

**IN SILICO TEST, ISOLATION AND ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES OF
KARAMUNTING (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)
LEAVES EXTRACT AS GLIOMA INHIBITORS**



**MARWATI
N013202003**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**



**UJI *IN SILICO*, ISOLASI DAN AKTIVITAS METABOLIT SEKUNDER EKSTRAK
DAUN KARAMUNTING (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)
SEBAGAI INHIBITOR GLIOMA**

***IN SILICO TEST, ISOLATION AND ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES OF
KARAMUNTING (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)
LEAVES EXTRACT AS GLIOMA INHIBITORS***

**MARWATI
N013202003**



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**Uji *In Silico*, Isolasi Dan Aktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Karamunting
(*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Sebagai Inhibitor Glioma**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi Doktor Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

**MARWATI
N013202003**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

DISERTASI

UJI *IN SILICO*, ISOLASI DAN AKTIVITAS METABOLIT SEKUNDER EKSTRAK DAUN
KARAMUNTING (*Rhodomyrtus tomentosa* (AITON) HASSK.)
SEBAGAI INHIBITOR GLIOMA

MARWATI
N013202003

Telah Dipertahankan Di Hadapan Panitia Ujian Doktor
Pada Tanggal 14 Mei 2024
Dan Dinyatakan Telah Memenuhi Syarat Kelulusan



Ko-promotor,



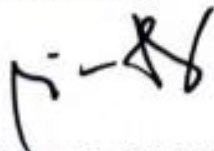
Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 0199002 1 005

Ko-promotor,



Dr. Rishan Yulianty, M. Si., Apt
NIP. 19780716 200312 2 001

Ketua Program Studi S3 Farmasi,
Fakultas Farmasi



Prof. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt
NIP. 19751117 200012 2 001



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A Manggau, Apt
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul Uji *In Silico*, Isolasi Dan Aktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Karamunting (*Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) sebagai Kandidat Antikanker Penghambat Glioma adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Yusnita Rifai., M.Pharm., Ph.D., Apt, Prof. Dr. Gemini Alam., M. Si., Apt dan ibu Dr. Risfah Yulianty., M. Si., Apt. Karya ilmiah ini belum di ajaukan dan tidak sedang di ajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak di terbitkan dari penulis lain telah di sebutkan dalam teks dan telah dicantumkan dalam daftar disertasi ini. sebagian dari disertasi telah dipresentasikan pada seminar internasional di Proceedings of the **Tapanuli International Health Conference 2022 (TIHC 2022)** dengan judul Toxicity Test of Leaf (*Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Ekstrac with Finder Liquid Variation Using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method, telah Accepted di jurnal **Indonesian Journal of Pharmacy**. dengan judul The Isolation, Characterisation, And Evaluation of Bioactivities of Secondary Metabolites from Leave Extracts of Karamunting (*Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk), telah submit di jurnal **Moroccan Journal of Chemistry** dengan judul ***In silico evaluation of the glioma activity of compound Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)**

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.



PRAKATA



“Assalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh”

Alhamdulillah Rabbil ‘Alamiin, Allah Rabbul izzah atas segala limpahan karunia dan hidayah-Nya, rasa syukur yang tiada hentinya sebagai implementasi terima kasih pada-Nya atas segala rahmat dan hidayah yang memberikan kesehatan, kemudahan, dan inspirasi sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Disertasi yang berjudul **“Uji *In Silico*, Isolasi Dan Aktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Sebagai Inhibitor Glioma”** sebagai salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Doktor pada Program studi Farmasi Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari bahwa, tanpa izin Allah SWT dan bantuan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan, Penelitian sampai pada penyusun Disertasi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan Disertasi ini.

Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada diri sendiri yang telah berjuang dengan sabar, sudah mau bertahan dan sudah mau bangkit, I love my self yang tidak pernah menyerah dalam menyelesaikan disertasi ini Teramat khusus, rasa bangga dan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada ayahanda tercinta Hayyung dan Ibunda tercinta Radi, tercinta yang telah menghadirkan ananda kedunia ini memberikan dukungan moril dan bantuan moral walaupun ditengah kesusahan mereka, serta doa yang tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan Disertasi ini. Kepada saudaraku tersayang Herman, Iwan, Herlina dan Haerati serta Ponakanku tercinta dan keluarga besarku terima kasih atas bantuan, cinta dan doanya.

Penulisan disertasi ini tidaklah mungkin bisa terselesaikan tanpa izin Allah SWT melalui bantuan dari berbagai pihak atas bimbingan memberikan motivasi kepada penulis demi terselesaikannya Disertasi ini. Pada kesempatan ini, penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Promotor ibu Hj. Prof. Yusnita Rifai., M.Pharm., Ph. D, Apt atas doa, ilmu, motivasi, kesabaran dalam memberikan arahan kepada bimbingan penulis untuk menyelesaikan disertasi ini.
2. Kopromotor Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt atas doa, ilmu, motivasi, kesabaran dalam memberikan bimbingan penulis untuk menyelesaikan disertasi ini.
3. Kopromotor Dr. apt. Risfah Yulianty., M. Si atas doa, ilmu, motivasi, kesabaran dalam memberikan bimbingan penulis untuk menyelesaikan disertasi ini.
4. Tim Penguji Disertasi Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt., ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt., ibu Prof Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt dan ibu Prof.Dr. Berna Elya, M.Si.,Apt. atas segala bantuan, arahan dan bimbinganya.
5. Ketua yayasan Universitas Almarisa Madani Bapak Drs. Hj. Sahibuddin A. Gani., apt dan ibu Dra. Hj. Aisyah Fatmawaty, M.Si., apt yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil, memberikan bimbingan dan arahan selama menempuh studi S3 Ilmu Farmasi, mereka berdua adalah pengganti orang tua saya selama di Makassar.
6. Dekan Fakultas Farmasi: Prof. Dr. rer. nat. Hj. Marianti manggau, M.Si .Apt atas dukungan dan fasilitasnya dalam penyelesaian disertasi ini.

7. Terima kasih yang tak terhingga kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Kemendikbudristek atas beasiswa penyelesaian studi yang telah dibarikan kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan studi dengan baik.
8. Teman-teman Angkatan seperjuangan S3 terkhusus kak Andi Nur Aisyah, kak Khairuddin dan kak Nurhikma atas segala kasih sayang, bantuan, arahan, dan semangatnya selama menjalani studi.

Saya pribadi menyadari bahwa penelitian dan penulisan disertasi ini masih banyak kekurangan, meskipun demikian semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat yang luar biasa pada ilmu pendidikan, masyarakat dan pemangku kepentingan dalam memajukan bangsa Indonesia. Saya berharap kepada Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Akhir kata, semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan kedepannya. Aamiin

Makassar, 24 Juni 2024



Marwati

ABSTRAK

Marwati, Uji *In Silico*, Isolasi Dan Aktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Sebagai Inhibitor Glioma.
(dibimbing oleh Yusnita Rifai, Gemini Alam dan Risfah Yulianty)

Rhodomyrtus tomentosa merupakan tanaman dari famili Myrtaceae yang dapat ditemukan pada beberapa daerah di Indonesia. Tanaman *R. tomentosa* telah dilaporkan mengandung senyawa golongan fenolik, flavonoid, steroid dan terpenoid. Senyawa *R. tomentosa* dilaporkan memiliki aktivitas sebagai inhibitor glioma dalam menghambat protein GLI secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kandungan kimia yang terdapat pada bagian tanaman *R. tomentosa* dan mengevaluasi aktivitas toksisitas, antioksidan dan antikanker pada ekstrak, fraksi dan isolat *R. tomentosa*. Serbuk simplisia daun *R. tomentosa* diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 70% dan dievaluasi toksisitas, aktivitas antioksidan, antikanker, dan inhibitor glioma secara *in vitro*. Terhadap ekstrak terpilih dilakukan pemisahan secara kolom kromatografi dan fraksi yang diperoleh dievaluasi aktivitas antioksidan dan antikanker. Fraksi terpilih dilanjutkan pemurnian sehingga diperoleh isolat. Isolat yang diperoleh dikarakterisasi dengan ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ²D-NMR, LCMS, dan FT-IR serta diuji aktivitasnya sebagai antioksidan, antikanker dan inhibitor glioma secara *in vitro* dan *in silico*. Total 44 senyawa dari tanaman daun karamunting didocking pada 1 protein yang bertanggung jawab pada pertumbuhan glioma menggunakan autodock tools. Hasil docking divisualisasi menggunakan Visualisasi Discovery Studio, juga dilakukan prediksi profil toksisitas, absorpsi dan metabolisme dari senyawa uji tersebut. Senyawa terbaik dari hasil docking molekular kemudian dilakukan pengujian menggunakan metode GLI-Dynabeads. Hasil elusidasi menunjukkan bahwa **senyawa 1** (Quercitrin) dan **senyawa 3** asam 2-(3-aminofenil) asetat yang merupakan golongan fenolik. **Senyawa 2** (β -sitosterol), merupakan golongan steroid. Evaluasi aktivitas dari ke-3 senyawa menunjukkan bahwa senyawa 1, 2, dan 3 memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat Glioma secara *in vitro* serta interaksi yang kuat secara *in silico* terhadap protein target GLI menunjukkan bahwa **senyawa 1** (Quercitrin), **senyawa 2** (β -sitosterol), dan **senyawa 3** asam 2-(3-aminofenil) asetat memiliki afinitas yang baik terhadap receptor GLI, dengan interaksi asam amino yang diprediksi memberikan efek yang lebih baik dibandingkan dengan ligan alaminya dengan nilai AG - 6,8 serta interaksi ikatan asam aminonya yang baik diprediksi dapat meningkatkan afinitas dalam memberikan efektifitas. Pengujian prediksi toksisitas menunjukkan semua senyawa tidak bersifat mutagenik, namun beberapa senyawa menunjukkan sifat karsinogenik, senyawa **senyawa 1** (Quercitrin), **senyawa 2** (β -sitosterol), dan **senyawa 3** (asam 2-(3-aminofenil) asetat parameter ADME. Uji GLI- Dynabeads **senyawa 1** (Quercitrin), **senyawa 2** (β -sitosterol), dan **senyawa 3** asam 2-(3-aminofenil) asetat menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan adanya endapan berwarna kuning kecoklatan sehingga dapat digunakan sebagai inhibitor glioma.

Kata Kunci: Inhibitor Glioma, *Rhodomyrtus tomentosa*, *in vitro* dan *in silico*, Isolasi, metabolit sekunder

ABSTRACT

Marwati, In a Silico Assay, Isolation and Activity of Secondary Metabolites of *Rhodomyrtus tomentosa* Leaf Extract as a Glioma Inhibitor.

(Supervised by Yusnita Rifai, Gemini Alam dan Risfah Yulianty)

Rhodomyrtus tomentosa is a plant from the Myrtaceae family that can be found in several regions of Indonesia. *R. tomentosa* plants have been reported to contain phenolic, flavonoid, steroid, and terpenoid compounds. *R. tomentosa* compounds are reported to have activity as glioma inhibitors in inhibiting GLI protein in vitro. This study aims to assess the chemical Compounds occurred in *R. tomentosa* plant parts and evaluate the toxicity, antioxidant, and anticancer activities of *R. tomentosa* extracts, fractions, and isolates. *R. tomentosa* leaf simplisia powder was extracted by maceration using n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol solvents and evaluated for toxicity, antioxidant activity, anticancer, and glioma inhibition in vitro. The selected extracts were separated by column chromatography, and the fractions obtained were evaluated for antioxidant and anticancer activities. Selected fractions were further purified to obtain isolates. The isolates obtained were characterized by 1H-NMR, 13C-NMR, 2D-NMR, LCMS, and FT-IR and tested for their activity as antioxidants, anticancer, and glioma inhibitors in vitro and in silico. A total of 44 compounds from *R. tomentosa* leaf plants were docked to one protein responsible for glioma growth using autodock tools. The docking results were visualized using Visualisas Discovery Studio, and the toxicity, absorption, and metabolism profiles of the test compounds were predicted. The best compounds from the molecular docking results were then tested using the GLI-Dynabeads method. Elucidation results showed that **compound 1** (Quercitrin) and **compound 3** (2-3-hydroxyphenyl acetic acid) are phenolic compounds. **Compound 2** (β -sitosterol) is a steroid compounds. Evaluation of the activity of the three compounds showed that compounds 1, 2, and 3 exhibited the best activity in inhibiting glioma in vitro and strong interactions in silico with GLI target proteins. Our findings showed that **compound 1** (Quercitrin), **compound 2** (β -sitosterol), and **compound 3** (2-3-hydroxyphenyl acetic acid), have good affinity to GLI receptors-, with amino acid interactions which is predicted to provide better effects compared to their natural ligands with AG values of -6.8 and good amino acid bond interactions are predicted to increase affinity in providing effectiveness. Toxicity prediction tests showed all compounds were not mutagenic, but some compounds showed carcinogenic properties. **Compound 1** (Quercitrin), **compound 2** (β -sitosterol), and **compound 3** (2-3-hydroxyphenyl acetic acid)met ADME parameters. The GLI-Dynabeads test of compounds 1 (Quercitrin), 2 (β -sitosterol), and 3 (2-3-hydroxyphenyl acetic acid)showed positive results indicated by the presence of a brownish-yellow precipitate. Thus, **compound 1** (Quercitrin), **compound 2** (β -sitosterol), and **compound 3** (2-3-hydroxyphenyl acetic acid) can be used as glioma inhibitors.

