

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi pada suatu tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas dari tanaman tersebut. Fungsi dari determinasi sendiri adalah untuk menghindari adanya kesalahan sampel yang digunakan dalam penelitian. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata L.*. Surat keterangan hasil identifikasi daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata L.* dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Penyiapan Sampel

Daun *Camellia sinensis* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari daerah Wonosobo, Jawa Tengah dalam bentuk daun kering, sedangkan daun *Annona muricata L.* didapatkan dari petani di Kabupaten Bantul dalam keadaan masih segar. Dari pengeringan 10 Kg daun *Annona muricata L.* didapatkan hasil daun kering dengan berat 2,5 Kg.

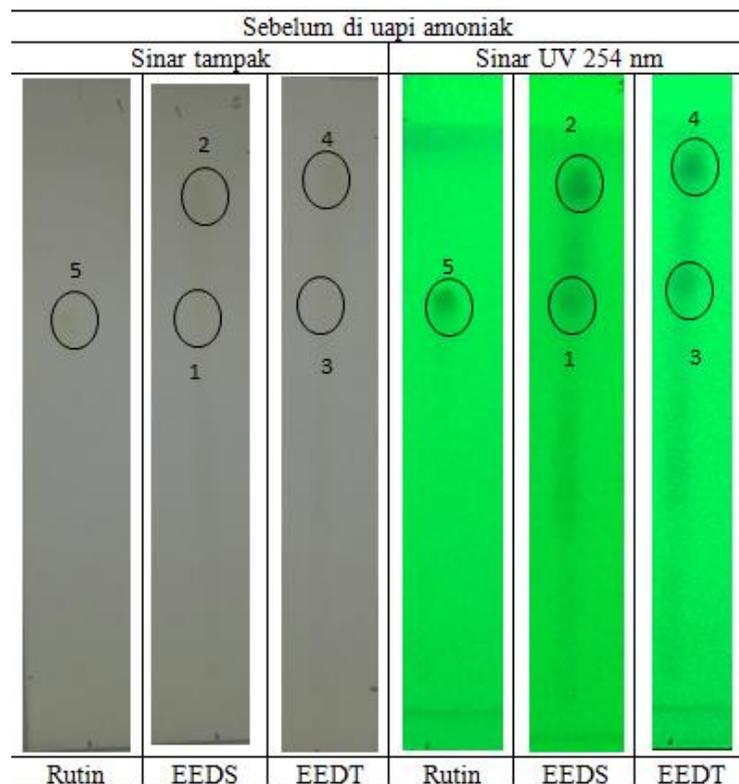
3. Ekstraksi

Hasil serbuk kering didapatkan dengan berat 500 mg, serbuk diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi, perendaman dengan perbandingan antara serbuk dan pelarut yaitu 1:6 selama 4 hari, kemudian dilakukan remaserasi dengan pelarut dan

perbandingan yang sama selama 2 hari. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode maserasi, metode ini dipilih karena senyawa yang ada di dalam simplisia daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata L.* dapat rusak pada suhu tinggi. Hasil dari maserasi kemudian diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu maksimal 60⁰ C hingga diperoleh ekstrak kental daun *Camellia sinensis* dengan berat 27,3 gram dan daun *Annona muricata L.* seberat 28,7 gram.

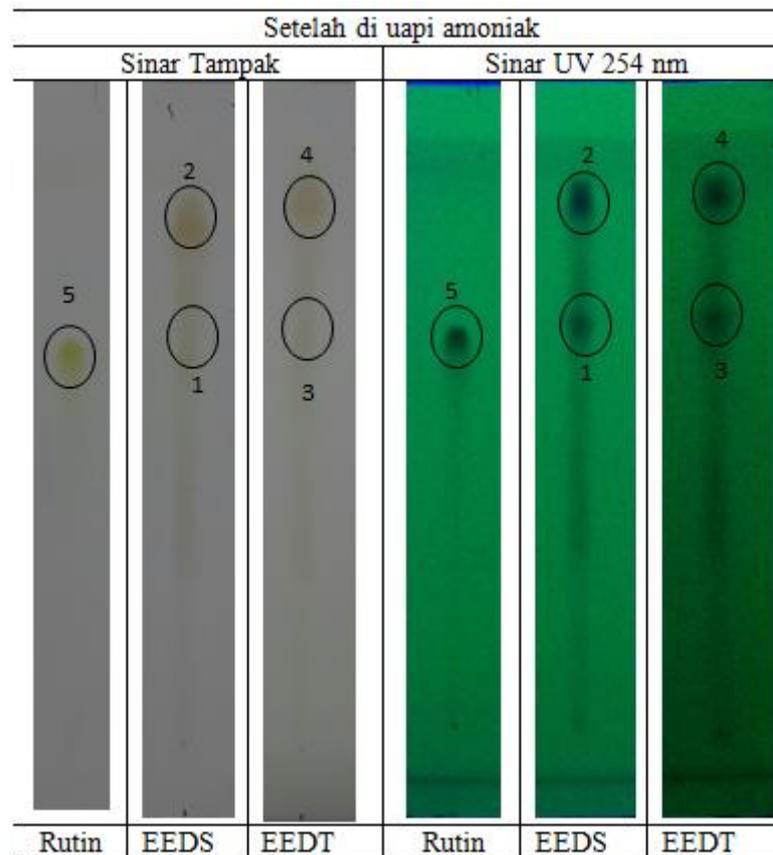
4. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa yang ada di dalam ekstrak daun teh dan daun sirsak. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah *n*-butanol, asam asetat dan air (BAW). Sebelumnya telah dilakukan beberapa percobaan menggunakan fase gerak yang sama tetapi dengan perbandingan yang berbeda-beda yaitu 4:1:5, 5:3:2 dan 7:2:1 untuk mendapatkan pemisahan yang optimal. Dari percobaan tersebut fase gerak BAW dengan perbandingan 7:2:1 menunjukkan hasil pemisahan yang paling baik dibandingkan dengan perbandingan yang lain. Profil kromatografi rutin, EEDT dan EEDS setelah dilakukan elusidasi dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 1. Plat KLT sebelum diuapi dengan amoniak

Untuk mendeteksi adanya kandungan flavonoid dilakukan pengujian warna. Metode yang dilakukan adalah penguapan dengan senyawa amoniak, plat kromatogram rutin, EEDT dan EEDS uapi dengan amoniak selama beberapa saat hingga terjadi perubahan warna pada bercak yang muncul. Profil kromatografi dari EEDT dan EEDS dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 2. Plat KLT setelah diuapi dengan amoniak

Deteksi menggunakan sinar tampak dan sinar UV 254 nm menghasilkan 2 bercak pada kromatogram EEDT dan 2 bercak pada kromatogram EEDS yang juga dibandingkan dengan standar rutin yang sama. Nilai Rf dari masing-masing bercak dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 1. Rf Plat KLT Ekstrak Etanol daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata L.*

| Nomor Bercak | Rf | Warna Noda Sebelum Diuapi | | Warna Noda Sesudah Diuapi | |
|--------------|------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------------------|
| | | Tampak | UV 254 nm | Tampak | UV 254 nm |
| 1 | 0,66 | Tidak berwarna | Peredaman | Kuning | Peredaman lebih gelap |
| 2 | 0,89 | Tidak berwarna | Peredaman | Kuning Lembayung | Peredaman lebih gelap |
| 3 | 0,68 | Tidak berwarna | Peredaman | Kuning | Peredaman lebih gelap |
| 4 | 0,91 | Tidak berwarna | Peredaman | Kuning Lembayung | Peredaman lebih gelap |
| 5 | 0,66 | Tidak berwarna | Peredaman | Kuning | Peredaman lebih gelap |

EEDT dan EEDS mengandung flavonoid pada kedua bercak dibuktikan dengan perubahan warna kuning setelah di uapi amoniak dan warna biru (peredaman) pada UV 254 nm.

5. Uji Antioksidan Dengan DPPH

Uji antioksidan ini dilakukan dengan mereaksikan kombinasi EEDT dan EEDS dengan senyawa radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) yang berwarna ungu. Selain itu dilakukan uji terhadap Vitamin C p.a sebagai pembanding. Uji antioksidan ini dilakukan dengan metode spektrofotometri pada beberapa seri kadar. Telah dilakukan beberapa kali percobaan untuk mendapatkan seri kadar dengan hasil terbaik pada sampel kombinasi EEDT dan EEDS serta vitamin C. Dari hasil percobaann tersebut didapatkan seri kadar untuk Vitamin C yaitu 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, dan 30 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan seri kadar untuk sampel adalah 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing sampel dilakukan replikasi

sebanyak 3 kali. Pembacaan serapan dilakukan pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH, dari hasil *screening* panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometer, hasil panjang gelombang maksimum yang didapat adalah 514 nm. Data rata-rata absorbansi reaksi antara DPPH dengan Vitamin C dan DPPH dengan kombinasi EEDT dan EEDS dapat dilihat pada tabel 6 dan tabel 7.

