

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi buah *M. citrifolia* L. dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian. Tujuannya adalah untuk menghindari kesalahan pengambilan sampel analisis (Harborne, 1987). Hasil identifikasi diketahui bahwa tumbuhan yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah buah *M. citrifolia* L. Surat keterangan hasil identifikasi buah *M. citrifolia* L. dapat dilihat pada lampiran 2.

B. Penyiapan Sampel

Buah *M. citrifolia* L. didapatkan dari daerah Kota Gede, Yogyakarta. Buah yang dipilih adalah buah yang tidak terlalu muda dan terlalu tua. Buah dalam keadaan bersih dan segar. Proses pembuatan simplisia diawali dengan sortasi, dengan tujuan meminimalkan dan memisahkan bahan penelitian dengan kotoran yang menempel. Buah *M. citrifolia* L. dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dipotong tipis dan ditutup kain hitam lalu dikeringkan dengan sinar matahari. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk menghentikan proses enzimatik yang mungkin masih bisa terjadi sehingga degradasi zat aktif dapat dikurangi. Setelah dilakukan pengeringan dari 6 kg buah *M. citrifolia* L. didapatkan simplisia kering sebanyak 500 gram

dikarenakan banyaknya buah *M.citrifolia* L. yang busuk karena proses pengeringan dibawah sinar matahari.

C. Ekstraksi dan Fraksinasi

Hasil simplisia kering buah *M. citrifolia* L. sebanyak 500 gram diserbuk didapatkan hasil sebanyak 425 gram serbuk kering dan di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 selama 5 hari kemudian diremaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan yang sama selama 2 hari. Penggunaan etanol dalam metode maserasi ini karena kepolarannya besar sehingga sebagian besar kandungan aktif baik zat polar dan non polar akan terlarut. Pemilihan metode maserasi dikarenakan senyawa-senyawa yang terdapat dalam buah *M. citrifolia* L. tidak tahan oleh panas. Hasil ekstrak kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*, dari proses ini didapat ekstrak etanolik kental seberat 121 gram.

Ekstrak etanolik buah *M. citrifolia* L. kemudian dilarutkan dengan etanol dan difraksinasi dengan metode partisi cair-cair etanol 96% dan kloroform, kemudian dipisahkan dengan corong pisah didapatkan hasil sebesar 800 ml fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dan fraksi kloroform buah *M. citrifolia* L. sebanyak 400 ml. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan 33,3 gram ekstrak kental fraksi etanol dan 14 gram ekstrak kental fraksi kloroform buah *M. citrifolia* L. Usaha penemuan agen kemopreventif yang spesifik dan selektif pada buah *M. citrifolia* L. dilakukan dengan fraksinasi dengan tujuan menyederhanakan senyawa metabolit sekunder yang terekstraksi untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan sebagai

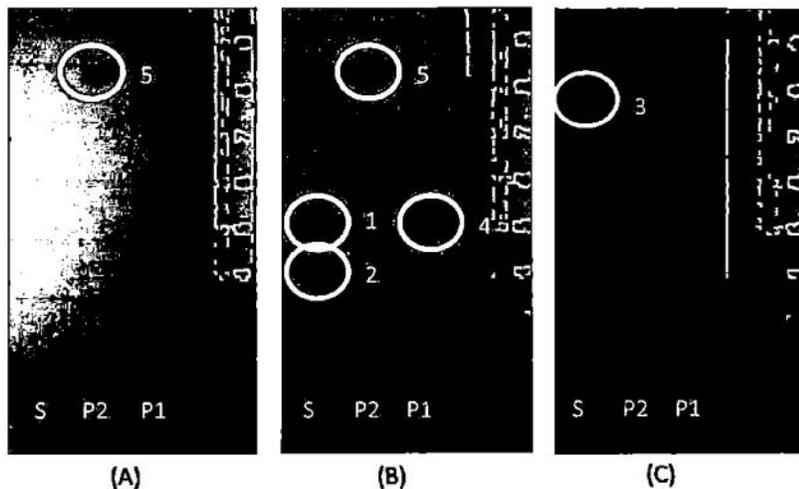
kemopreventif dan memisahkan senyawa aktif dari senyawa pengganggu ataupun senyawa lain. Senyawa flavonoid bersifat polar atau semipolar, sehingga digunakan etanol 70%. Penggunaan etanol 70% akan lebih efektif mengacu pada sifat polar etanol dalam mengekstrak senyawa flavonoid karena tingkat kepolaran etanol lebih rendah dibandingkan air. Hal ini akan mengakibatkan dinding sel tumbuhan yang bersifat kurang polar lebih mudah didegradasi dan senyawa flavonoid akan lebih mudah keluar dari sel tanaman (Tiwari *et al*, 2011). Oleh karena itu dengan penyari etanol diharapkan flavonoid yang terkandung dalam buah *M. citrifolia* L. dapat tersari kedalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar dan non polar, senyawa polar tersari kedalam etanol dan senyawa non polar tersari dalam kloroform.

