



SURAT KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR : 23 /UN3.1.5/2021

tentang

PENETAPAN TIM PENGUJI UJIAN TERTUTUP DISERTASI
MAHASISWA PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI
SEMESTER GASAL TAHUN AKADEMIK 2020/2021

DEKAN FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

- Menimbang :
- a. Bahwa untuk penyelenggaraan Ujian Tertutup Disertasi Mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, perlu dibentuk Tim Penguji Ujian Tertutup Disertasi
 - b. Bahwa untuk keperluan tersebut di atas perlu diterbitkan Surat Keputusan Dekan
- Mengingat :
1. Undang-Undang Republik Indonesia nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional
 2. Undang-Undang nomor 14 tahun 2005, tentang Guru dan Dosen
 3. Undang – Undang nomor 12 tahun 2012, tentang Pendidikan Tinggi
 4. Peraturan Pemerintah nomor 57 tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga
 5. Keputusan Menteri PTIP nomor 64 tahun 1965, tentang Pendirian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
 6. Peraturan Pemerintah nomor 30 tahun 2006 tentang Penetapan Universitas Airlangga sebagai Badan Hukum Milik Negara
 7. Peraturan Rektor Universitas Airlangga nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;
 8. Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Airlangga Nomor 3/H3.MWA/K/2020 tentang Pengangkatan Rektor Universitas Airlangga Periode 2020-2025;
 9. Keputusan Rektor Universitas Airlangga No. 726/UN3/2020, tentang Pengangkatan Dekan Fakultas, Direktur Sekolah Pascasarjana dan Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga Periode 2020-2025;
 9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga nomor 9057/J03/HK/2006 tentang Struktur Organisasi Universitas Airlangga
 10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga No. 1732/UN3/2015 tanggal 12 November 15, tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana Periode 2015-2020
 11. 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
 12. Keputusan Rektor Universitas Airlangga nomor : 13/H3/PR/2011 tanggal 20 Juni 2011, tentang Pengelolaan Pendidikan Program Magister dan Program Doktor Universitas Airlangga




LANJUTAN.....

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

MEMUTUSKAN

- Menetapkan Pertama : Mengangkat Tim Penguji Ujian Tertutup Disertasi Mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Semester Gasal tahun 2020/2021 dengan susunan Ketua dan Anggota seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini;
- 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 2020/2021 dengan ketentuan apabila dikemudian hari terdapat kekeliruan dan atau kekurangan akan diperbaiki sebagaimana mestinya

Ditetapkan : DI SURABAYA
Pada tanggal : 11 Februari 2021
an,

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 : 23/UN3.1.5/2021

Tanggal : 11 Februari 2021

PENETAPAN TIM PENGUJI UJIAN TERTUTUP DISERTASI
MAHASISWA PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI
SEMESTER GASAL TAHUN 2020/2021

NO	NAMA PENGUJI	STATUS	NAMA/ NIM YANG DIUJI	JUDUL DISERTASI
1.	Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo EW, M.S.	Ketua	Martha Ervina Nim.051517097308	Aktivitas Antikanker Dan Mekanisme Apoptosis Senyawa Stereroid Dari Daun Mindi (Melia Azedarach L.) Terhadap Sel T47D
2.	Prof. Dr. apt. Sukardiman, M.S.	Anggota		
3.	Apt. Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D	Anggota		
4.	Prof. Dr. apt. Siswandono, MS.	Anggota		
5.	Prof. Dr. apt. Mangestuti Agil, M.S.	Anggota		
6.	Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS	Anggota		
7.	Prof. Dr. apt. Sismindari, SU., Ph.D	Penguji Luar		
8.	apt. Rr. Retno Widyowati, S.Si., M.Pharm., Ph.D	Anggota		



Dekan

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



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS FARMASI

Gedung Nanizar Zaman Joenoes, Kampus C UNAIR Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115

Telp.031-5933150, Fax.031-5935249

Website : <http://www.ff.unair.ac.id>; Email : info@ff.unair.ac.id

Nomor : 68/UN3.1.5/PPd/2021
Lamp. : 1 (satu) berkas
Hal : **Mohon kesediaan sebagai Panitia Ujian Disertasi Tertutup**
A.n. Martha Ervina

5 Februari 2021

Kepada, Yth :

- | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo EW, M.S. (KETUA) | Fakultas Farmasi Unair |
| 2. Prof. Dr. apt. Sukardiman, M.S. | Fakultas Farmasi Unair |
| 3. apt. Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D | Fakultas Farmasi Unair |
| 4. Prof. Dr. apt. Siswandono, MS. | Fakultas Farmasi Unair |
| 5. Prof. Dr. apt. Mangestuti Agil, M.S. | Fakultas Farmasi Unair |
| 6. Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS | Fakultas Farmasi Unair |
| 7. Prof. Dr. apt. Sismindari, SU., Ph.D (Penguji Luar) | Fakultas Farmasi UGM |
| 8. apt. Rr. Retno Widyowati, S.Si., M.Pharm., 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, atas nama:

Nama : **MARTHA ERVINA**
NIM : 051517097308
Judul : Aktivitas Antikanker Dan Mekanisme Apoptosis Senyawa Steroid Dari Daun Mindi (Melia Azedarach L.) Terhadap Sel T47D
Promotor : Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS.
Ko-Promotor : Drs. apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D

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

Hari, tanggal : Kamis, 11 Februari 2021
Pukul : 09.00-12.00 WIB
Tempat : Online WFH (Work From Home)
Link Zoom : Meeting ID : 923 9106 3863 Passcode : 009060

Berkaitan dengan hal tersebut diatas, kami mohon kesediaan Bapak/Ibu mengisi surat pernyataan kesediaan sebagai Ketua/Anggota Panitia Ujian Disertasi Tertutup sesuai sebagaimana terlampir yang selanjutnya diserahkan kembali kepada kami dalam waktu yang tidak terlalu lama, guna diproses lebih lanjut

Demikian atas perhatian dan kehadirannya, kami ucapkan terima kasih.

Dekan

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

SURAT PERNYATAAN KESEDIAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :
NIP/NIK :
Pangkat/Golongan :
Jabatan :
Instansi/Unit Kerja :
Keterangan adm : Atas nama :
Nama Bank :
No. Rekening :

MENYATAKAN

Bahwa dengan ini saya **BERSEDIA / TIDAK BERSEDIA** *) menjadi Penguji Ujian Disertasi Tertutup Program Doktor Program Studi Ilmu Farmasi untuk mahasiswa sebagai berikut :

Nama : **MARTHA ERVINA**
NIM : 051517097308
Judul : Aktivitas Antikanker Dan Mekanisme Apoptosis Senyawa Steroid Dari Daun Mindi (Melia Azedarach L.) Terhadap Sel T47D

Yang akan diselenggarakan pada :

Hari, tanggal : **Kamis, 11 Februari 2021**
Pukul : **09.00-12.00 WIB**
Tempat : Online WFH (Work From Home)
Link Zoom : Meeting ID : 923 9106 3863 Passcode : 009060

Demikian Surat Pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

.....
Yang membuat,

NIP.

Catatan :

1. *) coret yang tidak perlu.
2. Mohon Formulir yang telah diisi diserahkan kembali kepada kami dapat melalui Email Prodi S3 Doktor Ilmu Farmasi dengan Alamat : **doktor.if@ff.unair.ac.id** atau Fax : **(031) 5020514**

NASKAH UJIAN DISERTASI TERTUTUP

DISERTASI
AKTIVITAS ANTIKANKER DAN MEKANISME APOPTOSIS
SENYAWA STEROID DARI DAUN MINDI (*MELIA AZEDARACH* L.)
TERHADAP SEL T47D



MARTHA ERVINA

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 1 FEBRUARI 2021**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS.

NIP. 196301091988101001

Ko-promotor



Drs. apt. Hadi Poerwono, MSc., PhD.

NIP. 196308221989021002

Mengetahui



Ketua Program Studi Doktor Ilmu Farmasi

Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi., Apt.

NIP. 195908051987011001

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIAT

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

Nama : Martha Ervina

NIM : 051717097302

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

**Aktivitas Antikanker dan Mekanisme Apoptosis Senyawa Steroid dari
Daun Mindi (*Melia azedarach* L.) terhadap sel T47D**

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 perundangundangan.

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

Surabaya, 20 Januari 2021

Yang membuat pernyataan,



Martha Ervina

§SURAT PERNYATAAN
PERSETUJUAN DIUNGGAH SECARA ELEKTRONIK

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

Nama : Martha Ervina

NIM : 051717097302

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

**Aktivitas Antikanker dan Mekanisme Apoptosis Senyawa Steroid dari
Daun Mindi (*Melia azedarach* L.) terhadap sel T47D**

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, 20 Januari 2021

Yang membuat pernyataan,



Martha Ervina

**AKTIVITAS ANTIKANKER DAN MEKANISME APOPTOSIS
SENYAWA STEROID DARI DAUN MINDI (*MELIA AZEDARACH* L.)
TERHADAP SEL T47D**

DISERTASI

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

Oleh:

**MARTHA ERVINA
NIM. 051717097302**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

Ujian Tertutup Disertasi

Tanggal 1 Februari 2021

PANITIA PENGUJI TERTUTUP DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo Eko W., MS

Anggota : 1. Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS.

2. apt. Drs. Hadi Poerwono, MSc., PhD.

2. Prof. Dr. apt. Mangestuti Agil, MS.

3. Prof. Dr. apt. Siswandono, MS.

5. Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS.

6. Prof. apt. Sismindari, SU., PhD.

7. apt. Rr. Retno Widyowati, S.Si., M.Pharm., PhD.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Nomor: 4/UN3.1.5/2021

Tanggal: 20 Januari 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Kuasa atas berkat dan rahmat yang diberikanNya, kami dapat menyelesaikan disertasi ini. Penyusunan disertasi merupakan salah satu syarat dari pendidikan S3 di Universitas Airlangga. Penelitian ini merupakan bagian dari peta penelitian pengembangan sediaan bahan alam sebagai antikanker dari kelompok penelitian Prof. DR. apt. Sukardiman, MS. Mindi (*M. azedarach* L.) tanaman penghijauan yang kurang dimanfaatkan, ternyata memiliki potensi yang lebih baik sebagai apoptosis terhadap sel T47D daripada doksorubisin.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankan kami menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

Kemenristekdikti atas Beasiswa Pengembangan Pendidikan Dalam Negeri (BPPDN) 2017-2020, PKPI (Peningkatan Kualitas Publikasi Ilmiah) 2019 dan PDD (Penelitian Disertasi Doktor) 2020 dan 2021.

Universitas Airlangga Rektor, Wakil Rektor dan Direktur Akademik, Fakultas Farmasi, Ketua dan Sekretaris Program Studi Doktor Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof. Dr. apt. Siswandono., MS., dan Dr. apt. Tristiana Erawati, MS., serta Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, MSi dan apt. Suciati, SSi., MPhil., PhD. serta peneliti di *Institut of Tropical Disease* (ITD) yang telah menyediakan kesempatan, fasilitas dan bantuan yang kami perlukan sepanjang studi dan atas penyelenggaraan Pendidikan yang berkualitas.

Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya: Ketua Yayasan Prof. Drs. Hengky Supit, Ak. dan Prof. Dr. Arsono, Ak., Rektor apt. Drs. Kuncoro Foe, G.Dipl.Sc., PhD., Dekan apt. Sumi Wijaya, S.Si., PhD. dan pimpinan Fakultas Farmasi untuk kesempatan studi lanjut dan *support* sepanjang studi saya.

Prof. Dr. apt. Sukardiman, MS., selaku promotor dan dosen wali, dan apt. Drs. Hadi Poerwono, MSc., PhD. sebagai kopromotor; yang selalu bersemangat pagi dan penuh kesabaran membimbing, mengarahkan dan *support* dari awal sampai dengan akhir studi di S3 Farmasi Unair.

Para penguji: Prof. Dr. apt. Mangestuti Agil, MS., Prof. Dr. apt. Bambang Prajogo EW, MS., Prof. Dr. apt. Siswandono, MS., Prof. Dr. apt. Suko Hardjono, MS., Prof. apt. Sisindari, SU., PhD. (Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada) dan yang banyak memberikan masukan dan saran untuk penyempurnaan penelitian dan hasil yang saya peroleh.

Ibu apt. Rr. Retno Widyowati, S.Si., MSc., PhD. yang bersedia membantu saat aplikasi beasiswa PKPI, sehingga memperoleh kesempatan riset di Graduate School of Biomedical & Health Sciences Hiroshima University. Juga sebagai penguji untuk koreksi dan masukan yang sangat penting terhadap hasil yang kami peroleh.

Prof. Katsuyoshi Matsunami, PhD. (Graduate School of Biomedical & Health Sciences Hiroshima University) untuk kebaikan hati bersedia menerima saya belajar dan bekerja di kelompok penelitiannya dan Prof. Hideaki Otsuka, PhD., Sensei Kawakami, PhD., Sensei Sugimoto Yamano, PhD. yang membantu melengkapi analisis sampel-sampel saya.

Kepala Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada: Prof Sugiyono atas ijin penelitian uji sitotoksik dan apoptosis.

Para staf tata usaha dan laboran di Unair: Pak Adi, Pak Aris, Fresty Katili, A.Md dan laboran Sudjarwo, Kusaeri; B. Tri AA, Dwi, Y.D. Setiawan (UKWMS), Rumbiwati, ST dan Farid (FK UGM)

Teman-teman S3 Ilmu Farmasi Unair: M. Rizky FP (Universitas Muhamadiyah Palangkaraya), Budiastuti (PT Herbalcore), Joharman (Universitas Lambung Mangkurat-Kalimantan Selatan), Nuri (Universitas Jember), Misgiati (Akafarma Malang), Nisa (Kalimantan Selatan) dan Lidya Tumewu (Unair); di Hiroshima Melanny, Fitrah, Pho & Charinrat (Thailand), Wang (China), Amanny, Zidan (Mesir), Uyen, Yuni, Arini, Shibata, Nishida (Hiroshima)

Keluarga dan orang tua, Ibu Subiyanti, Bpk (alm) Petrus Pardiyono; Dr. Ignatius Srianta STP, MP dan Ananda Timotius Danuagung Wicaksono untuk doa, pendampingan, dukungan fisik, moril dan materiil, yang menjadi penyemangat untuk segera menyelesaikan studi.

Dan pihak-pihak terkait yang tidak dapat dituliskan satu per satu disini.

Semoga Allah yang Maha Pengasih membalas dengan berkah yang melimpah atas integritas, ketekunan dan ketelitian bekerja, kerjasama yang baik, dan persahabatan yang saya terima dari Anda sekalian, sehingga penelitian disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Besar harapan, penelitian ini memberikan sumbangsih dan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam pemanfaatan tanaman Mindi lokal sebagai antikanker payudara.

Surabaya, 20 Januari 2021
Peneliti,

Martha Ervina

RINGKASAN

AKTIVITAS ANTIKANKER DAN MEKANISME APOPTOSIS SENYAWA STEROID DARI DAUN MINDI (*MELIA AZEDARACH L.*) TERHADAP SEL T47D

Martha Ervina

Kanker menjadi topik yang menarik dalam pengembangan obat berkenaan dengan prevalensinya yang terus meningkat baik secara global maupun nasional dan merupakan penyebab kematian tertinggi kedua. Diantara jenis kanker tersebut, kanker payudara menunjukkan peningkatan sebesar 0.09 ‰ selama kurun waktu lima tahun dan menjadi tiga terbesar menggeser kanker paru dan kolorektal. Meskipun terdapat pengembangan metode pengobatan kanker, kemoterapi masih menjadi metode pengobatan yang paling banyak digunakan. Efek samping yang tidak dapat dihindari dan timbulnya resistensi, menyebabkan pentingnya upaya untuk menemukan bahan kemoterapi dengan selektivitas yang tinggi.

Mindi (*Melia azedarach L.*) sudah tersebar di lebih dari sepertiga belahan dunia, namun masih kurang dimanfaatkan untuk kesehatan, terlebih di Indonesia. Dari penelitian terdahulu dapat diketahui potensi sitotoksik dari berbagai bagian *M. azedarach* dan *Melia* spesies lainnya terhadap beberapa galur sel kanker. Beberapa menyampaikan isolat limonoid, triterpenoid dan flavonoid aktif sitotoksik dan menunjukkan potensi apoptosis melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Peneliti terdahulu juga menemukan sitotoksik steroid dari daun *M. azedarach* terhadap sel A549, H460 dan U251, namun belum dieksplorasi sampai dengan mekanismenya. Proliferasi sel kanker payudara dipengaruhi oleh hormon estrogen, progesteron dan *human epidermal growth 2*. Terapi dengan estrogen dan tamoxifen (kompetitif estrogen) digunakan pada beberapa tahapan pengobatan kanker payudara. Dari beberapa mekanisme, apoptosis dan hambatan siklus pertumbuhan menarik untuk diteliti. Apoptosis merupakan jalur antikanker yang dapat mengembalikan kemampuan homeostatis sel, sedangkan hambatan siklus sel dapat mencegah pembelahan sel yang tidak terkendali. Oleh karena itu pada penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas dan mekanisme antikanker dari isolat steroid daun *M. azedarach* terhadap sel T47D. Aktivitas ditentukan dengan parameter IC₅₀ sitotoksik dan mekanisme apoptosis dan hambatan siklus sel dengan flowcytometer dan imunositokimia. Pemisahan dan isolasi dilakukan dengan penunjuk bioasai sitotoksik.

Penelitian dibagi menjadi empat tahap yaitu penyiapan bahan, isolasi senyawa aktif, pengujian sitotoksik dan apoptosis, serta elusidasi struktur isolat aktif. Bahan disiapkan dan distandarisasi sesuai dengan pedoman standarisasi bahan. Bahan memiliki ciri khas makroskopis dan mikroskopis antara lain daun Mindi lebih kecil, membulat, majemuk dan berujung *inipinnate* serta khas trikoma multiselulernya. Hasil standarisasi daun dari penelitian ini dapat melengkapi data standarisasi batang/ bijinya. Skrining daun Mindi menunjukkan adanya kandungan tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, glikosida, dan steroid. Ekstrak disiapkan dengan menggunakan etanol 96%, yang menghasilkan rendemen sebesar 30,1±0,42%. Ekstrak dianalisis kandungannya dengan LC-MS menunjukkan 23 puncak dengan persentase luas area 0,37% sampai 14,26% dengan dugaan kandungan steroid, limonoid dan fenolik. Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair menghasilkan fraksi n-heksana (MH), etil asetat (ME) dan air (MW). Uji sitotoksik dengan sel T47D menunjukkan ME yang paling aktif dengan IC₅₀ 166,48 µg/mL,

dibandingkan doksorubisin (169,54 µg/mL). Pemisahan selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan berbagai sistem fase diam dan fase gerak (Diaion, silika gel dan ODS dengan kloroform, metanol dan aseton), sampai dihasilkan subfraksi yang siap dipisahkan lebih baik dengan KCKT. Uji sitotoksik subfraksi menunjukkan subfraksi ME11 dan ME12 lebih poten dibanding subfraksi lainnya (IC₅₀ 92,16 dan 113,15 µg/mL). Dari optimasi pemisahan ME111-1110 dan ME121-1210 didapatkan pemisahan yang paling baik adalah subfraksi ME114 dan ME127. Pemisahan subfraksi ME114 dan ME127 menghasilkan isolat ME114A, ME127A dan ME127C. Ketiganya memiliki IC₅₀ berturut-turut >500; 173,62; 60,86 µg/mL. Isolat ME114A berupa serbuk, berwarna putih kekuningan, dan menghasilkan bercak kuning pada KLT dengan H₂SO₄. Dari identifikasi diketahui berat molekulnya 626,1373 dengan formula C₂₇H₃₀O₁₇. Senyawa 114A diduga sebagai kuersetin 3-*O*-β-*D*-galaktopiranosil-(1-6)-β-*D*-galaktopiranosida. Isolat ME127A dan ME127C diduga sebagai isomer dengan karakteristik fisik serbuk amorf, berwarna putih kekuningan, berbercak ungu pada uji KLT dengan H₂SO₄. Elusidasi strukturnya menunjukkan dua ikatan rangkap pada C5-C6 serta C14-C15, gugus o-hidroksil pada C3 dan C4, substituen metil pada C10 dan C7 atau C13, serta karbonil pada C16 dan etil pada C17. Keduanya memiliki formula C₂₁H₃₀O₃, dengan berat molekul 330,208. ME127A diduga sebagai 17-etil-3,4-dihidroksi-10,12-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]fenantren-16-on, sementara ME127C diperkirakan sebagai 17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on. Uji hambatan siklus sel kedua isolat menunjukkan penurunan jumlah sel pada fase subG₁, G₁ dan G₂; sementara apoptosis menghasilkan peningkatan jumlah sel apoptosis dan peningkatan rasio bax/bcl-2. Aktivitas ME127A dan ME127C teramati lebih baik dari pembanding doksorubisin.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan aktivitas dua isolat isomer steroid derivat baru yaitu pregnen-16-on (ME127A dan ME127C) yang diduga sebagai 17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*] fenantren-16-on dan 17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on, dari fraksi etil asetat daun Mindi (*Melia azedarach* L.) lokal. Isolat memiliki mekanisme sebagai apoptosis melalui jalur intrinsik bax/bcl-2 dan penghambat siklus sel pada subG₁, G₁ dan G₂.

SUMMARY

Anticancer Activity and Apoptosis Mechanism of Steroids Compounds from Mindi (*Melia azedarach* L.) leaves against T47D cells

Martha Ervina

The prevalence of cancer continues to increase and becomes the second leading cause of death both globally and nationally. Especially for breast cancer, which had an increase of 0.09 % over five years periods and has shifted to be the third largest, instead of lung and colorectal cancers. Despite the development of cancer treatment, chemotherapy is still one of the most widely used methods. The unavoidable side effects and the emergence of resistance, make it important to find high selective chemotherapy agents.

Mindi (*Melia azedarach* L.) has been spread in more than a third of the world, but less used for health, especially in Indonesia. Previous research showed the cytotoxic activities of various parts of *M. azedarach* and other *Melia* species against several cell lines. Some delivered limonoid, triterpenoid and flavonoid active cytotoxic isolates and showed their potential for apoptosis via intrinsic and extrinsic pathways. Moreover, others have also reported *Melia*'s leaves steroid cytotoxicity against A549, H460 and U251 cells, though they have not been explored to their mechanisms. Among anticancers, the apoptotic and cell cycle inhibition may restore the homeostatic of cells and retain cell proliferation. Furthermore, breast cancer cells are influenced by hormones on its proliferation, such as estrogen, progesterone and human epidermal growth 2. Therapy with estrogen and tamoxifen (competitive estrogen) are used in several stages of breast cancer treatments. Therefore, this study aims to examine the activities and anticancer mechanisms of steroids compounds from *M. azedarach* leaves against T47D cells. The activities were determined by IC₅₀ cytotoxic parameters, while the apoptotic and cell cycle inhibition mechanisms were examined by flowcytometer and immunocytochemicals. The separation and isolation were carried out using various chromatography methods with cytotoxic guided bioassay.

The study was divided into four stages, namely material preparation, isolation, cytotoxic and apoptosis testing, elucidation of the active isolates structure. *Melia*'s dried leaves were prepared and standardized according to material standardization guidelines. The plant has macroscopic and microscopic characteristics, which were include smaller in size, rounded shape dan innipinate *Melia* leaves and multicellular trichomes. These results would complement the data standardization of the *Melia*'s stems/ seeds. The *Melia*'s leaves phytochemical screening showed the presence of tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, glycosides, and steroids. The 96% ethanol extract yielded of 30.1 ± 0.42%. The contents of the extract were analyzed with LC-MS. It showed 23 peaks with an area percentage of 0.37% to 14.26%. They were presumed as steroid, limonoid and phenolic contents. Liquid-liquid fractionation produced n-hexane (MH), ethyl acetate (ME) and water (MW) fractions. The T47D cytotoxic assay showed that the most active fraction was ME fraction with IC₅₀ 166.48 µg/mL, compared to doxorubicin (169.54 µg/mL). The separation was then carried out further by column chromatography using various systems of stationary and mobile phases (Diaion, silica gel and ODS with chloroform, methanol, acetone and water). The cytotoxic test showed that ME11 and ME12 subfractions were more potent than others (IC₅₀ 92.16 and 113.15 µg/mL). The HPLC eluent optimization among ME111-1110 and ME121-1210 resulted

complete separation of ME114 and ME127. Furthermore, these processes obtained ME114A, 127A and ME127C isolates which have IC₅₀ (against T47D cell line) >500; 173.62; 60.86 µg/mL, respectively. ME114A is a powder, yellowish white, and produces TLC yellow spots with H₂SO₄ spray reagents. From the identification, it has 626.1373 molecular weight with the formula C₂₇H₃₀O₁₇. It is thought to be quercetin-3-*O*-β-*D*-galactopyranosyl-(1-6)-β-*D*-galactopyranoside. Meanwhile the ME127A and ME127C were suggested as isomers with the physical characteristics of amorphous powder, yellowish white, TLC purple spots with H₂SO₄. The elucidation of the structure showed two double bonds at C5-C6 and C14-C15, an *o*-hydroxyl group at C3 and C4, the methyl substituents at C10 and C7 or C13, and a carbonyl at C16 and ethyl at C17. Both have the formula C₂₁H₃₀O₃, with a molecular weight of 330.208. ME127A was assumed as 17-ethyl-3,4-dihydroxy-7,10-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodecahydro-16H-cyclopenta [α] phenanthrene-16-one, while ME127C was assumed as 17-ethyl-3,4-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17 - dodecahydro-16H-cyclopenta [α] - phenanthrene -16-one. The cell cycle inhibition test of the compounds resulted the decrease in the number of the cells in the subG, G1 and G2 phases; while obtained in increase of apoptotic cells and also the Bax/ Bcl-2 ratio by ME127A and ME127C treatments. Both have better apoptotic mechanism than doxorubicin.

This study concluded that two new bioactive derivates of pregnen-16-one steroids isomer, namely ME127A and ME127C, can be isolated from the ethyl acetate fraction of Mindi (*M. azedarach* L.) leaves. They are suggested as 17-ethyl-3,4-dihydroxy-7,10-dimethyl-1,2,3,4, 7,8,9,10,11,12,13,17-dodecahydro-16H-cyclopenta [α] fenantren-16-one and 17-ethyl-3,4-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodecahydro-16H-cyclopenta [α]phenanthrene-16-one. They showed intrinsic apoptotic and cell cycle mechanisms against T47D cell. The bax/bcl-2 intrinsic apoptosis pathway was observed, while cell cycle inhibitions resulted in the subG1, G1 and G2 phases.

ABSTRACT

Anticancer Activity and Apoptosis Mechanism of Steroids Compounds from Mindi (*Melia azedarach* L.) leaves against T47D cells

Martha Ervina

The prevalence of cancer continues to increase and becomes the second leading cause of death, both globally and nationally. Especially for breast cancer, which has increase in numbers and shifted to be the third largest. The unavoidable side effects and the emergence of resistance of chemotherapies, make important to find high selective chemotherapy agents. Among anticancer mechanisms, the apoptosis is restoring the homeostatic ability of the cell pathways. Mindi (*Melia azedarach* L.), has grown in more than a third of the world, but less used for health purposes, especially in Indonesia. Previous research not only yielded the cytotoxic potential of various parts of *M. azedarach* and other *Melia* species against several cell lines, but also isolated steroids compounds from it. Meanwhile, therapy with estrogen and tamoxifen (competitive estrogen) are used in several stages of breast cancer treatments. Therefore, this study aims to examine the activities and anticancer mechanisms of steroids compounds from *M. azedarach* leaves against T47D cells. The activities were determined by IC₅₀ cytotoxic, while the apoptosis and cell cycle inhibition were examined by flowcytometer and immunocytochemicals. The separation and isolation were carried out using various chromatography methods with cytotoxic guided bioassay.

The isolation procedure and LC-MS analysis applied to the standardized plant obtained tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, glycosides, and steroids. The extract was prepared by using 96% ethanol, while fractionation by liquid-liquid extraction produced n-hexane (MH), ethyl acetate (ME) and water (MW) fractions. Cytotoxic bioassay showed ME fraction as the most active with IC₅₀ 166.48 µg /mL, which was slightly better than doxorubicin. Furthermore, ME11 and ME12 subfractions showed more potent activity than the others (IC₅₀ 92.16 and 113.15 µg/mL). The HPLC optimization of the ME11 and ME12 subfractions resulted in ME114A, ME127A and ME127C components (IC₅₀> 500, 173.62, 60.86 µg/mL, respectively). ME114A compound has molecular weight of 626.1373 with the formula C₂₇H₃₀O₁₇; which is thought to be quercetin-3-*O*-β-*D*-galactopyranosyl-(1-6)-β-*D*-galactopyranoside. ME127A and ME127C were suggested as isomers steroids with molecular weight of 330.208 and the formula C₂₁H₃₀O₃.

This study concluded that two new bioactive derivates of pregnen-16-one steroids isomer, namely ME127A and ME127C, can be isolated from the ethyl acetate fraction of Mindi (*M. azedarach* L.) leaves. They are suggested as 17-ethyl-3,4-dihydroxy-7,10-dimethyl-1,2,3,4, 7,8,9,10,11,12,13,17-dodecahydro-16H-cyclopenta [*a*] fenantren-16-one and 17-ethyl-3,4-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodecahydro-16H-cyclopenta[*α*]phenanthrene-16-one. They showed intrinsic apoptotic and cell cycle mechanisms against T47D cell. The bax/bcl-2 intrinsic apoptosis pathway was observed, while cell cycle inhibitions resulted in the subG1, G1 and G2 phases.

Keywords: *M. azedarach*, cytotoxic, T47D, apoptosis, cell cycles, steroids

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Dalam	i
Surat Pernyataan Bebas Plagiat	ii
Surat Pernyataan Persetujuan Diunggah Secara Elektronik	iii
Prasyarat Gelar	iv
Lembar Pengesahan	v
Penetapan Panitia Penguji	vi
Ucapan Terima Kasih	vii
Ringkasan	ix
<i>Summary</i>	xi
<i>Abstract</i>	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xx
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	5
1.3.Tujuan Penelitian	5
1.4.Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Tinjauan tentang Mindi (<i>Melia azedarach</i> L.)	7
2.2. Kandungan senyawa <i>M. azedarach</i> L.	9
2.3. Steroid tanaman	13
2.4. Siklus pertumbuhan sel normal	15
2.5. Kanker payudara	18
2.6. Apoptosis	19
2.6.1. Jalur ekstrinsik dan intrinsik apoptosis	19
2.6.2. Regulasi apoptosis	21
2.6.3. Deteksi sel apoptosis	22
2.7. Uji sitotoksitas MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida)	23
2.8. Tinjauan tentang teknik pemisahan dan identifikasi	23
2.8.1. Ekstraksi	23
2.8.2. Kromatografi lapis tipis	23
2.8.3. Kromatografi kolom dan kromatografi cair kinerja tinggi	27
2.9. Tinjauan Spektroskopi	28
2.9.1. Spektroskopi inframerah	29
2.9.2. Spektroskopi RMI (Resonansi Magnet Inti)	30
2.9.3. Spektroskopi massa	30
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	32

3.1. Uraian kerangka konsep	32
3.2. Hipotesa penelitian	38
BAB 4. METODE PENELITIAN	39
4.1. Rancangan penelitian	39
4.2. Sampel penelitian	39
4.3. Skema penelitian	40
4.4. Variabel penelitian	41
4.5. Definisi operasional	42
4.6. Bahan dan instrumen penelitian	42
4.6.1. Bahan penelitian	43
4.6.2. Instrumen penelitian	43
4.7. Lokasi penelitian	44
4.8. Prosedur pengambilan/ pengumpulan data	45
4.8.1. Penyiapan bahan uji penelitian	45
4.8.1.1. Standarisasi simplisia	45
4.8.1.2. Pembuatan ekstrak etanol daun Mindi	46
4.8.1.3. Pemisahan ekstrak etanol dengan ekstraksi cair-cair	46
4.8.1.4. Isolasi senyawa aktif dengan kromatografi cair kinerja tinggi	47
4.8.2. Pengujian sitotoksitas pada sel kanker payudara T47D	47
4.8.2.1. Persiapan kultur sel	47
4.8.2.2. Penyiapan larutan uji	48
4.8.2.3. Uji sitotoksik	48
4.8.2.4. Uji induksi apoptosis dengan flowcytometer	50
4.8.2.5. Uji hambatan siklus sel T47D	50
4.8.2.6. Uji ekspresi p53, bax, bcl2, caspase 7 sel T47D dengan perubahan Morfologi dan imunositokimia	50
4.8.2.7. Disposal limbah sisa pengujian	51
4.8.3. Identifikasi bahan aktif dan struktur isolat aktif	52
4.8.3.1. Identifikasi dengan spektroskopi infra merah	52
4.8.3.2. Identifikasi dengan spektroskopi massa	52
4.8.3.3. Identifikasi dengan spektroskopi RMI	52
4.9. Cara Pengolahan dan Analisa Data	52
BAB 5. DATA DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	53
5.1. Penyiapan bahan penelitian	53
5.2. Pemisahan senyawa aktif	59
5.3. Uji sitotoksik subfraksi	62
5.4. Elusidasi struktur isolat	63
5.4.1. Elusidasi isolat ME114A	63
5.4.2. Elusidasi isolat ME127A	68
5.4.3. Elusidasi isolat ME127C	74
5.5. Uji mekanisme penghambatan siklus sel dan apoptosis dari isolat	82
5.5.1. Uji penghambatan siklus sel	82
5.5.2. Uji mekanisme apoptosis dan nekrosis	83
5.5.3. Uji imunositokimia p53, bax, bcl-2	85

BAB 6. PEMBAHASAN	90
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	104
7.1. Kesimpulan	104
7.2. Saran	104
Daftar Pustaka	105
Lampiran	112

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Klasifikasi molekular sel kanker payudara.....	19
Tabel 5.1. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis daun <i>M. azedarach</i>	53
Tabel 5.2. Berat kering <i>Melieae Folium</i>	54
Tabel 5.3. Parameter standarisasi <i>Melieae Folium</i>	54
Tabel 5.4. Skrining fitokimia <i>Melieae Folium</i>	54
Tabel 5.5 Hasil ekstraksi <i>M azedarach Folium</i>	55
Tabel 5.6. Hasil interpretasi spektra <i>LC-MS</i> ekstrak <i>M. azedarach</i>	56
Tabel 5.7. Hasil fraksinasi ekstrak <i>M azedarach</i>	57
Tabel 5.8. Hasil uji sitotoksik ekstrak, fraksi dan pembanding terhadap sel T47D	59
Tabel 5.9. Hasil sub fraksinasi bertingkat fraksi etil asetat ekstrak <i>M azedarach Folium</i>	59
Tabel 5.10. Hasil penentuan IC_{50} subfraksi	62
Tabel 5.11. Bilangan gelombang spektra ME114A	64
Tabel 5.12. Interpretasi spektra ME114A	66
Tabel 5.13. Hasil interpretasi spektra inframerah isolat ME127A	68
Tabel 5.14. Hasil interpretasi spektra RMI isolat 127A	74
Tabel 5.15. Hasil interpretasi spektra inframerah isolat ME127C	76
Tabel 5.16. Hasil RMI dan analisis struktur isolat ME127C	81
Tabel 5.17. Hasil penghitungan jumlah sel dengan flowcytometer	83
Tabel 5.18. Hasil perhitungan jumlah sel uji mekanisme apoptosis/ nekrosis	85
Tabel 5.19. Hasil pengujian imunositokimia isolat terhadap T47D	88
Tabel 6.1. Tabel penelitian sitotoksik dan mekanisme antikanker <i>Melia spp.</i>	101
Tabel L2. Hasil pemisahan dengan KCKT subfraksi	113
Tabel L3.1. Interpretasi spektrum infra merah ME154G	114
Tabel L3.2 analisis spektra RMI 154G	118
Tabel L4.1. prediksi toksisitas isolat dan pembanding (Zakharov <i>et al.</i> , 2013)	121
Tabel L4.2. Profil prediksi kuantitatif interaksi senyawa terhadap enzim dan reseptor antitarget	121
Tabel L5. Luaran penelitian disertasi	123

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tanaman <i>Melia azedarach</i> L. (A) bentuk pohon, (B) filotaksis daunnya.....	9
Gambar 2.2. Struktur molekul steroid dari <i>M. azedarach</i> L (A) $3\beta,4\beta$ -Dihidro-5-pregnen-16-on (Wu <i>et al.</i> 2009), dan (B) limonoid (Ntalli, <i>et al.</i> , 2010)	10
Gambar 2.3. Kerangka inti steroid	14
Gambar 2.4. Biosintesis fitosteroid (Gunaherath & Gunatilaka, 2010)	14
Gambar 2.5. Siklus sel eukariota	17
Gambar 2.6 kombinasi pengaturan siklus sel siklin-cdk	17
Gambar 2.7. Diagram tiga peubah yang menentukan pengaruh pemisahan KLT	25
Gambar 2.8. Kaidah faktor kromatografi adsorpsi	26
Gambar 3.1. Bagan kerangka konsep penelitian	37
Gambar 4.1. Skema tahapan penelitian	41
Gambar 5.1. Kromatografi lapis tipis simplisia, ekstrak dan fraksi	56
Gambar 5.2. kromatogram ekstrak <i>M. azedarach</i>	57
Gambar 5.3. KLT fraksi dan subfraksi	60
Gambar 5.4. Kromatografi lapis tipis subfraksi diaion dengan eluen kloroform-metanol	60
Gambar 5.5. KLT sub-subfraksi hasil pemisahan dengan kolom ODS, eluasi gradien metanol-air dan aseton	61
Gambar 5.6. Kromatogram hasil isolasi KCKT subfraksi 127 dan 114	63
Gambar 5.7. spektra inframerah isolat ME114A	64
Gambar 5.8. spektra massa isolat ME114A	64
Gambar 5.9. spektra RMI ^1H ME114A	65
Gambar 5.10. spektra RMI ^{13}C ME114A	65
Gambar 5.11. Dugaan struktur isolat 114A	67
Gambar 5.12. Spektra inframerah isolat ME127A	68
Gambar 5.13. Spektra massa isolat ME127A	68
Gambar 5.14. Spektra RMI ^1H isolat ME127A	69
Gambar 5.15. Spektra RMI ^{13}C isolat ME127A	69
Gambar 5.16. Spektra RMI 2D <i>COSY</i> isolat ME127A	70
Gambar 5.17. Spektra RMI <i>HMQC</i> isolat ME127A	70
Gambar 5.18. Spektra RMI <i>HMBC</i> isolat ME127A	71
Gambar 5.19. Analisis RMI <i>HMBC</i> ME127A	71
Gambar 5.20. Dugaan struktur isolat 127A	75
Gambar 5.21. Spektra inframerah isolat ME127C	75
Gambar 5.22. Fragmentasi massa isolat ME127C	76
Gambar 5.23. Spektrum RMI ^1H isolat ME127C	77
Gambar 5.24. Spektra ^{13}C isolat ME127C	77
Gambar 5.25. Spektra 2D <i>COSY</i> isolat ME127C	78
Gambar 5.26. Spektra <i>HMQC</i> isolat ME127C	78
Gambar 5.27. Spektra <i>HMBC</i> isolat ME127C	79
Gambar 5.28. Analisis RMI <i>HMBC</i> ME127C	79

Gambar 5.29. Dugaan struktur isolat ME127C	82
Gambar 5.30. Grafik hambatan siklus sel dari kontrol sel dan isolat	83
Gambar 5.31. Siklus (A) sel kontrol, isolat (B) ME127A dan (C) ME 127C	84
Gambar 5.32. Hasil flowcytometer mekanisme apoptosis/ nekrosis (A) kontrol sel, (B) 127A, (C), 127C, P1 (normal sel), P2 dan P3 (apoptosis), P4 (nekrosis)	84
Gambar 5.33. persentase apoptosis dan nekrosis isolat	85
Gambar 5.34. hasil uji imunositokimia p53 (A) kontrol sel, isolat (B) 127A, (C) ME127C.....	86
Gambar 5.35. hasil uji imunositokimia bax (A) kontrol sel, isolat (B) 127A, (C) ME127C, → sel yang mengekspresi Bax	86
Gambar 5.36. hasil uji munositokimia BCl ₂ (A) kontrol sel, isolat (B) 127A, (C) ME127C, → sel yang mengekspresi BCl ₂	86
Gambar 5.37. Grafik hasil uji imunositokimia isolat dan pembanding terhadap sel T47D	88
Gambar 6.1. peta distribusi dan pemanfaatan <i>M. azedarach</i>	89
Gambar 6.2. Dugaan struktur 127A(17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[<i>a</i>]fenantren-16-on) dan (B) ME127C (17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[<i>a</i>]fenantren-16-on), (C) doksorubisin, (D) azadiradion	97
Gambar 6.3. ER α ligan (A) Estrogen, (B) Tamoxifen, (C) Genistein, dan (D) β -sitosterol	99
Gambar L3.1. Spektra inframerah ME154g	113
Gambar L3.2. Spektra spektrometri massa ME154g	114
Gambar L3.3. Spektra RMI ¹ H ME 154g	115
Gambar L3.4. Spektra RMI ¹³ C ME154g	115
Gambar L3.5. Spektra RMI COSY ME154g	115
Gambar L3.6. Spektra RMI HMQC ME154g	116
Gambar L3.7. Spektra RMI HMBC ME154g	116
Gambar L3.8. Dugaan senyawa ME154G (kaempferol 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glukopiranosida) C ₂₇ H ₃₈ O ₁₁ = 538	118
Gambar L3.9. perbandingan data RMI Kaemferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glukopiranosida dengan ME154G	119

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

WHO = World Health Organization
HMGC_oA = 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
Bax = Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 = B-cell lymphoma 2
FADD = Fas Associated via Death Domain
caspase-8 = cysteine-aspartic proteases
ATCC = American Type Culture Cell
MTT = 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida
AgNOR = Silver Nucleolar organiser regions stain
C3H = jenis galur mencit yang banyak untuk riset antikanker
EGFR = epidermal growth faktor reseptor
ER = estrogen reseptor
PR = progesteron reseptor
HER2 = human epidermal growth faktor reseptor 2
Ki67 = indeks proliferasi sel
IC₅₀ = Inhibition concentration
LD₅₀ = Lethal dose
KCKT = kromatografi cair kinerja tinggi
LC-MS = Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
G1 = gap 1
S = Sintesis
G2 = Gap 2
CDK = cyclin dependent kinase
MAP = microtubule-associated protein
ERK1/2 = extracellular signal-regulated protein kinase
CDKi = cyclin dependent kinase inhibitor
Apaf1 = Apoptosis Protease Activating Factor
M = ekstrak Mindi
ME = Fraksi etil asetat daun Mindi
MH = Fraksi n-heksana daun Mindi
MW = Fraksi air daun Mindi
RMI ¹H = Resonansi magnet inti proton, karbon
COSY = homonuclear correlation spectroscopy
HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation
GC-MS = Kromatografi gas – spektroskopi massa

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker merupakan istilah umum kelompok penyakit yang mempengaruhi bagian tubuh dengan sifat pertumbuhan tidak terkontrol, menghasilkan sel abnormal yang dapat bermetastase (menyerang dan menyebar) ke organ lainnya. Metastase inilah merupakan penyebab utama kematian pada penyakit kanker. Untuk itu kanker menjadi penyebab kematian kedua di dunia. Pada 2013-2018 tercatat 9,6 juta kematian, yang menunjukkan peningkatan sekitar 800 ribu dan diperkirakan akan meningkat lebih dari 13,1 juta pada 2030 (WHO, 2020). Pada kurun waktu yang sama, peningkatan prevalensi penyakit kanker di Indonesia juga terjadi, dari 1,4‰ menjadi 1,49‰. Dari kelima jenis penyakit kanker penyebab kematian di dunia, prevalensi kanker payudara meningkat tajam disamping kanker paru, dan kolorektal. Hal yang sama juga dihasilkan dari data RS Dharmais dengan persentase kanker tertinggi adalah kanker payudara (19,18%) (KeMenkes RI, 2020).