Tabel 2. Rata-rata Absorbansi Vitamin C

| No | Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Rata-Rata Absorbansi | Standar Deviasi |
|----|-------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 0,5 | 0,641 | 0,026 |
| 2 | 1 | 0,638 | 0,006 |
| 3 | 2 | 0,625 | 0,034 |
| 4 | 5 | 0,557 | 0,013 |
| 5 | 10 | 0,402 | 0,021 |
| 6 | 20 | 0,189 | 0,063 |
| 7 | 30 | 0,055 | 0,014 |

Tabel 3. Rata-rata absorbansi Sampel kombinasi EEDT dan EEDS

| No | Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Rata-Rata Absorbansi | Standar Deviasi |
|----|-------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 5 | 0,661 | 0,016 |
| 2 | 7,5 | 0,598 | 0,022 |
| 3 | 10 | 0,532 | 0,003 |
| 4 | 15 | 0,488 | 0,017 |
| 5 | 20 | 0,476 | 0,061 |
| 6 | 30 | 0,298 | 0,018 |
| 7 | 40 | 0,186 | 0,022 |

Dari rata-rata absorbansi tersebut dapat digunakan untuk menghitung Persen Inhibisi (%IC). Persen inhibisi didapatkan dengan cara absorbansi kontrol negatif dikurangi dengan absorbansi kontrol positif kemudian hasilnya dibagi dengan absorbansi kontrol negatif. Untuk mendapatkan absorbansi kontrol negatif dilakukan pembacaan absorbansi

larutan DPPH, dari hasil percobaan didapatkan rata-rata absorbansi DPPH sebesar 0,7023. Data hasil perhitungan persen inhibisi Vitamin C dapat dilihat pada tabel 8.

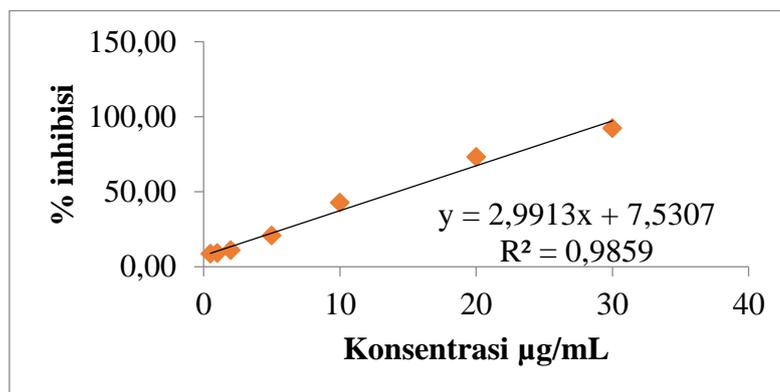
Tabel 4. Data Persen Inhibisi Vitamin C

| Konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ | Absorbansi | Absorbansi Blanko | Persen Inhibisi (%) |
|---------------------------------|------------|----------------------|------------------------|
| 0,5 | 0,641 | 0,7023 | 8,73 |
| 1 | 0,638 | 0,7023 | 9,11 |
| 2 | 0,625 | 0,7023 | 11,01 |
| 5 | 0,557 | 0,7023 | 20,76 |
| 10 | 0,402 | 0,7023 | 42,76 |
| 20 | 0,189 | 0,7023 | 73,04 |
| 30 | 0,055 | 0,7023 | 92,22 |

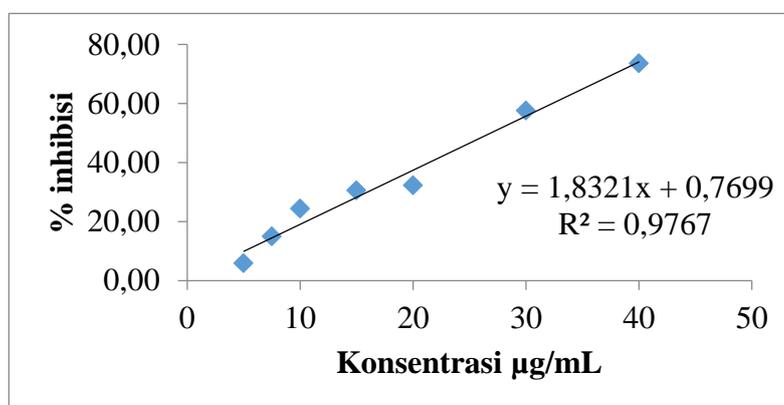
Tabel 5. Data Persen Inhibisi Kombinasi EEDT dan EEDS

| Konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ | Absorbansi | Absorbansi Blanko | Persen Inhibisi (%) |
|---------------------------------|------------|----------------------|------------------------|
| 5 | 0,661 | 0,7023 | 5,88 |
| 7,5 | 0,598 | 0,7023 | 14,90 |
| 10 | 0,532 | 0,7023 | 24,30 |
| 15 | 0,488 | 0,7023 | 30,56 |
| 20 | 0,476 | 0,7023 | 32,27 |
| 30 | 0,298 | 0,7023 | 57,53 |
| 40 | 0,186 | 0,7023 | 73,54 |

Untuk mengetahui efek antioksidan dari kombinasi EEDT dan EEDS serta Vitamin C, dilakukan perhitungan nilai IC_{50} yang didapatkan dengan membuat hubungan antara persen inhibisi dengan konsentrasi kemudian dibuat regresi linear. Grafik regresi linear hubungan antara konsentrasi dengan persen inhibisi kombinasi EEDT dan EEDS beserta Vitamin C dapat dilihat pada gambar 9 dan gambar 10.



Gambar 3. Grafik Regresi Linear Vitamin C



Gambar 4. Grafik Regresi Linier Kombinasi EEDT dan EEDS

Setelah didapatkan persamaan regresi linear, dapat dilakukan perhitungan IC_{50} . Nilai ini didapatkan dengan mengubah nilai y menjadi 50. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 6. Nilai IC_{50}

| Senyawa Uji | Persamaan regresi linear | Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Keterangan (Mardawati <i>et al.</i> , 2008) |
|-------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Vitamin C | $y = 2,9913x + 7,5307$ $R^2 = 0,9859$ | 14,20 | Sangat Kuat |
| Kombinasi EEDT dan EEDS | $y = 1,8321x + 0,7699$ $R^2 = 0,9767$ | 26,90 | Sangat Kuat |

6. *Molecular Docking*

Pengujian *molecular docking* bertujuan untuk mengetahui interaksi suatu molekul ligan dengan protein targetnya sebelum dilakukan uji *in-vitro*. Uji ini dilakukan menggunakan aplikasi *Autodock Vina* serta beberapa aplikasi pendukung seperti *Open Babel* yang digunakan untuk mengkonversikan tipe file seperti *pdb* ke *pdbqt* sehingga dapat di visualisasi menggunakan aplikasi lain dan *DS Visualizer* yang digunakan untuk melihat bentuk struktur dan interaksi yang terjadi antara ligan dengan protein secara molekuler. Protein yang diuji dalam penelitian ini adalah reseptor HER2 dan ER- α , hasil dari uji *molecular docking* kedua molekul tersebut berupa *docking score* yang berarti nilai energi bebas yang dibutuhkan oleh ligan untuk berinteraksi dengan protein target. Semakin kecil atau semakin negatif *docking score* maka energi yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan protein target semakin kecil, yang berarti semakin mudah untuk berinteraksi.

Nilai RMSD dan *docking score* antara senyawa uji dengan reseptor HER2 yang memiliki nilai terbaik dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 7. Hasil Pengujian Molecular Docking pada protein HER2

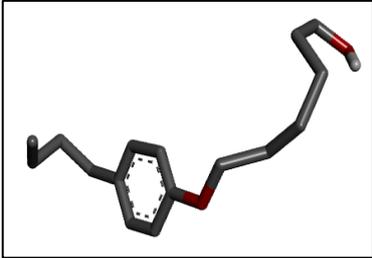
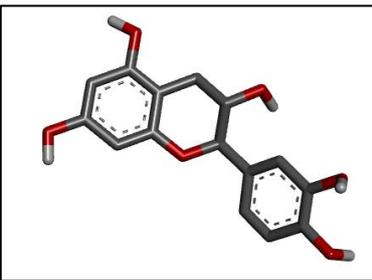
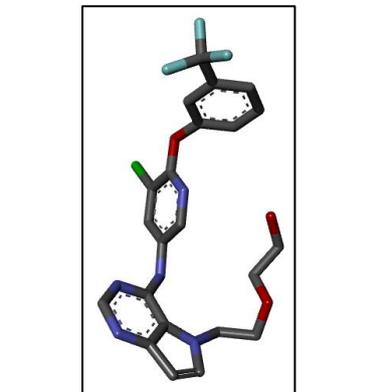
| No | Senyawa Uji | Konformasi | Nilai RMSD | <i>Docking Score</i> (Kcal/mol) |
|----|------------------------|------------|------------|------------------------------------|
| 1 | Acetogenin | 4 | 1.621 | - 6.3 |
| 2 | Katekin | 6 | 1.857 | - 6.7 |
| 3 | Native Ligand (03Q) | 2 | 1.536 | - 7.0 |
| 4 | Doxorubicin | 2 | 1.619 | -7.0 |
| 5 | 5-FU | 3 | 1.620 | -5.6 |

Setiap pengujian antara ligand dengan protein akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda-beda, RMSD yang baik adalah yang memiliki nilai $< 2\text{\AA}$, sehingga hasil yang diambil adalah konformasi yang memiliki nilai RMSD dibawah 2\AA . Senyawa *Acetogenin* dipilih konformasi yang ke-4 dengan nilai RMSD 1.621\AA dan *docking score* -6.3 kcal/mol . Sedangkan untuk senyawa katekin dipilih konformasi ke-6 dengan nilai RMSD 1.857\AA dan *docking score* -6.7 kcal/mol . *Native ligand* (ligan spesifik) dari reseptor HER 2 hanya ada satu yaitu 03Q yang memiliki nilai RMSD 1.536\AA dan *docking score* $-7,0\text{ kcal/mol}$ lebih rendah dibandingkan dengan senyawa *acetogenin* dan katekin. Senyawa obat doxorubicin dan 5-FU memiliki *docking score* sebesar -7.0 kcal/mol dan -5.6 kcal/mol , doxorubicin memiliki *docking score* lebih rendah dibandingkan senyawa *acetogenin* dan katekin, sedangkan 5-FU nilainya lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa katekin, *acetogenin* dan *native ligand*-nya. Senyawa *acetogenin* dan katekin memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan dengan 5-FU tetapi lebih tidak stabil jika dibandingkan dengan doxorubicin dan ligand asli pada reseptor HER2.