Penelitian ini fokus pada fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. karena senyawa golongan flavonoid merupakan senyawa polar dan yang paling banyak diteliti aktivitas kemoprevensinya (Chang *et al*, 2001).

D. Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengetahui senyawa yang terdapat dalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dilakukan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi tersebut. Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. diidentifikasi adanya kandungan flavonoid yang diduga merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Identifikasi dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji ini dilakukan dengan menotolkan sampel fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. pada plat silika gel 60 F₂₅₄ yang disertai dengan standar rutin dan standar

quersetin. Plat dimasukkan ke dalam bejana yang berisi fase gerak yang telah jenuh. Fase gerak yang digunakan adalah Etil asetat – Asam asetat glasial – Asam format – air (100:11:11:25). Kemudian terjadi elusi hingga ujung plat. kemudian plat KLT diuapi dengan uap amoniak menunjukkan terbentuknya 1 noda pada sinar tampak yaitu flavonoid, terdapat pula 2 noda yang terpisah dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm, dan terbentuk 1 noda di bawah panjang gelombang 366 nm. Profil dari kromatogram hasil KLT fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Plat KLT yang sudah diuapi dengan uap amoniak dan dilihat pada (A) sinar tampak, (B) UV 254 nm, (C) UV 366 nm. (P1) rutin, (P2) Quersetin, (S) Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L.

Pada pengamatan kromatogram memperlihatkan tidak adanya warna pada pengamatan secara visibel setelah diuapi amoniak pada sampel dan pembanding rutin. Akan tetapi di bawah sinar UV 254 bercak No. 1 dan No. 2 mengalami peredaman dan pada bercak no. 3 di bawah sinar uv 366 nm terlihat adanya fluoresensi biru dan pada pembanding quersetin terdapat bercak pada sinar visible maupun sinar UV 254. Flavonoid tidak nampak

pada plat kromatogram, kecuali antosian (bercak jingga sampai lembayung yang menjadi biru dengan uap amoniak), khalkon, auron dan 6-hidroksi flavanol kuning). Oleh karena itu, untuk mendeteksi bercak, kromatogram diperiksa dengan sinar UV (366 nm dan 254 nm) dan dapat diperjelas dengan uap amoniak. Flavonoid yang mempunyai kromofor nampak terjadi pepadaman pada UV₂₅₄ (Sutiningsih, 2005). Dari ketiga bercak yang terlihat pada plat didapatkan Rf dari masing-masing bercak pada Tabel 4.

Tabel 4. Rf plat KLT Fraksi Etanol Buah *M. citrifolia* L.

No bercak	Rf	Warna Noda		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,4	-	Peredaman	-
2	0,33	-	Peredaman	-
3	0,8	-	-	Flouresensi biru menyala
4	0,4	-	peredaman	-
5	0,85	ada	peredaman	-

Uji kromatografi lapis tipis ini menunjukkan bahwa fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. mengandung rutin dengan nilai Rf 0,4. Hal ini ditunjukkan oleh gambar 2 pada bercak no 1, dimana nilai Rf tersebut sama dengan nilai Rf standar rutin yaitu 0,4. Hasil ini juga sama dengan penelitian Windriyati *et al* (2011) dimana disebutkan Rf pembanding rutin sebesar 0,44. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. mengandung senyawa flavonoid. Apabila dalam fraksi ada senyawa flavonoidnya maka bisa diprediksi kemungkinan mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan kanker dan dilakukan pengujian antioksidan terlebih dahulu.

