

**KAJIAN METABOLIT SEKUNDER DARI ALGA MERAH
Gracilaria salicornia ASAL PERAIRAN PULAU HARI
SULAWESI TENGGARA SEBAGAI ANTIINFLAMASI DAN
ANTI KANKER PAYUDARA**

**THE STUDY OF SECONDARY METABOLITES OF RED ALGAE
Gracilaria salicornia FROM HARI ISLAND, SOUTHEAST SULAWESI
AS ANTIINFLAMMATORY AND ANTIBREAST CANCER**

SERNITA

H013191004



**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**KAJIAN METABOLIT SEKUNDER DARI ALGA MERAH
Gracilaria salicornia ASAL PERAIRAN PULAU HARI
SULAWESI TENGGARA SEBAGAI ANTIINFLAMASI DAN
ANTIKANKER PAYUDARA**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kimia

Disusun dan diajukan oleh

S E R N I T A

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

DISERTASI

**Kajian Metabolit Sekunder Dari Alga Merah *Gracilaria salicornia*
Asal Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara Sebagai Antiinflamasi
dan Antikanker Payudara**

Disusun dan diajukan oleh:


SERNITA
NIM: H013191004

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 23 Januari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,
Komisi Penasehat


Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S
Promotor


Prof. Dr. Sahidin, S.Pd., M.Si
Co-Promotor


Prof. Dr. Paulina Taba, M.Phill
Co-Promotor

Ketua Program Studi
Ilmu Kimia,


Prof. Dr. Paulina Taba, M.Phill

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin,


Dr. Eng. Amiruddin, M.Si



PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Sernita
Nomor Induk Mahasiswa : H013191004
Program Studi : S3-Ilmu Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis berjudul:

**KAJIAN METABOLIT SEKUNDER DARI ALGA MERAH
Gracilaria salicornia ASAL PERAIRAN PULAU HARI SULAWESI
TENGGERA SEBAGAI ANTIINFLAMASI DAN ANTIKANKER
PAYUDARA**

Benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebahagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 23 Januari 2024

Yang menyatakan,



Sernita

PRAKATA

Assalamu 'Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh,

Alhamdulillah Rabbi 'Alamin penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan ridho-Nya, sehingga penelitian dan penulisan disertasi ini dapat penulis rampungkan sebagai salah satu persyaratan untuk meraih gelar Doktor Ilmu Kimia pada Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis banyak menghadapi hambatan dan kendala selama proses penelitian, mulai dari awal penelitian hingga penyelesaian disertasi ini. Namun, berkat Rahmat Allah SWT, dengan semangat, kesabaran dan usaha yang keras semuanya dapat teratasi. Penulis sangat menyadari bahwa semua ini dapat terwujud berkat doa, motivasi dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis dengan tulus dan Ikhlas menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS. selaku promotor, Bapak Prof. Dr. I Sahidin, M.Si dan Ibu Prof. Dr. Paulina Taba, M.Phil., masing-masing selaku ko-promotor yang penuh kesabaran dan ketulusan untuk meluangkan waktu memberikan bimbingan, motivasi, nasihat, dan saran mulai dari perencanaan penelitian, pelaksanaan penelitian, hingga penulisan disertasi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Tim penguji Bapak Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt., Bapak Prof. Dr. Abd Wahid Wahab, M.Sc., Ibu Dr. Seniwati Dali, M.Si., dan Ibu Dr. St. Fauziah, S.Si., M.Si.

Pada kesempatan ini, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Yayasan Bina Husada Kendari, Ibu Dr. Tuti Dharmawati, SE., M.Si., AK., QIA., CA., ACPA., yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor dengan memberikan bantuan beasiswa pendidikan yayasan.
2. Direktur Politeknik Bina Husada Kendari, Bapak Apt. Muhammad Azdar Setiawan, S.Farm., CTT., atas rekomendasi untuk memperoleh beasiswa BPP-DN dari Kemenristekbudristek dan Pendidikan Tinggi.
3. Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Direktorat Sumber Daya Ditjen Pendidikan Tinggi atas kesempatan yang diberikan untuk menjadi bagian dari keluarga besar karyasiswa BPP-DN tahun 2019.
4. Rektor Universitas Hasanuddin dan Direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor.
5. Dekan Fakultas MIPA Unhas, Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Si., beserta wakil-wakilnya yang telah memberikan fasilitas dan kemudahan dalam pelayanan administrasi selama mengikuti pendidikan.
6. Ibu Prof. Dr. Paulina Taba, M.Phil., dan Ibu Dr. St. Fauziah, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kimia dan Kepala Departemen Kimia beserta Dosen dan Staf Departemen Kimia yang telah memberikan motivasi, bantuan dan kerjasama dalam penyelesaian studi.

7. Kepala Laboratorium Kimia Fisika, Laboratorium Kimia Analitik, Laboratorium Kimia Terpadu beserta staf yang telah memberikan fasilitas dan kemudahan dalam melakukan penelitian.
8. Bapak Agung Wibawa Mahatva Yodha, S.Si., M. Si yang telah memberikan fasilitasi dan kemudahan dalam melakukan penelitian pada Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo.
9. Rekan-rekan dosen Politeknik Bina Husada Kendari Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Ibu Firdayanti, S.Si., M.Sc., Ibu Sri Aprilianti, S.Si., M.Sc., Ibu Angriyani Fusvita, S.Si., M.Si., Ibu Susanti, S.Si., M.Kes., Bapak Muh. Sultanul Aulya, S.Si., M.Si dan Bapak Kemal Idris, SH., MH., yang telah memberikan dukungan dan semangat dalam suka dan duka selama menjalani masa studi.
10. Rekan-rekan mahasiswa S3 Ilmu Kimia Unhas Angkatan 2019 (Ida Ildaliah, Khadijah, Sarni dan La Kolo) yang telah berbagi suka dan duka, dukungan dan semangat, serta kebersamaannya selama menjalani studi.
11. Rekan-rekan mahasiswa S1, S2 dan S3 Kimia Unhas (Khususnya Tim Peneliti Kimia Organik Bahan Alam, Bahrin, Putut, Anrif, Alfi, Salman, Ilham dan Musni)
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala yang berlipat ganda.

Secara khusus, Penulis menghaturkan penghargaan setinggi-tingginya dan terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda

Nasaruddin dan Ibunda tercinta Siti Murni atas didikan, doa restu dan segala pengorbanannya selama ini. Demikian pula kepada Ananda tersayang Syellomitha Kasenda dan Raydh Raziq Kasenda, Kakanda Sandra, S.Sos., adinda Susianti, S.Pd, M.Pd., Ners. Pangeran Fadhli, S. Kep., dan Fomy Alfandy Hanafid, S. Kom serta seluruh keluarga terima kasih atas bantuan, motivasi dan doanya selama ini.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari sempurna sehingga masih perlu saran dan kritikan yang membangun untuk melengkapi kekurangan tersebut. Akhir kata Penulis berharap disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi umat manusia dan kontribusi pada perkembangan ilmu pengetahuan.

Wabillahi Taufiq wal Hidayah, Wassalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Penulis

Sernita

ABSTRAK

Sernita. Kajian Metabolit Sekunder dari Alga Merah *Gracilaria salicornia* Asal Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara sebagai Antiinflamasi dan Antikanker Payudara (dibimbing oleh **Nunuk Hariani Soekamto, I Sahidin dan Paulina Taba**)

Isolasi metabolit sekunder dari alga merah *Gracilaria salicornia* Asal Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara sebagai antiinflamasi dan antikanker payudara telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam alga merah *Gracilaria salicornia* dan menguji aktivitasnya sebagai antiinflamasi dan antikanker payudara. Isolasi dan pemurnian dikerjakan dengan cara maserasi bertingkat dilanjutkan dengan teknik kromatografi meliputi kromatografi kolom vakum cair (KVC) dan kromatografi radial. Struktur senyawa hasil isolasi ditetapkan berdasarkan data spektroskopi FT-IR, NMR dan MS. Uji aktivitas senyawa antiinflamasi dan antikanker dilakukan secara *in vitro* dan *in silico*. Uji *in vitro* meliputi uji antiinflamasi menggunakan metode penghambatan denaturasi protein dan uji antikanker payudara terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTT. Uji *in silico* menggunakan metode *docking* penghambatan senyawa terhadap protein COX-2 dan ER α . Senyawa yang berhasil diisolasi adalah palmitic acid (1), 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (2), 3 β ,7 α -dihydroxy-cholest-5-en (3), 3 β -hydroxy-5-cholestene (4), 3 β -hydroxy-stigmast-5-en-7-one (5), 2,3,4-trichloro-7-iodoindole (6) dan 2-bromo-3,4-dichloro-7-iodoindole (7). Senyawa (1), (2), (3), (5), (6), dan (7) merupakan senyawa baru pertama kali ditemukan pada spesies *G. salicornia*. Hasil uji aktivitas antiinflamasi menunjukkan bahwa senyawa 5 memiliki aktivitas yang lebih baik dengan nilai IC₅₀ sebesar 49.9 ppm dalam kategori sedang. Hasil uji aktivitas antikanker menunjukkan bahwa senyawa 3 dengan nilai IC₅₀ sebesar 10,4 ppm mampu menghambat sel MCF-7 dalam kategori kuat. Potensi antiinflamasi senyawa hasil isolasi berdasarkan nilai energi ikatan antara protein COX-2 dan senyawa 2, 3, 4, dan 5 (-10,19; -9,73; -10,97 dan 10,21 kkal/mol) lebih stabil dibandingkan dengan energi ikatan dari natrium diklofenak (-7,85 kkal/mol). Potensi antikanker senyawa berdasarkan nilai energi ikatan antara protein ER α dan senyawa 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 (-5,08; -7,89; -7,89; -9,36; -8,68; -6,42; dan -6,51 kal/mol) dibandingkan dengan energi ikatan dari doxorubicin (-4,08 kkal/mol).

Kata Kunci: *Gracilaria salicornia*, metabolit sekunder, antiinflamasi, antikanker, sel MCF-7, *molecular docking*

ABSTRACT

Sernita. Study of Secondary Metabolites from Red Algae *Gracilaria salicornia* from Hari Island Waters, Southeast Sulawesi as Anti-inflammatory and Antibreast Cancer (supervised by **Nunuk Hariani Soekamto, I Sahidin and Paulina Taba**).

