

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk melihat kebenaran atau keaslian identitas tanaman tersebut, sehingga dapat mengurangi kesalahan dalam pengambilan bahan yang akan diteliti. Dari hasil determinasi kulit jeruk mandarin dengan nama latin *Citrus reticulata* Blanco berasal dari suku *rutaceae* dan daun teh dengan nama latin *Camellia sinensis* (L.) O.K dari suku *theaceae*. Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada unit 2, Yogyakarta. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Ekstraksi

Sebanyak 309,03 gram serbuk simplisia dau teh (*Camellia sinensia*) dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) sebanyak 500 gram dimaserasi selama 5 hari perbandingan 1: 6 dengan menggunakan pelarut etanol 70% sambil sesekali di aduk, adapun tujuan dari pengadukan ini yaitu untuk menghomogenkan agar dapat terjadi keseimbangan konsentrasi larutan selama proses perendaman. Setelah 5 hari tahap selanjutnya dilakukan penyaringan melalui 2 tahap yang pertama disaring menggunakan kain putih dan yang kedua disaring dengan menggunakan kertas saring dan didapatkan ekstrak cair dari daun teh sebanyak 1,854 ml dan kulit jeruk sebanyak 1,982 ml. Setelah dimaserasi selama 5 hari

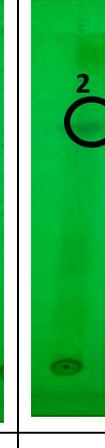
dilakukan pengambilan filtrat dan dilakukan pemekatan dengan *Rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan putaran 60 rpm, sehingga komponen senyawa yang terdapat dalam kulit jeruk dan daun teh tidak mengalami kerusakan. Ekstrak kental yang di dapat dari penelitian ini sebanyak 27,3 gram ekstrak teh dan 26,4 gram ekstrak kulit jeruk, Secara mikroskopis ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk bewarna hitam dengan bau yang khas.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terdapat dalam sampel ekstrak kulit jeruk dan daun teh, pemisahan dilakukan beberapa kali untuk mendapatkan pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik serta noda zat warna yang bagus. Lempeng KLT yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan yaitu Butanol:Asetat:Air dengan perbandingan 7:2:1 dengan pembanding senyawa flavonoid yaitu rutin. Fase gerak butanol, asetat dan air dimasukkan ke dalam *chamber* tunggu beberapa saat sampai jenuh hingga terjadi elusi dan kemudian fase diam ditotolkan 5-8 kali totolan dengan menggunakan sampel yang akan di uji dan kemudian dimasukkan kedalam fase gerak, setelah selesai plat di uap dengan amoniak. Bercak pada plat KLT di monitor dibawah sinar tampak lampu UV 254 dan UV 366 nm. Hasil dari uji KLT dapat di lihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebelum diuap amoniak								
Sinar tampak			254 nm			366 nm		
								
Rutin	EDT	EKJ	Rutin	EDT	EKJ	Rutin	EDT	EKJ

Setelah diuap amoniak								
Sinar tampak			254 nm			366 nm		
								
Rutin	EDT	EKJ	rutin	EDT	EKJ	rutin	EDT	EKJ

Pada pengujian kromatografi lapis tipis terlihat adanya warna yang samar pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm pada plat yang belum di uap amoniak dan setelah di uap amoniak pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm terlihat adanya warna kuning kecoklatan menunjukkan adanya fluoresensi. Deteksi menggunakan sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm menghasilkan 3 bercak ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh. Hasil uji kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada tabel 6 berikut.

Tabel 3. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis

Nomor Bercak	RF	Sebelum di Uap Amoniak		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,62	Kuning	Meredam	Ungu Tua
2	0,65	Kuning	Meredam	-
3	0,87	Kuning	Meredam	Ungu Tua

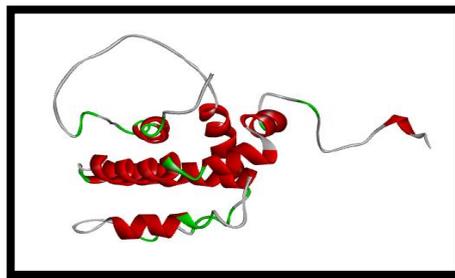
Nomor Bercak	RF	Sesudah di Uap Amoniak		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,62	Kuning	Meredam	Ungu Tua
2	0,65	Kuning	Meredam	-
3	0,87	Kuning	Meredam	Ungu Muda

Hasil pengamatan dari kromatografi lapis tipis memperlihatkan adanya bercak berwarna kuning pada no 1 sebelum diuap amoniak pada sinar tampak dan sesudah diuap amoniak terlihat bercak berwarna kuning pada sinar tampak no 1, 2 dan 3. Pada sinar UV 254 nm sampel meredam pada plat no 1 dan 3, sedangkan pada sinar UV 366 nm terlihat warna ungu tua. Semua senyawa flavonoid pada sinar UV 366 nm akan memberikan fluoresensi lembayung gelap, biru, kuning dan hijau (Harbome, 1987). Kromatogram

sampel menunjukkan nilai R_f pada bercak No. 2 pada sampel EDT dengan nilai 0,65 sedangkan nilai R_f pembanding dari rutin sendiri yaitu 0,62. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa sampel EDT mengandung senyawa flavonoid. Pada sampel EKJ menunjukkan nilai R_f 0,87 sedangkan pembanding rutin memiliki nilai 0,62, dari hasil tersebut menunjukkan sampel EKJ juga mengandung flavonoid.

4. *Molecular Docking*

Sebelum dilakukannya pengujian secara *In-vitro* dilakukan uji pendahuluan dengan *In-silico* yaitu dengan *molecular docking* dilakukan dengan aplikasi autodock Vina serta beberapa aplikasi pendukungnya seperti Open Babel untuk mengkonversi tipe file serta DS Visualizer untuk menampilkan struktur serta interaksi ligan protein. Pada uji ini dilakukan pada protein Bcl-x1 yang berperan dalam proses apoptosis, struktur dari Bcl-x1 dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur Protein Bcl-x1 (Oltersdorf dkk., 2005)

Docking dilakukan dengan cara melakukan *docking native ligand* pada reseptor. Metode *docking* dilakukan validasi dengan *redocking native ligand* pada *binding site* untuk mendapatkan nilai RMSD dan nilai dari RMSD serta

score docking dari setiap ligan terhadap protein Bcl-xl pada kode protein 1YSG dan 4TUH dapat dilihat pada tabel 7 dan 8.