Keyword: Glioma inhibitors, *Rhodomyrtus tomentosa*, in vitro and in silico, Isolation, secondary metabolites

DAFTAR ISI

	HALAMAN
DISERTASIiii
DISSERTATION.....	..iv
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	v
PRAKATA.....	..vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Deskripsi Tanaman <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	4
2.1.1 Taksonomi Tanaman.....	4
2.1.2 Morfologi Tanaman.....	4
2.1.3 Nama Daerah Tanaman	4
2.1.4 Kandungan Kimia.....	5
2.1.5 Manfaat Tanaman	5
2.2. Pengertian Simplisia	6
2.3 Radikal Bebas.....	6
2.4 Antioksidan.....	6
2.5 Cara Pengujian Antioksidan	7
2.5.1 Metode 2,2-Dipenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH)	7
2.5.2 Metode 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat (ABTS).....	7
2.5.3 Metode Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)	8
2.5.4 Metode β - Carotene Bleaching (BCB).....	8
2.5.5 Metode Nitrit Oksida	9
2.5.6 Metode Radikal Hidroksil	10
2.5.7 Metode Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)	10
2.5.8 Inhibition Concentration 50 (IC ₅₀)	11
2.5.9 Quercetin	11
2.6 Uraian Toksisitas Dan Sitotoksik.....	12

2.6.1 Definisi Toksisitas.....	12
2.6.2 (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	12
2.6.3 Uji Sitotoksik.....	12
2.6.4 Metode MTT Assay	12
2.7 Ekstraksi.....	13
2.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	13
2.9 Kromatografi Cair Vakum (KCV)	13
2.10 Kromatografi Radial.....	13
2.11 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi	14
2.12 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi.....	14
2.12.1 Spektrometer Ultraviolet dan Sinar Tampak.....	14
2.12.2 Spektrometer Infra Red.....	14
2.12.3 Spektrofotometer <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	14
2.12.4 Spektrofotometri massa	15
2.13 <i>In Silico</i> (<i>Docking</i>)	15
2.14 Protein GLIOMA.....	15
2.14.1 Isositrate Dehidrogenase (IDH).....	15
2.14.2 Protein GLI	16
2.14.3 Gly-Dynabeads	16
2.15 Kerangka Berpikir.....	16
2.16 Kerangka Teori.....	17
2.17 Hipotesis	18
2.18 Kerangka Konsep Penelitian	18
BAB 3 METODE PENELITIAN	19
3.1 Desain Penelitian	19
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	19
3.3.1 Alat.....	19
3.3.2 Bahan	19
3.4 Metode Penelitian	20
3.4.1 Tempat Pengambilan Sampel.....	20
3.4.2 Pengolahan Sampel.....	20
3.4.3 Pembuatan Ekstrak Daun Karamunting	20
3.4.4 Fraksinasi.....	20
3.5 Skrining Fitokimia	20
3.5.1 Identifikasi Golongan Senyawa dengan Reagen Spesifik	20
3.5.2 Skrining Fitokimia Dengan LC-MS/MS.....	21
3.6. Analisis Kualitatif Dan Kuantitatif.....	21
3.6.1 Uji Kandungan senyawa Flavonoid	21

3.6.2 Uji kandungan Senyawa Fenolik	21
3.6.3 Penetapan Kadar Fenolik dan Flavanoid Total Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	21
3.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan	22
3.7.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Peredaman Radikal DPPH	22
3.7.2 Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS	23
3.7.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Radical Hidroksil	23
3.7.4 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Nitric Oxide	23
3.7.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Beta Carotene Bleaching	23
3.7.6 Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP	24
3.7.7 Uji Aktivitas Antioksidan Metode CUPRAC	24
3.8 Uji Toksisitas dengan Larva Udang <i>Artemia Salina Leach</i>	24
3.8.1 Penetasan Larva <i>Artemia Salina Leach</i>	24
3.8.2 Pembuatan Larutan Uji.....	24
3.8.3 Pengujian Uji Toksisitas Ekstrak <i>R. tomentosa</i>	24
3.9 Pengujian Aktivitas Antikanker	24
3.9.1 Pembuatan Media Kultur.....	24
3.9.2 Penumbuhan Sel.....	25
3.9.3 Penggantian Media	25
3.9.4 Perhitungan Sel	25
3.9.5 Subkultur Sel.....	25
3.9.6 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT Assay.....	25
3.10 Isolasi Metabolit Sekunder	25
3.11 Pengujian Bioaktivitas Isolat Terhadap Protein GLI.....	27
3.12 Karakterisasi Senyawa	27
3.12.1 Karakterisasi Menggunakan Spektroskopi FT-IR	27
3.12.2 Karakterisasi dengan menggunakan H^1 NMR, C^{13} NMR dan 2D NMR	28
3.12.3 Karakterisasi Menggunakan Spektroskopi Massa.....	28
3.13 Studi In Silico Metabolit Sekunder	28
3.13.1 Persiapan Ligan	28
3.13.2 Perhitungan Nilai Fisikokimia berdasarkan Kaidah <i>Lipinski</i>	28
3.13.3 Prediksi Parameter Absorpsi dan Distribusi.....	28
3.13.4 Prediksi Toksisitas.....	28
3.13.5 Persiapan Molekul Reseptor SMO	28
3.13.6 Validasi Metode <i>Docking</i>	28
3.13.7 Simulasi <i>Docking</i>	28
3.14 Analisis Data	29
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1 Pengambilan Sampel	30
4.2 Proses Ekstraksi	30

4.3 Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Pada Ekstrak	30
4.4 Hasil Uji Kualitatif dan Kuantitatif senyawa Flavanoid dan Fenolik Total Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	31
4.5 Uji Toksisitas Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	32
4.6 Hasil Aktivitas Antioksidan Ekstrak daun <i>R. tomentosa</i>	32
4.7 Uji Antikanker Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	34
4.8 Analisis Profil Senyawa Dengan LC-MS Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	36
4.9. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Ekstrak <i>R. tomentosa</i>	38
4.9.1 senyawa 1 (Quercitrin)	43
4.9.2 Senyawa 2 (β -sitosterol)	44
4.9.3 Senyawa 3 Asam 2-(3-aminofenil) asetat	47
4.10. Bioaktivitas Secara in vitro.....	49
4.11. Uji Kualitatif GLL-Dynabeads	49
4.12 Hasil Docking Molekuler senyawa daun <i>R. tomentosa</i>	51
4.12.1 Perhitungan nilai fisikokimia	52
4.12.2 Validasi Metode Docking.....	58
4.12.3 Analisis Simulasi Docking	58
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	68
5.1 Kesimpulan.....	68
5.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	69
DAFTAR LAMPIRAN.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Tingkat kekuatan antioksidan	11
Tabel 4.2. Hasil Persentase Rendemen Ekstrak Daun <i>R. Tomentosa</i>	30
Tabel 4.3. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	30
Tabel 4.4. Hasil Analisis kualitatif Terhadap Golongan Senyawa Fenolik dan Flavanoid Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	31
Tabel 4.5. Hasil Pengukuran Kadar Flavonoid Total Dihitung Sebagai Quercetin Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	31
Tabel 4.6. Hasil Pengukuran Kadar Fenolik Total Dihitung Sebagai Asam Galat Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i>	32
Tabel 4.7. Hasil Uji BSLT Ekstrak Daun <i>R. tomentosa</i> terhadap <i>Larva A. Salina</i>	32
Tabel 4.8. Hasil Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Dan Fraksi Daun <i>R. tomentosa</i> Terhadap Empat Sel Line	35
Tabel 4.9. Prediksi senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak <i>R. tomentosa</i>	37
Tabel 4.10. Data NMR senyawa Quercitrin.....	41
Tabel 4.11. Data NMR senyawa β -Sitosterol	46
Tabel 4.12 Data NMR Senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asetat.....	48
Tabel 4.13. Aktivitas sitotoksik senyawa.....	59
Tabel 4.14. Hasil penapisan (skrining) senyawa berdasarkan kaidah <i>Lipinski</i>	53
Tabel 4.15. Prediksi Absorpsi dan Distribusi	54
Tabel 4.16. Prediksi Toksisitas.....	56
Tabel 4.17 Hasil Docking Molekuler Ligan <i>R. tomentosa</i> Terhadap Protein Target SMO.....	58
Tabel 4.18. Nilai ikatan bebas dan residu asam amino yang berikatan dengan reseptor	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman karamunting (Dokumentasi Pribadi)	4
Gambar 2.2 Struktur senyawa yang teridentifikasi pada tanaman <i>R. Toemntosa</i>	5
Gambar 2.3. Mekanisme Reaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020).....	7
Gambar 2.4. Mekanisme Reaksi 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat (ABTS) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)	8
Gambar 2.5. Mekanisme Reaksi <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (FRAP) dengan antioksidan (Shi et al., 2022)	8
Gambar 2.6. Reaksi pembentukan radikal β -carotene	9
Gambar 2.7 Mekanisme Reaksi Nitrit oksida (NO) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)	10
Gambar 2.8 Mekanisme Reaksi <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i> (CUPRAC) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)	11
Gambar 2.9. Struktur <i>Quercetin</i>	12
Gambar 2.10 Mekanisme Reaksi Microtetrazolium terhadap reagen warna	13
Gambar 2.11 Alur senyawa fraksinasi dan pemurian	27
Gambar 4.12 Alur senyawa fraksinasi dan pemurian.....	27
Gambar 4.13 Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan ekstrak Daun <i>R. Tomentosa</i>	33
Gambar 4.14 Hasil korelasi antara konsentrasi sampel dan persen hidup sel kanker dari empat lini sel kanker: ekstrak etanol (EE), fraksi n- heksana (FH), fraksi etil asetat (FEA), fraksi etanol-air, (FAE) dari pembanding Doxorubicin	35
Gambar 4.15 Morfologi Sel (A) Sel sebelum adanya perlakuan, (B) Sel setelah penambahan reagen MTT, (C) Sel setelah pemberian ekstrak etanol 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (D) Sel setelah pemberian ekstrak etanol 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (E) Sel setelah pemberian ekstrak etanol 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (F) Sel setelah pemberian ekstrak etanol 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (G) Sel setelah pemberian ekstrak etanol 15,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	36
Gambar 4.16 Profil KLT ekstrak n-heksan (EH), ekstrak etil asetat (EEA) dan ekstrak etanol (ET) menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (8: 2) (A) pengamatan UV 254 nm; (B) Pengamatan UV 366 nm.....	36
Gambar 4.17 Profil KLT ekstrak orientasi eluen (a) Eluen n-heksan : Etil asetat (8:2), (b) Eluen n-heksan : Etil asetat (7:3) Eluen n-heksan : Etil asetat (8:2) Eluen n-heksan : Etil asetat (6:4).....	38
Gambar 4.18 Profil KLT Setelah pemisahan klorofil menggunakan eluen Etil asetat : metanol : air (8: 1,5 : 0,5) (A) pengamatan UV 254 nm; (B) Visual setelah disemprot H ₂ SO ₄ 10% dan (C) Pengamatan UV 366 nm	39
Gambar 4.19 Profil KLT Fraksi1-27, A (visualisasi UV 254), B (Setelah di sempotrot H ₂ SO ₄ , C (Visualisasi UV 254) Eluen n-heksan : etil asetat (8:2)	39
Gambar 4.20 Profil KLT subfraksi 1-10, A (UV 254), B (Setelah di sempotrot H ₂ SO ₄ 10%).....	40
Gambar 4.21 Profil Hasil KLT multi eluen senyawa Quercitrin	40
Gambar 4.22 Profil kromatogram dari KLT dua dimensi senyawa Quercitrin.....	40
Gambar 4.23 Spektrum ¹³ C-NMR dari Senyawa Quercitrin.....	42
Gambar 4.24 Spektrum H-NMR dari Senyawa Quercitrin	42
Gambar 4.25 Spektrum HMBC dari Senyawa Quercitrin	42
Gambar 4.26 Struktur Senyawa Quercitrin.....	43
Gambar 4.27 Profil KLT Subfraksi 1-8 A (setelah disemprot H ₂ SO ₄ 10%) dan B (visualisasi UV 366 nm) eluen kloroform : metanol (8:2).....	43
Gambar 4.28 Hasil KLT SF52 Kromatografi radial Penampakan Setelah di sempotrot H ₂ SO ₄ 10% eluen kloroform : metanol (8:2)	44