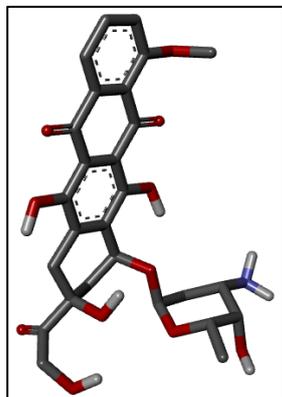
Senyawa uji yang sudah diolah menggunakan *Autodock Vina* dapat diamati secara visual interaksinya menggunakan aplikasi DS Visualizer. Senyawa yang ditambatkan pada reseptor HER2 akan mengikat atau berinteraksi dengan beberapa residu asam aminonya dan akan terjadi ikatan antara protein dengan senyawa uji.

Tabel 8. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji Protein HER2

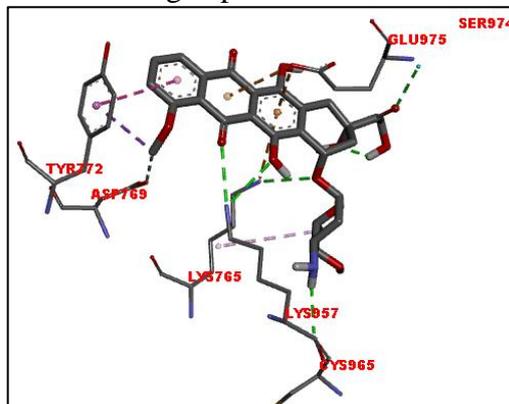
| No | Senyawa Uji | Protein Ikatan Asam Amino |
|----|-------------|---------------------------|
|----|-------------|---------------------------|

| | | |
|---|--|---|
| 1 | <p data-bbox="512 353 663 387">Acetogenin</p>  | <p data-bbox="815 315 1359 387">Asam Glutamat (GLU 975), Lysin (LYS 957).</p> <p data-bbox="855 389 1319 459">Visualisasi ikatan antara acetogenin dengan protein HER 2</p> |
| 2 | <p data-bbox="536 853 639 887">Katekin</p>  | <p data-bbox="815 757 1359 862">Lysin (LYS 957), Tirosin (TYR 772), Arginin (ARG 840), Valin (VAL 839), Asam Aspartat (ASP 950).</p> <p data-bbox="815 864 1359 936">Visualisasi ikatan antara catechin dengan protein HER 2</p> |
| 3 | <p data-bbox="451 1357 724 1391">Native Ligand (03Q)</p>  | <p data-bbox="815 1245 1359 1424">Asam Glutamat (GLU 964, 971 & 975), Leusin (LEU 972), Lysin (LYS 765 & 957), Asam Aspartat (ASP 769 & 871), Isoleusin (ILE 954), Sistein (CYS 965), Prolin (PRO 761 & 967).</p> <p data-bbox="815 1426 1359 1496">Visualisasi ikatan antara 03Q dengan protein HER 2.</p> |
| 4 |  | <p data-bbox="815 1899 1359 2004">Serin (SER 974), Asam Glutamat (GLU 975), Tirosin (TYR 772), Asam Aspartat (ASP 769), Lysin (LYS 765, 957 & 965)</p> |

Doxorubicin



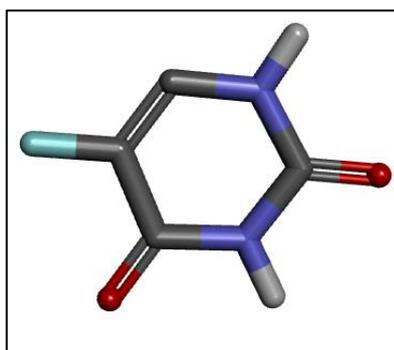
Visualisasi ikatan antara doxorubicin dengan protein HER 2



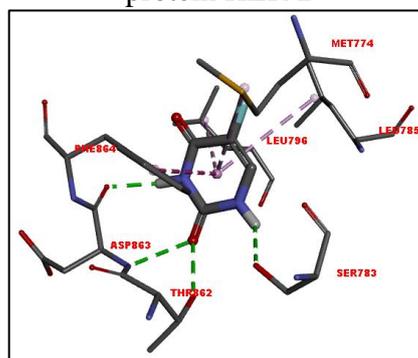
Metionin (MET 774), Leusin (LEU 785 & 796), Serin (SER 783), Asam Aspartam (ASP 863), Fenilalanin (PHE 864), Treonin (THR 862).

5-FU

5

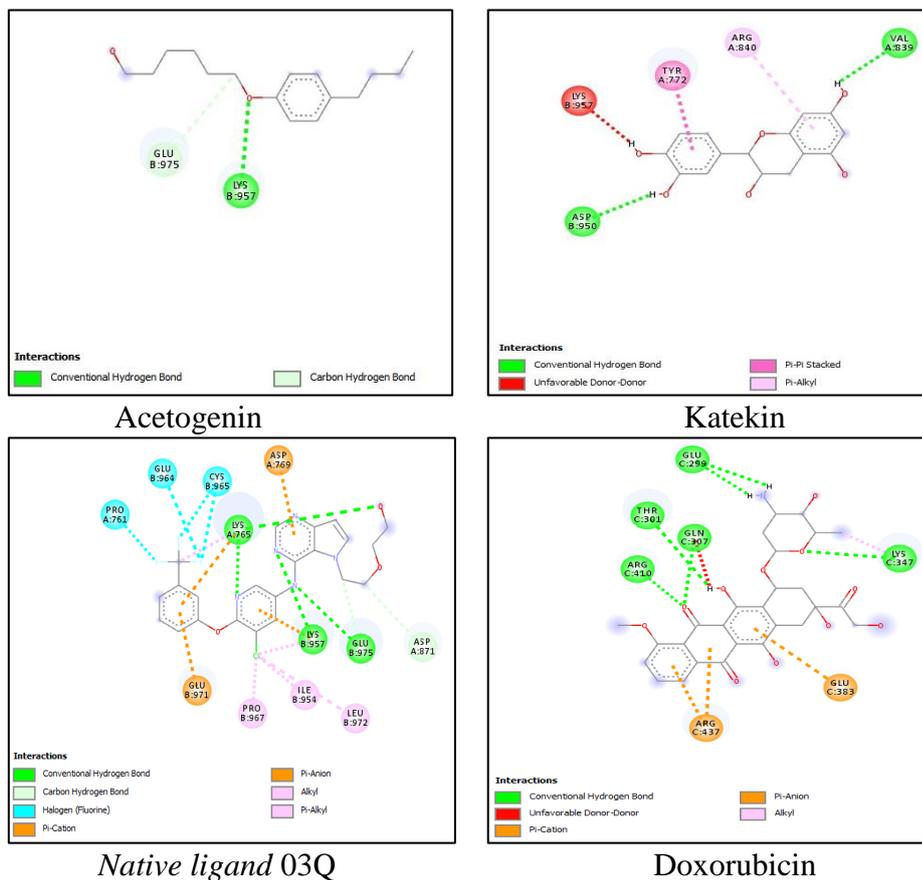


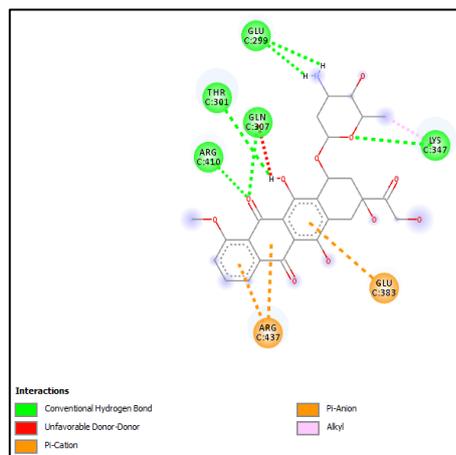
Visualisasi ikatan antara 5-FU dengan protein HER 2



Masing-masing senyawa mengikat residu asam amino dengan jumlah yang berbeda-beda, untuk senyawa acetogenin hanya mengikat 2 dan katekin mengikat 5 asam amino. *Native ligand* 03Q mengikat residu paling banyak sejumlah 12 asam amino, sedangkan untuk doxorubicin dan 5-FU masing-masing mengikat 7 asam amino. Senyawa uji berikatan dengan reseptor HER2 pada posisi *binding site* tertentu sehingga berpotensi berikatan dengan asam amino yang ada pada sekitar *binding site*-nya. Berdasarkan visualisasi pada tabel 12, dapat diamati bahwa

senyawa *acetogenin* memiliki *binding site* yang sama dengan ligand asli 03Q dan doxorubicin, hal ini ditunjukkan dengan kesamaan jenis asam amino yang berikatan pada *acetogenin*, ligand asli 03Q dan doxorubicin. Sedangkan untuk senyawa katekin hanya memiliki kemiripan *binding site* dengan doxorubicin yang ditandai dengan asam amino LYS 957 dan TYR 772. Terdapat ikatan molekuler yang terjadi antara senyawa uji dengan residu asam amino pada reseptor HER2 yang dapat diamati pada gambar 11.