Isolation of secondary metabolites from red algae *Gracilaria salicornia* from the waters of Hari Island, Southeast Sulawesi as anti-inflammatory and anti breast cancer has been carried out. This study aims to isolate and identify secondary metabolite compounds contained in red algae *Gracilaria salicornia* and test their activity as anti-inflammatory and antibreast cancer. Isolation and purification were done by multistage maceration followed by chromatography techniques including liquid vacuum column chromatography (KVC) and radial chromatography. The structure of isolated compounds was determined based on FT-IR, NMR and MS spectroscopic data. Activity tests of anti-inflammatory and anticancer compounds were carried out in vitro and in silico. In vitro tests include anti-inflammatory tests using the protein denaturation inhibition method and antibreast cancer tests against MCF-7 cells using the MTT method. The in silico test used the docking method of compound inhibition against COX-2 and ER α proteins. The successfully isolated compounds are palmitic acid (**1**), 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (**2**), 3 β ,7 α -dihydroxy-cholest-5-en (**3**), 3 β -hydroxy-5-cholestene (**4**), 3 β -hydroxy-stigmast-5-en-7-one (**5**), 2,3,4-trichloro-7-iodoindole (**6**) and 2-bromo-3,4-dichloro-7-iodoindole (**7**). Compounds (**1**), (**2**), (**3**), (**5**), (**6**), and (**7**) are new compounds first discovered in *G. salicornia* species. The results of the anti-inflammatory activity test showed that compound **5** had better activity with an IC₅₀ value of 49,9 ppm in the medium category. The results of the anticancer activity test showed that compound **3** with an IC₅₀ value of 10,4 ppm was able to inhibit MCF-7 cells in the strong category. The anti-inflammatory potential of the isolated compounds based on the binding energy values between the COX-2 protein and compounds **2**, **3**, **4**, and **5** (-10,19; -9,73; -10,97 and 1,21 kcal/mol) is more stable compared to the binding energy of diclofenac sodium (-7,85 kcal/mol). Potential anticancer compounds based on the bond energy values between the ER α protein and compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** and **7** (-5.08; -7.89; -7.89; -9.36; -8.68; -6.42; and -6.51 kcal/mol) compared to the binding energy of doxorubicin (-4.08 kcal/mol).

Keywords: *Gracilaria salicornia*, secondary metabolites, anti-inflammatory, anticancer, MCF-7 cells, molecular docking.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SIMBOL	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
A. Tinjauan umum <i>Gracilaria salicornia</i>	9
B. Toksisitas	22
C. Antiinflamasi.....	23
D. Antikanker Sel MCF-7	27
E. Kerangka Pikir Penelitian	27

F. Hipotesis	33
BAB III METODE PENELITIAN	34
A. Desain Penelitian	34
B. Waktu dan Lokasi Penelitian.....	34
C. Alat dan Bahan	35
D. Pelaksanaan Penelitian.....	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	50
A. Ekstraksi	50
B. Fraksinasi dan Pemurnian	53
C. Identifikasi dan Penentuan Struktur Senyawa.....	64
D. Jalur Biosintesis Senyawa Hasil Isolasi	99
E. Aktivitas Biologi Senyawa Hasil Isolasi Secara <i>In Vitro</i>	105
F. Aktivitas Biologi Senyawa Hasil Isolasi Secara <i>In silico</i>	109
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	120
A. Kesimpulan	120
B. Saran	121
DAFTAR PUSTAKA.....	122
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	132

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Gracilaria salicornia</i>	9
2. Reaksi Pengubahan MTT menjadi Formazan	29
3. Bagan Kerangka Pikir Penelitian	32
4. Skema tahapan pemisahan senyawa metabolit sekunder	39
5. Sampel <i>G. salicornia</i> (1), simplisia kering (2), maserasi (3), ekstrak <i>n</i> -heksan (4), ekstrak etil asetat (5) dan ekstrak metanol (6)	50
6. Aktivitas Biologi ekstrak <i>n</i> -heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol	52
7. Kromatogram Ekstrak <i>G. salicornia</i>	54
8. Kromatogram Fraksi A-G dari Ekstrak Etil asetat	56
9. Kromatogram Subfraksi 1-6 dari Fraksi F	57
10. Kromatogram Senyawa 1	57
11. Kromatogram Subfraksi A-F dari Fraksi DE	58
12. Kromatogram Senyawa 2	59
13. Kromatogram Senyawa 3	59
14. Kromatogram Subfraksi 1-4 dari Fraksi C	60
15. Kromatogram Senyawa 4	60
16. Kromatogram Senyawa 5	61
17. Kromatogram Fraksi A-E dari Ekstrak <i>n</i> -Heksan	61
18. Kromatogram Subfraksi 1-5 dari Fraksi D	62
19. Kromatogram Senyawa 6	63
20. Kromatogram Senyawa 7	63

21. Kromatogram Skrining Fitokimia Senyawa	64
22. Spektroskopi FT-IR senyawa 1	65
23. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 1	66
24. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 1	67
25. Struktur senyawa 1	67
26. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 1	69
27. Spektroskopi FT-IR senyawa 2	69
28. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 2	69
29. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 2	72
30. Struktur senyawa 2	73
31. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 2	75
32. Spektroskopi FT-IR senyawa 3	76
33. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 3	77
34. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 3	78
35. Struktur senyawa 3	79
36. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 3	81
37. Spektroskopi FT-IR senyawa 4	81
38. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 4	82
39. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 4	83
40. Struktur senyawa 4	85
41. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 4	86
42. Spektroskopi FT-IR senyawa 5	86
43. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 5	87
44. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 5	88

45. Struktur senyawa 5	90
46. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 5	91
47. Spektroskopi FT-IR senyawa 6	91
48. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 6	92
49. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 6	93
50. Struktur senyawa 6	94
51. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 6	95
52. Spektroskopi FT-IR senyawa 7	95
53. Spektroskopi ¹³ C NMR DEPT senyawa 7	96
54. Spektroskopi ¹ H NMR senyawa 7	97
55. Struktur senyawa 7	98
56. Spektroskopi massa dan fragmentasi ion molekul senyawa 7	99
57. Jalur sintesis asam palmitat	100
58. Jalur sintesis 3 β -hydroxy-5-cholestene, cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol, 3 β -hydroxy-cholest-5-en-7-one dan β -hydroxy-stigmast-5-en-7-one	102
59. Jalur sintesis 2,3,4-trichloro-7-iodoindole dan 2-bromo-3,4-dichloro-7-iodoindole	104
60. Aktivitas biologi senyawa hasil isolasi	105
61. Overlay dari konformasi kristalograsi tamoksifen (pink) terhadap konformasi terbaik hasil penambatan ulang tamoksifen (hijau) pada target ER α	110
62. Overlay dari konformasi kristalograsi diklofenak (pink) terhadap konformasi terbaik hasil penambatan ulang diklofenak (hijau) pada target COX-2	111
63. Visualisasi 2 dimensi interaksi senyawa 1-4 dengan cyclooxygenases (COX-2)	113

64. Visualisasi 2 dimensi interaksi senyawa 5-7 dan natrium diklofenak dengan cyclooxygenases (COX-2)	114
65. Visualisasi 2 dimensi interaksi senyawa 1-4 dengan Human Estrogen Receptor Alpha Ligand-Binding	116
66. Visualisasi 2 dimensi interaksi senyawa 5-7 dan doxorubicin dengan Human Estrogen Receptor Alpha Ligand-Binding	117

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penggunaan spesies <i>Gracilaria</i> dalam Pengobatan Tradisional.	11
2. Kajian Farmakologi ekstrak dari Genus <i>Gracilaria</i> dan aktivitas biologisnya	12
3. Kategori tingkat toksisitas ekstrak terhadap larva <i>Artemia salina</i>	23
4. Kategori aktivitas inflamasi	26
5. Kriteria aktivitas sitotoksik berdasarkan IC ₅₀	30
6. Kandungan kimia dalam ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol	51
7. Senyawa metabolit sekunder hasil isolasi	64
8. Data NMR senyawa 1 yang dibandingkan dengan 3 β -hydroxy-cholest-5-en-7-one	68
9. Data NMR senyawa 2 yang dibandingkan dengan cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol	74
10. Data NMR senyawa 3 yang dibandingkan dengan cholest-5-ene-3 β -ol	80
11. Data NMR senyawa 4 yang dibandingkan dengan 3 β -hydroxy-stigmast-5-en-7-one	84
12. Data NMR senyawa 5 yang dibandingkan dengan Palmitic Acid	89
13. Data NMR senyawa 6 yang dibandingkan dengan 2,3,4-trichloro-7-iodoindole	94
14. Data NMR senyawa 7 yang dibandingkan dengan 2-bromo-3,4-dichloro-7-iodoindole	98
15. Hasil molekuler docking antara senyawa dengan cyclooxygenases (COX-2)	112
16. Hasil molekuler docking senyawa dengan Human Estrogen Receptor Alpha Ligand-Binding	115

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan alir proses maserasi <i>G. salicornia</i>	132
2. Bagan alir penelitian	133
3. Bagan alir uji toksisitas metode BSLT	134
4. Bagan alir uji antiinflamasi	137
5. Bagan alir uji antikanker sel MCF-7	140
6. Bagan alir uji <i>In silico</i> senyawa antiinflamasi dan antikanker	142
7. Peta lokasi pengambilan sampel	144
8. Hasil identifikasi sampel BRIN	145
9. Hasil perhitungan uji sitotoksik	146
10. Hasil perhitungan uji antiinflamasi	151
11. Hasil perhitungan uji antikanker	162
12. Data NMR	173
13. Fragmentasi MS	180

DAFTAR SIMBOL

Simbol/Singkatan

A549	= Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
ATP	= Adenosin trifosfat
ELISA	= <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
BSA	= <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSLT	= <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
COX	= Siklooksigenase
EtOAc	= Etil asetat
EPSP	= enolpiruvilshikimat 3-fosfat
DEPT	= <i>Distortionless Enhancement of NMR Sinyals by Polarization Transfer</i>
DBE	= <i>Double Bond Equivalence</i>
Era	= Reseptor estrogen α
FTIR	= <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GC-MS	= Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HL60	= Human Leukimia Cell Line
IC ₅₀	= Inhibition Concentration
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
KR	= Kromatografi Radial
KVC	= Kromatografi Vakum Cair
LC ₅₀	= Lethal Concentration
LC-MS/MS	= Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MCF-7	= <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>

MTT	= <i>Microcultur Tetrazolium Technique</i>
PBS	= <i>Phosforic Buffer Solution</i>
Ppm	= <i>Part Per million</i>
Rf	= <i>Retardation Factor</i>
RMSD	= <i>Root mean square deviasi</i>
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	= <i>Sodium Dodesil Sulfat</i>
TBS	= <i>Tris Buffer Saline</i>
UV-Vis	= <i>Ultraviolet-Visible</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Inflamasi merupakan suatu respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi yang merusak jaringan. Rangsangan ini menyebabkan lepasnya mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, bradikinin, dan prostaglandin yang menimbulkan reaksi radang berupa panas, nyeri, merah, bengkak, dan disertai gangguan fungsi. Penyakit lain yang melibatkan adanya proses inflamasi kronis dalam tubuh antara lain: infeksi saluran pernapasan akut, asma, diabetes, dermatitis, penyakit sendi, alergi, anemia, hepatitis, tumor/kanker, dan penyakit-penyakit autoimun (Paramsivam *et al.*, 2016).