Tabel 4. Hasil *Molecular Docking* Protein Bcl-xl pada kode protein 1YSG

NO	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	Score Docking (kcal/mol)
1	Native Ligand	2	0,992	-6,4
2	Kaemferol	8	1,738	-6,7
3	Tangeretin	5	1,333	-4,5
4	5-Flurourasil	2	1,437	-4,9
5	Doxorubicin	2	1,207	-3,6

Tabel 5. Hasil *Molecular Docking* Protein Bcl-xl pada kode protein 4TUH

NO	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	Score Docking (kcal/mol)
1	Native Ligand	3	1,422	-7,8
2	Kaemferol	3	1,930	-6,4
3	Tangeretin	2	1,132	-5,8
4	5-Flurourasil	5	1,513	-7,0
5	Doxorubicin	5	1,901	-4,5

Hasil *docking* yang berupa *score* yang menggambarkan kekuatan suatu ikatan yang stabil antara ligan dan reseptor. Semakin kecil *score* yang diperoleh maka ikatan antara ligan dan reseptor semakin stabil, dimana setiap senyawa uji akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda-beda sehingga dapat dipilih konformasi dengan nilai RMSD < 2Å. Senyawa *kaemferol* dan *tangeretin* dipilih konformasi ke 8 dan 5 pada kode protein 1YSG dengan nilai RMSD 1,738 Å dan 1,333 Å dengan *score docking* -6,7 kcal/mol untuk senyawa *kaemferol* dan -4,5 kcal/mol untuk senyawa *tangeretin*. Ligan asli (*Native Ligand*) memiliki nilai RMSD 0,992 Å dan

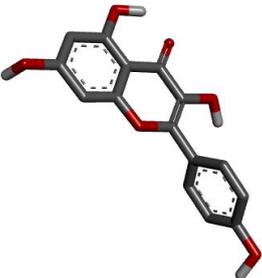
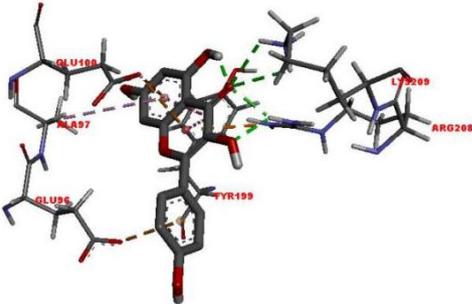
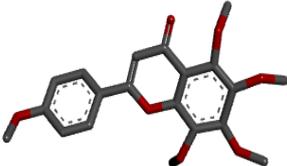
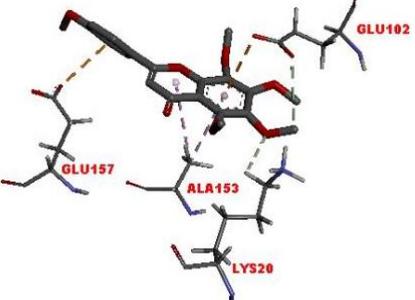
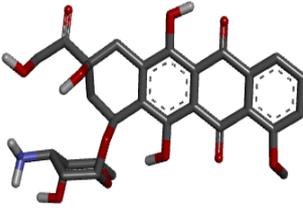
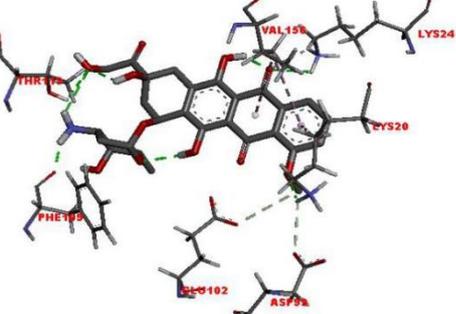
memiliki nilai score docking -6,4 kcal/mol pada konformasi ke 2, dari hasil tersebut senyawa *tangeretin* lebih rendah dari *native ligand* sedangkan pada senyawa *kaemferol* lebih tinggi dari *Native ligand*. *5-Fluourasil* dan *doxorubicin* memiliki nilai RMSD 1,437 Å dan 1,207 Å dengan *score docking* -4,9 kcal/mol dan -3,6 kcal/mol pada konformasi ke 2 untuk *5-Fluourasil* maupun *doxorubicin*. Senyawa *kaemferol* tidak lebih baik dari *5-Fluourasil* dan *doxorubicin* sedangkan pada senyawa *tangeretin* lebih baik dari *5-fluouracil* tapi tidak lebih baik dari *doxorubicin*.

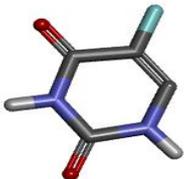
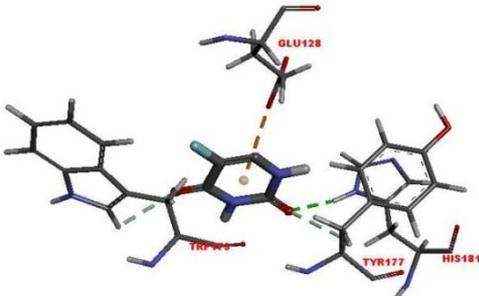
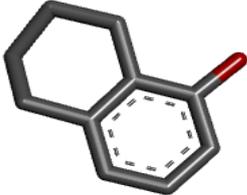
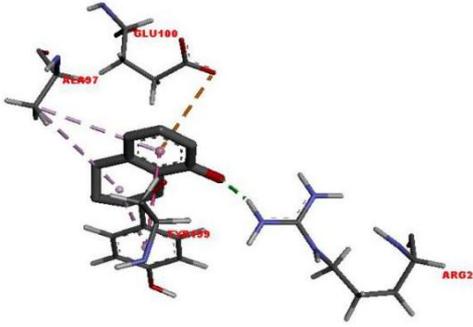
Senyawa *kaemferol* dan *tangeretin* dipilih konformasi ke 3 dan 2 pada kode protein 4TUH dengan nilai RMSD 1,422 Å dan 1,132 Å dengan *score docking* -6,4 kcal/mol untuk senyawa *kaemferol* dan -5,8 kcal/mol untuk senyawa *tangeretin*. Ligan asli (*Native ligand*) memiliki nilai RMSD 1,422 Å dan memiliki nilai *score docking* -7,8 kcal/mol pada konformasi ke 3, dari hasil tersebut senyawa *kaemferol* dan *tangeretin* memiliki nilai yang lebih baik dari *native ligand*. *5-fluourasil* dan *doxorubicin* memiliki nilai RMSD 1,513 Å dan 1,901 Å dengan *score docking* -7,0 kcal/mol dan -4,5 kcal/mol pada konformasi ke 5 untuk *5-fluourasil* maupun *doxorubicin*. Senyawa *tangeretin* dan *kaemferol* tidak lebih baik dari *doxorubicin* tapi lebih baik dari *5-fluouracil* terhadap protein Bcl-xl.

Senyawa yang diuji dan telah *didocking* dengan *Autodock Vina* dapat kita amati interaksinya secara visual menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, senyawa yang ditambahkan pada protein Bcl-xl akan berinteraksi dengan residu asam

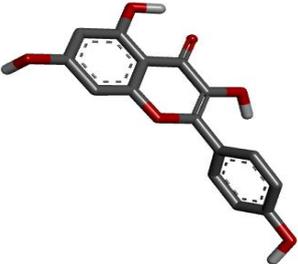
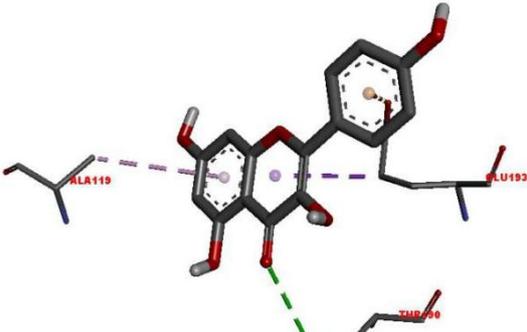
aminonya dan kemungkinan terjadinya ikatan antara senyawa yang di uji dan protein, hal ini dapat dilihat pada tabel 9 dan 10.

