

UJI AKTIVITAS KOMBINASI EKSTRAK ETANOLIK DAUN TEH (*Camellia sinensis*) DAN KULIT JERUK MANDARIN (*Citrus reticulata*) SEBAGAI AGEN KEMOPREVENTIF PADA SEL KANKER PAYUDARA T47D SERTA FORMULASI MENJADI SEDIAAN TABLET *EFFERVESCENT*

Ega Hida Prabowo, Rifki Febriansah

**Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta**

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang mematikan dan dapat menyerang wanita maupun pria dengan tingkat prevalensi yang tinggi. Pengobatan kanker pada umumnya dilakukan dengan metode kemoterapi, operasi atau radiasi. Namun pengobatan tersebut selain harganya mahal juga menimbulkan efek samping yang merugikan. Untuk mengatasi hal tersebut, perlu adanya inovasi pencegah kanker payudara, salah satunya dengan eksplorasi bahan alam. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas kombinasi ekstrak etanolik daun teh (*Camellia sinensis*) dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) sebagai agen kemopreventif kanker payudara pada sel T47D secara *in vitro* dan *in silico*.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Serbuk teh dan kulit jeruk mandarin diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, uji identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak menggunakan metode KLT dengan fase gerak Butanol:Asetat:Air (7:2:1), uji antioksidan ekstrak menggunakan metode DPPH(1,1-difenil-2-pikrihidrazil), uji sitotoksik ekstrak menggunakan metode MTT Assay, penambatan molekuler senyawa tangeretin dan EGCG (*epigallocatechin gallate*) pada reseptor HER2 menggunakan software *Autodock Vina* kemudian dibuat sediaan tablet *effervescent* kombinasi ekstrak metode granulasi basah.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk mandarin mengandung senyawa flavonoid dengan nilai Rf sebesar 0,81 dan 0,81 sesuai dengan pembanding rutin (Rf 0,75). Kombinasi ekstrak etanol daun teh dan kulit jeruk mandarin memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 83,00 µg/ml. Kombinasi ekstrak etanol daun teh dan kulit jeruk mandarin memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah dengan nilai IC₅₀ sebesar 1888,69 µg/ml. Hasil penambatan molekuler senyawa tangeretin dan EGCG menghasilkan nilai *score docking* sebesar -6.6 dan -5.0 dengan perbandingan nilai *score docking* ligan asli (-4.9). Pembuatan sediaan tablet *effervescent* dengan evaluasi uji kekerasan sebesar 0,24 kgf, uji waktu larut 3,15 menit, dan uji pH 5,15. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak etanolik *Camellia sinensis* dan *Citrus reticulata* memiliki potensi sebagai agen kemopreventif berdasar data aktivitas antioksidan yang kuat pada sel kanker payudara T47D.

Kata kunci: *Camellia sinensis*, *Citrus reticulata*, KLT, uji antioksidan, MTT Assay, *molecular docking*, tablet *effervescent*, kanker payudara T47D

ABSTRACT

Breast cancer is a deadly type of cancer and can affect women and men with high prevalence. Cancer treatment is generally done by chemotherapy, surgery or radiation. But the treatment is not only expensive but also causes adverse side effects. To solving this problem, we need the innovation to prevent breast cancer, one of which is the exploration from natural materials. This study aimed to examine the activity of a combination of ethanolic extract of tea leaves (*Camellia sinensis*) and mandarin orange peel (*Citrus reticulata*) as a chemopreventive agent of breast cancer in T47D cells in vitro and in silico.

The research method used is experimental. Tea powder and mandarin orange peel in maceration extraction using 70% ethanol solvent, identification test of flavonoid compounds in extract using TLC method with mobile phase Butanol: Acetate: Water (7:2:1), antioxidant test using DPPH method (*1,1-diphenyl-2-picrihydrazil*), cytotoxic test using MTT Assay method, molecular docking of tangeretine and EGCG (*epigallocatechin gallate*) compounds on HER2 receptors using *Autodock Vina* software then made effervescent tablet combination extracts with wet granulation method.