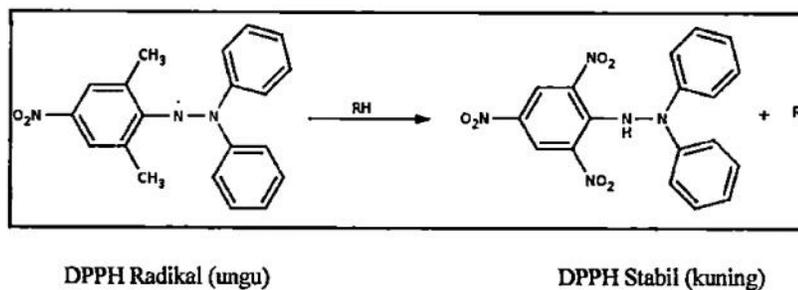
E. Uji Antioksidan Metode DPPH

Agen kemopreventif ditunjukkan dengan adanya mekanisme antioksidan, penetralan dan ekskresi senyawa karsinogenik atau melalui peningkatan kemampuan DNA repair (Beliveau dan Gingras, 2007; Katiyar *et al*, 2007; Surh dan Na, 2008; Walaszek *et al*, 2004). Menurut beberapa penelitian, suatu senyawa dapat digolongkan sebagai agen kemopreventif dikarenakan adanya mekanisme dalam penghambatan proses transformasi, proliferasi dan invasi dari sel kanker (Agarwal *et al*, 2000). Mekanisme kemopreventif pada antioksidan terjadi pada fase inisiasi. Pada fase ini antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas yang terdapat pada senyawa-senyawa yang bersifat karsinogenik seperti radikal oksigen, peroksida, dan superperoksida (Gordon, 1990). Senyawa radikal bebas ini berpotensi merusak DNA sehingga mengacaukan sistem info genetik dan berlanjut pada pembentukan sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida yang memicu munculnya penyakit degeneratif (Winarsi, 2007; Juniarti *et al*, 2009).

Aktivitas antioksidan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. secara kuantitatif ditentukan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), yaitu berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi atau menangkap radikal DPPH. DPPH menghasilkan radikal bebas aktif bila dilarutkan dalam alkohol. Kemampuan senyawa aktif dapat dilihat dari berkurangnya intensitas warna ungu dari larutan DPPH yang telah ditambahkan dalam sampel dan pembanding. Berkurangnya intensitas warna larutan DPPH tersebut dapat

menunjukkan bahwa terjadi reaksi antara atom hidrogen yang dilepas oleh bahan uji dengan molekul radikal DPPH sehingga terbentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang berwarna kuning. Semakin besar konsentrasi bahan uji, warna kuning yang dihasilkan akan semakin kuat. Pengurangan intensitas warna ungu larutan DPPH ini secara kuantitatif dapat dihitung dari berkurangnya absorbansi larutan tersebut.

Semakin besar konsentrasi bahan uji maka absorbansi yang terbaca semakin kecil, yang berarti aktivitas bahan uji dalam menangkap radikal DPPH semakin besar. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi sisa DPPH yang tidak bereaksi dengan larutan uji. Reaksi antara radikal DPPH dengan flavonoid sebagai senyawa penangkap radikal dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme peredaman radikal bebas oleh DPPH

Flavonoid dalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. akan melepaskan $H\cdot$ yang merupakan salah satu radikal bebas. $H\cdot$ akan berikatan dengan radikal DPPH membentuk senyawa baru yaitu difenil pikrilhidrazin yang stabil. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. sebagai penangkap radikal bebas yang kehilangan $H\cdot$ akan menjadi radikal

baru yang relatif lebih stabil dan tidak berbahaya bagi tubuh karena adanya efek resonansi inti aromatik.

Radikal bebas tersebut stabil dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 516 nm (Lampiran 6). Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum, yaitu gelombang yang menunjukkan senyawa mempunyai absorbansi paling besar. Pengukuran absorbansi suatu senyawa pada suatu analisis menggunakan panjang gelombang maksimum karena pada panjang gelombang tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi paling besar.

Aktivitas antioksidan dari larutan uji dapat dianalisis dari data hasil pengukuran absorbansi DPPH dengan adanya penambahan masing-masing larutan uji sebagai kontrol positif yang dibandingkan terhadap kontrol DPPH. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk mengetahui persen penangkapan radikal bebas DPPH yang menyatakan aktivitas antioksidan sampel dalam mereduksi radikal bebas DPPH. Persen penangkapan radikal bebas diketahui dengan cara absorbansi kontrol negatif dikurangi absorbansi bahan uji kemudian hasilnya dibagi dengan absorbansi kontrol negatif. Absorbansi kontrol negatif menunjukkan jumlah DPPH dalam larutan. Absorbansi kontrol negatif untuk fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. sebesar 1,081. Persen penangkapan radikal bebas DPPH fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase inhibisi. Nilai Absorbansi dan persen inhibisi serapan DPPH pada penelitian tertera pada Tabel 5 dan Tabel 6.

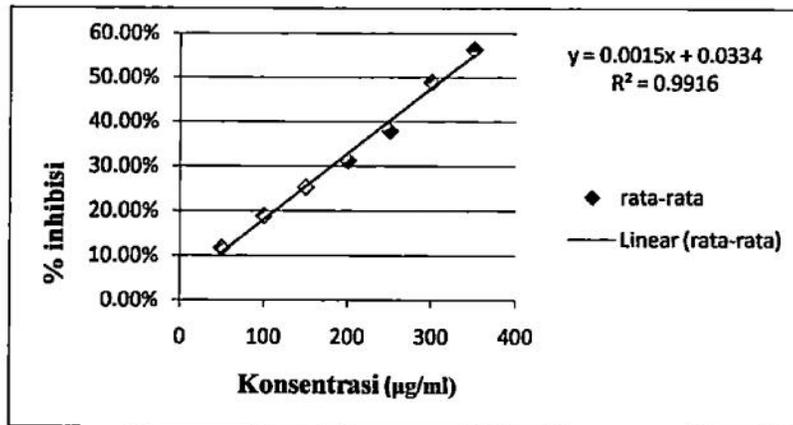
Tabel 5. Hasil Absorbansi Fraksi Etanol Buah *M. citrifolia* L.