Tabel 6. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dan Protein Bcl-x1 (IYSG)

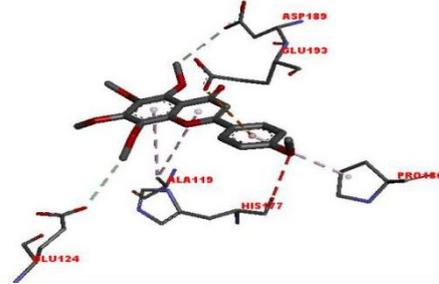
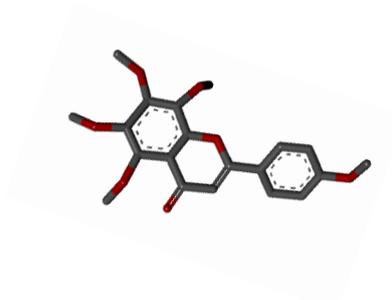
NO	Senyawa Uji	Potensi Ikatan Asam Amino
1	Kaemferol	Arginin(ARG 208), Lysin (LYS 209), Asam Glutamat (GLN 96,100), Alanin (ALA 97), Tirosin (TYR 199)
		
2	Tangeretin	Lysin (LYS 20), Alanin (ALA 153), Asam Glutamat (GLU 102,157),
		
3	Doxorubicin	Treonin (THR 113), Lysin (LYS 24,20), Fenilalanin (PHE 109), Valin (VAL 156), Asam Aspartat (ASP 99), Asam Glutamat (GLU 102)
		

4.	5-Flurouracil	Tirosin (TYR 177),Triptopan (TRP 173), Histidin (HIS 181),Asam Glutamat (GLU 128)
		
5.	Native Ligand	Glutamat (GLU 188), Alanin (ALA 97), Arginin (ARG 208), Tirosin (TYR 199)
		

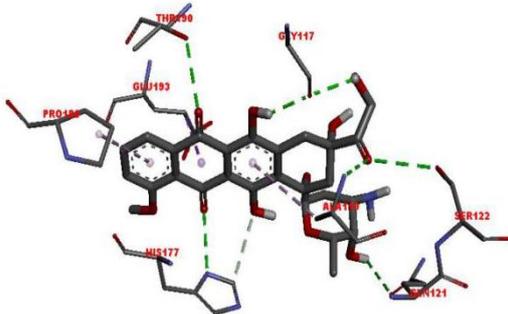
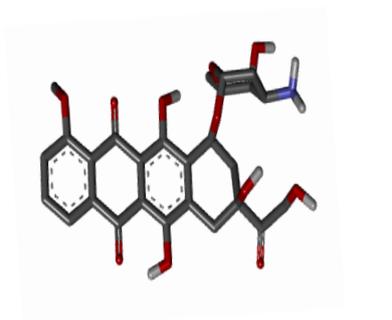
Tabel 7. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dan Protein Bcl-xl (4TUH)

NO	Senyawa Uji	Potensi Ikatan Asam Amino
1	Kaemferol	Treonin (THR 190), Alanin (ALA 119), Asam Glutamat (GLU 193)
		

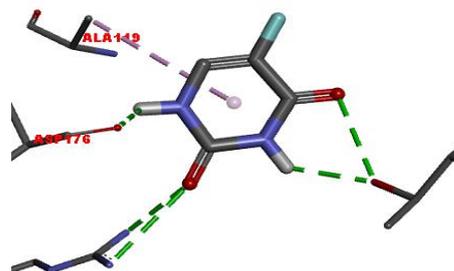
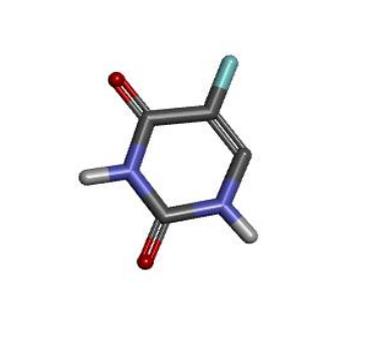
2 Tangeretin Asam Aspartat (ASP 189), Prolin (PRO 180), Asam Glutamat (GLU 193), Histidin (HIS 177), Alanin (ALA 119), Asam Glutamat (GLU 124)

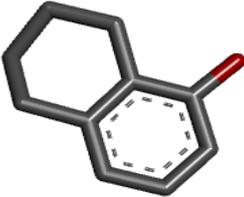
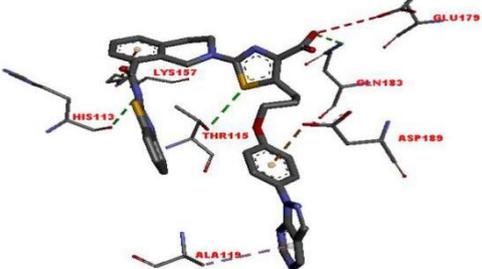


3 Doxorubicin Histidin (HIS 177), Alanin (ALA 199), Glutamat (121), Serin (122), Glisn (GLY 177), Treonin (THR 190), Asam Glutamat (GLU 193), Prolin; (PRO 180)