The results showed that tea leaf ethanolic extract and mandarin orange peel contained flavonoid compounds with Rf values are 0.81 and 0.81 according to rutin comparison (Rf 0.75). The combination of tea leaf ethanol extract and mandarin orange peel has a strong antioxidant activity with IC₅₀ values of 83.00 µg/ml. The combination of tea leaves ethanol extract and mandarin orange peel has a weak cytotoxic activity with IC₅₀ values of 1888.69 µg / ml. The results of the molecular docking of the tangeretin and EGCG compounds produced docking scores -6.6 and -5.0 with a comparison of the value of the original ligand docking score (-4.9). The evaluation tests of effervescent tablets are hardness test is 0.24 kgf, solubility test is 3.15 minutes, and pH test is 5.15. Based on these results it can be concluded that the combination of ethanolic extract of *Camellia sinensis* and *Citrus reticulata* has a potential as a strong chemopreventive agent based on antioxidant activity data on T47D breast cancer cells.

Keywords: *Camellia sinensis*, *Citrus reticulata*, TLC, Antioxidant DPPH, MTT Assay, molecular docking, effervescent tablet , T47D breast cancer cell

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker mematikan yang menyerang wanita dengan tingkat prevalensi yang tinggi. Pada tahun 2012, angka kejadiannya sebesar 26 per 100.000 perempuan (Anonim, 2012).

Pengobatan terapi kanker diantaranya kemoterapi, operasi dan radiasi (Aziz *et al.*, 2006). Namun pengobatan tersebut selain harganya mahal juga menimbulkan efek samping yakni bisa mematikan jaringan sehat disekitarnya, misal sel rambut. Untuk menanggulangi hal tersebut perlu adanya inovasi selain pengobatan tersebut, contohnya menggunakan alternatif pengobatan lain yang relatif lebih aman (Chang dan Kinghorn, 2001).

Dewasa ini, banyak penelitian berbahan dasar tanaman herbal yang bisa digunakan untuk pengobatan. Beberapa bahan alam yang dapat digunakan diantaranya adalah daun teh dan kulit jeruk mandarin.

Daun teh (*Camellia sinensis*) merupakan tanaman yang banyak dibudidayakan di dataran tinggi Indonesia. Kandungan terbesar yang terdapat pada daun teh ialah senyawa flavonoid polifenol yaitu *epigallocatechin gallate* (EGCG) (Zhao *et al.*, 2011).

Menurut Nelson (1934), kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) memiliki kandungan senyawa yang berpotensi menghambat perkembangan sel tumor yaitu tangeretin yang dapat menginduksi proses *cell-cycle G₁ arrest* (Pan, *et al.*, 2003).

Berdasarkan penelitian penelitian yang telah dilakukan di atas maka peneliti melakukan pengujian kandungan agen kemopreventif pada kombinasi ekstrak daun teh dan kulit jeruk mandarin dengan tujuan untuk mengetahui apakah dengan kombinasi dapat menghasilkan efek antioksidan yang lebih poten, sama, atau lebih

lemah dibanding ekstrak tunggalnya. Bila terbukti poten, penelitian akan diteruskan dengan pembuatan sediaan, yaitu sediaan tablet *effervescent*. Penelitian juga dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik kombinasi ekstrak daun teh dan kulit jeruk mandarin terhadap sel kanker payudara T47D.

METODE PENELITIAN

Alat

Seperangkat komputer ASUS, alat-alat gelas (Pyrex®), timbangan analitik (Sartorius®), oven (Mettler®), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), aluminium foil (Brand®), vorteks (Labinco® L46), autoklaf (Hirayama®), inkubator CO₂, laminar air flow hood (Labconco®), tabung konikal 15 ml steril, *centrifuge* (Sorvall®), mikropipet (Gilson®), *ELISA reader* (Bio-Rad®), *96-well plate* (Nunc®), mikroskop *inverted* (Zeiss®), blue tip, evaporator (Shimadzu®), ayakan serbuk 16 mesh, chamber, *water bath*, *blender*

(Miyako®), kertas saring, yellow tip, pipa kapiler, kuvet, dan pH meter.

Bahan

Daun teh (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari daerah Merapi, Kaliurang, Yogyakarta dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) dari daerah Bantul, Yogyakarta. Etanol 70%, aquadest, DPPH, Sel T47D koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, larutan MTT (Calbiochem®), lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, struktur protein reseptor HER2, amoniak, butanol, kontrol rutin, larutan RPMI (Merck®), larutan NaHCO₃, HCL encer 1 N, reagen stopper *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) (Merck®), larutan PBS, asam sitrat, asam tartat, natrium bikarbonat, sakarin.