Gambar 4.29 : Uji kemurnian Isolat dengan 3 fase gerak yaitu 1 n-heksan : EA (7:3) 2. Kloroform : metanol (8:2) dan 3 n-heksan : EA : Aseton (5:2:3) A (setelah disemprot H ₂ SO ₄ 10%) dan B UV 366 nm Senyawa β -sitosterol	44
Gambar 4.30 . Uji KLT 2 dimensi (a) Noda A pada sinar UV 254; (b) Noda A pada sinar UV 366; (c) Noda B pada sinar UV 254; (d) Noda B pada sinar UV 366 Senyawa β -sitosterol eluen Kloroform : metanol (8:2) dan 3 n-heksan : EA : Aseton (5:2:3)	44
Gambar 4.31 Spektrum ¹³ C-NMR dari Senyawa β -sitosterol	45
Gambar 4.32 Spektrum H-NMR dari Senyawa β -sitosterol.....	45
Gambar 4.33 Spektrum HMBC dari Senyawa β -Sitosterol.....	46
Gambar 4.34 Struktur Senyawa β -Sitosterol	47
Gambar 4.35 Profil KLT Fraksi 3 (a) disinari lampu UV 254 nm (b) disemprot (H ₂ SO ₄) dan dipanaskan n-heksan : etil asetat (7:3).....	47
Gambar 4.36 Spektrum H ¹ -NMR Senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asetat	47
Gambar 4.37 Spektrum H ¹ -NMR Senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asetat.....	48
Gambar 4.38 Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asetat.....	49
Gambar 4.39 Struktur senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asetat.....	49
Gambar 4.40 Hasil Pengujian GLI-Dynabeads senyawa R. tomentosa.....	50
Gambar 4.41 Hasil Analisis Kromatogram Senyawa Quercitrin	50
Gambar 4.42 Hasil Analisis Kromatogram Senyawa β -sitosterol.....	51
Gambar 4.43 Hasil Analisis Kromatogram Senyawa asam 2-(3-aminofenil) asetat.....	51
Gambar 4.44 Visualisasi protein target (A) Struktur 3D LY2940680 (4-fluro-N-methyl-N-{1-[4- (1-methyl1H-pyrazol-5-yl) phthalazine-1-yl]piperidin-4 yl}2 (trifluoromethyl) benzamide) (B) Struktur reseptor SMO (A) dan native ligan dengan kode (PDB:4JKV) (C) Ligan sebelum dilakukan validasi (biru), ligan setelah dilakukan validasi (kuning).	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman <i>R. Tomentosa</i>	75
Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian	76
Lampiran 3. Hasil Spektrum LC-MS dari masing-masing Ekstrak <i>R. Tomentosa</i>	77
Lampiran 4. Hasil Spektrum UV dari senyawa Quercitrin	78
Lampiran 5. Hasil Spektrum FT-IR dari senyawa Quercitrin	78
Lampiran 6. Hasil DEPT dari senyawa Quercitrin	79
Lampiran 7. Hasil HMBC dari senyawa Quercitrin	79
Lampiran 8. Hasil MS dari senyawa Quercitrin	80
Lampiran 9. Hasil Spektrum UV dari senyawa β -sitosterol	80
Lampiran 10. Hasil FT-IR dari senyawa β -sitosterol	81
Lampiran 11. Hasil HMBC dari senyawa β -sitosterol	81
Lampiran 12. Hasil MS dari senyawa β -sitosterol	81
Lampiran 13. Hasil Visualisasi Ligan Asli Dan Ligan <i>R. tomentosa</i>	82

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Keterangan
A	Absorbansi
ABTS	2,2-Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid
Caco-2	Sel Human Colon Adenocarcinoma
CUPRAC	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity
BCB	Beta-Carotene Bleaching
BHA	Butylated Hydroxy Anisol
BHT	Butylated Hydroxy Toluene
BSLT	Brine Shrimp Lethality Test
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DHh	Desert Hedgehog
DPPH	2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
DMSO	Dimetil Sulfoksida
EE	Ekstrak Etanol
EEA	Ekstrak Etil Asetat
EH	Ekstrak N-Heksan
FEA	Fraksi Etil Asetat
FEA	Fraksi Etanol Air
FH	Fraksi N-Heksan
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GAEAC	Gallate Acid Equivalent Antioxidant Capacity
GLI	Glioma
gr	Gram
Hh	<i>Hedgehog</i>
HAT	Transfer Atom Hidrogen
HIA	Human Intestinal Absorption
IC ₅₀	50% Inhibition Concentration
KCV	Kromatografi Cair Vakum
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
KR	Kromatografi Radial
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
mL	Mililiter
MS	Mass Spectrometry
MDCK	Mandin Darby Canine Kidney
Nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric Oxide
PPB	Plasma Protein Binding
ppm	Parts Per Million
PTCH	Patched
Rf	Retardation Faktor
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Spesies Oksigen Reaktif
SET	Transfer Elektron Tunggal
SHh	Sonic Hedgehog
SMO	Proto-Oncogen-Smoother
SUFU	Suppressor Of Fused
TBHQ	Tertier Butylated Hydroxy Quinone

TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	Related Apoptosis-Inducing Ligand
UV	Ultra Violet
Vis	Visible
$\mu\text{g/mL}$	Microgram Per Mililiter
ΔG	Energi Bebas Gibbs (Energi Bebas Ikatan)

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

International Agency for Research on Cancer (IARC) menjelaskan pada 5 tahun terakhir, penyebaran kanker di seluruh dunia mencapai 50.550.287 kasus. Di Indonesia sendiri, pada 5 tahun terakhir mencapai 946.088 kasus. Dimana pada tahun 2020 jumlah kasus baru di Indonesia telah mencapai 396.914 kasus dengan angka kematian sebanyak 234.511 kasus (Global Cancer Observatory, 2020).

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang disebabkan oleh adanya sel yang bersifat abnormal yang mengalami pembelahan sel secara tidak terkendali serta kemampuan sel untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik melalui pertumbuhan langsung di jaringan yang terdekat atau dengan perpindahan sel ke tempat yang jauh (Pratiwi *et al.*, 2017). Beberapa penyebab pertumbuhan sel kanker dapat disebabkan oleh adanya mutasi sel DNA dan beberapa transduksi signal diantaranya seperti *TNF (Tumor Necrosis Factor)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) dan *Hedgehog* (Hh). Salah satunya dipicu oleh adanya aktivasi protein GLI dimodulasi oleh jalur signalling Hh (*Hedgehog*) yang berikatan dengan membran reseptor patched (*PTCH*), yang dapat mengaktifasi penekanan *proto-oncogen-smoothed* (SMO) sehingga terjadi pelepasan protein GLI (*Glioma*).

Glioma adalah istilah umum yang menggambarkan penyakit primer tumor otak. Termaksud tumor yang terjadi pada sistem saraf pusat (SSP), dan menyumbang hampir 80% dari semua jenis tumor otak primer yang ganas (Hanif *et al.*, 2017). Pasien glioma sampai saat ini hanya memiliki waktu kelangsungan hidup rata-rata hingga 18 bulan. Dengan demikian, studi tentang glioma adalah topik yang mendesak dalam riset kanker (F. X. Yi *et al.*, 2013). GLI yang merangsang transkripsi dari gen target mamalia. Signal yang terganggu dan menyimpang dari jalur Hh dapat menyebabkan sejumlah kanker (Abidi, 2014). Tidak mengherankan, pensinyalan hedgehog muncul sebagai target dalam terapi kanker dan sejumlah hedgehog inhibitor telah dirancang. Vismodegib telah menjadi antagonis SMO pertama yang disetujui oleh FDA pada tahun 2012 untuk pengobatan metastasis. Obat ini memiliki beberapa efek samping seperti kejang otot, alopecia, dan gangguan rasa. Selain itu, obat ini telah dilaporkan mengalami resistensi terhadap reseptor SMO. Dari kelemahan tersebut, maka perlu dilakukan pengembangan terhadap senyawa dari bahan alam sebagai pendekatan pengobatan kanker melalui jalur signalling hedgehog.

Jalur IHh dan DHh telah terbukti memiliki peranan penting dalam perkembangan jaringan normal, termasuk pembentukan tulang dan fungsi pankreas. Sedangkan pada jalur pensinyalan SHh (yang diinisiasi oleh glikoprotein SHh) memiliki peran penting dalam perkembangan embrio yang dibutuhkan dalam diferensiasi sel yang tepat dan pemeliharaan polaritas jaringan. Transduksi sel yang dimediasi oleh pengaktifan SHh dengan melalui pengikatan SHh ke PTCH (Ptched) yang kemudian dapat menghambat aktivitas *seven-transmembrane G-protein-coupled receptor like Smoothed* (SMO) dan terjadi pelepasan gen GLI. Pelepasan protein GLI yang berlebih dapat memicu terjadinya karsinoma, medulla blastoma, kanker pankreas dan kanker prostat (Chai *et al.*, 2021). Sehingga target protein GLI dapat digunakan untuk penemuan obat anti kanker. Potensial inhibitor Hh sebagai obat anti kanker sudah banyak dipublikasi, dan sebagian besar menjadikan SMO protein sebagian target. Namun tidak banyak bahan alam yang menjadikan GLI sebagai target. Karena mampu menghambat signal Hh, maka peranan inhibitor Hh sebagai obat anti kanker, isolasi dan pengembangan senyawa aktif dari bahan alam ini menjadi kebutuhan penting untuk kesehatan masyarakat umum (Chai *et al.*, 2021)

Beberapa tahapan strategi dapat dilakukan dalam penemuan obat antikanker baru, diantaranya adalah pencarian senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker secara spesifik, *in silico* dan isolasi senyawa aktif dari bahan alam, yang memiliki aktivitas antikanker. Sampai saat ini banyak senyawa metabolit sekunder dan turunannya yang berasal dari bahan alam telah diaplikasikan dalam terapi penyakit kanker .

Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat herbal yaitu karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. Daun karamunting termasuk ke dalam famili Myrtaceae yang memiliki bioaktivitas farmakologis yang luas. Daun karamunting telah banyak dimanfaatkan dalam pengobatan diantaranya untuk mengobati luka, diare, mulas, abses, kudis dan juga digunakan sebagai obat analgesik, antibakteri,

dan antiinflamasi (Dona dkk, 2020). Hal ini secara ilmiah dibuktikan bahwa daun *R. tomentosa* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder di antaranya flavonoid, tannin, saponin, steroid, rhodomyrtosone C, watsonianone A, tomentodione A, tomentodione C, rhodomentone A, acylphloroglucinol, tomentosenol A, 4S-focifolidione, dan 4R-focifolidione (Chen *et al.*, 2011; Gayathri and Kiruba, 2014; Liu *et al.*, 2016). Selain memiliki kandungan senyawa, daun karamunting juga memiliki aktivitas diantaranya seperti antibakteri (Salni and Marisa, 2020), immunodulator (Na-Phatthalung *et al.*, 2018), antiinflamasi (Srisuwan *et al.*, 2014), antioksidan (Kuntorini *et al.*, 2019).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wunnoo *et al.*, 2021 bahwa ekstrak *R. tomentosa* memiliki aktivitas antiinflamasi pada jerawat sebesar 36,36%. pengujian sitotoksik terhadap sel kanker kulit daun *R. tomentosa* memiliki aktivitas dalam menghambat metastasis sel A431 dengan mengurangi aktivitas dan ekspresi MMP-2/9 melalui penghambatan jalur pensinyalan ERK1 / 2, p38 dan FAK/Akt melalui aktivitas NF- κ B. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa rhodomyrtone memiliki aktivitas sebagai antimetastasis dan antikanker (Tayeh *et al.*, 2017).

Metabolit sekunder yang telah teridentifikasi melalui pendekatan kromatografi telah mendukung dalam penarikan senyawa bioaktif berkhasiat inhibitor glioma melalui proses ekstraksi dan dilanjutkan dengan pemurnian serta karakterisasi senyawa murni. Proses pemurnian senyawa bahan alam dilakukan dengan teknik kromatografi menggunakan berbagai fase diam dan fase gerak sehingga senyawa target dapat terpisah. Senyawa dari hasil pemisahan dikarakterisasi secara spektroskopi dan kromatografi. Senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dari ekstrak teraktif *R. tomentosa* dilanjutkan pengujian aktivitas inhibitor melalui pendekatan *in silico*.

Pengujian secara *in silico* melalui penambatan molekul terhadap protein target penyebab kanker yang bertujuan untuk menganalisis interaksi antara ligan (senyawa kimia) dan reseptor (protein target) berupa protein GLI sehingga dapat diprediksi kemampuan senyawa dalam menghambat protein target penyebab terjadinya kanker. Dari pendekatan *in silico* melalui penambatan molekul terhadap protein target dapat membantu dalam menemukan senyawa obat aktif dari bahan alam secara efisien dan efektif terhadap beberapa protein target yang bertanggung jawab penyebab kanker (Nursamsiar *et al.*, 2020). Berdasarkan informasi dari kandungan senyawa kimia dan aktivitasnya sebagai antioksidan dan antikanker serta pendekatan kandungan senyawa *R. tomentosa* sehingga fokus pada penelitian ini dilakukan pengkajian metabolit sekunder dari daun *R. tomentosa* yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor glioma baik secara *in vitro* maupun *in silico*.

