

Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata* dan Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara.

High-Pressure Extraction of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata* Leaves and *In Silico* and *In Vitro* Study against Antiestrogen in Breast Cancer



**AGUM WAHYUDHA JUR
N012231030**



**PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata* dan
Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara**

**AGUM WAHYUDHA JUR
N012 23 1030**



**PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**High-Pressure Extraction of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata*
Leaves and *In Silico* and *In Vitro* Study against Antiestrogen in Breast Cancer**

**AGUM WAHYUDHA JUR
N012 23 1030**



**STUDY PROGRAM MASTER OF PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

**Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *deglabrata* dan
Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara**

AGUM WAHYUDHA JUR
N012 23 1030

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *deglabrata* dan Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara

AGUM WAHYUDHA JUR

N012 23 1030

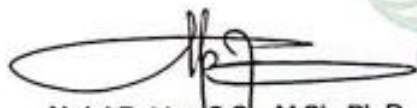
telah dipertahankan di depan panitia Ujian Magister Farmasi pada tanggal 06
Desember 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Magister Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



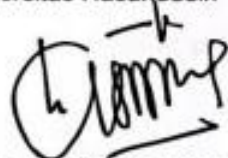
Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19771111 200812 1 001



Dr. Mansur Ibrahim, M.Kes.

Ketua Program Studi Magister Farmasi,
Universitas Hasanuddin

Dekan Fakultas Farmasi,
Universitas Hasanuddin



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19800101 200312 1 004



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

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *deglabrata* dan Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan Dr. Mansur, M. Kes. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dimasukkan pada jurnal *Biointerface Research in Applied Chemistry* sebagai artikel dengan judul "In Silico Analysis of Pharmacokinetics, Toxicity, and Drug-Likeness Properties of GC-MS Identified Bioactive Compounds from *Melochia umbellata* (Houtt.) Stapf var. *deglabrata* for Inhibiting Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Targets". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 06-12-2024



Agum Wahyudha Jur
AGUM WAHYUDHA JUR
N012231030

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing utama dan Dr. Mansur Ibrahim sebagai Pembimbing Pendamping. Saya mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak dari PT. Ismut Fitomedika Indonesia atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di pabrik industri. Saya juga berterima kasih banyak kepada laboran laboratorium farmakognosi dan fitokimia. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Sukanto S. Mamada, dan Budiman Yasir dalam memberikan saran dan masukan kepada tesis ini.

Kepada teman-teman Magister Farmasi Angkatan 2023, saya mengucapkan terima kasih atas dukungannya selama menempuh program pendidikan magister. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Civitas Akademika Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian.

Akhirnya, kepada kedua orang tua Bapak Jurumia dan Ibunda Darmiati tercinta saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada seluruh keluarga atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Makassar, 06 Desember 2024

Penulis

Agum Wahyudha Jur

ABSTRAK

AGUM WAHYUDHA JUR. Ekstraksi Tekanan Tinggi Daun *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata* dan Studi *In Silico* dan *In Vitro* terhadap Aktivitas Antiestrogen pada Kanker Payudara. (dibimbing oleh Abdul Rahim dan Mansur Ibrahim)

Latar belakang. *Melochia Umbellata* (Houtt) Stapf. var. *deglabrata* mengandung beberapa senyawa yang berpotensi memiliki sifat kemopreventif, seperti antiestrogen pada kanker payudara. Untuk mengesktraksi suatu senyawa dari tanaman, pemilihan metode memainkan peranan penting untuk mendapatkan hasil yang baik, salah satu metode ekstraksi yang memiliki keuntungan jika dibandingkan dengan metode lain yaitu *High-Pressure Extraction* (HPE). Senyawa yang ditemukan akan dilakukan pengujian insilico untuk memprediksi dan menentukan potensi aktivitas antiestrogen pada kanker payudara dan dilakukan pengujian in-vitro antikanker dalam menginduksi apoptosis sel model T47D. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi senyawa dari daun *M. umbellata* var. *deglabrata* menggunakan metode HPE dan dilanjutkan pengujian *in silico* dan in-vitro dalam menemukan efek antiestrogen (HER2). **Metode.** Daun *M. umbellata* var. *deglabrata* diekstraksi menggunakan HPE pada tekanan 200, 400, dan 600 MPa. Hasil ekstraksi dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Senyawa yang diperoleh kemudian diuji secara *in silico* menggunakan perangkat lunak Chimera dan BIOVIA Discovery Studio, dilanjutkan dengan prediksi farmakokinetik *in silico* menggunakan PkCSM dan SwissADME, dan *in vitro* dalam menginduksi apoptosis sel menggunakan sel T47D. **Hasil.** Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa persen rendemen tertinggi diperoleh pada HPE 600 MPa, dengan rendemen 28,032%. Analisis dengan GC-MS berhasil mengidentifikasi 12 senyawa. Pengujian *in silico* menunjukkan bahwa senyawa Lupeol dan γ -sitostenon menunjukkan afinitas pengikatan yang kuat terhadap reseptor estrogen dengan energi pengikatan sebesar -10,0 kcal/mol untuk kedua senyawa tersebut, dibandingkan dengan ligan alami yang memiliki energi pengikatan sebesar -10,8 kcal/mol pada target protein 3POZ. Selain itu, kedua senyawa tersebut memiliki profil farmakokinetik dan *drug-likeness* yang baik, menunjukkan potensinya untuk digunakan sebagai agen terapeutik. Pada pengujian in vitro masing-masing ekstrak HPE memiliki aktivitas mengiduksi apoptosis sel pada sel T47D secara signifikan yang dibandingkan dengan cisplatin. **Kesimpulan.** *M. umbellata* var. *deglabrata* dapat diekstraksi secara efektif menggunakan *High-Pressure Extraction* (HPE) pada 600 MPa. Pengujian *in silico* dan *in vitro* dapat menunjukkan efek antiestrogen HER2 pada kanker payudara