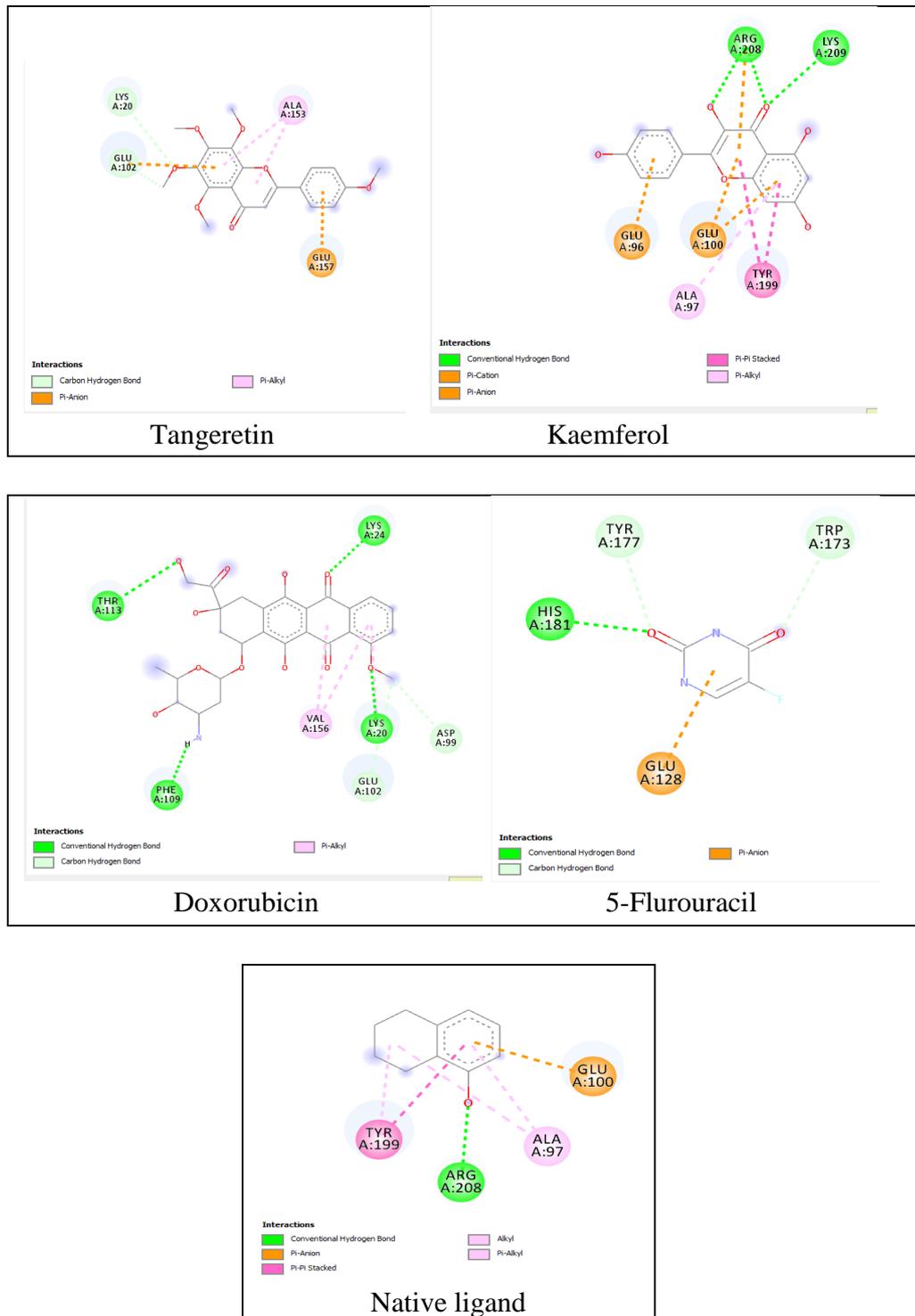


4 5-Flurouracil Arginin (ARG 165), Treonin (THR 190),Asam Aspartat (ASP 176), Alanin (ALA 119)

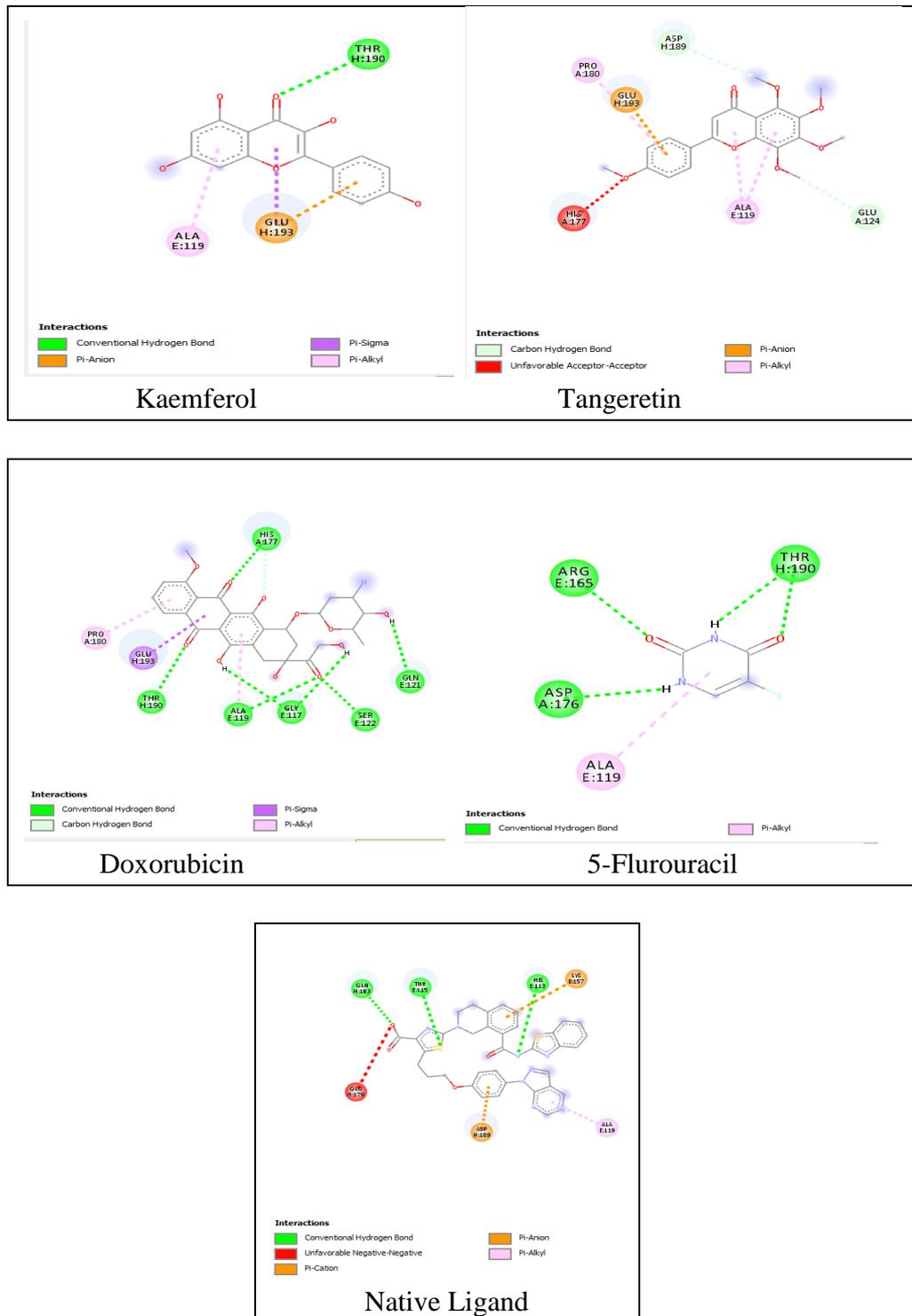


5	Native Ligand	Lisin (LYS 157), Histidin (HIS 113), Alanin (ALA 119), Asam Aspartat (ASP 189), Asam Glutamat (0GLU 179), Glutamin (GLU 183), Treonin (THR 115)
		

Senyawa-senyawa uji yang berikatan dengan protein Bcl-xl pada *binding site* tertentu sehingga dapat berpotensi untuk berikatan dengan asam amino disekitar *binding site*-nya. *Kaemferol* berikatan dengan lebih banyak asam amino, yaitu 6 asam amino sedangkan *tangeretin* 4 ikatan asam amino, tapi ikatan asam amino *tangeretin* tidak lebih bagus dari *doxorubicin* tapi lebih baik dari *5-Flurouracil* pada kode kode protein IYSG, sedangkan pada kode protein 4TUH *kaemferol* memiliki 3 ikatan asam amino sedangkan *tangeretin* memiliki 6 ikatan asam amino tetapi ikatan asam amino *tangeretin* tidak lebih bagus dari *doxorubicin* namun lebih baik dari *5-Flurouracil*. Jenis interaksi yang terbentuk antara senyawa uji dan residu asam amino ptotein Bcl-xl yaitu ikatan kovalen dan seperti yang ditunjuk oleh gambar 4 dan 5.



Gambar 4. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein Bcl-x1 (1YSG)



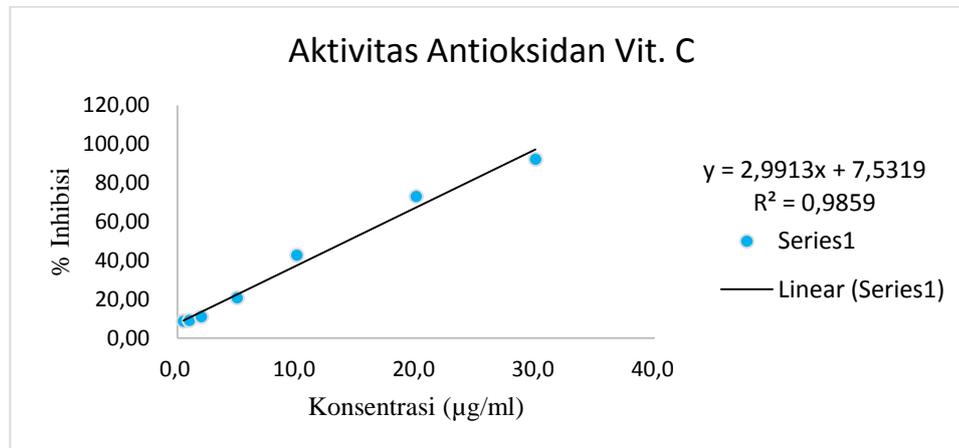
Gambar 5. Visualisasi 2D interaksi asam amino protein Bcl-x1 (4TUH)

5. Uji Antioksidan Metode DPPH

Penentuan suatu aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH. Pengujian dengan metode DPPH karena metode ini adalah metode sederhana, cepat, mudah dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk digunakan sebagai evaluasi aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh dilakukan dengan penangkapan radikal bebas DPPH dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pembanding yang dipilih dalam uji ini yaitu vitamin C. Penentuan panjang gelombang hasil uji pada penangkapan radikal bebas DPPH terhadap vitamin C dan ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh tertera pada Tabel 11.