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh sel abnormal jaringan tubuh yang tumbuh dan berkembang dengan cepat serta tak terkendali. Data *Global cancer observatory* (Globacon) menyebutkan bahwa pada tahun 2018, terdapat 18,1 juta kasus baru dengan angka kematian sebesar 9,6 juta kematian, di mana 1 dari 5 laki-laki dan 1 dari 6 perempuan di dunia mengidap penyakit kanker. Data tersebut juga menyatakan bahwa 1 dari 8 laki-laki dan 1 dari 11 perempuan meninggal karena penyakit kanker. Angka pengidap penyakit kanker di Indonesia (136.2/100.000 penduduk) berada pada urutan ke 8 di Asia Tenggara dan

pada urutan ke 23 di Asia. Angka pengidap kanker yang tertinggi adalah kanker payudara yakni sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk, diikuti dengan kanker leher rahim sebesar 23,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 13,9 per 100.000 penduduk (Riskesdas, 2018).

Tingginya angka penderita kanker payudara membuat para peneliti terdorong untuk melakukan penelitian terkait obat untuk mengatasi kanker payudara ini. Pengobatan penyakit kanker yang selama ini dilakukan adalah pembedahan, radioterapi, kemoterapi, dan imunoterapi (Chen & Kuo, 2017). Penggunaan obat-obatan sintetik untuk mengobati penyakit kanker dan inflamasi masih memiliki kekurangan dari segi efek samping yang lebih beresiko dibandingkan dengan pengobatan secara alami. Biaya kemoterapi untuk pengobatan kanker juga relatif tinggi namun tingkat keberhasilannya belum optimal. Oleh karena itu, penelitian perlu dilakukan untuk mengkaji dan menemukan produk obat inflamasi dan kanker payudara berbahan alam yang lebih efektif dan selektif.

Produk berbahan alam yang dapat dimanfaatkan adalah rumput laut yang merupakan salah satu sumber daya hayati yang sangat melimpah di Indonesia. Indonesia dengan 6.400.000 km² luas lautan dan 110.000 km panjang garis pantai, serta didukung iklim tropis, merupakan wilayah yang sesuai untuk pertumbuhan berbagai jenis rumput laut. Merdekawati & Susanto (2009) melaporkan bahwa 555 jenis rumput laut dari sekitar 8000 jenis yang ada di dunia dapat tumbuh dengan baik di

wilayah Indonesia. Rumput laut dari kelas alga merah (*Rhodophyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis yang tumbuh di perairan laut Indonesia, sekitar 452 jenis, disusul dengan alga hijau (*Chlorophyceae*) sekitar 196 jenis dan alga coklat (*Phaeophyceae*) sekitar 134 jenis (Winarno, 1996).

Beberapa alga merah (*Rhodophyceae*) dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional, di antaranya spesies *Gracilaria* sebagai anti hipotensi (Khare, 2007), pengobatan sistem pencernaan diare, disentri, radang usus, embeien, konstipasi usus, dan penyakit kuning (Fu *et al.*, 2016; Nadkarni, 1996; Jimenez & Ribez, 2007; Chengkui *et al.*, 1984; Ostraff, 2003; Liana, 1990), obat sistem kelenjar gondok, tumor toroid (Fu *et al.*, 2016; Anggadireja, 2009; Chengkui *et al.*, 1984), pengobatan sistem reproduksi yakni perangsang libido, keputihan, dan pendarahan (Smith *et al.*, 2984, Liana, 1990), pengobatan sistem pernafasan yakni radang paru-paru, batuk, iritasi tenggorokan dan komplikasi paru-paru (Fu *et al.*, 2016; Nadkarni, 1996; Watt, 2014; Anggadireja, 2009, Ostraff, 2003; Liana 1990), pengobatan sistem perkemihan yakni komplikasi kandung kemih, kesulitan buang air kecil dan sifat diuretik (Fu *et al.*, 2016; Anggadireja, 2009), serta penyakit lainnya seperti beri-beri, diabetes, obesitas, luka dan pembengkakan (Fu *et al.*, 2016; Ostraff, 2003; Liana, 1990).

Metabolit sekunder dan ekstrak spesies dari *Gracilaria* mempunyai efek biologis, antara lain: asam palmitat dari *G. changii*, *G. manilaensis* dan *Gracilaria sp* yang menghambat sel kanker HL60 dengan $IC_{50} 0,50 \pm 0,26$

dan MCF-7 $1,50 \pm 1,17$ (Fitrya *et al.*, 2016), fitol dari *G. edulis* yang menghambat sel kanker A549 dengan $IC_{50} 24,5 \pm 19,1 \mu\text{g/mL}$ (Sakthivel *et al.*, 2016), sel kanker MCF-7 dengan $IC_{50} 125 \mu\text{g/mL}$ (sheeja *et al.*, 2016), ekstrak diklorometan:metanol (7:3) *G. caudata* yang menghambat sel kanker HeLa dengan $IC_{50} 51 \mu\text{g/mL}$, HepG2 dengan $IC_{50} 89 \mu\text{g/mL}$, KB dengan $IC_{50} 47 \mu\text{g/mL}$ (Moo-Puc *et al.*, 2009). Selain itu, ekstrak *G. cervicomis* yang menghambat sel kanker HeLa dengan $IC_{50} 45 \mu\text{g/mL}$, HepG2 dengan $IC_{50} 32 \mu\text{g/mL}$, KB dengan $IC_{50} 19 \mu\text{g/mL}$ (Moo-Puc *et al.*, 2009). Ekstrak metanol *G. corticate* yang menghambat sel kanker dengan HeLa dengan $IC_{50} 27 \mu\text{g/mL}$, HepG2 dengan $IC_{50} 92 \mu\text{g/mL}$, HT-29 dengan $IC_{50} 130 \mu\text{g/mL}$, MCF-7 dengan $IC_{50} 25 \mu\text{g/mL}$, MDA-MB-231 dengan $IC_{50} 45 \mu\text{g/mL}$ (Namvar *et al.*, 2014). Ekstrak *G. damaecornis* yang menghambat sel kanker HeLa dengan $IC_{50} 76 \mu\text{g/mL}$, HepG2 dengan $IC_{50} >100 \mu\text{g/mL}$, KB dengan $IC_{50} 72 \mu\text{g/mL}$ (Moo-Puc *et al.*, 2009). Ekstrak polisakarida dari *G. caudata* (Chaves *et al.*, 2013)., *G. birdiae* (Vanderlei *et al.*, 2011)., *G. cornea* (Coura *et al.*, 2015)., ekstrak air dari *G. tenuipitala* (Chen *et al.*, 2013)., ekstrak poligalaktan dari *G. opuntia* (Makkar & Chakraborty, 2017)., ekstrak metanol dari *G. changii* (Shu *et al.*, 2013) memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Ekstrak polisakarida dari *G. birdiae* memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Vanderlei *et al.*, 2011), *G. corticate* memiliki aktivitas sebagai antiviral (Mazumber *et al.*, 2002), dan *G. cervicornis* memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Oumaskour *et al.*, 2013).

Hasil Penelusuran literatur yang peneliti lakukan menunjukkan bahwa penelitian terhadap genus *Gracilaria* khususnya pada spesies *G. salicornia* masih terbatas pada bioaktivitas ekstrak dan metabolit sekundernya. Beberapa penelitian tentang ekstrak dan metabolit sekunder *G. salicornia* antara lain ekstrak metanol *G. salicornia* yang menghambat pertumbuhan sel kanker HT-29 dengan IC_{50} 68,2 $\mu\text{g/mL}$, HeLa dengan IC_{50} 125,9 $\mu\text{g/mL}$ dan MCF-7 dengan IC_{50} 185,8 $\mu\text{g/mL}$ (Ghannadi *et al.*, 2016). Ekstrak air dari *G. salicornia* memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi (Paramsivam *et al.*, 2016). Ekstrak etil asetat *G. salicornia* sebagai antibakteri (Saeidnia *et al.*, 2009). Senyawa 22-dehidrokolesterol, kolesterol, stigmasterol, kolesterol oleat dari ekstrak kloroform:metanol (3:1) *G. salicornia* (Nasir *et al.*, 2011). Metabolit sekunder baru yang ditemukan dari *G. salicornia* adalah metabolit sekunder golongan terpenoid (Antony dan Charaborty, 2018; Antony dan Chakraborty, 2020a; Chakraborty *et al.*, 2019), turunan spiro (Antony dan Charaborty, 2019) dan turunan kromenil (Antony dan Charaborty, 2020b) yang berasal dari Pantai India yang memiliki efek biologis sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Hasil uji fitokimia pada ekstrak *G. salicornia* mengandung tannin, alkaloid, saponin, triterpenoid, flavonoid, antraquinon, fenol dan steroid (Ghannadi *et al.*, 2016; Paramsivam *et al.*, 2016; Widowati *et al.*, 2021).

Sulawesi Tenggara khususnya di Perairan Pulau Hari, komposisi rumput laut untuk kelas *chlorophyta* adalah sebesar 44%, serta *rhodophyta* dan *phaetophyta* masing-masing sebesar 28%. Kelas *rhodophyta*, genus

Gracilaria paling banyak ditemukan yakni sebesar 43% dibandingkan dengan genus lainnya. Spesies yang ditemukan dalam genus *Gracilaria* adalah *G. salicornia*, *G. edulis* dan *G. verrucosa* (Ira *et al.*, 2018).