Pengobatan kanker payudara (*Ca mammae*) pada saat ini bergantung pada tahapan terjadinya kanker. Misalnya pada stage 0, lumpektomi dapat digunakan pada *in situ* karsinoma duktal, sementara pada lesi yang lebih besar digunakan dengan kombinasi radioterapi. Untuk tipe kanker yang lebih ekstensif dilakukan mastektomi dan dapat dikombinasikan dengan tamoksifen. Demikian juga untuk stage 1 dan 2. Kemoterapi sistemik dengan radioterapi dan ajuvan endokrin digunakan pada awal *Ca mammae* dengan tumor > 1 cm. Sementara pada stage 3, penggunaan kombinasi keduanya dengan ajuvan endokrin dan penggunaan kemoterapi bertujuan untuk mengecilkan tumor primer. Pada stage 4 tujuan pengobatan berfokus menyelamatkan kehidupan dan kualitas hidup penderita, sehingga

terapi dengan endokrin digunakan pada kanker estrogen dan progesteron reseptor positif dengan metastase pada tulang dan jaringan lunak atau dengan asimtomatik metastase visceral; sementara untuk kondisi lainnya digunakan kemoterapi sistemik (Anjum *et al.*, 2017). Dari berbagai metode terapi tersebut, terlihat pentingnya entitas senyawa kimia berkaitan dengan bahan kemoterapi dan senyawa endokrin/ antagonisnya. Namun dalam penggunaannya dihasilkan efek samping yang ringan sampai berat dan penurunan efektivitas yang disebabkan selektivitasnya yang rendah dan timbulnya resistensi obat. Oleh karena itu upaya untuk menemukan senyawa dengan selektivitas dan efektivitas yang tinggi masih penting untuk dilakukan.

Diantara kelompok senyawa yang biasa digunakan dalam terapi *Ca mammae*, terdapat senyawa yang berasal dari bahan alam misalnya vinkristin, vinblatin dan semisintetik vinorelbine yang dikembangkan dari alkaloid *Vinca rosae*; doksorubisin yang dihasilkan dari *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 atau senyawa sintesis hormon antagonis seperti tamoxifen (anti estrogen), dan letrozole dan anastrozole (aromatase inhibitors) (Anjum *et al.*, 2017). Berkaitan dengan pemanfaatan tanaman sebagai antikanker, Tariq *et al.* (2017) melaporkan pemanfaatan etnomedisinal sebagai sitotoksik paling banyak juga terhadap *Ca mammae*. Diantara tanaman tersebut termasuk famili Meliaceae yang meliputi *Azadirachta*, *Melia* dan *Trichilia*. Dari ketiga genus tersebut *Azadirachta* dan *Melia* yang banyak dijumpai di Indonesia, namun *Melia* yang kurang dimanfaatkan kecuali sebagai tanaman peneduh dan kayunya sebagai bahan bangunan (kayu mahogani) (Takeya *et al.*, 1996a; 1996b).

Studi botani *Melia* diklasifikasikan ke dalam beberapa kelas berdasarkan pada tipe tanaman dan lingkungan penyebarannya (Mabberley, 1984). *Melia* tipe India dan China merupakan pohon kecil, sementara tipe liar ditandai dengan pohon tinggi sampai 40 m seperti di hutan. Diantara kelas tersebut, paling banyak dijumpai di Indonesia adalah *Mindi* (*Melia*

azedarach L., famili Meliaceae, Ordo Sapindales). Tanaman ini mudah tumbuh pada daerah tropis – subtropis dan merupakan tanaman asli dari Asia yang menyebar luas sampai ke benua lainnya. Daun, buah, batang dan akarnya dimanfaatkan secara tradisional untuk pengobatan. Daunnya digunakan dalam sistem pengobatan tradisional di India (Ayurveda, Unani-Tibb), China, Jepang dan juga Taiwan sebagai anthelmintik, diuretik, emenagogum, ekspektoran, vermifuga, astringent, lepra, dan scrofula, anti-parasit dan antifungi. Aktivitas lainnya antara lain sebagai anti-malaria, antibakteri, hepatoprotektif, antioksidan, anti-fertilitas, antipiretik dan sitotoksik (Sultana, *et al.*, 2014). Sebagai sitotoksik, Wu *et al.* (2009) telah mengisolasi enam senyawa steroid dari daun *M. azedarach* varietas China dan dilakukan pengujian terhadap sel A549, H460, U251. Riset steroid antikanker telah dilakukan lebih dari limapuluh tahun lalu. Selama sepuluh tahun terakhir steroid baru seperti cyproterone, finasteride, estramustin, exemestane dan fulvestrant telah menjadi bagian pengobatan di klinik (Minorics dan Zupko, 2017). Hormon steroid berkaitan dengan karsinogenesis terutama pada fungsi proliferasi sel kanker (Gupta *et al.*, 2013), oleh karena itu salah satu senyawa yang digunakan dalam terapi *Ca mammae* adalah estrogen antagonis, tamoxifen.

Dalam kaitannya dengan mekanisme induksi apoptosis yang dapat mengembalikan kemampuan homeostasis sel, telah dilaporkan jalur mitokondria (signal transduksi Bax/Bcl-2) dan kematian melalui jalur mediasi reseptor oleh 12-*O*-asetilazedarachin B terhadap sel HL-60 (Zhang *et al.*, 2014) yang diisolasi dari ekstrak metanol daun dan ranting *M. azedarach*. Hal yang sama juga teramati pada uji *in vivo* kombinasi ekstrak etanol biji *M. azedarach*, doksorubisin dan siklofosfamid (Sumarawati *et al.*, 2017). Kaitan apoptosis terhadap hambatan pertumbuhan dihasilkan dari tiga isolat ekstrak daun *M. azedarach*, yaitu 12-hidroksiamoorastin, 1-deasetilsendanin dan 29-iso-butilsendanin. Ketiga isolat ini memiliki struktur mirip dengan antikanker sedrelon, bahkan 29-iso-butilsendanin lebih kuat

dibanding sedrelon, dengan mengaktivasi kuat fosforilasi (agonis) MAPK/ERK yang berkaitan dengan progresi adhesi, migrasi, differensiasi, metabolisme, proliferasi, transkripsi dan siklus sel pada sel HEL dan CB7 (Wang, *et al.*, 2019). Meliaternin dan isomernya 12-hidroksiamoorastin mempengaruhi induksi p53 (Joray *et al.*, 2017). Selain kelompok enzim kinase, reseptor steroid hormon dan berbagai komponen dalam siklus sel, saling berinteraksi yang mengakibatkan perubahan aktivitas transkripsi dari reseptor. Kompleks steroid-reseptor meregulasi ekspresi gen transkripsi yang diperlukan dalam siklus sel (Zheng dan Murphy, 2016).

Untuk menghasilkan isolat tersebut Wu *et al.* (2009) melakukan ekstraksi dengan etanol, fraksinasi dengan etil asetat, isolasi dan pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan berbagai sistem fase gerak dan fase diam, sementara Kikuchi *et al.* (2013) dan Ntalli *et al.*, (2010) menghasilkan isolat dengan cara yang berbeda. Dalam riset penemuan obat yang sering memakan biaya dan waktu yang besar, teknik pemisahan menggunakan metode *bioassay guided isolation* merupakan strategi yang paling baik untuk mendapatkan isolat bioaktif (Weller, 2012). Dalam teknik tersebut proses pemisahan dikaitkan dengan aktivitas biologinya, dalam hal ini digunakan uji sitotoksik dengan sel T47D. Diketahui sel ini memiliki bioselektivitas untuk pengujian sitotoksitas *Ca mammae* sel luminal A (Holliday & Speirs, 2011; Yu *et al.* 2017; Ervina *et al.*, 2020).

Berdasarkan studi pustaka di atas, maka pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa steroid dari daun Mindi dengan pendekatan *bioassay guided isolation*. Ekstrak, fraksi dan isolat diuji sitotoksitas terhadap sel T47D; selanjutnya dari isolat diuji mekanisme apoptosis dan pengaruhnya terhadap hambatan siklus sel T47D.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah isolat yang diperoleh melalui *bioassay guided isolation* dari daun Mindi (*M. azedarach* L.) memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D?
2. Apakah hasil elusidasi struktur terhadap isolat murni dari daun Mindi (*M. azedarach* L) menunjukkan senyawa dengan inti steroid?
3. Apakah mekanisme antikanker isolat steroid tersebut sebagai apoptosis dengan menginduksi p53 dan meningkatkan rasio bax/bcl-2 sel T47D?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas sitotoksik isolat yang diperoleh melalui *bioassay guided isolation* dari daun Mindi (*M. azedarach* L.) terhadap sel T47D
2. Membuktikan bahwa senyawa isolat murni dari daun Mindi (*M. azedarach* L) memiliki inti steroid melalui elusidasi struktur
3. Menentukan mekanisme antikanker isolat steroid tersebut sebagai apoptosis yang dapat menginduksi p53 dan meningkatkan rasio bax/bcl-2 sel T47D

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat teoritis:

- Hasil penelitian bermanfaat mendapatkan senyawa isolat steroid dengan aktivitas antikanker payudara dan mengetahui mekanisme apoptosisnya.
- Isolat dapat digunakan dalam studi hubungan struktur aktivitasnya terhadap aktivitas antikanker dengan target mekanisme lainnya

Manfaat praktis:

Hasil penelitian merupakan dasar pengembangan lebih lanjut pemanfaatannya sebagai fitofarmaka obat tunggal/ ko-kemoterapi alternatif/ komplementer antikanker payudara.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Mindi (*Melia azedarach* L.)

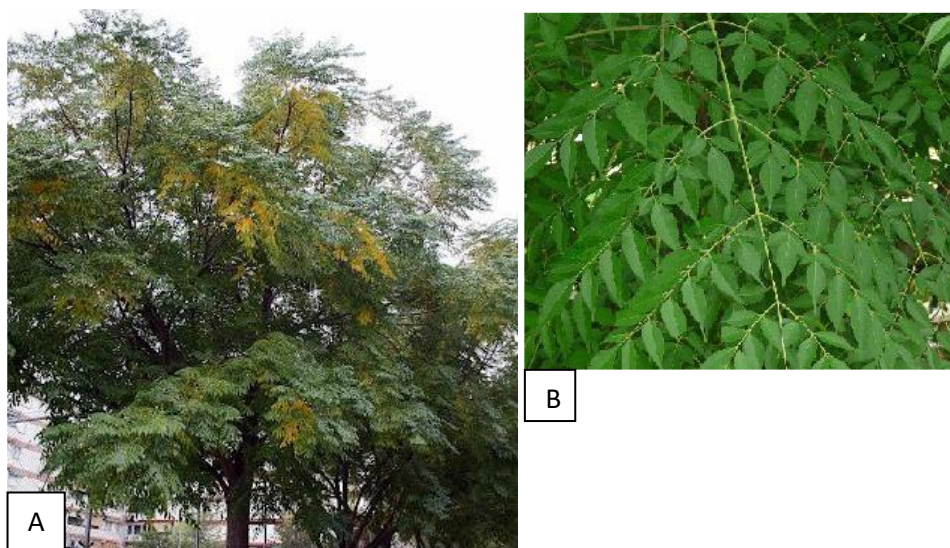
Mindi (*Melia azedarach* L.) familia Meliaceae, kelompok tanaman mahogani berbunga dan tergolong dalam orde Sapindales. Meliaceae merupakan asli tanaman daerah tropis dan subtropik, terdiri dari 51 genera dan sekitar 575 spesies tanaman. Umumnya berupa pohon dan (jarang) semak bahkan kadang semak belukar. Tipe monopodial atau simpodial, umumnya berupa desidious, lebih jarang monosious atau poligamodisious. Anggota tanaman umumnya memiliki daun yang banyak, dengan pengaturan daun seperti bulu dan cabang bunga berbentuk kluster (kelompok). Buahnya berdaging dan berwarna atau serupa kapsul kasar. Anggota genera dari familia berbeda tergantung dari ukuran buah dan pengaturan daunnya. *Melia* merupakan buah bersayap dengan daun bipinnate; tepinya utuh seperti bilah. *M. azedarach* berbeda dari pohon *Azadirachta*, keduanya sama familianya tapi berbeda genusnya (Mabberley, 1984; The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2015).

Mabberley (1984) membagi *Melia* menjadi beberapa kelas: (1) tipe liar, (2) kultivar China, dan (3) kultivar Indian. Kelas berdasarkan tipe tanaman dan daerah *Melia* tumbuh. Tipe *Melia* liar ditandai dengan pohon tinggi seperti di hutan, sampai 40 m; sementara tipe kultivar Indian dan China merupakan pohon kecil. Tipe liar termasuk didalamnya *M. composite* Willd., *M. dubia* Cav., Dissert, *M. superba* Roxb., *M. robusta* Roxb., *M. australis* Sweet, *M. candollei* A. Juss, *M. australasica* A Juss, *M. birmanica* Kurz., *M. azedarach* var *javanica* Koord. & Val, *M. bogoriensis* Koord. & Val., *M. azedarach* var. *glandulosa* Pierre, *M. composite* var *cochinchinensis* Pierre; yang dinamakan berdasarkan asal bahannya diperoleh. *M. azedarach* kultivar China dengan varietas dan sub varietas terdiri dari *M. japo*

nica G. Don. f., *M. toosendan* Sieb. & Zucc., *M. chinensis* Sieb ex Miq., *M. japonica* G. Don var. *semperflorens* Mak., *M. azedarach* f. *albiflora*. *M. azedarach* subvar. *intermedia* merupakan sub varietas antara *japonica* dan *toosendan*. Di India *M. azedarach* var. *sempervirens* L., *M. commelini* Medik., *M. arguta* DC., *M. sambucina* Bl., *M. angustifolia* Schum. & Thonn, *M. guineensis* G. Don. f, *M. bukayun* Royle, *M. cochinchinensis* M. J. Roem, *M. azedarach* var. *subtripinnata* Miq., *M. composite* var. *cochinchinensis* Pierre.

M. azedarach merupakan pohon yang dikenal penggunaan untuk ekologi maupun etnomedisinal di India, Jepang, dan China. Kayunya umumnya untuk bangunan, insektisida alami dan sebagai obat tradisional. Buah, akar dan bijinya pahit dan beracun. Semua bagian tanamannya (batang, kayu, akar dan batang akar, daun dan buahnya, bunga termasuk minyak bunganya, biji dan minyak bijinya) digunakan secara tradisional sebagai obat dan menunjukkan efek farmakologi pada uji *in vitro* maupun *in vivo*. Diantara semua bagian tanaman, daunnya yang paling banyak digunakan. Daunnya secara eksternal digunakan untuk mengontrol insektisida, kutu dan hama nematoda, untuk penyakit kulit, obat kumur gingivitis, untuk diabetes, malaria, demam dan sakit perut. Sharma & Paul (2013) mendeskripsikan penggunaan etnomedisinal dan farmakologikal dari *M. azedarach*. Beberapa penggunaan secara etnomedisinal *disupport* oleh hasil uji farmakologinya, tapi beberapa hanya berdasar penggunaannya secara empiris.

Bagian tanaman yang paling aktif adalah biji dan daun *Melia*. Mekanismenya antara lain sebagai anti-feedan, anti-oviposisi, fago-inhibitor, antimolting, larvisida, adultisida, dan antikolinesterase. Aktivitas ini mungkin berkaitan dengan azadirakhtin, senyawa utama insektisida yang telah dikomersialkan dalam minyak neem dan senyawa tetranortriterpenoid yang merupakan senyawa toksik utama dari *M. azedarach* L. *M. azedarach*, *A. indica* Juss. dan *Thrichilia emetic* Vahl. termasuk dalam 78 familia yang secara etnomedisinal digunakan

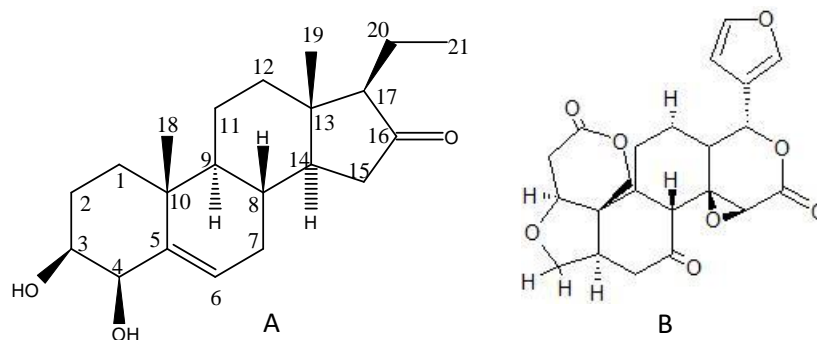


Gambar 2.1. Tanaman *Melia azedarach* L. (A) bentuk pohon, (B) filotaksis daunnya (Sharma dan Paul, 2013)

sebagai anti kanker. Diantara ketiganya *A. indica* yang lebih diekspose secara *in vitro* dan *in vivo* potensinya sebagai antikanker (Tariq, *et al.*, 2017).

2.2. Kandungan senyawa *M. azedarach* L.

Dari penelitian sebelumnya digunakan sejumlah pelarut pengekstraksi dari metanol, etanol dengan cara refluks atau dengan pekolasi dapat menguak kandungan kimia *M. azedarach* L. Secara umum mengandung senyawa organik flavonoid, terpenoid, steroid, asam organik dan antrakinon, alkaloid, saponin, dan tanin (Rishi & Singh, 2003; Suresh, *et al.*, 2008). Senyawa metabolit sekunder umumnya yang terkandung dalam bagian tanaman Minda adalah terpenoid dan limonoid (tetranorterpenoid), selanjutnya steroid dan flavonoid. Senyawa organik berada dalam bentuk glikosida atau aglikon; jadi beberapa mengkonfirmasi kandungan saponin (glikosida triterpena atau steroid).



Gambar 2.2. Struktur molekul steroid dari *M. azedarach* L (A) $3\beta,4\beta$ -Dihidro-5-pregnen-16-on (Wu *et al.* 2009), dan (B) limonoid (Ntalli, *et al.*, 2010)

Ekstrak daunnya mengandung kaempferol-3-*O*- β -rutinosida, kaempferol-3-*L*-rhamno-*D*-glukosida, rutin, kuersetin (flavonoid), stigmasterol, kampesterol (fitosterol), β -sitosterol, fitol (diterpena), 3-metildekana, heptadekana (hidrokarbon alkena), asam heksadekanoat, asam palmitat dan asam pentadekanoat (asam n-alkanoat), β -karoten, tokoferol (Vitamin E) dan skualen, 1-eikosanol (triterpen), 3,5,11,15-tetrametil-2-heksadesen-1-ol (terpen alkohol). Daunnya juga mengandung terpenoid (α -pinen, β -pinen, α -terpinen, α -terpineol) dan limonoid (1-sinamoil-3-asetil-11-hidroksi-meliakarpin, 1-sinamoil-3-metakrilil-11-hidroksi-meliakarpin, dease til salanin, 1,3-disinamoil-11-hidroksi-meliakarpin) (Sen & Batra, 2012).

Bijinya mengandung terpenoid dan limonoid glikosida 6,11-diasetoksi-7-okso-14 β -epoksimeliasin (1,5-diene-3-*O*- β -*D*-glukopiranosida), 3 β ,7 α -dihidroksi-21,23-epoksi-apotirukala-14,24-diene-21-on, meldenin dan melianol, meliasin, meliakarpin, meliartenin vanilin, vanilin dan steroid (β -sitosterol, kampesterol, kolesterol, daukosterol, stigmasterol), hidroksil-3-metoksisinamaldehida dan (\pm) pinoresinol. Bijinya juga mengandung asam organik (asam linoleat, asam linolenat, asam oleat (asam 9-oktadekanoat), asam benzoat, asam vanilat (Sharma & Paul, 2013; Sen & Batra, 2012).

Kayu Mindi mengandung terpenoid (α -pinen, β -pinen, α -terpinen, α -terpineol) dan limonoid (7α -asetoksi- $14\beta,15\beta$ -epoksigidunan-ene-3- O - β - D -glukopiranosida, 12-asetoksiamoorastatin, amoorastatin, fraksinelon, 12-hidroksiamoorastatin, 3-hidroksieufa-7,24-dien-21,16-olida, kulakton, kulinon, kulolakton, metilkulonat). Juga mengandung flavonoid (4',5-dihidroksi flavon-7- O - L -rhamnopiranosil-(1-4)- β - D -glukopiranosida), antraknon (1,3,5,8-tetrahidroksi-2-metil antraknon; 8-metil-eter, 3- O - α - L -rhamnopiranosida, 1,5-dihidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakuinon-3- O - α - L -rhamnopiranosida, 1,8-dihidroksi-2-metil antrakuinon-3- O - β - D , galaktopiranosida), dan terpenoid dan limonoid (melianin-A, melianin-B) (Sen & Batra, 2012).

Akar Mindi mengandung terpenoid dan limonoid (6-asetoksi-7 α -hidroksi-3-okso- 14β , 15β -epoksimelia-1,5-dien, 6-asetoksi- 3β -hidroksi-7-okso- 14β , 15β -epoksimelia-1,5-dien-3- O - β - D -glukopiranosida, azesin-1, azesin-2, azesin-3, azesin-4). Akarnya juga mengandung flavanoid (apigenin-5- O - β - D -galaktopiranosida); steroid (24-metilen sidoartanol, 24-metilensidoartanon, 4-stigmastanen-3-on, 4-kampesten-3-on, β -sitosterol, β -sitosterol- β - D -glukosida); asam (trans-asam sinamat, asam vanilat (4-hidroksi-3-metoksi asam benzoat). Kayu akarnya mengandung terpenoid dan limonoid (12- O -asetil azedarakhin-A, 12- O -asetil azedarakhin B, 1-asetil-3-tigloil-11-metoksi meliakarpinin, 12- O -asetil trikhilin B, 2 α -asetil-29-deasetil-29-isobutiril sendanin, azedarakhin A, azedarakhin C, 1-sinamoil-3-asetil-11-metoksi meliakarpinin, 1-sinamoil-3-hidroksi-11-metoksi meliakarpinin, 1-deoksi-3-metakrilil-11-metoksi meliakarpinin, 1-deasetil nimbolinin B, 1,12-diasetil trikhilin B, 7,12-diasetil trikhilin B, 29-isobutil sendanin, meliakarpinin E, nimbolidin B, salannal, salannin, 1-tigloil-3-asetil-11-metoksi meliakarpinin, 1-tigloil-3,20-diasidil-11-metoksimeliakarpinin, 3-tigloil-1,20-diasetil-11-metoksimeliakarpinin, trikhilin

B, D, dan H, steroids (6β -hidroksi-4-kanpesten-3-on, 6β -hidroksi-4-stigmasten-3-on, azeklarakhol) (Sharma & Paul, 2013).

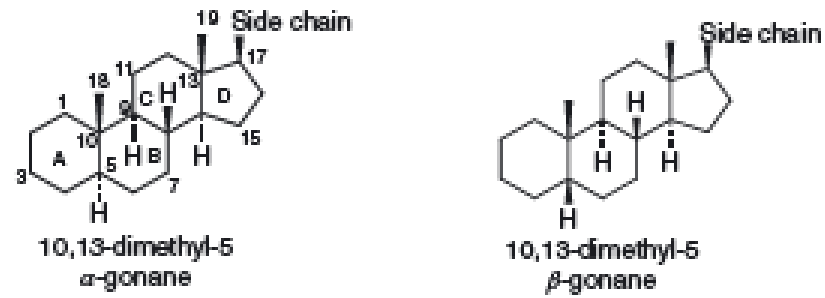
Buah Mindi mengandung terpenoid dan limonoid (6-asetoksi-14,15-epoksi-3,11-dihidroksimeliaka-1,5-dien-7-on, amoorastatin, amorastaton, azedirakhtin-A, 1-sinamoil-3, 11-dihidroksi-meliakarpinin, 1-sinamoil melianolon, 1-sinamoil melianon, kompositin, kompositolid, 1-*O*-deasetil ohkinolid B, 29-deasetil sendanin, 1-deasetil nimbolinin A, 3-deoksimelianon, 21,23,24,25-diepoksi-tirukal-7-en-21-ol, 3-epimelianol, 3-epimeliantriol, gedunin, 12α -hidroksiamoorastatin, meliandiol, melianol, melianolon, melianon, melianoninol, meliantriol, meliatoksin A1, meliatoksin A2, meliatoksin B1, meliatoksin B2, nimbolidin A, nimbolinin A, nimbolinin B, ohkhinal, ohkhinin, ohkhinin asetat, ohkhinolal, ohkhinolid A, ohkhinolid B, sendanal, sendandal, sendanin, 3-*O*-tigloilohkhinin, vilasinin. 21β -asetoksimelianon, metil kulonat, 3α -tigloilmelianol, asam stearat (asam oktadekanoat) dan asam trans-sinamat (Sharma & Paul, 2013).

Analisis fitokimia ekstrak etanol *M. azedarach* menunjukkan kandungan triterpenoid dan steroid, dan dalam biji dan daunnya juga mengandung alkaloid dan tanin kondensasi, yang diduga dapat menghambat perkembangan dan ovisida terhadap serangga (Mulla & Su, 1999). Dua senyawa triterpenoid baru (3α -(2-metilbutiril)-1,20-diasetil-11-metoksimeliakarpinin) dan 3α -tigloil- 17α -20S-21,24-epoksi-apotirukal-14-en- 7α , 23α , 25 -triol) dan sterol baru (2α , 3β -dihidroksiandrostan-16-on- 2β , 19 -hemiketal), dengan enam senyawa yang diketahui (1-sinamoil-3-asetil-11-metoksimeliakarpinin, 3-tigloil-1,20-diasetil-11-metoksimeliakarpinin, 3S,23R,25-trihidroksitirukal-7-en-24-on, dan 2α , 3α , 16β -trihidroksi- 5α -pregnan-20R-meta-krilat, 6-de-(asetiloksi)-7-deasetilkisaseton, senyawa E, dan toonapubesin C, berhasil diisolasi dari ekstrak metanol daun dan cabang *M. azedarach* (Zhang *et al.*, 2014).

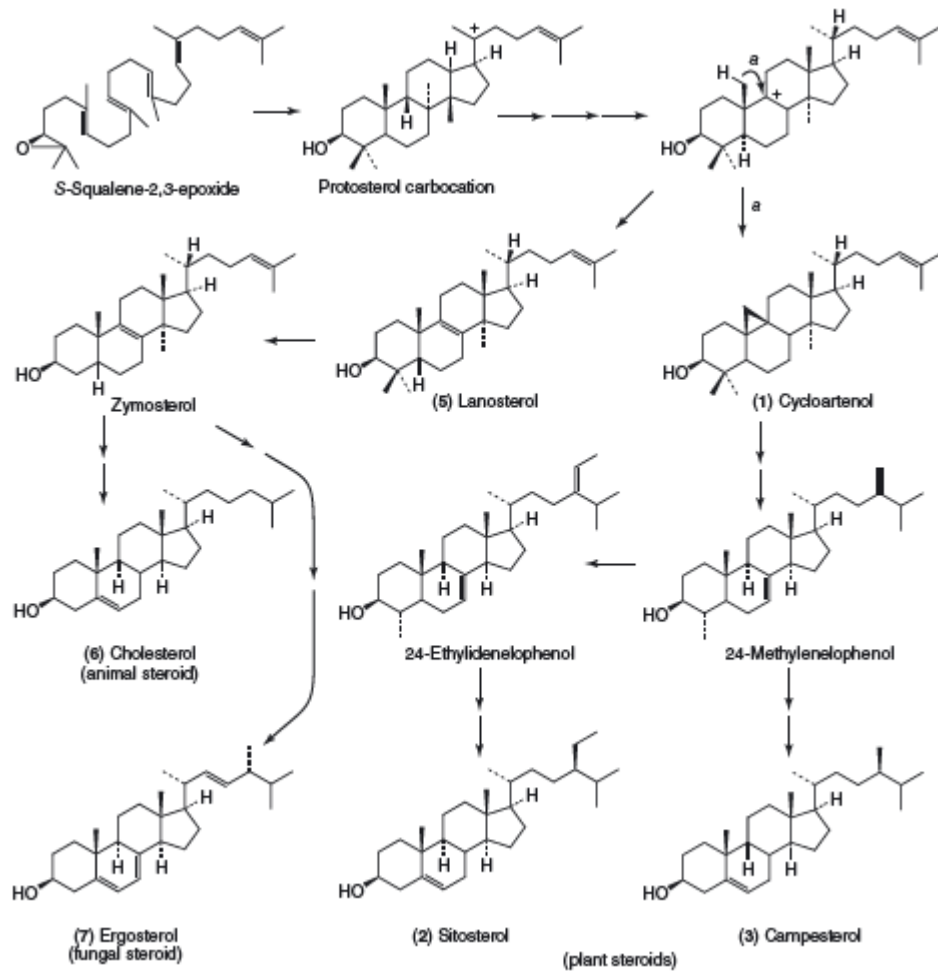
2.3. Steroid tanaman

Steroid merupakan golongan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman, hewan dan mikroorganisme. Secara struktur kimia terdiri dari kerangka tetrasiklik 1,2-siklopentanoperhidrofenantren, dengan substituent metil pada C-10 dan C-13, juga alkil pada C-17 (Gambar 2.3). Steroid dibiosintesis dari jalur asetat-mevalonat, dari prekursor S-skualena-2,3-epoksida. Pada tumbuhan prekursor ini mengalami siklisasi menghasilkan sikloartenol (1) (Gambar 2.4) yang bertandem enzimatis menghasilkan fitosterol β -sitosterol (2), kampesterol (3) dan stigmasterol (4). Biosintesis ini berbeda dengan jalur biosintesis sterol pada hewan yang melalui lanosterol (5) (Gunaherath & Gunatilaka, 2010).

Berdasarkan taksonomi steroid tumbuhan dapat diklasifikasikan antara lain yaitu: (1) fitosterol, (2) withanolida, (3) brasinoida, (4) fitoekdisteroida, dan (5) alkaloida steroid. Secara umum steroid memiliki peran penting pembentuk membran lipid bilayer dari sel, yang mengatur fluiditas dan permeabilitasnya (Kreis and Müller-Uri, 2010). Meskipun peran steroid lakton withanolida masih belum dipahami dengan baik, namun menunjukkan aktivitas biologis yang signifikan pada mamalia. Brasinosteroid memiliki peran penting dalam perkembangan dan berfungsi sebagai hormon tumbuhan (Bajguz and Tretyn, 2003). Fitoekdisteroid memiliki struktur serupa dengan hormon serangga (ekdisteroid), sementara alkaloid steroid berperan sebagai penghalau serangga dan pelindung terhadap patogen (Gunaherath & Gunatilaka, 2010).



Gambar 2.3. Kerangka inti steroid



Gambar 2.4. Biosintesis fitosteroid (Gunaherath & Gunatilaka, 2010)

2.4. Siklus pertumbuhan sel normal (Karp *et al.*, 2013)

Siklus sel berdasarkan aktivitas selulernya dibagi menjadi dua fase utama yaitu fase M (Mitosis) dan Interfase. Fase mitosis termasuk fase duplikasi kromosom serta nukleus; dan sitokinesis. Gambar 2.5. menunjukkan pembagian waktu terjadinya siklus sel, yang menunjukkan sebagian besar waktu siklus adalah pada interfase. Fase mitosis biasanya hanya selama 30-60 menit, sedangkan interfase bisa selama berjam-jam, hari, minggu bahkan bisa lebih lama lagi. Fase mitosis berkenaan dengan aktivitas pembelahan sel, dimana sintesis makromolekul berhenti; sebaliknya periode interfase merupakan saat sel bertumbuh volumenya dan terjadi aktivitas fungsi metabolik semacam oksidasi glukosa, transkripsi, translasi dan replikasi DNA yang termasuk dalam persiapan fase mitosis. Fase interfase terdiri dari fase G1, fase S dan fase G2. Saat fase G1 terjadi pertumbuhan dan metabolisme normal sel, dan duplikasi organel-organel. Pada fase S terjadi replikasi dan duplikasi DNA dan kromosom; sedangkan fase G2 terjadi pertumbuhan sel dan penyiapan sel masuk dalam fase mitosis.

Macam-macam sel dibedakan menjadi tiga macam:

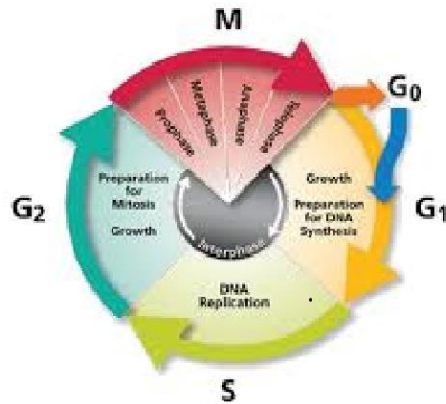
1. Sel yang sangat terspesialisasi fungsinya dan kehilangan kemampuan membelahnya. Kelompok sel ini memiliki sifat setelah berdiferensiasi akan tetap fungsinya sampai sel mati; termasuk didalamnya sel saraf, sel otot dan sel darah merah.
2. Sel yang normalnya tidak membelah, namun dapat terinduksi mensintesis DNA dan membelah oleh stimulus penginduksi. Termasuk dalam kelompok ini misalnya sel liver yang dapat diinduksi dengan pengambilan sebagian dengan pembedahan; serta sel limfosit yang dapat diinduksi oleh antigen.
3. Sel dengan aktivitas mitosis tinggi, termasuk didalamnya sel gonial (oogonia dan spermatogonia) yang akan menjadi gamet; sel stem hematopoetik yang akan menjadi sel

darah merah dan sel darah putih, sel epitelial yang berada di permukaan tubuh dan rongga tubuh.

Siklus sel bervariasi dari kurang 30 menit pada sel yang membelah sangat cepat misalnya pada embrio sampai beberapa bulan misalnya pada sel liver mamalia. Sel dewasa umumnya membelah antara 12 – 36 jam. Diantara 3 tahap dalam interfase, fase G1 yang paling bervariasi, meskipun fase S dan G2 juga berbeda. Sel dapat berhenti membelah sementara atau permanen, baik dalam tubuh maupun di kultur; terdapat fase sebelum inisiasi sintesis DNA. Sel yang berhenti membelah disebut berada pada fase G0 untuk membedakan dengan fase G1 yang akan masuk pada fase S.

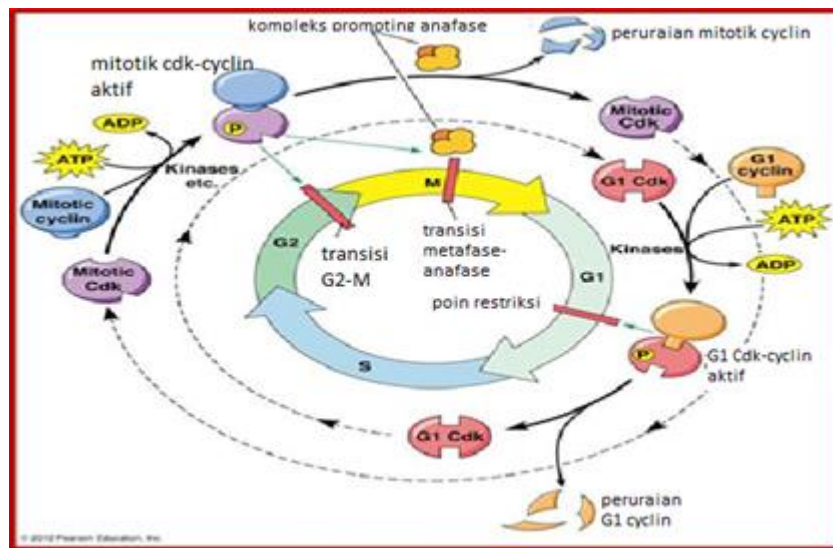
Regulasi siklus diatur oleh tiga kelompok protein utama yaitu siklin, siklin-dependent kinase (CDK) dan siklin dependen kinase inhibitor (CKIs). Siklus sel dimulai dari sinyal ekstraseluler/ faktor pertumbuhan yang akan memacu pertumbuhan melalui sinyal transduksi. Aktivitas sinyal transduksi melalui fosforilasi yang melibatkan ATP. Ikatan siklin dan aktivasi CDK serta CDKIs berefek pada progresivitas siklus sel sehingga aktivasi dan penghambatan siklin dapat dilakukan melalui progresi dari siklus. Ekspresi tiap siklin berbeda pada masing-masing fase siklus sel. Siklin D diekspresikan selama G1, siklin E selama fase G1 dan fase awal S, siklin A selama fase S dan G2, siklin B selama fase akhir dari G2. Adanya siklin juga diperlukan oleh protein partnernya yaitu CDK yang berperan penting dalam pengendalian siklus sel. Gambar pengaturan siklus sel dapat dilihat pada Gambar 2.6.

Siklus sel berhenti dengan kerusakan DNA menyebabkan sintesis protein yang menghambat kompleks siklin-CDK. Protein ini disebut sebagai CDKIs seperti p21 yang akan



Gambar 2.5. Siklus sel eukariota (Karp *et al*, 2013)
Keterangan: M =mitosis, G1= Gap 1, S = sintesis, G2 = Gap 2, I = interfase

mengaktivasi gen p27 oleh faktor transkripsi yang disebut sebagai p53. P21 dan p23 aktif dalam diferensiasi sel, sesaat sebelum sel berdiferensiasi baik di sel otot, sel liver, sel darah dan beberapa tipe sel lainnya.



Gambar 2.6. kombinasi pengaturan siklus sel siklin-cdk (Karp *et al*, 2013; anonim, 2017)
Keterangan: cdk = siklin dependen kinase, A+cdk2 = kompleks siklin A dan siklin dependen kinase 2, m = mitosis, G2 – gap 2, S= sintesis, G1 = gap 1

2.5. Kanker Payudara

Umumnya tumor payudara berasal dari sel epitel sehingga kanker (Ca) mammae digolongkan sebagai karsinoma. Berdasarkan asal dan karakter histologinya Ca mammae dikelompokkan menjadi *in situ* karsinoma dan karsinoma invasif. *In situ* karsinoma memiliki sifat dan lokasi tumor di duktus maupun lobular, tanpa ada invasi membran basal menuju stroma (duktal karsinoma *in situ* (DCIS)) atau lobular karcinoma *in situ* (LCIS). Hampir semua kanker payudara ini dapat disembuhkan. Pada kondisi ini merupakan indikator peningkatan resiko serangan kanker. Pada invasif karsinoma, membran basal telah rusak sebagian atau seluruhnya dan sel kanker akan menginvasi jaringan sekitarnya menjadi sel metastatik. Kanker payudara yang sering terjadi adalah *ductal breast cancer invasive* (Shah, *et al.* 2014; Eheman, 2009).

Sel kanker T47D merupakan sel kanker payudara manusia yang berasal dari efusi pleura yang diperoleh dari pasien karsinoma payudara duktal invasif wanita berusia 54 tahun. Sel-sel mengekspresikan onkogen WNT7B. Sel menunjukkan diferensiasi epitel, adanya *junction* sitoplasma dan reseptor 17 beta estradiol, steroid lain dan kalsitonin. Sel diisolasi oleh I Keydar. Sel T47D merupakan sel adherent (melekat) yang dapat tumbuh pada media DMEM atau RPMI yang mengandung 10% fetal bovine serum dan Penicillin dan Streptomisin (ATCC, 2011). T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi (*missense mutation*) pada residu 194 (dalam *zinc binding domain*, L2); sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan respon elemen pada DNA. Hal ini menyebabkan berkurang sampai hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi siklus sel. Pada sel tumor dengan mutasi p53, diketahui terjadi pengurangan respon terhadap agen yang menginduksi apoptosis dan tumor

Tabel 2.1. Klasifikasi molekular sel kanker payudara (Holliday & Speirs, 2011).

Klasifikasi	Imunoprofil	Karakteristik Lainnya	Contoh sel line
Luminal A	ER+, PR-/+, HER2-	Ki67 rendah, responsif endokrin dan kemoterapi	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, PR-/+, HER2+	Ki67 tinggi, biasanya responsif endokrin, variabel terhadap kemoterapi. HER2+ responsif terhadap trastusumab	BT474, ZR-75
Basal	ER-, PR-, HER2-	EGFR+ dan/ atau sitokeratin 5/6+, Ki67 tinggi, nonresponsif terhadap endokrin, sering responsif kemoterapi	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-Low	ER-, PR-, HER2-	Ki67, <i>E-cadherin</i> , <i>cludin-3</i> , <i>claudinin-4</i> dan <i>claudinin-7</i> rendah, respon intermediat terhadap kemoterapi	BT54, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER-, PR-, HER2+	Ki67 tinggi, responsif terhadap transtusumab dan kemoterapi	SKBR3, MDA-MB-453

Keterangan: EGFR = *epidermal growth faktor* reseptor, ER = estrogen reseptor, PR = progesteron reseptor, HER2 = *human epidermal growth faktor* reseptor 2

tersebut kemungkinan menjadi resisten terhadap obat antineoplastik yang memiliki target merusak DNA. Pada sel T47D mengekspresikan caspase-3 dan caspase-7 dan P-gp (Faneyte *et al.*, 2001). Tabel 2.1. menunjukkan klasifikasi dan contoh sel kanker yang banyak digunakan dalam penelitian berdasarkan imunoprofil dan karakteristik lainnya.

2.6. Apoptosis

2.6.1. Jalur ekstrinsik dan intrinsik apoptosis

Mekanisme apoptosis sangat kompleks dan rumit, melibatkan rangkaian molekuler energi dependen. Dikenal dua jalur utama apoptosis: jalur ekstrinsik atau jalur kematian melalui reseptor dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Terdapat kaitan diantara kedua jalur tersebut, dimana molekul dari jalur satu dapat mempengaruhi jalur lainnya (Igney & Krammer, 2002). Tambahan jalur ketiga yaitu sitotoksitas yang melibatkan mediasi T-cell dan perforin-granzim dependent. Jalur perforin/granzim menginduksi apoptosis melalui

granzim B atau A. Ketiga jalur ekstrinsik, intrinsik, dan granzim B berakhir pada terminal yang sama yaitu jalur eksekusi. Jalur ini diinisiasi oleh pemecahan (*cleavage*) dari *caspase-3* dan menghasilkan fragmentasi DNA, degradasi sitoskeletal dan protein inti, *crosslinking* protein, pembentukan badan apoptotik, ekspresi ligan untuk reseptor sel fagositik dan akhirnya *uptake* oleh sel fagositik. Jalur granzim A mengaktifasi secara bersama, jalur kematian sel *caspase*-independen melalui kerusakan untaian tunggal DNA (Elmore *et al.*, 2007).

