

NASKAH PUBLIKASI

UJI POTENSI KOMBINASI EKSTRAK ETANOLIK DAUN TEH (*Camellia sinensis*) DAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) SEBAGAI AGEN KEMOPREVENTIF PADA KANKER PAYUDARA SECARA *IN-VITRO* DAN *IN SILICO* SERTA OPTIMASI FORMULASI SEDIAAN GRANUL *EFFERVESCENT*

Disusun untuk Memenuhi Sebagian Syarat Memperoleh Derajat Sarjana Farmasi pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta



Disusun oleh

FATMA SARI MASITHA

20140350046

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

2018

**UJI POTENSI KOMBINASI EKSTRAK ETANOLIK DAUN TEH
(*Camellia sinensis*) DAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*) SEBAGAI
AGEN KEMOPREVENTIF PADA KANKER PAYUDARA SECARA *IN-
VITRO* DAN *IN SILICO* SERTA OPTIMASI FORMULASI SEDIAAN
GRANUL *EFFERVESCENT***

Fatma Sari Masitha, Rifki Febriansah

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

INTISARI

Kanker payudara memiliki angka insidensi yang selalu meningkat setiap tahunnya. Salah satu cara untuk mencegah terjadinya kanker adalah penggunaan agen kemopreventif. Daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun teh (*Camellia sinensis*) merupakan tanaman yang memiliki kandungan senyawa flavonoid yang diduga berperan sebagai antioksidan dan dapat menjadi agen kemopreventif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dari daun sirsak dan daun teh sebagai agen kemopreventif.

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimental, serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun teh (*Camellia sinensis*) di ekstraksi menggunakan etanol 70%. Identifikasi senyawa dari ekstrak menggunakan metode KLT dengan fase gerak *n*-Butanol:Asam Asetat: Air (7:2:1). Uji antioksidan ekstrak menggunakan radikal bebas dengan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrihidrazil*) pada beberapa seri konsentrasi. Serta uji *molecular docking* senyawa *acetogenin* dan katekin pada penghambatan reseptor HER2 dan ER- α yang merupakan biomarker pada kanker payudara. Kemudian dilakukan optimasi formula sediaan granul *effervescent* kombinasi ekstrak menggunakan metode granulasi basah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dan daun teh mengandung senyawa golongan flavonoid ditunjukkan dengan nilai Rf yaitu 0,66 dan 0,68 yang sesuai dengan pembanding rutin dengan Rf 0,66. Kombinasi ekstrak etanolik daun sirsak dan daun teh memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 26,9 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji menggunakan *molecular docking* senyawa *acetogenin* dan katekin pada reseptor HER2 menunjukkan *docking score* secara berurutan -6,3 kcal/mol dan -6,7 kcal/mol, sedangkan pada reseptor ER- α menunjukkan *docking score* secara berurutan -6,5 kcal/mol dan -7,6 kcal/mol. Sediaan granul *effervescent* yang paling optimal yaitu formula empat dengan hasil uji fisik diantaranya kadar air 1,07% dengan waktu larut 45,5 detik dan keasaman pH 6,18. Dari uji yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) dan Daun Teh (*Camellia sinensis*) berpotensi sebagai agen kemopreventif dan dapat di formulasikan menjadi sediaan granul *effervescent*.

Kata Kunci : *Annona muricata L.*, *Camellia sinensis*, antioksidan, Kanker Payudara, HER 2, ER- α , *effervescent*.

POTENCIAL TEST OF COMBINATION ETHANOLIC EXTRACT OF TEA LEAF (*Camellia sinensis*) AND SOURSOP LEAF (*Annona muricata* L.) AS A CHEMOPREVENTIVE AGENT ON BREAST CANCER IN IN-VITRO AND IN SILICO AND FORMULATION OPTIMIZATION IN EFFERVESCENT GRANULES