5-FU

Gambar 5. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein HER2

Jenis ikatan yang terbentuk dari interaksi antara asam amino dengan senyawa uji pada protein HER2 yaitu ikatan hidrogen dan ikatan kovalen seperti ditunjukkan pada gambar 11.

Sedangkan untuk reseptor ER- α nilai RMSD dan *docking score* yang memiliki nilai terbaik dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 9. Hasil Pengujian Molecular Docking pada reseptor ER- α

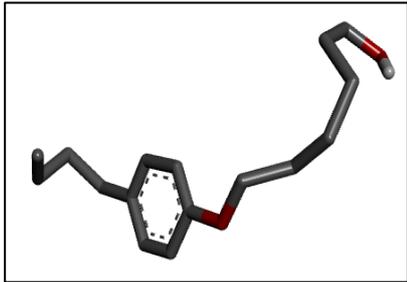
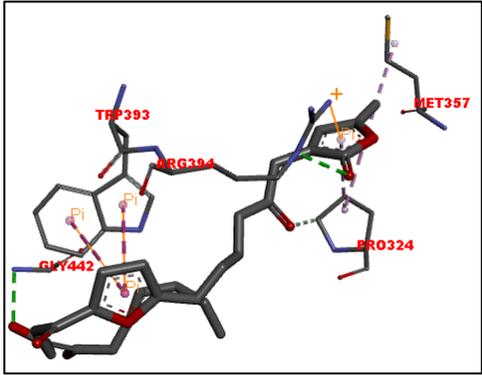
| No | Senyawa Uji | Konformasi | Nilai RMSD | <i>Docking Score</i> (Kcal/mol) |
|----|-------------------------|------------|------------|------------------------------------|
| 1 | Acetogenin | 2 | 1.623 | - 6.5 |
| 2 | Katekin | 5 | 1.350 | - 7.6 |
| 3 | Native Ligand (6BOF) | 5 | 1.436 | - 7.8 |
| 4 | Doxorubicin | 4 | 1.412 | - 6.0 |
| 5 | 5-FU | 2 | 1.791 | - 5.5 |

Senyawa *acetogenin* dipilih konformasi yang ke-2 dengan nilai RMSD 1.623 Å dan *docking score* -6.5 kcal/mol. Sedangkan untuk senyawa katekin dipilih konformasi ke-5 dengan nilai RMSD 1.350 Å dan *docking score* -7.6 kcal/mol. *Native ligand* 6BOF memiliki nilai RMSD

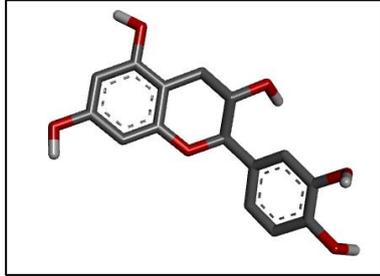
1.436 Å dan *docking score* terkecil yaitu -7,8 kcal/. Senyawa obat doxorubicin dan 5-FU memiliki *docking score* berturut-turut sebesar -6.0 kcal/mol dan -5.5 kcal/mol, senyawa doxorubicin dan 5-FU memiliki *docking score* yang lebih positif dibandingkan senyawa *acetogenin*, katekin, dan native ligand-nya. Senyawa *acetogenin* dan katekin memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan dengan doxorubicin dan 5-FU pada reseptor ER- α .

Reseptor ER- α akan berikatan dengan beberapa residu asam amino yang berinteraksi dengan ligand, hasil visulisasi dapat dilihat pada tabel 14.

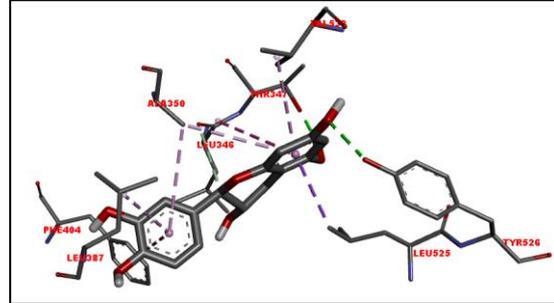
Tabel 10. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dengan Reseptor ER- α .

| No | Senyawa Uji | Protein Ikatan Asam Amino |
|----|-------------|---|
| | | Triptofan (TRP 393), Arginin (ARG 394), Metionin (MET 357), Prolin (PRO 324), Glisin (GLY 442) |
| 1 | Acetogenin | <p>Visualisasi ikatan antara acetogenin dengan Reseptor ER-α</p>   |
| 2 | | Alanin (ALA 350), Treonin (THR 347), Fenilalanin (PHE 404), Valin (VAL 533), Leusin (LEU 525, 346, 387), Tiroksin (TYR |

Katekin



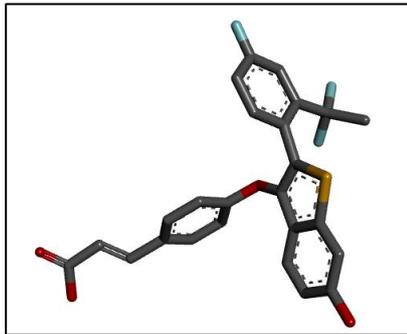
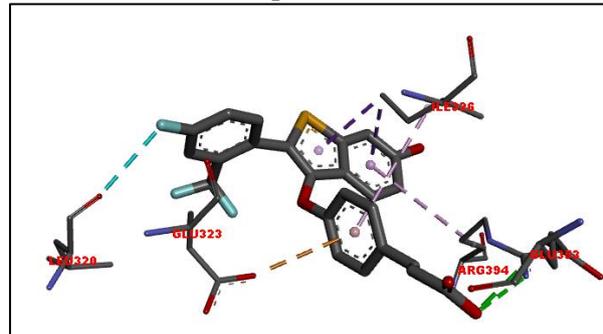
526).

Visualisasi ikatan antara catechin dengan Reseptor ER- α 

Asam Glutamat (GLU 323, 353), Leusin (LEU 320), Isoleusin (ILE 326), Arginin (ARG 394).

Native Ligand (6B0F)

3

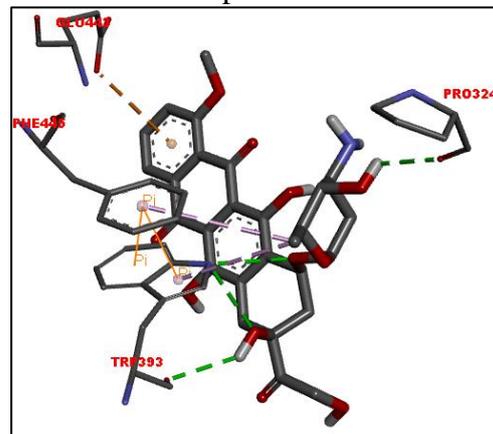
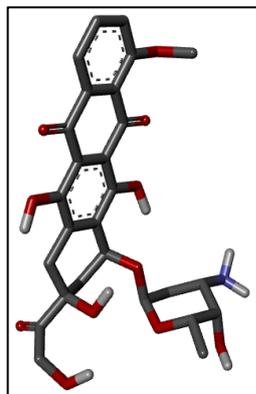
Visualisasi ikatan antara 6B0F dengan Reseptor ER- α .

Asam Glutamat (GLU 443), Prolin (PRO 324), Fenilalanin (PHE 445), Triptofan (TRP 393).

Visualisasi ikatan antara doxorubicin dengan Reseptor ER- α

Doxorubicin

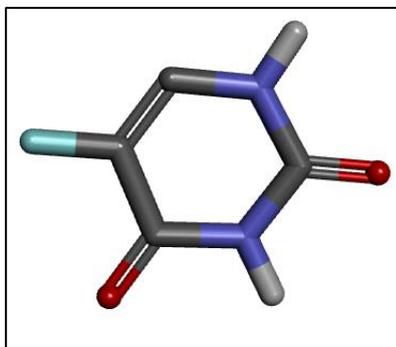
4



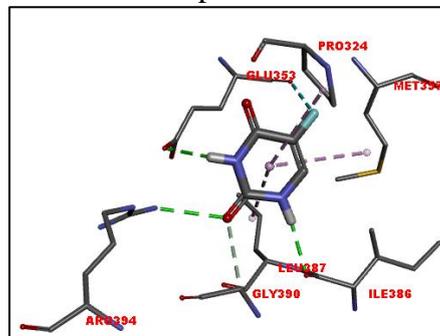
Leusin (LEU 387), Asam Glutamat (GLU 353), Prolin (PRO 324), Glisin (GLY 390), Arginin (ARG 394), Metionin (MET 357),

