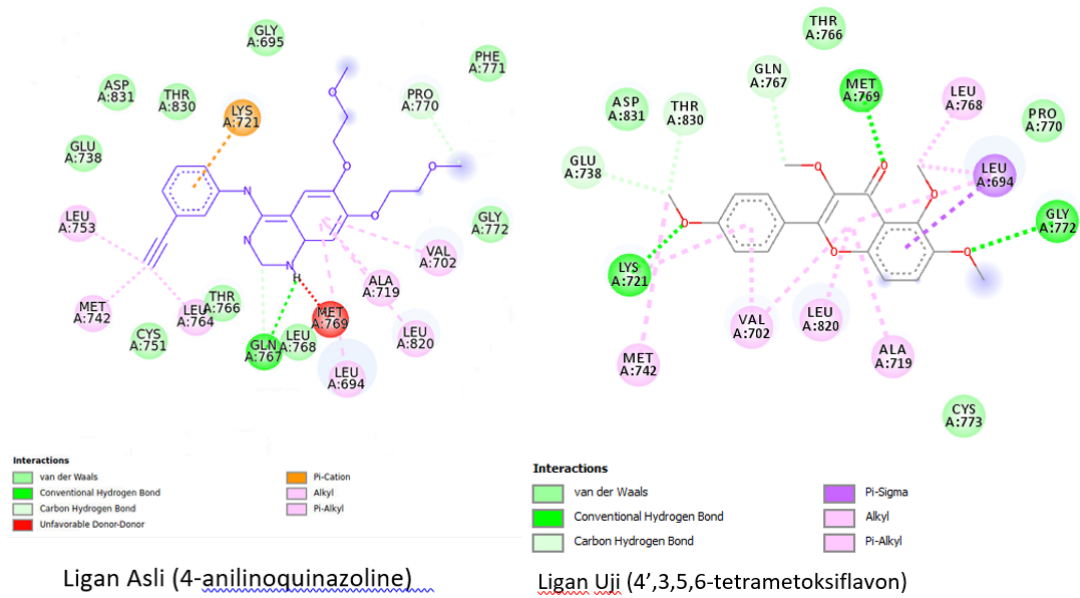
Gambar 5.17 Interaksi antara ligan dan reseptor 3ERT



Gambar 5.18 Interaksi antara ligan dan reseptor 2J6M



Gambar 5.19 Interaksi antara ligan dan reseptor 1YWN



Gambar 5.20 Interaksi antara ligan dan reseptor 1M17

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Sampel Buah dan Kulit Buah

Buah Mundar (*Garcinia forbesii* King.) di eksplorasi dari desa Tambak Baru, Kecamatan Martapura, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan pada bulan Januari 2017. Dikumpulkan buah yang matang dan diperoleh 300 buah dengan berat 12,81 kg dengan buah terbesar 66 gram dan buah terkecil 35 gram. Dari 300 buah tersebut, dipisahkan kulit buahnya dan diperoleh 8,315 kg. Kulit buah dikeringanginkan dan diperoleh 987 gram kulit kering, dengan rendamen 7,705% dari berat buah dan 11,87% dari berat kulit buah basah.

Tanaman mundar merupakan tanaman keras dengan ketinggian pohon mencapai 15 meter. Bentuk buahnya bundar, berwarna merah cerah, berkulit buah lunak. Daging buah berwarna putih, dengan rasa asam manis, semakin dekat ke biji akan terasa asam segar. Kulitnya berasa asam dengan getah khas seperti getah manggis berwarna kuning. Aroma juga mirip sekali dengan buah manggis. Mundar memiliki ukuran buah yang lebih kecil dari manggis (diameter 2-3 cm, lingkar 8-10 cm). Dalam 1 buah terdapat 4-5 keping biji.

#### 6.2 Ekstraksi, Fraksinasi dan Uji Sitotoksik

Sebanyak 502 gram serbuk kering kulit buah diekstraksi bertingkat menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksan, DCM (diklorometana), etil

asetat, n-butanol dan air secara berturut-turut. Dari hasil ekstraksi tersebut diperoleh 36 gram ekstrak n-heksan, 5 gram ekstrak DCM, 45 gram ekstrak etil asetat, 85 gram ekstrak n-butanol dan 97 gram ekstrak air. Seluruh ekstrak kemudian diuji sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF7 dan sel kanker hati HepG2. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan ( $IC_{50}$   $103,61 \pm 2,34$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak DCM ( $IC_{50}$   $397,61 \pm 28,05$ ), dan ekstrak etil asetat ( $IC_{50}$   $1.518,30 \pm 68,64$ ) secara berturut-turut pada sel kanker payudara MCF-7. Sedangkan terhadap sel kanker hati HepG2, ekstrak DCM ( $IC_{50}$   $79,80 \pm 1,23$ ) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksan ( $IC_{50}$   $83,23 \pm 4,26$ ), dan ekstrak etil asetat ( $IC_{50}$   $671,88 \pm 94,33$ ) secara berturut-turut. Ekstrak n-butanol dan air tidak menunjukkan potensi antikanker terhadap kedua sel tersebut yang diindikasikan dengan nilai  $IC_{50}$  yang sangat tinggi.

Berdasarkan hasil pengujian sitotoksik terhadap ekstrak, maka dilanjutkan proses fraksinasi terhadap ekstrak n-heksan menggunakan metode kromatografi kolom sehingga diperoleh 4 fraksi dengan profil KLT yang berbeda dengan kode fraksi NA, NB, NC dan ND. Hasil uji sitotoksik keempat fraksi menunjukkan bahwa fraksi ND ( $IC_{50}$   $51,22 \pm 7,04$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan fraksi NA ( $IC_{50}$   $84,31 \pm 5,43$ ), fraksi NB ( $IC_{50}$   $97,14 \pm 2,28$ ) dan fraksi NC ( $IC_{50}$   $146,85 \pm 12,45$ ) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Begitu pula terhadap sel kanker hati HepG2, fraksi ND ( $IC_{50}$   $26,61 \pm 1,23$ ) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan fraksi NA ( $IC_{50}$   $30,77 \pm 2,88$ ), fraksi NB ( $IC_{50}$   $42,12 \pm 0,82$ ) dan fraksi NC ( $IC_{50}$   $41,65 \pm 1,83$ ).



Berdasarkan hasil pengujian sitotoksik terhadap fraksi, maka dilanjutkan kembali proses subfraksinasi terhadap fraksi ND menggunakan metode kromatografi kolom sehingga diperoleh 3 subfraksi dengan profil KLT yang berbeda dengan kode subfraksi ND1, ND2 dan ND3. Hasil uji sitotoksik ketiga subfraksi menunjukkan bahwa subfraksi ND3 ( $IC_{50}$   $21,26 \pm 0,86$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan subfraksi ND1 ( $IC_{50}$  tidak terukur) dan subfraksi ND2 ( $IC_{50}$   $26,92 \pm 2,62$ ) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Begitu pula terhadap sel kanker hati HepG2, subfraksi ND3 ( $IC_{50}$   $23,69 \pm 0,53$ ) menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibandingkan subfraksi ND1 ( $IC_{50}$  tidak terukur) dan subfraksi ND2 ( $IC_{50}$   $27,80 \pm 1,76$ ).

### **6.3 Isolasi, Identifikasi Senyawa dan Uji Sitotoksik**

Berdasarkan hasil pengujian sitotoksik terhadap subfraksi, maka dilanjutkan proses pemisahan senyawa dari subfraksi ND3 menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP), dan diperoleh senyawa XND3 dan YND3. Uji sitotoksik dilakukan pada isolat XND3, YND3 dan doxorubicin sebagai kontrol positif dan diperoleh hasil YND3 ( $IC_{50}$   $5,03 \pm 0,92$ ) memiliki potensi antikanker lebih tinggi dibandingkan dengan XND3 ( $IC_{50}$   $11,13 \pm 0,39$ ) dan doxorubicin ( $IC_{50}$   $8,38 \pm 0,96$ ) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Sedangkan terhadap sel kanker hati HepG2, potensi antikanker isolat YND3 ( $IC_{50}$   $5,87 \pm 0,43$ ) hampir sebanding dengan doxorubicin ( $IC_{50}$   $5,12 \pm 0,03$ ), dan lebih tinggi dibandingkan dengan XND3 ( $IC_{50}$   $7,99 \pm 0,43$ ).

Identifikasi senyawa menggunakan metode LCMS\_QTOF untuk menentukan massa dan rumus molekul senyawa (Anonim, 2017). Selain itu juga menggunakan metode spektroskopi NMR untuk menentukan jumlah proton dan karbon yang dimiliki lingkungan kimia yang sama pada suatu senyawa organik, pemantauan senyawa kimia baik struktur senyawa dari bahan alam yang belum diketahui, konformasi hormone peptide, maupun polimer dinamis internal (Jenie dkk, 2014).

Profil kromatogram LCMS-QTOF senyawa XND3 memberikan puncak pada waktu retensi 17,99 menit. Ditinjau dari spektum massa, senyawa XND3 memiliki massa 602,3686 sehingga senyawa XND3 identik dengan rumus molekul  $C_{38}H_{50}O_6$ . Dikarenakan jumlah isolat XND3 yang sangat kecil (<5mg) menjadikan hasil pengujian spektroskopi NMR tidak memperlihatkan hasil yang mencukupi untuk dapat menentukan rumus struktur senyawa tersebut, sehingga identifikasi struktur hanya dilanjutkan terhadap isolat YND3.