PROSEDUR KERJA

1. MASERASI

Pembuatan ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* dengan cara serbuk simplisia direndam dalam etanol 70% dilakukan pengadukan secara berkala setiap hari

selama 4 hari agar mendapatkan hasil penyarian yang optimal.

Maserat disaring kemudian diremaserasi selama 2 hari untuk memaksimalkan hasil maserasi. Kemudian disaring kembali, lalu diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

2. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

Totolkan sampel uji yaitu kombinasi ekstrak etanolik *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* yang sudah dilarutkan dengan etanol 70% pada plat KLT silika gel menggunakan pipa kapiler, kemudian dielusi dengan fase gerak yang sudah jenuh di dalam bejana yang tertutup rapat. Untuk identifikasi senyawa flavonoid dalam ekstrak menggunakan fase gerak yaitu butanol : asam asetat : air (5:4:1) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Setelah dielusi plat KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan selama 10 menit dalam oven suhu 60⁰ C, kemudian plat diamati

di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm sehingga didapatkan hasil nilai Rf-nya.

Kemudian plat diberi uap amoniak hingga 10 menit. Lihat perubahan warna yang terjadi pada plat.

3. UJI ANTIOKSIDAN DPPH

a. Penyiapan larutan baku DPPH

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu takar, tambahkan 100 mL metanol p.a lalu dilarutkan hingga homogen dan didapatkan konsentrasi 0,4 mM. Larutan divortex selama 30 detik kemudian dibungkus menggunakan aluminium foil.

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C dimasukkan kedalam labu takar 50 mL, tambahkan metanol p.a hingga tanda batas sebagai larutan induk. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C 0,5;1;5;10; 20;30 µg/mL.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 20 mg kombinasi ET dan EKJ ditambahkan dengan 20 mL

metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000µg/mL. Dari larutan induk tersebut dibuat seri kadar 5;7,5;10; 15;20;30µg/mL.

d. Pengukuran Absorbansi

Larutan uji kemudian dipipet sebanyak 0,2 mL kemudian ditambahkan 3,8 larutan DPPH 0,05 mM dalam metanol. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Serapan kemudian diukur dengan alat spektrofotometer UV 515 nm. Sebagai kontrol positif digunakan larutan uji vitamin C dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

e. Perhitungan IC₅₀

Untuk menghitung IC₅₀ dengan cara mengolah data absorbansi sampel menjadi bentuk persen inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ bisa diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dalam

persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan x=kadar dan y=%inhibisi.

4. UJI SITOTOKSIK MTT ASSAY

a. Preparasi Sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan dalam suhu 37⁰ C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul lalu dibuka dan sel dipindahkan kedalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10 µl FBS, resuspensi perlahan hingga homogen. Sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dengan inkubator pada suhu 37⁰ C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

b. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan

penambahan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) buang larutan tersebut, tambahkan larutan 1 ml tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambah 3 ml larutan PBS, diamkan selama 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik.

Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer.

Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi 5×10^3 sel/100 μ L dan siap digunakan untuk penelitian.

c. Pembuatan Larutan Uji

Kombinasi ET dan EKJ dibuat stok dengan kadar $2 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$ dalam DMSO. Dari larutan tersebut dibuat seri kadar dalam media kultur.

b. Pemberian Perlakuan

Sel dengan kepadatan 70%-80% (konfluen) didistribusikan ke dalam 96

well plate lalu amati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusinya kemudian inkubasi selama 48 jam di dalam inkubator agar sel beradaptasi dan menempel didasar sumuran. Hari selanjutnya sumuran diambil, buang media sel dengan cara membalikkan plate 180° di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, tiriskan sisa cairan dengan tisu. Plate lalu dicuci menggunakan 100 μ L PBS yang ditambahkan pada sumuran yang terisi sel lalu masukkan seri konsentrasi sampel uji dan sumuran media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) dan diinkubasi kembali selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dan dicuci dengan 100 μ L PBS.

d. Pemberian reagen MTT

Sel yang hidup atau bertahan akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah inkubasi 4 jam, periksa kondisi sel

dengan mikroskop *inverted*. Apabila formazan telah jelas terbentuk tambahkan larutan *stopper* SDS (dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal formazan). Bungkus *plate* dengan alumunium foil dan inkubasi dalam tempat gelap dan suhu kamar.