Aspek kebaruan dari penelitian ini adalah belum ada laporan mengenai kandungan kimia metabolit sekunder dan data aktivitas biologi ekstrak *G. salicornia* sebagai antiinflamasi dan antikanker payudara sel MCF-7 dari Kawasan Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara. Menurut Valdir (2012) biosintesis dan kandungan senyawa metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh lingkungan hidup. Faktor lingkungan seperti temperatur, intensitas cahaya, mineral, dan CO₂ berpengaruh pada produksi metabolit sekunder (Akula dan Sakthivelnshankar, 2011; Barbouchi *et al.*, 2020).

Hasil penelitian dari disertasi ini diperoleh 7 senyawa metabolit sekunder beserta potensi bioaktivitasnya sebagai antiinflamasi dan antikanker payudara. Ketujuh senyawa tersebut dikarakterisasi sebagai asam palmitat (**1**), 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (**2**), 3 β ,7 α -dihydroxycholest-5-en (**3**), 3 β -hydroxy-5-cholestene (**4**), 3 β -hydroxy-stigmast-5-en-7-one (**5**), 2,3,4-trichloro-7-iodoindole (**6**) dan 2-bromo-3,4-dichloro-7-iodoindole (**7**). Senyawa **1**, **2**, **3**, **5**, **6** dan **7** pertama kali ditemukan pada spesies *G. salicornia*, sedangkan senyawa **4** sudah pernah dilaporkan oleh Nasir *et al* (2011) yang diisolasi dari *G. salicornia* yang berasal dari Teluk Persia.

B. Rumusan Masalah

Masalah yang dikaji dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana toksisitas, aktivitas antiinflamasi, dan antikanker sel MCF-7 dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol *G. salicornia* yang berasal dari Perairan Hari Sulawesi Tenggara?
2. Metabolit sekunder apa yang dapat diisolasi dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol dari *G. salicornia* yang berasal dari Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara?
3. Bagaimana aktivitas antiinflamasi dan antikanker sel MCF-7 secara *in vitro* metabolit sekunder hasil isolasi?
4. Bagaimana potensi metabolit sekunder hasil isolasi sebagai antiinflamasi dan antikanker berdasarkan analisis *in silico*?

C. Tujuan Penelitian

1. Melakukan uji toksisitas, aktivitas antiinflamasi dan antikanker sel MCF-7 dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol serta metabolit sekunder hasil isolasi dari *G. salicornia* yang berasal dari Perairan Hari Sulawesi Tenggara.
2. Mengisolasi dan menentukan struktur metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol *G. salicornia* yang berasal dari Perairan Pulau Hari Sulawesi Tenggara.

3. Menentukan aktivitas antiinflamasi dan antikanker sel MCF-7 secara *in vitro* metabolit sekunder hasil isolasi.
4. Melakukan analisis *in silico* aktivitas antiinflamasi dan antikanker metabolit sekunder hasil isolasi.

D. Manfaat Penelitian

Memberikan informasi dan pengetahuan ilmiah mengenai potensi ekstrak dan senyawa yang telah diisolasi dari *G. salicornia* sebagai antiinflamasi dan antikanker sel MCF-7

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan umum *Gracilaria salicornia*

1. Taksonomi *Gracilaria salicornia*

Taksonomi *Gracilaria salicornia* dapat dilihat pada klasifikasi berikut

(Guiry & Guiry, 2020):

Kingdom	: Plantae
Filum	: Rhodophyta
Kelas	: Florideophyceaea
Ordo	: Gracilariales
Famili	: Gracilariaceae
Genus	: <i>Gracilaria</i>
Species	: <i>Gracilaria salicornia</i>



Gambar 1. *Gracilaria salicornia*

2. Morfologi *Gracilaria salicornia*

Ciri umum *G. salicornia* adalah mempunyai bentuk thalus silindris atau gepeng dengan percabangan mulai dari yang sederhana sampai yang paling rumit dan rimbun, diatas percabangannya umumnya bentuk thalli (kerangka tubuh tanaman) agak mengecil, permukaannya halus atau berbintil - bintil, diameter talus berkisar antara 0,5 – 2 mm. Panjang dapat mencapai 30 cm atau lebih dan *G. salicornia* tumbuh di rataan terumbu karang dengan air jernih dan arus cukup dengan salinitas ideal berkisar antara 20 - 28 per mil (Birsyam, 1992). *G. salicornia* mempunyai thalus yang bulat, licin, berbuku-buku atau bersegmen-segmen dan membentuk rumpun yang lebat berekspansi melebar (radial) serta panjang rumpunnya dapat mencapai 25 cm. Percabangan timbul pada setiap antar buku. Warna hijau kekuning-kuningan (agak hijau kearah basal/dasar dan kuning di bagian ujung). Substansi *cartilaginous* dan mudah patah getas/rapuh (Atmadja *et al.*, 1996; Kadi, 2004).

3. Pemanfaatan *Gracilaria* dalam Pengobatan Tradisional

Gracilaria merupakan genus dari rumput laut famili *Gracilariaceae*. Jumlah spesies yang tercakup dalam genus ini antara lain. *G. andersonii*, *G. bursa-pastoris*, *G. edulis*, *G. arcuate*, *G. biodgetti*, *G. crassa*, *G. eucheumoides*, *G. textorii*, *G. verrucsa*, *G. coronopifolia*, *G. solicornia*, *G. gigas* (Sjafrie, 1990)

Secara etnobotani, penggunaan pengobatan tradisional spesies *Gracilaria* dalam berbagai literatur seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Penggunaan spesies *Gracilaria* dalam Pengobatan Tradisional

Penyakit	Referensi
Sistem kardiovaskuler (antihipotensi)	Khare <i>et al.</i> , 2007
Sistem pencernaan (Diare, disentri, radang usus, wasir, konstipasi usus, penyakit kuning)	Fu <i>et al.</i> , 2016; Nadkarni, 1996; Fonegra & Jimenez, 2007; Chengkui <i>et al.</i> , 1984; Ostraff, 2003; Liana, 1990
Sistem endokrin (Gondok tiroid, tumor tiroid)	Fu <i>et al.</i> , 2016; Anggadireja, 2009
Sistem reproduksi (Perangsang libido, keputihan, pendarahan)	Smith <i>et al.</i> , 2984, Liana, 1990)
Sistem pernapasan (Bronkitis, batuk, iritasi tenggorokan, komplikasi paru-paru)	Fu <i>et al.</i> , 2016; Nadkarni, 1996; Watt, 2014; Anggadireja, 2009, Ostraff, 2003; Liana 1990
Sistem perkemihan (Komplikasi kandung kemih, sulit buang air kecil, sifat diuretik)	Fu <i>et al.</i> , 2016; Anggadireja, 2009
Penyakit lainnya (Beri-beri, diabetes, kegemukan, luka dan pembengkakan)	Fu <i>et al.</i> , 2016; Ostraff, 2003; Liana, 1990

4. Fitokimia Genus *Gracilaria*

Skrining fitokimia yang dilakukan oleh Ghannadi *et al.*, (2016) terhadap ekstrak metanol *G. salicornia* yang berasal dari Teluk Persia menunjukkan adanya tannin, alkaloid, saponin dan triterpenoid, flavonoid

dan antraquinon, ekstrak air *G. salicornia* yang berasal dari pesisir pantai India mengandung tanin, flavonoid, fenol, dan steroid (Paramsivam *et al.*, 2016) dan ekstrak metanol *G. salicornia* yang berasal dari kawasan pesisir pulau Tidung Indonesia mengandung flavonoid, saponin, dan steroid (Widowati *et al.*, 2021). Beberapa hasil penelitian terhadap spesies dari ekstrak *Gracilaria* melaporkan adanya bioaktivitas yang menarik seperti yang disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Kajian Farmakologi ekstrak dari Genus *Gracilaria* dan aktivitas biologisnya.

Spesies	Ekstrak/Golongan senyawa	Aktivitas biologis	Pustaka
<i>G. caudata</i>	Diklorometan: metanol (7:3)	Antikanker HeLa IC ₅₀ 51 µg/mL HepG2 IC ₅₀ 89 µg/mL KB IC ₅₀ 47 µg/mL	Moo-Puc <i>et al.</i> , 2009
<i>G. cervicomis</i>	Diklorometan: metanol (7:3)	Antikanker HeLa IC ₅₀ 45 µg/mL HepG2 IC ₅₀ 32 µg/mL KB IC ₅₀ 19 µg/mL	Moo-Puc <i>et al.</i> , 2009
<i>G. corticate</i>	Metanol	Antikanker HeLa IC ₅₀ 27 µg/mL HepG2 IC ₅₀ 92 µg/mL HT-29 IC ₅₀ 130 µg/mL MCF-7 IC ₅₀ 25 µg/mL MDA-MB-231 IC ₅₀ 45 µg/mL	Namvar <i>et al.</i> , 2014
<i>G. damaecornis</i>	Diklorometan: metanol (7:3)	Antikanker HeLa IC ₅₀ 76 µg/mL HepG2 IC ₅₀ >100 µg/mL KB IC ₅₀ 72 µg/mL	Moo-Puc <i>et al.</i> , 2009
<i>G. salicornia</i>	Metanol	Antikanker HT-29 IC ₅₀ 68,2 µg/mL HeLa IC ₅₀ 125,9 µg/mL, MCF-7 IC ₅₀ 185,8 µg/mL	Ghannadi <i>et al.</i> , 2016

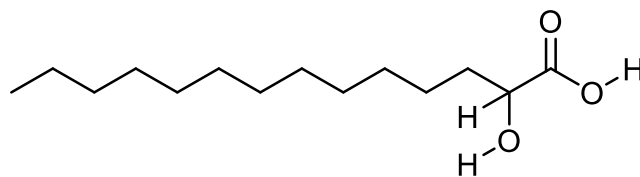
<i>G. caudata</i>	Polisakarida	Antiinflamasi	Chaves <i>et al.</i> , 2013
<i>G. tenuipitala</i>	Air	Antiinflamasi	Chen <i>et al.</i> , 2013
<i>G. birdiae</i>	Polisakarida	Antiinflamasi Antioksidan	Vanderlei <i>et al.</i> , 2011
<i>G. cornea</i>	Polisakarida	Antiinflamasi	Coura <i>et al.</i> , 2015
<i>G. opuntiae</i>	Poligalaktan	Antiinflamasi	Makkar dan Chakraborty, 2017
<i>G. changii</i>	Metanol	Antiinflamasi	Shu <i>et al.</i> , 2013
<i>G. salicornia</i>	Air	Antiinflamasi	Paramsivam <i>et al.</i> , 2016
<i>G. corticate</i>	Polisakarida	Antiviral	Mazumber <i>et al.</i> , 2002
<i>G. salicornia</i>	Etil asetat	Antibakteri	Saeidnia <i>et al.</i> , 2009

Beberapa jenis senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dari genus *Gracilaria* yang dalam golongan senyawa terpenoid, alkaloid, steroid, phenolik dan senyawa hidrokarbon lainnya.