Fatma Sari Masitha, Rifki Febriansah

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

Jl. Lingkar Barat, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta, 55183

Telp. (0274) 387656, Fax (0274) 387646

ABSTRACT

*Breast cancer has an incidence rate that always increases every year. One way to prevent cancer is the use of chemopreventive agents. Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) and Tea Leaves (*Camellia sinensis*) are plants that contain flavonoids which are thought to act as antioxidants and can become chemopreventive agents. This study aims to determine the potential of Soursop Leaves and Tea Leaves as chemopreventive agents.*

The first stage of this research was to determine the presence of flavonoids in both of ethanol extract using TLC method. Then to examine the antioxidant activity of the combination soursop leaf ethanolic extract and green tea leaves against free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). Docking molecular test of acetogenin and catechin compounds at HER2 and ER- α receptors which are biomarkers of breast cancer. Then optimization of effervescent granule formulation using wet granulation method.

*The results showed that ethanol extract of soursop leaves and tea leaves containing flavonoid, shown with Rf value 0.66 and 0.68, and the rutin with Rf 0.66. The combination of both ethanolic extract has very strong antioxidant activity with IC₅₀ value 26,90 μ g/mL. The results using molecular docking of acetogenin and catechin compounds at HER2 receptors showed docking score of -6.3 kcal/mol and -6.7 kcal/mol and ER- α receptors showed a docking score of -6.5 kcal/mol and -7.6 kcal/mol. The most optimal effervescent granule preparation is formula number four with physical test results such as moisture content of 1.07% with a soluble time of 45.5 seconds and acidity of 6.18. The result show that Soursop Leaf ethanol extract (*Annona muricata* L.) and Tea Leaves (*Camellia sinensis*) have potential activity as chemopreventive agents and can be formulated into effervescent granule preparations.*

Key words : *Annona muricata*, *Camellia sinensis*, Antioxidant, Breast Cancer, HER2, ER- α , effervescent.

1. PENDAHULUAN

Salah satu kanker yang memiliki angka insidensi terbesar di Indonesia adalah kanker payudara, angka kejadian kasus baru dari kanker ini mencapai 43,3%. Kanker Payudara (KPD) merupakan jenis kanker yang menempati urutan pertama pada perempuan. Jenis kanker ini biasanya muncul pada wanita dengan usia diatas 50 tahun. Di Indonesia sendiri menurut Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia (IAPI) dan Yayasan Kanker Indonesia (YKI) tahun 2010 angka kejadian kanker payudara di Indonesia yaitu 12 dari 100.000 perempuan, angka ini terus meningkat sejak tahun 2002 (Kuzairi *et al.*, 2016).

Daun teh (*Camellia sinensis*) memiliki banyak manfaat, yang paling

besar yaitu sebagai antioksidan kuat karena di dalam daun teh (*Camellia sinensis*) terdapat kandungan senyawa yaitu senyawa katekin. Katekin merupakan suatu antioksidan kuat dan senyawa inilah yang diduga dapat menekan proliferasi sel dan memiliki efek kemopreventif (Boehm *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008). Daun sirsak (*Annona muricata* L.) juga telah terbukti memiliki efek sebagai antikanker. Senyawa *acetogenin* merupakan golongan senyawa yang sudah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker dan agen sitotoksik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kemopreventif dari kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata* L..

2. METODE

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas Farmasi UGM Unit 2 pada bagian Laboratorium Biologi Farmasi.

2. Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia yang diperoleh dilarutkan dalam etanol 70% dengan perbandingan serbuk : etanol 70% 1:6 menggunakan metode maserasi yaitu dilakukan dengan merendam serbuk simplisia ke dalam etanol 70% selama 4 hari.

3. Uji Kandungan Senyawa Kimia

Uji ini dilakukan dengan metode KLT. Fase gerak yaitu *n*-Butanol : Asam Asetat: Air (BAA) dengan perbandingan 7:2:1 sedangkan fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Setelah di elusi plat KLT

dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan dalam oven suhu 60⁰ C selama 10 menit, kemudian plat diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan dilihat hasil serta Rf-nya. Setelah itu digunakan pereaksi warna yaitu uap amoniak untuk mendeteksi adanya flavonoid.

4. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan Baku DPPH

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan kedalam labu takar, kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 0,4 mM. Larutan di vortex selama 30 detik lalu bungkus menggunakan alumunium foil.