Buka pembungkus *plate*, tutup *plate*, goyang diatas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA *reader* 595 nm. Kemudian dari data absorbansi dapat dihitung % sel hidup dan analisis nilai IC₅₀.

e. Perhitungan IC₅₀

Pada percobaan diperoleh absorbansi 3 macam uji meliputi kontrol sel, kontrol media dan senyawa uji (berisi media kultur, sel, dan senyawa uji).

$$\% \text{Sel Hidup} = \frac{\text{Abs perlakuan} - \text{Abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol sel} - \text{Abs kontrol media}} \times 100\%$$

Buat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter*. Cari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menampilkan *add trendline* regresi linier. Masukkan y=50 dan cari x nya

kemudian dihitung sehingga diperoleh IC₅₀.

5. PENAMBATAN MOLEKULER

a. Pengambilan Data

Data struktur protein target HER2 kode 1N8Z didapatkan melalui Protein Data Bank (PDB).

b. Pemodelan Molekul Senyawa Tangeretin dan EGCG

Struktur senyawa tangeretin dan EGCG menggunakan *Autodock Vina* kemudian disimpan dengan format *file ligant_2D.pdb*. Kemudian setiap senyawa diprotonasi pada pH 7,4 dan dilanjutkan dengan mencari bentuk konformasi menggunakan program *Open Babel* sehingga didapat bentuk 3D, berkas disimpan dalam bentuk mol2 dan diperoleh sepuluh konformasi.

c. Preparasi Protein Target

Program yang digunakan untuk preparasi yaitu YASARA, yaitu berkas protein dalam format *#.pdb*, lalu dihapus salah satu rantai proteinnnya atau rantai B untuk memperkecil wilayah *docking*.

Dilanjutkan dengan menghapus

NAG dan air bila diperlukan sehingga tersisa molekul asam amino. Tambahkan hidrogen, hasilnya disimpan dalam berkas mol2 yang kemudian digunakan sebagai protokol *docking* untuk penapisan pada virtual HER2.

d. Simulasi dan Validasi *Docking*

Dalam satu folder *File input* ligan dan *file* protein target disimpan, kemudian *PLANTS* versi 1.2 ditambahkan kedalam folder, kemudian tentukan posisi konfigurasi dan konfigurasi *docking* yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar.

Definisi konfigurasi diubah menjadi 5Å dari koordinat lokasi SC558 terikat pada HER2. Posisi yang memiliki skor terbaik dipilih sebagai tempat sampel diperkirakan berikatan. Dilanjutkan dengan *docking* ligan asli, setelah itu dilakukan perhitungan *Root Mean Square Deviance* (RMSD) dengan menggunakan YASARA, nilai RMSD dinyatakan valid apabila hasilnya lebih rendah dari 2Å.

6. FORMULASI TABLET *EFFERVESCENT*

a. Pembuatan Granul Asam dan Basa

1) Granul Asam

Asam sitrat, asam tartrat, dan kombinasi ET dan EKJ dicampur hingga homogen (campuran 1). Tambahkan etanol 70% sedikit demi sedikit sambil diaduk secara homogen pada serbuk PVP hingga larut, campurkan larutan tersebut kedalam campuran 1 sedikit demi sedikit hingga terbentuk massa basah yang dapat dikepal.

Massa diayak dengan ayakan 16 mesh dan di oven pada suhu 50° C selama 24 jam.

2) Granul Basa

Natrium bikarbonat dan sakarin dicampur hingga homogen (campuran 2). Tambahkan larutan pengikat kedalam campuran 2 sedikit demi sedikit hingga terbentuk massa padat yang dapat dikepal.