Profil kromatogram LCMS-QTOF, senyawa YND3 memberikan puncak pada waktu retensi 8,89 menit. Ditinjau dari spektum massa, senyawa YND3 memiliki massa 342,1182 sehingga senyawa YND3 identik dengan rumus molekul  $C_{19}H_{18}O_6$ . Hasil perhitungan HDI (Hydrogen Deficiency Index) menunjukkan bahwa isolate YND3 memiliki HDI 11 yang artinya senyawa ini memiliki 11 cincin dan atau ikatan rangkap, karena 1 nilai HDI mewakili 1 ikatan rangkap 2 atau 1 cincin.

Analisis  $^1H$ NMR senyawa YND3 menunjukkan geseran kimia ( $\delta$ ) proton pada 3,96 Hz 6H dan 3,89 Hz 6H identik dengan gugus methoxy ( $-OCH_3$ ), artinya

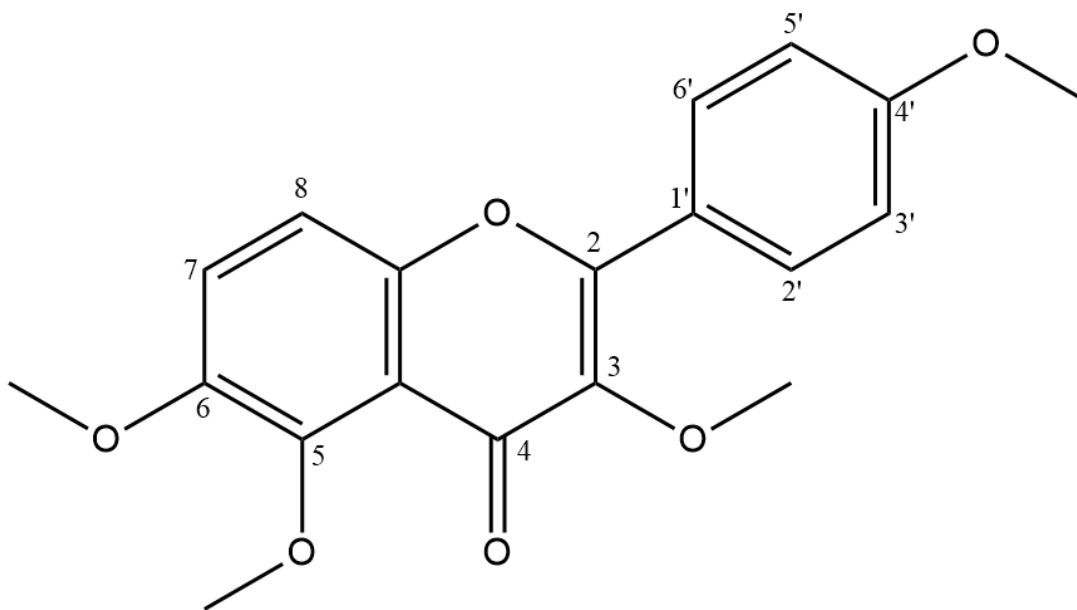
senyawa ini memiliki 4 gugus  $-OCH_3$ . Senyawa yang memiliki 11 HDI dan memiliki 4 gugus  $-OCH_3$  yang pernah diisolasi dari tanaman memiliki inti flavone yaitu tetrametoksiflavon (Zhou *et al.*, 2011).

Ditinjau dari spektrum  $^1H$  NMR, jumlah proton dan nilai  $\delta$  pada senyawa Y-ND3 adalah : posisi  $\delta = 3,96$  (d, 6H) 2 gugus metoksi ( $-OCH_3$ );  $\delta = 3,89$  (d, 6H) 2 gugus metoksi ( $-OCH_3$ );  $\delta = 7,69-7,78/C2'$  dan  $C6'$  (m, 2H) masing-masing 1 atom H pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 7,60/C3'$  (d, 1H) 1 atom H pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 7,45/5'$  (d 1H) 1 atom H pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 7,25/C8$  (d, 1H) 1 atom H pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 6,99/C7$  (d 1H) 1 atom H pada cincin aromatik ( $=CH-C$ ).

Ditinjau dari spectrum  $^{13}C$ NMR dan nilai  $\delta$ , menunjukkan jenis karbon pada senyawa Y-ND3 adalah :  $\delta = 56,04, 56,08, 56,13, 60,05$  adalah 4 gugus methoxy ( $-OCH_3$ );  $\delta = 104,66/C8$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 110,91/C5'$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 111,50/C3'$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 119,44/C7$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 122,23/C1'$  adalah C pada cincin aromatik ( $>C=C$ );  $\delta = 123,58/C6'$  CH pada benzene ( $=CH-C$ );  $\delta = 123,79/C2'$  adalah CH pada cincin aromatik ( $=CH-C$ );  $\delta = 124,88/C10$  adalah C pada cincin aromatik ( $>C=C$ );  $\delta = 140,68/C3$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq C-OCH_3$ );  $\delta = 148,80/C6$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq C-OCH_3$ );  $\delta = 150,17/C9$  adalah C pada cincin aromatik ( $>C=C$ );  $\delta = 156,70/C4'$  adalah C pada cincin aromatik yang mengikat gugus methoxy ( $\geq C-OCH_3$ );  $\delta = 151,22/C5$  adalah C pada cincin aromatik

yang mengikat gugus methoxy ( $\geq\text{C}-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 155,42/\text{C}2$  adalah C pada cincin aromatik ( $>\text{C}=\text{C}$ );;  $\delta = 174,78/\text{C}4$  adalah C karbonil ( $>\text{C}=\text{O}$ ).

Berdasarkan perbandingan geseran kimia  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dan juga korelasi pada spektrum HMBC, senyawa XND3 identik dengan senyawa 4',3,5,6-tetramethoxyflavone, dengan rumus struktur ditunjukkan pada gambar 6.1



Gambar 6.1 Struktur molekul 4',3,5,6-tetrametoksiflavon

Senyawa tetrametoksiflavin yang memiliki efek antikanker sudah banyak diisolasi dari tanaman antara lain 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetrametoksiflavin dari tanaman *Adenosma bracteosum* (Nguyen *et al.*, 2020), 3,5,7,4'-tetrametoksiflavin dan 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetrametoksiflavin dari tanaman *Kaempferia parviflora* Wall. (Rahman and Asaduzzaman, 2013) dan zapotin (5,6,2',6'-tetrametoksiflavin) dari tanaman *Casimiroa edulis* (Toton *et al.*, 2012), sedangkan untuk senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavin, belum ditemukan adanya penelitian yang telah mengisolasi senyawa ini.

Beberapa senyawa pernah diisolasi dari tanaman Mundar (*Garcinia forbesii* King.), yaitu 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xantone dan forbexanthone dari ranting tanaman ini (Harrison *et al.*, 1993), dan juga rubraxanthone dari batang tanaman yang memiliki efek antibakteri (Alen *et al.*, 2008). Menurut hasil penelitian Muthia dkk (2019), ekstrak etanol kulit buah mundar memiliki aktivitas antioksidan, namun tidak ditemukan penelitian yang mengisolasi senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavin dari kulit buah mundar dan efek sitotoksiknya.

#### **6.4 Uji Imunositokimia**

Pengujian imunositokimia yang dilakukan adalah melihat pengaruh isolat senyawa terhadap ekspresi p53 dan Bcl2. Menurut Liu *et al.* (2019), protein p53 berperan penting pada proses apoptosis, di mana p53 dapat menginduksi apoptosis, penghentian siklus sel, dan penuaan dalam sel. Penelitian tentang antikanker menyebutkan bahwa banyak kejadian kanker dikarenakan adanya mutasi dari protein

p53 yang berperan dalam proses apoptosis (Zilfou and Scott, 2009). Selain protein p53, beberapa protein lain juga berperan dalam proses apoptosis, salah satu diantaranya adalah Bcl2. Peningkatan resistensi terhadap proses apoptosis dihubungkan dengan peningkatan protein Bcl2 (Perini *et al.*, 2018), dan keluarga Bcl2 yang berperan sebagai anti apoptosis yaitu Bcl2 dan BclX dapat menghambat proses apoptosis (Willis *et al.*, 2003).

Hasil pengujian imunositokimia terhadap sel MCF7 memperlihatkan terjadi peningkatan jumlah protein sel p53 setelah diberikan perlakuan isolat XND3 dan YND3 dibandingkan dengan kontrol, dan terjadi penurunan protein sel Bcl2 setelah diberikan isolat YND3, namun tidak terjadi penurunan setelah diberikan isolat XND3. Hasil pengujian terhadap sel HepG2, terjadi peningkatan jumlah protein sel p53 dan penurunan protein sel Bcl2 setelah diberikan baik isolat XND3 maupun isolat YND3.

### **6.5 Uji Penambatan Molekul (*molecular docking*)**

*Molecular docking* atau penambatan molekul dilakukan untuk memprediksi potensi aktivitas dari senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon yang diisolasi dari kulit buah mundar berdasarkan energi ikatan dan interaksi terhadap sisi aktif dari beberapa reseptor pada kanker payudara dan hati. Pada penelitian ini, digunakan protein struktur dari reseptor dengan PDB ID: 3ERT (Shiau *et al.*, 1998) dan 2J6M (Yun *et al.*, 2007) yang merupakan *Breast Cancer active site receptor*, dan PDB ID: 1YWN

(Miyazaki *et al.*, 2005) dan 1M17 (Stamos *et al.*, 2002) yang merupakan *Liver Cancer active site receptor*.