2. Pembuatan Larutan Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C analisis dimasukkan kedalam labu takar 50 mL ,

kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas sebagai larutan induk. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

3. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 20 mg kombinasi ekstrak etanolik daun sirsak dan daun teh ditambahkan dengan 20 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan induk tersebut dibuat seri kadar 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

4. Penentuan Operating Time

Menyiapkan 3 labu ukur 5 mL, kemudian masukkan larutan vitamin C 3 ; 4 ; 5 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 1 mL ke labu ukur 1, 2, 3 secara berurutan. Tambahkan 1 mL Larutan DPPH kedalam masing-masing labu ukur dan tambahkan metanol sampai tanda batas. Pindahkan masing-masing larutan

dalam labu takar ke tabung reaksi kemudian Vortex 30 detik. Baca serapan larutan pada λ 514 nm tiap 5 menit selama 45 menit, dilakukan replikasi 3 kali.

5. Penetapan Panjang Gelombang Maximum

Kedalam labu ukur 10 mL dimasukkan 1 mL larutan DPPH, kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan tersebut dipindahkan kedalam tabung reaksi. Vortex larutan selama 30 detik. Diamkan selama *operating time* baca serapan pada panjang gelombang 200-800 nm.

6. Pengukurana Absorbansi Larutan DPPH

Kedalam labu ukur 10 mL dimasukkan 2 mL larutan DPPH. Tambahkan metanol hingga tanda batas

kemudian diamkan selama *operating time*. Baca serapan pada λ Maksimum, lakukan replikasi 3 kali.

7. Pengukuran Absorbansi Larutan Vitamin C dan Sampel

Kedalam labu ukur 10 mL dimasukkan 2 mL larutan DPPH. Tambahkan 2 mL larutan vitamin C atau larutan sampel pada berbagai seri konsentrasi yang dibuat. Kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. Vortex larutan selama 30 detik, dan diamkan selama *operating time*. Baca serapan pada λ Maksimum dan lakukan replikasi 3 kali.

Untuk menghitung IC_{50} dengan cara mengolah data absorbansi sampel menjadi bentuk % antioksidan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} bisa diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan $x = \text{kadar}$ dan $y = \% \text{ antioksidan}$.

5. *Molecular Docking*

a. Pengambilan Data

Dalam penelitian ini, data struktur protein target didapatkan melalui *Protein Data Bank* (PDB) dengan mengakses www.rcsb.org. PDB ID yang digunakan adalah HER2 sebagai target *docking* dengan kode protein 3PP0 dan ER- α dengan kode 6B0F. Kemudian *download file* dengan format PDB.

b. Simulasi *Docking* menggunakan Autodock Vina

File reseptor dan ligan senyawa uji dengan format *pdbqt* dimasukkan dalam satu folder yang berjudul *vina* pada local disk C. Untuk

menjalankan simulasi docking dengan autodock vina ini dijalankan menggunakan *command prom*. Akan muncul 9 konformasi pada folder tersebut, konformasi yang digunakan adalah yang memiliki nilai RMSD lebih rendah dari 2 Å.

c. Visualisasi Hasil Docking

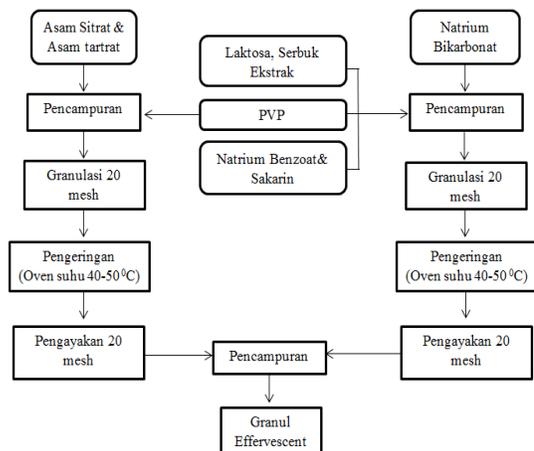
Untuk dapat melihat hasil docking dapat dilakukan visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer. Sebelumnya konversikan terlebih dahulu file yang memiliki format PDBQT menjadi PDB menggunakan aplikasi Open Babel agar dapat divisualisasi menggunakan DS Visualizer. Pada bagian input masukkan hasil docking dengan format pdbqt kemudian ubah bagian output menjadi PDB lalu lakukan konversi dengan menekan *convert*. Setelah itu hasil docking

dapat di visualisasi menggunakan DS Visualizer.