Pada penelitian ini dilakukan serangkaian proses Metode ekstraksi dengan metode maserasi dan tingkat kepolaran pelarut yang berbeda yaitu menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 70%. Parameter evaluasi *in vitro* sebagai inhibitor glioma dari ekstrak hasil maserasi dengan aktivitas antioksidan dengan menggunakan beberapa metode antioksidan yaitu 2,2 *Diphenyl-1-Picrylhydrazyl* (DPPH), *Ferric Reducing Antioxidant* (FRAP), 2,2-Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS), *Beta-Carotene Bleaching* (BCB), *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* (CUPRAC), Nitric Oxide (NO) dan Hydroxyl. melakukan pengujian aktivitas antikanker terhadap sel line yaitu sel MCF7, T47D, WiDr, Hela dan sel vero. Kajian metabolit sekunder dibatasi pada ekstrak dan fraksi-fraksi teraktif yang selanjutnya dilakukan pemisahan secara kromatografi vakum. Karakterisasi senyawa dilakukan dengan metode spektroskopi ^1H dan ^{13}C NMR, 2D-NMR, FT-IR dan spektroskopi massa (MS). Evaluasi *in silico* dari senyawa terkarakterisasi dibatasi menggunakan uji penambatan molekuler (Molecular Docking) pada protein target yang memiliki peranan dalam mekanisme glioma. Evaluasi aktivitas *in vitro* dari senyawa terkarakterisasi dibatasi pada metode dengan aktivitas *in silico* dibatasi pada pengujian inhibitor glioma.

Aspek kebaruan dari penelitian ini adalah belum ada dan di laporkan mengenai penelitian aktivitas inhibitor glioma ekstrak daun tanaman *R. tomentosa* secara *in vitro*. Kajian isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak tanaman *R. tomentosa* sebagai inhibitor glioma dapat memberikan informasi ilmiah mengenai profil senyawa yang dapat dijadikan sebagai marker untuk pengembangan selanjutnya. Kajian *in silico* dari senyawa hasil isolasi tanaman *R. tomentosa* terhadap protein target terkait mekanisme inhibitor glioma.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dikaji dalam Penelitian ini , yaitu:

1. Bagaimana toksisitas dan aktivitas antioksidan ekstrak dari daun *R. tomentosa*?
2. Bagaimana aktivitas antikanker ekstrak dan senyawa hasil isolasi daun *R. tomentosa*?
3. Metabolit sekunder apakah yang diisolasi dari ekstrak etanol *R.tomentosa*?
4. Bagaimana aktivitas inhibitor glioma senyawa hasil isolasi secara *in vitro* dari ekstrak etanol *R. tomentosa*
5. Bagaimana interaksi penambatan molekuler senyawa hasil isolasi dari *R. tomentosa* terhadap protein target yang berperan sebagai inhibitor glioma?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian yang dikaji bertujuan untuk:

1. Melakukan uji toksisitas dan aktivitas antioksidan ekstrak dari daun *R. Tomentosa*.
2. Memperoleh ekstrak dan senyawa hasil isolasi dari daun *R. tomentosa* sebagai antikanker.
3. Mengisolasi dan menentukan struktur metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari ekstrak *etanol R. tomentosa*
4. Menghasilkan senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari tanaman *R. tomentosa* yang berpotensi sebagai inhibitor glioma.
5. Mengevaluasi mekanisme molekuler secara *in silico* dari senyawa hasil isolasi sebagai inhibitor glioma dengan menggunakan protein target yaitu protein GLI.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk:

1. Bidang ilmu pengetahuan dan teknologi, khususnya pada bidang kimia bahan alam diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah terkait profil senyawa yang berhasil diisolasi pada bagian tanaman *R. tomentosa* sehingga dapat dikembangkan pada penelitian selanjutnya.
2. Bidang industri, khususnya industri obat bahan alam diharapkan penelitian ini memberikan informasi terkait senyawa metabolit sekunder dari tanaman *R. tomentosa* sehingga dapat dijadikan sebagai marker yang memiliki aktivitas inhibitor glioma.
3. Bagi masyarakat, diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah terkait manfaat tanaman *R. tomentosa* sebagai bahan alam yang memiliki khasiat sebagai inhibitor glioma.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman *Rhodomyrtus tomentosa*

2.1.1 Taksonomi Tanaman

Karamunting *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. adalah tumbuhan berbunga family Myrtaceae, merupakan tumbuhan asli Asia selatan dan tenggara, dari India, China timur sampai selatan, Hong Kong, Taiwan dan Filipina, dan selatan hingga Malaysia dan Indonesia. Tumbuhan ini tumbuh di pesisir, hutan rimba alamiah, lahan basah, hutan rimba lembap dan basah, pinggiran rawa, hingga tinggi 2400 m permukaan laut.



Gambar 2.1. Tanaman karamunting (Dokumentasi Pribadi)

Adapun klasifikasi dari tumbuhan karamunting berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium botani FMIPA Universitas Negeri Makassar sebagai berikut (Dharmayanti, 2018):

Regnum	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Family	: Myrtaceae
Genus	: <i>Rhodomyrtus</i>
Species	: <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (Aiton) Hassk.

2.1.2 Morfologi Tanaman

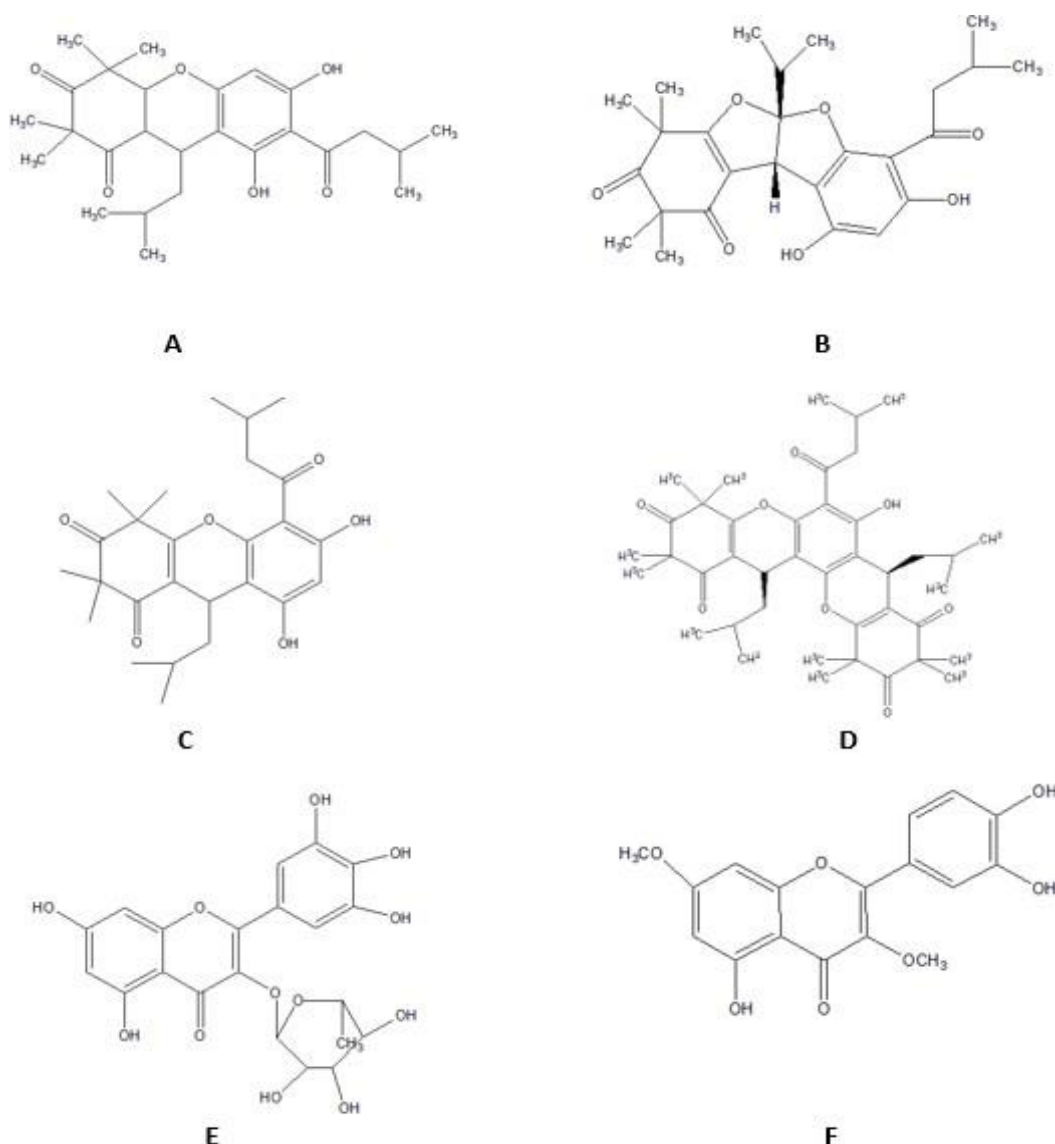
Tanaman karamunting perdu berkayu dengan tinggi mencapai 4 m. Tanaman ini dapat tumbuh pada ketinggian 300 m, jarang ditemukan pada daerah dengan ketinggian 1.300 m. letak daun bersilang berhadapan dan tulang daun berjumlah tiga dari pangkal, berbentuk oval, ujung dan pangkal meruncing, tepi rata, permukaan bagian atas mengkilap, sedangkan permukaan bagian bawah kasar karena memiliki rambut-rambut halus, panjang 5-7 cm dan lebar 23 cm, bagian atas dihiasi oleh helain yang menyerupai kelopak dengan warna yang senada dan bakal buah, memiliki empat sampai enam ruang. Bunga berwarna ungu, termasuk bunga majemuk dengan kelopak berlekatan, jumlah mahkota bunga lima dan putik satu, benang sari lurus dan memiliki panjang yang tidak sama. Buahnya berbentuk periuk, memiliki biji seperti biji anggur, daging buah terasa lebih berserat, tidak banyak mengandung air, warna buah yang semula berwarna hijau menjadi merah kecoklatan sampai hitam, dapat dikonsumsi dan rasanya manis (Yuliana et al., 2021).

2.1.3 Nama Daerah Tanaman

Karamunting memiliki sebuah julukan yang unik di daerah dengan nama Kalamunting di Pekanbaru, Haramunting di Sumatera Utara, dan Harendong Sabrang dengan asal di Jawa Barat. Tumbuhan mulanya dari Asia Selatan juga Asia Tenggara hingga penyebarannya ke berbagai tempat tropis juga subtropis hingga mencapai ketinggian 2400 m (Yuliana et al., 2021).

2.1.4 Kandungan Kimia

Daun karamunting terdapat kandungan senyawa Foroglusinol berupa rhodomentone, rhodomentone A, rhodomentone B, rhodomentone C, dan senyawa Flavanoid berupa Myricitrin dan Quercetin. (Chen *et al.*, 2011; Gayathri and Kiruba, 2014; Liu *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2021).



Keterangan : a. Rhodomyrtone; b. Rhodomyrtoson A; c. Rhodomyrtoson B;
d. Rhodomyrtoson C; e. Myricitrin; f. Quercetin

Gambar 2.2 Struktur senyawa yang teridentifikasi pada tanaman *R. toemntosa*

2.1.5 Manfaat Tanaman

Tanaman daun Karamunting atau dengan nama latin (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton.) Hassk) merupakan salah satu bagian dari keluarga *Myrtaceae* yang seluruh bagian tanaman dari karamunting telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional di Vietnam, Cina, Malaysia dan Indonesia sebagai antidiare atau disentri, immunosupresan, menyehatkan sistem darah, melawan rematik dan mengobati hematemesis, pendarahan rahim (Zhao *et al.*, 2020). Beberapa studi farmakologi secara ilmiah telah dibuktikan adanya aktivitas farmakologis yang diberikan oleh daun karamunting yaitu seperti antibakteri (Saising and Voravuthikunchai, 2012; Salni, and Marisa, 2020), immunodulator (Na-Phatthalung *et al.*, 2018), antiinflamasi (Srisuwan *et al.*, 2014), antioksidan (Kuntorini *et al.*, 2019), antidiabetik

(Ferlinahayati *et al.*, 2020).

2.2. Pengertian Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, simplisia merupakan bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani, simplisia pelican dan mineral (Depkes RI, 1979).

Simplisia harus bebas dari serangga, fragmen hewan, kotoran hewan, tidak boleh menyimpang dari bau, warna tidak mengandung lender, cendawan, menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain, tidak boleh mengandung bahan lain beracun atau berbahaya (Depkes RI, 1985). Menjamin keseragaman zat aktif, keamanan maupun kegunaannya, maka simplisia harus memenuhi persyaratan minimal tersebut, ada beberapa faktor yang berpengaruh antara lain adalah:

- a. Sumber bahan baku simplisia
- b. Proses pembuatan simplisia
- c. Cara pengepakan dan penyimpanan simplisia (Depkes RI, 1989).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul, atom atau gugus yang memiliki 1 atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif dan radikal seperti misalnya radikal bebas turunan oksigen reaktif (Reactive Oxygen Species). Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau reactive oxygen species (ROS) dan reactive nitrogen species (RNS). Reactive Oxygen terdiri dari superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen ($^1\text{O}_2$), oksida nitrit (NO^{\cdot}), peroksinitrit (ONOO^{\cdot}) dan asam hipoklorit (HOCl). Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Radikal hidroksil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. (Phaniendra *et al.*, 2016).