Jalur intrinsik melalui kerusakan DNA, stress oksidatif, hipoksia (jalur apoptosis melalui mitokondria). Jalur ekstrinsik: TNF α , limfotoksin dan Fas ligand (FasL), kurang/tidak adanya survival faktor seperti interleukin 2 dan interleukin 3. Obat kemoterapi seperti etopoksida dan sinar gamma (*genotoxic*) akan meningkatkan p53 sebagai gen supresor tumor, menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan DNA memperbaiki diri. Bila proses gagal p53 akan merangsang sitokrom c ke sitosol yang akan dihalangi oleh anti apoptosis *member* yaitu Bcl-2. Dalam sitosol sitokrom c dengan *Apaf1* (*Apoptosis Protease Activating Factor*) dan *procaspase 9* membentuk *caspase 9* (kompleks apoptosome). Terbentuknya *caspase 9* sebagai *caspase* awal akan mengaktifkan *caspase* eksekusioner yaitu *caspase 3*, 6 dan 7 sehingga dapat mengakibatkan kematian sel (Nagata, 1997). Gen p53 dikenal sebagai tumor suppressor gen yang mengalami mutasi pada lebih 60% tumor dan mengalami hambatan fungsi pada sebagian tumor yang lain. P53 mengatur siklus sel, kematian dan penuaan sel, angiogenesis, diferensiasi dan metabolisme DNA, termasuk aktivasi bax. Mutasi p53 umumnya berkaitan dengan posisi ikatannya dengan DNA dan ketidakmampuan genetik mengontrol replikasi p53. Struktur p53 terdiri dari gugus N-terminal transaktivasi, gugus kaya prolin, gugus DNA-binding spesifik, gugus tetramerisasi dan ujung C-terminal dasar. Gugus N-terminal melalui transaktivasi gen lain yang berperan

dalam stabilitas p53 dalam sel, gugus kaya prolin berfungsi dalam menekan pertumbuhan sel, gugus ikatan-DNA spesifik untuk menempelnya p53 pada DNA yang akan menghambat proses transkripsi, dan gugus C-terminal dasar untuk menempelnya p53 pada rantai tunggal DNA yang mempengaruhi fungsi sampai berhentinya siklus sel, aktivasi GADD45 pada DNA repair dan aktivasi bax pada apoptosis. Rangkaian fungsi ini yang membuat p53 sebagai tumor repressor gen. Dalam sel normal dijaga keseimbangan p53. P53 memiliki waktu paruh yang singkat sekitar 20-30 menit sehingga jarang terdeteksi pada sel yang tidak mengalami stress. Bila sel stress akibat bahan-bahan perusak DNA seperti radiasi, hipoksia, hipoglikemia, obat kemoterapi maka p53 akan mengalami stabilisasi sehingga masa hidup lebih lama guna mengatur berhentinya siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis (Samali *et al.*, 1999).

Dalam kaitannya dengan siklus sel, p53 bekerjasama dengan CDK1-P2 and CDC2 menjaga sel kanker tetap berada di fase G1 dan G2. Dalam kaitannya dengan CDK2 dan efek menghambat p21 pada tahap siklus sel, terjadi saat kerusakan DNA karena gen lainnya yang dapat menstimulasi gen WAF1. Aksi antikanker p53 aktif selama rute stimulasi, untuk protein repair, induksi apoptosis dan menghambat siklus sel pada fase G1/S (Hassanpour & Dehghani, 2017).

2.6.2. Regulasi Apoptosis

Apoptosis dimediasi oleh keluarga protease (*caspase*) yang akan mengaktifkan zimogen. Ada 13 macam enzim *caspase* yang dibagi menjadi 2 golongan. Golongan 1 terdiri dari *caspase* 8, 9 dan 10 dengan predomain yang panjang pada N-terminal dan berfungsi pada inisiator kematian sel. Golongan 2 terdiri dari *caspase* 3, 6 dan 7 dengan predomain pendek pada N-terminal yang bekerja sebagai efektor, yang memotong substrat kematiannya

yang akan menyebabkan perubahan morfologi dan biokimiawi yang tampak pada sel yang mengalami apoptosis. Molekul Apaf juga merupakan molekul efektor bersama sitokrom C akan mengikat *pro-caspase 9* dengan atau tanpa ATP, akan menstimulasi proses *pro-caspase 9* menjadi *caspase 9*.

Bcl-2 merupakan regulator lainnya, terdapat 18 macam bcl-2 yang dibagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan strukturnya. Anggota subkelompok 1 diwakili oleh Bcl-2 dan BClxl yang berfungsi sebagai anti apoptosis. Anggota subkelompok 2 diwakili oleh Bax dan Bak dan subkelompok 3 Bid dan Bad yang merupakan molekul proapoptosis (Nagata, 1997).

2.6.3. Deteksi sel apoptosis

Sel apoptosis dapat dideteksi dengan cara sebagai berikut:

- pengamatan morfologi dengan mikroskop cahaya/ elektron. Sel apoptosis akan teramati mengkerut, adanya tonjolan di membran sitoplasma, mitokondria pecah, keluarnya sitokrom c, terbentuk badan apoptosis yang mengandung sitoplasma, organel, fragmen inti sel diliputi membran fosfolipid fosfatidilserin yang biasanya dalam membran plasma akan tampak di permukaan sel, sel berikatan dengan reseptor di sel fagosit, fagositosis oleh sel disekitarnya oleh makrofag atau makrofag dan sel fagosit mengeluarkan sitokin
- pewarnaan fragmentasi DNA dengan pewarnaan imunohistokimia dengan Tunnel assay dengan mikroskop fluoresens. Tunnel assay dapat mendeteksi putusnya rantai tunggal dan rantai ganda DNA yang berkaitan dengan apoptosis. Rantai DNA yang putus dideteksi dengan enzimatis melalui pelabelan gugus 3'-OH
- Penetapan profil DNA sel apoptosis yang berbeda dengan DNA sel normal dengan flowcytometri

2.7. Uji sitotoksitas MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida)

MTT dapat digunakan untuk uji preliminari aktivitas antikanker dengan menghitung jumlah sel yang hidup. Uji MTT merupakan uji sitotoksik *in vitro* yang ekonomis, reliable dan mudah dilaksanakan, akurat dan cepat serta sensitif dan spesifik. Metode MTT menggunakan metode kolorimetri untuk menentukan jumlah sel yang hidup berdasarkan aktivitas dehidrogenase mitokondria. MTT akan direduksi oleh dehidrogenase sel menghasilkan NADH atau NADPH yang akan mereduksi garam tetrazolium yang tidak berwarna, menghasilkan produk formazan. MTT memerlukan bahan pensolubilisasi untuk melarutkan produk formazan. Selain MTT dapat juga digunakan MTS 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, pereaksi garam dan elektron kopling (fenazin etosulfat). Berbeda dengan MTT, MTS tidak memerlukan bahan pensolubilisasi karena akan terbentuk produk formazan yang larut air (McCauley *et al.*, 2013)

2.8. Tinjauan tentang teknik pemisahan dan identifikasi

2.8.1. Ekstraksi

Ekstraksi digunakan dalam bidang farmasi berkaitan dengan pemisahan senyawa aktif dari komponen inaktif/ inert pada jaringan tumbuhan/ hewan menggunakan pelarut selektif dengan prosedur ekstraksi terstandar. Berdasarkan penggunaan pemanasan dan proses berkelanjutan dibagi menjadi ekstraksi panas dan pada suhu kamar; serta ekstraksi berkesinambungan dan tidak. Termasuk dalam ekstraksi panas dan tidak berkesinambungan adalah proses dekok, infus; sementara ekstraksi panas berkesinambungan dengan menggunakan pelarut yang mudah menguap seperti proses soxhletasi dan reflux. Ekstraksi dengan pemanasan menggunakan air misalnya proses destilasi. Ekstraksi tanpa pemanasan, tidak berkesinambungan misalnya proses maserasi dan remaserasi; sementara perkolasi

merupakan ekstraksi tanpa pemanasan dan berkesinambungan. Ekstrak berupa cair, semisolid atau sebuk dihasilkan dari proses ekstraksi, termasuk sediaan tinktur (Handa, 2008; BPOM RI, 2013).

2.8.2. Kromatografi Lapis Tipis (Harborne, 1987 & Gritter *et al*, 1985)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisika kimia yang berdasarkan pada perbedaan partisi dari komponen diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis, merupakan tipe kromatografi yang paling tua, dan tergolong sebagai kromatografi cair padat. Berbagai macam adsorben yang banyak digunakan antara lain silika gel dan aluminium oksida. Fase diam dapat berupa bahan berbutir-butir yang ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (pada garis awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Tahapan selanjutnya dengan penampak bercak untuk menampakkan pemisahan senyawa yang dihasilkan.

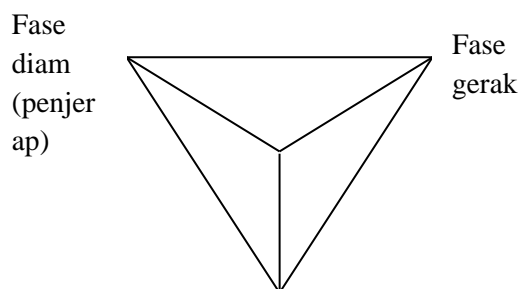
Untuk campuran yang tidak diketahui, lapisan pemisah (sifat penjerap) dan sistem larutan pengembang harus dipilih dengan tepat karena keduanya menentukan tercapainya pemisahan. Hal yang juga penting adalah memilih kondisi kerja yang optimum, yang meliputi sifat pengembangan, atmosfer bejana, dan lain-lain. Gambar berikut menunjukkan kaitan antara semua faktor tersebut.

Berikut ini merupakan kaidah dasar kromatografi adsorpsi:

- a. Hidrokarbon jenuh terjerap sedikit atau tidak sama sekali, karena itu ia bergerak paling cepat. Penjerapan hidrokarbon tidak jenuh meningkat dengan meningkatnya jumlah ikatan rangkap dan ikatan rangkap terkonjugasi. Oleh karena itu untuk pemisahan harus

digunakan suatu penjerap yang aktif dan pelarut pengembang yang kurang polar. Kemungkinan lain ialah pembalikan fase (fase diam dibacem dengan suatu fluida dan fase gerak digunakan pelarut hidrofilik).

- b. Bila gugus fungsi dimasukkan ke dalam suatu hidrokarbon, afinitas jerap naik menurut ukuran berikut :

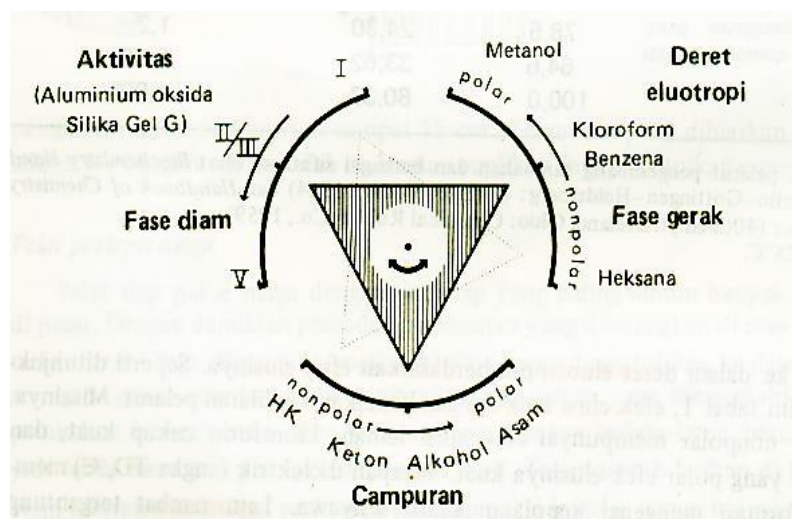


Teknik kerja: (a) Atmosfer bejana (penjenuhan, suhu),
(b) Jenis pengembangan, (c) Kondisi awal

Gambar 2.7. Diagram tiga peubah yang menentukan pengaruh pemisahan KLT. Puncak piramid melambangkan campuran cuplikan (Stahl, 1985).

Hasil pemisahan pada KLT dapat dideteksi secara visual dan optikal dengan menggunakan pemindai yang berdasarkan penerapan teknik fotometri pada lapis tipis, yang berarti melakukan pengukuran sinar yang melalui medium yang menghamburkan sinar. Pengukuran bercak pada kromatogram dilakukan dengan cara melewatkannya pada alat dimana ukuran relatif dan kerapatan noda dapat diukur (Densitometer). Kaidah dasar kromatografi jerap dan kaitannya dapat digambarkan dalam bentuk segitiga seperti gambar 2.4.

Dalam aplikasinya kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan pada pemisahan zat secara cepat dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penyerap, cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut. KLT digunakan untuk memisahkan komponen-komponen yang partikelnya kecil. Metode ini menggunakan gelas atau aluminium sebagai lapisan luar yang dilapisi dengan silika gel. Ketebalan silika gel dapat dibuat bermacam-macam tergantung pada jumlah material yang dituangkan pada silika gel tersebut (Heinrich *et al.*, 2004).



Gambar 2.8. Kaidah faktor kromatografi adsorpsi (Stahl, 1985)

Fase diam pada KLT dapat berupa fase polar dan nonpolar. Fase diam yang sering digunakan antara lain silika gel, aluminium oksida, kiselguhr, magnesium silikat, dan selulose, sedangkan fase gerak dapat dipilih dengan percobaan (orientasi fase gerak). Sistem yang paling sederhana ialah dengan menggunakan campuran dua pelarut organik karena daya

elusi campuran kedua pelarut ini mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal.

Parameter yang digunakan dalam KLT adalah harga R_f . Harga R_f adalah perbandingan jarak yang ditempuh oleh zat dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dari titik awal. Harga R_f dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh noda dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak dari titik awal}}$$

Angka R_f bernilai antar 0,00-1,00 dan hanya dapat ditentukan dengan dua desimal. Harga hR_f dapat diperoleh dengan mengalikan harga R_f dengan 100 (h) dan menghasilkan nilai berjangka 0-100 (Stahl, 1985).

2.8.3. Kromatografi Kolom dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi kolom merupakan metode yang paling baik untuk memisahkan campuran dalam jumlah besar. Secara teknis, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca/ plastik/ logam. Pelarut/ fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gaya gravitasi atau oleh tekanan. Pita senyawa linarut akan bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi keluar dari alas kolom.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan pengembangan dari kromatografi kolom klasik. terdapat empat pengembangan pada KCKT dibandingkan dengan kromatografi kolom klasik, yaitu digunakannya penjerap yang lebih halus dengan kisaran ukuran mesh yang lebih sempit, sehingga tercipta kesetimbangan yang lebih baik. Digunakannya sistem tekanan dengan pompa mekanis sehingga memperkecil difusi dan pemisahan bisa lebih cepat. Penggunaan detektor yang memungkinkan analisis senyawa

berkesinambungan baik untuk analisis kualitatif (volume dan waktu retensi) maupun untuk keperluan kuantitatif (luas area bawah puncak). Penggunaan penjerap dan cara pengemasan kolom yang baru memungkinkan derajat pemisahan yang tinggi dapat dicapai dengan KCKT (Gritter *et al.*, 1985)

Pada pemisahan golongan β -amyrin dan β -sitosterol menggunakan HPTLC dari ekstrak diklorometana dan etanol herba *Tinospora cordifolia* dan *Calotropis gigantea* dengan 60 F₂₅₄ dan pelarut n-heksana dan etil asetat (7.5:2.5, v/v) dan penampak bercak p-anisaldehyda akan teramati β -sitosterol ($R_F = 0.26 \pm 0.001$) dan β -amirin ($R_F = 0.39 \pm 0.001$) dan puncak serapan pada $\lambda_{\max} = 530$ nm (Alajmi, *et al.*, 2017).

2.9. Tinjauan Spektroskopi

2.9.1. Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi inframerah merupakan teknik yang berdasarkan vibrasi atom dalam molekul. Spektrum inframerah dihasilkan dari melewatkan radiasi inframerah pada sampel dan menentukan fraksi radiasi yang diserap pada energi tertentu. Energi yang diserap pada puncak absorpsi berkaitan dengan frekuensi vibrasi dari molekul sampel. Dikenal ada daerah gugus fungsi (4000-1600 cm^{-1}) dan daerah sidik jari (1600-600 cm^{-1}) yang sangat penting dalam identifikasi senyawa organik. Spektrum inframerah dapat ditentukan pada berbagai macam sampel misalnya likuida, larutan, pasta, serbuk, film, serabut, gas. Perkembangan instrumentasi menghasilkan pengukuran yang lebih sensitif, misalnya pada Fourier Transform spektrofotometer. FTIR menaikkan kualitas spektra inframerah dan meminimalkan waktu analisis.

Struktur molekul senyawa organik dapat ditentukan dengan spektroskopi inframerah pada panjang gelombang menengah, dapat mengikuti cara antara lain sebagai berikut:

ditentukan pada panjang gelombang $>1500\text{ cm}^{-1}$ pada akhir spektra dan diperhatikan pada pita gelombang utama. Pada tiap pita, dicatat kemungkinan dengan tabel korelasi. Panjang gelombang pendek dicatat pada akhir spektra untuk konfirmasi dan elaborasi kemungkinan struktur senyawa. Diperiksa kembali dugaan senyawa yang dihasilkan dari pembacaan hasil spektra inframerah. Misalnya golongan aldehid seharusnya menyerap dekat 1730 cm^{-1} dan pada daerah $2900\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$. Diperhatikan setiap hasil baik positif maupun negatif, misalnya jika tidak ada pita pada daerah $1850\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, biasanya terdapat gugus karbonil. Intensitas pita mesti menjadi perhatian, mungkin bervariasi meskipun menunjukkan gugus yang sama. Jika terdapat variasi pada panjang gelombang, mungkin dipengaruhi kondisi sampel padat atau likuid atau larutan. Misalnya jika dalam larutan beberapa pita sensitif terhadap pelarut yang digunakan. Digunakan blanko untuk mengurangi serapan dari pelarut terhadap sampel. Analisis data dari spektrum inframerah digunakan bersama data dari teknik lainnya misalnya data kromatografi, spektroskopi massa dan RMI untuk mengidentifikasi senyawa.

2.9.2. Spektroskopi RMI (Resonansi Magnet Inti)

Spektroskopi RMI merupakan bentuk lain spektrometri serapan. Sample dapat menyerab radiasi magnetik dalam frekuensi radio saat berada dalam pengaruh medan magnet. Daerah frekuensi radio sangat khas untuk tiap sampel, plot frekuensi dari puncak serapan versus intensitas puncak menghasilkan spektrum RMI. Interpretasi spektra RMI lebih detail dibanding spektra ir dan uv. Dikenal adanya spektra proton dan karbon (Silverstein *et al.*, 1991). Menganalisis hasil spektrum RMI dapat digunakan sebagai bagian identifikasi isolat senyawa.

Dalam RMI akan dihasilkan informasi (1) geseran kimia yang menunjukkan komposisi kelompok atom dalam molekul, (2) konstanta kopling *spin* untuk menunjukkan

atom yang berdekatan, (3) waktu relaksasi untuk menunjukkan dinamika molekul, (4) intensitas signal memberikan informasi kuantitatif atom dalam molekul yang dapat membantu menentukan struktur molekular dan proporsi senyawa dalam campuran. RMI dapat digunakan untuk menganalisis struktur molekular dan mengidentifikasi senyawa yang tidak diketahui termasuk dalam kimia organik, anorganik, biokimia, analisis farmasi, material baru dan lain-lain.

Dalam analisis senyawa organik umumnya digunakan data RMI ^1H , ^{13}C dan RMI dua dimensi (RMI 2D) untuk mengelusidasi strukturnya. RMI 2D merupakan metode yang menghasilkan plotting pada dua frekuensi aksis. Termasuk didalamnya COSY (*Correlation Spectroscopy*), NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) dan HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*). Pada spektra 2D menghasilkan informasi lebih dan bermanfaat pada elusidasi struktur molekul kompleks, yang sulit jika hanya menggunakan data RMI satu dimensi. Pada hasil RMI 2D, spektrum ^1H diplot pada salah satu aksis, sementara aksis lainnya menunjukkan spektrum ^1H (COSY) dan ^{13}C (HMQC dan HMBC). Pada spektroskopi korelasi heteronuclear memberikan signal berdasarkan kopling dua inti yang berbeda. Spektrum HMQC selektif untuk menunjukkan korelasi langsung ikatan C-H, sedangkan HMBC menunjukkan korelasi lebih jauh berjarak 2-4 ikatan C-H (Keeler, 2010).

2.9.3. Spektroskopi massa

Spektroskopi massa (SM) memegang peran penting dalam teknik analisis. SM memiliki kelebihan dibandingkan teknik analisis yang lain dalam hal kemampuannya multianalisis, sensitifitas, selektivitas, kemampuan mengkarakterisasi senyawa melalui formula atau massa molekularnya dan dapat dikombinasikan dengan kromatografi. Dalam kombinasinya dengan kromatografi cair sebagai inlet dalam MS, dapat memisahkan

campuran kompleks untuk deteksi dan identifikasi senyawa. Dengan selektivitas multipel, teknik kombinasi dapat menghasilkan pemisahan kualitatif senyawa organik yang berbeda dalam campuran dan matriks.

Prosesnya meliputi konversi atom/ molekul senyawa menjadi ion gas dengan penembakan energi yang tinggi. Ion dapat berfragmentasi atau tidak, yang kemudian dipisahkan sesuai rasio massa terhadap muatan yang disimbolkan sebagai m/z dan kelimpahan relatifnya (*relative abundance*). Teknik ini dasarnya berkaitan dengan efek energi ionisasi pada molekul, yang bergantung pada reaksi kimia dalam fase gas pada molekul sampel selama pembentukan spesies terion dan netral. Hasil diplotkan kelimpahan ion versus m/z . Ion menyediakan informasi sifat dan struktur molekul prekursor dan fragmentasinya. Dalam spektrum senyawa murni, molekular ion jika ada tampak pada nilai tertinggi m/z (diikuti dengan ion yang mengandung isotop) dan dapat memberikan informasi massa molekular senyawa. Akurasi massa ditentukan dengan eksperimen untuk menentukan massa unsur dalam formula. Untuk molekul dengan massa dibawah 200Da, akurasi 5 ppm sering dianggap cukup untuk menentukan komposisi unsur. Massa eksak (massa terhitung) dari spesies isotop ditentukan dengan menjumlahkan massa individual molekul isotop. Misalnya massa dari H_2O dihitung sebagai $1.0078 + 1.0078 + 15.9949 = 18.0105$ Da, dan bukan 18 Da (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1. Uraian Kerangka Konsep

Kelemahan pengobatan penyakit kanker konvensional antara lain rendahnya selektivitas obat anti kanker, sehingga bersifat toksis dan menimbulkan efek samping serius terhadap sel normal yang sehat. Kelemahan lainnya adalah timbulnya resistensi sel kanker terhadap senyawa anti kanker, sehingga harus dinaikkan dosisnya untuk memberikan efek terapi. Mekanisme resistensi antara lain karena perubahan transport membran, berkaitan dengan produk gen p-glikoprotein *multidrug resistance* (MDR) atau protein terkait lainnya, perubahan target enzim, penurunan aktivasi obat, peningkatan degradasi obat karena perubahan ekspresi enzim yang memetabolisme obat, inaktivasi obat karena konjugasi dengan peningkatan glutathione, redistribusi obat subseluler, interaksi obat, peningkatan DNA repair dan kegagalan apoptosis sebagai hasil mutasi protein siklus sel misalnya p53 (Chorawala *et al.*, 2012). Untuk itu pilihan kemoterapi dengan target molekuler spesifik merupakan upaya pengembangan obat anti kanker saat ini.

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang berperan penting dalam pengaturan homeostatis siklus sel normal. Terjadinya keganasan sel kanker disebabkan gangguan pada mekanisme apoptosis dalam siklus sel. Mekanisme induksi apoptosis merupakan salah satu pendekatan dalam terapi penyakit kanker. Induksi apoptosis dapat mencegah promosi, progresi dan munculnya kembali penyakit kanker. Beberapa contoh senyawa yang diisolasi efektif sebagai kemoterapi melalui mekanisme apoptosis antara lain kurkumin dari *Curcuma longa*, astaxanthin, resveratrol, epigallocatekin-3 galat, kapsaisin

termasuk didalamnya limonoid dan tirukan triterpenoid, toosendanin dan 12-hidroksiamoorastatin dari *M. azedarach* (Zhang *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2013; Joray *et al.*, 2017).

Mindi (*M. azedarach* L.) merupakan tanaman yang secara etnomedisinal dan farmakologi sebagai sitotoksik. Penelitian yang telah dilakukan terkait aktivitas sitotoksik *Melia* spp. secara *in vitro* dan *in vivo*, antara lain uji *in vitro* ekstrak, fraksi dan isolatnya telah dilakukan terhadap berbagai sel kanker sel karsinoma kolorektal manusia (HT-29), sel kanker payudara (MCF-7, SK-BR-3) dan serviks hepatoma (HepG-2, SMMC-7721 dan Hep3B), sel epitelial ginjal (MDBK cell lines), sel epithelial adenokarsinoma paru-paru (A549), sel kanker paru (H460), sel paru limfoblast (U937), sel kanker promielositik leukemia (HL-60), sel lambung (AZ521), sel kanker kolon (SW480) dan sel murine kolorektal adenokarsinoma (CT26), sel kanker oral (KB), sel kanker prostat (PC3), sel kanker liver (BEL7404), sel kanker sistem syaraf pusat (SH-SY5Y, U251, SF539), dan sel melanoma tikus (B16F10). Pengujian *in vivo* juga telah dilakukan terhadap mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma *mammae* dan terhadap mencit balb/c yang diinokulasi sub kutan dengan sel karsinoma hepar H22.

Kim & Kang (2012) menguji toksisitas dan aktivitas antikanker ekstrak n-heksana batang *M. azedarach* L. var. *japonica* Makino's terhadap A549; juga terhadap sel yang sama Ntalli *et al.* (2010) menguji 3- α -tigloilmelianol triterpenoid tirukan baru, dari fraksi terlarut diklorometana ekstrak metanol. Kim *et al* (1994) menunjukkan 28-deasetil sendanin lebih sensitif terhadap sel SF-539 (sistem syaraf pusat) dan PC-3 (prostat) dibandingkan doksorubisin. Tada *et al.* (2009) menunjukkan bahwa Trichilin H dan toosendanin sangat toksis terhadap sel KB cells, sedangkan 12-*O*-metil volkensin, toosendanin dan meliatoksin B1 tidak menunjukkan efek toksis yang bermakna. Hasil juga menunjukkan aktivitas

sitotoksik terhadap sel KB membutuhkan struktur C-14/C-15-epoksida seperti trikhilin H dan toosendanin dibandingkan dengan C-15-keto dari toosendanin dan meliatoksin B1.

Jafari *et al.* (2013) menunjukkan ekstrak metanol dan fraksi dari buah, batang dan daun Mindi menghasilkan aktivitas sitotoksik paling kuat dan selektif terhadap sel kanker HT-29, A-549, MCF-7 dan HepG-2 dan MDBK dibandingkan dengan *Azadirachta indica* (IC₅₀ 8,18- 60,10 µg/mL) dengan metode MTT. Dari ekstrak ini diisolasi golongan flavonol 3-O-glikosida termasuk rutin, kaempferol-3-O-robinobiosida, kaempferol-3-O-rutinosida dan isokuersetin.

Mekanisme antikanker dengan apoptosis intrinsik melalui jalur dependen-mitokondria (peningkatan rasio Bax/Bcl-2), dan Fas diajukan oleh He *et al.* (2010) yang menguji toosendanin (TSN) secara *in vivo* dan *in vitro* terhadap sel SMMC-7721 (p53+) dan Hep3B (p53-) (*human hepatocellular carcinoma cell lines*). Aktivitas *caspase* ditetapkan dengan metode pengamatan morfologi dengan pewarnaan annexin V. Adanya kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA diamati oleh Tang *et al.* (2012) dari ekstrak etanolik buah *M. toosendan* (EMTF) secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap SW480 dan CT26. Apoptosis sel tumor dihasilkan dari peningkatan permeabilitas membran mitokondria dan pelepasan sitokrom c dari mitokondria. EMTF menginduksi aktivitas *caspase-9*, yang mengaktifasi *caspase-3* dan pemecahan poli-(ADP-ribose) polimerase. EMTF secara *in vivo* juga mereduksi volume tumor dan menghasilkan efek apoptotik, serta tidak menginduksi efek samping. Sumarawati *et al.* (2017) menduga mekanisme melalui peningkatan ekspresi Bax dan penurunan AgNOR.

Selain jalur intrinsik, Akihisa *et al.* (2013) mengamati adanya jalur ekstrinsik apoptotik mediasi reseptor (Bratton *et al.*, 2000) dari Meliarachin C (IC₅₀ 0.65 IM) dan 3-O-deasetil-40-demetil-28-oksosalannin (IC₅₀ 2.8 IM) menunjukkan potensi aktivitas anti kanker

selektif terhadap sel HL60. Asetilazedarachin B menginduksi apoptotik sel HL-60 (dengan mengaktivasi *caspase* dan *cleaved caspasesnya* -3, -8, dan -9) dengan penurunan level Bid dan peningkatan tBid. *Caspase-8* dapat memotong Bid, sedangkan tBid mengaktivasi jalur mitokondria; menurunkan Bcl-2 dan menaikkan level Bax. Rasio Bax/Bcl-2 menunjukkan jalur intrinsik melalui mitokondria dan melibatkan kematian sel melalui signal transduksi Bax/Bcl-2. Toosendanin, derivat triterpenoid dari batang *M. toosendan* Sieb et Zucc. menunjukkan sitotoksik lebih kuat terhadap sel U937 dibandingkan dengan VP-16 (etoposide) (Zhang *et al.*, 2005). Demikian halnya dengan Kikuchi *et al.* (2013) yang menunjukkan 12-*O*-asetilazedarachin B poten terhadap sel leukemia (HL-60) (IC₅₀ 0.016 μm) dan lambung (AZ521) (IC₅₀ 0.035 μm), 100-kali lebih tinggi dari cisplatin dengan IC₅₀ 4.2 μm (HL-60) dan 9.5 μm (AZ521), meskipun tidak sitotoksik terhadap sel SK-BR-3. Hal ini kemungkinan karena perbedaan reseptor spesifik sel yang membedakan tumor satu dengan lainnya atau perbedaan reseptor teraktivasi jalur pensinyalan anti apoptosis. Hasil juga dilaporkan teramati adanya reseptor Fas, yang dikenal sebagai reseptor kematian dengan menginduksi dan mengaktivasi jalur nekrotik dari sel AZ521, meskipun tidak jelas *caspase-8* diaktivasi oleh reseptor Fas tersebut.

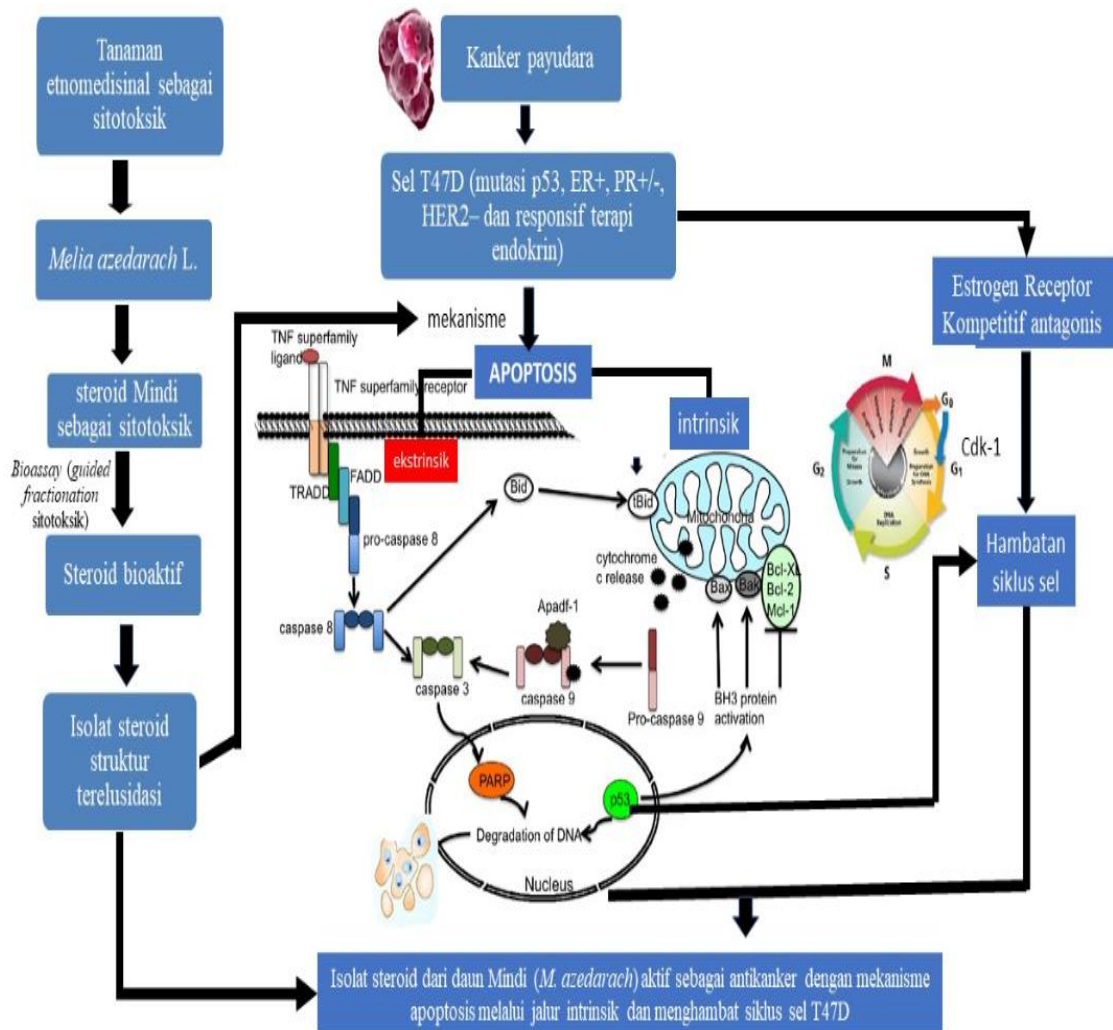
Vundru *et al.* (2013) menunjukkan adanya *cell arrest* β -sitosterol (ST) dan kematian dari sel MDA-MB-231 pada siklus G0/G1 yang diiringi dengan penurunan kadar CDK4 dan cyclin D1, serta peningkatan p21/Cip1 dan p27/Kip1. Kematian sel oleh ST dikaitkan dengan induksi apoptosis. ST juga menyebabkan depolarisasi potensial membran mitokondria dan peningkatan rasio protein bax/bcl-2.

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara T47D. T47D digolongkan sebagai tipe sel luminal A dengan karakteristik imunoprofil ER+, PR+/-, HER2- dan penanda proliferasi Ki67 rendah, responsif terhadap terapi endokrin dan juga

kemoterapi. Sel T47D tergolong dalam kelompok yang sama dengan sel MCF-7, dan SUM185; merupakan sel uji yang tepat untuk terapi tertarget reseptor hormon endokrin (Holliday & Speirs, 2011). Uji sitotoksik dilakukan dengan penghitungan jumlah sel mati dengan MTT, induksi apoptosis dengan metode perubahan morfologi sel (diamati dengan mikroskop cahaya), penghitungan sel apoptosis dan siklus sel dengan flowcytometer, dan uji ekspresi p-53, bax, bcl-2 dengan imunositokimia. Diduga apoptosis terjadi pada sel T47D terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik yaitu melalui aktivasi *caspases*-3, -8, dan -9, *cleaved caspases*-3, -8, dan -9 dengan penurunan level Bid dan peningkatan tBid. Dilaporkan *caspase*-8 dapat memotong Bid, sedangkan tBid mengaktivasi jalur mitokondria; menurunkan Bcl-2 dan menaikkan level Bax (Rasio Bax/Bcl-2) (Zhang *et al.*, 2005). Sementara mekanisme siklus sel berkaitan dengan peran p53 dengan hormon steroid dan reseptornya sebagai regulator transkripsi terutama saat fase G2/M (Zheng dan Murphy, 2016).

Berdasarkan uraian tersebut di atas dengan pendekatan kemotaksonomi, adanya interaksi terhadap protein-protein dalam proses apoptosis dan ligan-reseptor estrogen maka diduga daun Mindi (*M. azedarach* L.) terutama dari fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan steroid yang mampu menginduksi apoptosis dan menghambat proliferasi (siklus sel) sel kanker T47D. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan senyawa antikanker dari ekstrak daun Mindi yang mempunyai selektivitas dan efektivitas tinggi terhadap sel T47D. Upaya ini penting dalam pengembangan produk fitofarmaka dalam penyediaan bahan baku bermutu yang memiliki khasiat sebagai antikanker. Metode pengujian dengan *bioassay guide isolation* yaitu penemuan senyawa bioaktif antikanker dengan panduan aktivitas terhadap galur sel dari ekstrak kasar, fraksi sampai isolat; dan dilengkapi dengan karakterisasi struktur isolat aktifnya. Diharapkan dari penelitian ini didapatkan bukti-bukti ilmiah berupa

parameter kualitas bahan (fisika dan kimia) ekstrak, fraksi dan isolat daun Mindi serta parameter aktivitas dan mekanisme antikanker T47D dari isolat bioaktif daun Mindi (*M. azedarach* L.). Bagan konsep penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan kerangka konsep penelitian

3.2. Hipotesa penelitian

Berdasarkan uraian di atas maka pada penelitian ini dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Isolat yang diperoleh melalui *bioassay guided isolation* dari daun Mindi (*M. azedarach* L.) memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D
2. Hasil elusidasi struktur terhadap isolat murni dari daun Mindi (*M. azedarach* L) menunjukkan senyawa dengan inti steroid
3. Mekanisme antikanker isolat steroid tersebut sebagai apoptosis dengan menginduksi p53 dan meningkatkan rasio bax/bcl-2 sel T47D

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong sebagai eksperimental dengan *pretest and post test control group design* yang bertujuan memisahkan senyawa bioaktif dan menguji potensi aktivitas sitotoksiknya secara *in vitro*. Hipotesis disusun berdasarkan studi literatur sesuai dengan tujuan penelitian. Adapun secara garis besar rancangan penelitian meliputi:

1. Isolasi golongan senyawa steroid dari daun Mindi.

Ekstraksi dengan perkolasi menggunakan EtOH 96%.

Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair ekstrak kental bebas etanol dengan heksana dan etil asetat.

Pemisahan fraksi heksana, etil asetat dan air dengan kromatografi kolom dengan berbagai sistem.

Pemeriksaan ekstrak, fraksi dan sub fraksi dan isolat dengan kromatografi lapis tipis.

Isolasi senyawa dengan kromatografi cair kinerja tinggi.

Identifikasi isolat dengan pereaksi spesifik, spektrofotometer infra merah, resonansi magnet inti proton dan karbon serta spektroskopi massa.

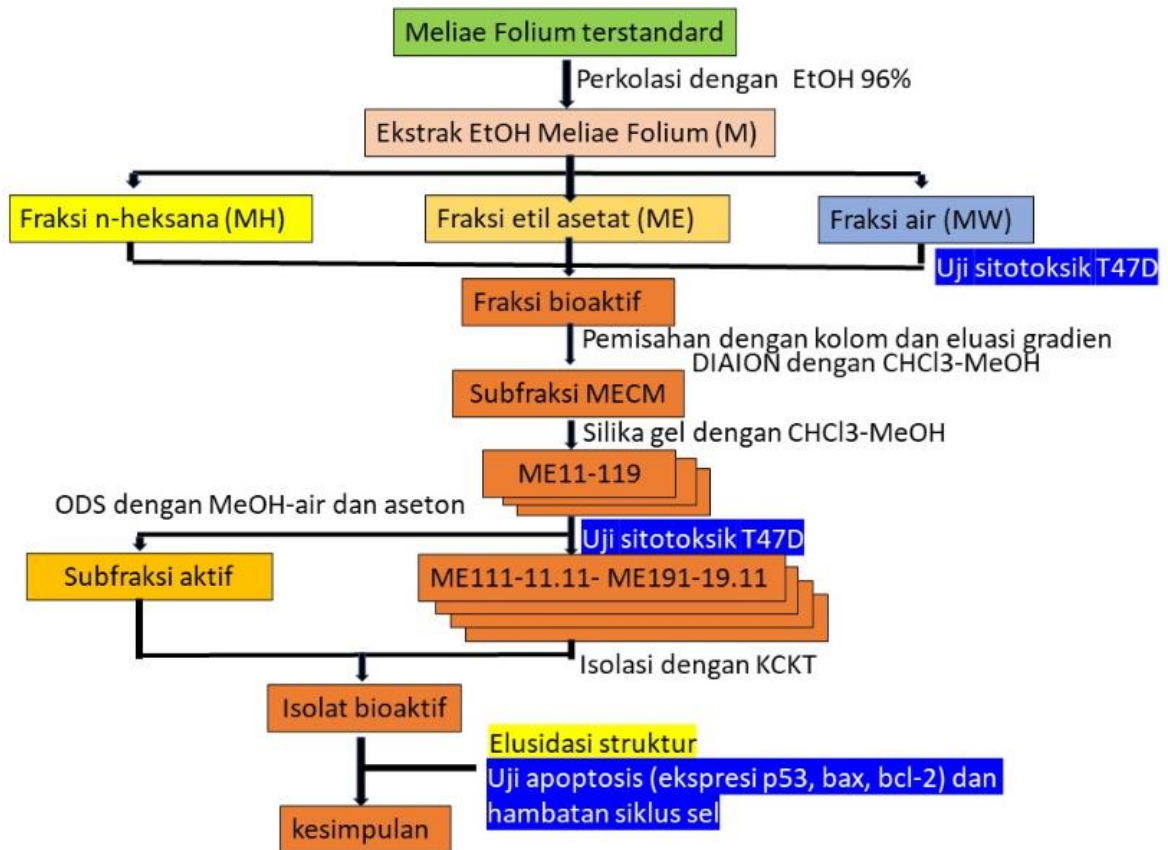
2. Persiapan kultur sel payudara manusia T47D dengan jumlah 5×10^3 sel/ml/ well.
3. Persiapan bahan uji. Ekstrak, fraksi dan isolat dilarutkan dalam DMSO dan diencerkan dengan media sampai diperoleh beberapa konsentrasi.
4. Uji sitoksisitas ekstrak, fraksi dan isolat terhadap sel kanker payudara manusia T47D dengan Uji MTT dengan 96 well plate dengan replikasi tiga kali.

5. Uji induksi apoptosis dengan perubahan morfologi, pewarnaan, flowcytometer dan ekspresi p53, bax, Bcl-2 sel kanker payudara manusia T47D.
 - a. Persiapan kultur sel kanker T47D dengan media RPMI dengan 10% FBS
 - b. Persiapan bahan uji dilarutkan dengan DMSO
 - c. Uji induksi apoptosis dengan metode perubahan morfologi sel (diamati dengan mikroskop cahaya), apoptosis kuantitatif dengan flowcytometer
 - d. Uji ekspresi p-53, bax, Bcl-2 dengan imunohistokimia

4.2. Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah daun Mindi diperoleh dari Materia Medika Batu, ekstrak etanol 96% daun Mindi, fraksi hasil pemisahan dan isolat.