Massa kemudian diayak dengan ayakan 16 mesh dan di oven pada suhu 50 C selama 24 jam.

b. Penambahan Lubrikan

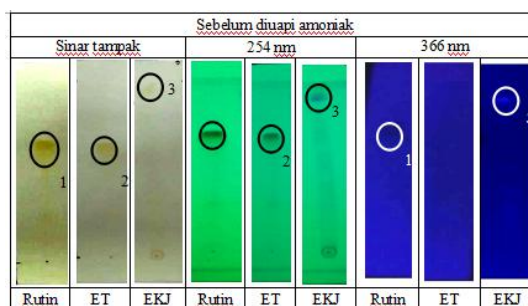
Setelah kering campuran 1 diayak dengan ayakan 16 mesh tambahkan laktosa dan mg stearat campur hingga homogen. Campuran 2 di ayak dengan ayakan 16 mesh, kemudian masukkan kedalam campuran 1 campur hingga homogen.

c. Pencetakan Tablet

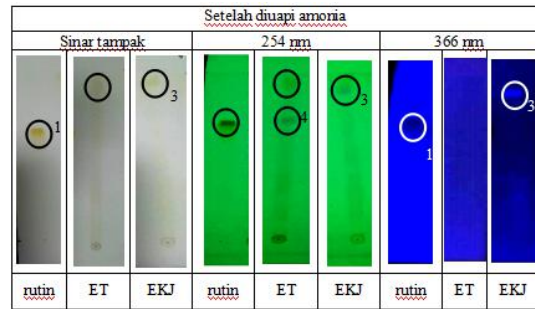
Granul yang telah dihasilkan kemudian dicetak dengan bobot 1000 mg pada tekanan tertentu dengan mesin tablet kemudian dilakukan evaluasi tablet. Tablet yang dihasilkan disimpan di tempat kering pada suhu di bawah 25°C dalam kemasan kedap udara yang tidak tembus uap air.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kromatografi Lapis Tipis



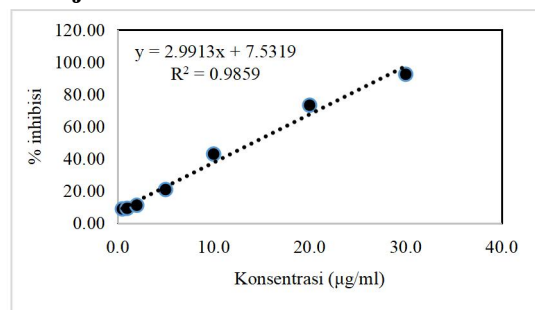
Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis Rutin, ET, dan EKJ sebelum diuapi Amoniak



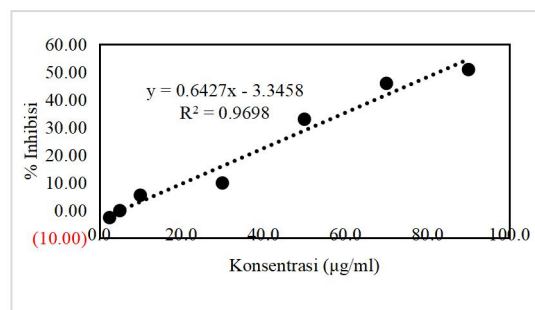
Gambar 2. Profil Kromatografi Lapis Tipis Rutin, ET, dan EKJ setelah diuapi Amoniak

Adanya senyawa flavonoid dibanding dengan nilai Rf senyawa standar (rutin). Pembanding rutin memiliki Rf 0,75 sedangkan sampel ET dan EKJ memiliki Rf 0,81 hal ini menunjukkan ET dan EKJ mengandung senyawa flavonoid.

2. Uji Antioksidan DPPH



Gambar 3. Grafik Inhibisi Vitamin C



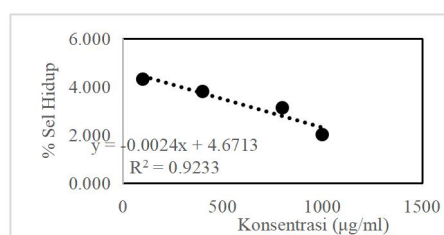
Gambar 4. Grafik Inhibisi Kombinasi ET dan EKJ

Tabel 1. Nilai IC₅₀

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

Nilai IC₅₀ senyawa vitamin C sebesar 14,87 µg/ml. Sedangkan IC₅₀ kombinasi ET dan EKJ sebesar 83,00 µg/ml, lebih lemah kekuatannya dalam menangkap radikal dibandingkan dengan senyawa kontrol vitamin C. Hal ini disebabkan karena masih dalam bentuk ekstrak belum dalam fraksi sehingga jumlah senyawa aktif yang dapat menghambat aktifitas radikal masih kecil. Namun menurut Mardawati *et. al.* (2008), IC₅₀<100 µg/ml dapat digolongkan sebagai antioksidan yang kuat, sehingga kombinasi EKJ dan ET berpotensi kuat dalam aktifitas penangkapan senyawa radikal.