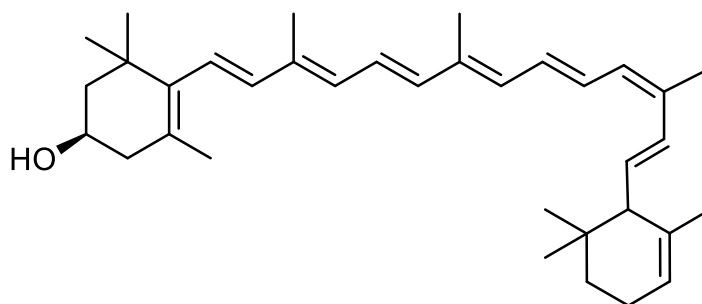
a. Golongan Terpenoid

Senyawa terpenoid asam palmitat (**1**) telah diidentifikasi dari ekstrak dietil eter *G. changii*, *G. manilaensis* dan *Gracilaria sp* yang menghambat sel kanker HL60 dan MCF-7 dan asam 2-hidroksi miristik (**8**) dari ekstrak dietil eter *G. changii* yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Fitrya *et al.*, 2016). Senyawa β -kriptoksantin (**9**) telah diidentifikasi dari *G. lichenoides* yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Aihara dan Yamamoto, 1968). Senyawa diterpenoid seperti fitol atau (2E, 7R, 11R)-3,7,11,15-tetrametil-2-heksadesen-1-ol (**10**) telah diidentifikasi dari ekstrak etil asetat *G. edulis* menghambat sel kanker A549

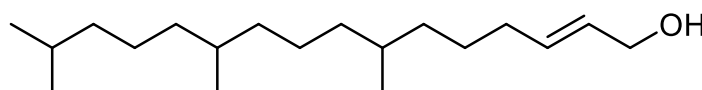
(Sakthivel *et al.*, 2016), ekstrak metanol *G. edulis* menghambat sel kanker MCF-7 (sheeja *et al.*, 2016), dan senyawa ini ditemukan pada *G. foliifera* bersama senyawa asiklik diterpenoid 3,7,11,15 tetrametil-3-heksadek-en-1-ol (**11**) (Alarif *et al.*, 2010).



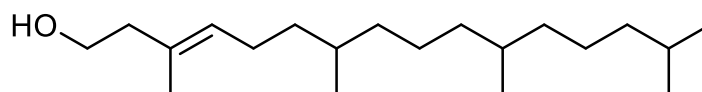
(8)



(9)



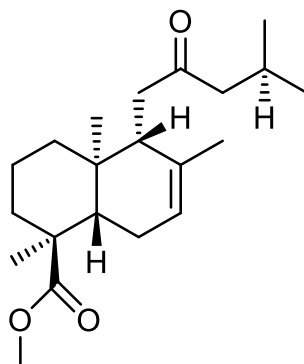
(10)



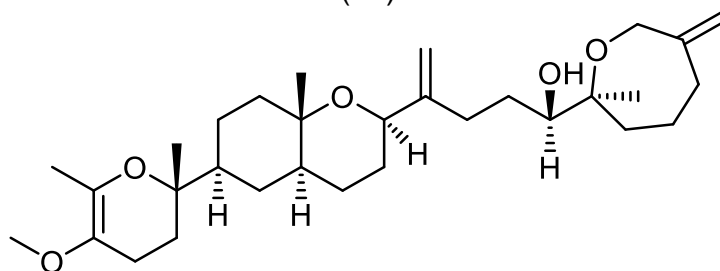
(11)

Senyawa terpenoid telah diidentifikasi dari *G. salicornia* yang berasal dari pantai India melalui GC-MS, senyawa ini memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi antara lain: ekstrak etil asetat:metanol (1:1) menghasilkan senyawa diterpenoid metil-16(13-14)-abeo-7-labden-(12-oxo) karboksilat (**12**) (Antony dan Charaborty, 2018). Ekstrak metanol menghasilkan

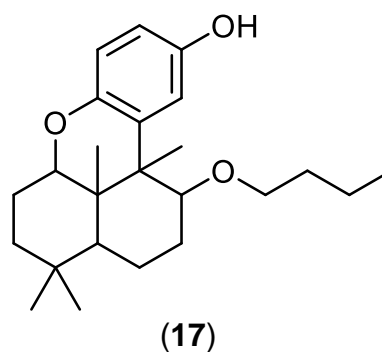
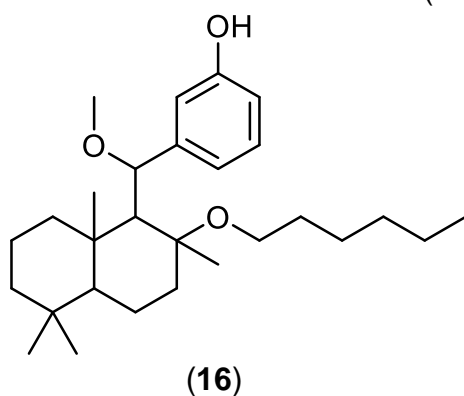
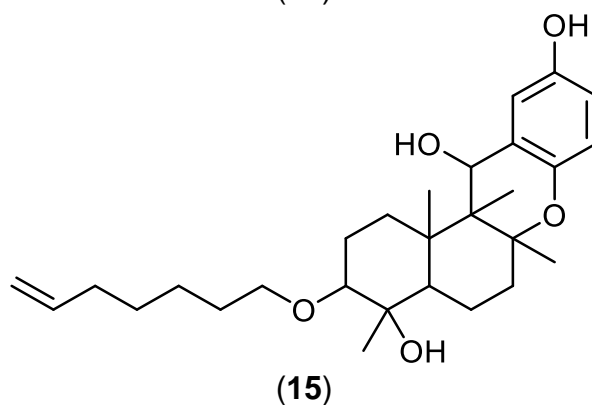
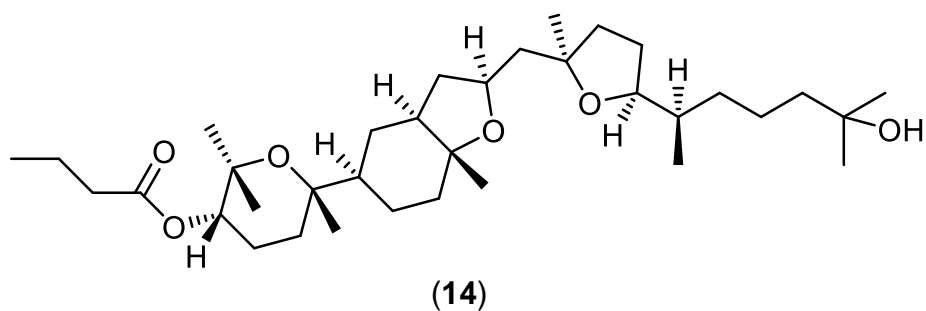
senyawa triterpenoid 15-(oktahidro-7-(4,5-dihidr-3-metoksi-2,6-dimetil,2*H*-piran-6-il)-10-metilpirano[3,2-*b*]piran-14-il)-18-(19-metil-23-etilenoksepan-19-*i*)pent-15-en-18-ol (**13**) dan tetra-hidro-6-(heksahidro-13-((tetrahidro-18-(23-hidroksi-23-metilheptan-19-il)-15-metilfuran-15-il)metil)-10-metil-2*H*-piran-3-il butirat (**14**) (Antony dan Chakraborty, 2020a). Ekstrak etil asetat:metanol (1:1) menghasilkan 3 senyawa sesquiterpen yaitu 3-(hept-3⁶-eniloksi)-dekahidro-4,6a,12a,12b-tetrametil-1*H*-benzo[*a*]xanten-4,10,12-triol (**15**), 13-[[2-(heksiloksi)-2,5,5,8a-tetrametildekahidro-1-naptalen](metoksi)metil]benzenol (**16**) dan 1-butoksi-4,4,11b,11c-tetrametil-dekahidrobenzo[*k*]xanten-10-ol (**17**) (Chakraborty *et al.*, 2019).



(12)



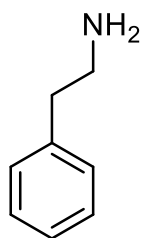
(13)



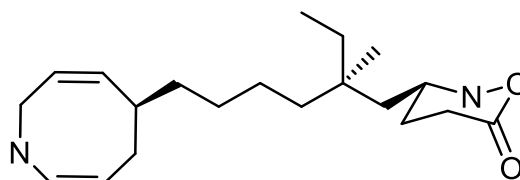
b. Golongan Alkaloid

β -feniletilamin (18) telah diidentifikasi dari ekstrak etanol *G. bursapastoris* melalui GC-MS oleh Percot *et al.*, (2009). Alkaloid jenis ini banyak ditemukan dalam rumput laut kelas alga coklat, alga hijau dan pada alga merah (guven *et al.*, 2010). Senyawa 3-(2-etil-6-((3Z,7Z)-1,2,5,6-tetrahydroazocin-5-il)heksil)morpolin-6-one (19) diidentifikasi dari ekstrak metanol:etil asetat *G. opuntia*. Sun *et al.*, (2006) telah mengisolasi 3

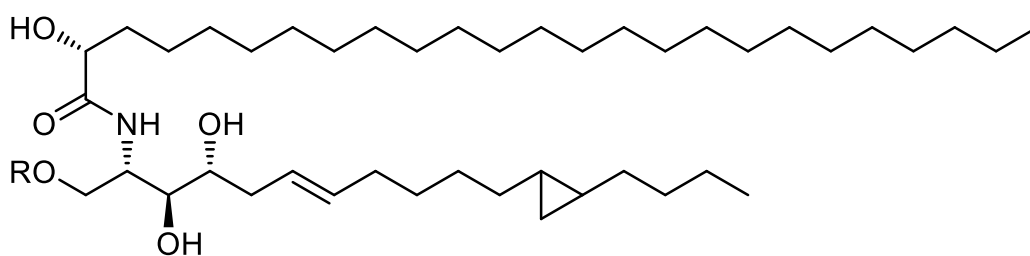
senyawa yaitu gracilariosid (**20**), gracilamid A (**21**) dan gracilamid B (**22**) dari ekstrak metanol *G. asiatica* yang memiliki aktivitas antikanker sel A375-S2.