Hasil re-docking pada ligan asli (4-hydroxitamoxifen) terhadap reseptor 3ERT menghasilkan nilai RMSD sebesar -11,87 kcal/mol dan konstanta inhibisi 1,99 nM. Sementara itu, hasil docking pada ligan uji (4',3,5,6-tetrametoksiflavon) memiliki energi ikatan lebih besar yaitu -8,15 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 1,07  $\mu$ M. Hasil ini menunjukkan bahwa ligan uji memiliki potensi lebih lemah dibandingkan dengan ligan asli. Hasil re-dock menunjukkan bahwa ligan asli membentuk ikatan hydrogen pada residu Glu353 dan Arg394; membentuk ikatan van der Waals pada residu Met343, Leu346, Thr347, Leu349, Asp351, Leu354, Trp383, Leu384, Phe404, Glu419, Gly420, Ile424, Gly521, dan His524; dan membentuk ikatan alkyl dan Pi-alkyl pada residu Ala350, Leu387, Met388, Leu391, Met421, Leu428, dan Leu525. Sedangkan hasil docking ligan uji menunjukkan interaksi berupa ikatan van der Waals pada residu Trp383, Leu387, dan Arg394; membentuk ikatan alkyl dan Pi-alkyl pada residu Leu346, Leu349, Leu391, Leu421, Leu428, Leu525, dan Met528; membentuk ikatan carbon-hydrogen pada residu Phe404; membentuk ikatan Pi-sigma pada Thr347; membentuk ikatan Pi-sulfur pada Met343.

Hasil re-docking ligan asli (AEE788 atau gefinitib) pada reseptor kanker payudara dengan PDB ID 2J6M dengan nilai RMSD sebesar -9,74 kcal/mol dan konstanta inhibisi 73,07 nM. . Sementara itu, hasil docking pada ligan uji (4',3,5,6-tetrametoksiflavon) memiliki energi ikatan lebih besar -5,29 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 132,41  $\mu$ M, hasil ini menunjukkan bahwa ligan uji memiliki potensi

lebih lemah dibandingkan dengan ligan asli. Ligan asli membentuk interaksi berupa ikatan hydrogen pada residu Gln791 dan Met793; membentuk ikatan van der Waals pada residu Val726, Ile744, Met766, Ile789, Leu792, Pro794, Phe795, Gly796, Cys797, Asp800, Tyr801, Glu804, dan Thr854; membentuk ikatan alkyl dan Pi-alkyl pada residu Leu718, Ala743, Lys745, Leu788, dan Leu844; dan membentuk ikatan Pi-sigma pada Thr790, sedangkan pada ligan uji membentuk interaksi berupa ikatan hydrogen pada residu Gly796; membentuk ikatan van der Waals pada residu Ile744, Leu777, Leu788, Ile789, Met793, dan Pro794; membentuk ikatan carbon-hydrogen pada Ala743 dan Glu762; membentuk ikatan Alkyl dan Pi-alkyl pada residu Leu718, Val726, Lys745, Met766, dan Leu792; dan membentuk ikatan Pi-sigma pada residu Thr790 dan Leu844.

Hasil re-docking pada ligan asli (4-amino-furo[2,3-d]pyrimide) dengan nilai RMSD sebesar 0,601 Å memiliki energi ikatan sebesar -10,64 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 15,96 nM sedangkan ligan uji (4',3,5,6-tetrametoksiflavon) memiliki energi ikatan sebesar -7,02 kcal/mol dengan konstanta inhibisi 7,15 µM. Antara ligan asli dengan reseptor pada PDB ID 1YWN menunjukkan adanya interaksi ligan asli terhadap beberapa residu seperti membentuk ikatan hydrogen dengan Asp1044, Glu883, dan Glu195; membentuk ikatan Van der Waals pada residu Gly839, Arg840, Gly841, Gly844, Gln845, Lys866, Ile886, Ile890, Val897, Phe916, Cys917, His1024, dan Leu1033; ikatan halogen (Fluorine) pada residu Ile1042 dan Cys1043; ikatan alkyl dan Pi-alkyl pada residu Leu838, Ala864, Leu887, Val914, Val896, dan Leu1017; dan membentuk Pi-sigma pada Val846, Hasil docking ini



sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (El-Adl et al., 2020). Hal yang sama juga dapat dilihat pada ligan uji terjadi interaksi berupa ikatan hydrogen pada residu Asp1044; ikatan Vand der Waals pada Glu883, Ile890, Cys1022, Ile1042 dan Cys1043; ikatan alky dan Pi-alkyl pada residu Val846, Ala864, Lys866, Ile886, Val896, Val897, Val914, Leu1017, dan His1024; dan ikatan Pi-sigma Leu887. Berdasarkan hasil analisis molecular docking, senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon memiliki interaksi yang sangat baik terhadap sisi aktif reseptor 1YWN meskipun kurang kuat dibandingkan dengan ligan asli.

Hasil re-docking pada reseptor dengan PDB ID: 1M17, ligan asli (4-anilinoquinazoline) menunjukkan nilai RSMD sebesar 1,387 Å dengan energi ikatan sebesar -5,89 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 47,85 µM. sementara itu, hasil *docking* untuk ligan uji (4',3,5,6-tetrametoksiflavon) dengan energi ikatan sebesar -7.63 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 2,54 µM. Interaksi antara ligan asli dengan reseptor membentuk ikatan hydrogen pada residu Gln767; membentuk ikatan Van der Waals pada residu Gly695, Glu738, Cys751, Thr766, Leu768, Pro770, Phe771, Gly772, Thr830, dan Asp831; membentuk ikatan alkyl dan Pi-alkyl pada residu Leu694, Val709, Ala719, Met742, Leu753, dan Leu764; dan membentuk ikatan Pi-cation pada residu Lys721. Sedangkan pada hasil interaksi ligan uji pada reseptor yang sama membentuk ikatan hydrogen pada residu Asp1044; membentuk ikatan Van der Waals pada residu Val846, Ala864, Lys866, Ile886, Val896, Val897, Val914, Leu1017; dan membentuk ikatan Pi-sigma pada residu Leu887. Berdasarkan

energi ikatan dan interaksinya, senyawa ligan uji memiliki potensi yang lebih kuat dibandingkan dengan ligan asli.

## 6.6 Senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon

Telah banyak penelitian yang menemukan senyawa tetrametoksiflavon yang memiliki aktivitas antikanker, antara lain 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetrametoksiflavon dari tanaman *Adenosma bracteosum* (Nguyen *et al.*, 2020), 3,5,7,4'-tetrametoksiflavon dan 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetrametoksiflavon dari tanaman *Kaempferia parviflora* Wall. (Rahman and Asaduzzaman, 2013) dan zapotin (5,6,2',6'-tetrametoksiflavon) dari tanaman *Casimiroa edulis* (Toton *et al.*, 2012), namun senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon belum pernah diisolasi. Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian-penelitian tersebut, dimana senyawa-senyawa tetrametoksiflavon sebagian besar memberikan efek antikanker terhadap sel kanker baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Pada pengujian secara *in silico*, senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon berikatan pada reseptor 3ERT membentuk beberapa ikatan yang sama dibandingkan dengan senyawa 4-hydroxitamoxifen (Shiau *et al.*, 1998) yaitu ikatan Van der Waals pada residu Trp383, ikatan alkyl dan pi-alkyl pada residu Leu 391, Leu425 dan Leu525. Sedangkan pada reseptor 2J6M, senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon membentuk beberapa ikatan yang sama dibandingkan dengan gefinitib (Yun *et al.*, 2007) yaitu ikatan Van der Waals pada residu Ile744, Ile789 dan Pro794, ikatan alkyl dan pi-alkyl pada residu Leu718 dan Lys745, dan ikatan pi sigma pada residu Thr790. Hasil *in*

*silico* ini mendukung hasil secara *in vitro* bahwa senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon memiliki efek antikanker terhadap sel kanker payudara.

Pengujian *in silico* terhadap sel kanker hati, menunjukkan adanya ikatan yang sama antara senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon dengan 4-amino-furo[2,3-d]pyrimide (Miyazaki *et al.*, 2005) terhadap reseptor IYWN yaitu ikatan hydrogen pada residu Asp1044, ikatan Van der Waals pada residu Ile890, ikatan alkyl dan pi-alkyl pada residu Ala864, Val914 dan Leu1017. Sedangkan pada reseptor 1M17, senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon tidak menunjukkan adanya ikatan yang sama dibandingkan dengan 4-anilinoquinazoline (Stamos *et al.*, 2002), namun menghasilkan energi ikatan yang lebih rendah yaitu -7,57 kcal/mol dengan konstanta inhibisi yang juga lebih rendah yaitu 2,83  $\mu$ M. Hasil *in silico* ini mendukung hasil secara *in vitro* bahwa senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon memiliki efek antikanker terhadap sel kanker hati.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka diperoleh kebaruan pada penelitian ini yaitu terdapat kandungan senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon di bagian kulit buah mundar (*Garcinia forbesii* King.), dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* dan *in silico*, dan senyawa tersebut juga berperan meningkatkan protein sel p53 dan menghambat protein sel Bcl2 secara *in vitro*.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan :

1. Ekstrak n-heksan ( $IC_{50}$  103,61±2,34  $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang paling tinggi dibandingkan ekstrak lainnya. Fraksi ND ( $IC_{50}$  51,22±7,04  $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya. Subfraksi ND3 ( $IC_{50}$  21,26±0,86  $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi antikanker yang paling tinggi dibandingkan subfraksi lainnya.
2. Hasil isolasi dan identifikasi terhadap subfraksi ND3 dari kulit buah Mundar (*Garcinia forbesii* King.), diperoleh 1 senyawa golongan flavonoid yang diduga adalah senyawa 4',3,5,6-tetrametoksiflavon.
3. Senyawa yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon memiliki efek sitotoksik dengan  $IC_{50}$  5,03±0,92  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel MCF7 dan  $IC_{50}$  5,87±0,43  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HepG2.
4. Senyawa yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon menunjukkan potensi apoptosis melalui jalur peningkatan p53 dan penghambatan Bcl2.
5. Senyawa yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon menunjukkan potensi sitotoksik berdasarkan uji *in silico* terhadap reseptor kanker payudara 3ERT dan 2J6M dengan konstanta inhibisi 123,48  $\mu\text{M}$  dan 11,16  $\mu\text{M}$ , dan terhadap reseptor kanker hati 1YWN dan 1M17 dengan konstanta inhibisi 9,19  $\mu\text{M}$  dan 2,83  $\mu\text{M}$ .