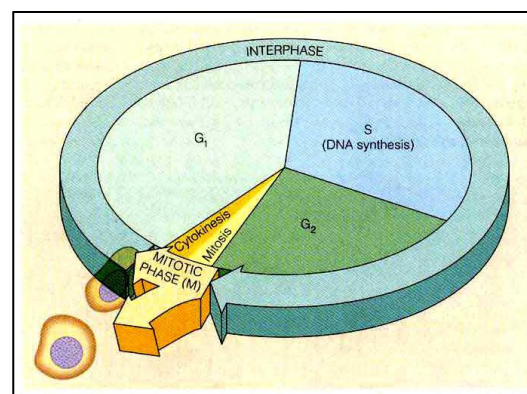
3. Uji Sitotoksik MTT Assay



Gambar 5 Grafik % Sel Hidup T47D Setelah diberi Perlakuan Kombinasi ET dan EKJ

Hasil uji sitotoksik kombinasi ET dan EKJ pada konsentrasi terendah yaitu 100 µg/ml dapat membunuh 95,692% sel T47D (100 - 4,308%), sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 1000 µg/ml dapat membunuh 97,99% sel kanker T47D (100 - 2,009%). Nilai IC₅₀ yang didapat dari kombinasi ET dan EKJ sebesar 1888,69 µg/ml dengan persamaan $y = -0.0024x + 4.6713$ dan $r^2 = 0.9233$. Sedangkan IC₅₀ agen kemoterapi doxorubicin sebesar 15nM (Junedi *et al.*, 2010).

Pemberian perlakuan menunjukkan bahwa kombinasi ET dan EKJ terhadap sel kanker payudara T47D memiliki potensi dalam menghambat viabilitas sel kanker dengan IC₅₀ sebesar 1888,69 µg/ml.



Gambar 6. Mekanisme Siklus Sel (Campbell *et al.*, 1999)

Mekanisme siklus sel yaitu dimulai dengan masuknya sel dari fase G_0 menuju fase G_1 akibat stimulus *growth factor*, kemudian menyebabkan hiperfosforilasi protein retinoblastoma (pRb) dan DNA menjadi longgar lalu masuk ke *restriction point* lalu fase S untuk melakukan replikasi DNA. Bila terjadi kerusakan saat sintesis dapat diperbaiki terlebih dahulu sebelum akhirnya masuk ke fase M. *Restriction point* adalah titik dimana terjadi hiperfosforilasi yang menyebabkan inhibitor p27, suatu gen pengepresi p53 (gen apoptosis) terdegradasi. Pada titik ini terjadi perbaikan DNA yang rusak, bila kerusakan DNA sudah parah dan tidak bisa diperbaiki, maka akan segera dieliminasi ke fase G_0 (Vermeulen *et al.*, 2003).

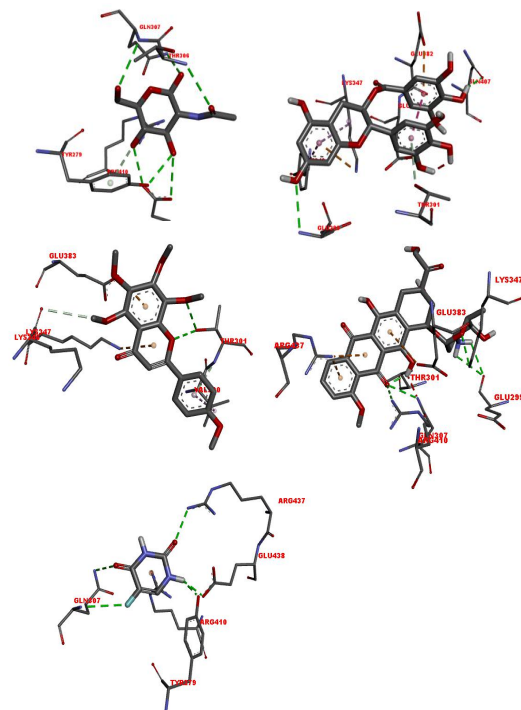
Pada sel kanker gen p53 inilah yang terjadi mutasi. Mekanisme flavonoid tangeretin sebagai agen kemopreventif dengan menginduksi *cell*

cycle G₁ arrest saat sel berada pada *restriction point* (Morley, 2007).