4.3. Skema penelitian



Gambar 4.1. Skema tahapan penelitian

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas: bahan awal, konsentrasi senyawa uji.

Variabel kendali: penyiapan bahan, metode pengujian, penyiapan sel uji.

Variabel tergantung: rendemen dan kualitas bahan; jumlah sel apoptotik, ekspresi p53, bax, bcl-2.

4.5. Definisi operasional

1. Bahan disiapkan dan distandarisasi sesuai dengan parameter standarisasi Depkes RI (2000)
2. Ekstraksi dilakukan dengan perkolasi menggunakan etanol 96%
3. Pemisahan senyawa dengan fraksinasi cair-cair dengan n-heksana, etil asetat dan air; dan kromatografi kolom dengan fase diam Diaion, silika gel dan ODS dan eluasi landaian kloroform, metanol dan air; serta dengan KCKT dengan eluen yang dapat memisahkan senyawa dengan baik (optimasi eluen).
4. Isolat diidentifikasi dengan pereaksi spesifik, spektrum inframerah, RMI ^1H , ^{13}C , *COSY*, *HMQC* dan *HMBC* serta penentuan berat molekulnya dengan kromatografi massa.
5. IC_{50} sitotoksik adalah konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan 50% dari sel T47D yang diukur dari absorbansi sel perlakuan dibandingkan terhadap sel kontrol. IC_{50} diperoleh dari linearitas beberapa konsentrasi uji. MTT digunakan sebagai pereaksi untuk menunjukkan sel yang masih hidup, yang menghasilkan warna ungu dan diukur absorbannya pada 595 nm dengan Elisa Reader.
6. Pengujian dilengkapi dengan kontrol (tanpa senyawa uji) dan pembanding (doksorubisin).

7. Penghambatan siklus sel subG1, G1, S, G2 dan M dilakukan dengan penghitungan sel menggunakan flowcytometer
8. Jumlah sel apoptotik adalah persentase sel T47D yang dihitung dengan flowcytometer dengan pengecatan propium iodida-anexin, dilakukan terhadap kontrol sel, perlakuan dan pembanding.
9. Ekspresi p53, bax, bcl-2 pada sel uji adalah angka yang diperoleh dengan penghitungan persentase sel kanker payudara yang mengekspresikan p53, bax, bcl-2, berdasarkan warna coklat yang terlihat pada pengecatan imunohistokimia dengan mikroskop cahaya

4.6. Bahan dan Instrumen Penelitian

4.6.1. Bahan Penelitian

4.6.1.1. Bahan Tanaman

Daun Mindi (*M. azedarach* L.) diperoleh dari Materia Medika Batu, Jawa Timur pada bulan Oktober 2017, yang telah dideterminasi sesuai lampiran 1 dan dilakukan proses standarisasi.

4.6.1.2. Bahan untuk ekstraksi, fraksinasi dan isolasi

Bahan kimia yang digunakan etanol, n-heksana, etil asetat (teknis redestilasi), etanol p.a., kloroform, metanol, aseton, air, KLT silika gel F₂₅₄ (Merck), silika gel 60 (E. Merck, Darmstadt, Germany, 70–230 mesh). *Reversed-phase* (octadecylsilanized silica gel (ODS)), Cosmosil 75C18-OPN, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, $\Phi = 2$ cm, L = 40 cm), penampak bercak.

4.6.1.3. Bahan untuk uji sitotoksisitas

4.6.1.4. Sel Kanker payudara manusia T47D dari LP2T UGM, aquabidest, natrium bikarbonat (sigma) dan hepes (sigma), media RPMI, FBS 10% (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (Gibco), fungison 0,5%, buffer fosfat salin (PBS) 20% (sigma), DMSO, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) 5 mg dlm 1 ml PBS (Sigma); stopper SDS (sodium dodesil sulfat) 10% dlm HCl 0,01 Merck, *96 well plate*, pipet tip (1-1000 μ l) steril, filter unit 0,22 μ m Millex-GV (Milipore), Propidium Iodide (PI), RNase, Triton-X 100 (pro GC - Merck).

4.6.1.5. Bahan untuk pembiakan

RPMI (Sigma), FBS (Gibco), DMSO (Sigma), Pennicilin-Streptomycin (PAA Lab GmbH, Austria), L-Glutamin (Sigma).

4.6.1.6. Bahan untuk induksi apoptosis, ekspresi p53, bax, Bcl-2 dan siklus sel

Antibodi p53, bax, Bcl-2 (Boehringer Mannheim, Germany), agarose (LE), streptavidin, hematosilin, propidium iodide (PI), RNase, Triton-X 100 (pro GC - Merck), annexin.

4.6.1.7. Bahan untuk identifikasi struktur

Metanol pro spektrofometer, metanol-d₄ pro RMI, TMS pro RMI

4.6.2. Instrumen Penelitian

4.6.2.1. Instrumen untuk isolasi senyawa

Labu Erlenmeyer, rotavapor (Buchi), timbangan analitik, corong pisah, kolom vakum, bejana kromatografi, botol vial, pipet kapiler, penampak bercak, lampu uv 254 dan 366, spektrofotometer inframerah (Shimadzu type IR Prestige-21), RMI (RMI JEOL frekuensi gelombang radio 400 Hz (JNM-ECS400), MS (LTQ-Orbitrap XL, JMS-T100GCV),

KCKT (Shimadzu LC-10AD), kolom Inersil ODS GL Science 10 mm x 250 mm, detector RI-930 Jasco, degasser prominence DGU-20A5, pump LC-10AD), *manual collector*.

4.6.2.2. Instrumen untuk uji sitotoksitas

Inkubator CO₂ (New Brunswick, Galaxy 170R), sentrifuge (Hermle siemensstr-25D-78564), sonikator, LAF (Mascotte LH-s), micropipette (socorex), autoclave, hemositometer mikroskop inverted (Olympus CKX41-2), elisa reader (Robonik)

4.6.2.3. Instrumen untuk induksi apoptosis, ekspresi p53, bax, Bcl-2 dan siklus sel

Inkubator CO₂ (New Brunswick, Galaxy 170R), waterbath inkubator, sentrifus eppendorf, sentrifus, mikroskop cahaya (Olympus), kamera mikroskop, Neubauer *chamber* (haemocytometer), flowcytometer.

4.7. Lokasi Penelitian

Standarisasi dan penyiapan ekstrak dilakukan di Ruang Penelitian Fitokimia Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga (UA), uji sitotoksitas dan induksi apoptosis, bax, bcl-2 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Identifikasi isolat dengan Spektrofotometer IR dilakukan di Departemen Kimia Farmasi FFUA, isolasi dengan KCKT dan analisis RMI dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis UA dan Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University.

4.8. Prosedur Pengambilan/ Pengumpulan Data

4.8.1. Penyiapan bahan uji penelitian

4.8.1.1. Standarisasi simplisia

Bahan distandarisasi sesuai dengan buku acuan standarisasi yang meliputi standarisasi spesifik dan non spesifik. Parameter spesifik meliputi identitas, organoleptis (makroskopis, mikroskopis), dan kandungan senyawa kimia (Farnsworth, 1966; Wagner *et al*, 1984) sedangkan parameter non spesifik meliputi kadar air, kadar abu total, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol (DepKes RI, 2000).

4.8.1.2. Pembuatan ekstrak etanol daun Mindi

Sebanyak 0,5 kg serbuk daun Mindi dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan etanol 96% 5 L (1:10); filtrat ditampung. Proses remaserasi diulangi 2x dengan menggunakan etanol 96% 2 L (1:4). Semua filtrat dikumpulkan dan diuapkan etanolnya menggunakan penguap vakum putar, sehingga diperoleh ekstrak kental (M). % Rendemen ekstrak dihitung terhadap berat simplisia awal yang digunakan.

4.8.1.3. Pemisahan ekstrak etanol dengan ekstraksi cair-cair

Ekstrak kental etanol 10 g ditambahkan aquadest hangat 100 ml dan dilakukan ekstraksi cair-cair dengan dikocok ekstrak cair dengan n-heksana sama banyak menggunakan corong pisah. Fase n-heksana dipisahkan dari fase air; dilakukan 3x dan fase n-heksana dikumpulkan menjadi satu (MH), selanjutnya fase air diuapkan pada waterbath sampai tidak berbau heksana; dilanjutkan fraksinasi menggunakan etil asetat (3x). Fase etil asetat dipisahkan dari fase air dan masing-masing dikumpulkan sehingga diperoleh fase etil asetat (ME) dan fase air (MW). Pola kromatogram dari ekstrak dan fraksi diperiksa; menggunakan silika gel F₂₅₄ dengan n-heksana:etil asetat (4:1) dan kloroform:metanol (95:5), dengan penampak bercak asam sulfat.

4.8.1.4. Isolasi senyawa aktif dengan kromatografi cair kinerja tinggi

Subfraksi yang aktif selanjutnya diisolasi dengan kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom Inersil ODS GL Science 10 mm x 250 mm, Shimadzu LC-10AD, detector RI-930 Jasco, volume injeksi 10 μ l, dengan fase gerak aseton-air (90% sampai 30%) dengan kecepatan alir 2,5 ml/ menit. Dilakukan optimasi eluen yang dapat memisahkan puncak-puncak kandungan senyawa sehingga memudahkan untuk menampung isolat secara manual.

Cara kerja dilakukan sebagai berikut: kolom dicuci dengan eluen sampai diperoleh kromatogram bersih dari serapan. Subfraksi dilarutkan dengan pelarut metanol dan dimasukkan dalam kolom dengan injektor. Eluasi menggunakan fase gerak yang telah diperoleh dari proses optimasi. Filtrat ditampung sesuai puncak yang muncul pada panjang gelombang yang telah ditentukan. Filtrat-filtrat yang dihasilkan diamati pola kromatogramnya dengan fase gerak kloroform-metanol dengan penampak bercak UV 254 nm, UV 366 nm dan asam sulfat 10%. Isolat yang dihasilkan diuji sitotoksitasnya terhadap sel kanker T47D. Isolat aktif diidentifikasi struktur kimianya, spektrofotometer infra merah, dan RMI. Jika diperoleh kristal dilakukan pencucian kristal dengan pelarut yang sesuai, sampai diperoleh kristal yang murni.

4.8.2. Pengujian sitotoksitas pada sel kanker payudara T47D

4.8.2.1. Persiapan kultur sel

Penyiapan sel dimulai dengan mengamati kesiapan sel dari kultur sel induk dalam *t-flask* dengan menggunakan mikroskop. Pemanenan sel optimum jika sel teramati konfluen (70-80% sel memenuhi dinding *flask*). Media dalam botol dibuang dan diganti dengan PBS,

dan didekantasi dua kali. Ditambahkan tripsin dalam PBS sebanyak 100 μ l dan *flask* dimasukkan kembali dalam inkubator CO₂ selama 3 menit dengan tutup sedikit terbuka. Sel diamati kembali untuk memastikan tidak ada sel yang menempel di dinding *flask*. Ditambahkan larutan media 5 mL dan diresuspensi dengan pipet steril. Diambil suspensi sel 50 μ l dan ditambahkan tripan biru 0,45% 50 μ l, kemudian sel dihitung dengan hemositometer (maksimum 3 menit). Diencerkan dengan menambahkan media (sesuai data perhitungan sel) sampai volume 10 mL (untuk pengujian 1 plat dengan 96 sumur)

4.8.2.2. Penyiapan larutan uji

Ekstrak, fraksi dan isolat disiapkan bahan uji sitotoksitas terhadap ekstrak, fraksi dan isolat daun Mindi dengan konsentrasi 500, 100, 20, 4, 0,8 μ g/mL dengan DMSO.

4.8.2.3. Uji sitotoksik

Sel diambil dari inkubator CO₂, diamati kondisi sel. Sel dipanen sesuai dengan protokol panen. Dihitung jumlah sel dan dibuat pengenceran dengan media sesuai kebutuhan mengikuti protokol penghitungan sel. 100 μ l sel ditransfer ke dalam sumuran. Disisakan 3 sumuran kosong (untuk blanko media). Sel diamati di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan didokumentasikan. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen). Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal. Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, diinkubasikan kembali. Diambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂. Dibuang media sel (*plate* dibalikkan 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu steril untuk meniriskan sisa cairan. Dimasukkan 100 μ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian dibuang PBS dengan cara membalik *plate* seperti cara di atas. Ditiriskan sisa cairan dengan tisu. Dimasukkan seri konsentrasi

sampel ke dalam sumuran (triplo). Diinkubasi di dalam inkubator CO₂. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, diinkubasi kembali selama 24 jam (waktu inkubasi total: 24-48 jam). Menjelang akhir waktu inkubasi, didokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan. Disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara ambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5mg/mL), diencerkan dengan media ad 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). Dibuang media sel, dicuci PBS 1x dan ditambahkan reagen MTT 100 µl ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Diinkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO₂. Diperiksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk (teramati bentuk kristal), ditambahkan *stopper* 100 µl SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Ditentukan absorbannya dengan ELISA *reader*. Ditunggu proses *progressing* hingga selesai. Dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. *Plate* dimasukkan ke dalam ELISA *reader* Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm, tekan tombol *START*). Dibuat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi. Dihitung persentase sel hidup dan analisis harga IC₅₀ dengan Excel (Regresi linear dari log konsentrasi).

4.8.2.4. Uji induksi apoptosis dengan flowcytometer

Pemeriksaan uji induksi apoptosis sel kanker payudara kontrol dan perlakuan dengan diresuspensikan dalam dapar Annexin dan direaksikan dengan Annexin V dan propidium iodide. Campuran didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Sel dihitung dengan FAC-Scan flowcytometer. Analisis bivarian FITC-fluoresens dan PI-

fluoresens menghasilkan populasi sel berbeda. Fenotipe FITC (-) dan PI (-) sebagai viable sel viable, sementara FITC (+) dan PI (-) sebagai sel apoptosis awal, FITC (-) dan PI (+) sebagai sel nekrosis dan FITC (+) dan PI (+) sebagai sel apoptosis akhir.

4.8.2.5. Uji hambatan siklus sel T47D

Supernatan dibuang dengan menambahkan 500 μ L alcohol 70% dalam konikal sambil digoyang perlahan. Konikal disimpan pada suhu ruang selama 35 menit dan diresentrifugasi pada 600 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan alcohol. Konikal ditambahkan 500 μ L of PBS dan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 3 menit. Pencucian dilakukan dua kali dengan PBS dan konikal dibungkus alumunium foil dan diberi keterangan. Ditambahkan reagen flowcytometri dan didiamkan selama 30 menit. ditransfer suspensi sel ke dalam *flowcyto-tube* (jika diperlukan di filter dengan kain nylon/kain kaca) menggunakan mikropipet 1 mL. Dibaca hasilnya dengan flowcytometer FACS Calibur untuk mengetahui profil siklus sel dengan dibandingkan terhadap kontrol sel. Setiap selesai pekerjaan, dilakukan sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja *In Vitro* di Laboratorium.

4.8.2.6. Uji ekspresi p53, bax, bcl-2 sel T47D dengan perubahan morfologi dan imunositokimia

Sel kanker T47D dalam medium RPMI yang ditambahkan FBS 10% dan fungasol 0,1%. Konsentrasi bahan uji dibuat pada IC_{50} dengan DMSO, kontrol negatif DMSO dan positif doksorubisin 100 μ g/mL, ditambahkan sel dan diikunbasi suhu 37⁰C dalam inkubator CO₂ selama 24, dan 48 jam. Sel hasil perlakuan diamati perubahan morfologi dengan mikroskop cahaya dan difoto.

Sel kanker hasil perlakuan ditambah RPMI 1640 disentrifus pada suhu 4⁰C, 800 rpm selama 5 menit. Medium dibuang, sebagian sel dipindahkan ke gelas obyek dan

ditambahkan H₂O₂ 0,5% selama 10 menit, dicuci dengan air, dan dicuci kembali dengan PBS selama 5 menit. Ditambahkan buffer sitrat dalam microwave dan didinginkan. Dicuci dengan PBS 2 x selama 5 menit, ditambah normal serum 10 menit, ditambah antibodi 1 jam/ semalam. Selanjutnya dicuci dengan PBA 2x selama 5 menit. Ditambahkan antibodi sekunder selama 10 menit, dicuci dengan PBS 2x selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan streptavidin selama 10 menit, dicuci dengan PBS 2x 5 menit dan ditambahkan DAB selama 8 menit, dan dicuci dengan air. Ditambahkan hematoksilin. Sel yang mengekspresikan p53, bax, Bcl-2 akan terwarnai coklat (diamati dengan mikroskop cahaya). Penentuan ekspresi dengan persentase sel yang mengekspresikan p53, bax, bcl.

4.8.2.7. Disposasi limbah sisa pengujian

Untuk limbah kultur sel dalam media kultur diinaktivasi selama 2 jam dalam larutan hipoklorida (10.000 ppm) sebelum dibuang ke wastafel dengan air yang banyak. Untuk pipet setelah digunakan direndam dalam larutan hipoklorida (2500 ppm) semalam sebelum dicuci dan disterilkan dengan *autoclave* dan atau dimusnahkan. Sampah padat seperti *flasks*, tabung sentrifus, sarung tangan, dan tisu terkontaminasi, diletakkan dalam sampah khusus *biohazard* untuk limbah terkontaminasi dan dimusnahkan dengan diinsenerasi.

Jika memungkinkan semua limbah diinsenerasi

4.8.3. Identifikasi bahan aktif dan struktur isolat aktif

4.8.3.1. Identifikasi dengan spektroskopi infra merah

Sejumlah kecil isolat digerus dengan KBr bebas air sampai homogen dan dikempa sampai menjadi pellet yang transparan. Pellet dimasukkan ke dalam sampel holder dan direkam spektrumnya.

4.8.3.2. Identifikasi dengan spektroskopi massa

Isolat diletakkan pada wadah sampel dan ditentukan pola fragmentasinya. Hasil digunakan untuk menentukan berat molekul dan memperkirakan formula senyawa.

4.8.3.3. Identifikasi dengan spektroskopi RMI

Sekitar 3 mg isolat dilarutkan dalam 0,5mL metanol-d4 dan dimasukkan kedalam tabung sampel. Kedalam larutan ditambahkan tetrametilsilana (TMS) sebagai acuan internal. Campuran dimasukkan ke alat diantara dua kutub magnet dan direkam spektrumnya.

4.9. Cara Pengolahan dan Analisa Data

Dari hasil uji sitotoksik (CCRC, 2013) yang berupa respon serapan dikonversikan ke persen sel hidup dengan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{absorban uji} - \text{absorban kontrol media})}{\text{absorban kontrol sel} - \text{absorban kontrol media}} \times 100\%$$

Potensi sitotoksik ditentukan dengan IC_{50} yaitu konsentrasi bahan uji yang menyebabkan hambatan pertumbuhan sebanyak 50% dari populasi. IC_{50} ditentukan dengan analisis probit sehingga dapat ditentukan IC_{50} ekstrak, fraksi dan isolat. Tahapan penentuan IC_{50} dapat dilakukan dengan dibuat grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup dengan *chart type scatter* dan *chart subtype compare pairs of values*. Dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menambilkkan *add trendline*-regresi linier. Dilihat parameter r pada persamaan regresi linier. Jika r lebih besar dari r tabel maka persamaan regresi linier memenuhi standar untuk mencari IC_{50} . Dimasukkan $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier dan dicari x nya kemudian dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh IC_{50} .

BAB 5





DATA DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Penyiapan bahan penelitian

Tanaman diperoleh dari Balai Materia Medika Batu sesuai dengan keterangan determinasi Lampiran 1. Sebelum digunakan, bahan ditetapkan kualitasnya sesuai dengan parameter spesifik dan non spesifik yang meliputi identitas tanaman, ciri makroskopis dan fragmen mikroskopisnya seperti disajikan pada tabel 5.1.

Dari identifikasi botani dan pengamatan ini dapat ditetapkan bahan yang digunakan adalah Mindi (*Melia azedarach L.*). Meskipun tidak dibudidayakan, dapat dipastikan bahwa pemanenan dan pembuatan simplisia mengikuti ketentuan cara pembuatan simplisia yang baik. Daun dipisahkan dari batang dan ranting, juga disisihkan dari komponen asing. Bahan dicuci,

Tabel 5.1. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis daun *M. azedarach*

Makroskopis	Foto	Mikroskopis	Foto
Pohon, 10-15m dan berdaun sepanjang musim (<i>deciduous</i>)		ep = epidermis, co = kolenkim, pa = parenkim, pal= palisade, ca = kalsium oksalat, tr = trikoma, gl = rambut kelenjar, xy = jaringan xilem; fl = floem	
Filotaksis daun berpasangan, dan khas tunggal pada ujungnya, permukaan kasar, berukuran panjang 3-8 cm, bergerigi pinggirnya, bau khas, berwarna hijau gelap sampai pucat		trikoma multiseluler dan kolaborasi, berkas pembuluh	

ditiriskan dan dikeringkan dengan diangin-anginkan dan dioven pada suhu $<50^{\circ}\text{C}$. Hasil pembuatan simplisia Meliae Folium dapat dilihat pada tabel 5.2, diperoleh simplisia Meliae Folium $39,3 \pm 2,10\%$.

Tahapan standarisasi simplisia dilakukan untuk menjamin kualitas bahan yang digunakan disamping mengendalikan variabel-variabel yang dapat mempengaruhi hasil. Standarisasi meliputi penentuan parameter spesifik dan non spesifik seperti tabel 5.3 dan 5.4.

Tabel 5.2. Berat kering Meliae Folium

Replikasi	Daun segar (g)	Simplisia (g)	Rendemen simplisia (%)	X ± SD
1	1000	398	39,8	39,3 ± 2,10
2	1000	370	37,0	
3	1000	411	41,1	

Tabel 5.3. Parameter standarisasi Meliae Folium

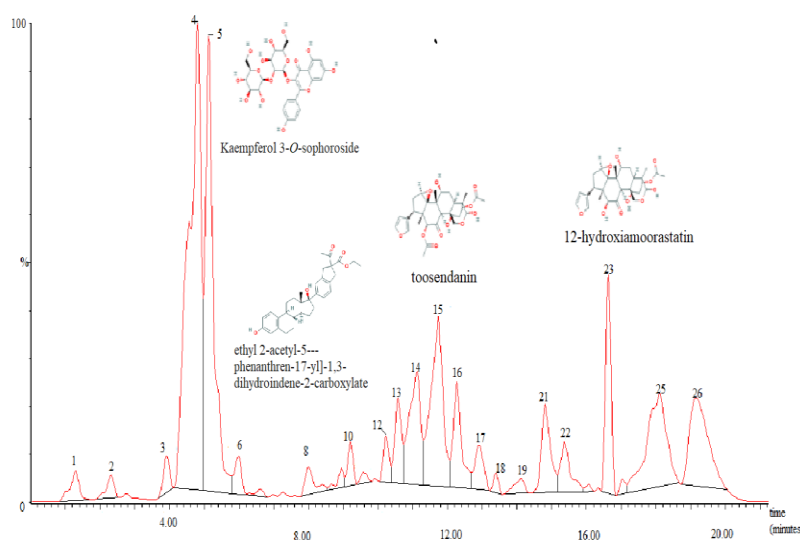
Parameter	Replikasi			X ± SD (%)
	1	2	3	
Sari larut etanol	26,54	23,53	28,78	27,28 ± 1,30
Sari larut air	34,5	33,52	33,53	33,85 ± 0,56
Kadar abu total	6,73	6,77	6,76	6,77 ± 0,28
Susut pengeringan	1,60	1,80	1,60	1,67 ± 0,12

Tabel 5.4. Skrining fitokimia Meliae Folium

Golongan senyawa	Pereaksi	Hasil pengamatan	
Tannin	FeCl ₃	Biru hitam	+
Flavonoid	Wilstater	Kuning	+
Saponin	Busa	Busa stabil	+
Steroid/ triterpenoid	Liebermann-Burchard	Biru hijau	+
Antrakinon	KOH	Kuning	-
Glikosida	Molisch	Cincin merah	+
Alkaloid	Dragendorf	jingga keruh	+
	Wagner	keruh	+

Tabel 5.5 Hasil ekstraksi *Meliae Folium*

Replikasi	W simplisia (g)	W ekstrak (g)	Rendemen Ekstrak (%)	X ± SD (%)
1	500	151,5	30,3	30,1 ± 0,42
2	500	147,5	29,5	
3	500	150,5	30,1	

Gambar 5.1. kromatogram *LC-MS* ekstrak *M. azedarach*

Analisis *LC-MS* dari ekstrak *M. azedarach* teramati 16 puncak dengan persen area >1% (Gambar 5.1). dari masing-masing puncak ini dianalisis pola fragmentasinya sehingga dapat diduga kandungan senyawa dalam ekstrak daun Mindi seperti ditampilkan pada tabel 5.6. Senyawa glikosida fenolat Kuersetin 3-*O*- β -*D*-galaktopiranosil-(1-3)- β -*D*-galaktopiranosida (24.74%) dan Kaempferol 3-*O*-soforosida (16.67%) menunjukkan persentase terbesar (PubChem, 2020; Mona-Mass bank of North America, 2020). Senyawa lainnya seperti Toosendanin (8.96%) (Ong *et al.*, 2007), Triterpen saponin of 3-*O*- β -[2'-(2''-*O*-glikolil)-glioksilil]-asam oleanolat-28-*O*- β -*D*-glukopiranosida (8.03%) (Mitaine-Offer *et al.*, 2001), dan polimer sterol dari (2*E*)-6-{13,17-dihidroksi-7,7,12,16- tetrametil-6-[(3,4,5-

Tabel 5.6. Hasil interpretasi spektra LC-MS ekstrak *M. azedarach*

No Puncak	M			Dugaan senyawa (referensi)
	Rt	%	Berat molekul [M+H]	
4	4.80	24.74	627.14	Kuersetin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galaktopiranosil-(1-3)- β - <i>D</i> -galaktopiranosida; C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇ 626.5 g/mol (PubChem, 2020; Mona-Mass bank of North America, 2020)
5	5.12	16.67	611.15	Kaempferol 3- <i>O</i> -soforosida; C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ 610.5 g/mol (Mona-Mass bank of North America, 2020)
6	6.00	1.19	287.09	Kaempferol; C ₁₅ H ₁₀ O ₆ 286.24 g/mol (PubChem, 2020; Mona-Mass bank of North America, 2020)
8	7.99	1.11	626.34	Hesperetin 5,7-diglukosida; C ₂₈ H ₃₄ O ₁₆ 626.6 g/mol (PubChem, 2020)
10	9.20	1.03	557.24	Toosendanal; C ₃₀ H ₃₆ O ₁₀ 556.6 g/mol (Tada <i>et al.</i> , 1999)
12	10.22	1.13	503.42	etil 2-asetil-5-[(8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-3,17-dihidroksi-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahidro-6 <i>H</i> -siklopenta[α]fenantren-17-yl]-1,3-dihydroindene-2-carboxylate; C ₃₂ H ₃₈ O ₅ , 502.6 g/mol (Mona-Mass bank of North America, 2020)
13	10.58	2.49	683.25	[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)-oksan-2-il] (1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>βR</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>aR</i>)-1,10,11-trihidroksi-9,9-bis(hidroksimetil)-2,2,6 <i>a</i> ,6 <i>β</i> ,12 <i>a</i> -pentametil-1,3,4,5,6,6 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> ,10,11,12,13,14 <i>β</i> -tetradekahoidropisena-4 <i>a</i> -karboksilat (toosendanin sterol); C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂ 682.3 g/mol (Mona-Mass bank of North America, 2020)
14	11.11	5.53	697.26	1-sinnamoil-3-hidroksi-11-metoksimelekarpinin; C ₃₀ H ₄₉ O ₁₈ 696.7 g/mol (PubChem, 2020; Chemspider, 2020)
15	11.72	8.96	575.52	Toosendanin; C ₃₀ H ₃₈ O ₁₁ 574.6 g/mol (Ong & Ong, 2007)
16	12.26	3.81	659.24	Meliatoksin B1; C ₃₅ H ₄₆ O ₁₂ 658.74 g/mol (PubChem, 2020)
17	12.88	1.71	549.28	Miristin A; C ₃₃ H ₄₀ O ₇ 548.7 g/mol (PubChem, 2020)
20	14.81	3.44	507.34	Kuersetin-3- <i>O</i> -glukosil-6''-asetat; C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃ 506.1 g/mol (Mona-Mass bank of North America, 2020)
21	15.37	2.10	547.24	Meliarakhin H; C ₂₉ H ₃₈ O ₁₀ 546.6 g/mol (PubChem, 2020)
23	16.62	5.22	533.26	Derivat 12-hidroksiamoorastatin-asetil; C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀ 532.5 g/mol (PubChem, 2020; Polonsky <i>et al.</i> , 1979)
25	18.10	8.03	751.43	3- <i>O</i> -beta-[2'-(2''- <i>O</i> -glikolil)-glioksilil]-asam oleanolat-28- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glukopiranosida, C ₄₀ H ₆₂ O ₁₃ , 750.9 g/mol (Mitaine-Offer <i>et al.</i> , 2001)
26	19.15	7.25	577.12	β -Sitosterol glukosida; C ₃₅ H ₆₀ O ₆ 576.8 g/mol (PubChem, 2020)

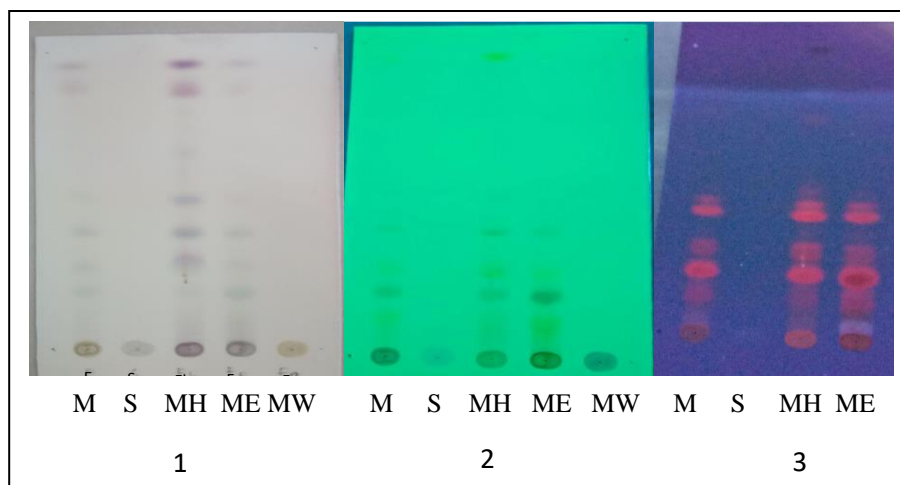
trihidroksioksan-2-il)-oksi]-pentasiklo-[9.7.0.0^{1,3}.0^{3,8}. 0^{12,16}]-oktadekan-15-il]-2-metilhepta-2-asam enoat (7.25%) (PubChem, 2020). Kelompok limonoid dari 1-sinamoil-3-hidroksi-11-metoksimeliakarpinin (5.53%), derivat 12-hidroksi amoorastatin-asetil (5.22%), Meliatoksin B1 (3.81%), triterpen [(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)-oksan-2-il] (1*S*,4*R*,6*S*, 6*R*,10*R*,11*R*,12*R*)-1,10,11-trihidroksi-9,9-bis-(hidroksimetil)-2,2,6 α ,6 β ,12 α -pentametil-1,3,4,5,6, 6 α ,7,8,8 α ,10,11, 12,13,14 β -tetradekahidropikena-4 α -karboksilat (2.49%), dan Meliarachin H (2.09%). Dapat diamati juga sejumlah kecil glikosida flavonoid dan aglikon Kaempferol (1.19%) dan Hesperetin-5,7-diglukosida (1.11%); etil-2-asetil-5-[(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihidroksi-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahidro-6*H*-siklopenta-[*a*]-fenantren-17-yl]-1,3-dihidroinden-2-karboksilat (1.13%), Toosendanal (1.03%) dan Myristinin A (1.71%).

Tabel 5.7. Hasil fraksinasi ekstrak *M azedarach*

Parameter	MH	ME	MW
Identitas	Fraksi n-heksana ekstrak etanol <i>M azedarach</i> Folium	Fraksi etil asetat ekstrak etanol <i>M azedarach</i> Folium	Fraksi air ekstrak etanol <i>M azedarach</i> Folium
Konsistensi	Hijau hitam, ekstrak kental	Hijau tua, ekstrak kering, menggumpal	Coklat tua, ekstrak kental
Rendemen			
1	26,21	8,67	49,63
2	28,25	8,72	48,31
3	27,45	7,75	52,91
X \pm SD	27,30 \pm 1,03	8,38 \pm 0,55	50,28 \pm 2,37
Skrining Fitokimia			
Tannin	-	-	+
Flavonoid	-	+	+
Saponin	-	-	+
Steroid	+	+	-
Alkaloid	+	+	+
Glycoside	-	-	+
Anthraquinone	-	-	-

Skrining fitokimia menunjukkan adanya perbedaan kandungan ekstrak dan fraksi seperti ditunjukkan pada tabel 5.4 dan 5.7. Ekstrak menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder kecuali golongan antrakinon, sementara di fraksi lebih terdistribusi sesuai dengan polaritasnya. Di fraksi air teramati lebih banyak golongan senyawa metabolit sekunder dibanding fraksi lainnya.

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan kandungan senyawa metabolit sekunder dari daun Mindi berdasarkan kelarutannya dalam pelarut yang digunakan yaitu dalam n-heksana, etil asetat dan air. Hasil KLT ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada gambar 5.2. Dapat diamati bercak ungu pada MH dan ME yang diduga golongan senyawa steroid pada fraksi n-heksana dan etil asetat.



Gambar 5.2. Kromatografi lapis tipis simplisia, ekstrak dan fraksi

Keterangan: (1) Penampak bercak anisaldehyd sulfat, (2) uv 254, (3) uv 366, M = ekstrak, S = simplisia, MH= fraksi heksana, ME= fraksi etil asetat, MW = fraksi air

Sitotoksik terhadap sel T47D dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi untuk menentukan proses isolasi selanjutnya. Hasil sitotoksik dapat diamati pada tabel 5.8. menunjukkan fraksi etil asetat (ME) memiliki potensi yang paling baik dibanding ekstrak

Tabel 5.8. Hasil uji sitotoksik ekstrak, fraksi dan pembanding terhadap sel T47D

IC ₅₀	Rersamaan linearitas	r ²	IC ₅₀ (µg/mL)
M	y=-0,0989x+1 13,51	0,9816	654,27
MH	y=-0,0826x+115,91	0,8678	757,09
ME	y=-0,3409x+100,43	0,9935	166,48
MW	y=-0,061x+109.42	0,9052	893,58
Doksorubisin	y= -0,1106x + 71.98	0,8832	169,54

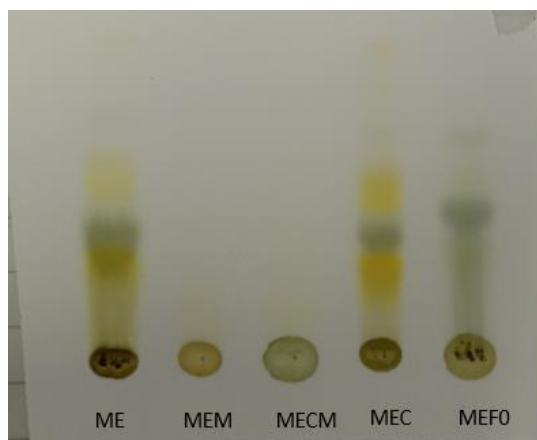
maupun sampel lainnya (fraksi dan pembanding). Hasil ini digunakan untuk melanjutkan proses pemisahan dan isolasi senyawa aktif pada ME.

5.2. Pemisahan senyawa aktif

Hasil pemisahan senyawa dari fraksi bioaktif etil asetat yang sudah dihilangkan klorofil dan senyawa inert lainnya, serta dipisah-pisahkan sesuai dengan kelarutan pada eluen yang digunakan seperti ditampilkan pada tabel 5.9.

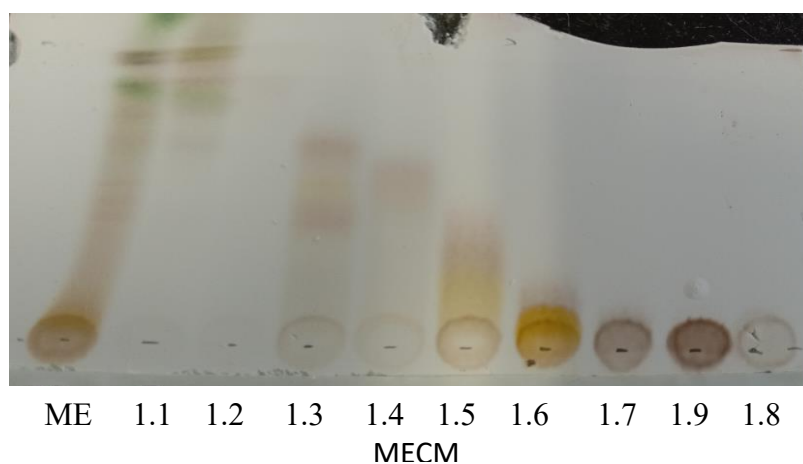
Tabel 5.9. Hasil sub-fraksinasi bertingkat fraksi etil asetat ekstrak *M azedarach* Folium

Solven metanol	Berat Subfraksi (g)								
	ME11	ME12	ME13	ME14	ME15	ME16	ME17	ME18	ME19
	9,1238	18,0195	9,6155	8,7348	7,8714	6,9636	1,7386	0,6482	0,8808
10% (1)	0,3688	2,0056	1,5593	2,2170	1,1815	0,6815	0,0956	0,0877	0,1744
20% (2)	0,5471	1,7553	1,3943	1,2151	1,7040	0,5357	0,0451	0,0167	0,0260
30% (3)	0,4007	1,7373	1,1593	0,8580	1,3114	1,0648	0,0352	0,0405	0,0479
40% (4)	0,6940	2,7846	1,6978	1,1677	1,1157	0,6697	0,0723	0,1154	0,0674
50% (5)	1,6993	3,3644	1,7543	1,3580	0,6972	0,4454	0,0607	0,0424	0,0858
60% (6)	1,9258	2,1376	0,8660	0,5105	0,4213	0,1825	0,0462	0,0080	0,0746
70% (7)	0,7861	1,1756	0,3510	0,2689	0,1920	0,0971	0,0490	0,0652	0,0780
80% (8)	0,8971	0,6667	0,1938	0,2208	0,0923	0,0896	0,0267	0,0919	0,0582
90% (9)	1,0159	0,6141	0,1196	0,1434	0,2057	0,1478	0,0395	0,0509	0,0581
100% (10)	0,8105	0,5786	0,1706	0,1490	0,4881	0,1381	0,0392	0,0488	0,0662
Aseton (11)	0,0364	0,4640	0,1780	0,0296	0,0201	0,0309	0,0070	0,0045	0,0292



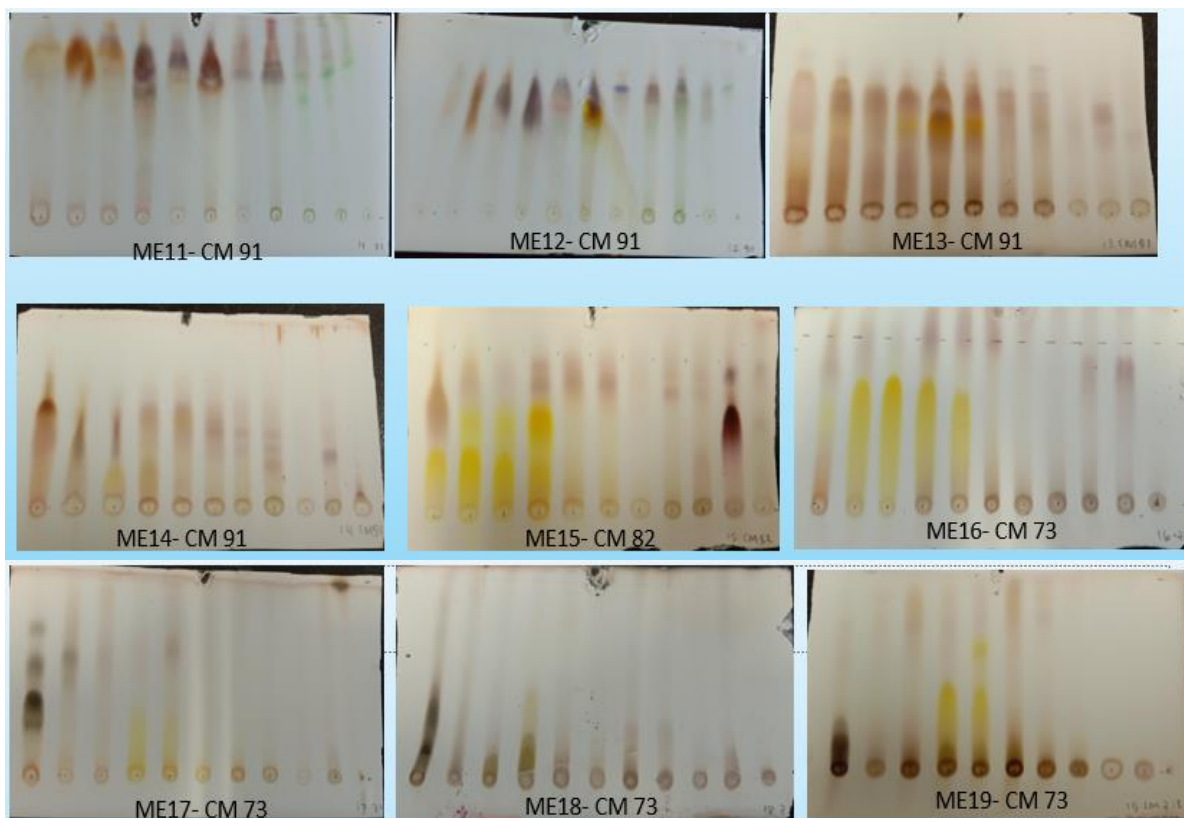
Gambar 5.3. KLT fraksi dan subfraksi dengan fase gerak n-heksana-etil asetat 7-3, penampak bercak H_2SO_4 10%, ME= fraksi etil asetat, MEM= subfraksi metanol, MECM= subfraksi campuran kloroform-metanol, MEC= subfraksi kloroform, MEF0= fraksi tidak larut awal

Gambar 5.3. menunjukkan KLT dari fraksi dan subfraksi pada fraksi metanol dan kloroform-metanol berada di garis awal, sementara pada subfraksi kloroform (MEC) terlihat pemisahan lebih jelas dibandingkan dengan fraksi EAny (ME). Subfraksi metanol (MEM) dan kloroform-metanol (MECM) tampak pada garis awal. Pada fraksi tidak larut (MEF0) teramati bercak warna abu-abu.