## 7.2 Saran

1. Menguji secara *in vivo* senyawa aktif yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon terhadap sel kanker payudara dan sel kanker hati pada hewan coba.
2. Menguji secara *in vitro* dan *in vivo* senyawa aktif yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon terhadap sel normal.
3. Menguji secara *in silico* pengaruh senyawa aktif yang diduga senyawa aktif yang diduga 4',3,5,6-tetrametoksiflavon terhadap protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak (*Bcl-2 associated killer*), Bid (*a novel BH3 domain-only death agonist*) dan Bad (*the Bcl-2 associated death molecule*).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H. and Pober, J.S., 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Aisha A.F.A., Khalid M.A.S., Zhari I. and Malik S.A.M. 2012. In vitro and in vivo anti-colon cancer effects of *Garcinia mangostana* xanthones extract. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 12, pp.104-115.
- Alen, Y., Novi S., Dachriyanus A., Munaf A., N.H. Ladjis, M.V. Sargent, 2008. Rubraxhantonen dari *Garcinia forbesii* King. dan bioaktivitasnya, *ResearchGate*, Vol 1(2), pp.192-201.
- Anonim. 2017. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu. LPPT – UGM, Yogyakarta. Diakses dari <https://lppt.ugm.ac.id/wp-content/uploads/sites/718/2018/01/Booklet-Alat-LPPT-2017-rev.pdf> pada tanggal 12 Januari 2021.
- Anonim. 2012. Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT. Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi UGM. Diakses dari <http://www.ccrf.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.010.-Sitotoksik.pdf> pada tanggal 29 Oktober 2015.
- Backer, C.A.D. and Bakhuizen, R.C.V., 1963. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*. Vol. II. Groningen : Noordhoff Press.
- Bakar, M.F.A., Nor E.A., Monica S., Asmah R., Azizul I., 2015. *Garcinia dulcis* Fruit Extract Induces Cytotoxicity and Apoptosis in HepG2 Liver Cancer Cell Line. *BioMed Research International*, Article ID 916902, pp.1-10.
- Bast, R.C., Kufe, D.W. and Pollock, R.E., 1998. *Cancer Medicine*. 5th ed. Holland: B.C Decker Inc.
- Bhaswati, C., Raghuram K., Rupjyoti B., Javadi M., Ajaikumar B., Kunnumakara, Kasturi K., Jibon K., 2016 Anticancer Activity of *Garcinia Morella* on T-Cell Murine Lymphoma Via Apoptotic Induction. *Frontiers in Pharmacology*, 7(3), pp.1-13.
- Bratawidjaja, K.G., 2002. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Edisi ke-5.

Brands S.J., 2007. *Systema Naturae 2000. The taxonomicon Universal Taxonomic Services*, The Netherland.

Brink, M and Escobin, R.P., 2003. *Plant Resources of South-East Asia. Fiber Plants*. Backhuys Publishers, Leiden.

Boyle, N.M.O., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G.R., 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(33), pp.1–14.

Camarillo, I.G., Funian X., S. Madhivanan, Therese S., Maxine N., Lisa M. R., James F. L., Kevin O., Arutselvan N., A. Ramesh, Raji S., 2014. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study, *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, Woodhead Publishing, pp.55-102.

Chang, H.F., Chih-Hsiung Wu, Ling-ling Y., 2013. Antitumor and radical scavenging effect of  $\gamma$ -Mangostin isolated from *Garcinia mangostana* pericarps against hepatocellular carcinoma cell. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65, pp.1419-1428.

Chaverri, J.P., Noemi C.R., Marisol O.I., Jasmin M.P.R., 2008. Medical properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp.3227-3239.

Chen J. and Antonio M.M., 1998. Isolation and Identification of New Polymethoxyflavonoids from *Dancy tangerine* Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 46, pp.1235-1238.

Ding, Y-Q., Ying X., Bin Z., Min-zhi D., Ke-zhong D., 2015. Isolation and Structural Identification of Flavonoids from *Aurantii fructus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 40(12), pp.2352-2358.

Donato M.T., Tolosa L., Gómez-Lechón M.J. 2015. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*. 1250, pp.77-93.

Doyle, A. And Griffiths, J.B., 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York. John Willey and Sons.

El-Adl, K., El-Helby, A.G.A., Sakr, H., Eissa, I.H., El-Hddad, S.S.A., & M.I.A. Shoman, F. 2020. Design, synthesis, molecular docking and anticancer evaluations of

5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione derivatives targeting VEGFR-2 enzyme. *Bioorganic Chemistry*, pp.102-110.

Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan dari bahasa Inggris oleh Kosasih P. dan Iwang S. Bandung: Penerbit ITB.

Harrison, L.J., Lup-San L., Guat-Lee S., Keng-Yeow S., Hugh T.W., 1993. Xanthones From *Garcinia Forbesii*. *Phytochemistry*. vol 33(3), pp.727-728.

Higa, M., Megumi I., Kanae S., Kazuhito O. and Toshimasa S., 2012. Isolation of Six New Flavonoids from *Melicope triphylla*. *Chem. Pharm. Bull.* 60(9), pp.1112-1117.

Hongthong, S., Jatuporn M., Phanruethai P., Darunee S., Palangpon K., Samran P., Pawinee P., Surawat J., Kanoknetr S., Thaworn J., Narong N., Vichai R., Chutima K., 2016 Cytotoxic lanostanes from fruit of *Garcinia wallichii* Choisy (Guttiferae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 26, pp.5773-5779.

Houghton, P.J. and Raman, A., 1998. *Laboratory handbook for fractionation of natural extracts*. Chapman and Hall, London.

Ionta M., Guilherme A.F.S., Evandro L.N., Ederson D.C., Adam A.M., Welton R., Marisi G.S., Glaucia M.M.S., Joao H.G.L., and Marcelo H.S. 2015. 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells. *Molecules*. 20. pp.12804-12816.

Irshad, A.H., Ahmad, S., Noor, F., Fabelboum, I., Awen, B., 2010. Anticancer activity of Vinca Alkaloids. *Conference: First International Medical Congress*. Omar Al -Mukhtar University, AI-Beida, Libya (April, 23 - 25, 2010).

Jenie, U.A., Leonardus B.S.K., Muhammad H., Rymond J.R., Akhmad D., 2014. *Teknik Modern Spektroskopi NMR: Teori dan Aplikasi dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik*. LIPI Press. Hal.1-40.

Joharman, 2017. Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Beberapa Bagian Tanaman dari Mundar (*Garcinia forbesii* King.) (Uji pendahuluan yang tidak dipublikasikan).

Kaennakam S., Pongpun S., Santi T., 2015. Kaennacowanols A-C, three new xanthones and their cytotoxicity from the roots *Garcinia cowa*. *Fitoterapia*, 102, pp.171-176.



Kastan, M.B., 1997. *Molecular Biology of Cancer : The Cell Cycle*. In *De Vita Jr. Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia. Lippincott Raven Pub, pp.79-100.

Katzung, B.G., 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Buku 3 edisi 8. Diterjemahkan dari bahasa Inggris oleh Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Empat.

Kardinan, A., dan Taryono, 2003. *Tanaman Obat Penggempur Kanker*. Agromedia Pustaka. Depok.

Kar, B. and Sivamani S., 2015. Apoptosis: Basic Concepts, Mechanisms and Clinical Implications. *Int J Pharm Sci Res*. 6(3), pp.940-950.

Kemenkes RI, 2019. *Hari Kanker Sedunia*. Diakses dari [https://www.kemkes.go.id/article/view/19020100003/hari-kanker-sedunia\\_2019.html](https://www.kemkes.go.id/article/view/19020100003/hari-kanker-sedunia_2019.html) pada tanggal 4 September 2020.

King, R.J.B., 2000. *Cancer Biology*. 2nd edition. Harlow-England-London-New York: Pearson Education.

Kristanti, A.N., Nanik S.A., Mulyadi T., Bambang K., 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.

Le, D.H., Katsumi N., Yukiko T., Yoshiyuki M., and Takao T., 2016. Polyprenylated Benzoylphloroglucinols with DNA Polymerase Inhibitory Activity from the Fruits *Garcinia schomburgkiana*. *Journal of Natural Products*, 79, pp.1798-1807.