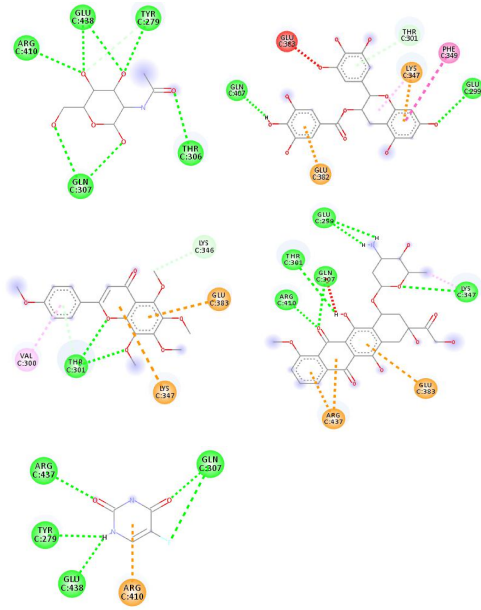
4. MOLECULAR DOCKING

Tabel 2. Hasil *Molecular Docking* Antara Ligan dan Reseptor HER2

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



Gambar 7. Struktur 3D Hasil Optimasi Geometri



Gambar 8. Interaksi 2 Dimensi Senyawa Uji pada target HER2 dalam *pocket atom*

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

Senyawa uji yang digunakan sebagai ligan antara lain *native ligand*, EGCG (*epigallocatechin gallate*), tangeretin, agen kemoterapi yaitu

doxorubicin dan 5-fluorouracil. Kemudian ligan-ligan tersebut ditambatkan dengan suatu protein target. Protein target yang digunakan sebagai senyawa target adalah HER2 yang memiliki peran dalam pertumbuhan pada sel payudara yaitu dengan mekanisme diferensiasi dan proliferasi (Kumar,2005).

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

Melalui hasil *score docking*, dipilih konformasi terbaik tiap senyawa uji dengan melihat nilai *score docking* terendah. Nilai *score docking* berhubungan dengan jumlah energi yang dibutuhkan suatu ligan untuk mengikat

suatu senyawa target. Semakin rendah *score docking*, semakin sedikit energi yang dibutuhkan, semakin stabil pula ikatan yang dihasilkan. Senyawa ligan berinteraksi dengan protein target melalui suatu ikatan, dapat berupa ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik (Kartasasmita *et. al*, 2009)

Analisis dilakukan dengan cara membandingkan nilai *score docking* ligan uji dengan *native ligand*. Parameter *scoring* dipengaruhi oleh kekuatan ikatan, jenis ikatan, dan kesesuaian pose dengan *native ligand*. Data hasil *molekular docking* dapat dilihat pada tabel 8.

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

kemoterapi 5-fluorouracil justru memiliki nilai *score docking* yang lebih tinggi dibanding *native ligand* (Tabel 8).

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

Sementara ikatan senyawa flavonoid tangeretin dengan protein HER2 dengan ligan aslinya memiliki stabilitas energi dalam aktivitas inhibisi yang hampir sama. Flavonoid tangeretin menghambat protein HER2 dengan mekanisme induksi proliferasi siklus sel fase G₁ (Morley, 2007).

5. TABLET *EFFERVESCENT*

Tabel 3. Formulasi Tablet *Effervescent*

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

Tabel 4. Evaluasi Tablet *Effervescent*

No	Nama Uji	Nilai
1	Penampilan fisik	
	Bentuk	Tabung
	Diameter	1 cm
	Ketebalan	0,5 cm
	Warna	Coklat
	Permukaan	Tidak homogen
2	Kekerasan	0.24 kgf
3	Uji pH	5.52
4	Uji waktu larut	3.15 menit

Penggunaan kombinasi asam sitrat dan asam tartat sebagai bahan asam dan natrium bikarbonat sebagai bahan basa. Talk bertujuan sebagai pelicin (lubrikan) agar tidak melekat pada *punch*. Mg stearat digunakan untuk bahan penghancur. Untuk pemanis menggunakan sakarin karena rasanya manis dan harganya yang relatif murah (Negara, 2011).