Gambar 5.4. Kromatografi lapis tipis subfraksi diaion dengan eluen kloroform-metanol, ME = fraksi etil asetat, MECM 1.1-1.9 = subfraksi diaion metanol dan kloroform

Pada gambar 5.4 hasil pemisahan subfraksi Diaion-CM dengan silika eluasi gradien CM teramati semakin tinggi konsentrasi metanol semakin polar senyawa yang dihasilkan (bercak tetap pada garis awal. Pemisahan paling baik dihasilkan pada ME12-14.



Gambar 5.5. KLT sub-subfraksi hasil pemisahan dengan kolom ODS, eluasi gradien metanol-air dan aseton, lempeng silika, fase gerak CM = kloroform-metanol (9-1, 8-2, 7-3) dan penampak bercak H_2SO_4 10%.

KLT subfraksi seperti pada gambar 5.5. dengan menggunakan kolom ODS dengan gradien eluasi metanol-air dan aseton, menunjukkan adanya pemisahan senyawa. Teramati bercak warna ungu, kuning dan coklat. Dari subfraksi-subfraksi ini kembali diuji sitotoksiknya yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.10. Subfraksi ME11 dan ME12 merupakan subfraksi yang paling aktif dengan IC_{50} 92,1588 dan 113,1504 $\mu\text{g/mL}$.

5.3. Uji sitotoksik subfraksi

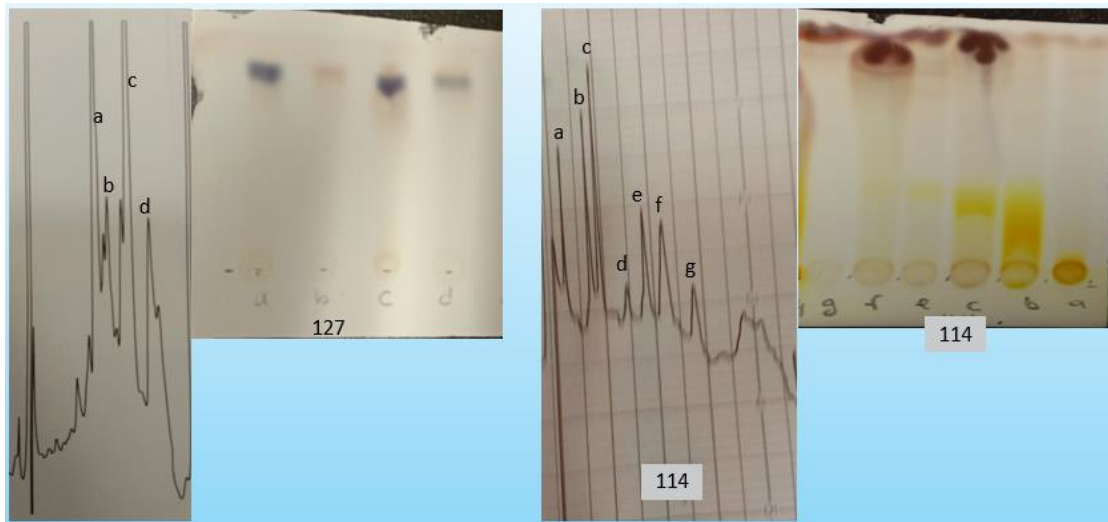
Tabel 5.10. Hasil penentuan IC₅₀ subfraksi

Sub-sub Fraksi	Persamaan linearitas	r ²	IC ₅₀ (µg/mL)
F0	-	-	>500
11	y = -0,1612x + 64,856	0,9923	92,1588
12	y = -0,4555x + 101,55	0,9998	113,1504
13	y = -0,1335x + 77,1	0,9996	202,9963
14	-	-	>500
15	y = -0,1481x + 93,247	0,9792	292,0122
16	y = -0,1746x + 110,72	0,9911	347,7663
17	y = -0,0701x + 76,91	0,9905	383,8802
18	y = -0,0715x + 74,506	0,9992	342,7413
19	y = -0,0806x + 83,225	0,9764	412,2208
Isolat			
114A	-	-	>500
127C	y = -0,4782x + 79,105	0,9693	60,8637
127A	y = -0,1512x + 76,251	0,9997	173,6177
1210D	y = -0,0473x + 107,03	0,9541	1205,708
154G	y = -0,0531x + 103,61	0,9795	1009,605
Doxo	y = -0,3374x + 83,042	0,9577	97,9312

Subfraksi kembali diuji sitotoksitasnya untuk menentukan subfraksi paling bioaktif. Hasil menunjukkan subfraksi yang paling aktif adalah subfraksi ME11 dan 12 dengan IC₅₀ 92,1588 dan 113,1504 µg/mL seperti ditampilkan pada tabel 5.10.

Dari subfraksi aktif ini dilakukan optimasi fase gerak kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang paling baik untuk memisahkan senyawa lebih lanjut. Optimasi dilakukan dengan menggunakan eluen aseton pada beberapa konsentrasi, sampai dipilih eluen yang dapat memisahkan puncak dengan baik. Diantara subfraksi ME11 dan ME12 diperoleh pemisahan paling baik adalah subfraksi ME114 dan 127. Subfraksi ME114 dengan eluen aseton 35%, sedangkan ME127 dengan aseton 55%. Kromatogram KCKT ME114 dan ME127 menunjukkan pemisahan paling baik dengan KLTnya yang teramati satu bercak; sehingga dilanjutkan prosesnya untuk diisolasi, dielusidasi struktur dan ditentukan kemungkinan mekanisme apoptosisnya terhadap sel T47D.

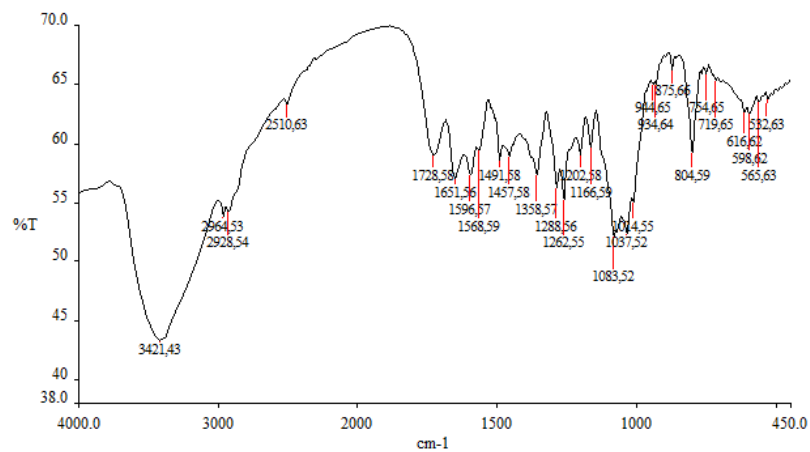
Pada ME114 dapat diisolasi 7 puncak (Gambar 5.6) dengan cara manual, KLT menunjukkan dugaan senyawa terpisah pada ME114A. Meskipun 114A bercak kuning (diduga golongan flavonoid) namun tetap dipisahkan dan dilanjutkan untuk elusidasi strukturnya, sedangkan dari ME127 diisolasi 4 komponen, yang diduga golongan steroid yaitu ME127A dan ME127C.



Gambar 5.6. Kromatogram hasil isolasi KCKT subfraksi 127 dan 114

5.4. Elusidasi struktur isolat

5.4.1. Elusidasi isolat ME114A

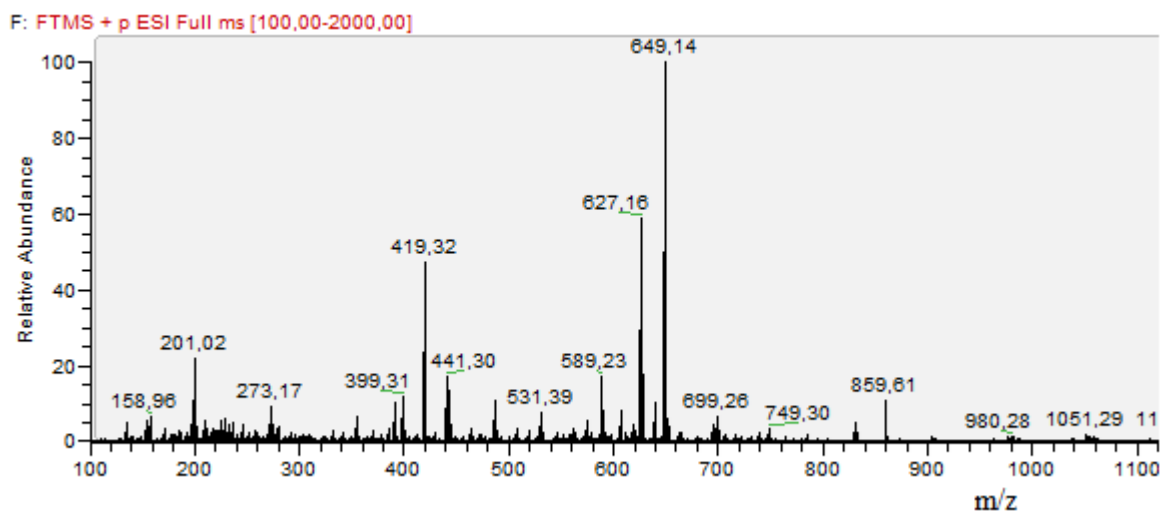


Gambar 5.7. spektra inframerah isolat ME114A

Tabel 5.11. Bilangan gelombang spektra ME114A

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Sidik jari (cm ⁻¹)
3421,43	-OH	1491,58	1457,58
		1358,57	1288,56
		1262,55	1202,58
2964,53 2928,54 2510,63	C-H (sp ²)	1166,59	
		1083,52	1037,52
		1014,55	944,65
		934,64	
1728,58	C=C	875,66	804,59 754,65
		719,65	616,62
		598,62	565,63 532,63
1651,56 1596,57 1568,59	C=O		

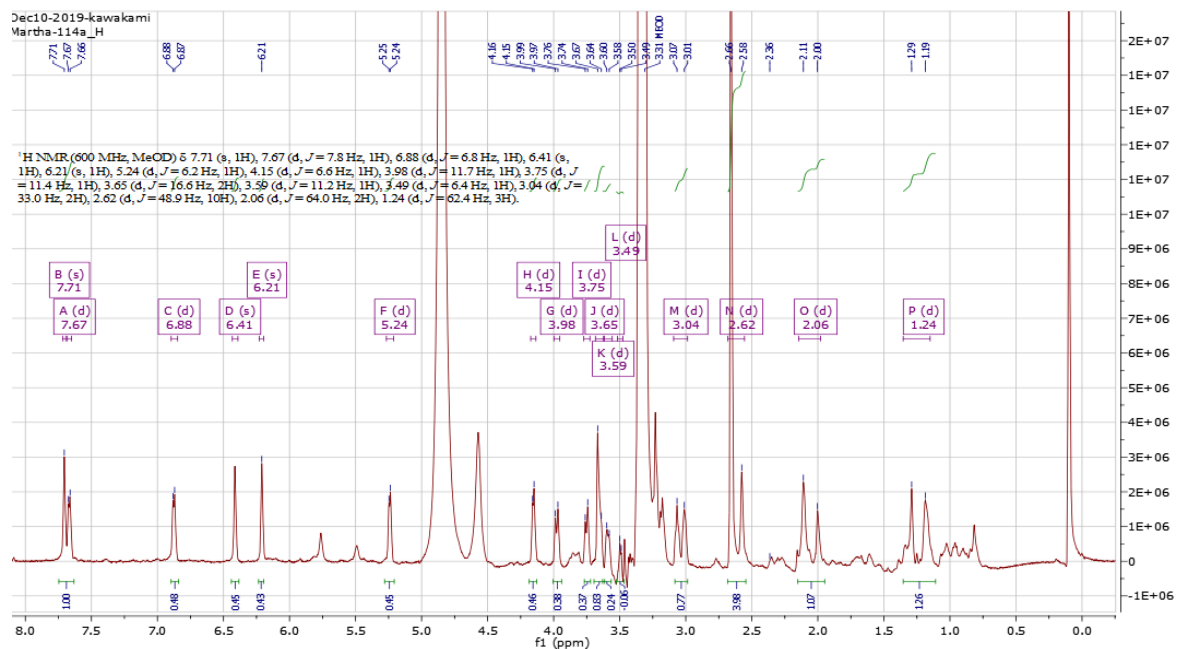
Dari analisis hasil spektra inframerah ME114A diketahui adanya gugus C=C, C=O dan C-H, -OH seperti ditampilkan pada tabel 5.11.



Gambar 5.8. spektra massa isolat ME114A

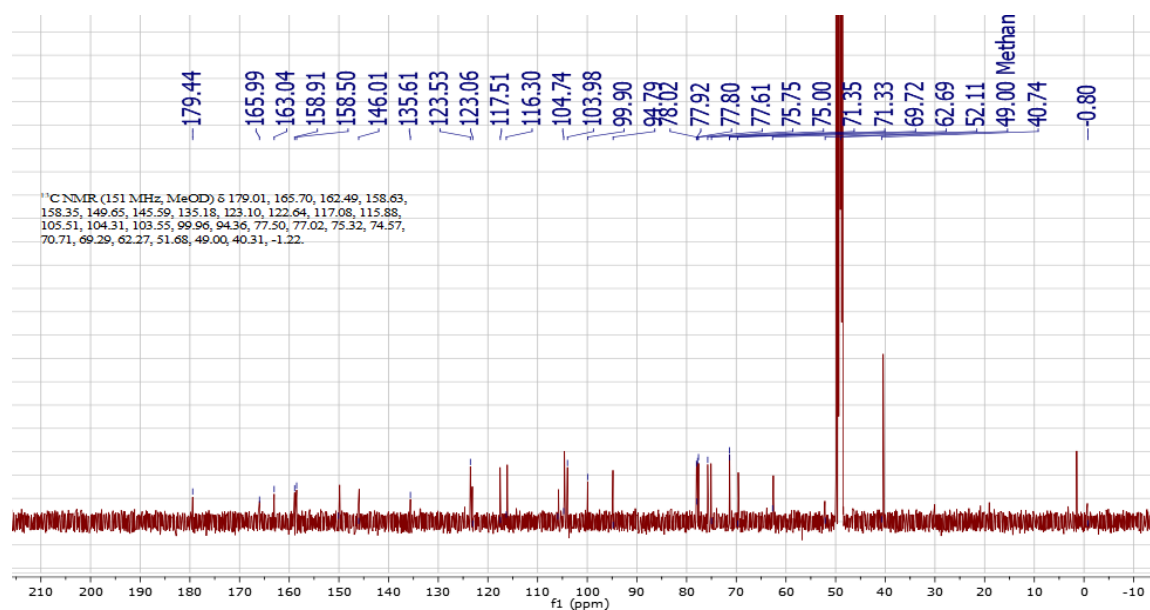
Dari fragmentasi spektra massa diketahui isolat 114A (6,4 g) memiliki berat molekul

649,1373 C₂₇H₃₀O₁₇Na (626,1373 C₂₇H₃₀O₁₇).



Gambar 5.9. spektra RMI ^1H ME114A dalam CD_3OD

Analisis RMI ^1H 114A terdapat sekitar empat belas macam signal ^1H dengan tipe singlet dan banyak doublet; serta pola bertumpuk pada δ 2-4 ppm. Teramati δ tinggi pada 4,823 setara dengan δ metanol-d4 yang diduga berasal dari eluen yang belum menguap.



Gambar 5.10. spektra RMI ^{13}C ME114A dalam CD_3OD

Analisis RMI ^{13}C dari ME114A menunjukkan terdapat dua puluh tujuh atom karbon dengan tipe ikatan C=O, C-OH, C=C, CH, dan CH₂ seperti ditunjukkan tabel 5.12. Karena keterbatasan bahan ME114A tidak dapat ditentukan RMI 2D – sehingga elusidasi dilakukan dengan membandingkan data pustaka (JEOL NMR database). Dari pustaka diduga ME114A adalah kuersetin seperti pernah dilaporkan Hirayama *et al.* (2013), namun dengan modifikasi pada glikonnya.

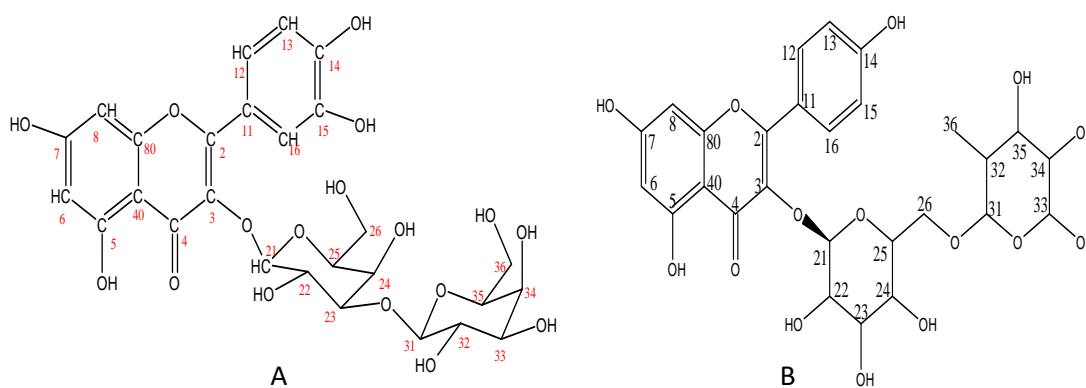
Tabel 5.12. Interpretasi signal RMI ME114A

114A		Pustaka (Hirayama <i>et al.</i> , 2013)				
^1H (δ)	^{13}C (δ)	C No	^{13}C (δ)	^1H (δ)		
5.24 (d, $J = 6,2$ Hz)	103,78	21	104,7	CH	5,30	d 7,9
	104,76	40	105,6	C		
4,15 (d, $J = 6,6$ Hz)	105,80	31	106,5	CH	4,54	d 7,6
6.88 (d, $J = 6.8$ Hz)	116,42	15	116,1	CH	6,86	d 8,5
7,76 (s)	117,55	12	117,7	CH	7,84	d 2,1
	123,13	11	122,9	C		
7.67 (d, $J = 7.8$ Hz)	123,73	16	122,9	CH	7,58	dd 8,5 2,1
	135,61	3	135,7	C		
	146,15	13	145,8	C		
	150,09	14	150,0	C		
	158,5	80	158,5	C		
	158,90	2	158,7	C		
	162,92	5	163,0	C		
	166,13	7	166,2	C		
	179,54,	4	179,4	C		
3,67 (d, $J = 11.4$ Hz)	51.68	26	62,0	CH ₂	3,67	dd 11,3 5,8
2.06 (d, $J = 64.0$ Hz) 1.24 (d, $J = 62.4$ Hz).	62,69	36	62,6	CH ₂	3,74	dd 11,4 7,1
4.15 (d, $J = 6.6$ Hz)	71,33	24	69,6	CH	4,16	brd 3,3
2.62 (d, $J = 48.9$ Hz)	71,35	34	70,2	CH	3,83	brd 3,3
3.98 (d, $J = 11.7$ Hz)	74,57	22	72,3	CH	3,98	dd 9,6 7,9
3.65 (d, $J = 16.6$ Hz)	75,75	32	73,0	CH	3,64	dd 9,7 7,6
3.04 (d, $J = 33.0$ Hz) 1.24 (d, $J = 62.4$ Hz).	77,61	33	74,6	CH	3,51	dd 9,7 3,3

3.59 (d, $J = 11.2$ Hz)	77,80	35	76,8	CH	3,55	brdd 7,1 5,0
3.49 (d, $J = 6.4$ Hz)	77,92	25	76,9	CH	3,53	brdd 6,2 5,8
3.75 (d, $J = 11.4$ Hz)	78,20	23	84,7	CH	3,71	dd 9,6 3,3
6.41 (s)	94,83	8	94,7	CH	6,40	d 2,0
6.21 (s)	99,86	6	99,9	CH	6.20	d 2,0
4.92 (s)	40.74					kontaminasi metanol

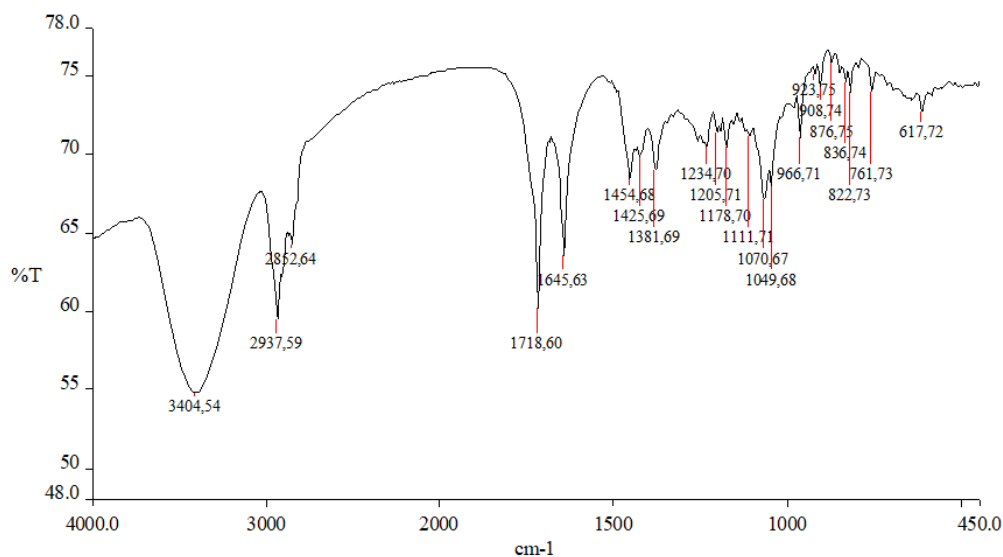
Dari interpretasi NMR diduga senyawa ME114A adalah golongan flavonoid glikosida yaitu kuersetin 3-*O*- β -*D*-galaktopiranosil-(1-6)- β -*D*-galaktopiranosida seperti Gambar 5.11.

Dugaan senyawa



Gambar 5.11. Dugaan struktur isolat (A) kuersetin 3-*O*- β -*D*-galaktopiranosil-(1-3)- β -*D*-galaktopiranosida (Hirayama *et al.*, 2013) dan ME114A (B) kuersetin 3-*O*- β -*D*-galaktopiranosil-(1-6)- β -*D*-galaktopiranosida

5.4.2. Elusidasi isolat ME127A

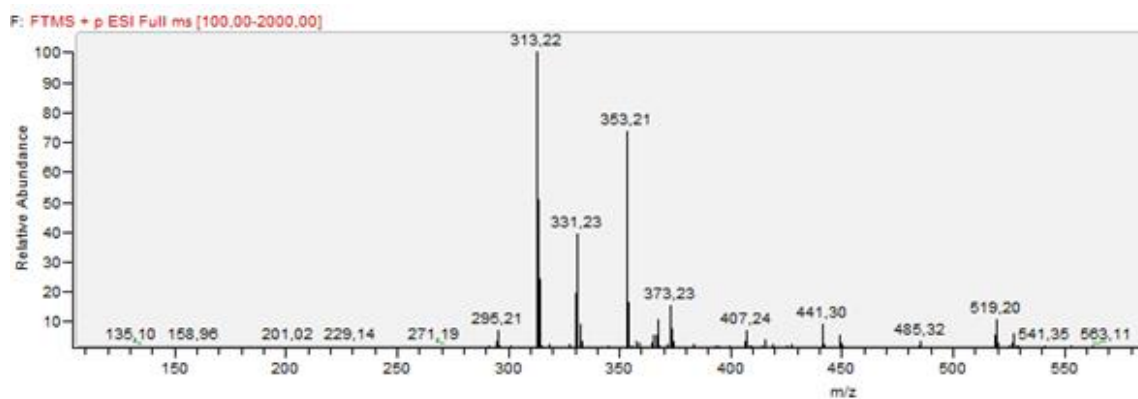


Gambar 5.12. Spektra inframerah isolat ME127A

Tabel 5.13. Hasil interpretasi spektra inframerah isolat ME127A

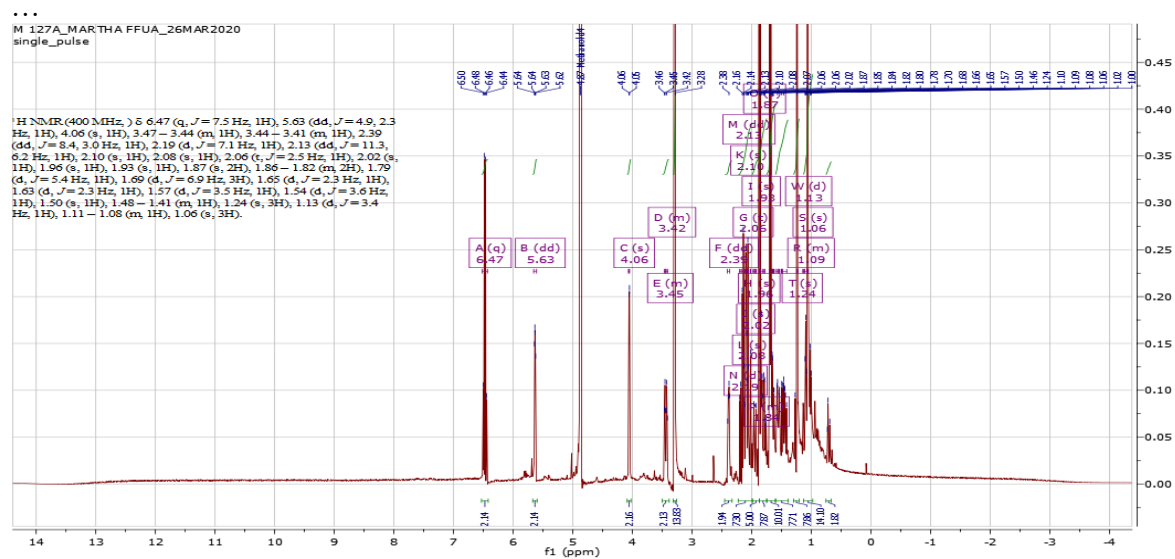
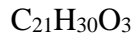
Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Sidik jari
3404,54	-OH	1454,68 1425,69 1381,69 1234,70 1205,71	
2937,59	C-H (sp ²)	1178,70 1111,71 1070,67 1049,68 966,71	
1718,60	C=C	923,75 908,74 876,75 836,74 822,73 761,73 617,72	
1645,60	C=O		

Senyawa ME127A mengandung gugus -OH, C-H, C=C dan C=O, seperti pada tabel 5.13.



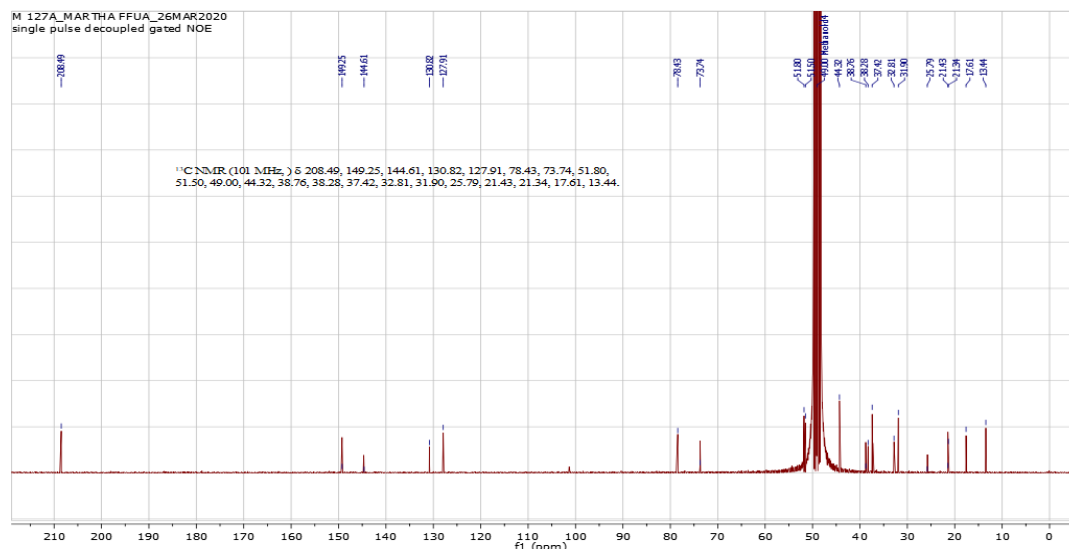
Gambar 5.13. Spektra massa isolat ME127A

Spektra massa 127A menunjukkan dugaan berat molekulnya 330,2087 dengan formula



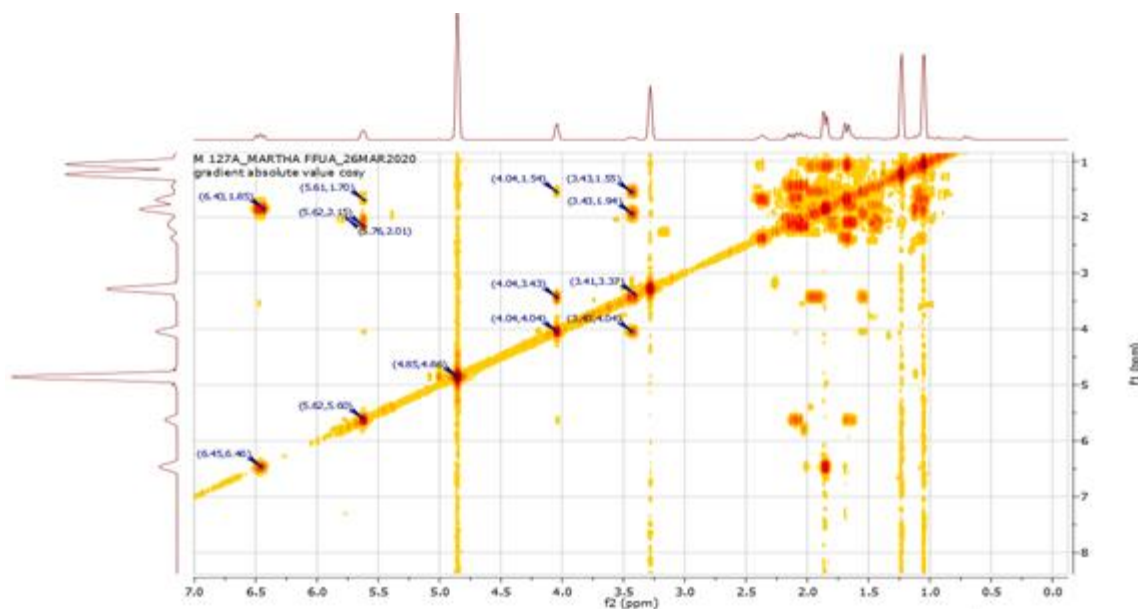
Gambar 5.14. Spektra RMI 1H isolat ME127A dalam CD_3OD

RMI 1H ME127A menunjukkan δ 6,47 -0,69 ppm dengan bertumpuk signal pada 1-2,5 ppm seperti terlampir pada tabel 5.14.



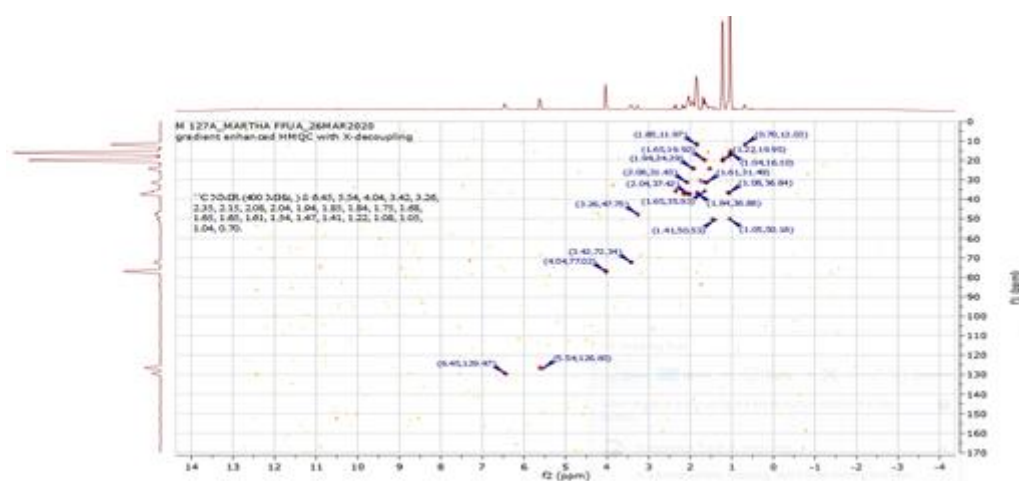
Gambar 5.15. Spektra RMI ^{13}C isolat ME127A dalam CD_3OD

RMI ^{13}C dari ME127A menunjukkan terdapat 21 atom karbon dengan tipe ikatan C=O, C-OH, C=C, CH_2 dan CH_3



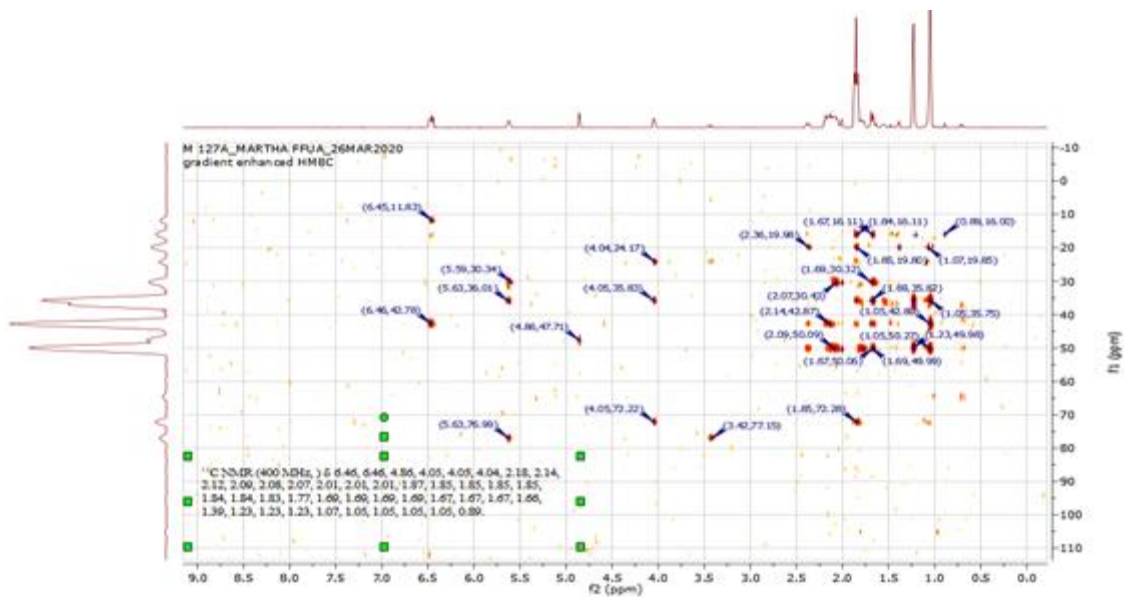
Gambar 5.16. Spektra RMI 2D *COSY* isolat ME127A dalam CD_3OD

Analisis spektra RMI *COSY* 127A menunjukkan terdapat hubungan antara H dengan H seperti ditunjukkan pada tabel 5.14. HA-HP, HB-HH, HQ, HC, HM-HS, HW-HD, HR-HW, HF, HS-HD.

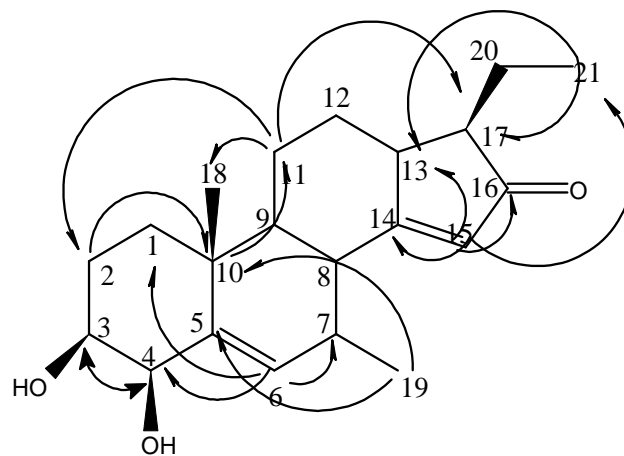


Gambar 5.17. Spektra RMI *HMQC* isolat ME127A dalam CD_3OD

Analisis spektra RMI *HMQC* 127A menunjukkan terdapat hubungan antara C6HA, C6HB, C4HC, C3HD, C17HT, C8HW, C13HE, C14HK, C1HVV, C12HP, C7HF, C2HS, C11HR, C20HM, C19HR, C18HW dan empat karbon tidak mengikat hidrogen C5, C10, C14, dan C16, seperti ditunjukkan pada tabel 5.14



Gambar 5.18. Spektra RMI *HMBC* isolat ME127A dalam CD₃OD



Gambar 5.19. analisis *HMBC* 127A

Analisis spektrum RMI *HMBC* ME127A menunjukkan terdapat hubungan antara karbon dengan proton berjarak 2-4 ikatan yaitu C16-HA,HJ,HG,HL, C2-HA, C3-HC, C4-HB, HR, C6-HE,HW, C17-HW,HR, C10-HH, C1-HJ,HG,HI,HL, C19-HT, C12-HA,HR,HW,HF, C11-HS,HR,HE,HW,HT, C19-HR,HT, C21-HS,HT,HK,HR seperti diilustrasikan pada gambar 5.19. dan tabel 5.14.

Dari data tersebut di atas, dilakukan elusidasi struktur M127C dengan cara sebagai berikut:

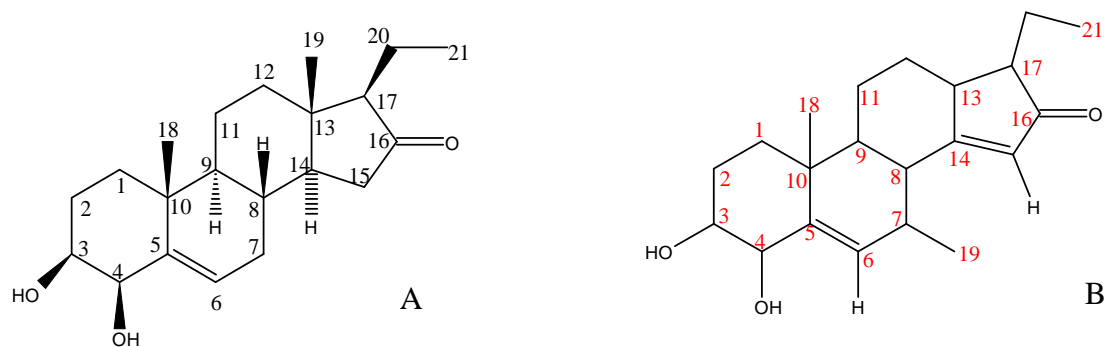
- Dengan H₂SO₄ berwarna ungu,
- rumus struktur C₂₁H₃₀O₃, dengan *molecular weight* 330.2087
- $DBE = ((2*21+2)-30)/2 = 7$ – rangka steroid sudah terdapat 4 DBE (*Double Bond Equivalen*) – jadi ada 3 tambahan ikatan rangkap
- Terdapat gugus -OH yang berdekatan, yang terikat pada C3 dan C4. Tiga tambahan ikatan rangkap dengan posisi C5-C6, C14-C15. Gugus C=O dekat dengan C14-C15. Terdapat empat atom C yang tidak berikatan dengan H (C5, C10, C14, C16), sehingga diduga substituen metil bukan terikat pada C13 tetapi pada C7.

Dari interpretasi NMR diduga senyawa ME127A adalah 17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]fenantren-16-on seperti pada Gambar 5.20.