Li G., Sakina M.P., Larisa N., Jeremy J.J. 2014. Inhibition of CHOP accentuates the apoptotic effect of  $\alpha$ -mangostin from the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*) in 22Rv1 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 453, pp.75-80.

Lim, T.K., 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: volume 2, fruits*. Springer science+Business Media B.V., pp.41-43.

Liu, J., Cen Z., Wenwei H., Zhaohui F., 2019. Tumor Suppressor p53 and Metabolism. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), pp.284-292.

Ma'at, S., 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Surabaya: Airlangga University Press.

Mc Donald, F. and Ford, C.H.J., 1997. *Molecular Biology of Cancer*. Oxford. BIOS. Scientific Pub.

Miyazaki, Y., Matsunaga, S., Tang, J., Maeda, Y., Nakano, M., Philippe, R. J., Shibahara, M., Liu, W., Sato, H., Wang, L., & Nolte, R. T., 2005. Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(9), pp.2203–2207.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J., 2009. AutoDock4 and AutodockTools4: Automated Docking with Selectivity Receptor Flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), pp.2785–2791.

Motiejunas, D. and Wade, R., 2006. *Structural, Energetics, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions*. In J. B. Taylor & D. J. Triggler (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 4: Computer-Assisted Drug Design Elsevier Vol. 4*, pp.193-214.

Mudiana D., 2017. *Surat Keterangan Identifikasi*. UPT Balai Konservasi Tumbuhan. Kebun Raya Purwodadi, LIPI, Pasuruan.

Mukesh, B. and Kumar R. 2011. Molecular Docking: A Review. *Int J Res Ayurv Pharm*. 2(6), pp.1746-1751.

Murray, J. B., Davidson, J., Chen, I., Davis, B., Dokurno, P., Graham, C. J., Harris, R., Jordan, A., Matassova, N., Pedder, C., Ray, S., Roughley, S. D., Smith, J., Walmsley, C., Wang, Y., Whitehead, N., Williamson, D. S., Casara, P., Le Diguarher, T., Hubbard, R. E., 2019. Establishing Drug Discovery and Identification of Hit Series for the Anti-apoptotic Proteins, Bcl-2 and Mcl-1. *ACS Omega*, 4(5), pp.8892–8906.

Negi, J.S., V.K. Bisht, P. Singh, M.S.M. Rawat and G.P Joshi., 2013. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Applied Chemistry*. ,Article ID621459, 9 page.

Nguyen, N.H., Qui T.H.T., Quang T.P., Thi N.H.L., Van T.P., Thuc-Huy D., and Van G.V., 2020. Ancicancer Activity of Novel Plant Extracts and Compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in Human Lung and Liver Cancer Cells. *Molecules*. Jun 24;25(12):2901, pp.1-16.

Pecorino, L. 2005. *Molecular Biology of Cancer Mechanism, Target, and Therapeutics*. Oxford University Pers.

Perini, G.F., Glaciano N.R., Jorge V.P.N., Laura T.C., Nelson H., 2018. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 11:65, pp.1-15.

Pieme, C.A., Pathaleon A., Emmanuel Y., Ajit K.S., 2015. Epigarcinol and isogarcinol isolated from the root of *Garcinia ovalifolia* induce apoptosis of human promyelocytic leukemia (HL-60 cells). *BMC Res Notes*, 8, pp.700-709.

Purnomo, H., 2011. *Kimia Komputasi*. Penerbit Buku Pustaka Pelajar: Jogjakarta.

Pusztai L., 1996. *Cell Proliferation in Cancer ; Regulatory Mecanisms of Neoplastic Cell growth*, Oxford University Press, New York.

Rahman, M.M., and Asaduzzaman K., 2013. Anticancer Potential of South Asian Plants. Review. *Nat. Prod. Bioprospect.* 3, pp.74-88.

Rejitha, G., Suraj, R., Azman, H., Vignesh, M., Proom, P. dan Setiawan, D., 2007. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. 4th edition, Jakarta : Puspa Swara, Anggota Ikapi.

Rita, W. Susannah, I Wayan Suirta, dan Ali Sabikin. 2008. Isolasi Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica charantia* Linn). *Jurnal Kimia*. 2(1), Januari 2008, hal.1-6.

Sales, L., Julia A.P., Kleiton S.B., Maria S.B., Carlos A.S., Luiz G.T., Marcelo H.D.S., Marisa L., Jaqueline C.D.O., 2015. Anticancer activity of 7-epiclusianone a benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. *BMC Complementaary & Alternative Medicine*, 15, pp.393-400.

Schlesinger, Paul H. 2013. *Apoptosis*. Encyclopedia Britannica. Diakses dari <https://www.britannica.com/science/apoptosis> pada tanggal 17 Juni 2021.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), pp.927–937.

Sholihah, M., Usman A., I Wayan B., 2017. Aplikasi Gelombang Ultrasonik untuk Meningkatkan Rendamen Ekstraksi dan Efektivitas Antioksidan dari Kulit Manggis. *Jurnal Keteknikan Pertanian*. Vol. 5 No. 2, hal.161-168.

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., & Eigenbrot, C., 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-

anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp.46265–46272.

Sudiana, I. K., 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*, Salemba Medika, Jakarta.

Sugiyama, S., Kaoru U., Masanori K., Akira U. and Takao T., 1993. Studies on the Differentiation Inducers of Myeloid Leukemic Cells from Citrus Species. *Chem. Pharm. Bull.* 41(4), pp.714-719.

Suhartati, T., 2017. *Dasar - Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*, AURA, Bandar Lampung, Indonesia, hal.41-49.

Sukandar, E.R., Taslim E., Sri F., Pongpun S., Thammarat A., Santi T., 2016. Cylindroxanthones A-C, three new xanthones and their cytotoxicity from the stem bark of *Garcinia cylindrocarpa*. *Fitoterapia*, 108, pp.62-65.

Sukardja, I.D.G., 2000. *Onkologi Klinik*. Edisi kedua, Surabaya: Airlangga University Press.

Sunarto, P.A., 1977. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta : Penerbit Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.

Tamborini, E., Perrone F., Frattini M., Negri T., Aiello A., Gloghini A. 2008. *Principles of molecular oncology*. Third edition. Totowa, New jersey : Humana, pp.54-56.

Tovar, C., Graves, B., Packman, K., Filipovic, Z., Xia, B. H. M., Tardell, C., Garrido, R., Lee, E., Kolinsky, K., To, K. H., Linn, M., Podlaski, F., Wovkulich, P., Vu, B., & Vassilev, L. T. (2013). MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Research*, 73(8), pp.2587–2597.

Toton, E., Lisiak N., Rubis B., Budzianowski J., Gruber P., Hofmann J., and Rybczynska M., 2012. The Tetramethoxyflavone Zapotin Selectively Activates Protein Kinase C Epsilon, Leading to its Down-modulation Accompanied by Bcl-2, c-Jun and c-Fos decrease. *European Journal of Pharmacology*. 682(1-3), pp.21-28.

Vet J.N.I., de Boer M.A., van den Akker B.E.W.M., Siregar S., Budiningsih S., Tyasmorowati D., Moestikaningsih, Cornain S., Peters A.A.W., Fleuren G.J., 2008.

Prevalence of human papillomavirus in Indonesia a populationbased study in three regions. *British Journal of Cancer*, 99(I), pp.214-218.

Wang, L., Wu, Y., Deng, Y., Kim, B., Pierce, L., Krilov, G., Lupyán, D., Robinson, S., Dahlgren, M. K., Greenwood, J., Romero, D. L., Masse, C., Knight, J. L., Steinbrecher, T., Beuming, T., Damm, W., Harder, E., Sherman, W., Brewer, M., Abel, R., 2015. Accurate and reliable prediction of relative ligand binding potency in prospective drug discovery by way of a modern free-energy calculation protocol and force field. *Journal of the American Chemical Society*, 137(7), pp.2695–2703.

Weaver, B.A., 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Molecular Biology Of The Cell, *Mol Biol Cell*, 25(18), pp.2677–2681.

Williams D.H. and Ian F., 2009. *Metode Spektroskopi Dalam Kimia Organik*. Diterjemahkan dari bahasa Inggris oleh Lolita, July M. dan Winny R.S., Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal.73-274.

Willis, S., Catherine L.D., Mark G.H., David C.S.H., 2003. The BCL-2 regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science*, 116, pp.4053-4056.

World Cancer Research Fund International, 2020. *Worldwide Cancer Data*, Global Cancer Statistics for the Most Common Cancers. Diakses dari <https://gco.iarc.fr> Pada tanggal 4 Februari 2021.

Wu, J., Guangrui H., Yajing L., Xiaojiaoyang L., 2020. Flavanoids from *Aurantii fructus immaturus* and *Aurantii fructus*: promising phytomedicines for the treatment of liver diseases. *Chin Med*. 26;15, pp.89-94.

Xu, L., Lao Y., Zhao Y., Qin J., Fu W., Zhang Y., Xu H., 2015. Screening Active Compounds from *Garcinia* Species Native to China Reveals Novel Compounds Targeting the STAT/JAK Signaling Pathway. *BioMed Research International*, Article ID 910453, pp. 267-273.

Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J., 2007. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell*, 11(3), pp.217–227.

Zhang, L, Jiling F, Siyuan K, Man W, Zhichao X, Baojun Z, Wenwei F, Yuanzhi L, Hongsheng T, Hongxi X., 2016. Nujiangexathone A, a novel compound from

Garcinia nuijiangensis, suppresses servical cancer growth by targeting hnRNPK. *Cancer Letterrs*, 380, pp.447-456.