2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif adalah radikal bebas, senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dan dipicu oleh bermacam-macam faktor (Winarsi, 2007).

Jenis antioksidan terdiri dari dua, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan, sayur-sayuran dan buah-buahan (Winarsi, 2007), sedangkan yang termasuk dalam antioksidan sintetik yaitu butylated hydroxyanisole (BHA), terbutilasi hidroksi toluene (BHT), butylhydroquinone tersier (TBHQ) dan ester dari asam galat, misalnya gallate propil (PG) (Sayuti, 2015). Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dibedakan menjadi 3 kelompok, yaitu:

1. Antioksidan primer

Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksida. Suatu senyawa dinyatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberi atom hydrogen secara cepat kepada radikal, kemudian radikal antioksidan segera berubah menjadi senyawa yang stabil.

2. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder atau antioksidan non-enzimatis disebut sistem pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan, terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkhelatan metal, atau dirusak pembentukannya. Antioksidan sekunder dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas, kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya.

3. Antioksidan tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-repair dan metonin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2007).

Mekanisme utama dalam kerja antioksidan adalah melalui pemulungan radikal bebas (free radical

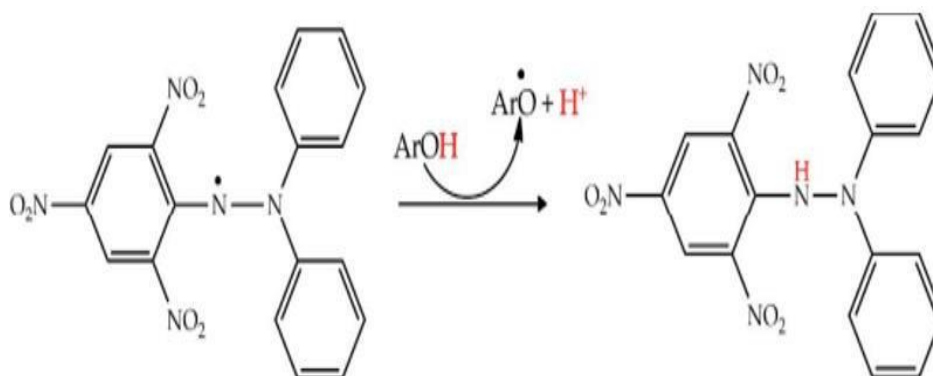
scavenging). Suatu molekul dapat menjadi radikal bebas ketika memiliki elektron yang tidak berpasangan. Adanya antioksidan sebagai suatu molekul yang lebih stabil dan mampu mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas sehingga mengurangi kapasitasnya untuk merusak. Selain itu, terdapat pula antioksidan yang bekerja sebagai pengkhelat ion logam (metal ion chelating). Ion-ion logam seperti Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{+} dan Cu^{2+} dapat memicu terjadinya oksidasi, oleh karena itu dengan aksi pengkhelatan dari antioksidan dapat mencegah terbentuknya radikal bebas (Lobo, et al., 2010).

2.5 Cara Pengujian Antioksidan

2.5.1 Metode 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) merupakan radikal bebas yang dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen atau proton sehingga membentuk senyawa non-radikal yang bersifat non-radikal. DPPH digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan pada suatu bahan/ ekstrak. Karena elektron yang tidak berpasangan, DPPH memberikan serapan yang kuat pada serapan sekitar 517 nm. Ketika elektron berpasangan karena adanya penangkap radikal bebas, maka serapannya menurun secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron yang diambil. Adanya senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning (Susilowato et al., 2019).

Metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah menggunakan radikal bebas 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Sadeer et al., 2020).

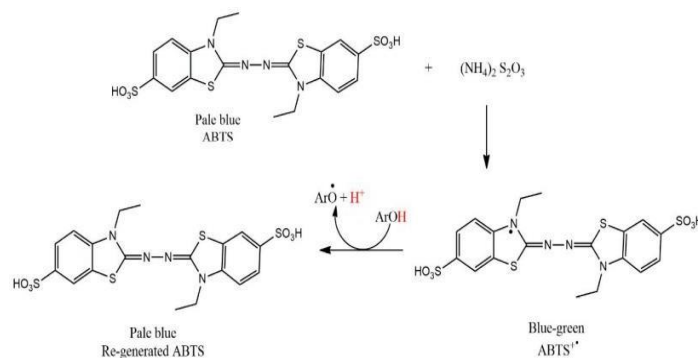


Gambar 2.3. Mekanisme Reaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)

2.5.2 Metode 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat (ABTS)

Metode ABTS menggunakan senyawa 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat sebagai sumber penghasil radikal bebas. Metode ini mengukur kemampuan antioksidan untuk meredam ABTS^+ yang dihasilkan dalam fase air. Dalam uji ini, kapasitas antioksidan diuji dengan mereaksikan senyawa uji dengan larutan ABTS yang menghasilkan penurunan warna larutan. ABTS^+ dihasilkan dengan mereaksikan garam ABTS dengan agen pengoksidasi kuat seperti potassium permanganat atau potassium persulfat (Sadeer et al., 2020)

Kemampuan relatif antioksidan untuk mereduksi ABTS dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 734 nm. Absorbansi maksimal juga dapat terjadi pada panjang gelombang yang lain. Panjang gelombang yang mendekati daerah infra merah (734 nm) dipilih untuk meminimalkan interferensi dari absorbansi komponen lainnya. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer selanjutnya dibandingkan dengan standar baku antioksidan sintetik, yaitu trolox yang merupakan analog vitamin E larut air. Hasil perbandingan ini diekspresikan sebagai TEAC. TEAC adalah konsentrasi (dalam milimolar) larutan trolox yang memiliki efek antioksidan ekuivalen dengan 1,0 mM larutan zat uji. TEAC mencerminkan kemampuan relatif dari antioksidan untuk menangkap radikal ABTS dibandingkan dengan trolox (Sadeer et al., 2020)

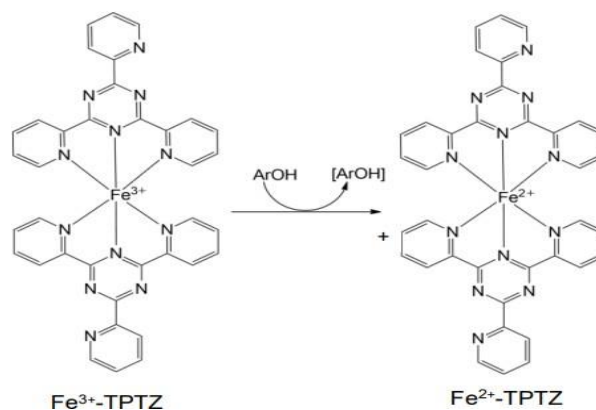


Gambar 2.4. Mekanisme Reaksi 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat (ABTS) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)

2.5.3 Metode Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Metode FRAP bekerja berdasarkan reduksi dari analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dari tripiridiltriazin $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ menjadi kompleks Fe^{2+} , $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Prinsip dari uji FRAP adalah reaksi transfer elektron dari antioksidan ke senyawa Fe^{3+} . TPTZ sendiri mewakili senyawa oksidator yang mungkin terdapat dalam tubuh dan dapat merusak sel-sel. Metode FRAP menggunakan $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ kompleks besi ligan 2,4,6-tripiridil-triazin sebagai pereaksi. Kompleks biru $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ akan mengalami reduksi menjadi $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ yang berwarna kuning dengan reaksi berikut: $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+} + \text{AROH} \rightarrow \text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+} + \text{H}^+ + \text{AR}=\text{O}$

Aktivitas antioksidan metode FRAP dihitung berdasarkan kesetaraan dengan standar FeCl_3 yang dinyatakan dengan $\mu\text{mol Fe(II)}$ per gram (Shi et al., 2022)



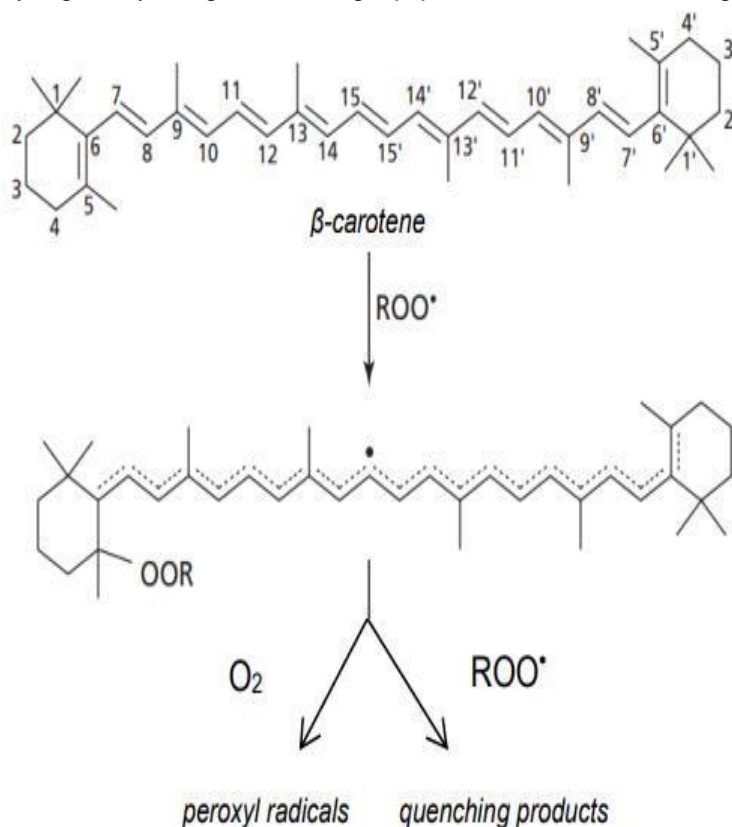
Gambar 2.5. Mekanisme Reaksi Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) dengan antioksidan (Shi et al., 2022)

2.5.4 Metode β -Carotene Bleaching (BCB)

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode β -Carotene Bleaching (BCB). Aktivitas antioksidan pada pengujian ini ditentukan oleh oksidasi β -karoten, asam linoleat dan kuersertin sebagai pembandingnya. Prinsip dari metode ini yaitu pemutihan β -karoten didasarkan pada hilangnya warna kuning β -karoten karena reaksi dengan radikal yang terbentuk oleh oksidasi asam linoleat dalam emulsi (Septiani et al., 2021). Dalam metode ini, β -karoten mengalami perubahan warna dengan cepat tanpa adanya antioksidan. Radikal bebas asam linoleat yang terbentuk pada abstraksi atom hidrogen dari salah satu gugus metilena diaksinya menyerang molekul β -karoten yang tidak jenuh. Akibatnya β -karoten akan teroksidasi dan terurai sebagian, sehingga β -karoten kehilangan gugus kromofor dan karakteristik warna jingganya (Septiani et al., 2021).

Prinsip Metode BCB (*β -Carotene Bleaching Method*) Pada uji aktivitas antioksidan dengan

menggunakan metode β -karoten asam linoleat, radikal bebas terbentuk dari hidroperoksid yang dihasilkan oleh asam linoleat. Radikal bebas asam linoleat terbentuk karena pengurangan atom hidrogen dari satu gugus metilen dialil yang menyerang ikatan rangkap pada beta karoten sehingga terjadi oksidasi beta



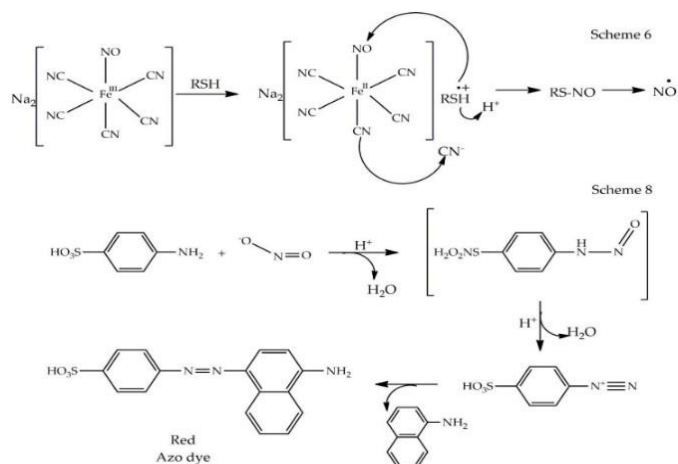
karoten yang menyebabkan hilangnya gugus kromofor yang memberi warna orange (Sadeer et al., 2020).

Gambar 2.6. Reaksi pembentukan radikal β -carotene (Sadeer et al., 2020).