Replikasi	Absorbansi pada Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)						
	50	100	150	200	250	300	350
Rep 1	0.955	0.878	0.807	0.745	0.672	0.552	0.473
Rep 2	0.957	0.876	0.807	0.743	0.673	0.552	0.472
Rep 3	0.954	0.877	0.808	0.742	0.672	0.552	0.473
Rep 4	0.955	0.876	0.809	0.742	0.672	0.555	0.473
Rata-rata	0.955	0.876	0.807	0.743	0.672	0.552	0.472

Berdasarkan data Tabel 5 diketahui bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji maka persentase penangkapan radikal bebas DPPH adalah semakin besar. Semakin besar konsentrasi larutan uji maka semakin banyak senyawa antioksidan yang bereaksi dengan radikal bebas DPPH. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa harga IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan senyawa untuk menangkap radikal DPPH. Grafik hubungan konsentrasi larutan uji dengan persen inhibisi dapat diperoleh dengan memplotkan nilai persen inhibisi dan konsentrasi larutan uji, sehingga dapat diperoleh suatu kurva regresi linier. Hasil uji aktivitas antioksidan dan kurva hasil uji aktivitas antioksidan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Buah *M. Citrifolia* L.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata Absorbansi	Aktivitas antioksidan \pm SD	Persamaan
50	0.955	11.61 \pm 0.0000	y = 0,0015x + 0,0334
100	0.876	18.84 \pm 0.0013	
150	0.807	25.22 \pm 0.0012	R = 0,9916
200	0.743	31.19 \pm 0.0019	
250	0.672	37.81 \pm 0.0000	IC_{50} = 311,067 $\mu\text{g/ml}$
300	0.552	48.77 \pm 0.0019	
350	0.472	56.22 \pm 0.0000	



Gambar 7. Grafik Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Buah *M. citrifolia* L.

Dari hasil regresi linier dapat dihitung nilai IC_{50} fraksi etanol *M. citrifolia* L. memiliki nilai IC_{50} sebesar 311,067 µg/ml. Menurut Mardawati, *et al.* (2008) hasil uji aktivitas antioksidan terlihat bahwa fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori lemah karena > 200 µg/ml.

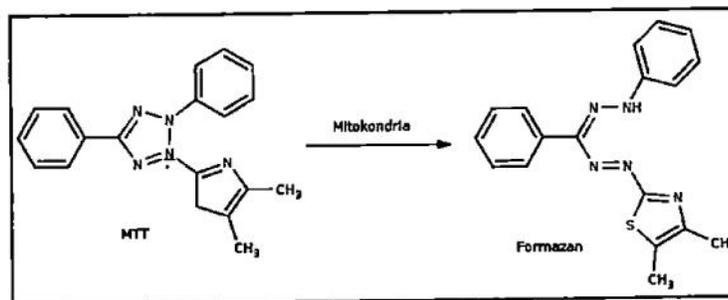
Mekanisme kemopreventif fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. adalah kemampuannya sebagai antioksidan sangat lemah mungkin dikarenakan senyawa rutin golongan flavonoid yang terkandung dalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. sedikit, terlihat dari hasil KLT pada kromatogram hanya terlihat samar-samar.

Pada penelitian sebelumnya uji antioksidan dengan fraksi etil asetat buah *M. citrifolia* L. mendapatkan nilai IC_{50} 7,90 µg/ml (Rohman *et al.*, 2005). Murniasih, 2006 juga menyebutkan bahwa pada ekstrak metanol buah *M. citrifolia* L. memiliki nilai IC_{50} sebesar 883,69 µg/ml dengan itu pada ekstrak metanol aktivitas antioksidannya jauh lebih lemah dibandingkan dengan

fraksi etanol, akan tetapi lebih lemah dibandingkan dengan fraksi etil asetat buah *M. citrifolia* L. hal ini kemungkinan dikarenakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan lebih banyak terdapat pada fraksi yang bersifat non polar.

F. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik pada penelitian ini merupakan pengujian lanjutan untuk mengetahui aktivitas kemoprevensi dari fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dengan menggunakan sel MCF-7. Penelitian ini menggunakan metode MTT Assay. Prinsip dasar MTT assay adalah mengukur aktivitas seluler berdasarkan aktivitas enzim suksinat dehidrogenase mitokondria sel untuk mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Pada proses metabolisme, enzim suksinat dehidrogenase dihasilkan oleh sel hidup. Enzim akan bereaksi dengan MTT membentuk Kristal formazan berwarna ungu dan jumlahnya sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Reaksi pembentukan Kristal formazan ditunjukkan oleh Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi garam MTT membentuk Kristal formazan

Aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7 ditentukan dengan menggunakan MTT (3,[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolium bromida). Pengujian

dengan menggunakan MTT didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium yang berwarna kuning dan larut dalam air menjadi kristal biru keunguan formazan yang tidak larut dalam air. Reaksi menggunakan MTT ini melibatkan piridin nukleotida kofaktor NADH dan NADPH yang hanya dikatalisis oleh sel hidup, sehingga jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 550 nm. Semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh mengindikasikan mortalitas (kematian) yang rendah (Fajarningsih *et al*, 2006). Absorbansi tersebut menggambarkan jumlah sel hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, absorbansi akan semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak MTT yang diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria, sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak. Absorbansi ini yang akan digunakan untuk menghitung persentase sel hidup sebagai respon. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (Anggrianti, 2008).

Hasil dari uji sitotoksik dengan metode MTT berupa nilai absorbansi dari masing-masing larutan uji dengan beberapa konsentrasi. Nilai absorbansi dari larutan uji dengan beberapa konsentrasi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai % hidup sel. Nilai % hidup sel MCF-7 dengan pemberian

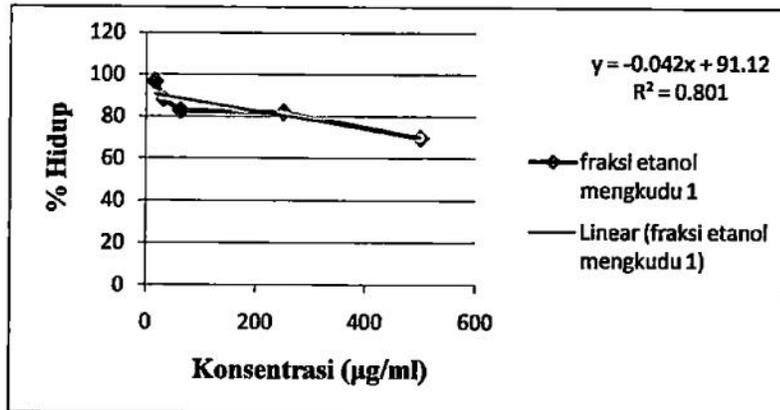
fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dengan beberapa konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Persen Hidup Sel MCF-7 Dengan Perlakuan Fraksi Etanol Buah *M. citrifolia* L.

Rata-rata Absorbansi Kontrol		Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel ± SD	Persamaan
Sel	Media				
		15,625	0,547	96,56 ± 0,0188	y = - 0,042x + 91,12
		31,25	0,506	88,10 ± 0,0761	
0,564	0,084	62,5	0,480	82,68 ± 0,0157	r = 0,801
		250	0,477	81,99 ± 0,0480	IC50 979,04 µg/ml
		500	0,418	69,77 ± 0,0177	

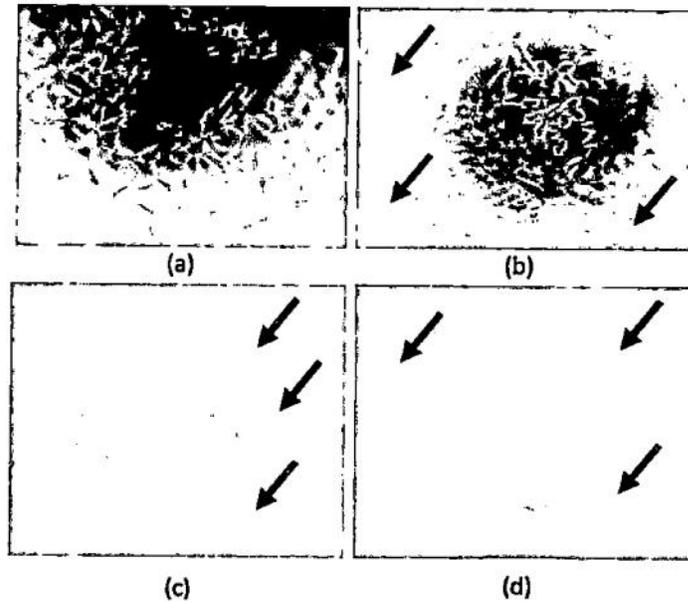
Tabel 7 menunjukkan bahwa pada konsentrasi rendah tidak terdapat sel yang mati namun fraksi etanol pada konsentrasi 500 µg/ml memperlihatkan adanya kematian sel yang cukup tinggi dengan persentase sel MCF-7 yang hidup sebesar 69,77%, sedangkan pada konsentrasi 15,625 µg/ml persentase sel MCF-7 yang hidup sebesar 96,56%. Penurunan persen hidup sel MCF-7 mulai tampak pada konsentrasi 31,25 – 500 µg/ml sebesar kurang dari 100%, akan tetapi masih ada proliferasi sel tetapi tidak signifikan. Fraksi uji pada penelitian ini menunjukkan efek sitotoksik yang rendah terhadap sel MCF-7 meskipun perlakuan fraksi uji pada konsentrasi tertinggi yaitu 500 µg/ml menyebabkan kematian terhadap sel MCF-7. Grafik hubungan konsentrasi fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. dengan persen hidup sel MCF-7 dapat diperoleh dengan memplotkan nilai dari persen sel hidup dan konsentrasi

fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. sehingga diperoleh suatu kurva regresi linier. Kurva hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi uji dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik hasil uji sitotoksik fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Dari hasil grafik diatas terlihat peningkatan kematian sel disetiap peningkatan konsentrasi. Penelitian ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Bintang *et al* (2012) yang menyatakan bahwa meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol buah *M. citrifolia* L. maka % kematian sel MCF-7 akan meningkat pula. Dari persamaan regresi diatas dapat dihitung nilai IC_{50} fraksi etanol *M. citrifolia* L. memiliki nilai IC_{50} sebesar 979,04 µg/ml. menurut Weerapreeyakul, *et al.* (2012) fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 979,04 µg/ml, mempunyai aktivitas sitotoksik yang tergolong kurang toksik terhadap sel kanker payudara MCF-7. Adapun efek paparan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. terhadap sel MCF-7 dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Efek paparan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan dosis (a) kontrol sel; (b) 15,625 µg/ml; (c) 62,5 µg/ml; (d) 500 µg/ml; (→) sel hidup; (→) sel mati

Gambar 10 menunjukkan efek paparan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L terhadap sel kanker payudara MCF-7. Morfologi sel kanker pada dosis 15,625 µg/ml tidak jauh berbeda dengan kontrol sel. Sel berbentuk bulat, bening, besar, bergerombol dan tidak lisis. Persen hidup sel MCF-7 pada dosis tersebut juga tinggi yaitu 96,56%. Pada dosis 62,5 µg/ml terlihat sel yang sudah mulai mengkerut dan lisis. Persen hidup sel MCF-7 pun menurun yaitu 82,68%. Terlihat jelas sel-sel yang lisis dan mengkerut pada dosis 500 µg/ml. Pada dosis ini sebagian besar sel MCF-7 mati yang ditandai dengan persen hidup yang semakin menurun yaitu 69,77%. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. mempunyai efek sitotoksik terhadap sel

kanker payudara MCF-7 yang lemah, dimana kriteria suatu senyawa dapat digunakan sebagai agen kemopreventif yaitu memiliki nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ (Meiyanto *et al*, 2008).

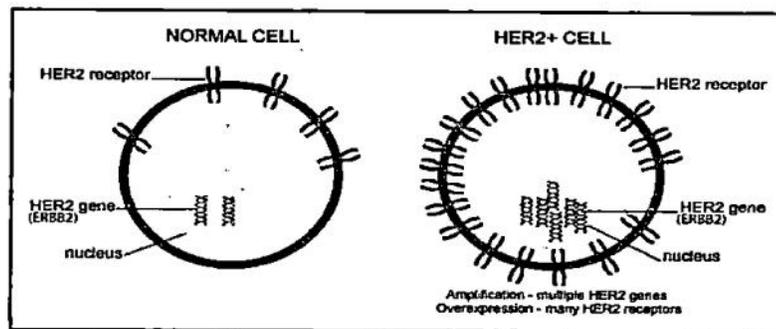
Pada penelitian sebelumnya uji sitotoksik dengan ekstrak etanolik buah mengkudu mendapatkan nilai IC_{50} 1117 $\mu\text{g/ml}$ (Bintang *et al*, 2013). Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. memiliki IC_{50} lebih kecil dibandingkan dari ekstrak etanolik, hal ini menunjukkan bahwa fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. lebih baik penghambatan proliferasi sel MCF-7. Senyawa rutin yang terdapat pada fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. diduga ikut berkontribusi terhadap efek sitotoksiknya.

G. Docking Molekuler

Pada penelitian ini juga dipelajari mengenai interaksi senyawa yang berpotensi sebagai anti kanker yaitu rutin dengan protein yang berperan terhadap terjadinya perkembangan sel kanker. Metode yang digunakan adalah *molecular docking* dimana dilakukan perhitungan energi interaksi dari kedua senyawa. Senyawa target atau reseptor pada penelitian ini adalah *Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER-2)*.