Zhou, J., Guirong X., Xinjian Y., 2011. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications. : Isolated Compounds A-C*. Vol. 1.

Zilfou, J.T. and Scott W.L., 2009. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, a001883, pp.1-12.

## Lampiran-1

### Identifikasi Tanaman Mundar (*Garcinia forbesii* King.)



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)  
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN  
KEBUN RAYA PURWODADI

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163  
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 4266046  
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



#### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No 0269 /IPH.06/HM/II/2017

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

**Joharman, NIM : 051417097303**

Mahasiswa Program Doktor Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 20 Februari 2017, berdasarkan hasil identifikasi/determinasi, spesimen herbarium dan koleksi kebun, An Alphabetical List of Plant Species Cultivated in The Bogor Botanic Gardens tahun 2010, serta buku Economic Products of the Malay Peninsula Vol.I karangan L.H Burkill tahun 1966, nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Garcinia*  
Species : *Garcinia forbesii* King

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XIV klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*  
Class : *Magnoliopsida*  
Subclass : *Dilleniidae*  
Ordo : *Theales*  
Family : *Clusiaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 27 Februari 2017  
An. Kepala

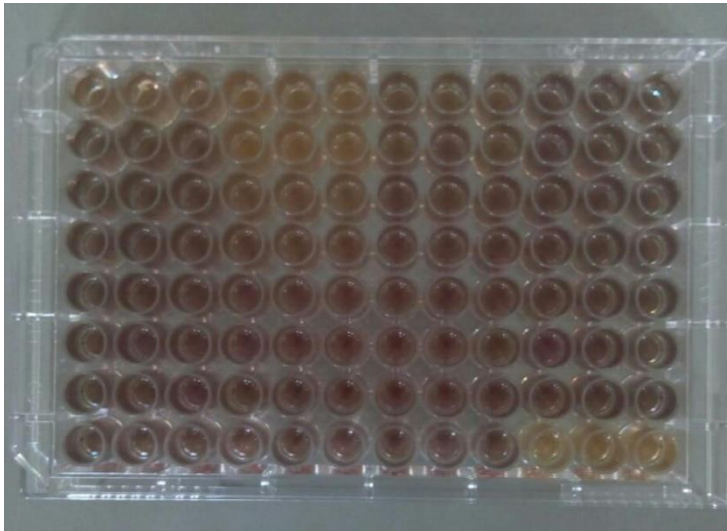
Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

## Lampiran-2

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian ekstrak n-heksan, DCM, etil asetat, n-butanol dan air terhadap sel MCF7



MCF7 20/17  
10

Absorbance Report  
Single Wavelength  
Mes= F3. 595nm  
Incubation= OFF

Blank Mean 0.000  
Std. Dev. 0.000

	1	2	3
A	0.165	0.158	0.156
B	0.237	0.268	0.264
C	0.264	0.275	0.297
D	0.277	0.299	0.309
E	0.286	0.329	0.312
F	0.289	0.316	0.319
G	0.259	0.286	0.308
H	0.276	0.274	0.262

	4	5	6
A	0.121	0.128	0.119
B	0.128	0.125	0.117
C	0.196	0.204	0.198
D	0.257	0.247	0.271
E	0.287	0.286	0.295
F	0.310	0.311	0.309
G	0.326	0.341	0.303
H	0.287	0.299	0.305

	7	8	9
A	0.219	0.211	0.217
B	0.259	0.271	0.263
C	0.313	0.307	0.312
D	0.327	0.337	0.338
E	0.338	0.353	0.321
F	0.338	0.328	0.331
G	0.307	0.322	0.334
H	0.288	0.298	0.272

	10	11	12
A	0.266	0.267	0.266
B	0.315	0.305	0.275
C	0.338	0.312	0.298
D	0.339	0.326	0.305
E	0.343	0.333	0.304
F	0.325	0.341	0.292
G	0.321	0.336	0.314
H	0.087	0.089	0.091



### Lampiran-3

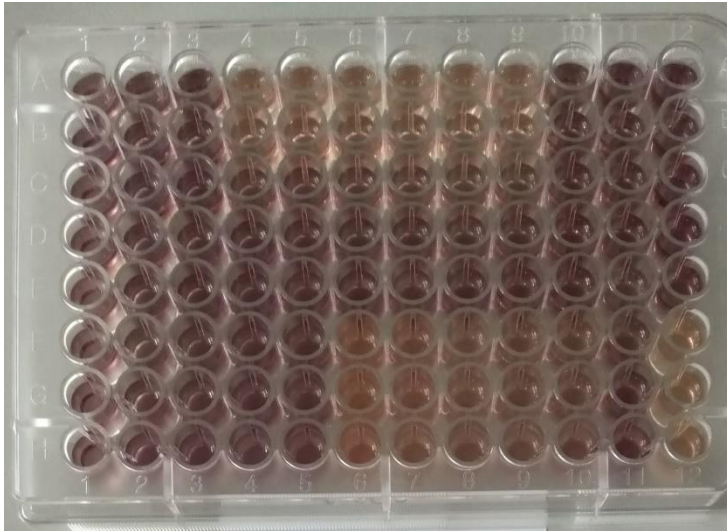
Foto *plate* dan hasil elisa pengujian ekstrak n-heksan, DCM, etil asetat, n-butanol dan air terhadap sel HepG2



	Blank	Mean	Std. Dev.
		0.000	0.000
	1	2	3
A	0.122	0.113	0.108
B	0.098	0.099	0.094
C	0.096	0.090	0.093
D	0.220	0.244	0.251
E	0.428	0.447	0.467
F	0.499	0.508	0.525
G	0.486	0.540	0.483
H	0.492	0.544	0.538
	4	5	6
A	0.106	0.107	0.112
B	0.093	0.099	0.103
C	0.096	0.091	0.094
D	0.279	0.261	0.256
E	0.425	0.413	0.406
F	0.476	0.505	0.489
G	0.536	0.560	0.478
H	0.531	0.543	0.498
	7	8	9
A	0.247	0.221	0.212
B	0.334	0.348	0.334
C	0.476	0.475	0.444
D	0.540	0.525	0.464
E	0.499	0.528	0.503
F	0.565	0.507	0.508
G	0.512	0.496	0.455
H	0.492	0.456	0.485
	10	11	12
A	0.348	0.365	0.361
B	0.431	0.348	0.343
C	0.399	0.427	0.374
D	0.486	0.463	0.421
E	0.465	0.458	0.461
F	0.513	0.524	0.466
G	0.417	0.437	0.412
H	0.101	0.088	0.091

## Lampiran-4

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian fraksi NA, NB, NC dan ND terhadap sel MCF7



MCF-7

Raw Data Report  
Single Wavelength  
Mes= F5, 595nm  
Incubation= OFF

	1	2	3
A	0.425	0.397	0.420
B	0.479	0.441	0.425
C	0.463	0.447	0.465
D	0.424	0.454	0.431
E	0.416	0.447	0.421
F	0.417	0.446	0.467
G	0.434	0.430	0.448
H	0.450	0.440	0.435
	4	5	6
A	0.233	0.230	0.233
B	0.257	0.188	0.264
C	0.415	0.388	0.380
D	0.460	0.463	0.442
E	0.501	0.492	0.493
F	0.420	0.445	0.238
G	0.455	0.430	0.248
H	0.413	0.433	0.271
	7	8	9
A	0.231	0.225	0.235
B	0.246	0.240	0.250
C	0.351	0.357	0.364
D	0.451	0.419	0.429
E	0.422	0.432	0.432
F	0.244	0.289	0.308
G	0.245	0.269	0.319
H	0.273	0.317	0.336
	10	11	12
A	0.439	0.411	0.461
B	0.440	0.435	0.465
C	0.421	0.423	0.447
D	0.438	0.437	0.464
E	0.472	0.451	0.463
F	0.304	0.442	0.259
G	0.300	0.436	0.268
H	0.339	0.436	0.291

## Lampiran-5

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian fraksi NA, NB, NC dan ND terhadap sel HepG2



*HepG2*

Raw Data Report  
 Single Wavelength  
 Mes= FS, 595nm  
 Incubation= OFF

	1	2	3
A	0.436	0.437	0.447
B	0.466	0.464	0.463
C	0.468	0.492	0.473
D	0.523	0.462	0.518
E	0.481	0.441	0.481
F	0.434	0.415	0.485
G	0.442	0.440	0.458
H	0.447	0.465	0.473

	4	5	6
A	0.201	0.213	0.206
B	0.190	0.211	0.214
C	0.443	0.386	0.455
D	0.496	0.524	0.527
E	0.557	0.553	0.571
F	0.489	0.493	0.206
G	0.402	0.536	0.229
H	0.492	0.531	0.260