6. Sediaan Granul Effervescent

No	Bahan	Perlakuan (%)			
		F.1	F.2	F.3	F.4
1	Serbuk Ekstrak	1,5	1,5	1,5	1,5
2	Asam Sitrat	16,4	20,7	14	8
3	Asam Tartrat	11	14	23,5	26
4	Na Bikarbonat	26	32	32,7	33
5	PVP	1,4	1,4	1,4	1,4
6	Natrium Benzoat	1	1	1	1
7	Sakarín	0,5	0,5	0,5	0,5
8	Laktosa	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Serbuk ekstrak didapatkan dengan memasukkan kombinasi ekstrak kental daun teh dan daun sirsak ke dalam oven pada suhu 45 °C selama 72 jam.



Gambar. Diagram alir pembuatan granul effervescent

Uji Sifat Fisik Granul *Effervescent* yaitu uji organoleptis, uji kadar air, analisis ph, uji melarut granul.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi Tanaman

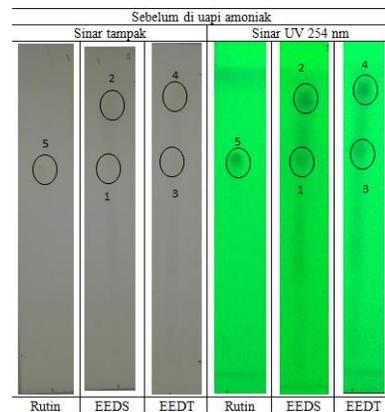
Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata L.*

2. Ekstraksi

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 diperoleh ekstrak kental daun *Camellia sinensis* dengan berat 27,3 gram dan daun *Annona muricata L.* seberat 28,7 gram.

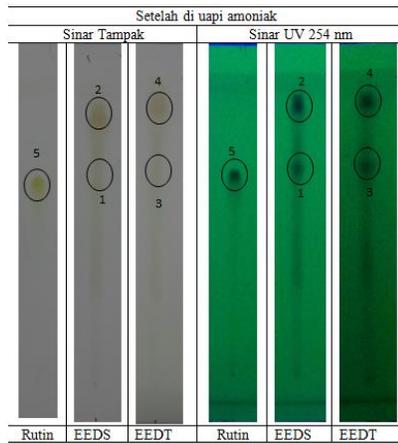
3. Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah *n*-butanol, asam asetat dan air (BAW). Dari percobaan tersebut fase gerak BAW dengan perbandingan 7:2:1 menunjukkan hasil pemisahan yang paling baik dibandingkan dengan perbandingan yang lain.



Gambar. Plat KLT sebelum diuapi dengan amoniak

Untuk mendeteksi adanya kandungan flavonoid dilakukan pengujian warna dengan senyawa amoniak.



Gambar. Plat KLT setelah diuapi dengan amoniak

Nilai Rf dari masing-masing bercak dapat dilihat pada tabel.

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 Lembayu	Peredaman lebih gelap
3	0,68	Tidak berwarna	Peredaman	Kuning	Peredaman lebih gelap
4	0,91	Tidak berwarna	Peredaman	Kuning Lembayu	Peredaman lebih gelap
5	0,66	Tidak berwarna	Peredaman	Kuning	Peredaman lebih gelap

4. Uji Antioksidan Dengan DPPH

Uji antioksidan ini dilakukan dengan metode spektrofotometri pada beberapa seri kadar. Data rata-rata absorbansi reaksi antara DPPH

dengan Vitamin C dan DPPH dengan kombinasi EEDT dan EEDS dapat dilihat pada tabel.