HER-2 adalah protein pada membran sel yang dapat berikatan dengan faktor pertumbuhan. Dalam kondisi normal ikatan ini akan mengaktivasi enzim tirosin kinase (TK) melalui jalur Ras/Raf/Map kinase. Ketika *growth factor* berikatan dengan reseptornya maka akan terjadi dimerisasi yang akan meningkatkan kemampuan enzimatik suatu reseptor. Reseptor yang terdimerisasi akan saling mengaktifkan satu sama lain dan akan terfosforilasi.

Reseptor akan menjadi tempat ikatan bagi protein lain yaitu Grb₂ yang kemudian akan terikat dengan SOS. Apabila SOS teraktivasi maka akan menyebabkan aktifnya Ras. Ras berfungsi menghantarkan signal dari reseptor *tirosin kinase* ke dalam nukleus. Ras yang teraktivasi akan mengaktifkan kinase seluler yaitu Raf-1 kinase. Raf-1 kinase akan memfosforilasi kinase seluler yang lain yaitu MEK dan MAPK, karena MEK dan MAPK aktif maka akan terjadi faktor transkripsi gen melalui Fos dan Jun sehingga akan memacu pertumbuhan sel (Chen YR *et al*, 2006; Amann J *et al*, 2005).



Gambar 11. Perbandingan Sel Normal dan sel HER-2+

HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) adalah protein yang ditemukan dalam setiap sel payudara yang normal dan berfungsi membantu pertumbuhan sel normal. Gen *HER-2* ditemukan pada DNA sel dan mengandung informasi untuk pembuatan protein *HER-2*. Protein *HER-2*, atau disebut juga reseptor *HER-2*, ditemukan pada permukaan beberapa sel normal tubuh. Fungsinya adalah mengirimkan sinyal yang memerintahkan sel untuk tumbuh dan membelah diri.

Pada kanker payudara dengan jenis *HER-2+*, sel kankernya memiliki jumlah gen *HER-2* yang sangat banyak pada tiap sel sehingga terlalu banyak

protein HER-2 muncul dipermukaan sel kanker jenis HER-2+. Kondisi ini disebut overekspresi protein HER-2. Terlalu banyaknya jumlah protein HER-2 menyebabkan sel kanker tumbuh dan membelah jauh lebih cepat. Oleh sebab itu, kanker payudara dengan HER-2+ disebut sebagai kanker payudara agresif. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan analisis ikatan rutin dengan HER-2 guna melihat ikatan yang terjadi.

Sebelum dilakukan *docking*, senyawa harus dipreparasi menggunakan YASARA. Senyawa-senyawa yang mengganggu sebaiknya dihilangkan seperti air agar yang berinteraksi hanya senyawa uji dan senyawa target. Kemudian dilakukan protonasi 3 dimensi untuk menambahkan muatan atom dan hidrogen pada senyawa, selanjutnya data ligan asli dihilangkan sehingga menyisakan protein target saja dengan *pocket* untuk *docking* dan disimpan dalam *file* format mol2.

Senyawa uji, juga dilakukan preparasi terlebih dahulu seperti halnya senyawa target. Senyawa digambarkan struktur dua dimensinya menggunakan *MarvinSketch* dan dilakukan optimasi protonasi untuk mendapatkan struktur yang disesuaikan dengan pH darah yaitu 7,4. Selanjutnya dilakukan optimasi untuk menentukan konformasi yang paling cocok untuk HER-2 dengan metode *conformers*. Terdapat 10 konformasi yang mewakili semua posisi *ligand* terhadap *pocket*. Konformasi yang paling sesuai dapat diketahui dengan *docking* PLANTS.

Validasi metode *docking* dilakukan dengan *re-docking native ligand* pada *binding site* yang selanjutnya akan didapatkan nilai *Root Mean Square*