Tabel 5.14. Hasil interpretasi spektra RMI isolat ME127A

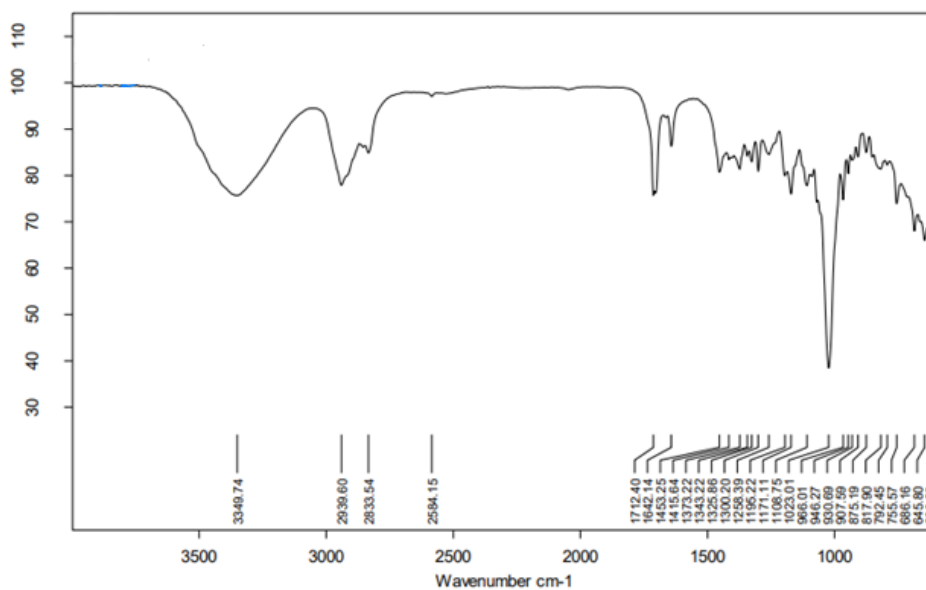
Isolat 127A						Pustaka (Wu <i>et al.</i> , 2009)		
No	¹ H	¹³ C	COSY	HMQC	HMBC	No	¹³ C	¹ H
		208.56		208,56	C=O	16	219,3	
		149.45		149,45	C=	14	50,6	1,45, 1H, dd, 13.1, 8.2
		144.78		144,78	C=	5	139,6	
A	6.47 (q, J = 7.5 Hz, 1H)	130.90	HA-HP	C15HA	CH	15	37,9	1,78, 1H, dd, 18.0, 13.1, 2.23, 1 H, dd,18.0, 8.2
			HB- HH, HB- HQ, HB- HC			6	121,8	5.41, 1H, brd, 5.0
B	5,63 (dd, 1H)	127.99		C6HB	CH			
			HC- HS, HC- HD	C4HC	OH	4	39,2	2,35, 2 H, m
C	4.06 (s, 1H)	78.52						
			HD- HS, HD- HM	C3HD	OH	3	76,2	3,34, 1H, ddd, 10.4, 9.0, 6.4
D	3,42 (m, 1H)	73.81		C17HT	CH	17	65,1	1,66, 1H, overlapped
		51.88						
		51.52	HJ-HR, HJ-HB,	C8HW	CH	8	30,4	1,67, 1H, m
E	3.29 (m, 1H),	44.41		C13HE	CH	13	41,8	
		38.87		C10		10	38,4	
		37.49	HP- HW	C1HV	CH	1	44,8	1,09; 1H, overlapped
F	2.39 (dd, J = 8.4, 3.0 Hz, 1H)	32.90	HF-HR	C7HF	CH ₂	7	31,8	1,66,1H, m; 2.00, 1H, m
G	2.19 (d, J = 7.1 Hz, 1H)							
H	2.13 (dd, J = 11.3, 6.2 Hz, 1H)							
I	2.10 (s, 1H)							
J	2.08 (s, 1H)							
K	2.06 (t, J = 2.5 Hz, 1H)			C9HK	CH	9	50	1,20, 1H, m

Dugaan senyawa



Gambar 5.20. A. Struktur steroid Wu *et al.* (2009), (B) dugaan struktur isolat ME127A (17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]fenantren-16-on)

5.4.3. Elusidasi isolat ME127C



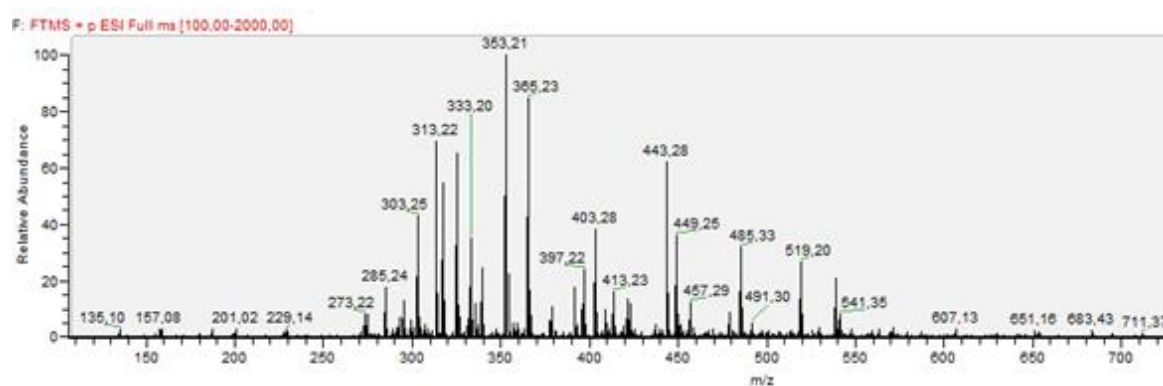
Gambar 5.21. Spektra inframerah isolat ME127C dalam CD₃OD

Tabel 5.15. Hasil interpretasi spektra inframerah isolat ME127C

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Sidik jari
3349,74	-OH	1453,25 1415,64	
		1373,22 1343,22 1325,88	
		1300,20 1258,39	

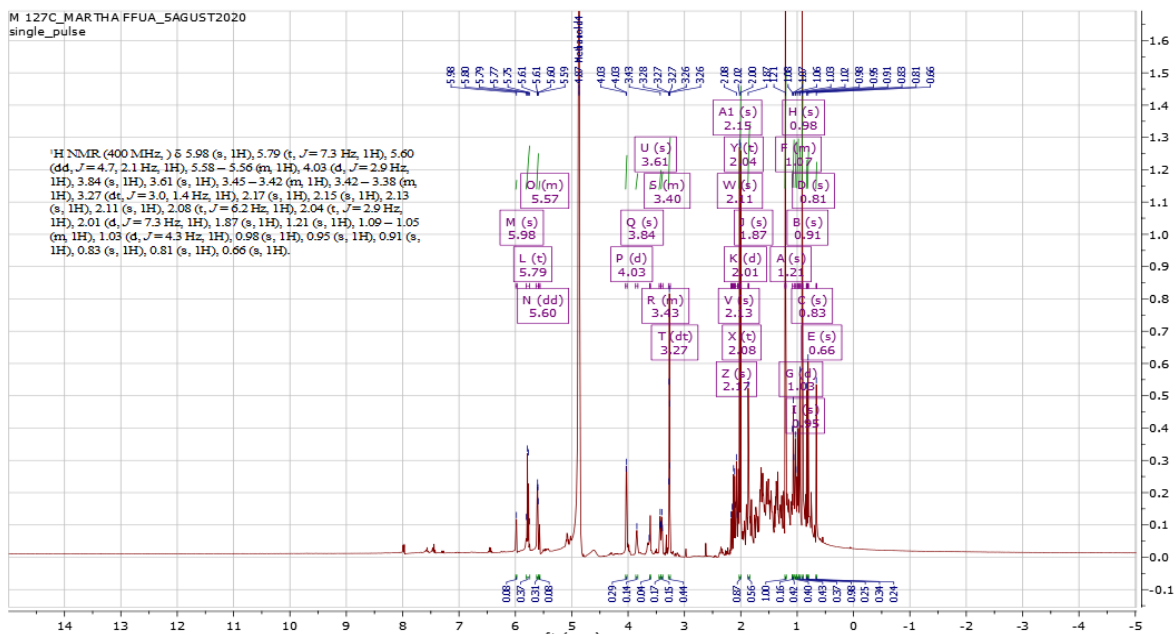
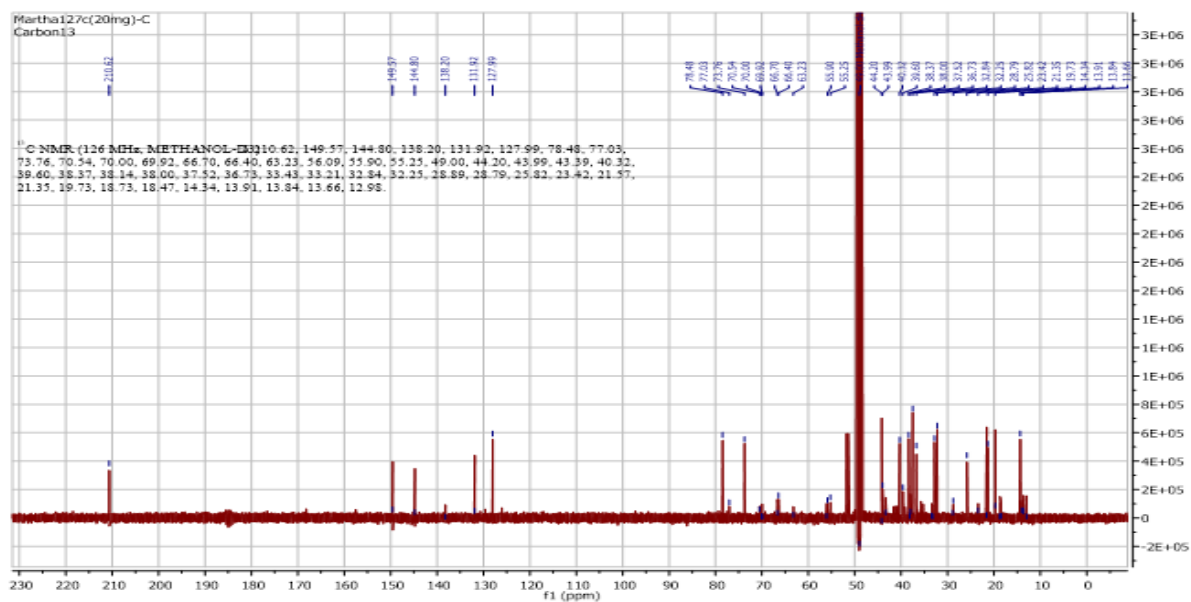
2939,60	C-H (sp ²)	1195,22	1171,11	1108,75
2833,54		1023,01	966,01	946,27
2584,15		930,69	907,59	
1712,40	C=C	875,19	817,90	792,45
		755,57	686,16	645,80
		608,20		
1642,14	C=O			

Isolat ME127C terdapat gugus -OH, C-H, C=C dan C=O, dan tampaknya ME127C isomer dengan ME127A

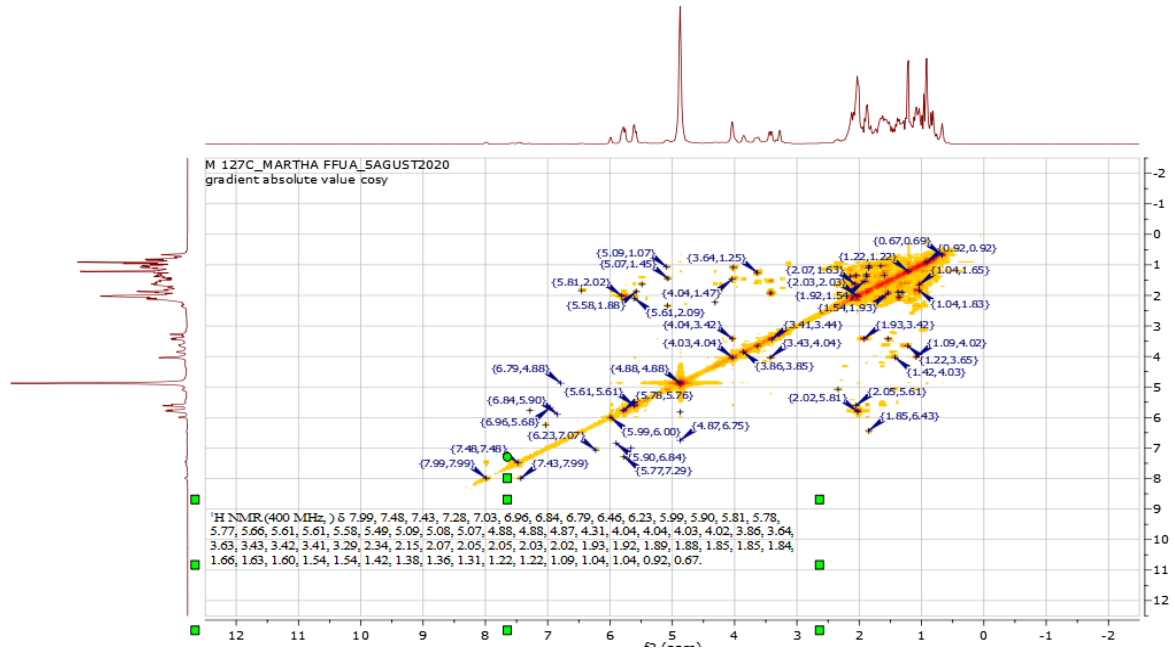


Gambar 5.22. Fragmentasi massa isolat ME127C

Fragmentasi massa ME127A dan ME127C sebagian besar memiliki pola yang mirip dengan kelimpahan yang berbeda. Pada ME127A kelimpahan fragmen terbesar pada m/z 353,21, sementara pada ME127C pada 313,22. Dipilih m/z 353,21 sebagai massa induk senyawa berkenaan dengan Δ geseran yang lebih kecil (± 5 ppm).

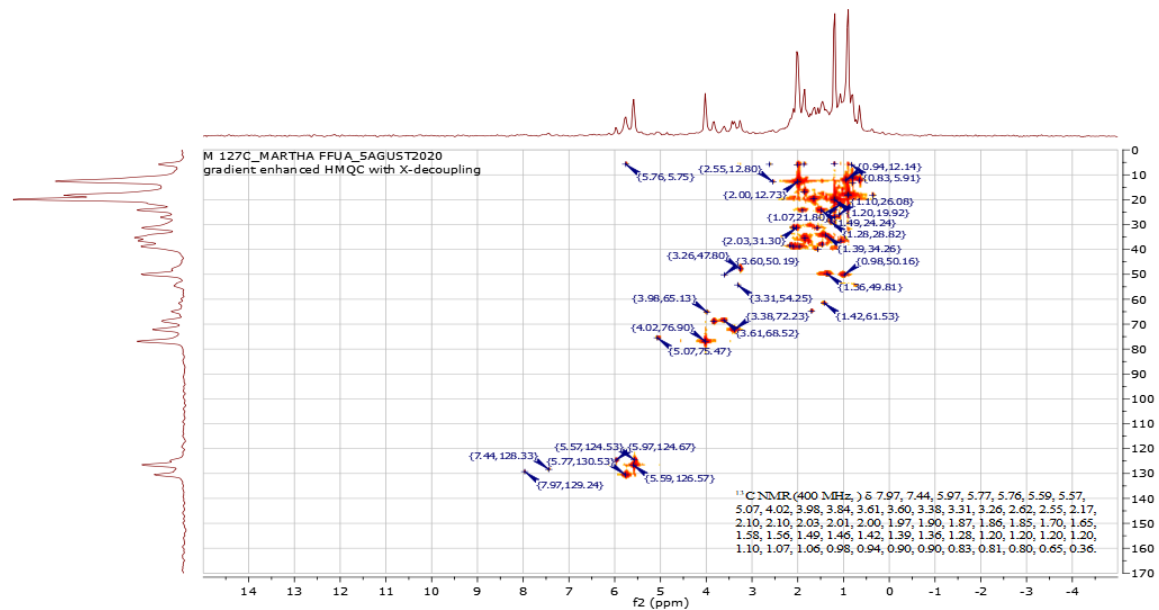
Gambar 5.23. Spektrum RMI 1H isolat ME127C dalam CD₃ODGambar 5.24. Spektra ¹³C isolat ME127C dalam CD₃OD

RMI ¹³C dari ME127C menunjukkan terdapat 21 atom karbon dengan tipe ikatan C=O, C-OH, C=C, CH₂ dan CH₃



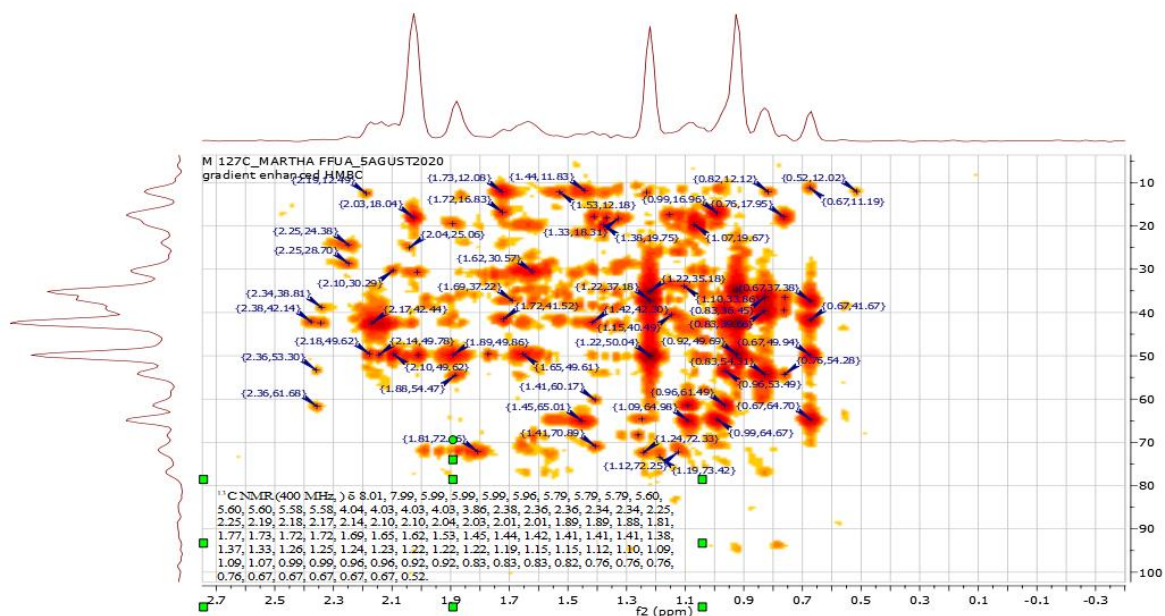
Gambar 5.25. Spektra 2D *COSY* isolat ME127C dalam CD₃OD

Analisis RMI *COSY* menunjukkan adanya hubungan antara proton-proton HA-HL, HB-HH, HC-HT, HW seperti pada tabel 5.16

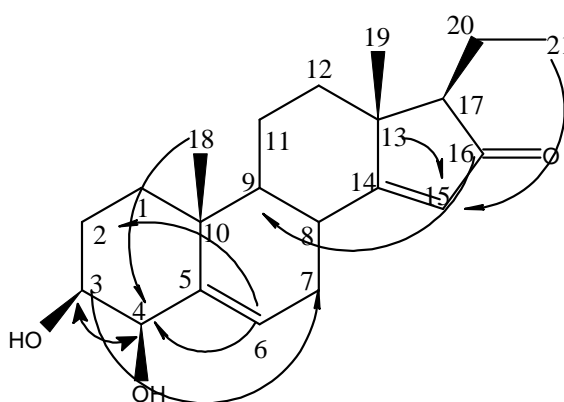


Gambar 5.26. Spektra *HMQC* isolat ME127C dalam CD₃OD

Analisis RMI *HMQC* menunjukkan adanya ikatan antara C15HA, C6HB, C4HC, C3HD, C17HF, C9HI, C8HL, C1HM, C12HO, C7HO, C2HI, C11HR, C20HS, C18HO, C19HV, C21HZ dan dua atom karbon yang tidak terikat dengan hidrogen yaitu C10 dan C13 seperti terlampir pada tabel 5.16.



Gambar 5.27. Spektra *HMBC* isolat ME127C dalam CD₃OD



Gambar 5.28. Analisis hasil RMI *HMBC* ME127C

Analisis RMI *HMBC* ME127C menunjukkan adanya hubungan antara C16-HA,HI, C14-HL,HW, C5-HR, HU, C15-HL,HQ, C6-HC, HA, C4-HB, C3-HC, HO, C17-HN, HX, C9-HT,HL,HR,HU,HX,HZ, C13-HA,HH,HX,HZ, C8-HU,HZ, C1-HB,HC,HU,HX, C2-HB,HR, C18-HC, C19-HL,HT seperti ditampilkan pada tabel 5.16 dan gambar 5.28. Beberapa signal bergeser dan bertumpuk yang menyulitkan interpretasi/ menentukan korelasinya terhadap atom lainnya.

Tabel 5.16. Hasil RMI dan analisis struktur isolat ME127C

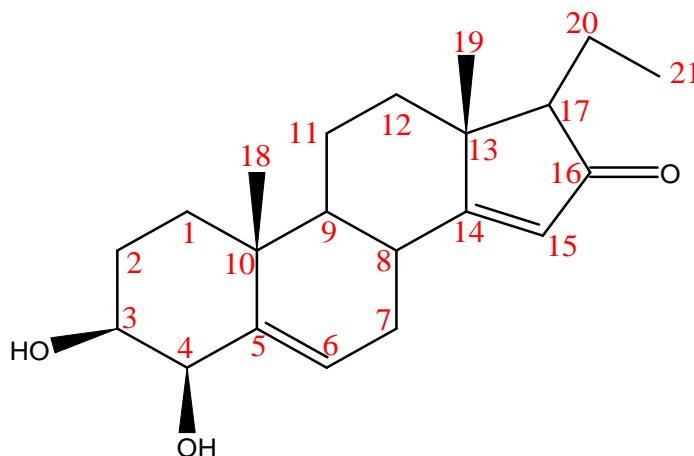
ME127C						Pustaka (Wu <i>et al.</i> , 2009)			
¹³ C δ	No	¹ H δ	COSY	HMQC	HMBC	No	¹³ C δ	¹ H δ	
210.94					209,26 5,79; 2,09	16	219,3		
149.77					147,99 2,03; 1,04	14	50,6	1,45, 1H, dd, 13.1, 8.2	
145.00					143,19 1,64; 1,22	5	139,6		
131.99	A	5.78 (q, <i>J</i> = 7.3 Hz 2H)	HA-HL	C15HA	CH 130,63 2,03; 1,76	15	37,9	1,78, 1H, dd, 18.0, 13.1, 2.23, 1 H, dd, 18.0, 8.2	
128.19	B	5.61 (dd, <i>J</i> = 4.8, 2.2 Hz, 2H)	HB-HH	C6HB	CH 126,43 4,05; 1,64	6	121,8	5.41, 1H, brd, 5.0	
78.64	C	4.04 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 2H)	HC-HT HC-HW	C4HC	COH 76,84 5.60	4	39,2	2,35, 2 H, m	
73.95	D	3.42 (dt, <i>J</i> = 11.9, 4.0 Hz, 2H)	HD-HT	C3HD	COH 72,03 4,03; 1.81	3	76,2	3,34, 1H, ddd, 10.4, 9.0, 6.4	
	D1	3,60 (m)							
	E	3,31 (s, 1H)							
51.92	F	3.28 (dt, <i>J</i> = 2.9, 1.5 Hz, 5H)		C17HF	CH 49,86 1,89; 0,92	17	65,1	1,66, 1 H, overlapped	
	H	2.13 (m, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H)							
51.55	I	2.10 (d, <i>J</i> = 5.1 Hz, 1H)		C9HI	CH 49,77 2,10; 2,01; 1,65; 1,22; 0,92; 0,67	9	50	1,20, 1H, m	
32.35				C2HI	CH ₂ 30,55 5,60; 1,62	2	72,5	3,68; 1H, ddd, 12,5	
44.39	J			C13	C 42,46 5,79; 2,14; 0,92; 0,67	13	41,8		
40.52	K			C10	C	10	38,4		

38.57	L	2.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 6H),	C8HL	CH	37,17	1,22; 0,67	8	30,4	1,67, 1H, m
37.68	M	1,97	C1HM	CH ₂	35,69	5,63; 4,05; 1,22; 0,92	1	44,8	1,09; overlapped
	N	1.88 (s, 2H)							
36.88	O	1,86	C12HO	CH ₂			12	38,5	1,40, 1H, m; 1.93, 1H, m
32.92	P		C7HO	CH ₂			7	31,8	1,66, 1H, m; 2.00, 1H, m
21.48	Q	1,76 (m)	C18HQ	CH ₃	23,95	4,05;	18	13,4	0,72, 3H, s
26.00	R	1,64 (m)	C11Hr	CH ₂			11	20,6	1,54, 1H, m; 1.66, 1H, m overlapped
21.68	S	1,57, 1.22 (s, H),	C20HS	CH ₂	18,03	2,03; 1,41;	20	17,6	1,27, 1, m; 1.66, 1H, overlapped
	T	1.48 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H),							
20.01	V	1.14 (s, 1H),	C19HV	CH ₃	16,67	5,99; 5,58; 2,03;	19	20,5	1,08, 3H, s
	X	0.92 (s, 5H),							
14.33	Z W	0.67 (s, 1H), 1.09 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H),	C21-HZ	CH ₃	12,62	5,79; 1,71; 1,44	21	13,3	1,03, 3H, t, 6.8

Dari data tersebut di atas, dilakukan elusidasi struktur M127C dengan cara sebagai berikut:

- rumus struktur C₂₁H₃₀O₃, dengan *molecular weight* 330.2087
- Dengan H₂SO₄ berwarna ungu,
- $DBE = ((2 \cdot 21 + 2) - 30) / 2 = 7$ – rangka steroid sudah terdapat 4 DBE (*Double Bond Equivalen*) – jadi ada 3 tambahan ikatan rangkap
- Terdapat gugus -OH yang berdekatan, terikat pada C3 dan C4, tiga tambahan ikatan rangkap dengan posisi C5 berdekatan dengan C6, C14 berdekatan dengan C15, C=O dekat dengan C14 dan C15, dan terdapat lima atom C yang tidak berikatan dengan H (C5, C10, C13, C14, C16)

Sehingga diduga struktur ME127C seperti terlampir pada gambar 5.29. sebagai 17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on.



Gambar 5.29. Dugaan struktur isolat ME127C (17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on)

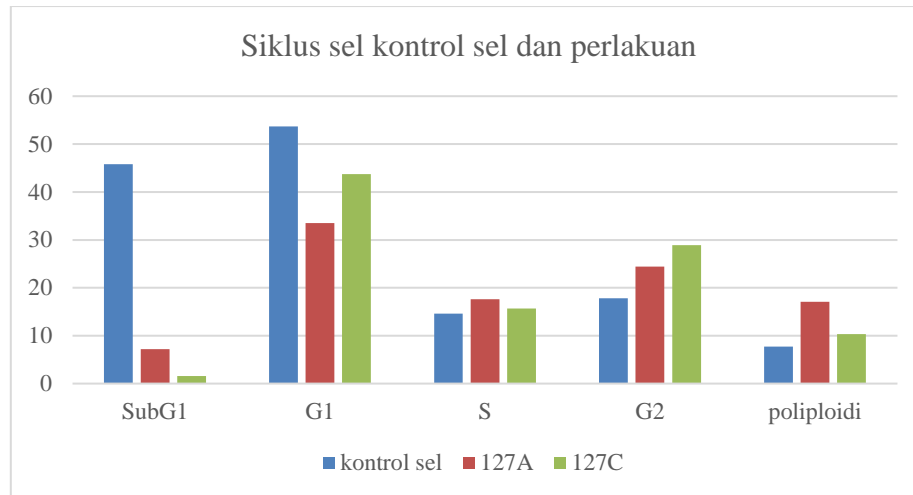
5.5. Uji mekanisme penghambatan siklus sel dan apoptosis dari isolat

5.5.1. Uji penghambatan siklus sel

Tabel 5.17. Hasil penghitungan jumlah sel perlakuan dengan isolat dengan *flowcytometer*

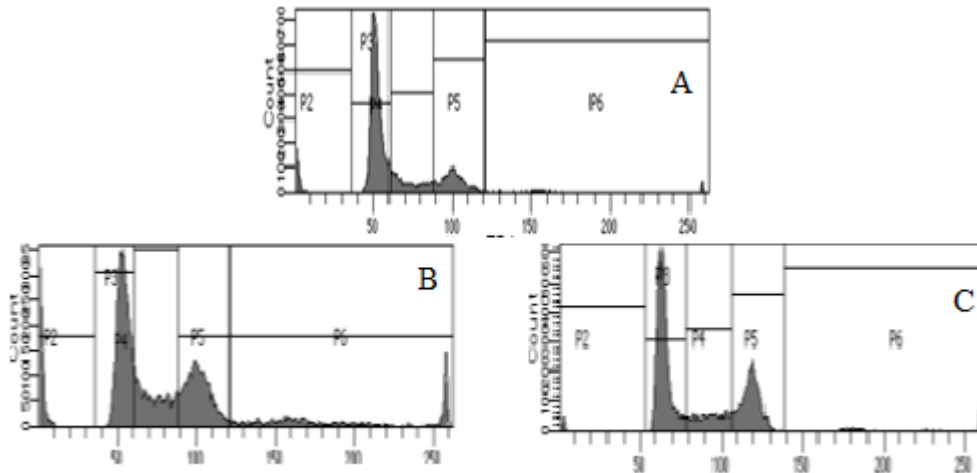
Fase dalam siklus sel	% jumlah sel		
	Kontrol sel	127A	127C
Sub Gap 1	45,8	7,2	1,6
Gap1	53,7	33,5	43,7
Sintesis	14,6	17,6	15,7
Gap2	17,8	24,4	28,9
poliploidi	7,7	17,1	10,3

Keterangan: G1 = persiapan sel masuk ke fase sintesis, Gap 2 = fase sel persiapan masuk ke mitosis



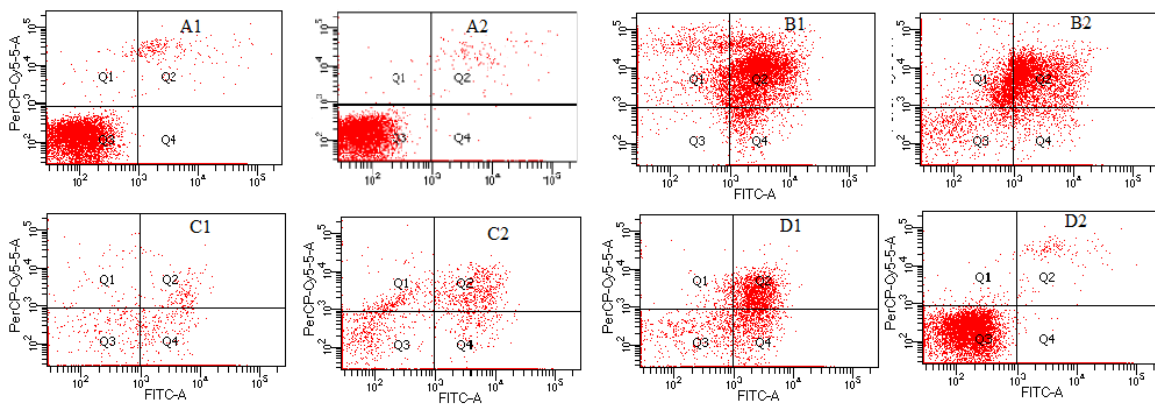
Gambar 5.30. Grafik hambatan siklus sel dari kontrol sel dan isolat

Hasil uji isolat ME127A dan ME127C terhadap siklus sel T47D dapat diamati pada tabel 5.17 dan gambar 5.30. Dapat diamati pada kontrol sel paling banyak berada dalam fase subG1 dan G1 masing-masing sebesar 45,8 dan 53,7%, sementara terjadi penurunan signifikan jumlah sel perlakuan pada fase subG1 dari 45,8% menjadi 7,2% dan 1,6%. Fase subG1 banyak diasosiasikan dengan terjadinya apoptosis pada sel uji. Hasil ini menunjukkan potensi isolat sebagai apoptosis. Penurunan jumlah sel perlakuan juga teramati pada fase G1 dengan penurunan sebesar 20,2% dan 10%. Pada fase G1 terjadi pertumbuhan komponen sel, sel menyiapkan semua yang diperlukan untuk replikasi DNA dan sel menyiapkan lingkungan yang optimum untuk masuk fase sintesis. Tidak ada hambatan pertumbuhan pada fase sintesis ditunjukkan dengan sedikit pertambahan jumlah sel yang ada pada fase ini, sementara terjadi akumulasi persen jumlah sel pada Gap 2 teramati pada kedua isolat, yang menunjukkan adanya *arrest* pada fase ini. Jumlah sel pada fase poliploidi dari kedua isolat menunjukkan jumlah yang lebih besar dari kontrol sel.



Gambar 5.31. Siklus (A) sel kontrol, isolat (B) ME127A dan (C) ME127C

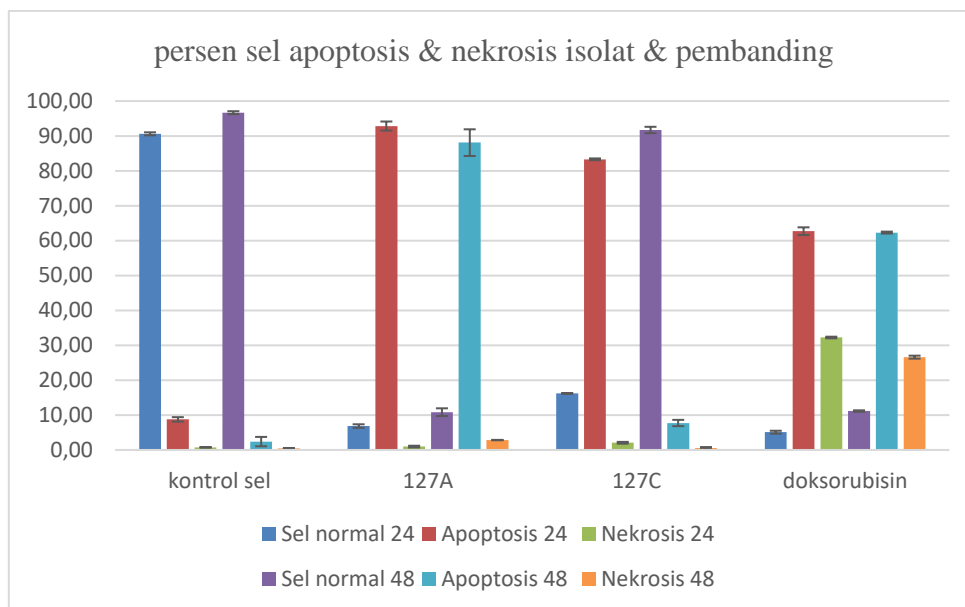
5.5.2. Uji mekanisme apoptosis dan nekrosis



Gambar 5.32. Hasil flowcytometer mekanisme apoptosis/ nekrosis (A) kontrol sel, (B) Doksorubisin, (C) ME127A, (D), ME127C, (1) 24 dan (2) 48 jam, Q3(normal sel), Q2 dan Q4 (apoptosis), Q1 (nekrosis).

Tabel 5.18. Hasil perhitungan jumlah sel mekanisme apoptosis/ nekrosis

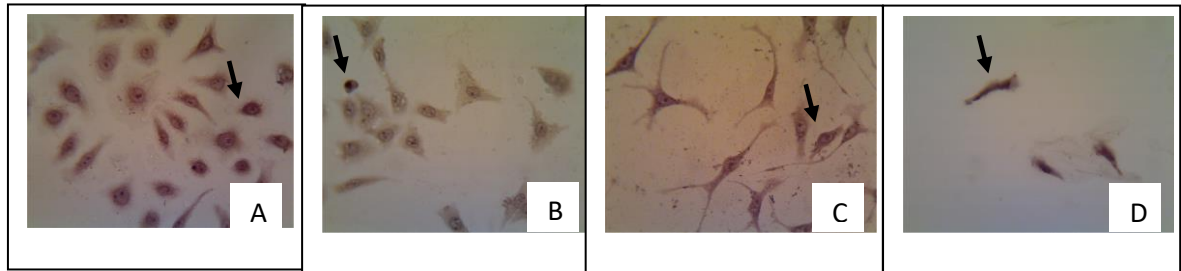
Perlakuan	% jumlah sel					
	24 jam			48 jam		
	Sel normal	Apoptosis	Nekrosis	Sel normal	Apoptosis	Nekrosis
kontrol sel	90,60±0,44	8,77±0,51	0,75±0,07	96,67±0,42	2,40±1,35	0,43±0,12
127A	6,85±0,64	92,83±1,30	0,97±0,25	10,83±1,11	88,08±3,82	2,83±0,06
127C	16,20±2,97	83,30±3,70	2,07±0,25	91,70±0,92	7,73±0,90	0,53±0,31
doksorubisin	5,10±3,39	62,70±3,54	32,23±0,23	11,15±0,21	62,30±0,28	26,60±0,42



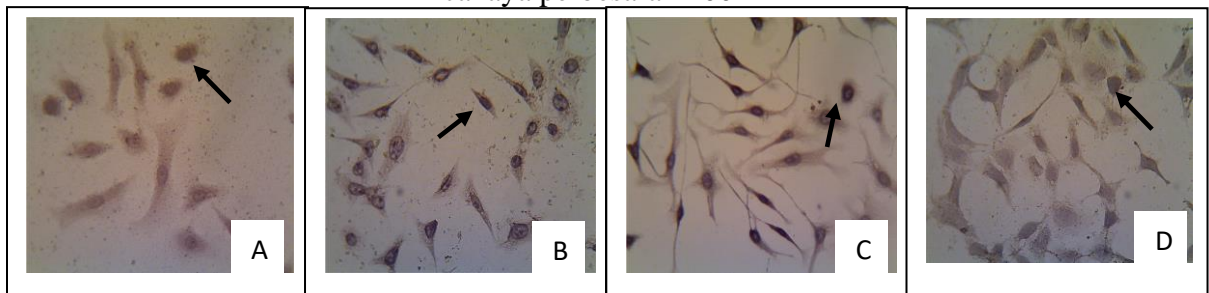
Gambar 5.33. persentase apoptosis dan nekrosis isolat

Hasil uji mekanisme apoptosis isolat dan pembanding seperti terlampir pada tabel 5.18. Apoptosis diamati pada konsentrasi IC_{50} nya 24 dan 48 jam. Sel kontrol T47D teramati persentase sel terbanyak pada sel normal 90,60% dan 96,67%; dan sedikit sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Pada sel perlakuan teramati isolat ME127A dan ME127C menunjukkan apoptosis yang bermakna dibandingkan kontrol sel, meskipun keduanya memiliki karakteristik yang berbeda. Pada 127A persen sel yang apoptosis lebih banyak dibanding ME127C pada 24 jam, sementara pada ME127C jumlah sel nekrosis lebih banyak. Pada 48 jam kedua sel normal perlakuan meningkat, bahkan mendekati persen sel kontrol, menurunnya persen jumlah sel apoptosis dan nekrosis pada ME127C, namun meningkat jumlah sel nekrosis pada ME127A. Pada pembanding doksorubisin jumlah sel apoptosis dan nekrosis hampir serupa baik pada 24 maupun 48 jam. Jumlah sel apoptosis perlakuan isolat ME127A dan ME127C lebih banyak dan jumlah sel yang nekrosis lebih sedikit dibandingkan dengan doksorubisin pada 24 jam.

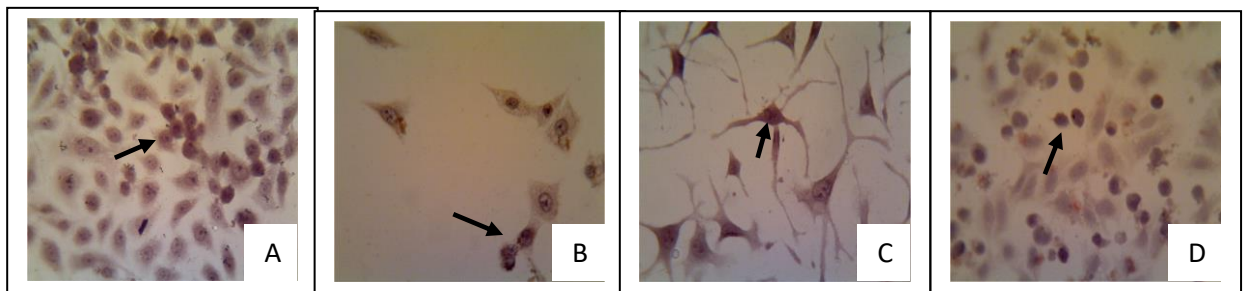
5.5.3. Uji imunositokimia p53, bax, bcl-2



Gambar 5.34. hasil uji imunositokimia p53 (A) kontrol sel, isolat (B) ME127A, (C) ME127C, (D) Doksorubisin, → sel yang mengekspresi p53; diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x



Gambar 5.35. hasil uji imunositokimia bax (A) kontrol sel, isolat (B) ME127A, (C) ME127C, (D) Doksorubisin, → sel yang mengekspresi Bax; diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x



Gambar 5.36. hasil uji imunositokimia Bcl-2 (A) kontrol sel, isolat (B) ME127A, (C) ME127C, → sel yang mengekspresi Bcl-2; diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x

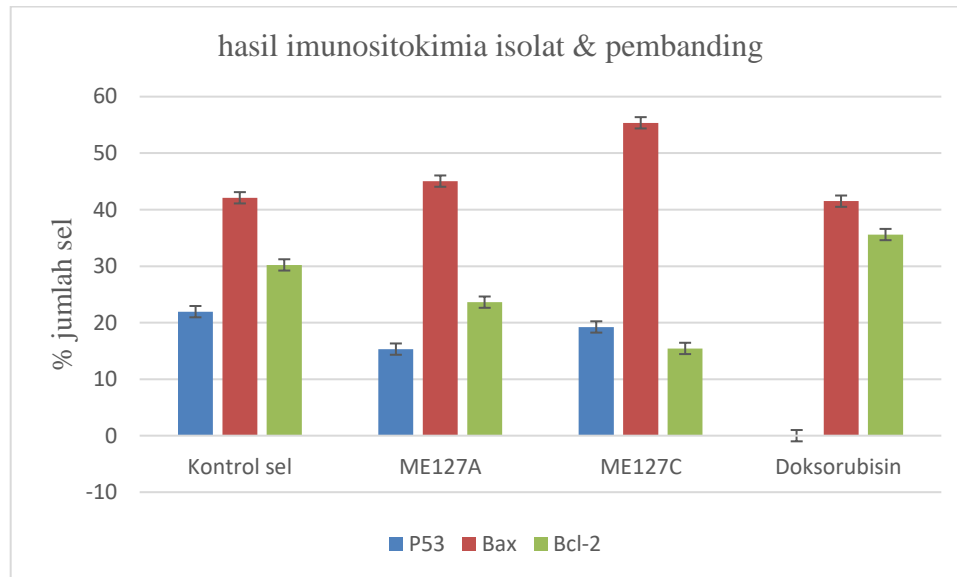
Tabel 5.19. Hasil pengujian imunositokimia isolat terhadap T47D

Jenis pengujian	Jumlah sel (%)			
	Kontrol sel	ME127A	ME127C	Doksorubisin
P53	21,95±0,25	15,32±0,45	19,24±1,06	-
Bax	42,1±4,10	45,05±4,17	55,37±2,97	41,5±2,12
Bcl-2	30,22±0,22	23,63±1,94	15,44±0,06	35,595±0,43
Pengamatan kualitatif:				
- Jumlah sel per lapangan pandang	+++	+	+	± Memanjang Tidak terlihat
- Bentuk sel inti	membulat terlihat, > 1	memanjang terlihat, > 1	memanjang terlihat, > 1	Mengecil menjauh
- sitoplasma	jelas	mengecil	mengecil	
- Jarak antar sel	rapat dan homogen	menjauh	menjauh	

Keterangan: +++ - = kualitatif pertumbuhan banyak sampai tidak ada pertumbuhan

Dari uji imunositokimia p53, Bax dan Bcl-2 perlakuan dapat diamati terjadi perubahan morfologi sel seperti pada gambar 5.34-5.36 dan tabel 5.19. Sel T47D merupakan sel yang mengalami mutasi pada residu 194 dalam p53 yang menyebabkan berkurang sampai hilangnya kemampuan dalam regulasi siklus sel. Dari pengamatan kualitatif teramati perubahan morfologi sel membulat, menjauh sampai sel menjadi hancur, dibandingkan kontrol sel dan doksorubisin seperti terlampir pada tabel 5.19. Dapat diamati juga terjadi peningkatan jumlah ekspresi bax dan penurunan bcl-2 dari perlakuan. Grafik 5.37 menggambarkan perbandingan kuantitatif hasil perhitungan sel diantara kontrol sel, perlakuan dan pembanding untuk mengamati perlakuan terhadap ekspresi p53, bax dan bcl-2. % sel yang mengekspresi p53 teramati menurun pada perlakuan dibandingkan terhadap kontrol dan tidak dapat diamati pada pembanding. P53 pada ME127C teramati lebih tinggi dibandingkan pada ME127A. Pada ekspresi bax ME127C menunjukkan jumlah paling tinggi diantara semua sampel uji. Kedua perlakuan menunjukkan %jumlah sel yang mengekspresikan bax lebih tinggi daripada kontrol sel dan pembanding. Sementara terhadap

ekspresi bcl-2 dihasilkan % jumlah perlakuan yang mengekspresikan bcl-2 lebih kecil dibandingkan kontrol sel dan pembanding. Sehingga hasil keduanya akan meningkatkan rasio bax/bcl-2.



Gambar 5.37. Grafik hasil uji imunositokimia isolat dan pembanding terhadap sel T47D

BAB 6

PEMBAHASAN

Melia azedarach (Mindi) (familia Meliaceae) tersebar secara luas hampir di sepertiga bagian dunia, meskipun tidak semua memanfaatkannya (Gambar 6.1). Tanaman ini telah dimanfaatkan secara tradisional untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan baik secara lokal maupun sistemik di beberapa negara (Sultana *et al.*, 2014; Sharma & Paul, 2013). Namun demikian penggunaannya sebagai tanaman penghijauan dan kayunya untuk bangunan lebih dikenal dari penggunaannya sebagai obat tradisional di Indonesia. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa golongan steroid dari daun Mindi dengan metode penunjuk uji sitotoksik terhadap sel T67D dan menguji mekanisme apoptosis dari isolatnya. Sel T47D berasal dari sel kanker payudara manusia, tipe luminal A yang peka terhadap progesterone dengan adanya estrogen berbeda dari MCF-7 (Holliday & Speirs, 2011, Yu *et al.*, 2011; Ervina *et al.*, 2020).