Tabel 1. Rata-rata Absorbansi Vitamin C

No	Konsentrasi (µg/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

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 2. Data Persen Inhibisi Vitamin C

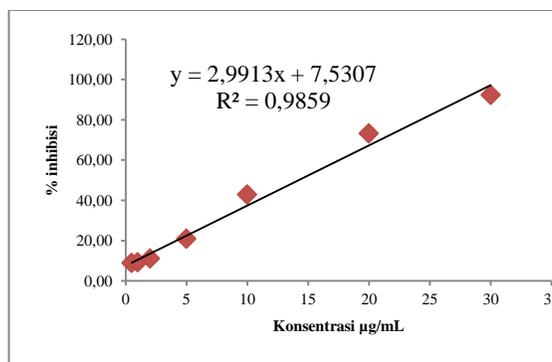
No	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-Rata Absorbansi	Standar Deviasi
1	0,5	0,641	0,026
2	1	0,638	0,006
3	2	0,625	0,034
4	5	0,557	0,013
5	10	0,402	0,021
6	20	0,189	0,063

7	30	0,055	0,014
---	----	-------	-------

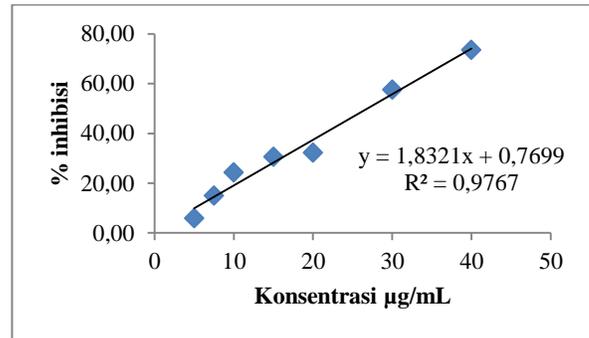
Tabel 3. Data Persen Inhibisi Kombinasi EEDT dan EEDS

No	Konsentrasi (µg/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

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 1. Grafik Regresi Linear Vitamin C



Gambar 2. 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 didapatkan nilai IC_{50} Vitamin C sebesar 14,20 µg/mL, sedangkan untuk kombinasi ekstrak 26,9 µg/mL.

5. Molecular Docking

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

Tabel 4. 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

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

Tabel 5. 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	5	1.436	- 7.8

(6B0F)

4	Doxorubicin	4	1.412	- 6.0
5	5-FU	2	1.791	- 5.5

6. Sediaan Granul *Effervescent*

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 3. Uji Organoleptis Granul *Effervescent*

Uji sifat fisik granul *effervescent* dilakukan untuk mengetahui bahwa granul yang dihasilkan memiliki sifat yang baik. Hasil evaluasi tersebut dapat dilihat pada tabel.

No	Keterangan	Formula			
		1	2	3	4
1	Kadar Air (%)	1,34	1,73	1,53	1,07
2	pH	5,98	5,81	5,80	6,18
3	Waktu Melarut (detik)	95	66	97	45,5

PEMBAHASAN

Ekstrak etanol daun teh dan daun sirsak menghasilkan nilai rendemen masing-masing sebesar 13,38% dan

14,6%. 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.

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan KLT, 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.

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. 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.

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.

Dari persamaan regresi linier keduanya dapat dihitung nilai IC₅₀,

kombinasi ekstrak etanol daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata* L. memiliki nilai IC₅₀ sebesar 26,90 μ g/mL. Menurut Mardawati pada (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.

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).

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.

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.

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).

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). 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 berturutan 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 °C (Lee, 2000). 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.

4. Kesimpulan

- a. Dalam kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata* L. Terbukti mengandung senyawa golongan flavonoid, dibuktikan dengan nilai Rf EEDS yaitu 0,66 dan 0,89. Sedangkan EEDT dengan Rf 0,68 dan 0,91. Selain itu dibuktikan dengan pereaksi warna yaitu uap amoniak

memberikan hasil berwarna kuning hingga kuning lembayung.