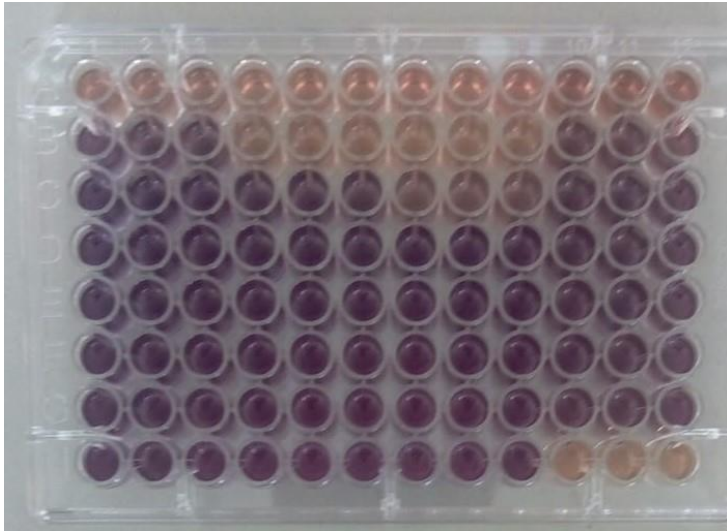
	7	8	9
A	0.207	0.213	0.212
B	0.200	0.200	0.201
C	0.426	0.419	0.409
D	0.518	0.490	0.491
E	0.471	0.400	0.488
F	0.214	0.225	0.238
G	0.213	0.240	0.243
H	0.238	0.247	0.272

	10	11	12
A	0.446	0.461	0.494
B	0.431	0.467	0.451
C	0.453	0.430	0.451
D	0.502	0.476	0.486
E	0.516	0.483	0.504
F	0.250	0.497	0.216
G	0.247	0.471	0.250
H	0.267	0.499	0.276

## Lampiran-6

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian subfraksi ND1, ND2 dan ND3 terhadap sel MCF7



MCF7 Joharman

Raw Data Report  
Single Wavelength  
Mes= F5, 595nm  
Incubation= OFF

	1	2	3
A	0.159	0.154	0.158
B	0.491	0.528	0.535
C	0.628	0.703	0.667
D	0.617	0.691	0.748
E	0.619	0.701	0.693
F	0.684	0.721	0.722
G	0.628	0.709	0.671
H	0.669	0.667	0.615

	4	5	6
A	0.135	0.142	0.145
B	0.156	0.155	0.162
C	0.629	0.606	0.568
D	0.718	0.687	0.705
E	0.717	0.758	0.788
F	0.693	0.761	0.727
G	0.677	0.729	0.718
H	0.642	0.658	0.624

	7	8	9
A	0.154	0.155	0.163
B	0.147	0.146	0.151
C	0.353	0.343	0.346
D	0.763	0.748	0.681
E	0.691	0.723	0.754
F	0.726	0.745	0.727
G	0.703	0.693	0.706
H	0.619	0.649	0.612

	10	11	12
A	0.202	0.182	0.196
B	0.448	0.453	0.391
C	0.554	0.542	0.503
D	0.621	0.573	0.555
E	0.613	0.658	0.572
F	0.649	0.584	0.525
G	0.589	0.588	0.524
H	0.138	0.136	0.165

## Lampiran-7

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian subfraksi ND1, ND2 dan ND3 terhadap sel HepG2



absorbance report  
HepG2, Johanna

Raw Data Report  
Single Wavelength  
Wav= 595nm  
Incubation= OFF

	1	2	3
A	0.137	0.132	0.132
B	0.157	0.150	0.148
C	0.517	0.506	0.571
D	0.599	0.602	0.637
E	0.634	0.660	0.669
F	0.636	0.644	0.660
G	0.625	0.654	0.693
H	0.681	0.651	0.620

	4	5	6
A	0.134	0.131	0.144
B	0.119	0.127	0.128
C	0.197	0.220	0.207
D	0.575	0.610	0.567
E	0.718	0.738	0.696
F	0.626	0.710	0.692
G	0.656	0.654	0.645
H	0.560	0.600	0.645

	7	8	9
A	0.139	0.145	0.145
B	0.125	0.130	0.128
C	0.127	0.132	0.133
D	0.513	0.458	0.428
E	0.552	0.595	0.616
F	0.630	0.645	0.615
G	0.594	0.598	0.571
H	0.571	0.555	0.536

	10	11	12
A	0.148	0.153	0.173
B	0.155	0.164	0.163
C	0.158	0.158	0.171
D	0.206	0.219	0.211
E	0.301	0.319	0.311
F	0.287	0.290	0.292
G	0.289	0.313	0.305
H	0.124	0.134	0.157

## Lampiran-8

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian isolat XND3, YND3 dan doxorubicin terhadap sel MCF7



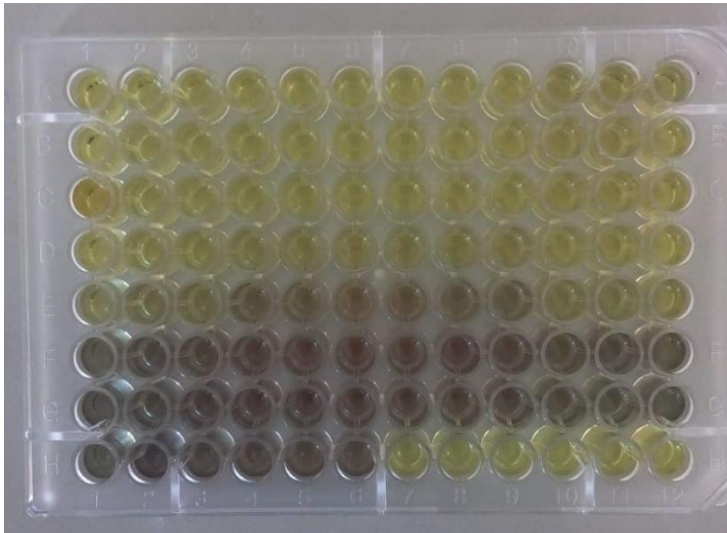
MCF7

Absorbance Report  
Single Wavelength  
Mes= F3, 595nm  
Incubation= OFF

	Blank Mean	Std. Dev.	
	0.000	0.000	
	1	2	3
A	0.091	0.093	0.098
B	0.079	0.081	0.078
C	0.104	0.116	0.111
D	0.159	0.172	0.172
E	0.478	0.420	0.565
F	0.698	0.804	0.785
G	0.621	0.728	0.750
H	0.727	0.651	0.641
	4	5	6
A	0.115	0.086	0.085
B	0.118	0.110	0.116
C	0.158	0.159	0.156
D	0.591	0.547	0.604
E	0.734	0.728	0.716
F	0.677	0.680	0.668
G	0.744	0.826	0.856
H	0.652	0.646	0.617
	7	8	9
A	0.092	0.091	0.095
B	0.166	0.226	0.222
C	0.254	0.274	0.322
D	0.816	0.764	0.795
E	0.743	0.733	0.812
F	0.783	0.784	0.737
G	0.887	0.816	0.843
H	0.071	0.071	0.071
	10	11	12
A	0.164	0.154	0.159
B	0.131	0.136	0.138
C	0.116	0.115	0.120
D	0.128	0.124	0.117
E	0.822	0.812	0.715
F	0.809	0.886	0.720
G	0.881	0.851	0.699
H	0.074	0.074	0.072

## Lampiran-9

Foto *plate* dan hasil elisa pengujian isolat XND3, YND3 dan doxorubicin terhadap sel HepG2



YND3

Absorbance Report  
Single Wavelength  
Mes= F3. 595nm  
Incubation= OFF

Blank Mean 0.000  
Std. Dev. 0.000

	1	2	3
A	0.095	0.083	0.098
B	0.077	0.078	0.080
C	0.122	0.077	0.077
D	0.087	0.086	0.082
E	0.159	0.162	0.170
F	0.381	0.382	0.386
G	0.432	0.380	0.417
H	0.394	0.521	0.440

	4	5	6
A	0.084	0.082	0.083
B	0.073	0.073	0.075
C	0.081	0.077	0.079
D	0.114	0.112	0.113
E	0.287	0.270	0.272
F	0.418	0.398	0.423
G	0.415	0.434	0.419
H	0.412	0.394	0.398

	7	8	9
A	0.084	0.085	0.089
B	0.072	0.080	0.076
C	0.081	0.084	0.085
D	0.128	0.130	0.128
E	0.289	0.273	0.273
F	0.401	0.435	0.408
G	0.387	0.402	0.407
H	0.062	0.065	0.065

	10	11	12
A	0.125	0.129	0.128
B	0.104	0.105	0.106
C	0.090	0.096	0.096
D	0.085	0.085	0.086
E	0.145	0.148	0.143
F	0.365	0.394	0.371
G	0.383	0.376	0.380
H	0.073	0.071	0.070

Lampiran-10

Uji statistik ekspresi p53 oleh sel MCF7 dan HepG2

**Between-Subjects Factors**

		N
Perlakuan	Kontrol_HepG2	4
	Kontrol_MCF7	4
	XND3_HepG2	4
	XND3_MCF7	4
	YND3_HepG2	4
	YND3_MCF7	4

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: p53

F	df1	df2	Sig.
2.991	5	18	.039

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: p53

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16109.194 <sup>a</sup>	5	3221.839	64.652	.000
Intercept	30775.830	1	30775.830	617.569	.000
Perlakuan	16109.194	5	3221.839	64.652	.000
Error	897.009	18	49.834		
Total	47782.033	24			
Corrected Total	17006.202	23			

a. R Squared = ,947 (Adjusted R Squared = ,933)