Tabel 8. Uji aktivitas Antioksidan Vitamin C

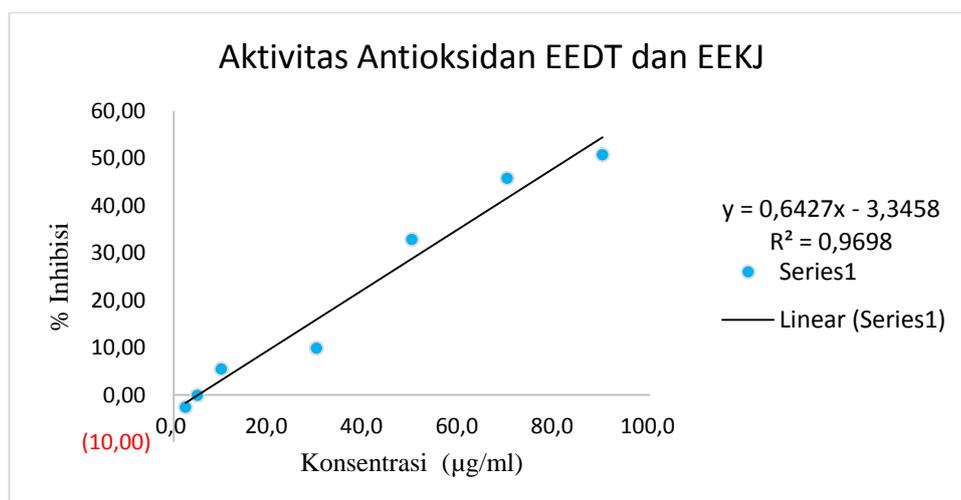
Konsentrasi ug/ml	Rata-rata Absorbansi	Absorbansi Blanko	Persen Inhibisi (%)
0,5	0,641	0,702	8,73
1,0	0,638	0,702	9,11
2,0	0,625	0,702	11,01
5,0	0,557	0,702	20,76
10,0	0,402	0,702	42,76
20,0	0,189	0,702	73,04
30,0	0,055	0,702	92,22
IC₅₀	14,197 µg/ml		



Gambar 6. Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vit. C terhadap DPPH

Tabel 9. Uji Aktivitas Antioksidan EDT dan EKJ

Konsentrasi µg/ml	Rata-rata Absorbansi	Absorbansi Blanko	Persen Inhibisi (%)
2,5	0,721	0,702	2,61
5,0	0,703	0,702	0,09
10,0	0,664	0,702	5,46
30,0	0,633	0,702	9,87
50,0	0,472	0,702	32,87
70,0	0,381	0,702	45,80
90,0	0,346	0,702	50,78
IC₅₀	83,00 µg/ml		



Gambar 7. Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan EDT dan EKJ terhadap DPPH

Seri kadar yang di dapatkan dari percobaan tersebut untuk vitamin C yaitu 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 dan 30,0. Sedangkan seri kadar untuk sampel adalah 2,5; 5,0; 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 dan 90,0. Panjang serapan dibaca pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH dan hasil panjang gelombang maksimum yang didapat adalah 514 nm. Berdasarkan hasil yang didapat pada tabel 5 dan 6 dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji dan kontrol positif, maka penangkapan suatu radikal bebas DPPH akan semakin besar. Jika semakin besar suatu konsentrasi larutan uji maka akan semakin banyak senyawa antioksidan yang akan bereaksi dengan radikal bebas DPPH. Grafik hubungan konsentrasi larutan uji dengan persen inhibisi diperoleh dengan cara memplotkan dari nilai persen inhibisi dan konsentrasi larutan uji, sehingga didapatkan suatu kurva regresi linier. Hasil kurva uji aktivitas antioksidan kombinasi EDT dan EKJ serta vitamin C dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7.

Nilai persen inhibisi diperoleh dari perhitungan yang dilakukan dengan cara memasukkan suatu nilai absorbansi ke dalam rumus persen inhibisi yang telah ditetapkan (Lampiran 2). Konsentrasi antara rutin dan Kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk yang dihubungkan dengan nilai persen inhibisi dapat menghasilkan persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier vitamin C dan kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh yang di dapat adalah $y = 2,9913x + 7,5319$ dengan $R^2 = 0,9859$ dan $y = 0,6427x + 3,3458$ dengan $R^2 = 0,9698$. Persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (sumbu x) dengan cara memasukkan nilai 50 kedalam

sumbu y pada persamaan regresi linier yang diperoleh. Hasil perhitungan menunjukkan nilai IC_{50} untuk vitamin c yaitu sebesar 14,197 $\mu\text{g/ml}$ untuk kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh yaitu dengan IC_{50} 83,00 $\mu\text{g/ml}$.

6. Formulasi Tablet

Pembuatan formulasi tablet ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh menggunakan metode granulasi basah. Tablet yang akan dibuat berbentuk bulat dengan berat 270 mg per tablet.

Tabel 10. Formulasi Tablet EDT dan EKJ

Bahan	Formulasi
Ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk	7,5
PVP	3,15
Amilum 10%	10,5
Laktosa	75,45
Mg stearat	0,786
Amilum 6 %	4,71
Talk	0,786
Alkohol 70 %	Qs

Pembuatan granul dengan menggunakan fase dalam yaitu zat aktif, amilum 10%, laktosa, PVP dan fase luar yaitu amilum 6%, mg stearat, talk. Fase dalam dicampur pada proses pembuatan granul sedangkan fase luar ditambahkan pada proses pencetakan tablet, setelah itu dilakukan beberapa uji formulasi tablet seperti uji keseragaman bobot dan uji waktu hancur untuk menentukan kesesuaian dari formulasi tablet yang telah ditentukan.