(18)



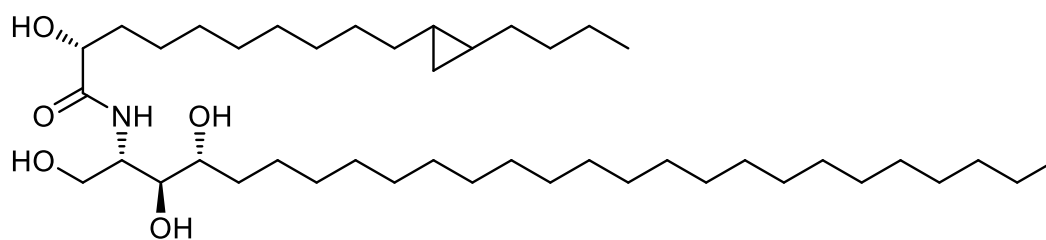
(19)



(20) & (21)

R = 1- β -D-glucosyl : Gracilarioside (**20**)

R = H : Gracilamide A (**21**)

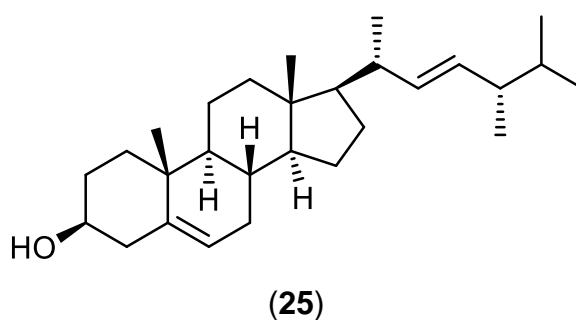
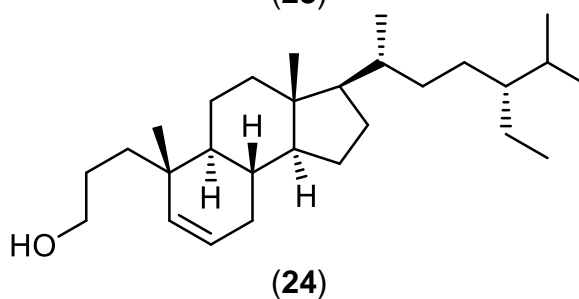
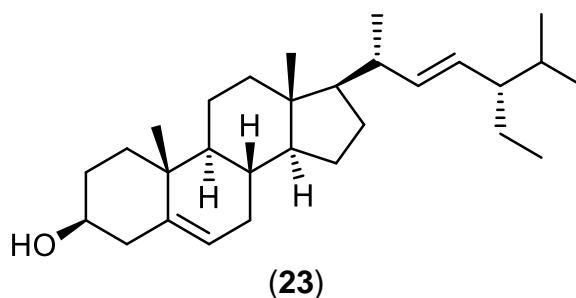


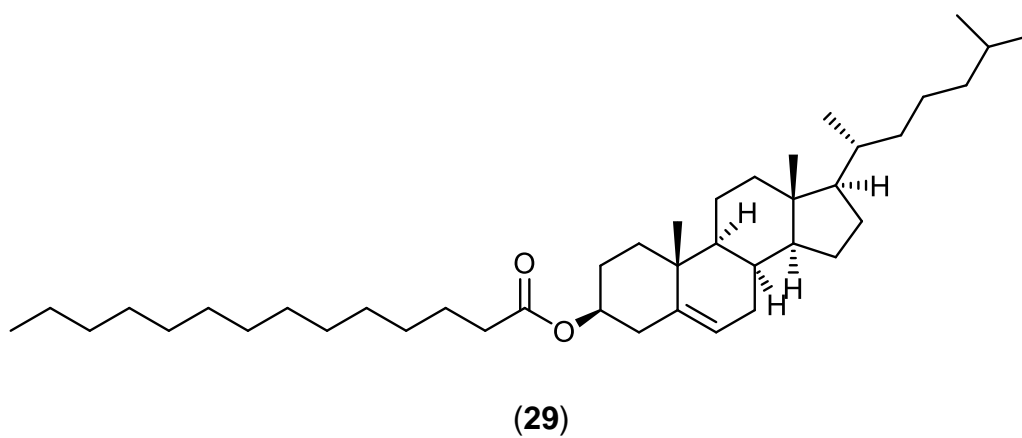
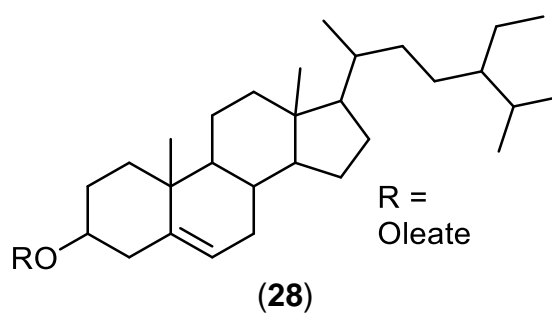
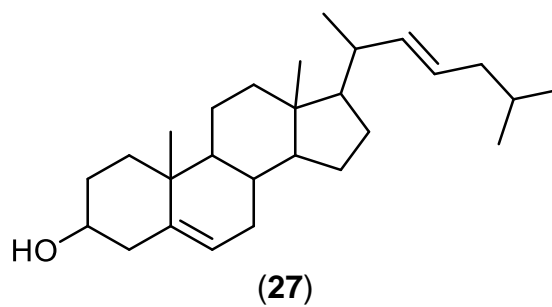
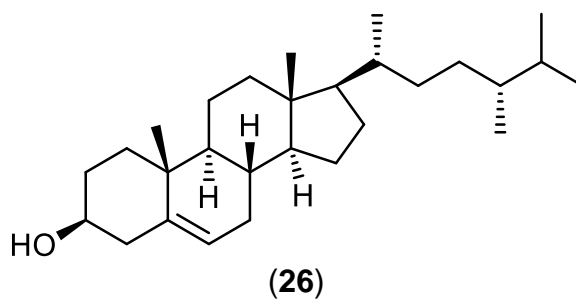
(22)

c. Senyawa Steroid

Senyawa golongan steroid telah diidentifikasi yaitu stigmasterol (**23**), β -stigmasterol (**24**), brassikasterol (**25**) dan kampesterol (**26**) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Gerwick dan Bernart, 1993; Kasanah *et al.*,

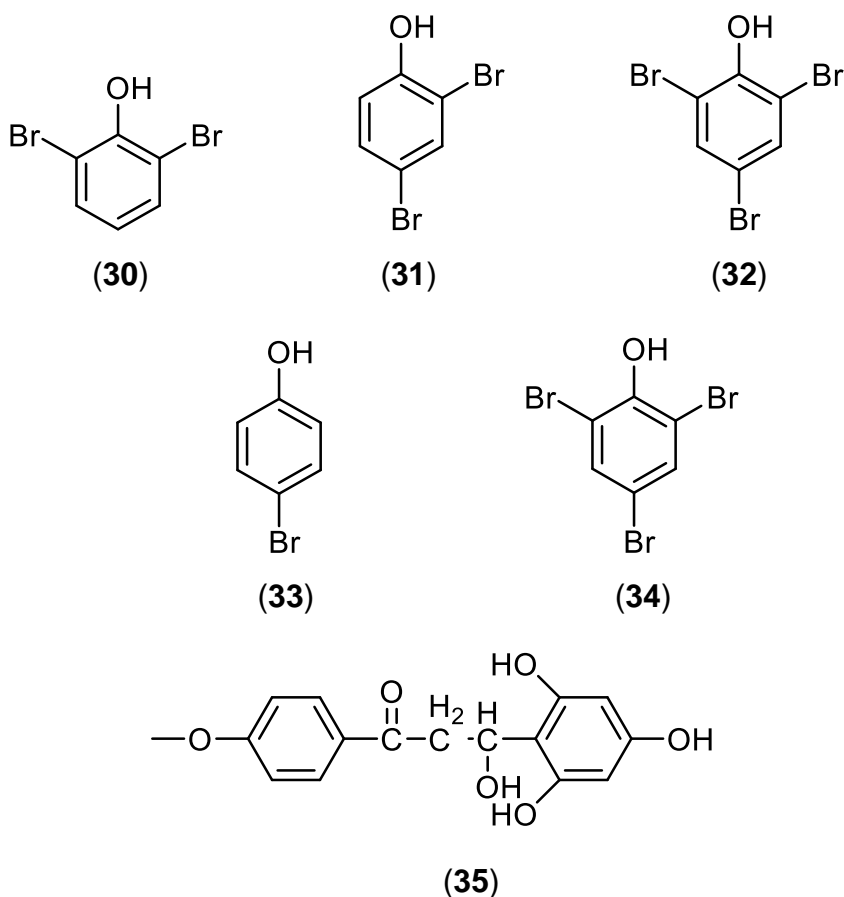
2015) dari *Gracilaria* spp. Senyawa kolesterol (**4**) diidentifikasi dari ekstrak dietil eter *G. changii*, *G. manilaensis* dan *Gracilaria* sp yang memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan (Fitrya *et al.*, 2016). Nasir *et al.*, (2011) telah mengidentifikasi 4 senyawa steroid antara lain: 22-dehidrokolesterol (**27**), kolesterol (**4**), stigmasterol (**24**), kolesterol oleat (**28**) dari ekstrak mkloroform:metanol (3:1) *G. saliconia*. Senyawa kolesterol miristat (**29**) diidentifikasi dari ekstrak dietil eter *G. changii* yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Fitrya *et al.*, 2016).