- b. Kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata* L. mempunyai aktivitas antioksidan berdasarkan metode DPPH dengan nilai IC_{50} 26,90 $\mu\text{g/mL}$ yang tergolong sangat kuat.
- c. Senyawa katekin dan *acetogenin* memiliki afinitas ikatan yang tinggi dalam menghambat HER2 dan ER- α dibuktikan dengan *docking score* pada HER 2 secara berurutan yaitu -6,7 kcal/mol dan -6,3 kcal/mol, sedangkan *docking score* pada reseptor ER- α secara berurutan adalah -7,6 kcal/mol dan -6,5 kcal/mol.
- d. Formulasi sediaan granul *effervescent* yang optimal untuk kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Annona*

muricata L. adalah formula ke-4 dengan hasil uji kadar air 1,07%, pH dengan nilai 6,18 dan waktu larut 45,5 detik.

5. Saran

1. Perlu dilakukan uji mengenai efek antioksidan sediaan granul *effervescent*.
2. Perlu dilakukan uji sitotoksik pada sel kanker payudara menggunakan kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan *Annona muricata* L. untuk mengetahui lebih lanjut mengenai potensi kombinasi ekstrak ini sebagai agen kemopreventif.

DAFTAR PUSTAKA

Adelina, R., Febriyanti, R., Aminah, S., Pramono, S., 2013. Isolasi Flavonoid Daun Murbei (*morus alba* L.) Serta uji Aktivitasnya Sebagai Penurun Tekanan Darah

- Arteri Pada Anjing Teranestesi. *Maj. Farm.* 9, 235–242.
- Ansel, H. C., 2005, Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, diterjemahkan oleh Ibrahim, F., Edisi IV, 605-619, Jakarta, UI Press.
- Boehm, K., Borrelli, F., Ernst, E., Habacher, G., Hung, S.K., Milazzo, S., Horneber, M., 2009. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer, in: *The Cochrane Collaboration* (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005004.pub2>
- Kuzairi, K., Yulianto, T., Safitri, L., 2016. Aplikasi Metode Adams Bashforth-Moulton (Abm) Pada Model Penyakit Kanker. *J. Mat. MANTIK* 2, 14–21.
- Lee, R.E., 2000. Effervescent tablets. CSC publishing, Tablets & capsules.
- Liu, J., Xing, J., Fei, Y., 2008. Green tea (*Camellia sinensis*) and cancer prevention: a systematic review of randomized trials and epidemiological studies. *Chin. Med.* 3, 12. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-3-12>
- Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 15, Penerbit ITB, Bandung.
- Neldawati, N., 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar Phys.* 2.
- Nurani, L.H., 2011. Uji Sitotoksitas, Antiproliferatif, Dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi P53 Dan Bcl2 Dari Fraksi Etanol Infusa Daun Teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) Terhadap Sel HeLa. *Maj. Obat Tradis.* 16(1), 14 – 21.
- Nurani, L.H., 2015. Cytotoxicity, Antiproliferative Assays, And Expression of p53 And Bcl2 Of Ethanolic Fraction From Tea (*Camellia sinensis* (L.) ok) leaves Infuse To Hela Cells. *tradit. med. J.* 16, 14–21.
- Nurani, L.H., 2013. Isolasi dan Uji Penangkapan Radikal Bebas DPPH Oleh Isolat-1, Fraksi Etil Asetat, dan Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). *Pharmaciana* 3.
- Rachmawati, E., Karyono, S., Suyuti, H., 2013. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *J. Kedokt. Brawijaya* 27, 28–33.
- Suhendi, A., 2011. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Pharmacoon J. Farm. Indones.* 12, 73–81.
- Syamsul, E.S., Supomo, S., 2014. Formulation Of Effervescent Powder Of Water Extract Of Bawang Tiwai (*Eleuterine palmifolia*) AS A HEALTHY DRINK. *Maj. Obat Tradis. Tradit. Med. J.*, Vol. 19(3), p 113-117 19, 113–117.
- Zhai, S., Dai, R., Friedman, F., and Vestal, R., 1998, Comparative Inhibition Of Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2 By Flavonoids, *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 10, 989-9.