- Hasil pengujian kadar air granul:

Alat	: Moisture Analyzer
Suhu alat	: 105 ⁰ C
Berat granul yang di uji	: 3 gram
Waktu pengujian	: 5 menit
Kadar Air	: 1,62 %

- Uji Pemampatan

Tabel 11. Hasil Uji Pemampatan

Bahan	Sebelum	Sesudah	Hasil
Tabung A	126 ml	119 ml	5,59 %
Tabung B	126 ml	144 ml	9,52 %

Perhitungan uji pemampatan

$$I = \frac{V_0 - V_{500}}{V_0} \times 100 \%$$

Keterangan :

I = Indeks Kompresibilitas (%)

V₀ = Volume granul sebelum dimampatkan (ml)

V₅₀₀ = Volume granul setelah dimampatkan sebanyak 500 kali ketuk (ml)

Syarat : Tidak lebih dari 20%

- Uji Keseragaman Bobot

Tabel 12. Berat rata-rata 20 tablet

BERAT 20 TABLET	
1 = 744,2	11 = 785,5
2 = 742,2	12 = 784,6
3 = 756,2	13 = 747,2
4 = 747,8	14 = 756,7
5 = 766,2	15 = 755,5
6 = 752,2	16 = 749,0
7 = 744,4	17 = 746,2
8 = 786,5	18 = 744,2
9 = 778,4	19 = 768,7
10 = 779,0	20 = 789,5

Perhitungan dengan 20 tablet yaitu timbang 20 tablet dan hitung bobot rata-rata tiap tabletnya, berdasarkan ketentuan uji keseragaman bobot.

Rata-rata berat 20 tablet = $15224,2 : 20 = 761,21$

- Uji Waktu Hancur (< 15 Menit)

Tablet yang akan diuji sebanyak 6 tablet dimasukkan dalam tiap tube, ditutup dengan penutup dan dinaik-turunkan ke ranjang tersebut dalam medium air dengan suhu 37° C. Aquadest dimasukkan kedalam masing-masing tabung sebanyak 1000 ml, Hasil yang didapat yaitu 20 menit dimana range waktu hancur < 15 menit.

B. Pembahasan

1. Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Pengobatan pada terapi kanker menggunakan antioksidan semakin banyak dan berkembang terutama senyawa-senyawa yang berasal dari bahan-bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik yang tinggi. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan yaitu daun teh (*Camellia sinensis*) dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*). Daun teh dan kulit jeruk yang diperoleh dari daerah kaliurang dan bantul, yogyakarta masih dalam keadaan basah kemudian dicuci dengan air yang mengalir dan dikeringkan dengan sinar matahari yang dilapisi dengan kain hitam. Proses pengeringan bertujuan untuk menghentikan proses enzimatik yang mungkin masih bisa terjadi dan degradasi zat aktif dapat dikurangi.

Daun teh (*Camellia sinensis*) dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus, proses selanjutnya ekstraksi dengan menggunakan

etanol 70% dengan perbandingan serbuk dan pelarut yaitu 1: 6 dimaserasi selama 5 hari sambil sesekali diaduk setelah itu disaring, kemudian di keringkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak kental kulit jeruk yang di peroleh sebanyak 27,3 gram dan ekstrak kental daun teh yang diperoleh sebanyak 26,4 gram.

2. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik pemisahan menggunakan fase gerak dan fase diam, fase diam yang digunakan pada penelitian ini yaitu silika gel GF₂₅₄ sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu butanol: asetat: air dengan perbandingan 7:2:1. Selain fase gerak tersebut juga dilakukan percobaan kromatografi lapis tipis menggunakan fase gerak yang sama dengan rasio perbandingan yang berbeda yaitu 5:3:3 dan 4:1:5. Dari plot yang dihasilkan fase gerak dengan perbandingan 7:2:1 menunjukkan hasil pemisahan yang optimal tanpa adanya tailing.

Pada pengamatan hasil KLT Tabel 6 sebelum diuap amoniak menunjukkan warna kuning muda pada plat no 1 dengan menggunakan sinar tampak, pada sinar UV 254 menunjukkan warna menjadi meredam pada plat no 1, 2 dan 3, sedangkan pada sinar UV 366 menunjukkan warna ungu tua pada plat no 1 dan 3. Hasil yang di peroleh setelah diuap amoniak menunjukkan warna kuning tua pada plat no 1 sedangkan pada plat no 2 dan 3 bewarna kuning muda. Pada sinar UV 366 pada plat no 1 dan menghasilkan warna bercak ungu tua sedangkan pada plat no 3 dengan warna bercak ungu muda. Berdasarkan hasil tersebut, bercak pada nomor

1, 2 dan 3 dengan nilai Rf masing-masing 0,62, 0,65 dan 0,87 diduga ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh yang mengandung senyawa flavonoid. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan bercak bewarna kuning pada sinar tampak setelah diuap amoniak.

3. Penambatan Molekuler

Dalam rangka perkembangan senyawa antioksidan dengan target aksi yang spesifik, maka akan dilakukan pengkajian dan penelusuran mekanisme aksi secara *molecular docking*. Senyawa ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh diduga memiliki aktivitas penurunan insidensi kanker yaitu senyawa golongan flavonoid. *Molecular docking* atau penambatan molekul adalah metode komputerisasi yang mampu memperkirakan interaksi suatu senyawa dengan protein melalui jalur energi terendah

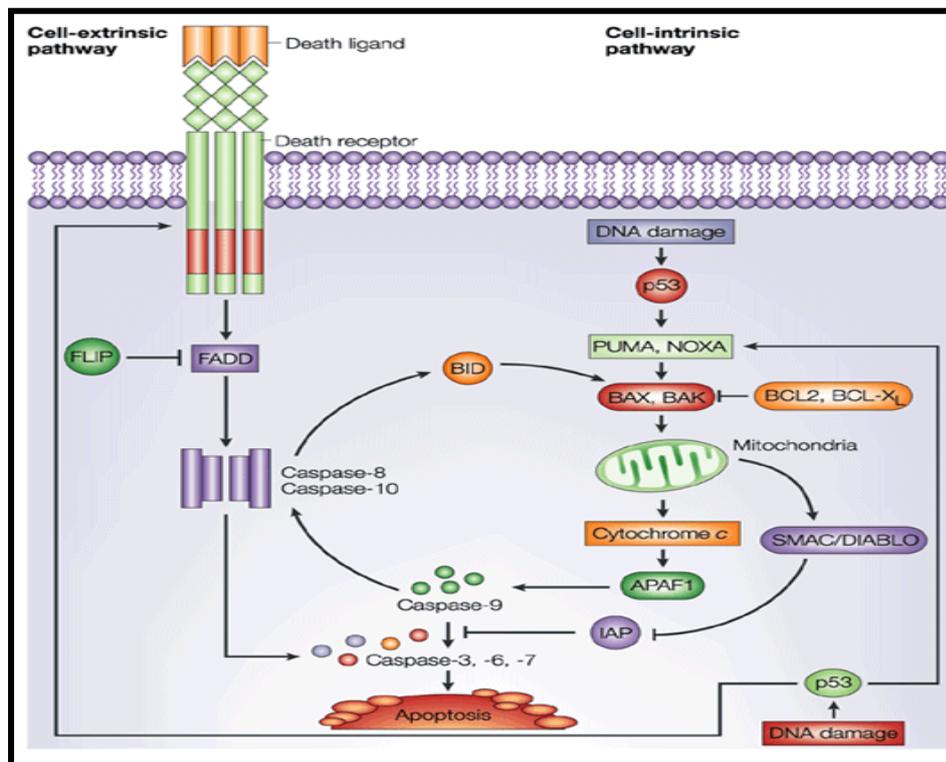
Parameter yang dilihat dari hasil *molecular docking* adalah nilai *score docking*. Nilai *score docking* itu sendiri adalah suatu nilai yang menunjukkan besarnya energi yang dibutuhkan senyawa uji berinteraksi dengan senyawa target, dimana semakin rendah nilai *score docking* maka semakin kecil pula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

Pada penelitian ini senyawa uji yang digunakan sebagai ligan yaitu *kaempferol*, *tangeretin*, *native ligand*, serta senyawa agen kemoterapi yaitu *doxorubicin* dan *5-fluorouracil*. Protein Bcl-x1 yang digunakan sebagai senyawa target yang memiliki peran dalam pertumbuhan pada sel kanker payudara, protein Bcl-x1 ini sendiri merupakan suatu transmembran

protein dengan berat molekul 26 kDa, Bcl-xl yang tersusun dari 233 asam amino. Protein Bcl-xl terletak pada membran luar mitokondria, selain itu Bcl-xl juga terletak di retikulum endoplasma dan pada membran nucleus. Bcl-xl berfungsi untuk menjaga integritas membran, mencegah pengeluaran protein intermembran dari mitokondria dan mencegah pengeluaran ion Ca^{2+} dari retikulum endoplasma.