5

5-FU

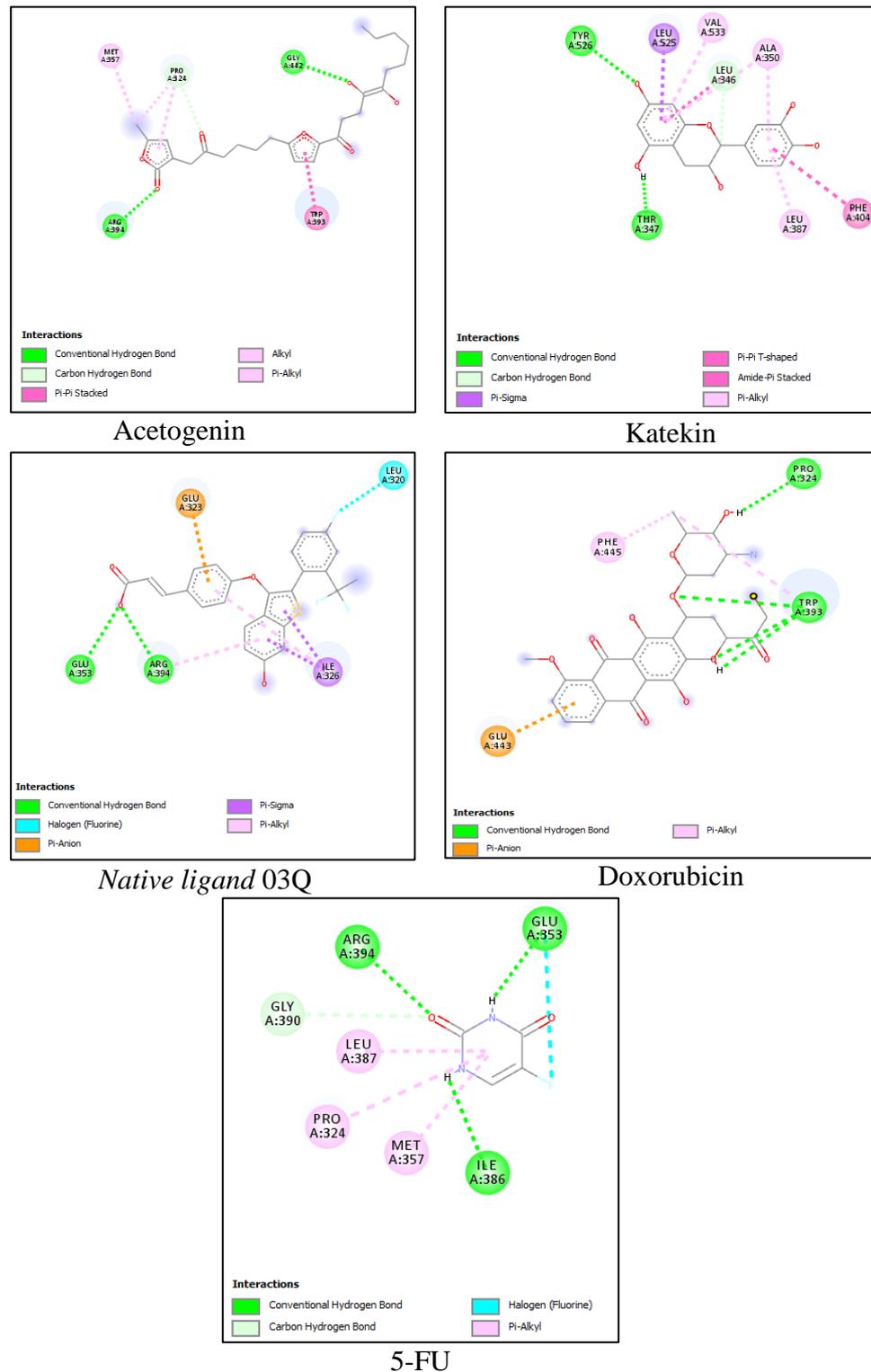


Isoleusin (ILE 386).

Visualisasi ikatan antara 5-FU dengan Reseptor ER- α 

Masing-masing senyawa yang berinteraksi dengan reseptor ER- α

mengikat residu asam amino dengan jumlah yang berbeda-beda, untuk senyawa *acetogenin* mengikat 5 asam amino dan katekin mengikat residu terbanyak yaitu 9 asam amino. *Native ligand* 6B0F mengikat residu sebanyak 5 asam amino, sedangkan untuk doxorubicin dan 5-FU masing-masing mengikat 4 dan 7 asam amino. Senyawa *acetogenin* dan katekin memiliki *binding site* yang hampir mirip dengan *binding site* doxorubicin dan 5-FU, hal ini ditunjukkan dengan kemiripan asam amino yang terikat pada senyawa tersebut. Terdapat ikatan yang terjadi antara senyawa uji dengan residu asam amino pada reseptor ER- α yang dapat diamati pada gambar 12.



Gambar 6. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein ER- α

Sebagian besar jenis ikatan yang terbentuk dari interaksi antara asam amino dengan senyawa uji dan pembandingnya pada reseptor ER- α

yaitu ikatan hidrogen dan beberapa ikatan kovalen seperti ditunjukkan pada gambar 12.

7. Sediaan Granul *Effervescent*

Granul *effervescent* kombinasi ekstrak daun teh dan daun sirsak dibuat menggunakan metode granulasi basah, proses granulasi dilakukan secara terpisah antara komponen asam dan komponen basa. Formula granul *effervescent* terdiri dari beberapa komponen yaitu zat aktif, komponen asam, komponen basa, bahan pengisi, pemanis, pengawet dan pengikat. Zat aktif yang digunakan adalah ekstrak kering daun sirsak dan daun teh dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari pemanasan ekstrak kental. Asam sitrat dan asam tartrat dikombinasikan sebagai komponen asam dengan perbandingan yang berbeda pada setiap formula. Komponen basa yang umum digunakan adalah natrium bikarbonat, selain itu digunakan polivinil pirolidone (PVP) sebagai pengikat. Bahan tambahan seperti pemanis dan pengawet yang digunakan adalah sakarin dan natrium benzoat. Hasil pengamatan dari keempat formula memiliki kekurangan pada citarasa dan warna granul yang dihasilkan. Ke-empat formula memiliki rasa yang kurang manis, hanya saja ketika diminum terasa segar dan tidak pahit ataupun sepat. Aroma yang dihasilkan cukup baik karena tidak berbau ekstrak. Sedangkan untuk warna granul tidak seragam karena ekstrak kering yang berwarna hijau kecoklatan dicampurkan hanya pada komponen basa sehingga granul komponen basa berwarna kecoklatan

sedangkan komponen asam berwarna putih. Pemeriksaan organoleptis granul dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 7. Uji Organoleptis Granul *Effervescent*

Uji sifat fisik granul *effervescent* dilakukan untuk mengetahui bahwa granul yang dihasilkan memiliki sifat yang baik. Uji yang dilakukan antara lain uji kadar air, uji waktu melarut granul dan pengukuran pH larutan *effervescent*. Hasil evaluasi tersebut dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 11. Hasil Evaluasi Granul *Effervescent*

| No | Keterangan | Formula | | | | Standar |
|----|-----------------------|---------|------|------|------|------------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | Kadar Air (%) | 1,34 | 1,73 | 1,53 | 1,07 | 0,4-0,7% (Fuesset et al., 2000) |
| 2 | pH | 5,98 | 5,81 | 5,80 | 6,18 | 6-7 (Kailaku, 2012) |
| 3 | Waktu Melarut (detik) | 95 | 66 | 97 | 45,5 | 5 menit (Siregar, 2010) |

Uji kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terdapat di dalam granul. Hasil uji dari keempat formula memiliki kadar air antara 1,07% -1,73% , sedangkan syarat kadar air yang baik untuk granul *effervescent* adalah 0,4%-0,7% (Fuesett *et al.*, 2000). Granul *effervescent*

kemudian di uji pH dengan melarutkan 1000 gram granul ke dalam 200 mL air kemudian diukur menggunakan pH meter, uji ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keasaman granul. Hasil uji pH menunjukkan bahwa keempat formula memiliki pH yang bervariasi antara 5,80 – 6,18. pH sediaan *effervescent* yang baik adalah mendekati netral yaitu 6-7 (Kailaku & Sumangat, 2012), formula 4 memenuhi persyaratan dengan pH 6,18, hal ini disebabkan karena perbedaan kandungan asam dan basa yang tidak terlalu banyak. Waktu larut merupakan waktu yang dibutuhkan oleh granul untuk melarut sempurna. Granul dinyatakan larut dengan sempurna apabila produksi gas CO₂ berhenti setelah bereaksi dengan air. Waktu melarut granul yang baik pada sediaan *effervescent* adalah kurang dari 5 menit (Siregar, 2010). Hasil dari pengujian waktu larut menghasilkan waktu larut yang berbeda yaitu berkisar 45-97 detik, semua formula memenuhi persyaratan waktu larut granul *effervescent*, semakin cepat waktu larut granul maka sediaan tersebut semakin baik, oleh karena itu formula ke empat merupakan formula yang ideal karena memiliki waktu larut tercepat yaitu 45,5 detik.

B. Pembahasan

Ekstrak etanol daun teh dan daun sirsak menghasilkan nilai rendemen masing-masing sebesar 13,38% dan 14,6%. Rendemen ekstrak etanol daun sirsak memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak dau teh meskipun perbedaannya tidak terlalu banyak. Kedua tanaman di ekstraksi menggunakan etanol karena memiliki kepolaran yang

mirip sehingga dapat ter-ekstraksi dengan baik. Hal ini sesuai dengan teori sebelumnya bahwa kandungan di dalam daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata L.* lebih banyak mengandung senyawa polar dibandingkan dengan senyawa non polar (Moghadamtousi *et al.*, 2015 & Rani *et al.*, 2014) sehingga senyawa polar akan mudah larut dalam etanol yang memiliki indeks polaritas 4,3 (Kellner *et al.*, 2004).