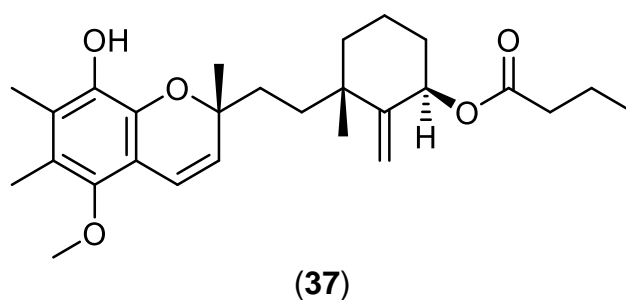
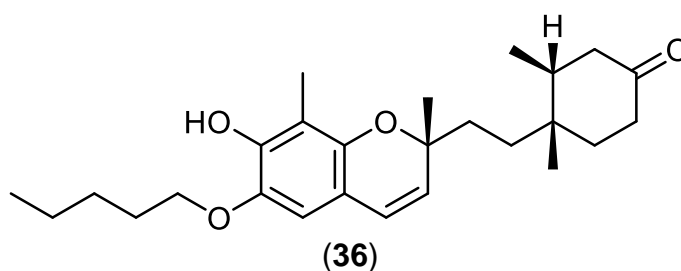
d. Senyawa Fenolik

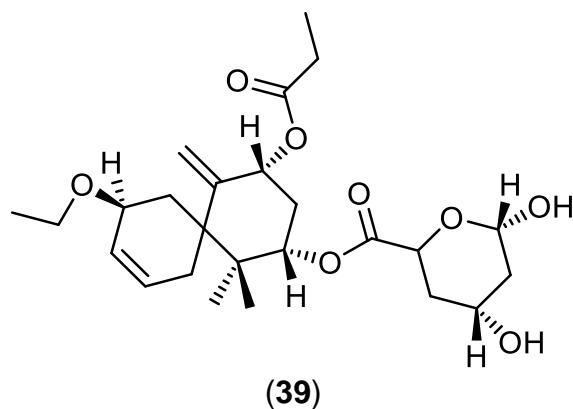
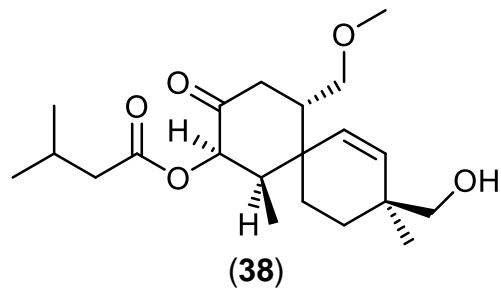
Whitfield *et al.* (1999) telah mengidentifikasi senyawa bromopenol antara lain: 2,6-dibromopenol (**30**), 2,4-dibromopenol (**31**), tribromopenol (**32**), 2-bromopenol (**33**), dan 4-bromopenol (**34**) dari *G. edulis* dan *G. secundata* yang memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur. Senyawa 1-(4'-metoksipenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroksipenil)-3-hidroksiopropanon (**35**) diidentifikasi dari ekstrak dietil eter *G. changii* yang memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan (Fitrya *et al.*, 2016).



e. Senyawa Hidrokarbon Lainnya

Antony dan Charaborty (2020b) telah mengisolasi 2 senyawa turunan kromenil yaitu 4'-[10'-[7-hidroksi-2,8-dimetil-6-(pentiloksi)-2*H*-kromen-2-il]etil]-3'4'-dimetilsikloheksanon (**36**) dan 3'-[10'-(8-hidroksi-5-metoksi-2,6,7-trimetil-2*H*-kromen-2-il)etil]3'-metil-2'-etilen sikloheksil butirat (**37**) dari ekstrak etil asetat:metanol (1:1) *G. salicornia*. Ekstrak etil asetat:metanol (1:1) *G. salicornia* menghasilkan 2 senyawa yaitu spiro[5,5]undekanes,3-(hidroksimetil)-7-(metoksimetil)-3,11-dimetil-9-okso-spiro[5,5]undek-4-en-10-metilbutanoat (**38**) dan 4-etoksi-11,11-dimetil-7-metilen-8-(propioniloksi)spiro[5.5]undek-2-en-10⁴,10⁶-dihidroksitetrahydro-2*H*-piran-10-10-carboksilat (**39**) (Antony dan Charaborty, 2019).





B. Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai potensi suatu zat untuk dapat menyebabkan kerusakan pada tubuh hewan uji ketika zat tersebut menyentuh atau masuk ke dalam tubuh hewan uji. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan larva *Artemia salina* yang dikenal dengan *Brine Shrim Lethally Test* (BSLT). Metode ini banyak digunakan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui apakah zat bersifat antikanker (McLaughin dan Rogers, 1998). Metode BSLT dilakukan dengan menghitung tingkat kematian larva *Artemia salina* setelah dilakukan pengujian 24 jam. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat uji yang dapat menyebabkan kematian hewan uji (larva *Artemia salina*) sebanyak 50% setelah masa pengujian 24

jam. Kategori toksisitas senyawa uji menurut Meyer *et al.* (1982) disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Kategori tingkat toksisitas ekstrak terhadap larva *Artemia salina*

No	Nilai LC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
1	<30	Sangat toksik
2	30 – 1000	Toksik
3	> 1000	Tidak toksik

(Meyer *et al.*, 1982)

C. Antiinflamasi

Inflamasi (peradangan) merupakan reaksi kompleks pada jaringan ikat yang memiliki vaskularisasi akibat stimulus eksogen maupun endogen. Dalam arti yang paling sederhana, inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal kerusakan sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel (Robbins, 2004). Penyebab inflamasi antara lain mikroorganisme, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika. Tujuan akhir dari respon inflamasi adalah menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar dapat mengisolasi, menghancurkan, atau menginaktifkan agen yang masuk, membersihkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan (Corwin, 2008).

Respon inflamasi terjadi dalam tiga fase dan diperantarai oleh mekanisme yang berbeda, yaitu: 1) fase akut, dengan ciri vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler. 2) reaksi lambat, tahap sub akut dengan ciri infiltrasi sel leukosit dan fagosit. 3) fase proliferasi kronik,

dengan ciri terjadinya degenerasi dan fibrosis (Wilmana, 2007). Respon antiinflamasi meliputi kerusakan mikrovaskular, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala proses inflamasi yang sudah dikenal ialah: 1) kemerahan (rubor), terjadinya warna kemerahan ini karena arteri yang mengedarkan darah ke daerah tersebut berdilatasi sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke tempat cedera (Corwin, 2008). 2) rasa panas (kalor) dan warna kemerahan terjadi secara bersamaan dan disebabkan oleh jumlah darah yang lebih banyak di tempat radang daripada di daerah lain di sekitar radang. Fenomena panas ini terjadi bila terjadi di permukaan kulit. Sedangkan bila terjadi jauh di dalam tubuh tidak dapat kita lihat dan rasakan (Wilmana, 2007). 3) Rasa sakit (dolor), rasa sakit akibat radang dapat disebabkan beberapa hal: a. adanya peregangan jaringan akibat adanya edema sehingga terjadi peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa nyeri; b. adanya pengeluaran zat-zat kimia atau mediator nyeri seperti prostaglandin, histamin, bradikinin yang dapat merangsang saraf-saraf perifer di sekitar radang sehingga dirasakan nyeri (Wilmana, 2007). 4) Pembengkakan (tumor), Gejala paling nyata pada peradangan adalah pembengkakan yang disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler, adanya peningkatan aliran darah dan cairan ke jaringan yang mengalami cedera sehingga protein plasma dapat keluar dari pembuluh darah ke ruang *interstitium* (Corwin, 2008). 5) Fungsi laesa, Fungsi laesa merupakan gangguan

fungsi dari jaringan yang terkena inflamasi dan sekitarnya akibat proses inflamasi (Wilmana, 2007).

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dari senyawa aktif dapat dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein menggunakan Bovin Serum Albumin. Metode ini digunakan karena denaturasi protein pada jaringan merupakan salah satu penyebab inflamasi. Panas dapat digunakan untuk mempengaruhi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar karena panas meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul yang menyusun protein bergerak sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan hidrogen. Selain itu, pemanasan akan membuat protein berubah kemampuan mengikat airnya. Energi panas akan mengakibatkan terputusnya interaksi non-kovalen yang ada pada struktur alami protein tetapi tidak memutuskan ikatan kovalennya yang berupa ikatan peptida. Proses ini terjadi pada rentang suhu yang sempit. Penghambatan denaturasi protein diketahui dengan pengukuran serapan secara spektrofotometri UV-Vis. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat dijadikan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat (Verma *et al.*, 2011).

Menurut Baylac & Racine (2003), kategori skala *in vitro* suatu senyawa sebagai antiinflamasi dibagi dalam 5 kategori seperti disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kategori aktivitas inflamasi

No	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
1	<10	Sangat kuat
2	10 ≤ IC ₅₀ ≤ 30	Kuat
3	31 ≤ IC ₅₀ ≤ 50	Sedang
4	51 ≤ IC ₅₀ ≤ 100	Lemah
5	>100	Tidak aktif

(Baylac & Racine, 2003)

Selain Uji *In vitro* metode penghambatan denaturasi protein menggunakan Bovin Serum Albumin dilakukan uji *in silico* dan metode ini digunakan pada pengembangan senyawa obat yang menggunakan media simulasi misalnya komputer. Pengembangan senyawa aktif sebagai antiinflamasi (inhibitor enzim siklooksigenase) dilakukan dengan penambatan molekul. Pengembangan tersebut diantaranya mencakup desain senyawa dan interaksi senyawa tersebut dengan enzim atau reseptor. Dalam hal ini, senyawa di uji interaksinya dengan reseptor enzim siklooksigenase (COX) dengan 2 isoform yaitu COX-1 dan COX-2 melalui uji *in silico* sehingga dapat diketahui afinitas senyawa yang berikatan dengan reseptor COX dan memiliki afinitas yang lebih baik dibandingkan dengan obat antiinflamasi nonsteroid (OANS) sebagai ligan pembanding melalui metode penambatan molekul dengan membandingkan energi bebas yang berupa skor CHEMPLP menggunakan *software* PLANTS 1.2 (Rachmania *et al.*, 2018).

D. Antikanker Sel MCF-7

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan sekitar (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah dan menyerang organ-organ penting serta saraf tulang belakang. Sel keadaan normal hanya akan membelah diri jika terjadi penggantian sel-sel yang telah mati dan rusak. Sebaliknya, sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga penumpukan sel baru akan terjadi. Penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal sehingga akan merusak dan mengganggu organ yang ditempatinya (Mangan, 2010).