2.5.5 Metode Nitrit Oksida

Pengujian metode Nitrit Oksida (NO) untuk menguji aktivitas antioksidan secara kuantitatif. Nitrit Oksida (NO) merupakan suatu molekul biologi yang terdapat di seluruh tubuh, dihasilkan oleh sejumlah tipe sel yang akan memberikan efek merugikan dan menguntungkan ditingkat seluler dan vaskuler (Karolina *et al.*, 2019). Nitrit oksida (NO) dihasilkan dari asam amino L-arginin oleh enzim dalam sel endotel vaskular, sel neuronal tertentu, dan fagosit. Kelebihan jumlah Nitrit Oksida (NO) akan mempunyai efek sitotoksik. Nitrit Oksida (NO) merupakan molekul kimia reaktif pada otot polos, menyebabkan vasodilatasi dan relaksasi otot polos organ tubuh lain, berdasarkan efek vasodilator tersebut, Nitrit Oksida (NO) dipakai sebagai preparat anti angina. Selain itu Nitrit Oksida (NO) juga berperan dalam proses imunologis, di antaranya dihasilkan oleh sel makrofag jaringan, akibat aktivasi berbagai sitokin dan endotoksin bakteri patogen. Nitrit Oksida (NO) diduga dapat merusak jaringan karena bersifat sitotoksik bukan hanya terhadap mikroba tetapi juga terhadap sel-sel penghasil NO dan terhadap sel tetangga (Sadeer et al., 2020).

Metode Nitrit oksida berperan dalam inflamasi akut dan kronik, dimana NO dipercaya dapat merusak jaringan karena bersifat sitotoksik tidak hanya pada mikroba tetapi juga terhadap sel penghasil NO dan sel sekitarnya. Secara umum Nitrat oksida (NO) memiliki dua sifat kerja pada sistem biologis tubuh. Pada konsentrasi rendah NO dapat mengatur banyak proses fisiologis tubuh namun jika berlebihan NO dapat berperan dalam proses patogenesis berbagai penyakit. Nitrit Oksida (NO) adalah molekul kecil yang mengandung satu elektron tidak berpasangan, oleh karena itu nitrit oksida (NO) juga merupakan radikal bebas. Prosedur ini didasarkan pada prinsip bahwa natrium nitroprussida dalam larutan air pada pH fisiologis secara spontan menghasilkan oksida nitrat yang berinteraksi dengan oksigen untuk menghasilkan ion nitrit yang dapat diperkirakan menggunakan reagen Griess. Penyetabilan nitrit oksida bersaing dengan oksigen, yang menyebabkan berkurangnya produksi ion nitrit (Singh *et al.*, 2012).

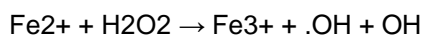


Gambar 2.7 Mekanisme Reaksi Nitrit oksida (NO) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020).

2.5.6 Metode Radikal Hidroksil

Pengujian terhadap aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode baik secara *in vitro* dan *in vivo*. Uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* dapat dilakukan dengan metode penangkap radikal hidroksil atau anti degradasi deoksiribosa yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti (Sri Atun, 2005; Kim, 2002). Radikal hidroksil dihasilkan dari reaksi Fenton antara 1,5 mM FeSO_4 dan 6 mM H_2O_2 (1,4:1, v/v) pada suhu 37°C selama 30 menit sebelum pengujian, dan dideteksi dengan kemampuannya untuk menghidroksilasi salisilat (Sadeer et al., 2020).

Uji aktivitas penangkap radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan metode Fenton sebagai penghasil radikal hidroksil. Reaksi pembentukan radikal hidroksil dapat terjadi menurut persamaan sebagai berikut:

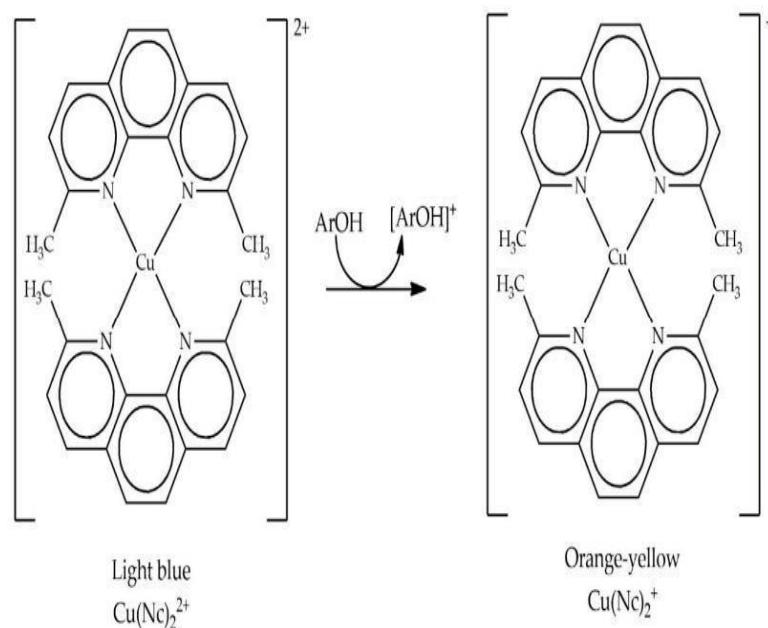


Radikal hidroksil selanjutnya akan bereaksi dengan 2-deoksiribosa membentuk malonaldehid. Adanya sampel atau ekstrak yang mengandung senyawa yang dapat menangkap radikal hidroksil akan mengurangi kerusakan 2-deoksiribosa. Adanya malonaldehid dapat diidentifikasi dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang akan membentuk kompleks berwarna merah, sehingga dapat ditetapkan secara (Sadeer et al., 2020).

2.5.7 Metode Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

Metode *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* CUPRAC merupakan salah satu metode untuk melihat daya antioksidan senyawa-senyawa polifenol, dan vitamin E yang dikenal mudah untuk dilakukan dan berbiaya rendah. Metode ini menggunakan reagen copper (II)-neocuproine ($\text{Cu}(\text{II})\text{-Nc}$). Metode ini dapat juga digunakan untuk mengetahui kapasitas antioksidan senyawa-senyawa fenolik (Apak et al., 2008). Kelebihan dari metode *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* CUPRAC adalah pereaksi yang digunakan cukup cepat bekerja, selektif, lebih stabil, mudah didapatkan dan mudah untuk di aplikasikan.

Prinsip dalam pengujian ini, Cu^{2+} -Neocuproine ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$) direduksi menjadi Cu^+ Neocuproine ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$) melalui aksi antioksidan non-enzimatik yang disajikan dalam sampel. Cu^+ Neocuproine merupakan kompleks stabil yang memiliki serapan maksimum pada 450 nm (Solani et al., 2021.)



Gambar 2.8. Mekanisme Reaksi *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* (CUPRAC) dengan antioksidan (Sadeer et al., 2020)

2.5.8 Inhibition Concentration 50 (IC₅₀)

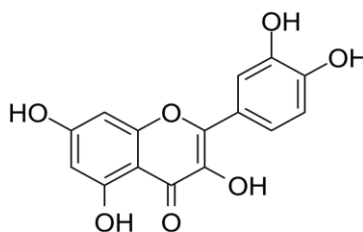
Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji dapat digolongkan menurut nilai IC₅₀ (Siddiq & Prabawati., 2016) yaitu :

Tabel 2.1 Tingkat kekuatan antioksidan

Nilai	Tingkatan
IC ₅₀ < 50 µg/mL	Sangat kuat
IC ₅₀ 50-100 µg/mL	Kuat
IC ₅₀ 101-150 µg/mL	Sedang
IC ₅₀ > 151-200 µg/mL	Lemah
>200 µg/mL	Sangat lemah

2.5.9 Quercetin

Quercetin adalah flavonoid yang banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan, Quercetin ada dalam berbagai bentuk glikosida dan lima senyawa kuning yang diisolasi dari quercetin makanan (misalnya, quercetin-3-glukosida atau isoquercitrin, quercetin-4'-glukosida, quercetin-3,4'-diglukosida [5]). Kelima senyawa ini adalah quercetin 3-O-beta-D-glukopiranosida (DA), kaempferol 3-O-(6"-trans-kumarin-beta-D-glukopiranosida (D1), kaempferol 3-O-(2, 4"-diacetyl-p-coumaroyl-6"-trans-coumaroyl) -beta-D-glucopyranoside (A), kaempferol 3-O-(2"-6"-di-trans-p-coumaroyl) -beta-D-glucopyranoside (D7), dan kaempferol 3-O-beta-D-glucopyranoside (B). Quercetin mengandung beberapa gugus hidroksil dan struktur molekulnya terdiri dari empat gugus reaktif, yaitu gugus dihidroksi di antara cincin A; gugus o-dihidroksi B; dan ikatan rangkap C2 dan C3 pada cincin C, dan gugus 4-karbonil memiliki aktivitas fisiologis yang siap mengalami esterifikasi dengan gugus karboksil dan penyakit anti-kardiovaskular (Qi W et al., 2022).



Gambar 2.9. Struktur Senyawa Quercetin (Qi W et al.,2022).

2.6 Uraian Toksisitas Dan Sitotoksik

2.6.1 Definisi Toksisitas

Toksisitas merupakan kemampuan zat kimia dalam menimbulkan kerusakan pada organisme baik saat digunakan atau saat berada di lingkungan. Uji toksisitas pada ekstrak tanaman biasanya dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu ekstrak dan salah satu prasyarat suatu tanaman dapat dikembangkan sebagai obat dan produk lainnya. Salah satu metode awal yang digunakan untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari suatu ekstrak atau senyawa bahan alam adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). BSLT adalah metode yang mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Meyer dkk., 2010).

Telah banyak dilakukan pengujian tentang toksisitas yang dikembangkan. Adapun beberapa metode pengujian yaitu, *Simple Brench-Top Bioassay* (terdiri dari *Brine Shrimp Lethality Test*, *Lemna Mino Bioassay*, *Crown-Gall Potato Bioassay* dan pengujian sel telur bulu babi (Meyer et al., 2010).

2.6.2 (*Brine Shrimp Lethality Test*)

BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk skrining Senyawa seperti senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman, metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktifitas antikanker. Metode ini mudah dikerjakan murah, cepat dan cukup akurat. Uji BSLT juga bertujuan menentukan suatu ekstrak memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel dan menjalani prosedur lebih lanjut dalam proses penemuan obat antikanker (Mayer.et al., 1982)

Metode BSLT juga digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa toksik dalam proses isolasi senyawa dari bahan alam yang berefek sitotoksik dengan menentukan harga LC_{50} dari senyawa aktif. Metode BSLT dapat digunakan untuk berbagai sistem uji seperti peptisida, mitotoksin, polutan, anestetik, komponen seperti morfin, karsinogenik, dan ketoksikan dari hewan dan tumbuhan laut serta senyawa beracun dari tumbuhan darat (Mayer.et al., 1982).

2.6.3 Uji Sitotoksik

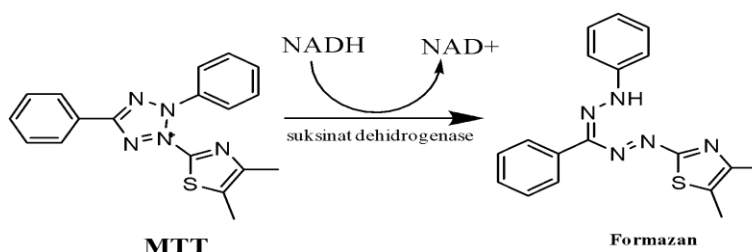
Uji sitotoksik adalah pengujian yang banyak digunakan untuk menguji kemampuan suatu senyawa dalam membunuh sel tumor atau sel kanker. Uji sitotoksik merupakan uji awal untuk mengetahui potensi toksisitas suatu senyawa terhadap sel kanker dan digunakan nilai IC_{50} sebagai parameter (Rangkuti *et al.*, 2019). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang mengarah pada penghambatan proliferasi sel 50%. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Mayer.et al., 1982).

Menurut National Cancer Institute kriteria sitotoksik berdasarkan nilai IC_{50} terdapat 4 kategori yaitu: jika nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ maka termasuk kategori sangat toksik, jika nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/mL}$ maka termasuk kategori cukup aktif/toksik, jika nilai IC_{50} 201-500 maka termasuk kategori lemah, dan jika nilai $IC_{50} > 501 \mu\text{g/mL}$ maka termasuk kategori tidak toksik (Mayer.et al., 1982).

2.6.4 Metode MTT Assay

Uji MTT Assay adalah uji kolorimetri untuk mengukur aktivitas metabolisme sel. Hal ini didasarkan pada kemampuan NADPH-enzim oksidoreduktase seluler yang bebas untuk mengurangi pewarna tetrazolium MTT ke formazan yang tidak larut, yang memiliki warna ungu. Dengan demikian, metode ini digunakan untuk mengukur viabilitas sel dalam hal aktivitas reduktif sebagai konversi enzimatis dari senyawa tetrazolium menjadi kristal formazan yang tidak larut dalam air oleh dehidrogenase yang terjadi di mitokondria sel hidup meskipun agen pereduksi dan enzim yang terletak di organel lain seperti retikulum endoplasma juga terlibat (Kuate, *et al.*, 2017). Prinsip metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam

sel. MTT Assay (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) direduksi menjadi garam 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 garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi) (Duval *et al.*, 2012).