Senyawa flavonoid yang ada di dalam daun teh sebagian besar terdiri dari senyawa polifenol seperti katekin, epigalokatekin, epikatekin yang merupakan flavonoid golongan flavonol dan memiliki kepolaran tinggi (Liu *et al.*, 2008). Senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun sirsak memiliki komponen yang mirip dengan flavonoid yang ada pada daun teh, senyawa flavonoid dalam daun sirsak bermanfaat sebagai senyawa antioksidan, sedangkan untuk senyawa *acetogenin* merupakan senyawa golongan lakton. Meskipun *acetogenin* memiliki rantai yang panjang, di dalam rantai tersebut terdapat ikatan rangkap dan senyawa lakton yang membuat sifat *acetogenin* menjadi lebih polar sehingga dapat diekstraksi menggunakan etanol (Febriani *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2016). Untuk mendapatkan kadar senyawa flavonoid yang lebih tinggi atau lebih murni, pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan proses ekstraksi yang lebih spesifik seperti fraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda-beda hingga pada tahap isolasi senyawa tunggal.

Uji pendahuluan untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid pada EEDT (Ekstrak Etanol Daun Teh) dan EEDS (Ekstrak Etanol Daun Sirsak)

dilakukan dengan metode KLT. Hasil pemisahan kandungan senyawa EEDT dan EEDS dapat menggunakan pelarut dengan kombinasi antara butanol, asam asetat dan air atau BAW. Penggunaan BAW sebagai fase gerak dapat menghasilkan pemisahan yang optimal, fase gerak ini sering digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid. Pemilihan BAW sebagai fase gerak dapat disesuaikan tingkat kepolarannya, beberapa perbandingan fase gerak BAW yang dapat digunakan yaitu 3:1:1v/v (Diniatik, 2016) dan 4:1:5 v/v fase atas (Suhendi, 2011) akan menghasilkan bercak yang berwarna kuning, lembayung, biru keunguan. Pemilihan fase gerak ini juga disesuaikan dengan karakteristik flavonoid yang akan diidentifikasi yaitu senyawa golongan katekin yang merupakan golongan flavonol dan flavonoid yang ada pada daun sirsak seperti argentinin, katekin, genistein dan glistein (Coria-Téllez *et al.*, 2016). Prinsip dari pengujian ini adalah “*like dissolve like*”, sehingga flavonoid yang ada di dalam EEDT dan EEDS dapat diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase gerak yang polar.

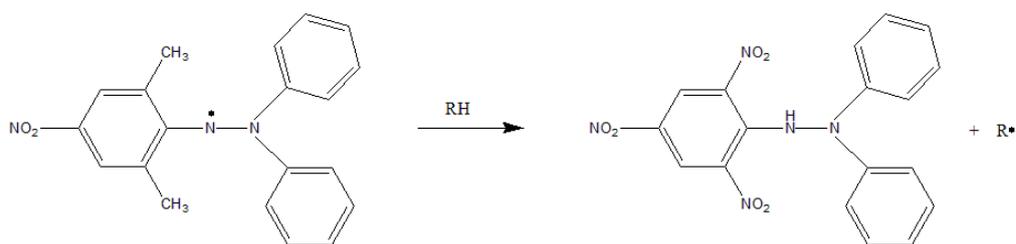
Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan KLT gambar 7 dan 8, sampel EEDT dengan bercak nomor 1 dan 2 yang memiliki Rf 0,66 dan 0,89 kemudian sampel EEDS dengan bercak nomor 3 dan 4 yang memiliki Rf masing-masing 0,68 dan 0,91 diduga mengandung senyawa flavonoid. Keempat bercak mengalami peredaman berwarna biru pada UV 254 nm dan tidak berwarna pada sinar tampak sebelum diuapi dengan amoniak. Setelah diuapi dengan amoniak pada sinar tampak terlihat bercak berwarna

kuning redup yang mengindikasikan kandungan flavonoid (Aminah dan Pramono, 2013) berupa flavonoid glikosida pada bercak 1 dan 3, sesuai dengan nilai Rf pembanding yang digunakan yaitu rutin yang ditunjukkan pada bercak nomor 5 dengan nilai Rf 0,66. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa nilai Rf rutin berkisar antara 0,625 dan 0,75 dengan fase gerak BAW, senyawa rutin yang dimaksud adalah kuersetin (Suhendi, 2011). Kuersetin merupakan salah satu turunan flavonoid yang tergolong ke dalam flavonol, begitu juga dengan katekin yang terdapat dalam daun teh dan daun sirsak yang juga termasuk dalam flavonoid golongan flavonol (Neldawati, 2013). Sehingga penggunaan rutin sebagai pembanding sudah sesuai untuk mendeteksi adanya kandungan flavonoid. Pada bercak nomor 2 dan 4 bukanlah senyawa glikosida flavonoid karena memiliki Rf yang berbeda dan lebih tinggi, diduga senyawa flavonoid ini adalah jenis genistein karena genistein merupakan flavonoid yang bersifat kurang polar (Markham, 1988). Nilai Rf dari kedua sampel hampir sama, hal ini menandakan bahwa senyawa flavonoid yang ada pada sampel EEDT dan EEDS memiliki jenis senyawa yang mirip. Uji identifikasi senyawa menggunakan KLT hanya bersifat kualitatif saja yaitu untuk mengetahui keberadaan senyawa flavonoid berdasarkan warna dan kepolaran senyawa, sehingga untuk memastikan jenis dan kadar senyawa yang ada pada masing-masing bercak pada penelitian selanjutnya dapat diuji menggunakan KLT-densitometri atau HPLC.

Salah satu mekanisme kerja agen kemopreventif adalah melalui proses pencegahan, salah satu pencegahan yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan senyawa antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas penyebab kanker payudara (Zai, *et al.*, 1998). Salah satu senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan pada bahan alam adalah senyawa flavonoid, pada pengujian sebelumnya diketahui bahwa dalam kedua ekstrak tersebut telah terbukti mengandung senyawa flavonoid. Sehingga untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari kombinasi EEDT dan EEDS perlu dilakukan uji antioksidan menggunakan DPPH. Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) merupakan metode yang digunakan untuk menentukan kekuatan aktivitas antioksidan dari suatu bahan, aktivitas antioksidan ini diukur berdasarkan kekuatan suatu senyawa dalam menghambat atau menangkal radikal bebas DPPH. Radikal bebas yang aktif akan terbentuk ketika DPPH dilarutkan pada alkohol seperti metanol dan menghasilkan larutan dengan warna ungu. Kekuatan senyawa aktif yang diduga memiliki aktivitas antioksidan dapat dilihat dari berkurangnya intensitas warna ungu larutan DPPH ketika ditambahkan dengan sampel atau larutan standar (Nurani, 2013). Standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah Asam Askorbat (Vitamin C) karena vitamin C sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga digunakan sebagai standar pembanding pada uji antioksidan (Khasanah *et al.*, 2014).

Mekanisme senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dalam menetralkan radikal bebas DPPH adalah dengan menyumbangkan proton sehingga radikal DPPH akan menjadi lebih stabil, semakin banyak senyawa antioksidan yang ditambahkan maka semakin banyak senyawa radikal bebas DPPH yang dinetralkan, hal tersebut dapat diamati dengan terjadinya perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi semakin kuning (Muharni *et al.*, 2013).

Aktivitas penangkalan radikal DPPH dengan senyawa yang ada dalam kombinasi EEDT dan EEDS dilakukan secara spektrofotometri berdasarkan pengukuran absorbansi dari sisa radikal DPPH setelah direaksikan dan diukur pada panjang gelombang maksimalnya. Konsentrasi senyawa uji yang semakin besar akan diikuti dengan nilai absorbansi yang semakin kecil, hal ini bermakna bahwa aktivitas penangkalan radikal DPPH yang terjadi semakin besar. Mekanisme senyawa antioksidan dalam menangkal radikal bebas dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 8. Mekanisme penangkalan radikal bebas.

Senyawa flavonoid yang terdapat dalam kombinasi EEDT dan EEDS akan mendonorkan proton yang merupakan salah satu radikal bebas yaitu unsur $H\cdot$. Unsur $H\cdot$ ini akan berinteraksi dengan DPPH

sehingga terjadi ikatan yang menghasilkan senyawa difenil pikrihidrazin yang bersifat lebih stabil. Senyawa flavonoid yang mendonorkan H[•] akan menjadi suatu radikal bebas yang tidak reaktif atau lebih stabil karena mengalami resonansi aromatik sehingga tidak akan membahayakan tubuh dan dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif (Fessenden dan Fessenden, 1994).

Data absorbansi yang didapatkan dari pengujian digunakan untuk menghitung persen inhibisi radikal bebas DPPH (%*IC*), nilai ini digunakan untuk mengetahui kemampuan larutan uji dalam mereduksi radikal bebas DPPH. Persen inhibisi didapatkan dengan cara absorbansi kontrol negatif dikurangi dengan absorbansi kontrol positif kemudian hasilnya dibagi dengan absorbansi kontrol negatif. Absorbansi kontrol negatif yang didapatkan adalah 0,7023 yang menunjukkan jumlah radikal bebas DPPH dalam larutan. Persen inhibisi (% *IC*) larutan uji dan pembanding dapat dilihat pada tabel 8 dan 9. Dapat pada tabel tersebut bahwa semakin besar konsentrasi larutan pembanding vitamin C dan larutan uji maka kemampuannya dalam menangkal radikal bebas menjadi semakin besar, hal ini terlihat dengan adanya penurunan nilai absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi maka proton yang didonorkan pada radikal bebas DPPH semakin banyak.