Kanker payudara adalah salah satu penyakit yang bersifat ganas akibat bertambahnya sel kanker yang berasal dari sel-sel normal di payudara, bisa berasal dari kelenjar susu, saluran susu atau jaringan penunjang seperti lemak dan saraf. Sebagian besar kanker payudara berhubungan dengan faktor hormonal dan genetik yang berkaitan dengan:

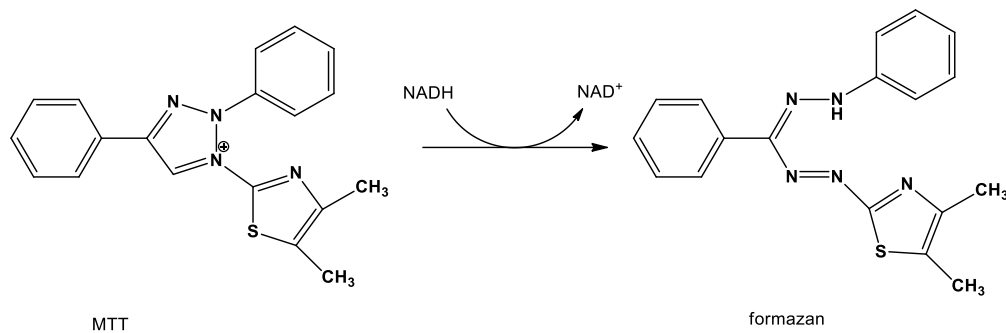
- 1) faktor yang berhubungan dengan diet yang berdampak negatif seperti makanan yang mengandung lemak jenuh, minuman beralkohol;
- 2) hormon dan faktor produksi seperti *membrane menarche* dan haid pertama pada usia muda (kurang dari 12 tahun), melahirkan anak pertama pada usia lebih tua (lebih dari 35 tahun), infertilitas dan tidak menyusui anak;
- 3) terpapar

radiasi pengion pada saat pertumbuhan payudara; 4) adanya faktor genetik dan keturunan (Depkes, 2009). Sel kanker payudara dapat tumbuh menjadi benjolan sebesar 1 cm² dalam waktu 8-12 tahun (Tambunan, 2003).

Sel kanker payudara yang biasa digunakan dalam penelitian adalah sel MCF-7 dan T47D. Sel MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel MCF-7 biasa digunakan untuk berbagai penelitian tentang kanker payudara secara *in vitro* karena memiliki beberapa karakteristik yang sama dengan epitel payudara yang terkait kemampuan untuk memproses estrogen dalam bentuk estradiol melalui reseptor estrogen di dalam sitoplasma (Pfeiffer, 2004).

Uji aktivitas antikanker secara *in vitro* menggunakan metode kolorimetrik *microtetrazolium* (MTT) assay, pada metode ini absorbansi dari formazan yang dihasilkan dibaca dengan menggunakan ELISA reader. Hasil yang diperoleh digunakan untuk menentukan besarnya nilai IC₅₀. Sel target yang digunakan dalam uji sitotoksik dengan metode MTT assay adalah sel kanker payudara MCF-7 (*hormone dependent breast carcinoma cells*). Prinsip metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromid) direduksi menjadi formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan reagen *stopper*. *Reagen stopper* tersebut akan melisis membran sel sehingga melarutkan formazan tersebut dan dapat

keluar dari sel. Formazan yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin tinggi sel yang hidup. Reaksi perubahan MTT menjadi formazan dijelaskan seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Perubahan MTT menjadi Formazan

Toksistas suatu senyawa atau ekstrak dinyatakan dengan parameter nilai IC_{50} , yang menyatakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat kelangsungan hidup sebesar 50%. Menurut Boik (2011) *US National Cancer Institute* menetapkan kriteria suatu ekstrak dikategorikan toksik jika berada di bawah $20 \mu\text{g/mL}$. Kategori tingkat sitotoksik suatu senyawa atau ekstrak berdasarkan nilai IC_{50} menurut Boik (2001), Sajjadi dkk. (2015) dan Prasetyaningrum dkk. (2018) disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Kriteria aktivitas sitotoksik berdasarkan IC₅₀

No	Kategori	IC ₅₀ (µg/mL)		Referensi
		Ekstrak	Senyawa	
1	Sangat kuat	<30	<4	Boik, (2001) Prasetyaningrum dkk. (2018) *)Cao dkk. (1998)
			<5*)	
2	Kuat	<20 20 – 50	5 – 10*)	Sajjadi dkk., (2015)
3	Sedang	50 - 100	11 - 30*)	
4	Lemah	101-500	-	
5	Tidak aktif	>500	>30*)	

Uji *in silico* juga dilakukan untuk mengetahui aktivitas anti kanker dilakukan metode *docking*. Kanker payudara diketahui memiliki kaitan erat dengan inflamasi yang bersifat kronis, inflamasi dalam sel dikontrol oleh enzim siklooksigenase 2 (COX-2). Enzim yang berperan mensintesis prostaglandin ini diketahui memiliki kaitan dengan perkembangan kanker payudara. Ekspresi berlebihan pada COX-2 ditemukan pada kanker payudara (Soslow *et al.*, 2000).

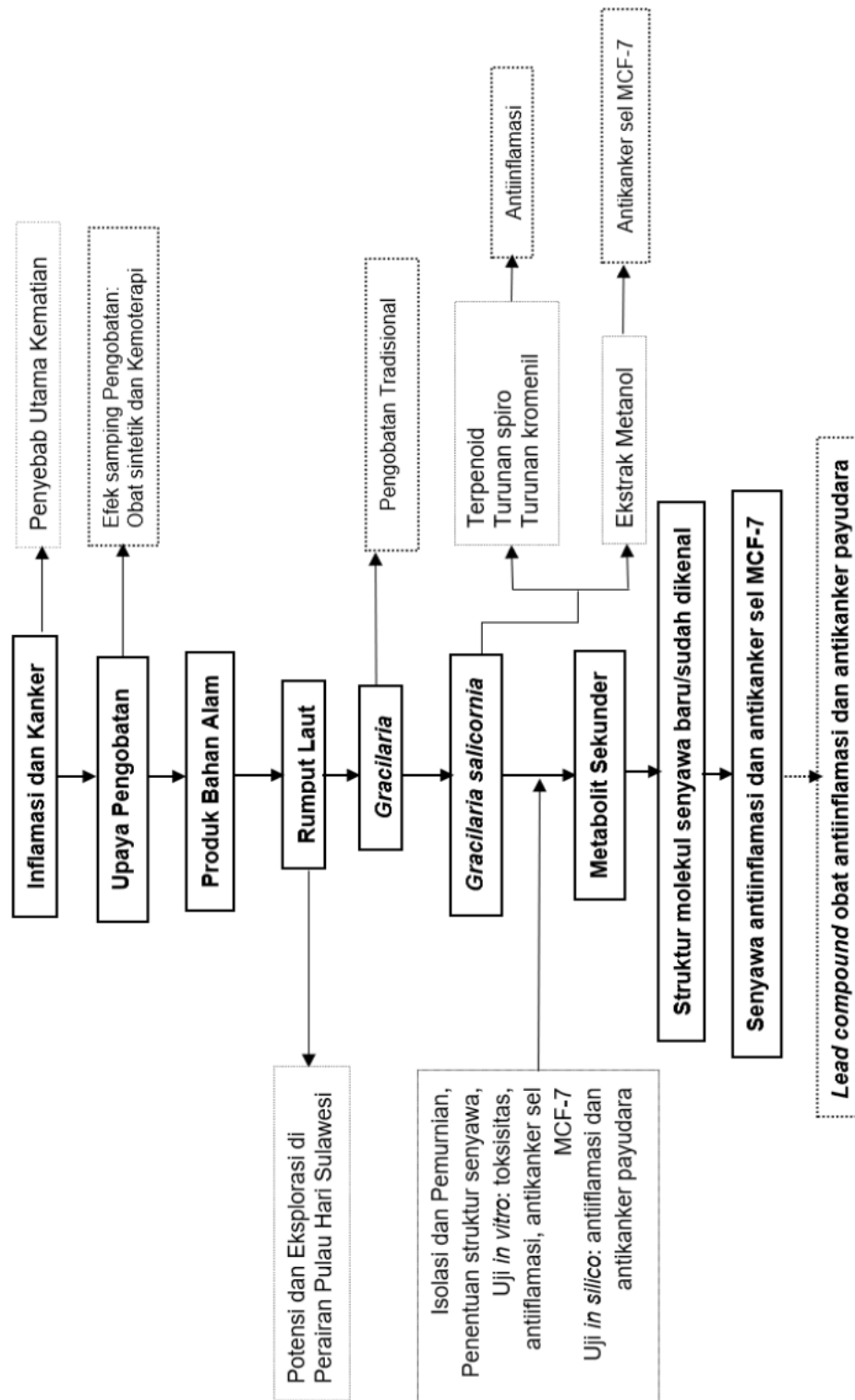
E. Kerangka Pikir Penelitian

Pencarian senyawa obat antiinflamasi dan antikanker merupakan kegiatan riset yang penting, karena dilatarbelakangi oleh penggunaan obat sintetik yang mempunyai efek samping dan harganya yang relatif mahal serta tingkat keberhasilan terapi yang belum optimal. Oleh karena itu, penelitian perlu dilakukan untuk mengkaji dan menemukan produk obat berbahan alam yang lebih efektif dan selektif. Rumput laut yang mempunyai

potensi sebagai sumber bahan kimia bioaktif adalah Rhodophyta. Pemanfaatan Alga merah (*Rhodophyceae*) dalam pengobatan tradisional adalah spesies dari *Gracilaria* seperti yang telah diuraikan di latar belakang dan tinjauan pustaka, karena mengandung senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai obat.

Proses isolasi dan pemurnian metabolit sekunder dari *G. salicornia* dapat dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu; preparasi sampel, ekstraksi secara maserasi, fraksinasi, dan pemurnian. Isolat murni dianalisis dengan spektroskopi untuk menetapkan struktur molekulnya dan dilakukan pengujian secara *in vitro*: (1) uji toksisitas, (2) uji antiinflamasi dan (3) uji antikanker serta *in silico*: (1) uji antiinflamasi dan (2) uji antikanker.

Metabolit sekunder yang bersifat toksik, mempunyai aktivitas antiinflamasi dan antikanker MCF-7 dapat dikembangkan menjadi *lead compound* bahan baku obat yang berguna di bidang kesehatan. Secara garis besar, kerangka pikir dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Bagan Kerangka Pikir Penelitian

F. Hipotesis

1. Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol *G. salicornia* mempunyai toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach, antiinflamasi, dan antikanker sel MCF-7
2. Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari *G. salicornia* mengandung senyawa metabolit sekunder turunan alkaloid, terpenoid, dan steroid.
3. Metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari *G. salicornia* memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, dan antikanker sel MCF-7.
4. Aktivitas metabolit sekunder hasil isolasi sebagai antiinflamasi dan antikanker dapat di buktikan berdasarkan analisis *in silico*.