Gambar 2.10. Mekanisme Reaksi Microtetrazolium terhadap Regen warna (Duval, *et al*, 2020)

2.7 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penyaringan zat aktif dari bagian tanaman obat yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman obat tersebut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Metode ekstraksi secara dingin bertujuan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia yang tidak tahan terhadap panas atau bersifat termolabil. Metode ekstraksi panas digunakan apabila senyawa-senyawa yang terkandung dalam simplisia sudah tahan panas (Marjoni, 2016)

2.8 Pemisahan secara Kromatografi

Prosedur kromatografi merupakan teknik yang beragam dan banyak digunakan pada fraksinasi ekstrak. Semua kromatografi didasarkan pada perbedaan distribusi senyawa di antara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak merupakan fluida yang dapat berupa cairan, gas, atau cairan superkritis. Fase diam yang digunakan berupa padatan yang terdiri dari partikel halus (Groves Carlin & Dean, 2020).

2.9 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum merupakan teknik pemisahan berguna dalam isolasi senyawa bioaktif. Metode pemisahan ini melibatkan prinsip yang sama seperti kromatografi lapis tipis, tetapi dapat diterapkan untuk memisahkan jumlah yang lebih besar dari KLT. Kromatografi vakum dapat digunakan pada skala besar maupun skala kecil (Groves Carlin & Dean., 2020; Ismail, 2017). Pemisahan dan pemurnian senyawa dengan Teknik kromatografi vakum dapat dilakukan dengan beberapa Teknik berdasarkan fase yang digunakan.

2.10 Kromatografi Radial

Kromatotron atau yang disebut sentrifugal kromatografi yaitu kromatografi dengan alat kromatotron, teknik pemisahannya memakai gaya sentrifugal dan gravitasi. Dengan teknik yang menggunakan silika gel for TLC yang berflourecent. Prinsip pemisahan kromatotron sama saja dengan kromatografi yang lain, namun teknik pemisahan akan berlangsung lebih cepat, karena ada gaya sentrifugal yang mempercepat proses penyerapan pelarut bersama komponen yang dipisah (Salsabila *et al.*, 2022)

Kromatografi radial memiliki prinsip yang sama seperti kromatografi konvensional yakni aliran fase gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Kromatografi jenis ini menggunakan rotor miring dan ditutupi oleh plat kaca kuarsa, sedangkan lapisan penyerapnya berupa plat kaca yang dilapisi oleh silika gel. Plat dipasang pada rotor listrik dan berputar pada 800 rpm. Eluen dimasukkan ke bagian tengah alat sehingga dapat mengalir dan menyebar karena gaya sentrifugal. Untuk mengetahui jalannya proses elusi dimonitor dengan lampu UV. Gas nitrogen dialirkan kedalam plat untuk mencegah pengembunan eluen dan mencegah sampel teroksidasi. Pemasukan sampel itu diikuti dengan pengelusan menghasilkan pita-pita

komponen dalam bentuk lingkaran. Di tepi plat, pita-pita akan berputar keluar dengan gaya sentrifugal dan ditampung dalam wadah (Salsabila et al., 2022).

2.11 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

KLT dua dimensi atau KLT dua arah ini dimaksudkan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika komponen terlarut memiliki karakteristik sifat kimia yang serupa, karena nilai R_f juga hampir sama. Selain itu, dua sistem fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan pada suatu campuran tertentu sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan dengan tingkat polaritas yang hampir sama. KLT dua arah dilakukan dengan menotol sampel disalah satu sudut lapisan lempeng dan dielus dengan eluen pertama. Lempeng kromatografi selanjutnya dipindahkan dari chamber dengan menggunakan eluen kedua sehingga proses elusi dapat terjadi pada arah kedua yang tegak lurus dengan arah elusi yang pertama. Kemampuan untuk memodifikasi selektifitas eluen menentukan keberhasilan pemisahan kedua dibandingkan dengan selektifitas eluen pertama (Groves Carlin & Dean, 2020).

2.12 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Suatu senyawa bahan alam hasil isolasi belum dapat dipastikan murni selama proses pemisahan, oleh karena itu hasil isolasi akan diidentifikasi berdasarkan kimia, fisika dan identifikasi dengan instrumen spektroskopi. Metode Spektroskopi yang umum digunakan untuk mengidentifikasi struktur adalah spektroskopi ultraviolet (UV), infra merah (IR), NMR (*Nuclear Magnetic resonance*), dan massa. Spektroskopi UV digunakan untuk identifikasi adanya gugus kromofor (fenolik; ikatan rangkap; dll), spektroskopi IR yakni untuk identifikasi suatu gugus fungsional (hidroksi; aromatik; karbonil; dsb), spektroskopi NMR (^1H dan ^{13}C), ^1H NMR untuk menentukan jumlah dan lingkungan proton (atom H dalam senyawa), ^{13}C NMR untuk menentukan jumlah atom karbon dalam senyawa, sedangkan untuk menentukan massa atom relatif (Mr) digunakan MS (Nur et al., 2024).

2.12.1 Spektrometer Ultraviolet dan Sinar Tampak

Spektrofotometri UV-VIS adalah metode untuk mengukur panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diserap oleh suatu sampel. Prinsip dasar metode spektrofotometri UV-VIS didasarkan pada pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diserap sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Sampel diberi radiasi UV (ultraviolet) pada panjang gelombang 180-380 nm atau cahaya tampak (visible light) pada panjang gelombang 380-780 nm. Penyerapan radiasi menyebabkan promosi elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi dalam gugus fungsi yang disebut kromofor. Data serapan ini akan dihasilkan oleh spektrofotometri UV-VIS berupa transmitansi atau absorbansi yang dapat dibaca oleh spektrofotometer sebagai spektrum UV-VIS (Skoog et al., 2016). Eksitasi elektron yang terjadi pada spektrofotometri UV-VIS dicatat dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi, sesuai dengan jenis elektron yang ada dalam molekul yang dianalisis. Semakin mudah elektron tereksitasi, semakin besar panjang gelombang yang diserap, semakin banyak elektron tereksitasi, maka semakin tinggi absorbansinya (Pratiwi & Nandiyanto, 2022).

2.12.2 Spektrometer Infra Red

Fourier transform infrared (FTIR) adalah salah satu teknik analisis yang penting bagi para peneliti. Jenis analisis ini dapat digunakan untuk mengkarakterisasi sampel dalam bentuk cairan, larutan, pasta, bubuk, film, serat, dan gas. Analisis ini juga memungkinkan untuk menganalisis material pada permukaan substrat. Dibandingkan dengan jenis analisis karakterisasi lainnya, FTIR cukup populer. Dalam prosedur analisis FTIR, sampel dikenai kontak dengan radiasi infra merah (IR). Radiasi IR kemudian berdampak pada getaran atom molekul dalam sampel, menghasilkan penyerapan dan/atau transmisi energi tertentu. Ini membuat FTIR berguna untuk menentukan getaran molekul spesifik yang terkandung dalam sampel (Nandiyanto et al., 2019).

Spektrum IR dibagi menjadi tiga daerah bilangan gelombang yaitu spektrum IR jauh ($<400\text{ cm}^{-1}$), spektrum IR tengah ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), dan spektrum IR dekat ($4000\text{-}13000\text{ cm}^{-1}$). Spektrum IR tengah adalah yang paling banyak digunakan dalam analisis sampel, tetapi spektrum IR jauh dan dekat juga

berkontribusi dalam memberikan informasi tentang sampel yang dianalisis (Nandiyanto et al., 2019).

2.12.3 Spektrometer resonansi magnetik inti (RMI)

Spektrometer resonansi magnetik inti (RMI) adalah instrumen kimia yang digunakan untuk memperoleh informasi mengenai struktur dan konformasi senyawa kimia. Spektroskopi RMI merupakan metode elusidasi yang cukup baik dalam menentukan struktur senyawa organik. Spektroskopi RMI memanfaatkan interaksi antara nucleus yang bertindak sebagai magnet kecil dan medan magnet luar, sehingga dapat digunakan untuk mengevaluasi ikatan kimia dan lingkungan nuklir (Dayrit & de Dios, 2017). Sinyal yang diperoleh dari spektroskopi RMI memberikan informasi tentang interaksi antara inti dan elektron serta interaksi antar inti, yang dapat membantu untuk menentukan struktur suatu senyawa kimia (Hilal et al., 2017). Spektrum RMI yang dihasilkan merupakan kumpulan dari satu atau lebih puncak resonansi pada frekuensi tertentu (Dayrit & Dios, 2017; Gunawan & Nandiyanto, 2021; Hilal et al., 2017). Ada dua jenis spektroskopi RMI, yaitu ^1H -RMI dan ^{13}C -RMI. Salah satu informasi penting yang ditunjukkan oleh spektrum ^1H -RMI adalah pergeseran kimia dari berbagai jenis proton dalam sampel, sedangkan ^{13}C -RMI dapat memberikan informasi struktural yang terkait dengan senyawa berdasarkan pergeseran kimia dari berbagai jenis karbon. Spektroskopi ^1H -RMI adalah metode analisis yang digunakan untuk menentukan struktur suatu senyawa berdasarkan jenis proton atau hidrogen. Spektrum ^1H -RMI memberikan informasi mengenai jumlah jenis proton dalam suatu senyawa dan sifat lingkungan dari masing-masing jenis hidrogen proton

2.12.4 Spektrometer Massa

Spektrometer massa adalah instrumen dengan kemampuan mengukur massa molekul setelah terionisasi. Karena massa molekul yang sangat kecil yang dinyatakan dalam gram atau kilogram, akan lebih mudah untuk mengukur massa molekulnya, yang dinyatakan sebagai mol; misalnya, massa atom hidrogen adalah $1,66 \times 10^{-24}$ gram, tetapi molnya kira-kira 1 gram, atau jika diinginkan dalam Dalton, mengingat satuan ini setara dengan 1/12 massa karbon isotop ^{12}C . Spektrometri tidak secara langsung mengukur massa isotop, melainkan rasio massa terhadap muatan dari ion yang terbentuk (m/z), di mana z adalah muatan, sebagian besar ion yang terbentuk dalam spektrometri massa memiliki nilai muatan $z = 1$. Spektrometer massa terdiri dari berbagai komponen, yaitu: 1) sistem pemasukan sampel, 2) sumber ionisasi, 3) penganalisis massa, 4) sistem pendeteksi, dan 5) sistem analisis data (Noriega et al., 2022).

2.13 In Silico (*Docking*)

In silico adalah salah satu metode yang merupakan kemajuan dari studi informatika yang memprediksi molekul baru serta fungsinya. Metode ini membantu memilih molekul yang lebih baik sebelum dilakukan pengujian secara *in vitro* atau kondisi *in vivo*. Metode ini dilakukan untuk mendesain, memprediksi sifat stabilitas fisika kimia dan mengoptimalkan ekspresi dari host (Daina, *et.al.*, 2020). *In silico* membantu dalam menafsirkan hasil penelitian, menafsirkan interaksi pada obat dan target reseptor serta memprediksi aktivitas katalik dan selektivitas. Metode ini juga digunakan untuk membuat visualisasi dari molekul sederhana tiga dimensi (3D) yang dapat dengan mudah dilakukan atau bahkan digabungkan dengan *real time* (Foscato, *et.al.*, 2020).

Molecular docking (penambatan molekul) dapat dianggap sebagai masalah gembok dan kunci (lock and key), protein dapat dianggap sebagai gembok dan ligan dapat dianggap sebagai kunci. *Molecular docking* dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu. Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan daerah ikatan (binding site) pada protein. Beberapa kemungkinan konformasi dalam ikatan antara ligan dan protein mungkin terjadi yang disebut model ikatan ((Nur et al., 2023).

2.14 Protein GLIOMA

2.14.1 Isositrate Dehidrogenase (IDH)

Isocitrate dehydrogenases (IDH) adalah enzim yang mengubah isocitrate menjadi alpha-ketoglutarate (α -KG, 2-oxoglutarate, 2-OG). Pada manusia, gen IDH1, IDH2, dan IDH3 mengekspresikan tiga isoform enzim IDH, yang semuanya memiliki fungsi penting dalam reaksi metabolik. IDH1 ditemukan

di sitoplasma dan peroksisom, sedangkan IDH2 dan IDH3 berada di matriks mitokondria. Meskipun IDH1 dan IDH2 memiliki lokasi yang berbeda, keduanya merupakan isoenzim dan mengkatalisis konversi isocitrate menjadi 2-OG sambil menggunakan nikotinamid adenin dinukleotida fosfat (NADP+) sebagai kofaktor untuk menghasilkan NADPH. NADPH sitosolik adalah antioksidan penting dan memiliki peran utama dalam metabolisme lipid. Di sisi lain, 2-OG digunakan sebagai kofaktor oleh dioksigenase yang bergantung pada 2-OG. Dioksigenase yang bergantung pada 2-OG yang paling terkenal dalam nukleus adalah enzim yang mengandung domain Jumonji- C (JmjC), yang merupakan histone lysine demethylases (KDMs), dan enzim sepuluh-sebelas translokasi (TET), yang merupakan DNA demethylases (Kayabolen et al., 2021)

Di sisi lain, enzim yang mengandung domain prolyl hidroksilase (PHD) adalah contoh dioksigenase sitosolik, yang memiliki berbagai fungsi metabolisme. IDH3 juga mengkatalisis pembentukan 2-OG dari isositrat, namun dengan menggunakan NAD+ sebagai kofaktornya, dan menghasilkan NADH yang digunakan untuk pembentukan adenosin trifosfat (ATP) dalam rantai transpor elektron. Ada juga perbedaan penting lainnya antara isoform IDH. IDH1 dan IDH2 berfungsi sebagai homodimer dan mengkatalisis reaksi reversibel, sedangkan IDH3 berfungsi sebagai heterotetramer dengan subunitnya yang berbeda dan mengkatalisis reaksi ireversibel. Mutasi yang diamati pada enzim IDH pada glioma terutama pada IDH1 sitosol dan mitokondria IDH2, paling sering pada kodon R132 dan R172. Mutasi ini menyebabkan IDH1 dan IDH2 mendapatkan fungsi enzimatik neomorfik, di mana mereka mengubah 2-OG yang diproduksi oleh enzim IDH tipe liar menjadi D-2-hidroksiglutarat (2-HG) yang dianggap sebagai onkometabolit, ia bertindak sebagai antagonis 2-OG dan karena itu menghambat aktivitas enzimatik dari enzim yang bergantung pada 2-OG, KDM, atau enzim keluarga TET. (Kayabolen et al., 2021).