Nilai IC_{50} merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui besarnya kekuatan senyawa sebagai antioksidan, IC_{50} yaitu konsentrasi suatu senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk menetralkan radikal

bebas DPPH sebanyak 50%. Dari persen inhibisi (%*IC*) dapat digunakan untuk mengetahui nilai IC_{50} , dimana nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan senyawa dalam menetralkan radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} yang didapatkan maka semakin kuat aktivitas senyawa tersebut sebagai antioksidan. Grafik hubungan antara larutan uji atau pembanding dengan persen inhibisi diperoleh dengan membuat kurva regresi linier antara nilai persen inhibisi dan konsentrasi larutan uji atau pembanding. Grafik hubungan antara larutan uji atau pembanding dengan persen inhibisi dapat dilihat pada gambar 9 dan 10.

Dari persamaan regresi linier keduanya dapat dihitung nilai IC_{50} , kombinasi ekstrak etanol daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata L.* memiliki nilai IC_{50} sebesar 26,90 $\mu\text{g/mL}$. Menurut Mardawati pada tahun 2008, hasil uji aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak etanol daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata L.* menunjukkan bahwa aktivitasnya masuk ke dalam kategori sangat kuat sebagai antioksidan. Nilai IC_{50} yang didapatkan dari larutan uji lebih besar jika dibandingkan larutan pembanding vitamin C yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 14,20 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kombinasi ekstrak etanol daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata L.* Dengan hasil pengujian tersebut menandakan bahwa kombinasi ekstrak daun teh dan daun sirsak memiliki potensi yang baik sebagai agen kemopreventif melalui mekanisme antioksidan.

Selain melalui mekanisme pencegahan, agen kemopreventif juga berperan dalam penekanan jumlah sel kanker untuk mencegah metastasis. Untuk mengetahui kedua ekstrak tersebut memiliki aktivitas sebagai antikanker, perlu dilakukan uji pendahuluan menggunakan *molecular docking*. Tujuan dari metode ini yaitu untuk memprediksi afinitas dan orientasi ikatan ligan di dalam interaksinya dengan protein pada struktur 3 dimensi.

Hasil validasi menggunakan aplikasi *Autodock Vina* menunjukkan bahwa *acetogenin*, katekin, 5-FU, Doxorubicin dan Ligan Asli pada pengujian terhadap reseptor HER2 dan ER- α , masing-masing memiliki satu konformasi dengan nilai RMSD $< 2\text{\AA}$. RMSD merupakan nilai penyimpangan antara konformasi ligand dengan pembandingnya, semakin besar nilai RMSD menandakan semakin besar penyimpangannya yang berarti semakin besar pula kesalahan prediksi yang terjadi pada interaksi ligand dengan protein (Korb, *et al.*, 2006). Hasil uji *molekular docking* pada HER2 menunjukkan bahwa *docking score* senyawa *acetogenin* (-6,3 kcal/mol) dan katekin (-6,7 kcal/mol) lebih negatif dari pembandingnya yaitu 5-FU (-5,6 kcal/mol), tetapi lebih positif jika dibandingkan dengan doxorubicin (-7,0 kcal/mol) hal ini membuktikan bahwa senyawa *acetogenin* dan katekin dengan HER2 memiliki kestabilan ikatan yang lebih baik jika dibandingkan dengan 5-FU tetapi tidak lebih stabil jika dibandingkan dengan doxorubicin dan ligand asli 03Q (-7,0 kcal/mol). Hal ini dapat diartikan bahwa energi yang dibutuhkan untuk berikatan dengan

protein HER2 lebih sedikit dibandingkan dengan 5-FU sehingga ikatan yang terbentuk lebih stabil, tetapi jika dibandingkan dengan doxorubicin dan ligand asli, senyawa katekin dan acetogenin membutuhkan energi yang lebih besar.

Sedangkan hasil uji pada reseptor ER- α menunjukkan *docking score* senyawa *acetogenin* (-6,5 kcal/mol) dan katekin (-7,6 kcal/mol) lebih negatif dari pembandingnya yaitu 5-FU (-5,5 kcal/mol) dan doxorubicin (-6,0 kcal/mol) hal ini membuktikan bahwa senyawa *acetogenin* dan katekin pada reseptor ER- α memiliki kestabilan ikatan yang lebih baik jika dibandingkan dengan 5-FU dan doxorubicin tetapi lebih positif dibandingkan ligand asli 6B0F (-7,8 kcal/mol). Hal ini dapat diartikan bahwa energi yang dibutuhkan oleh kedua senyawa untuk berikatan dengan reseptor ER- α lebih sedikit dibandingkan dengan 5-FU dan doxorubicin, sehingga ikatan yang terbentuk lebih stabil.

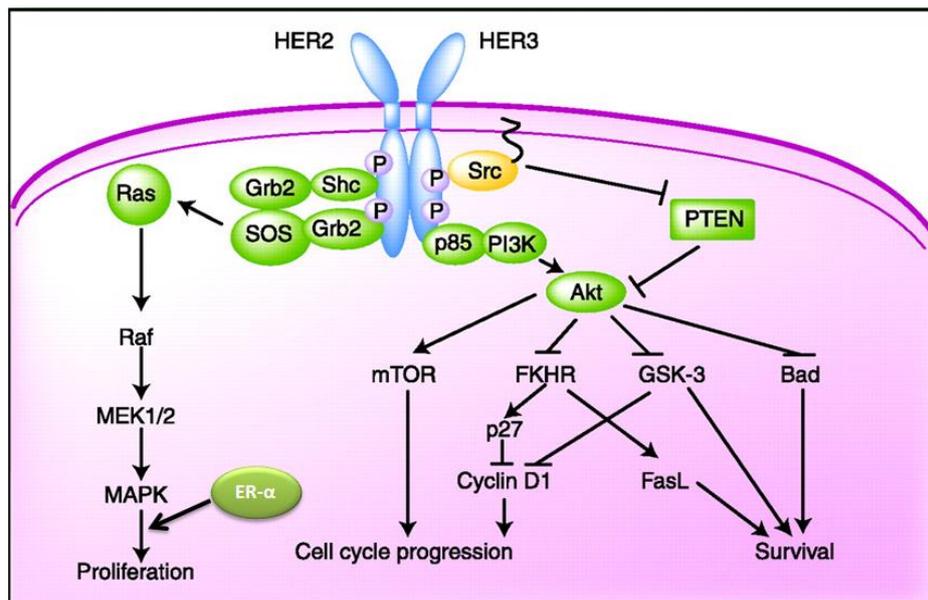
Jenis ikatan yang terbentuk antara asam amino dengan senyawa uji antara lain adalah ikatan hidrogen dan ikatan kovalen, dimana ikatan kovalen merupakan ikatan yang lebih kuat diantara ikatan lainnya. Ikatan kovalen merupakan satu-satunya ikatan yang bersifat *irreversible* sehingga memiliki peran yang besar pada penurunan afinitas ikatan dibandingkan dengan ikatan hidrogen (Fleming and Rose, 2005). Ikatan kovalen biasanya terbentuk dari residu asam amino ionik diantaranya yaitu Glu 964, Glu 971, Glu 975, Lys 765, Lys 957, Asp 769 dan Asp 871, sedangkan asam amino polar seperti Pro 761, Pro 967, Leu 972 dan Ile

954 biasanya membentuk ikatan hidrogen, hal ini berarti bahwa dengan adanya residu ionik memberikan kontribusi terbesar terhadap penurunan energi afinitas senyawa uji karena membentuk ikatan kovalen.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, katekin terbukti memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme antiproliferasi dan induksi apoptosis sel melalui pemacuan protein p53 (Nurani, 2011). Begitu juga senyawa *acetogenin* memiliki aktivitas sebagai antikanker melalui penghambatan proliferasi sel, menginduksi program apoptosis sel dan peningkatan ekspresi p53 (Rachmawati *et al.*, 2013). Adapun dari hasil penelitian ini, senyawa katekin dan *acetogenin* memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme antiproliferasi dengan target penghambatan reseptor HER2 dan ER- α , serta meningkatkan program apoptosis sel melalui peningkatan ekspresi protein Bad.

HER2 dan ER- α merupakan reseptor yang dapat menginisiasi proses metastase pada kanker payudara. Aktivasi atau overekspresi dari kedua protein ini secara berlebihan dapat menjadi salah satu penyebab terjadinya perkembangan kanker. HER2 berperan penting pada proses diferensiasi, adhesi dan motilitas sel, secara alami HER2 terdapat pada payudara dalam jumlah yang normal untuk menjaga payudara agar berkembang dengan normal (Ahmad *et al.*, 2012). Mutasi gen HER2 akan menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi HER2 yang menyebabkan aktivasi beberapa protein yang merupakan *growt factor* (gambar 15). Aktivasi reseptor HER2 yang berlebihan akan menyebabkan beberapa

jalur siklus sel teraktivasi seperti jalur Ras. Ras merupakan suatu protein penting dalam proses transduksi signal dari reseptor melalui RTK (*Reseptor Tirosin Kinase*). Protein Ras yang teraktivasi akan mengaktifkan Raf yang merupakan suatu protein tirosin kinase seluler, Raf akan memicu serangkaian peristiwa fosforilasi seperti MEK $\frac{1}{2}$ yang bertransformasi menjadi MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*). MAPK merupakan suatu faktor transkripsi yang apabila teraktivasi oleh mitogen dapat mempengaruhi ekspresi gen sehingga mengubah sifat fisiologi sel yang menyebabkan terjadinya proses proliferasi secara berlebihan (Lin and Winer, 2007).