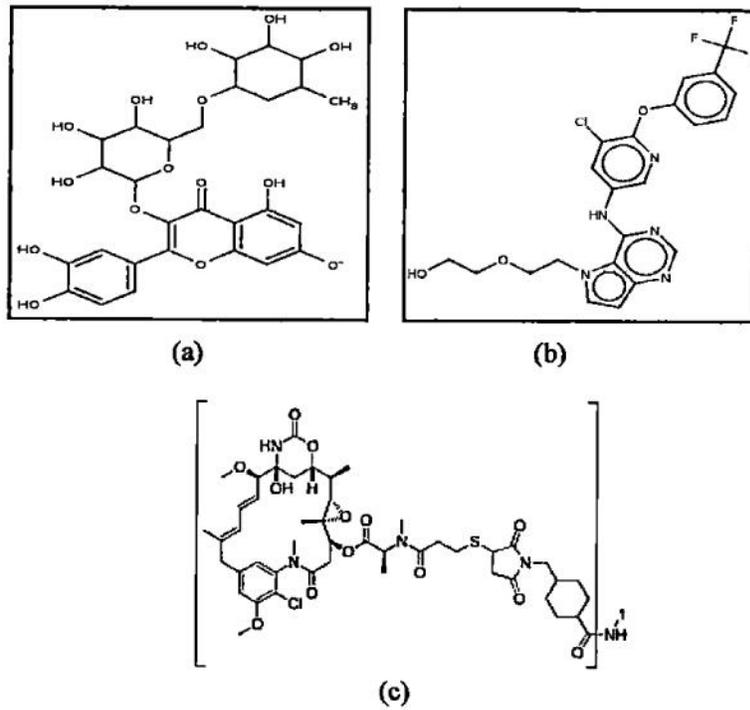
Deviation (RMSD). RMSD merupakan suatu parameter untuk evaluasi validasi metode dan digunakan untuk pengukuran dua posisi untuk membandingkan posisi atom antara struktur eksperimental dengan struktur yang di-*docking*-kan. Nilai RMSD pada penelitian ini sebesar 1,1591. Hal ini berarti bahwa metode ini memiliki validitas yang baik karena memiliki nilai RMSD kurang dari 2. Nilai RMSD yang biasa dijadikan kriteria kesuksesan adalah RMSD kurang dari 2,0 Å (Jain dan Nicholls, 2008). Hal ini berarti bahwa posisi *ligand copy* mirip dengan *native ligand* yang ditunjukkan pada gambar 12. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi *ligand* yang diprediksi semakin baik karena semakin mendekati konformasi *native ligand*.



Gambar 12. Posisi *native ligand* 3PP0 dan posisi prediksi *docking* dari simulasi *docking*. *Native ligand* (atom karbon diperlihatkan dengan warna biru muda), posisi prediksi *docking* dari simulasi *docking* (atom karbon diperlihatkan dengan warna ungu). Atom Nitrogen diperlihatkan dengan warna biru, atom oksigen diperlihatkan pada warna merah, atom Sulfur diperlihatkan dengan warna hijau.

Pada penelitian ini telah dilakukan *docking* antara senyawa rutin yang dilaporkan memiliki efek sitotoksik dengan HER-2 sebagai target yang diperoleh dari *Protein Data Bank* dengan kode 3PP0. Analisis dilakukan dengan membandingkan ligan uji dengan *native ligand* reseptor. Hasil

menunjukkan bahwa *native ligand* memiliki *score* yang lebih kecil dibandingkan dengan *score* rutin yang dapat dilihat pada tabel 8. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kompleks ikatan protein HER-2 dengan *native ligand* lebih stabil dibandingkan dengan senyawa uji. Hasil ikatan antara rutin dengan HER-dapat ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. (a) struktur rutin, (b) struktur *native ligand* 3PP0, (c) struktur *herceptin*

Tabel 8. *Score docking ligand* dengan protein HER-2

<i>Ligand</i>	<i>Score Docking</i> terhadap HER-2
<i>Native Ligand</i> (3PP0)	-103
Rutin	-77
<i>Herceptin</i>	144



Gambar 14. Ikatan antara rutin dengan HER-2

Dibandingkan *herceptin*, rutin memiliki *score docking* yang lebih rendah. Ikatan antara *herceptin* dan HER-2 menghasilkan *score docking* sebesar 144. Hal ini menunjukkan bahwa *herceptin* memiliki ikatan yang lebih lemah dengan HER-2 dan lebih kurang berpotensi dalam penghambatan HER-2. Ikatan antara *herceptin* dan HER-2 dapat ditunjukkan pada gambar 15.



Gambar 15. Ikatan antara *herceptin* dengan HER-2

Herceptin merupakan antibodi monoklonal yang pertama di dunia, dan satu-satunya obat yang telah direkomendasikan oleh FDA untuk indikasi kanker payudara dengan over ekspresi HER-2 atau status HER-2 positif (Hudis, 2007).

Rutin memiliki skor *docking* terhadap HER-2 lebih tinggi dibandingkan *native ligand* nya yang menunjukkan bahwa rutin memiliki ikatan yang lemah dibandingkan *native ligand* nya, dibandingkan dengan *herceptin* rutin memiliki skor *docking* yang lebih rendah pula. Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini bahwa fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. Jauh lebih baik penghambatan terhadap HER-2 dibanding *herceptin* dan dapat di kembangkan sebagai agen kemopreventif walaupun hasilnya tidak cukup memuaskan. Sehingga dalam pengembangan fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. sebagai agen kemopreventif dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan hasil yang optimal.