Gambar 6.1. peta distribusi dan pemanfaatan *M. azedarach* (Plant ID: NPO18932),
■ daerah penyebaran, ■ penyebaran dan pemanfaatannya untuk kesehatan
(<http://bidd.group/CMAUP/plant.php?plant=NPO18932>)

Penyiapan bahan meliputi penyiapan bahan tanaman dan penyiapan isolat melalui proses pemisahan dan isolasi. Penyiapan bahan termasuk didalamnya standarisasi tanaman. Hasil pemeriksaan makroskopis daun Mindi dapat diamati pada tabel 5.1. Sharma & Paul (2013) mendeskripsikan tinjauan botani dan fitokimia *M. azedarach* secara umum, sedangkan pada penelitian ini menggunakan daunnya. Diamati daunnya memiliki ukuran yang lebih besar yang mungkin disebabkan pengaruh lingkungan hidupnya. Mindi yang digunakan bukan merupakan tanaman budidaya, mengingat masih belum dimanfaatkan secara luas. Di Indonesia Mindi pada umumnya digunakan sebagai tanaman peneduh/ diambil kayunya saja. Secara botani juga Mindi sedikit sulit dibedakan dari *Azadirachta indica* (Nimba), sesama famili Meliaceae. Beberapa jurnal menyampaikan perbedaan karakteristik daunnya yang berbeda ukuran, warna, bentuk dan filotaksisnya. Daun Mindi lebih kecil, membulat dan melebar ujungnya, lebih pucat warnanya dan berujung *inipinnate* (Gambar 1A). Lingkungan banyak mempengaruhi makromorfologinya (Sharma & Paul, 2013; Mabberley, 1984). Pengamatan mikroskopis daun Mindi seperti ditampilkan pada Gambar 1B. Pengamatan ini tidak berbeda bermakna dari ciri *A. indica*, kecuali trikoma multiselulernya. El Hawary *et al.* (2013) menggunakan analisis sidik jari DNA untuk membedakan Mindi dari Nimba. Dengan analisis ini dapat ditentukan koefisien kesamaan sampai ke tingkat polimorfismenya. Parameter spesifik dan non spesifik simplisia Mindi dapat dilihat pada tabel 5.1. Parameter bahan organik terekstraksi air dapat dibandingkan dengan bahan yang larut dalam etanol. Beberapa penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara ekstraksi dengan etanol dan air (Ahmad *et al.*, 2012; Nahak & Sahu, 2010). Penggunaan ekstraksi perkolasi dengan etanol lebih menguntungkan dibandingkan dengan air. Ekstrak etanol lebih mudah diuapkan, sehingga menghasilkan ekstrak kental bebas etanol yang lebih stabil dan mudah untuk

diproses lebih lanjut. Hasil penetapan parameter non spesifik dapat melengkapi hasil penelitian dari Sharma & Paul (2013) untuk batangnya.

Skrining fitokimia daun Mindi mengandung tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, glikosida, dan steroid. Hasil ini sedikit berbeda dari hasil sebelumnya yaitu adanya antraknon yang mungkin disebabkan faktor eksternal juga (Ahmad *et al.*, 2012; Suresh *et al.* 2008; Fitriyani *et al.*, 2016). Fraksinasi membagi senyawa kelutannya seperti terlihat pada tabel 5.4. Fraksi MH mengandung steroid dan alkaloid, ME mengandung flavonoid, steroid dan alkaloid, sementara MW mengandung tannin, flavonoid, saponin dan glikosida.

Ekstraksi dengan perkolasi pada suhu ruangan dengan etanol 95% bertujuan untuk mendapatkan kandungan senyawanya. Persen ekstraksi ditampilkan pada Tabel 5.5. Hasil menunjukkan persen ekstrak dalam rentang $30,1 \pm 0,42\%$; sementara fraksi ME $8,38 \pm 0,55\%$, MH $27,30 \pm 1,03\%$ dan $64,71 \pm 2,54\%$ untuk MW. Hasil ini berbeda dari Ahmad *et al.*, (2012) yang menghasilkan 11,07%, dan Carpinella *et al.* (1999) yang menghasilkan 34,77% dari ekstrak buahnya. Sementara Irshan *et al.* (2017) menemukan $26,96 \pm 0,12\%$ dari cara maserasi daunnya. Hasil dari perkolasi lebih tinggi, berkenaan dengan ekstraksi berkelanjutan dengan volume solven bisa sampai 5x bahannya. Persen ME kecil kemungkinan karena lebih sedikit senyawa semi polar yang terekstrak dalam etil asetat. Organoleptis M kental, sementara fraksinya bervariasi dari berminyak (MH), kering (ME) dan kental (MW). Perbedaan ini mungkin disebabkan karakteristik senyawa dan kandungan air pada fraksi tersebut. Pemisahan dilakukan melalui tahapan fraksinasi yang bertujuan mendapatkan senyawa bioaktif yang murni

Kromatogram ekstrak berbeda dari fraksinya (Ervina *et al.*, 2020). Ekstrak memiliki puncak lebih banyak dibanding fraksinya. Penggunaan fraksinasi dengan pelarut yang berbeda polaritasnya membagi senyawa sesuai dengan kelutannya. Senyawa non-polar dan lipid

terekstraksi dalam n-heksana sebelum fraksinasi dengan etil asetat. Hasil *LC-MS* ekstrak menunjukkan 23 puncak dengan persentase luas area 0,37% sampai 14,26% (Tabel 5.6.). Spektra fragmentasi massa menunjukkan pola steroid; limonoid dan fenolik. Terdapat 3 puncak dengan *m/z* 557 pada *Rt* 9,21 menit (2,08%), 11,74 menit (14,26%) dan 12,28 menit (7,54%). Puncak-puncak ini memiliki fragmen ion 667 dan 681. Dari pola fragmentasinya diduga senyawa turunan meliatoksin (Cornelio *et al.*, 2017). Meliarachin teramati pada menit 14,80, Azedarachin pada 15,34 menit, Salannin (*Rt* 16,62 menit), Neoazedarachin (*Rt* 17,85 menit) (Zhou *et al.*, 1998), 1-*o*-asetiltrikhilin (*Rt* 18,15 menit) dan derivatnya dengan kuantitas yang kecil (Takeya *et al.*, 1996), termasuk derivat nimbolin (*Rt* 7,96, 12,63 dan 19,15 menit) (Zhou *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2005). Spektra sterol teramati pada *Rt* 10,57, 10,98 dan 14,13 menit. Toosendanin (Ong & Ong, 2007) dan toosendanin sterol dengan *m/z* of 277 ($M^+-C_3H_7O$) $18-CH_3^+$ dengan rantai sampingnya, yang khas pada pemecahan 16-ketosteroids (Inada *et al.*, 1998).

Fragmen senyawa flavonoid teramati pada *Rt* 4,8, 5,12 dan 14,81 menit pada *m/z* 303 dan 627 (diduga sebagai kuersetin-3-*O*-rutinosida), 287 dan 611 (kaempferol-3-*O*-soforosida) dan *m/z* 507,34 sebagai rutin (kuersetin glikosida). Fragmen fenolik lainnya teramati pada *Rt* 6,00 dan 7,99 menit, yang diperkirakan sebagai kaempferol dan hesperetin diglukosida. M'rabeta *et al.* (2017) mengusulkan penggunaan beberapa senyawa fenolik sebagai biomarker untuk daun Mindi. Hasil *LCMS* ekstrak daun Mindi menunjukkan dugaan senyawa lebih spesifik dibandingkan metode skrining konvensional.

Etanol lebih efektif untuk mengekstraksi daun Mindi dibandingkan air atau petroleum eter juga ditunjukkan oleh Ahmad *et al.*, (2012) dan Nahak & Sahu (2010). Etanol lebih disukai dibanding metanol ditinjau dari keamanannya (Saleem *et al.*, 2000; Siddhuraju & Becker, 2003). Pada penelitian Ervina *et al.* (2020) yang menentukan aktivitas antioksidan, total fenol, kadar

sterol ekivalen dan sitotoksik menunjukkan adanya kaitan gugus hidroksil terhadap aktivitas antioksidannya. Dari penelitian ini juga dapat diamati korelasi positif antara daya antioksidan terhadap sitotoksik, yang mungkin mengindikasikan peran fenolik sebagai sitotoksik. Korelasi positif antara daya antioksidan dan sitotoksik juga dihasilkan dari penelitian Eddebagh *et al.* (2016) pada sel MDA-MB-231 dan HT-29.

Aktivitas sitotoksik pada ME (fraksi etil asetat) lebih tinggi dibandingkan fraksi lainnya. Hasil ini dapat digunakan sebagai penunjuk isolasi senyawa aktif dari ME. Fraksi etil asetat potensial menghasilkan senyawa sitotoksik juga ditunjukkan oleh Wu *et al.* (2009), yang mengisolasi 6 steroid sitotoksik dari ekstrak etanol daun *M azedarach* terhadap galur sel kanker A549, H460, U251; sementara Ntalii *et al* (2010) dan Takeya *et al.* (1996) menemukan triterpen tirukallan dari fraksi diklorometan dan trikhilin dari kloroform ekstrak metanol buah dan akar batang *M azedarach*. Hal ini menunjukkan perlunya pemurnian dan isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat daun *M azedarach*.

Subfraksinasi dilakukan dengan isolasi bertingkat menggunakan beberapa sistem fase diam dan gradien fase gerak. Sistem yang digunakan meliputi Diaion dan silika gel dengan kloroform dan metanol; dan ODS dengan metanol-air dan aseton. Penggunaan fase diam Diaion dengan fase gerak metanol dan kloroform ditujukan untuk menghilangkan klorofil dan asam lemak yang banyak mengganggu proses isolasi. Diaion merupakan polimer fase terbalik yang memiliki sifat mirip dengan C18. Penggunaan silika gel dengan gradien eluasi kloroform-metanol dapat mengelompokkan senyawa dalam sembilan jenis pelarut dengan polaritas bertingkat. Pemisahan lebih lanjut dengan kolom ODS untuk memisahkan fraksi silika gel kedalam sepuluh kelompok senyawa dari masing-masing subfraksi. Dengan tahapan ini diharapkan terjadi pemisahan lebih baik dan lebih memudahkan untuk proses isolasinya dengan KCKT. Isolasi dilakukan dengan

optimasi eluen untuk mendapatkan pemisahan yang paling baik dari puncak kromatogram dengan KCKT. Penampungan masing-masing puncak dilakukan dengan cara manual. Tabel 5.9 menampilkan berat dari masing-masing subfraksi.

Dari subfraksi yang dihasilkan dilakukan kembali uji sitotoksik dengan hasil seperti pada tabel 5.10. Hasil menunjukkan bahwa subfraksi paling aktif adalah subfraksi ME11 dan ME12. Dari pola KLTnya dapat diamati pemisahan yang cukup baik (Gambar 5.5). Tahapan selanjutnya adalah isolasi dengan KCKT. Optimasi pemisahan dilakukan dengan percobaan pemisahan dengan menggunakan pelarut aseton berbagai konsentrasi. Dari subfraksi ME11.1-11.11 dan ME12.1-12.11 dihasilkan pemisahan yang paling baik pada ME114 dan ME127 (Gambar 5.6). Dari ME114 dapat diisolasi tujuh (A-G) dan empat senyawa dari ME127 (A-D). Dari warna bercak ME114A diduga golongan flavonoid, sedangkan ME127A dan ME127C adalah golongan steroid.

Elusidasi ME114A dilakukan dengan membandingkan analisis hasil RMInya dengan data pustaka. Dari hasil analisis diduga 114A adalah kuersetin 3-O- β -D-galaktopiranosil-(1-6)- β -D-galaktopiranosida ($C_{27}H_{30}O_{17}$ berat molekul 626,1373), dengan modifikasi perbedaan δ pada ikatan karbon glikon dari yang pernah dilaporkan Hirayama *et al.* (2013) dari kepompong *Rodotia menciata*. Adanya kuersetin juga dapat diamati dari LC-MS ekstrak (Rt 4,8 menit). Demikian juga Jafari *et al.*, (2013) dapat mengisolasi empat flavonol 3-O-glikosida termasuk rutin, kaempferol-3-O-robinobiosida, kaempferol-3-O-rutinosida dan isokuersetin dari ekstrak dan fraksinya. Terdapat geseran kimia pada RMI ^{13}C dan 1H 40,74 dan 4,55 ppm (s) yang setara dengan pelarut metanol-d₄, yang diduga merupakan pengotor dari pelarut metanol. Adanya kontaminan dari eluen dan senyawa lain juga jumlahnya yang sangat sedikit menyulitkan mengelusidasi hasil RMI. Seperti diketahui flavonoid kuersetin merupakan fitoestrogen karena strukturnya yang mirip dengan estrogen terutama pada cincin A dengan substituen hidroksil pada C7nya. Namun

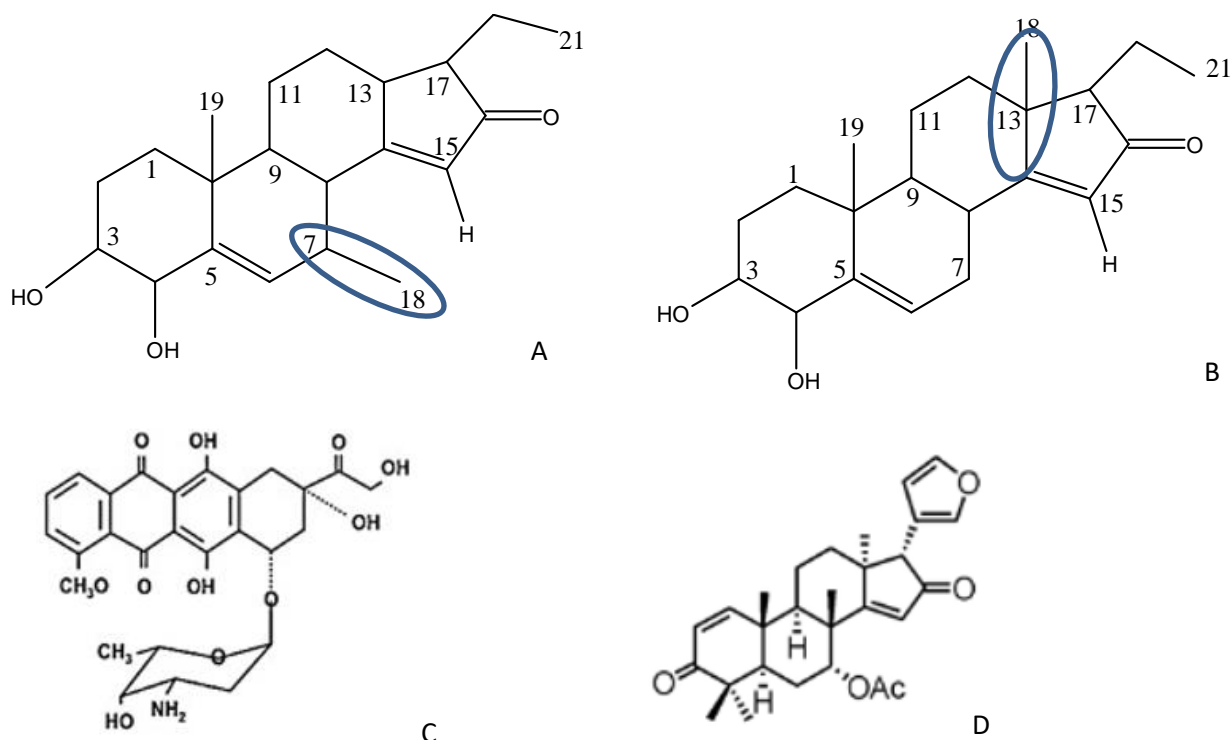
berkenaan dengan teknis jumlahnya yang sangat sedikit sehingga tidak memungkinkan untuk pemastian struktur melalui hidrolisis dan analisis glikon serta analisis RMI 2D termasuk ditetapkan mekanismenya lebih lanjut.

Elusidasi isolat ME127A dan ME127C diduga merupakan isomer dengan rumus molekul $C_{21}H_{30}O_3$ dan struktur inti siklopenta(α)-fenantren-2-il)-16-on, dengan perbedaan pada substituenya. Isomerisasi merupakan salah satu karakteristik dari senyawa steroid yang berkaitan dengan adanya atom karbon anomerik. Fragmentasi massa ME127A dan ME127C sebagian besar memiliki pola yang mirip dengan kelimpahan yang berbeda. Pada ME127A kelimpahan fragmen terbesar pada m/z 353,21, sementara pada ME127C pada 313,22. Dipilih m/z 353,21 sebagai massa induk senyawa berkenaan dengan Δ geseran yang lebih kecil (± 5 ppm). Data *COSY*, *HMQC* dan *HMBC* yang membedakan keduanya (Gambar 6.1). Kedua senyawa memiliki inti sama seperti yang dilaporkan oleh Wu *et al.*, (2009) *2 α ,3 β -dihidro-5-pregnen-16-on* dengan modifikasi pada letak ikatan rangkap serta rantai sampingnya. Adanya ikatan rangkap pada cincin D (C14-C15 dan substituen metil pada C7 atau C13, Gambar 6.2) seperti ditunjukkan pada azadiradion, senyawa triterpenoid dari minyak biji *A. indica* seperti yang dilaporkan oleh Hallur *et al.* (2002).

Tahapan selanjutnya adalah uji sitotoksik dan menentukan mekanisme apoptosis dari isolat tersebut. Hasil sitotoksik isolat dapat dilihat pada tabel 5.10. Isolat ME127C menunjukkan aktivitas yang paling besar dibanding ME127A dan ME114A maupun 154G. Uji hambatan siklus sel menunjukkan adanya penurunan jumlah sel pada fase subG1 dari semua perlakuan dengan isolat ME127C dan ME127A. ME127C menunjukkan penurunan jumlah sel terbesar, disusul ME127A, dibandingkan terhadap sel kontrol. Hambatan pada Gap 1 juga teramati pada semua perlakuan, dengan hambatan terbesar dari ME127A dan ME127C. Peningkatan jumlah sel poliploidi hingga lebih dari dua kalinya teramati pada ME127A. Pada fase subG1 sering

dihubungkan dengan kemampuan sel untuk apoptosis. Jumlah sel menurun dibandingkan kontrol menunjukkan terjadinya gangguan metabolisme pada fase G1. Dari siklus sel dapat diduga ME127A dan ME127C memberikan *arrest* pada fase G2. Pada fase G2 terjadi pertumbuhan sel dan persiapan sel masuk dalam fase mitosis. Adanya hambatan pada kedua fase siklus sel menyebabkan endoreduplication (replikasi DNA prematur dan terbentuk poliploidi). P53 berkaitan dalam pengaturan pembelahan sel. Mutasi pada p53 menginduksi tumorigenesis. Pada sel T47D terjadi *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc binding domain*, L2; sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan respon elemen pada DNA (Faneyte *et al.*, 2001). Gambar 2.6. menunjukkan peran protein siklin, kinase (CDK) dan inhibitorynya dalam regulasi siklus sel. Adanya gangguan pada tahapan ini dapat menghasilkan hambatan pada siklus sel. Adanya CDKI seperti p21 akan mengaktifasi gen p27 oleh faktor transkripsi yang disebut sebagai p53.

Pembanding doksorubisin merupakan turunan antrasiklin (Gambar 6.2.) yang digunakan secara luas sebagai kemoterapetika, termasuk untuk kanker payudara. Doksorubisin dapat menghambat enzim topoisomerase II, yang menginterkalasi pasangan rantai basa DNA, menyebabkan putusya untaian DNA dan menghambat sintesis DNA dan RNA. Efek samping doksorubisin dapat menyebabkan kardiomiopati pada pasien kanker, yang sering dikaitkan dalam induksi apoptosis pada sel endothelial dan kardiomyosites melalui aktivasi p53 dan spesies oksigen reaktif. Diketahui juga doksorubisin dapat menginduksi bax, meningkatkan proteolitik protein anti-apoptotik bcl-2, caspase-8 dan caspase-3, mempengaruhi stres oksidatif dengan meningkatkan produksi hidrogen peroksida dan simultan menurunkan gen NF- κ B dan ekspresi protein pada MCF-7 dan MDA-MB-231.



Gambar 6.2. Dugaan struktur (A) ME127A (17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]fenantren-16-on) dan (B) ME127C (17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on), (C) doksorubisin, (D) azadiradion

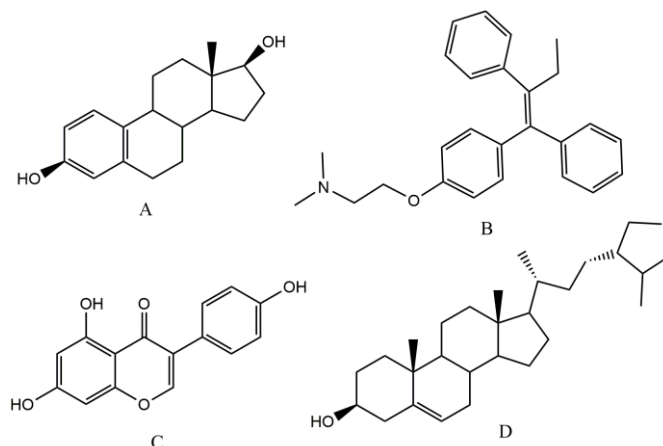
Pada ME127A dan ME127C teramati hambatan siklus sel, peningkatan jumlah sel apoptosis dan peningkatan rasio Bax/Bcl-2. Fenomena ini seperti yang dihasilkan oleh Vundru *et al.* (2013) dari β -sitosterol (ST). Kematian sel oleh ST dikaitkan dengan induksi apoptosis dengan depolarisasi potensial membran mitokondria dan peningkatan rasio protein bax/bcl-2. Mekanisme antagonis reseptor (estrogen reseptor α) dapat juga ditunjukkan melalui studi model toksisitas ME127A dan ME127C (Lampiran 4) yang menunjukkan nilai prediksi 127A dan ME127C mendekati satu sama lain, dengan ME127C lebih dapat dimodelkan dibanding 127A untuk kedua parameter IC_{50} dan K_i (konstanta inhibisi) yang mendekati nilai tamoksifen. Hasil ini

menunjukkan bahwa ME127A dan 127C memiliki aktivitas terhadap ER α . Pemodelan ini juga mendukung hasil sitotoksik dari ME127A dan ME127C, yang menunjukkan ME127C lebih kuat potensi sitotoksiknya dibanding ME127A, meskipun keduanya lebih kurang toksik terhadap reseptor model dibanding tamoksifen dan doksorubisin (Tabel L4.1 dan L4.2).

Senyawa steroid memiliki aktivitas fitoestrogenik berkenaan dengan strukturnya yang dapat berikatan pada reseptor. Sel T47D sebagai ER+ (Estrogen Receptor) peka dengan adanya senyawa estrogenik, dapat meregulasi ekspresi dan fungsi protein yang mengatur fase G₁ dan mempromot transisinya. Siklin D1, c-Myc, p21 dan siklin E-cdk2 merupakan target bawah estrogen. Estradiol dapat meningkatkan ekspresi cyclin D1 dengan stimulasi transkripsinya melalui jalur PI3-Kinase/Akt. Efek penghambatan dari anti-estrogen pada aktivitas estrogen receptor dapat menurunkan ekspresi cyclin D1 dan disosiasi p21 dan p27 dari kompleks siklin D1-cdk4/6 dan kaitannya dengan kompleks siklin E-cdk2 (Rezaei *et al.*, 2012).

Uji mekanisme apoptosis dilakukan pula terhadap isolat ME127A dan ME127C. Apoptosis merupakan mekanisme homeostasis sel. Hasil menunjukkan keduanya menghasilkan apoptosis yang lebih baik, dengan sedikit persen nekrosis dibandingkan terhadap doksorubisin pada 24 jam. Sementara pada pengamatan 48 jam menghasilkan penurunan jumlah sel apoptosis, meskipun pada ME127A masih lebih tinggi dibanding doksorubisin. Hasil ini menunjukkan aktivitas isolat yang lebih selektif sebagai apoptosis dibandingkan dengan doksorubisin.

Pengamatan mikroskopis hasil imunositokimia untuk menentukan mekanisme intrinsik apoptosis yang dihasilkan oleh ME127A dan ME127C. Hasil menunjukkan terjadi perubahan mikroskopis sel dan peningkatan rasio bax/bcl-2 dari perlakuan dibandingkan terhadap kontrol. Dari penelitian terdahulu diketahui beberapa ekstrak/ senyawa dari Mindi menghasilkan apoptosis baik melalui jalur intrinsik bax/bcl-2 (Sumarawati *et al.*, 2017), caspase seperti ditunjukkan oleh



Gambar 6.3. ER α ligan (A) Estrogen, (B) tamoxifen, (C) Genistein, dan (D) β -sitosterol

toosendanin (He *et al.*, 2010) pada SMMC-7721 (p53+) dan Hep3B (p53-) dan dari ekstrak etanolik buah *M. toosendan* (Tang *et al.*, 2012) terhadap SW480 dan CT26.

Jalur apoptosis ekstrinsik mediasi reseptor dari Meliarachin C dan 3-*O*-deasetil-40-demetil-28-oksosalannin diamati oleh Bratton *et al.*, (2000) terhadap sel HL60. Adanya reseptor Fas, sebagai reseptor kematian dari jalur nekrotik dari sel AZ521 juga dilaporkan oleh Kikuchi *et al.* (2013) dari 12-*O*-asetilazedarachin B terhadap sel leukemia (HL-60) dan AZ521, meskipun tidak sitotoksik terhadap sel SK-BR-3. Wu *et al.* (2009) yang melaporkan 2,3-dihidro-5-pregnen-16-on dari daun *M. azedarach* tidak menghasilkan efek sitotoksik pada sel A549, H460, dan U251. Meskipun pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan mekanisme apoptosis ekstrinsiknya dari ME127A dan ME127C.

Tabel 6.1. menunjukkan posisi temuan riset diantara penelitian sitotoksik dan apoptosis ekstrak dan isolat *Melia* spp. Telah dilakukan penelusuran derivat pregnen dengan formula C₂₁H₃₀O₃ dalam pubchem dan google scholar dari 4140 temuan sampai mengerucut 12 senyawa. Diantara keduabelas senyawa tersebut diteliti satu demi satu rumus molekulnya yang sama dengan

ME127A dan ME127C. Umumnya senyawa tersebut adalah derivat progesterone dengan karbonil pada C3 dan ikatan rangkap pada C4-C5, sedangkan ME127A dan 127C terdapat substituen o-

Tabel 6.1. Tabel penelitian sitotoksik dan mekanisme antikanker *Melia* spp.

MA/ M SPESIES LAINNYA	NON CA MAMAE		CA MAMAE	
	ekstrak	isolat	ekstrak	isolat
		HL60, A549, AZ521, and SK-BR-3 , MCF-7 : flavonol 3-O-glycosida termasuk rutin, kaempferol-3-O-robinobiosida, kaempferol-3-O-rutinosida and isokuercetin (Jafari <i>et al.</i> , 2013)		
Daun MA		A549, H460, U251 (20S)-5,24(28)-ergostadien-3_,7_,16_,20-tetrol, (20S)-5-ergosten-3_,7_,16_,20-tetrol, & 2_,3_-dihidro-5-pregnen-16-on, (20S)-5-stigmasten-3_,7_,20-triol (4) (Wu <i>et al.</i> , 2009)		steroid derivat baru pregnen-16-on: 17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[<i>a</i>]fenantren-16-on) dan 17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[<i>a</i>]-fenantren-16-on. IC ₅₀ sitotoksik terhadap sel T47D 173,62 dan 60,86 µg/mL. Apoptosis lebih tinggi dibanding doksorubisin, melalui jalur bax/bcl-2
Apoptosis		HEL & CB7 sel: 12-hidroksiamoorastin, 1-deasetilsendanin dan 29-isobutilsendanin (Wang <i>et al.</i> , 2019)		
		A549 sel: Tirukalan triterpen, 3- α -tigloilmelianol and tirukalan, melianon, 21- β -asetoksi-melianon, and metil kulonat (Ntalli <i>et al.</i> , 2010)		
Buah MA	A549: antikanker (Kim & Kang, 2012)			
		HL60, A549, AZ521, and SK-BR-3 Meliarachin C, 3-O-deasetil-40-demetil-28-oksosalannin, 31 limonoid dan 1 triterpenoid tirukallan (Akhizha <i>et al.</i> , 2013)		
	B16F10: melanogenes is (Yao <i>et al.</i> , 2015)			
		HL-60 & AZ521, SK-BR-3 : 12-O-Asetilazedarachin B (Kikuchi <i>et al.</i> , 2013)		

Tabel 6.1. Tabel penelitian sitotoksik dan mekanisme antikanker *Melia* spp. (lanjutan)

		<i>in vivo</i> : Bax/Bcl-2 (Sumarawati <i>et al.</i> , 2017)
Buah MA		21,24-sikloeufa-7-en-3 β ,16 β ,21 α ,25-tetrol, 3 β -asetoksi-12 β -hidroksi-eufa-7,24-dien-21,16 β -olid, 29-hidroperoksi-stigmasta-7,24(28)E-dien-3 β -ol, dan 24 ξ -hidroperoksi-24-vinil-latosterol, 2-4, 24 ξ - hidroperoksi -24-vinil-kolesterol, kulinon, meliastatin 3, asam 3-okso-olean-12-en-28-oat, (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioksi-24-metil-kolesta-6,22-dien-3 β -ol (12) (Wu <i>et al.</i> , 2014)
		HepG2, K562, and SGC7901 sel: 2 α ,3 β ,16 β -trihidroksi-5 α -pregnane-20R-metakrilat (Ma <i>et al.</i> , 2018)
apoptosis		-
Melia spesies lainnya		
buah <i>M. toosendan</i> (MT)		M14, NCI-H23, SF-539, PC-3, SW 620, KM12, UO-31 and ACHN sel: 28-deasetil sendanin (Kim <i>et al.</i> , 1994) KB sel: Toosendanal, Metilvolkensin, Meliatoksin B1, Trichilin H, Toosendanin (Tada <i>et al.</i> , 1999)
Apoptosis	SW480 and CT26: apoptosis (Tang <i>et al.</i> , 2012)	
batang MT		PC3, BEL7404, SH-SY5Y, U251, HL-60 dan U937 sel: Toosendanin (Zhang <i>et al.</i> , 2005) <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i> SMMC-7721 dan Hep3B dan BALB/c mice; Toosendanin (Liu <i>et al.</i> , 2016)
Apoptosis		SMMC-7721 dan Hep3B; <i>in vivo</i> : toosendanin; Bax/bcl-2, & Fas (He <i>et al.</i> , 2010)

Keterangan: M = *Melia*, MA = *M. azedarach*, MT = *M. toosendan*, kotak merah muda = temuan penelitian

hidroksil pada C3 dan C4, ikatan rangkap pada C5-C6 dan C14-C15. Dari hasil ini diduga ME127A dan ME127C merupakan steroid modifikasi baru yang dihasilkan dari Mindi lokal. Dari Tabel 6.1. juga dapat diketahui *gap* penelitian mekanisme apoptosis steroid dari Mindi terhadap sel T47D. Penelitian isolasi dan mekanisme merupakan penelitian yang membutuhkan sumber daya yang banyak dan waktu yang lama. Penggunaan teknik isolasi dengan penunjuk sitotoksik merupakan cara strategis untuk mendapatkan isolat bioaktif.

Dalam kaitan dengan mekanisme apoptosis umumnya peneliti mengalami kesulitan melanjutkan penetapannya berkenaan dengan jumlah isolat yang sangat kecil dan terbatas. Oleh karena itu dengan diketahuinya struktur isolat merupakan bahan yang baik untuk studi hubungan struktur dan aktivitas atau penggunaannya sebagai biomarker. Dari tahapan yang dilakukan untuk menguji temuan-temuan tersebut, dapat disampaikan *novelty* dalam penelitian ini yaitu antara lain:

- (1) pasangan isomer ME127A dan ME127C merupakan senyawa steroid derivat pregnen modifikasi baru dengan ikatan rangkap pada C14-15 yang tidak dimiliki oleh senyawa (Wu *et al.*, 2009)
- (2) Pasangan isomer ME127A dan ME127C menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan mekanisme apoptosis jalur intrinsik bax/bcl-2 lebih baik daripada doksorubisin terhadap sel T47D
- (3) Disamping senyawa steroid ME127A dan ME127C, ditemukan senyawa ME114A yang merupakan glikosida kuersetin dengan struktur yang mirip dengan struktur kuersetin 3-*O*- β -*D*-galaktopiranosil-(1-3)- β -*D*-galaktopiranosida seperti dilaporkan Hirayama *et al.* (2013), dengan perbedaan pada ikatan antara gula pertama dan kedua.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Isolat ME127A dan ME127C yang diperoleh melalui *bioassay guided isolation* dari fraksi etil asetat ekstrak daun Mindi (*M. azedarach* L.) memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC₅₀ berturut-turut 173,62 dan 60,86 µg/mL.
2. Hasil elusidasi struktur terhadap isolat murni dari daun Mindi (*M. azedarach* L) menunjukkan senyawa dengan inti steroid, yaitu dua isomer baru derivat pregnen-16-on (ME127A dan ME127C) yang berturut-turut diduga sebagai 17-etil-3,4-dihidroksi-7,10-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]fenantren-16-on) dan 17-etil-3,4-dihidroksi-10,13-dimetil-1,2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,17-dodekahidro-16H-siklopenta[*a*]-fenantren-16-on.
3. Mekanisme antikanker isolat senyawa steroid ME127A dan ME127C tersebut sebagai apoptosis dengan meningkatkan rasio bax/bcl-2 sel T47D

7.2. Saran

Saran dari hasil penelitian ini adalah:

1. Menguji aktivitasnya terhadap galur sel lain dari *Ca mammae*
2. Melengkapi mekanisme molekularnya dan studi bioavailabilitasnya terhadap protein terkait dengan studi *molecular docking*
3. Melakukan uji aktivitas lanjutan untuk penggunaannya sebagai antikanker payudara

Daftar Pustaka

- Akihisa, T., Pan, X., Nakamura, Y., Kikuchi, T., Takahashi, N., Matsumoto, M., Ogihara, E., Fukatsu, M., Koike, K., Tokuda, H., 2013. Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 89, pp.59–70.
- Alajmi, M.F., Hussain, A., Alam, P., 2017. Concurrent analysis of the biologically active markers β -amyrin and β -sitosterol by applying a validated high-performance thin-layer chromatography method in the aerial parts of *Tinospora cordifolia* and *Calotropis gigantea*. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 30 (3), pp.175-80
- American Type Culture Collection, 2013. Breast Cancer and Normal Cell Line. Diakses dari www.atcc.org, pada tanggal 9 September 2017.
- Anonim, Cell Cycle and Its Regulation, 2017. The cell cycle is regulated at the checkpoints by cyclin-Cdk complexes. Diakses dari <http://www.mun.ca/> dan http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Cell_Cycle_And_Its_Regulation.htm, pada tanggal 10 September 2017.
- Awad, A.B., Chinnama, M., Finka, C.S., Bradford, P.G., 2007. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 14, pp.747–54.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2013. *Pedoman Teknologi Formulasi Sediaan Berbasis Ekstrak*. Jakarta: BPOM RI, 2, pp.3-4, 9-12.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta: BPOM RI, 5(1), pp.90-1.
- Bajguz, A. and Tretyn, A., 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62, pp.1027–46.
- Bayala, B., Zoure, A.A., Baron, S., de Jousseineau, C., Simpire, J., and Lobaccaro, J.M.A., 2020. Review pharmacological modulation of steroid activity in hormone-dependent breast and prostate cancers: effect of Some Plant Extract Derivatives, *International Journal of Molecular Science*, 21, 3690.
- Bratton, S.B., MacFarlane, M., Cain, K., Cohen, G.M., 2000. Protein complexes activate distinct *caspase* cascades in death receptor- and stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 256, pp.27–33.
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2013. Protokol uji sitotoksik metode MTT. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta: CCRC UGM.
- Chemspider, Royal Society of Chemistry, 2020. <http://www.chemspider.com/>
- Chorawala, M.R, Oza, P.M., Shah, G.B., 2012. Mechanisms of Anticancer Drugs Resistance: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4(1), pp.1-9.
- De Hoffmann, E., dan Stroobant, V., 2007. Mass Spectrometry Principles and Applications. 3rd Edition, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, England

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, cetakan I, Jakarta: Depkes RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008. Farmakope Herbal Indonesia. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, edisi I, Jakarta, Jakarta: Depkes RI, hal. 41-4.
- Eheman, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., White, M.C., 2009. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(6), pp.1763-9. Diakses dari ebp.aacrjournals.org, pada tanggal 29 November 2017.
- El-Hawary, S.S., El-Tantawy, ME., Rabeh, M.A., Badr, W.K., 2103. DNA fingerprinting and botanical study of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) family Meliaceae. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science*, 2, pp.1-13
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495–516.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J., 2005. *Caspase* family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37, pp.719–27.
- Faneyte, I.F., Kristel, P.M.P., Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Schellens, J.H.M., Van de Vijver, M.J., 2002. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 8, pp.1068–74. Diakses dari <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/8/4/1068.full.pdf>, pada tanggal 28 November 2017.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (3), pp.225-68.
- Karp, G., Iwasa, J., Marshall, W. 2013. Cell and Molecular Biology, 7th Edition, USA: John Wiley & Son, Inc.
- Keeler, J., 2010. Understanding NMR Spectroscopy, 2nd edition. Wiley. pp. 184–7.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., Schwarting, A.E., 1991. Pengantar Kromatografi, terjemahan K. Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Gunaherath, G.M.K.B. and Gunatilaka, A.A.L. Plant steroids: occurrence, biological significance, and their analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2014, p.1-26.
- Gupta, A., Kumar, B.S., Negi, A.S., 2013. Review Current status on development of steroids as anticancer agents. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, pp.242-70
- Hallur, G., Sivramakrishnan, A., Bhat, S.V., 2002. Three New Tetranortriterpenoids from Neem Seed Oil. *Journal of Natural Product*, 65 (8), pp.1177–9.
- Handa, S.S., 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plant. In: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, S.S. Handa, S.P.S Khanuja, G. Longo, D.D.Rakesh Eds. Trieste, Italy: International Centre for Science and High Technology.

- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan*. cetakan ke II, Bandung: Penerbit ITB, hal.19-34.
- Hassanpour, S.H, Dehghani, M., 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4, pp.127-9
- He, Y., Wang, J., Liu, X., Zhang, L., Yi, G., Li, C., He, X., Wang, P., Jiang, H., 2010. Toosendanin inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis. *Planta Medica*, 76 (13), pp.1447-53.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M., 2004. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. London: Churchill Livingstone, pp.109-15.
- Hirayama, C., Ono, H., Meng, Y., Shimada, T., Daimon, T. 2013. Flavonoids from the cocoon of *Rondotia menciiana*. *Phytochemistry*, 94, p.108
- Igney, F.H., Krammer, P.H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), pp.277-88.
- Jafari, S., Saedinia, S., Hajimehdipoor, H., Ardekani, S.M.R., Faramarzi, M.A., Hadjiakhoond, A., and Khanavi, M., 2013. Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1, pp. 21-37.
- Joray, M.B., Villafañez, F., González, M.L, Crespo, M.I., Laioloa, J., Palacios, S.M., Bocco, J.L., Soria, G., Carpinella, M.C., 2017. P53 tumor suppressor is required for efficient execution of the death program following treatment with a cytotoxic limonoid obtained from *Melia azedarach*. *Food and Chemical Toxicology*, 109(Pt 2), pp.888-97.
- Kathiravan, V., Ravi, S., Ashokkumar, S., 2014. Synthesis of silver nanoparticles from *Melia dubia* leaf extract and their *in vitro* anticancer activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, pp.116-21.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015. Infodatin Stop Kanker.
- Kikuchi, T., Pan, X., Ishii, K., Nakamura, Y., Ogihara, E., Koike, K., Tanaka, R., and Akihisa, T., 2013. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of 12-o-acetylazedarachin B from the fruits of *Melia azedarach* in human cancer cell lines, *Biological Pharmaceutical Bulletin. The Pharmaceutical Society of Japan*, 36(1), pp.135-9.
- Kim, H.M., Oh, G.T., Han, S.B., Hong, D.H., Hwang, B.Y., Kim, Y.H., Lee, J.J., 1994. Comparative studies of adriamycin and 28-deacetyl sendanin on *in vitro* growth inhibition of human cancer cell lines. *Archives of Pharmacology Research*, 17 (2), pp.100-3.
- Kim, H.W., Kang, S.C., 2012. The Toxicity and Anti-cancer Activity of the Hexane Layer of *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino's Bark Extract. *Toxicology Research*, 28 (1), pp.57-65.
- Kreis, W. and Müller-Uri, F., 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. *Annual Plant Reviews*, 40, pp.304-63.
- Liu, X.L., Wang, H., Zhang, L., Wang, Y.L., Wang, J., Wang, P., He, X., He, Y.J., 2016. Anticancer effects of crude extract from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc on hepatocellular

- carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 22 (5), pp.362-9.
- Mabberley, D.J., 1984. A Monograph of *Melia* in Asia and the Pacific: The history of White Cedar and Persian Lilac. *The Gardens' Bulletin Singapore*, 37 (1), pp.49–64.
- McCauley, J., Zivanovic, A., Skropeta, D., 2013. Bioassays for anticancer activities, University of Wollongong Research Online. diakses dari <http://ro.uow.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?>, pada tanggal 25 November 2017.
- Minorics, R., Zupko, I., 2018. Steroidal Anticancer Agents: An Overview of Estradiol-related Compounds. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*, 18 (5), pp.652-66.
- Mitaine-Offer, A.C., Marouf, A., Hanquet, B., Birlirakis, N., Lacaille-Dubois, M.A., 2001. JEOL NMR database. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 49, p.1492
- Mona-Mass bank of North America. 2020. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/VF-NPL-QEHF010860>, [VF-NPL-QEHF023440](https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/VF-NPL-QEHF023440), [VF-NPL-QEHF023122](https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/VF-NPL-QEHF023122), CCMSLIB000 00855190.
- Mulla, M.S., Su, T. 1999. Activity of biological effects of neem products against Arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of American Mosquito Control Association*, 15, pp.133-52.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor, *Cell*, 88 (3), pp.355-65. Diakses dari [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81874-](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81874-), pada tanggal 9 September 2017.
- Nguyen, L.T., Lee, Y.H., Sharma, A.R., Park, J.B., Jagga, S., Sharma, G., Lee, S.S., Nam, J.S., 2017. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean Journal of Physiology Pharmacology*, 21(2), pp.205-13.
- Ntalli, N.G., Cottiglia, F., Bueno, C.A., Alché, L.E., Leonti, M., Vargiu S, Bifulco E, Menkissoglu-Spirodi, U., and Caboni, P., 2010. Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from *Melia azedarach* Fruits. *Molecules*, 15, pp.5866-77.
- Ong, E.S., dan Ong, C.N., 2007. Qualitative and quantitative analysis of toosendanin in *Melia toosendan* Sieb. Et Zucc (Meliaceae) with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, pp.589–98. doi: 10.1002/rcm.2878
- Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P., Ajeet, 2013. Anticancer potential of plants and natural products: a review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1 (6), pp.104-15.
- PubChem, US National Library of Medicine, National Centre for Biotechnology Information. 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Polonsky J, Varon Z, Marazano C, Arnoux B, Pettit GR, Schmid JM, Ochi M and Kotsuki H. 1979. The structure of amoorastatone and the cytotoxic limonoid 12-hydroxyamoorastatin. *Experientia*, 35, pp.987-1130
- Ren, G.X., Hou, J., Fang, Q., Sun, H., Liu, X., Zhang, L., Wang, P.G. 2012. Synthesis of flavonol 3-O-glycoside by UGT78D1. *Glycoconjugate Journal*, 29, pp.425–32.