Gambar 9. Mekanisme Pertumbuhan Sel Kanker Payudara (Lin and Winer, 2007)

Jalur MAPK yang aktif akan memacu aktivitas dari ER- α di dalam intraseluler, ER- α akan teraktivasi kemudian akan mengirimkan signal ke dalam inti sel. ER- α akan mempengaruhi faktor transkripsi di dalam inti sel sehingga terjadi mutasi gen transkripsi yang menyebabkan

pertumbuhan sel kanker payudara menjadi tidak terkontrol (Berger *et al.*, 2012).

Selain terjadi aktivasi pada jalur Ras, ekspresi yang berlebihan pada reseptor HER2 juga menyebabkan penghambatan pada program apoptosis sel yaitu melalui penghambatan protein Bad yang merupakan protein pro-apoptosis. Penghambatan protein ini akan menyebabkan peningkatan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 *family*, peningkatan protein pro-apoptosis akan menyebabkan apoptosis sel yang telah terprogram menjadi terganggu sehingga menyebabkan sel menjadi lebih kuat dan tidak mengalami kematian (*survival*) seperti ditunjukkan pada gambar 15.

Penekanan pada HER2 dan ER- α akan mengakibatkan penurunan induksi pada perkembangan sel yang berlebihan dengan menginaktivasi jalur Ras, dari hasil uji *docking molekuler* dapat dilihat bahwa senyawa *acetogenin* dan senyawa katekin berinteraksi dengan baik pada protein ini sehingga dapat menekan pertumbuhan sel kanker, sekaligus mengaktifkan kembali protein Bad sehingga program apoptosis sel dapat berjalan normal dan diharapkan progresifitas sel kanker menurun.

Interaksi yang lemah antara 5-FU dengan HER2 dan ER- α mengindikasikan bahwa 5-FU memiliki aktivitas antikanker yang rendah pada penekanan ekspresi kedua reseptor tersebut. 5-FU merupakan obat golongan antimetabolit yang bekerja dengan menghambat enzim timidilat sintetase (TS) sehingga tidak dihasilkan timin yang diperlukan oleh DNA

pada siklus sel. Hal ini menyebabkan sel menjadi tidak berkembang dan akhirnya mati (Longley & Johnston, 2007). Doxorubicin berinteraksi lebih kuat pada reseptor HER2 dibandingkan dengan reseptor ER- α , hal ini mengindikasikan bahwa doxorubicin memiliki aktivitas antikanker yang kuat sebagai antiproliferasi melalui penghambatan protein membran sel, dan memiliki aktivitas penghambatan yang lemah pada protein intraseluler. Doxorubicin merupakan obat antibiotik golongan antrasiklin, pada sel kanker doxorubicin bekerja melalui beberapa mekanisme yaitu penghambatan topoisomerase II, penghambatan sintesis DNA dan RNA, dan melalui penekanan membran sel yang menyebabkan adanya aliran dan transport ion (Childs *et al.*, 2002).

Karena hasil uji *docking* menunjukkan hasil yang baik dan dapat dikatakan bahwa senyawa yang terdapat di dalam ekstrak daun teh dan daun sirsak memiliki potensi sebagai agen kemopreventif maka untuk menambah kemanfaatan dari penelitian ini untuk masyarakat kemudian dilakukan pembuatan sediaan granul *effervescent*.

Bahan-bahan yang berbentuk serbuk memiliki sifat alir yang kurang baik, termasuk serbuk ekstrak karena didapatkan dari tumbuhan yang memiliki kadar air tinggi, untuk memperbaiki sifat alir tersebut pembuatan granul *effervescent* dilakukan dengan metode granulasi basah, sediaan granul dipilih karena lebih cepat mengalir dan memiliki ukuran yang seragam jika dibandingkan dengan serbuk (S. Fika, 2009). Asam sitrat dan asam tartrat berfungsi pada proses *effervescing*, komponen asam

ini akan terhidrolisis di dalam air menghasilkan asam yang akan bereaksi dengan natrium bikarbonat sehingga menghasilkan gas karbondioksida (CO_2) dan air. Penggunaan kombinasi asam sitrat dan asam tartrat biasa dilakukan karena pada penggunaan asam tunggal akan menyebabkan kesukaran pada buih yang dihasilkan. Asam sitrat yang digunakan secara tunggal akan menghasilkan campuran yang lekat dan sukar dibuat menjadi granul. Sedangkan penggunaan asam tartrat saja akan menghasilkan granul yang mudah rapuh dan mudah menggumpal (Ansel, 2005).

Syarat bahan yang digunakan untuk sediaan *effervescent* adalah harus dapat segera larut setelah dimasukkan ke dalam air, laktosa adalah salah satu bahan yang memiliki sifat mudah larut dalam air sehingga cocok untuk dijadikan bahan pengisi pada sediaan *effervescent*. Selain sebagai pengisi, laktosa juga dapat digunakan sebagai pemanis pada sediaan meskipun rasa manis yang dihasilkan tidak dapat menutupi rasa dari zat aktif yang memiliki rasa sepat dan sedikit pahit, penggunaan pemanis seperti sakarin dapat membantu menutupi rasa dari ekstrak tersebut. Pengikat yang digunakan untuk membuat granul adalah PVP yang dilarutkan pada alkohol, granul yang dihasilkan dari penggunaan PVP memiliki sifat alir yang baik dan menghasilkan *fines* atau serbuk sisa yang minimal. Penggunaan PVP dengan konsentrasi 5% dalam etanol menghasilkan granul yang kuat dan cepat larut (PM. Iva, 2009).

Uji pH sangat penting dilakukan untuk dapat mengontrol keasaman sediaan, jika pH larutan sediaan terlalu asam maka sediaan ini dapat

berpotensi menyebabkan iritasi lambung sedangkan apabila sifatnya terlalu basa akan menimbulkan rasa pahit yang tidak enak. Faktor yang dapat mempengaruhi keasaman sediaan adalah jumlah pembentukan CO_2 saat *effervescent* berinteraksi dengan air, hasil lain dari reaksi ini adalah asam karbonat. Asam karbonat akan mengalami penguraian dan menghasilkan ion H^+ dalam larutan sehingga larutan tersebut menjadi asam (Rahmawati *et al.*, 2016). *Effervescent* sendiri memiliki prinsip yaitu reaksi netralisasi ketika asam bertemu dengan basa dan akan terbentuk garam, sehingga dengan komposisi yang sama antara asam dan basa akan menghasilkan sediaan dengan pH yang mendekati netral (Wijayati *et al.*, 2014). Kesetaraan reaksi yang terjadi pada sediaan *effervescent* mengikuti kaidah stoikiometri yaitu satu molekul asam sitrat akan bereaksi dengan tiga molekul natrium bikarbonat, sedangkan asam tartrat akan bereaksi dengan dua molekul natrium bikarbonat. Sehingga persamaan reaksi yang didapatkan sebagai perbandingan antara natrium bikarbonat : asam sitrat dan asam tartrat secara berturut-turut adalah 53 : 28 : 19 (Syamsul dan Supomo, 2014).

Dari hasil uji yang didapatkan, kadar air keempat formula tidak memenuhi syarat. Faktor yang dapat mempengaruhi kadar air adalah kelembaban relatif, syarat kelembaban relatif (RH) ruangan untuk pembuatan sediaan *effervescent* adalah $< 25\%$ dengan suhu ruangan tidak lebih dari $20\text{ }^\circ\text{C}$ (Lee, 2000). Kadar air yang tinggi berhubungan dengan reaksi yang terjadi pada *effervescent*, jika kadar air tinggi sediaan granul

effervescent berpotensi untuk bereaksi lebih cepat sebelum dilarutkan ke dalam air. Selain mempengaruhi reaksi, kadar air juga berkaitan dengan sifat alir granul, kadar air yang tinggi pada granul dapat menyebabkan daya kohesi yang semakin besar, sehingga granul akan sukar mengalir (Rahmawati *et al.*, 2016). Oleh karena itu kadar air sediaan harus diusahakan sekecil mungkin agar reaksi asam dengan basa tidak terjadi sebelum sediaan dilarutkan dan sediaan granul *effervescent* memiliki sifat alir yang baik.

Waktu larut granul sebagian besar dipengaruhi oleh bahan-bahan yang digunakan dalam formulasi, bahan yang digunakan harus memiliki kelarutan yang tinggi di dalam air, bahan aktif yang berasal dari tanaman seperti ekstrak kental akan sulit larut sehingga perlu ditambahkan bahan seperti laktosa, sukrosa atau bahan pengemulsi untuk membantu meningkatkan kelarutan zat aktif tersebut. Selain itu konsentrasi dari bahan pengikat yang digunakan juga dapat mempengaruhi waktu larut, semakin tinggi konsentrasinya maka granul yang dihasilkan akan semakin keras dan waktu larutnya akan menjadi lebih lama (Asiani *et al.*, 2012).

Granul *effervescent* yang dihasilkan memiliki sifat fisik yang berbeda-beda pada setiap formulanya, hasil dari uji sifat fisik granul *effervescent* menunjukkan bahwa formula 4 memiliki hasil yang paling baik diantara formula yang lain dengan pH 6,18, kadar air 1,07% dan waktu larut 45,5 detik.

Kelebihan dari pemilihan sediaan granul *effervescent* yaitu dapat lebih cepat berefek dibandingkan dengan tablet konvensional karena zat aktif dapat larut dalam air, dapat digunakan pada pasien yang sulit menelan sediaan tablet, lebih tepat dosis, serta dapat menutupi rasa dan bau dari ekstrak dengan adanya gas CO₂ yang dihasilkan. Sedangkan kekurangan dari sediaan ini adalah sulitnya mendapatkan kestabilan kimia karena pengaruh kelembaban (Lee, 2000).