Protein Bcl-xl juga berperan dalam penghambatan jalur intrinsik apoptosis. Pada saat terdapat stimulus apoptosis, Bcl-xl yang terdapat pada membran luar mitokondria diikat oleh Bad, suatu protein Bcl-2 proapoptosis, sehingga Bcl-xl tidak dapat melakukan fungsinya dalam menghambat apoptosis. Stimulus apoptosis menyebabkan Bax yang terdapat di sitosol akan bergerak menuju membran luar mitokondria. Di luar mitokondria Bax mengalami oligomerisasi dan membentuk suatu kanal pada membran luar mitokondria, sedangkan Bax yang merupakan transmembran protein pada membran luar mitokondria segera mengalami *oligomerisasi* dan membentuk kanal pada membran luar mitokondria setelah terdapat stimulus apoptosis. Melalui kanal yang dibentuk oleh Bax dan Bak, *cytochrome c* serta protein intermembran akan keluar dari mitokondria menuju sitosol, di sitosol *cytochrome c* berikatan dengan apaf-1. Apaf-1 kemudian berikatan dengan ATP dan mengalami *oligomerisasi*. Kemudian beberapa molekul *procaspase 9* akan berikatan dengan apaf-1, agregasi *procaspase 9* tersebut akan menyebabkan *procaspase 9* melakukan *selfcleavage* sehingga *procaspase 9* akan aktif

menjadi *caspase* 9. Kompleks apaf-1 *cytochrome c*, *caspase* 9, serta ATP disebut *apoptosome*. *Caspase* 9 kemudian akan mengaktifkan *caspase* 3,6 dan 7 yang memprotolisis protein-protein sel dan memicu terjadinya kematian sel dan dapat dilihat pada gambar 8. Kode protein yang digunakan yaitu 1YSG dan 4TUH yang digunakan sebagai protein target dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand*. Proses preparasi senyawa uji dengan optimasi struktur senyawa uji dilakukan dengan menggunakan bantuan program *Marvin Sketch*. Struktur 3D senyawa uji digambar lengkap dengan atom hidrogen setelah itu dilakukan optimasi konformasi.



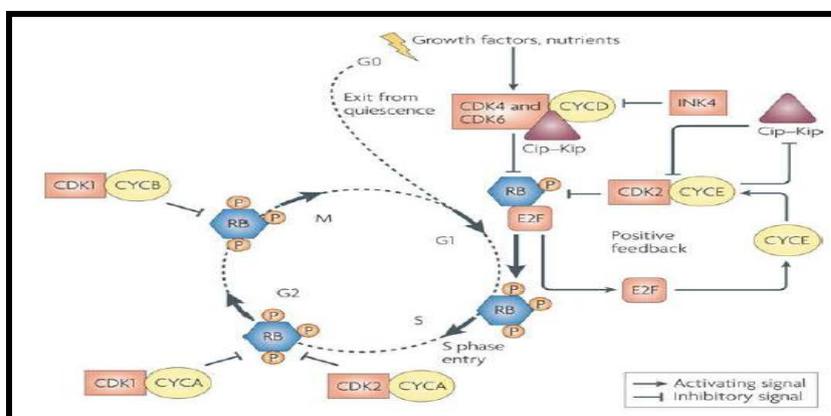
Gambar 8. Jalur Apoptosis Intrinsik dan Ekstrinsik (CCRC, 2009)

Bcl-x1 dapat melakukan fungsinya untuk menghambat apoptosis apabila terdapat survival stimulus. Stimulus survival akan mengaktifkan *phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway*. Akt yang mengalami aktivitas akan *memfosforilasi* Bad. Bad yang terfosforilasi akan melepaskan Bcl-x1, sehingga Bcl-x1 dapat melaksanakan fungsinya untuk menghambat apoptosis. Bcl-x1 akan mengikat Bak dan Bax. Bak dan bax yang diikat oleh Bcl-x1 tidak dapat mengalami *oligomerisasi* sehingga tidak dapat membentuk suatu kanal pada membran luar mitokondria, sehingga tidak terjadi pelepasan *cytochrome c*. Tidak adanya pelepasan *cytochrome c* menyebabkan tidak terbentuknya interaksi apaf-1 dan *cytochrome c*, sehingga tidak terjadi *caspase cascade* yang memicu kematian sel.

Hasil data yang diperoleh dapat divalidasi menggunakan nilai RMSD (*root mean square deviation*). RMSD adalah nilai penyimpangan antara suatu konformasi ligan dengan pembandingnya, jika penyimpangannya terlalu besar maka kesalahan terjadi pada prediksi interaksi ligand dan protein. Data dapat dikatakan valid jika nilai RMSD < 2 Å. Berdasarkan data *molecular docking* dengan *Autodock Vina* seluruh interaksi senyawa uji *tangeretin*, *kaemferol*, *ligan asli*, *doxorubicin* dan *5-flurouracil* memiliki nilai RMSD < 2 Å, maka data tersebut dinyatakan valid.

Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa *score docking* yang di peroleh dengan cara menganalisis dengan membandingkan nilai *score docking* ligan uji dengan *native ligand*. Hasil data dari *molecular docking* dapat dilihat pada tabel 4 dan 5 Senyawa uji dari *tangeretin* pada komformasi ke 5 yang terdapat pada kulit jeruk mandarin memiliki nilai *score docking* paling kecil di antara senyawa uji yang lain tapi tidak lebih kecil dari agen kemoterapi *doxorubicin*. Namun senyawa uji *tangeretin* memiliki nilai *score docking* yang lebih rendah dari agen kemoterapi *5-fluorouracil* yang memiliki nilai *score docking* yang cukup tinggi.

Pada hasil uji *molecular docking* menunjukkan bahwa ikatan antara senyawa flavonoid *tangeretin* terhadap protein Bcl-xl memiliki aktivitas inhibisi lebih stabil, sehingga aktivitasnya lebih tinggi terhadap Bcl-xl. Sedangkan senyawa flavonoid *kaempferol* memiliki aktivitas yang hampir sama dengan agen kemoterapi *5-fluorouracil* dan *native ligand*. Flavonoid menghambat protein Bcl-xl dengan mekanisme induksi proliferasi siklus sel fase G1 tanpa aktivitas apoptosis dapat kita lihat pada gambar 6 berikut.



Gambar 9. Ilustrasi Umum Siklus Sel (CCRC, 2009)

Mekanisme siklus sel 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 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 pengekspresi 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 .