- Rezaei, P.F., Fouladdel, S., Ghaffari, S.M., Amin, G., Azizi, E., 2012. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, p.101
- Rishi, K., and Singh, R., 2003. Chemical components and insecticidal properties of Bakain (*Melia azedarach L.*) - a review. *Agricultural Reviews*, 24(2), pp.101-15
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1997. *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. *Cell*, 91, pp.443-6.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., Orrenius, S., 1999. Apoptosis: Cell death defined by *caspase* activation. *Cell Death and Differentiation*, 6, pp.495-6. Diakses dari <https://www.nature.com/articles/4400520.pdf>, pada tanggal 28 November 2017.
- Sen, A., and Batra, A., 2012. Chemical composition of methanol extract of the leaves of *Melia azedarach L.* *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3), pp.42-5.
- Shah, R., Rosso, K., Nathanson, S.D., 2014. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*, 5(3), pp.283-98.
- Sharma, D., and Paul, Y., 2013. Preliminary and pharmacological profile of *Melia azedarach L.*: an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (12), p.133-8.
- Silverstein, R.M., Bassler, I., Morrill, H., Terence, C., 1991. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., Singapore.
- Stahl, E. 1985. Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi. Bandung: Penerbit ITB.
- Sukirtha, R., Priyanka, K.M., Antony, J.J., Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P., Krishnan, M., Achiraman, S., 2012. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against *in vitro* HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochemistry*, 47 (2), pp.273-9.
- Sultana, S., Khan, M.A., Ahmad, M., Bano, A., Zafar, M., and Shinwari, Z.K., 2011. Authentication of herbal medicine Neem (*Azadirachta indica A. Juss.*) using taxonomic and pharmacognostic techniques. *Pakistan Journal of Botany*, 43, pp.141-50.
- Sumarawati, T., Israhnanto, Fatmawati, D., 2017. Anticancer mechanism of *Melia azedarach*, doxorubicin and cyclophamide combination against breast cancer in Mice, *Bangladesh Journal of Medical Science*, 16 (3), pp.428-31.
- Suresh, K., Deepa, P., Harisaranraj, R., Vaira, A.V., 2008. Antimicrobial and Phytochemical investigation of the leaves of *Carica papaya L.*, *Cynodon dactylon L. Pers.*, *Euphorbia hirta L.*, *Melia azedarach L.* and *Psidium guajava L.* *Ethnobotanical Leaflets*, 12, pp.1184-91.
- Tada, K., Takido, M., Kitanaka, S., 1999. Limonoids from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, 51, pp.787-91.
- Takeya K., Quio Z.S., Hirobe C., Itokawa H., 1996. Cytotoxic trichilin-type limonoids from *Melia azedarach*. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 4, pp.1355-9.
- Takeya K., Qiao Z.S., Hirobe C., Itokawa H., 1996. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 42, pp.709-12.

- Tang, X.L., Yang, X.Y., Kim, Y.C., Kim, S.Y., Kang, B.D., Choi, D.Y., King, O., Park, W.C., Park, H., 2012. Protective effects of the ethanolic extract of *Melia toosendan* fruit against colon cancer. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 49(3), pp.173-81.
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O.O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B.B., Kumar, B., Islam, R., and Adnan, M., 2017. A systematic review on ethnomedicines of anticancer plants. *Phytotherapy Research*, pp.1-64. diakses dari <https://www.researchgate.net/publication/312471852>, pada tanggal 9 September 2017.
- The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2015. Meliaceae, Encyclopaedia Britannica Inc.. diakses dari <https://www.britannica.com/plant/Meliaceae>, pada tanggal 25 September 2017.
- Vijayarathna, S., and Sasidharan, S., 2012. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (10), pp.826-9. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609226/>, pada tanggal 20 November 2017.
- Vundru, S.S., Kale, S.K., and Singh, R.P., 2013. β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, pp.280-9.
- Wagner, H., Blatt, S., and Zgainski, E.M., 1984. *Plant Drug Analysis: Thin Layer Chromatography*. (translator Scott TA). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 24-5.
- Wang, N., Fan, Y., Yuan, C.M., Song, J., Yao, Y., Liu, W., Gajendran, B., Zacksenhaus, E., Li, Y., Liu, J., Hao, X.J., Ben-David, Y. 2019. Selective ERK1/2 agonists isolated from *Melia azedarach* with potent anti-leukemic activity. *BMC Cancer*, 19, p.764
- Weller, M.G. 2012. Review A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*, 12, pp. 9181-209.
- World Health Organization. Cancer: Fact sheets. 2020. Diakses dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, pada tanggal 21 September 2020.
- Wu, S.B., Ji, Y.P., Zhu, J.J., Zhao, Y., Xia, G., Hu, Y.H., Hu, J.F., 2009. Steroid from the leaves *Melia azedarach* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Steroids*, 74 (9), pp.761-5.
- Xiong, W., Luo, G., Zhou, L., Zeng, Y., Yang, W., 2009. *In vitro* and *in-vivo* antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chinese Medicine*, 4, pp.1-7.
- Yao, C., Jin, C.L., Oh, I.G., Park, C.H., Chung, J., 2015. *Melia azedarach* extract stimulates melanogenesis through increase of tyrosinase-related protein 1 expression in B16F10 mouse melanoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 35 (6), pp.1761-6.
- Yu, S., Kim, T., Yoo, K.H., Kang, K., 2017. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal a subtype of breast cancer, *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 486, pp.752-8,

- Zakharov, V., Lagunin, AA., Filimonov, DA., and Poroikov, VV., 2012. Quantitative prediction of antitarget interaction profiles for chemical compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 25, pp.2378–85.
- Zhang, B., Wang, Z.F., Zhi Tang, M., Liang Shi, Y., 2005. Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from Chinese traditional medicine. *Investigational New Drugs*, 23, pp.547–53.
- Zhang, W.M., Liu, J.Q., Peng, Q.R., Wan, L.S., Zhang, Z.R., Li, Z.R., Qiu, M.H., 2014. Triterpenoids and sterols from the leaves and twigs of *Melia azedarach*. *Natural Product and Bioprospecting*, 4, pp.157–62.
- Zheng, Y., Murphy, L.C. 2016. Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors. *Nuclear Receptor Signaling*, 14, pp.1-12

Lampiran-1
Lembaran identifikasi tanaman



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 346/ 102.7/ 2017
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Mindi Kecil**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : MARTHA ERVINA
NIM : 051717097302
Instansi : S3-ILMU FARMASI, FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

1. Perihal determinasi tanaman mindi kecil
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Dicotyledonae
 - Bangsa : Meliales
 - Suku : Meliaceae
 - Marga : Melia
 - Jenis : *Melia azadirach* L.
 - Nama Umum : Mindi, mindi kecil, renech, gringgng, cakra-cikri.
 - Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220b-224b-225b-227b-229b-230b-234a-235a-1a-1.
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi 10-15 m. Batang: Tegak, berkayu, bulat, permukaan kasar, percabangan simpodial, coklat. Daun: Majemuk, menyirip ganda, berseling, panjang 20-80 cm, tangkai panjang 8-20 cm, hijau; anak daun bulat telur bergerigi, hijau tua. Bunga: Majemuk, malai, berkelamin dua, di ujung cabang, tangkai silindris, panjang 10-20 cm, kelopak hijau, benang sari silindris, putih kekuningan, putik lonjong, coklat muda, mahkota 5 dan berwarna ungu pucat. Buah: Batu, coklat kekuningan. Biji: Bulat, putih. Akar: Tunggang, coklat.
3. Nama Simplisia : Meliae Folium/ Daun Mindi.
4. Kandungan : Daun mengandung flavones glycoside, quercitrin, kaempferol, dan sejenis protein yang memiliki sifa insektisidal.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
 - Anonim. <http://www.tanamanobat.com/Mimba>, diakses tanggal 9 Januari 2009.
 - Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/Mimba>, diakses tanggal 6 November 2010.
 - Syamsulhidayat, Sri Sagati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batuu, 18 September 2017
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin B.M., Drs., Apt., M.Kes.
NIP. 19611102 199103 1 003

Lampiran-2

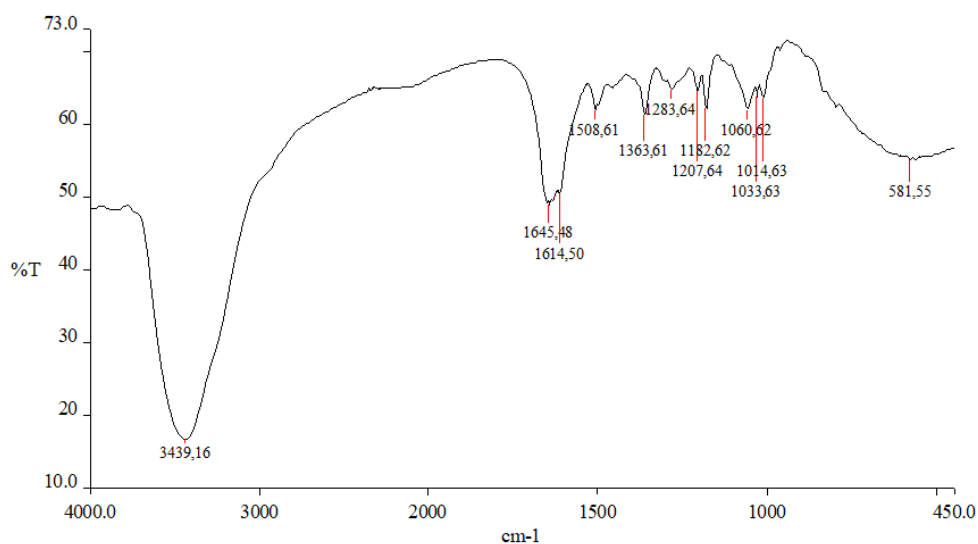
Tabel L2. Hasil pemisahan dengan KCKT subfraksi

No	Isolat (berat/ mg)	Data			Catatan/ dugaan senyawa
		Karakteristik fisik	warna bercak KLT (H ₂ SO ₄)	MS	
1	ME111A (5.2)	kecoklatan, kristal jarum	coklat (banyak bercak)	x	
2	ME111B (9.2)	Serbuk kecoklatan	coklat	199.0573 C ₇ H ₁₂ O ₅ Na	
3	ME111E (123.1)	Minyak kuning kecoklatan	Kuning sampai coklat	313.2163 C ₂₁ H ₂₉ O ₂	
4*	ME114A (6.2)	Serbuk kecoklatan	Kuning	649.1373 C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇ Na	Quercetin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -galactopyranosida (Hirayama <i>et al.</i> (2013))
5	ME114E (10.7)	serbuk kekuningan	Ungu	233.1512 C ₁₃ H ₂₂ O ₂ Na	Diduga Blumenol C
6	ME114F (14.9)	Serbuk kecoklatan	Ungu	441.2973 C ₂₆ H ₄₂ O ₄ Na	ME114F RMI spektrum jelek (campuran?)
7	ME114G (7.1)	Serbuk putih	Ungu merah	557.24 C ₂₆ H ₄₂ O ₄ Na	Toosendanin derivat
9*	ME127A (23.5)	Serbuk putih	Ungu	353.2087 C ₂₁ H ₃₀ O ₃ Na	RMI elusidasi struktur
10	ME127B (10.2)	Serbuk putih	coklat	629.3660 C ₃₄ H ₅₄ O ₉ Na	
11*	ME127C (40.1)	Serbuk putih kekuningan	Ungu	353.2087 C ₂₁ H ₃₀ O ₃ Na	
12	ME127D (24.7)	Serbuk putih	Ungu	379.2455 C ₂₀ H ₃₆ O ₅ Na	
13	ME1210A (10.2)	Serbuk kehitaman	Ungu	425.2146 C ₂₀ H ₃₄ O ₈ Na	ReHPLC 1210A1 (hilang)
14	ME1210C (27.8)	Serbuk kecoklatan	Ungu	425.2146 C ₂₀ H ₃₄ O ₈ Na	RMI
15	ME1210D (43.2)	Serbuk kecoklatan	Ungu	837.4400 C ₄₀ H ₆₈ O ₁₆ Na	ME1210D= 2xME1210A/C?
16	ME1510B (6,4)	Serbuk kekuningan	coklat	441,2973 C ₂₆ H ₄₂ O ₄ Na	Beberapa fragmen mirip dengan meliatoksin A1/A2 m/z373
17	ME1510D (12,4)	Serbuk kekuningan	Coklat merah	425,2146 C ₂₀ H ₃₄ O ₈ Na	ME1510=ME1210A/C? Beberapa fragmen mirip dengan meliatoksin
18	ME1510F (10,9)	Serbuk kekuningan	Coklat	519,1989 C ₂₈ H ₃₂ O ₈ Na	Meliatoksin
19	ME154B (5,4)	Serbuk kuning	Ungu	561,2308 C ₂₇ H ₃₀ O ₆ Na	
20	ME154G (13,47)	Serbuk kecoklatan	kuning	561,2308 C ₂₇ H ₃₀ O ₆ Na	
21	ME124A (8.4)	Serbuk putih	kuning	367.2090 C ₁₈ H ₃₂ O ₆ Na	

Keterangan: * = dielusidasi strukturnya

Lampiran-3

Isolat ME154G



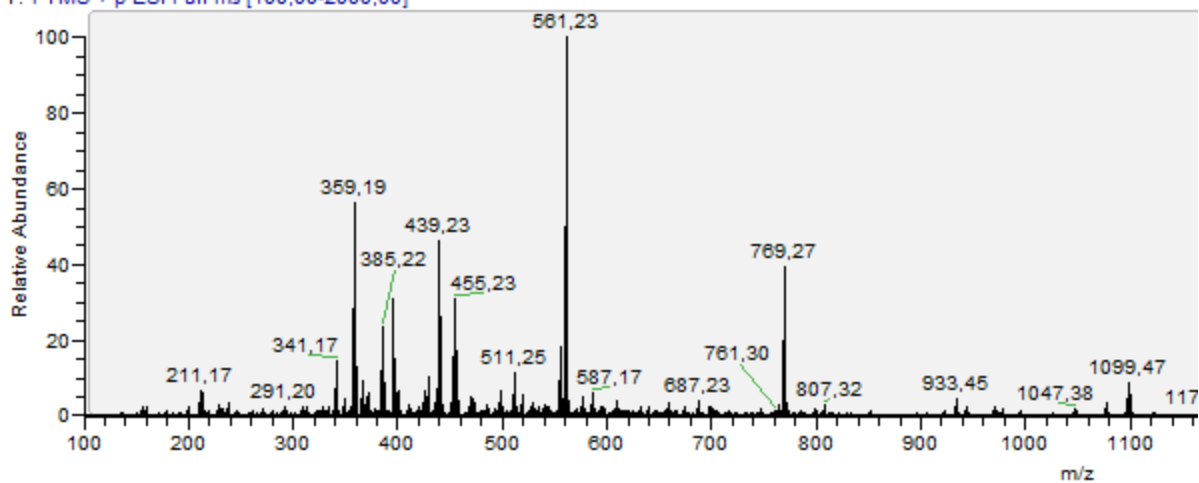
154 g.pk

Gambar L3.1. Spektra inframerah ME154G

Tabel L3.1. Interpretasi spektrum infra merah ME154G

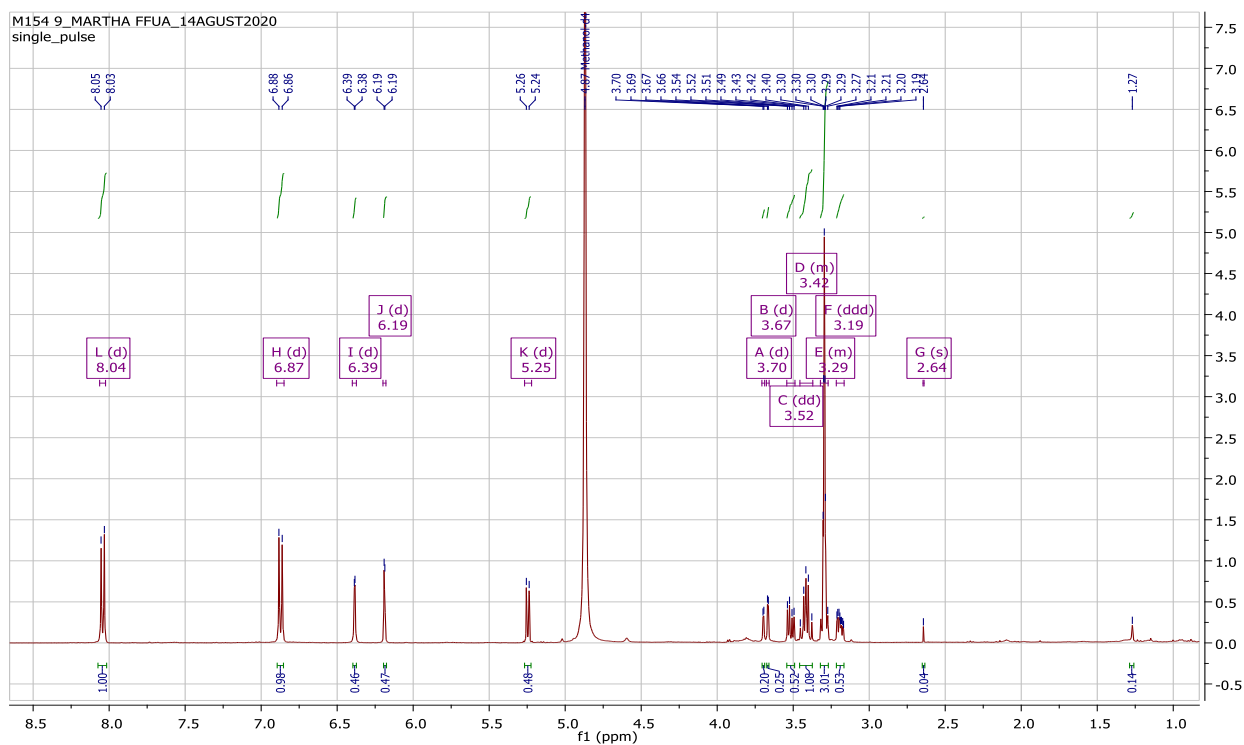
Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Sidik jari
3439 16	-OH	1283 64 1207 64 1182 62 1060 62 1033 63	
1645 48	C=O	1014 63 581 55	
1614 50 1508 61 1363 61 2937,59			

191226_34 #7 RT: 0,07 AV: 1 NL: 3,57E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100,00-2000,00]

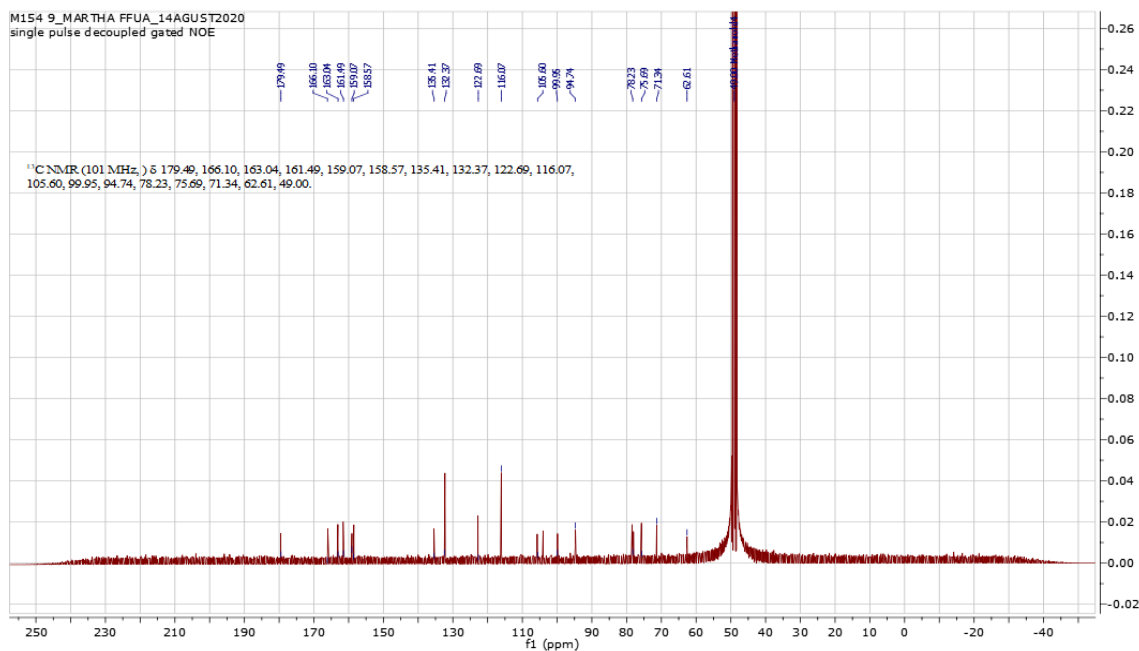
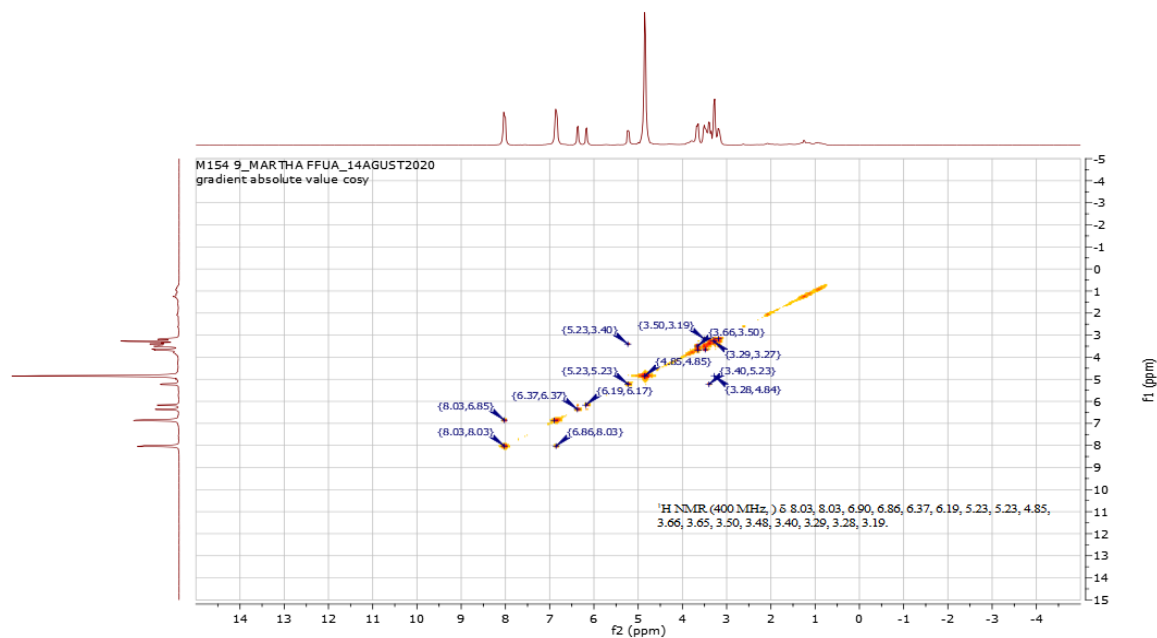


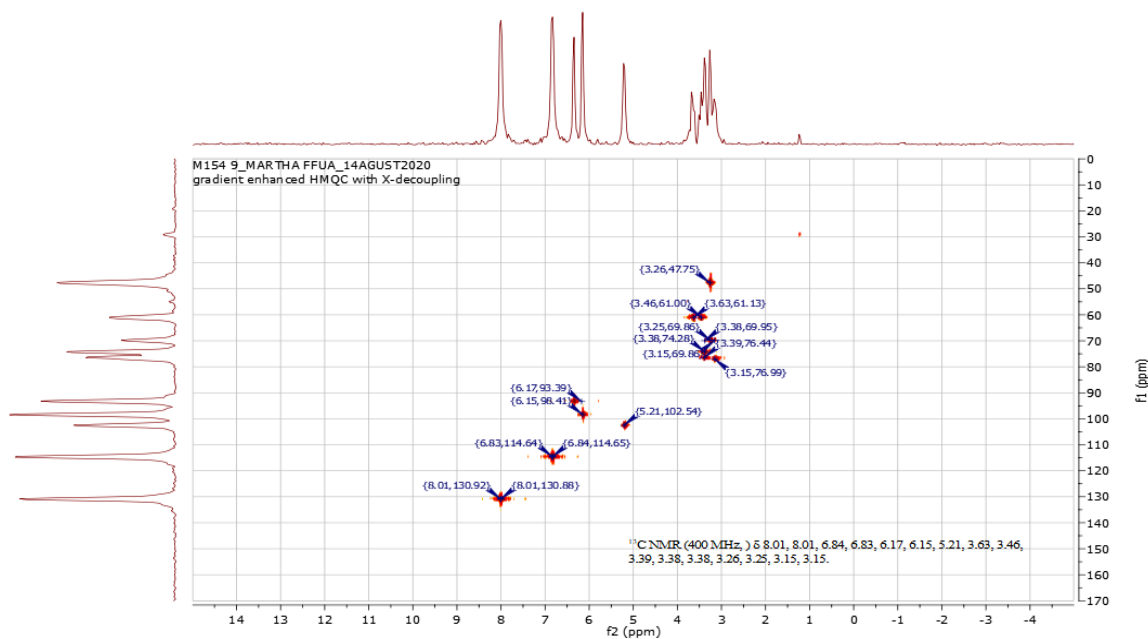
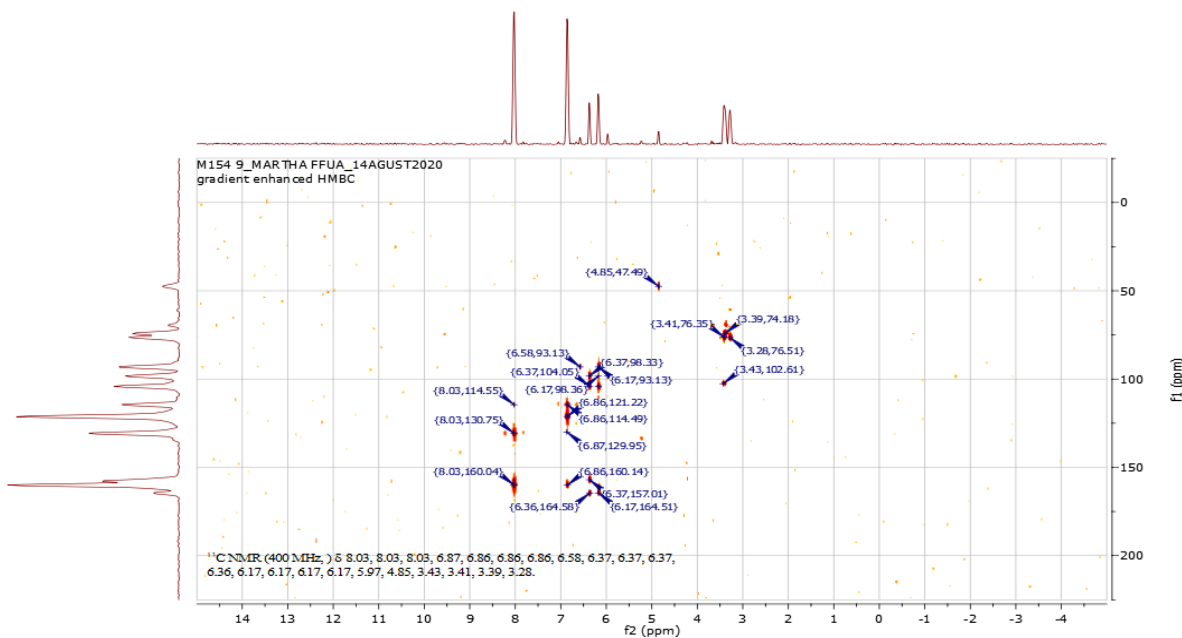
Gambar L3.2. Spektra spektrometri massa ME154G

561,23077 C₂₇H₃₈O₁₁Na (C₂₇H₃₈O₁₁ = 538)



Gambar L3.3. Spektra RMI ¹H ME 154G dalam CD₃OD

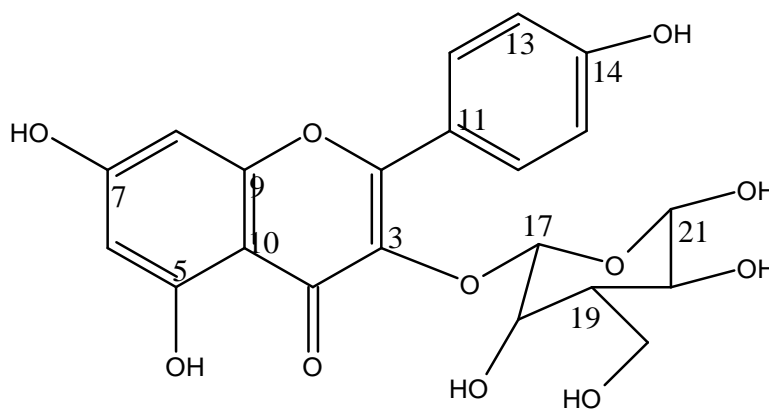
Gambar L3.4. Spektra RMI ^{13}C ME154G dalam CD_3OD Gambar L3.5. Spektra RMI *COSY* ME154G dalam CD_3OD

Gambar L3.6. Spektra RMI HMQC ME154G dalam CD₃ODGambar L3.7. Spektra RMI HMBC ME154G dalam CD₃OD

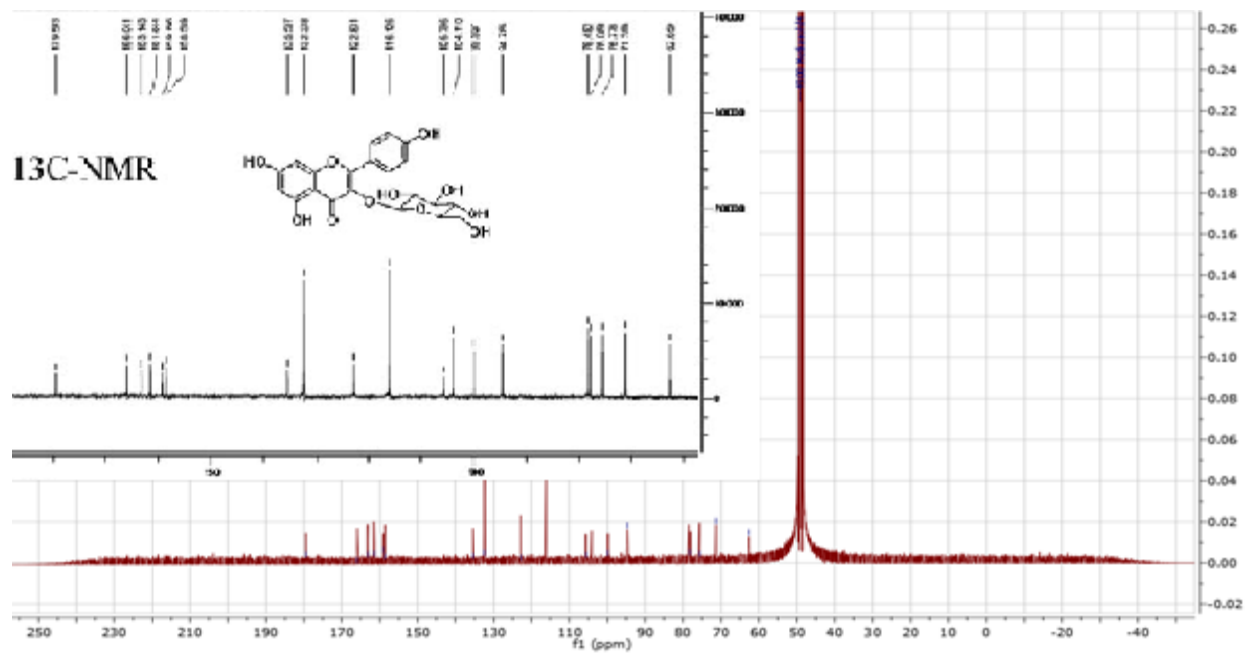
Tabel L3.2 analisis spektra RMI 154G

¹ H	δ	Interpretasi hasil				Curir, <i>et al.</i> (2001)				
		¹³ C	COSY	HMOC	HMBC	C No	¹³ C (δ)	¹ H (δ)		
		179.49	8.03 8.03	8.01 8.01	8.03 8.03 8.03 3.41 3.39 3.28	4	180.0	C		
		166.10	6.90	6.84 6.83	6.87 6.86 6.86 6.86	7	166.1	C		
		163.04	6.86	6.17 6.15	6.58	5	163.1	C		
		161.49	6.37	5.21	6.37 6.37 6.37 6.36	9	162.8	C		
		159.07	6.19	3.63	6.17 6.17 6.17 6.17	14	159.0	C		
		158.57	5.23 5.23	3.46	5.97	2	158.1	C		
		135.41	4.85	3.39 3.38 3.38	4.85	3	134.1	C		
A	8.04 (d, 5H	132.37	3.66 3.65	3.26 3.25	3.43	12	132.8	CH	8.06	d 8.5
		122.69	3.50 3.48	3.15 3.15		16	124.0	C		
B	6.87 (d, 5H	116.07	3.40			11	115.8	CH	6.92	d 8.5
		105.60	3.29			13	105.1	C		
E	5.25 (d, 2H	101	3.28			15	101.4	CH	5.38	d 7.5
F	3.70 (d, 1H	101	3.19			17	101.8	CH	4.50	br s
G	3.67 (d, 1H	104				10	104.5	CH	4.80	d 7.0
D	6.19 (d, 2H	99.95				6	99.8	CH	6.24	s
C	6.39 (d, 2H	94.74				8	95.0	CH	6.42	s
J	3.32 – 3.27 (m)5H					42	81.5	CH	3.77	t 7.5
K	3.19 (ddd,3H					35	77.1	CH	3.37	
L	2.64 (s, 1H					36	77.5	CH	3.61	
							77.5	CH	3.61	

I	3.46 – 3.37 (m, 5H)	78.23	20	77.7	CH	3.50	ddd 9.5 5.5 3.5
H	3.52 (dd, 3H)	75.69	17	74.5	CH	3.43	
			33	73.8	CH	3.29	
			32	72.6	CH	3.62	br d 3.0
		71.34	18	71.5	CH	3.72	dd 8.5 7.5
			26	71.5	CH	3.42	m
				71.8	CH	3.74	dd 3.0 8.5
			31	71.9	CH	3.31	t 9.5
			24	63.3	CH ₂	3.67	
		62.61	19	62.8	CH ₂	3.86	
I	3.46 – 3.37 (m, 5H)	49.00	22	50.5	CH ₃	3.39	S
			17	17.1	CH ₃	1.12	d 6.0
			45			3.60	
			46			3.77	



Gambar L3.8. Dugaan struktur ME154G (kaempferol-3-*O*- β -*D*-glukopiranosida) C₂₁H₂₀O₁₁
berat molekul 448



Gambar L3.9. Perbandingan data RMI Kaempferol-3-O-β-D-glukopiranosida (Ren *et al.*, 2012) dengan ME154G

Lampiran-4

Tabel L4.1. prediksi toksisitas isolat dan pembanding (Zakharov *et al.*, 2013)

Senyawa	LD ₅₀ (mg/kg) rute (kelas OECD)			
	Intraperitoneal	Intravena	Oral	Subkutan
ME127A	616,500 (5)	6,580 (2)	1290,000 (4)	310,000 (4) *
ME127C	781,700 (5)	15,310 (3)	1107,000 (4)	1001,000 (5)
Tamoksifen	367,700 (4)	33,280 (3)	2419,000 (5)	1031,000 (5)
Estradiol	1340,000 (non toksik)	32,240 (3)	1623,000 (4)	959,400 (4)
Doxorubisin	7,230 (2)	22,670 (3)	185,300 (3)*	28,460 (3)*

Keterangan: parameter senyawa * = tidak masuk, tidak bertanda = masuk dalam domain penerapan model

Hasil prediksi toksisitas peroral menghasilkan pola yang sama dengan hasil uji sitotoksitas yang menunjukkan isolat ME127C lebih toksik dibanding ME127A.

Tabel L4.2. Profil prediksi kuantitatif interaksi senyawa terhadap enzim dan reseptor antitarget

No	Senyawa	Parameter	Nilai prediksi, -Log ₁₀ (nilai), Mol			
			tamoxifen	doxorubisin	127A	127C
1	antagonis reseptor 5-hidroksitriptamin 1B	IC ₅₀	6,251*	5,243*	4,195*	4,134*
2	Antagonis reseptor 5-hidroksitriptamin 2A	Ki	7,675*	6,516	6,348	7,129
3	Antagonis reseptor 5-hidroksitriptamin 2C	IC ₅₀	6,151	7,536	7,387*	7,621*
4	Antagonis reseptor 5-hidroksitriptamin 2C	Ki	6,409*	6,939	5,971*	6,880*
5	Antagonis reseptor adrenergik α1a	IC ₅₀	6,738	6,734	7,381*	7,492*
6	Antagonis reseptor adrenergik α1b	Ki	7,165*	6,371	7,298*	7,442*
7	Antagonis reseptor adrenergik α2A	IC ₅₀	7,174*	6,687	5,075*	4,720*
8	Antagonis reseptor adrenergik α2A	Ki	6,269*	7,140*	5,953	5,950
9	inhibitor amin oksidase [flavin-] A	Ki	6,804	7,150	6,151*	5,837*
10	antagonis reseptor androgen	IC ₅₀	7,646	5,614	7,709	7,119
11	aktivator karbonik anhidrase I	Ki	6,274	6,556	6,352	6,071
12	aktivator karbonik anhidrase 2	IC ₅₀	5,780	5,072	4,016	4,425
13	inhibitor karbonik anhidrase II	Ki	5,581	4,493	5,550	5,243
14	antagonis D(1A) dopamin reseptor	IC ₅₀	6,723	6,374	8,055	8,121
15	antagonis D3 dopamin reseptor	Kact	6,619	7,263	4,403*	4,426*
16	antagonis D3 dopamin reseptor	Ki	7,334	7,125	6,816	6,930
17	estrogen reseptor antagonis	Kact	6,462	6,318	5,182	5,201
18	estrogen reseptor antagonis	Ki	8,076	7,601	7,919	8,140
19	estrogen reseptor antagonis	IC ₅₀	6,491	4,853	6,911	6,895
20	estrogen reseptor antagonis	Ki	5,432*	6,026	6,643	6,972*
21	estrogen reseptor antagonis	Ki	7,171*	6,660	7,014*	6,951*
22	estrogen reseptor antagonis	Ki	6,963*	6,607	6,315*	6,254*
23	estrogen reseptor antagonis	IC ₅₀	7,085	5,851	7,647*	7,579


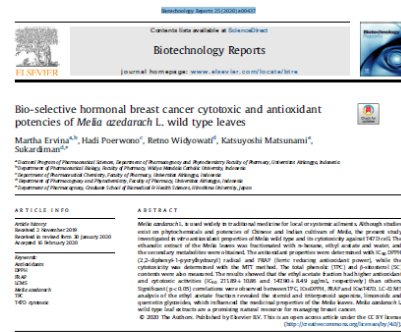
24		Ki	7,342	9,670	7,034	6,948
25	antagonis reseptor kappa-tipe opioid	Ki	5,401*	5,931	6,515	6,820*
26	antagonis reseptor mu-tipe opioid	IC ₅₀	8,001	5,899	7,597*	7,818*
27		Ki	7,474	6,178	7,856	7,096
28	antagonis sodium- klorid- dependen GABA transporter 1	IC ₅₀	4,037	5,164	5,142	4,897
29	antagonis sodium- dependen dopamin transporter	IC ₅₀	6,120*	6,355	5,761	5,641
30		Ki	5,396*	6,138	5,021	5,075
31	antagonis sodium- dependen serotonin transporter	IC ₅₀	7,254*	5,925	5,822*	5,082*
32		Ki	7,615*	6,804	7,147*	7,050*
Jumlah total antitarget			11	18	10	9

Keterangan: parameter senyawa * = tidak masuk, tidak bertanda = masuk dalam domain penerapan model

Isolat ME127A dan ME127C memiliki interaksi yang mendekati nilai interaksi tamoksifen terhadap reseptor estrogen. Isolat 127C memiliki nilai interaksi yang lebih aplikabel pada model yang digunakan dibanding isolat ME127A

Lampiran-5

Tabel L5. Luaran penelitian disertasi

No	Program	Hasil
1	Review artikel: <i>Melia azedarach</i> L. as a Potent Anticancer Drug (<i>Pharmacognosy Reviews</i> , Vol 12, Issue 23, January-June 2018) – Q1 Scopus Indeks, HI 42	
2	Seminar IGSCPS: presentasi oral “Phytochemical study of ethanolic extract and fractions of <i>Melia azedarach</i> L. leaves”	Best oral presenter 29-30 Agust 2018
3	Penyusunan dan pengajuan proposal Penelitian Disertasi Doktor (DP2M-Dikti)	Proposal PDD (Pengajuan agustus 2019)
4	<i>Awardee</i> PKPI- sandwich like program Ristek DIKTI 2019-	Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, September- Desember 2019 Published paper dan isolat dari fraksi etil asetat
5	<i>Published paper</i> Biotechnology Report Bio-selective hormonal breast cancer cytotoxic and antioxidant potencies of <i>Melia azedarach</i> L. wild type leaves. <i>Biotechnology Reports</i> 25 (2020) e00437, Q1 Scopus Indeks, HI 21	

- 6 Penulis artikel terbaik versi KeMenristekdikti 2020

Judul Artikel	Impact Factor WoS	Nama Jurnal	Klastor	Nama	Peran	Tanggal Verifikasi	Hasil Verifikasi
Bio-selective-hormonal breast cancer cytotoxic and antioxidant potencies of <i>Melia azedarach</i> L wild type leaves	-1	Biotechnology Reports	Q1 Non IF	Sukardiman	Corresponding Author	16 November 2020	Diskonfirmasi

- 7 Paper 'The analysis, estrogen receptor- α antagonist and toxicity prediction of wild type *Melia azedarach* leaves bioactive fraction'

Submit ke *Brazilian Archieve Biology and Technology*, indeks scopus Q2, HI 45 – proses editorial

Submission Confirmation Print

Thank you for your submission

Submitted to: Brazilian Archives of Biology and Technology
 Manuscript ID: BABT-2020-0812
 Title: The analysis, and alpha receptor antagonists molecular docking and toxicity prediction of wild *Melia azedarach* bioactive fraction content
 Authors: Ervina, Martha sukardiman, Sukardiman
 Date Submitted: 27-Dec-2020

[Author Dashboard](#)

- 8 Draft paper 'the apoptosis potency of new modified steroids from *Melia azedarach* wild type'

Rencana submit ke Steroid, Q2 Scopus indeks, HI 101