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

Kemudian dilakukan uji pH larutan yaitu sebesar 5.52, tidak memenuhi standar yaitu antara 6-7 (Kailaku & Sumangat, 2012) dan uji kekerasan hanya sebesar 0,24 kgf tidak sesuai standar yang seharusnya antara 8-12 kgf. Sehingga tablet yang dihasilkan empuk dan sangat mudah hancur (Chabib, 2015). Hal tersebut disebabkan bisa karena kurangnya bahan pengikat yang digunakan, sehingga

solusi untuk memperbaikinya perlu diberi tambahan zat pengikat ke dalam proses pembuatan granul asam dan granul basa sebelum dioven.

Hal yang membedakan antara tablet konvensional dan tablet *effervescent* adalah dalam hal uji waktu larut. Tablet dilarutkan ke dalam pelarut hingga melarut sepenuhnya. Tablet *effervescent* yang bagus sebaiknya larut < 5 menit. Tablet yang diformulasikan memiliki waktu larut 3.15 menit, sehingga sesuai persyaratan.

KESIMPULAN

Kombinasi etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Citrus reticulata* terbukti mengandung kandungan senyawa flavonoid melalui uji KLT, memiliki aktifitas sebagai antioksidan kuat dengan IC_{50} 83,00 $\mu\text{g/ml}$, memiliki potensi sebagai antikanker dengan IC_{50} 1888,69 $\mu\text{g/ml}$.

Terdapat ikatan antara senyawa tangeretine dan EGCG dengan reseptor

HER2 dengan nilai *score docking* -6,6 dan -5,0.

Sediaan tablet *effervescent* kombinasi etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Citrus reticulata* belum dapat diaplikasikan karena pengaruh suhu dan kelembaban yang kurang memadai.

SARAN

1. Perlu dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui efek sebagai antikanker seperti uji immunositokimia, uji kombinasi, dan uji apoptosis.
2. Untuk uji sitotoksik dapat dilakukan pengulangan uji dengan seri konsentrasi yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2012. Breast Cancer Treatment, <http://cancer.gov>, diakses pada tanggal 10 Maret 2018.
- Aziz, N.M., Oeffinger, K.C., Brooks, S., Turoff, A.J., 2006. Comprehensive long-term follow-up programs for pediatric cancer survivors. *Cancer* 107,841–848.doi:10.1002/cncr.220

- Campbell, 1999. *On the in vivo function of the RecA ATPase1*. doi.org/10.1006/jmbi.1998.2457
- Chang, LC, dan Kinghorn, AD, 2001. *Flavonoid as Chemopreventive Agent, Bioactive Compound from Natural Sources, Isolation, Characterization and Biological Properties*, Taylor & Friends, New York.
- Junedi S., Susidarti R. A., Hermawan A., Fitriyani A., Meiyanto E., 2011. The improvement of doxorubicin activity on breast cancer cell lines by tangeretin through cell cycle modulation. *Orient Pharm Exp Med*
- Kartasasmita *et. al*, 2009. *Docking Turunan Kuersetin Berdasarkan Studi Interaksi Flavonoid Terhadap Enzim Siklooksigenase-2*. Bandung Institute of Technology, Bandung
- Lee, R., 2000. *Effervescent Tablets*. [http://www.amerilabtech.com/Effervescent Tablets & Keyfacts.pdf](http://www.amerilabtech.com/Effervescent%20Tablets%20&%20Keyfacts.pdf)
- Mardawati, 2008. Kajian Aktivitas Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya, Bandung, *Laporan*, Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjajaran.
- Negara, 2011. Penggunaan Sakarin Dan Siklamat Pada Minuman Yang Dijajakan Pedagang di Sekolah Dasar Wilayah Puskesmas Driyorejo Gresik. *Thesis*. Universitas Airlangga. Surabaya
- Purnomo, Hari. 2011. *Kimia Komputasi Molecular Docking PLANT*. Yogyakarta; Pustaka Pelajar