Lampiran-11

Post hoc test LSD dan Duncan ekspresi p53

Multiple Comparisons

Dependent Variable: p53

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Kontrol_HepG2	Kontrol_MCF7	5.8450	4.99168	.273	-4.8421	16.1321
		XND3_HepG2	-64.4250	4.99168	.000	-74.9121	-53.9379
		XND3_MCF7	-33.7275	4.99168	.000	-44.2146	-23.2404
		YND3_HepG2	-52.2800	4.99168	.000	-62.7871	-41.7929
		YND3_MCF7	-14.8100	4.99168	.008	-25.2971	-4.3229
	Kontrol_MCF7	Kontrol_HepG2	-5.8450	4.99168	.273	-16.1321	4.8421
		XND3_HepG2	-70.0700	4.99168	.000	-80.5571	-59.5829
		XND3_MCF7	-39.3725	4.99168	.000	-49.8596	-28.8854
		YND3_HepG2	-57.9250	4.99168	.000	-68.4121	-47.4379
		YND3_MCF7	-20.4550	4.99168	.001	-30.9421	-9.9679
	XND3_HepG2	Kontrol_HepG2	64.4250	4.99168	.000	53.9379	74.9121
		Kontrol_MCF7	70.0700	4.99168	.000	59.5829	80.5571
		XND3_MCF7	30.6975	4.99168	.000	20.2104	41.1846
		YND3_HepG2	12.1450	4.99168	.028	1.6579	22.6321
		YND3_MCF7	49.6150	4.99168	.000	39.1279	60.1021
	XND3_MCF7	Kontrol_HepG2	33.7275	4.99168	.000	23.2404	44.2146
		Kontrol_MCF7	39.3725	4.99168	.000	28.8854	49.8596
		XND3_HepG2	-30.6975	4.99168	.000	-41.1846	-20.2104
		YND3_HepG2	-18.5525	4.99168	.002	-29.0396	-8.0654
		YND3_MCF7	18.9175	4.99168	.001	8.4304	29.4046
YND3_HepG2	Kontrol_HepG2	52.2800	4.99168	.000	41.7929	62.7871	
	Kontrol_MCF7	57.9250	4.99168	.000	47.4379	68.4121	
	XND3_HepG2	-12.1450	4.99168	.028	-22.6321	-1.6579	
	XND3_MCF7	18.5525	4.99168	.002	8.0654	29.0396	
	YND3_MCF7	37.4700	4.99168	.000	26.9829	47.9571	
YND3_MCF7	Kontrol_HepG2	14.8100	4.99168	.008	4.3229	25.2971	
	Kontrol_MCF7	20.4550	4.99168	.001	9.9679	30.9421	
	XND3_HepG2	-49.6150	4.99168	.000	-60.1021	-39.1279	
	XND3_MCF7	-18.9175	4.99168	.001	-29.4046	-8.4304	
	YND3_HepG2	-37.4700	4.99168	.000	-47.9571	-26.9829	

Based on observed means.  
 The error term is Mean Square(Error) = 49,834.  
 \*. The mean difference is significant at the .05 level.

p53

Perlakuan	N	Subset				
		1	2	3	4	5
Duncan <sup>a,b</sup> Kontrol_MCF7	4	3.5650				
Kontrol_HepG2	4	9.2100				
YND3_MCF7	4		24.0200			
XND3_MCF7	4			42.9375		
YND3_HepG2	4				61.4900	
XND3_HepG2	4					73.6350
Sig.		.273	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.  
 The error term is Mean Square(Error) = 49,834.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

b. Alpha = ,05.

Lampiran-12

Uji statistik ekspresi Bcl2 oleh sel MCF7 dan HepG2

**Between-Subjects Factors**

		N
Perlakuan	Kontrol_HepG2	4
	Kontrol_MCF7	4
	XND3_HepG2	4
	XND3_MCF7	4
	YND3_HepG2	4
	YND3_MCF7	4

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: Bcl2

F	df1	df2	Sig.
1.321	5	18	.300

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Bcl2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1297.024 <sup>a</sup>	5	259.405	30.727	.000
Intercept	9286.207	1	9286.207	1099.974	.000
Perlakuan	1297.024	5	259.405	30.727	.000
Error	151.960	18	8.442		
Total	10735.191	24			
Corrected Total	1448.984	23			

a. R Squared = ,895 (Adjusted R Squared = ,866)

Lampiran-13

Post hoc test LSD dan Duncan ekspresi Bcl2

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Bcl2

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Kontrol_HepG2	Kontrol_MCF7	10.7900 <sup>*</sup>	2.05453	.000	6.4738	15.1064
		XND3_HepG2	17.8075 <sup>*</sup>	2.05453	.000	13.4911	22.1239
		XND3_MCF7	10.1950 <sup>*</sup>	2.05453	.000	5.8798	14.5114
		YND3_HepG2	21.8000 <sup>*</sup>	2.05453	.000	17.4838	26.1164
		YND3_MCF7	19.5350 <sup>*</sup>	2.05453	.000	15.2188	23.8514
	Kontrol_MCF7	Kontrol_HepG2	-10.7900 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-15.1064	-6.4738
		XND3_HepG2	7.0175 <sup>*</sup>	2.05453	.003	2.7011	11.3339
		XND3_MCF7	-.5950	2.05453	.775	-4.9114	3.7214
		YND3_HepG2	11.0100 <sup>*</sup>	2.05453	.000	6.6938	15.3264
		YND3_MCF7	8.7450 <sup>*</sup>	2.05453	.000	4.4288	13.0814
	XND3_HepG2	Kontrol_HepG2	-17.8075 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-22.1239	-13.4911
		Kontrol_MCF7	-7.0175 <sup>*</sup>	2.05453	.003	-11.3339	-2.7011
		XND3_MCF7	-7.8125 <sup>*</sup>	2.05453	.002	-11.9289	-3.2961
		YND3_HepG2	3.9925	2.05453	.088	-.3239	8.3089
		YND3_MCF7	1.7275	2.05453	.411	-2.5889	6.0439
	XND3_MCF7	Kontrol_HepG2	-10.1950 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-14.5114	-5.8788
		Kontrol_MCF7	.5950	2.05453	.775	-3.7214	4.9114
		XND3_HepG2	7.6125 <sup>*</sup>	2.05453	.002	3.2961	11.9289
		YND3_HepG2	11.8050 <sup>*</sup>	2.05453	.000	7.2888	15.9214
		YND3_MCF7	9.3400 <sup>*</sup>	2.05453	.000	5.0238	13.6564
YND3_HepG2	Kontrol_HepG2	-21.8000 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-26.1164	-17.4838	
	Kontrol_MCF7	-11.0100 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-15.3264	-6.6938	
	XND3_HepG2	-3.9925	2.05453	.088	-8.3089	.3239	
	XND3_MCF7	-11.8050 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-15.9214	-7.2888	
	YND3_MCF7	-2.2650	2.05453	.285	-6.5814	2.0514	
YND3_MCF7	Kontrol_HepG2	-19.5350 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-23.8514	-15.2188	
	Kontrol_MCF7	-8.7450 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-13.0814	-4.4288	
	XND3_HepG2	-1.7275	2.05453	.411	-6.0439	2.5889	
	XND3_MCF7	-9.3400 <sup>*</sup>	2.05453	.000	-13.6564	-5.0238	
	YND3_HepG2	2.2650	2.05453	.285	-2.0514	6.5814	

Based on observed means.  
 The error term is Mean Square(Error) = 8,442.  
 \*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Bcl2

Perlakuan	N	Subset		
		1	2	3
Duncan <sup>a,b</sup> YND3_HepG2	4	11.2250		
YND3_MCF7	4	13.4900		
XND3_HepG2	4	15.2175		
Kontrol_MCF7	4		22.2350	
XND3_MCF7	4		22.8300	
Kontrol_HepG2	4			33.0250
Sig.		.081	.775	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

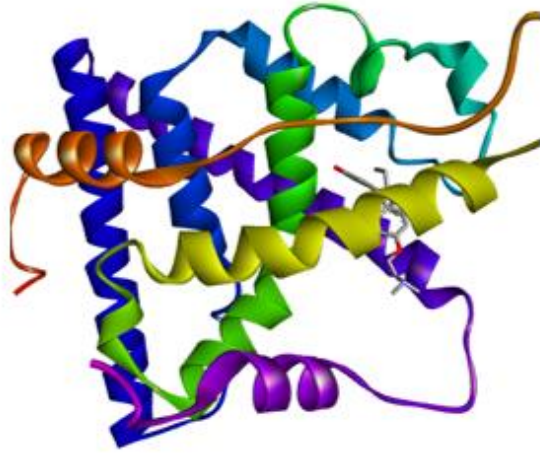
The error term is Mean Square(Error) = 8,442.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

b. Alpha = ,05.

Lampiran-14

*Breast cancer active site receptor (3ERT dan 2J6M), dan Liver cancer active site receptor (1YWN dan 1M17)*



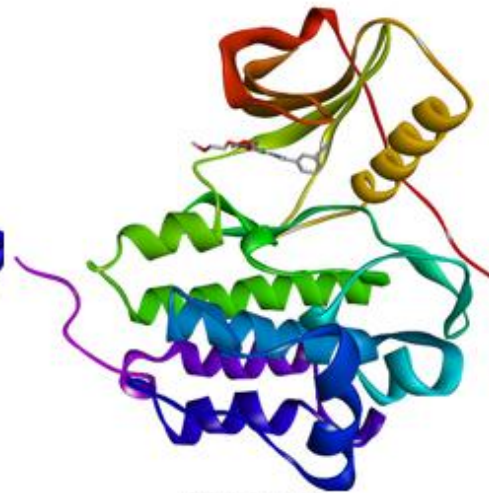
PDB ID: 3ERT



PDB ID: 2J6M



PDB ID: 1YWN



PDB ID: 1M17