2.14.2 Protein GLI

Signal dalam proliferasi kanker hedgehog (Hh) mengatur berbagai kejadian dalam perkembangan embrio dan pemeliharaan jaringan otot dewasa, Jika Hh rusak maka akan terjadi cacat lahir bawaan. Dan jika terjadi penyimpangan Hh mengakibatkan penyakit kanker. Mekanismenya Signal mula-mula mengikat ligan protein Hh pada membran reseptor PTCH. Ikatan ini akan menekan aktivitas Proto-oncogen-Smoothened (SMO) dan memicu pelepasan Gen GLI. Kelebihan GLI akan menyebabkan karsinoma, medula blasoma, kanker pankreas, kanker prostat. Sehingga GLI menjadi target protein yang digunakan dalam penemuan obat anti kanker. Trend pengembangan inhibitor signal Hh sebagai anti kanker sejak ditemukan Hh antagonis dari bahan alam yakni Cyclopamin, pada beberapa jenis seperti karsinoma, medula blasoma. Signal Hh disebabkan oleh mutasi PTCH atau SMO, akan mengaktifkan GLI kemudian GLI akan berpartisipasi pada aktivasi kanker yang berkaitan dengan penyimpangan signal Hh. GLI yang merupakan faktor transkripsi menyerupai zink, berperan mengatur beberapa gelombang termasuk sel pembeda yang berhubungan dengan signal Hh. Ada tiga gen homolog GLI dalam vertebrata GL1, GL2, dan GL3. Aktivator gelombang GL1, target utama Hh menyebabkan hubungan langsung dengan pembentukan tumor pada wilayah promotor (5'- GACCACCCA-3") target gen. Sementara GL2 dan GL3 bertindak sebagai repressor (Niewiadomski et al., 2019).

GLI1 adalah efektor transkripsi di jalur pensinyalan Hedgehog (Hh) dan diatur secara ketat selama perkembangan embrionik di pola diferensiasi jaringan. GLI1 memiliki ekspresi tingkat rendah dalam jaringan yang berdiferensiasi, namun, pada kanker tertentu, aktivasi GLI1 yang menyimpang telah dikaitkan dengan berbagai ciri kanker, seperti proliferasi, kelangsungan hidup, angiogenesis, metastasis, dan resistensi kemoterapi. Semua dikarenakan oleh peran GLI1 dalam mengatur siklus sel, replikasi DNA, dan proses perbaikan kerusakan DNA (Avery et al., 2021)

2.14.3 Gly-Dynabeads

Gly-Dynabeads merupakan metode yang digunakan untuk menarik senyawa target agar terjerap pada protein yang diinginkan dengan menggunakan magnetic beads. Senyawa-senyawa aktif dari tanaman akan terjerap pada target protein GLI yang termobilisasi yang kemudian akan dilakukan analisis lanjutan menggunakan instrument spektrofotometri kinerja tinggi (HPLC). Penggunaan metode ini akan menghasilkan senyawa bahan baku obat yang kerjanya spesifik terhadap protein GLI (H Kara, 2014).

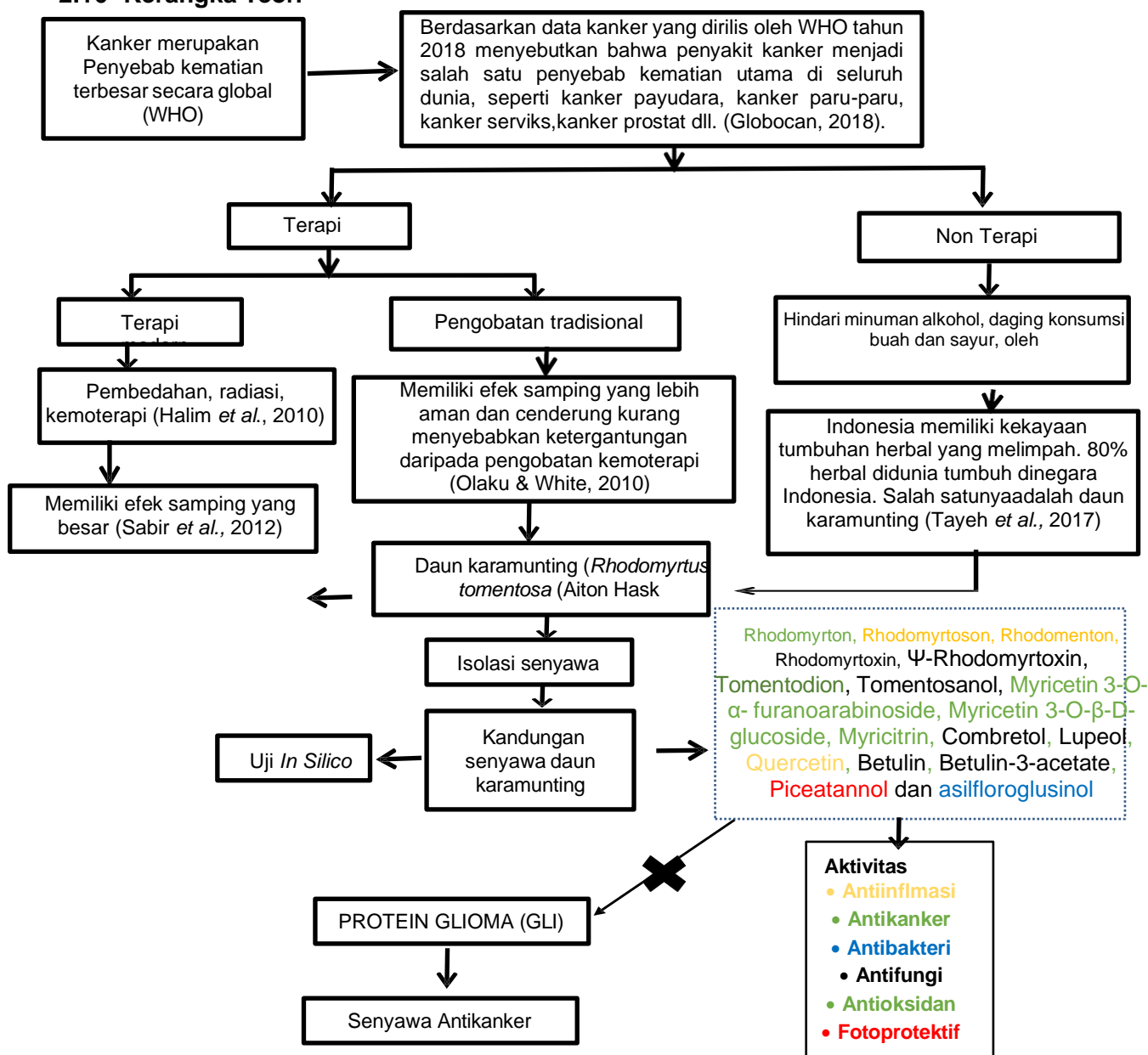
2.15 Kerangka Berpikir

Pencarian senyawa obat inhibitor glioma 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 berbaaha alam yang lebih efektif dan selektif.

Proses isolasi dan pemurnian metabolit sekunder dari *R. tomentosa* 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 aktivitas antioksidan, (3) uji antikanker dan (4) uji inhibitor Glioma serta *in silico*: (1) uji inhibitor glioma .

Metabolit sekunder yang bersifat toksik, mempunyai aktivitas antioksidan, antikanker dan inhibitor glioma dapat dikembangkan menjadi *lead compound* bahan baku obat yang berguna di bidang kesehatan. Secara garis besar. Kerangka pikir dalam penelitian ini disajikan pada **Gambar 2.11**.

2.16 Kerangka Teori

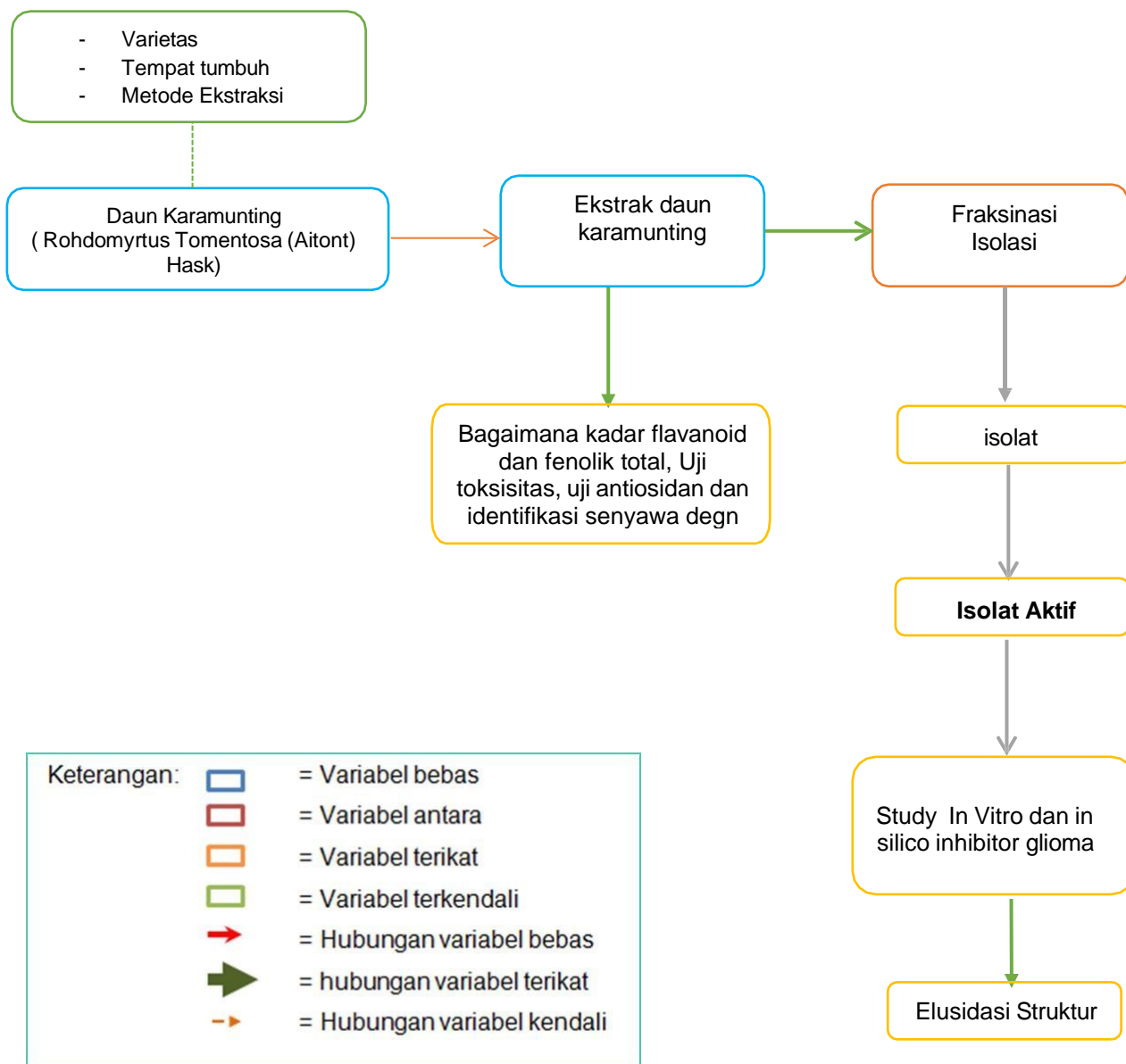


Gambar 2.11 Kerangka Pikir Penelitian

2.17 Hipotesis

1. Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% dari *R. tomentosa* mempunyai toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach dan aktivitas antioksidan
2. Ekstrak, fraksi dan isolat dari *R. tomentosa* mempunyai mempunyai aktivitas terhadap sel MCF7, T47D, WiDr, Hela dan el Vero.
3. Metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari ekstrak *R. tomentosa* yaitu senyawa Quercitrin, senyawa β -sitosterol, dan senyawa Asam 2-(3-aminofenil) asam memiliki aktivitas sebagai inhibitor glioma.
4. Senyawa metabolit sekunder dari *R. tomentosa* memiliki interaksi yang kuat terhadap protein target yaitu Protein GLI sehingga dapat digunakan sebagai inhibitor glioma

2.18 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.12 Kerangka Konsep