Hasil tersebut juga dapat dilihat pada visualisasi 3D menggunakan aplikasi DS *Visualizer* antara ligan dan senyawa target. Senyawa uji *tangeretin* sebanding dengan *5-fluorouracil* yang mengikat 4 dan 6 ikatan hidrogen, yang berinteraksi pada asam amino lisin pada posisi 20 (LYS 20), Alanin pada posisi 153, 119 (ALA 153, 119), Asam Glutamat pada posisi 102, 157, 193, 124 (GLU 102, 157, 193, 124), Asam Aspartat pada posisi 189 (ASP 189), Prolin pada posisi 180 (PRO 180), Histidin pada posisi 177 (HIS 177) yang hampir sama dengan senyawa *native ligand* dan *5-fluorouracil* tapi tidak dengan agen kemoterapi *doxorubicin* yang memiliki ikatan asam amino lebih banyak dibandingkan dengan *tangeretin* yang memiliki ikatan asam amino 7 dan 8.

Senyawa *kaemferol* mengikat 6 dan 3 ikatan hidrogen yang berinteraksi dengan asam amino Arginin pada posisi 208 (ARG 208), Lisin pada posisi 209), Asam Glutamat pada posisi 96,100,193 (GLU 96,100,193), Alanin pada posisi 97,119 (ALA 97,119), Tirosin pada posisi 199 (TYR 199), Treonin pada posisi 190 (THR 190). *Kaemferol* memiliki ikatan asam amino lebih banyak dibandingkan dengan *native ligan* yaitu 6 ikatan pada kode protein 1YSG dan mengikat 3 ikatan pada kode protein 4TUH. *Kaemferol* memiliki ikatan yang hampir sama dengan 5-*flurouracil*, tapi tidak dengan *doxorubicin* yang memiliki ikatan asam amino yang lebih banyak. Semakin banyak ikatan yang terbentuk antara ligan dan protein target, maka potensi aktifitas suatu senyawa tersebut semakin kuat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji *tangeretin* dengan uji *in silico* memiliki potensi yang kuat dalam aktifitas penghambatan terhadap protein Bcl-xl dan senyawa *kaemferol* kurang poten dalam inhibisi protein Bcl- xl namun kekuatannya masih sebanding dengan ligan aslinya.

4. Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian antioksidan dengan metode DPPH dengan senyawa kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh, adapun prinsip dari metode DPPH ini yaitu dengan melihat perubahan warna dari sampel saat direaksikan dengan menggunakan *reagen* DPPH. Bila dilihat secara visibel *reagen* DPPH yang mengandung kromofor dapat menimbulkan warna ungu, warna ungu akan memudar menjadi warna

kuning jika direaksikan dengan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Setelah terjadi perubahan warna pada sampel kemudian dibaca pada lamda 514 nm menggunakan spektrofotometer.

Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan dengan cara memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus inhibisi memberikan nilai IC_{50} 83,00 $\mu\text{g/ml}$, yang memiliki aktivitas antioksidan berpotensi kuat sebagai anti kanker payudara dengan mekanisme antioksidan. Kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh memiliki aktivitas yang tergolong kuat, meskipun demikian aktivitas ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh memiliki nilai IC_{50} yang besar bila dibandingkan dengan pembandingnya yaitu vitamin C 14,2 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa vitamin C merupakan senyawa yang lebih murni dibandingkan dengan senyawa ekstrak yang diuji, serta vitamin C juga dikenal sebagai antioksidan yang kuat dengan mekanisme menangkap senyawa serta mencegah terjadinya reaksi berantai.

Nilai IC_{50} yang terlalu besar atau hasil antioksidan yang didapat terlalu kecil dapat disebabkan karena senyawa dari flavonoid yang mengikat gugus dapat menghambat aktivitas antioksidan yang tidak terdapat pada ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh, sehingga tidak dapat menyumbangkan flavonoid dan DPPH tidak dapat menerima hidrogen beserta elektron. Walaupun nilai IC_{50} yang didapat pada ekstrak etanolik kulit jeruk dan daun teh lebih besar dari senyawa pembandingnya

yaitu vitamin C, namun nilai IC_{50} 83,00 ug/ml dinyatakan berpotensi sebagai antioksidan.

5. Formulasi Sediaan Tablet

Pada data uji antioksidan dan *molecular docking* yang baik, maka penelitian ini dapat dilanjutkan dengan uji formulasi kombinasi sediaan tablet ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh. Pada pembuatan formulasi tablet dilihat dari aktivitas antioksidan.

Kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh digunakan sebagai zat aktifnya, mg stearat digunakan sebagai bahan pelicin agar granul tidak melekat ada *punch* pada fase luar, sebagai pengikat digunakan PVP sebanyak 3% dan sebagai pelarutnya digunakan alkohol 70%. Laktosa digunakan sebagai bahan pengisi pada pembuatan tablet, talk bertujuan sebagai glidan dan amilum bertujuan sebagai bahan penghancur pada fase luar dan dalam pada pembuatan formulasi sediaan tablet.

Setelah pencampuran formulasi dilakukan beberapa uji granul dan uji tablet. Uji kadar air granul dinyatakan sebagai LOD (*Lost on Drying*) atau susut pengeringan. Uji kadar air dilakukan dengan cara otomatis, yaitu dengan menimbang granul dalam keadaan kering menggunakan alat *Moisture Analyzer* setelah proses pengeringan. Cara kerja dari alat ini adalah dengan mengukur kelembaban yang menguap dari bahan uji. Dari hasil pengukuran, diperoleh kadar air atau susut pengeringan granul

kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh sebesar 1,65% dan tidak sesuai dengan persyaratan yaitu 2-5%.

Uji pemampatan granul dengan cara, bagi granul menjadi 2 bagian sama rata dan ditimbang dengan berat yang sama yaitu 126 ml pada masing-masing tabung, masukkan masing-masing granul yang sudah ditimbang pada tabung A dan B pada alat uji *jolting volumeter*, hasil yang didapat pada uji pemampatan yaitu tabung A 199 ml dengan persentase hasil 5,55% pada tabung B 114 ml dengan persentase 9,52% dari hasil tersebut nilai yang didapat baik dimana syarat dari uji pemampatan itu sendiri tidak lebih dari 20%.

Setelah proses uji granulasi selesai dilakukan pengempaan tablet dan uji tablet. Uji keseragaman bobot tablet, pengujian ini dilakukan untuk melihat keseragaman suatu tablet dengan menimbang satu persatu dari tablet yang telah kita buat kemudian kita hitung rata-rata tiap tablet. Uji keseragaman bobot dilakukan dengan menimbang sebanyak 20 tablet. Pada penelitian ini ada beberapa tablet yang tidak memenuhi syarat sebanyak 8 tablet yang menyimpang dari rata-rata 20 tablet, sehingga tablet tidak memenuhi uji keseragaman bobot, dimana jika ditimbang satu persatu tidak boleh lebih dari dua tablet menyimpang dari bobot rata-rata tablet.



Gambar 10. Gambar granul setelah pengeringan dan tablet setelah pencetakan

Uji waktu hancur tablet atau uji *disintegration tester*, pada uji ini digunakan untuk menentukan dan mengukur waktu yang dibutuhkan sejumlah tablet untuk hancur menjadi serbuk granul atau penyusunnya. waktu hancur yang dibutuhkan pada formula tablet kombinasi ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh yaitu 20 menit, waktu ini tidak memenuhi standar yang telah ditetapkan, karena waktu hancur tablet yang ditetapkan adalah tidak lebih dari 15 menit. Dari hasil uji keseragaman bobot, waktu hancur, uji pemampatan, uji kadar air formulasi sediaan tablet ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh, dapat disimpulkan bahwa formulasi tablet tersebut belum dapat diaplikasikan.