Kata Kunci : *Melochia umbellata*, GC-MS, Molekular Docking, *High-Pressure Extraction*, dan Antiestrogen (HER-2).

ABSTRACT

AGUM WAHYUDHA JUR. **High-Pressure Extraction of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. Deglabrata Leaves and *In Silico* and *In Vitro* Study against Antiestrogen in Breast Cancer** (supervised by Abdul Rahim and Mansur Ibrahim)

Background. *Melochia Umbellata* (Houtt) Stapf var. *deglabrata* contains several compounds with potential chemopreventive properties, such as antiestrogens for breast cancer. To extract a compound from a plant, the selection of methods plays a crucial role to achieve good extraction. One extraction method that stands out for its advantages over others is High-Pressure Extraction (HPE). The extracted compounds will undergo *in silico* testing to predict and determine their potential antiestrogen activity in breast cancer. Additionally, *in-vitro* anticancer testing was conducted to evaluate its ability to induce apoptosis in T47D cell models. **Aim.** This study aimed to extract compounds from the leaves of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. Deglabrata using HPE method. This study also aimed to perform *in silico* and *in vitro* analysis to identify active compounds with HER2-specific antiestrogen activities. **Method.** *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. Deglabrata was extracted using HPE method at pressures of 200, 400, and 600 MPa. The extraction results were analyzed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The obtained compounds were then tested *in silico* using Chimera and BIOVIA Discovery Studio software, with pharmacokinetic studies conducted using PkCSM and SwissADME and *in vitro* testing was performed to evaluate its ability to induce apoptosis in T47D cells. **Results.** The extraction results showed that the highest percent yield was obtained at HPE 600 MPa, with a yield of 28.032%. GC-MS analysis successfully identified 12 compounds. *In silico* testing revealed that lupeol and γ -sitosterone exhibited strong binding affinities to the estrogen receptor, with binding energies of -10.0 kcal/mol for both compounds, compared to the native ligand's binding energy of -10.8 kcal/mol for the target protein 3POZ. Additionally, both compounds demonstrated favorable pharmacokinetic and drug-likeness profiles, highlighting their potential as therapeutic agents. *In vitro* testing further confirmed that each HPE extract significantly induced apoptosis in T47D cells, showing effectiveness comparable to cisplatin. **Conclusion.** *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. Deglabrata can be effectively extracted using High-Pressure Extraction (HPE) at 600 MPa. *In silico* and *in vitro* analysis demonstrated the potential antiestrogenic HER2 effects of the compounds on breast cancer.

Keywords : High-Pressure Extraction, *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. Deglabrata, GCMS, *in silico*, and HER2 Antiestrogen.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	Error!
Bookmark not defined.	
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	2
BAB II METODE KERJA.....	3
2.1 Alat dan bahan.....	3
2.1.1 Alat	3
2.1.2 Bahan	3
2.2 Cara kerja	3
2.2.1 Pengambilan Sampel	3
2.2.2 Penyiapan Simplisia.....	3
2.2.3 Penyiapan Ekstrak	4
2.2.4 Analisis GC-MS.....	4
2.2.5 Pengujian <i>In Silico</i>	5
2.2.6 Pengujian Antikanker T47D Sel Kanker Payudara Metode WST-Assay.....	5
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	8
3.1 Penetapan Persen Rendemen.....	8
3.2 Analisis GC-MS.....	8
3.2.1 <i>High-Pressure Extraction</i> 200 Mpa	9
3.2.2 <i>High-Pressure Extraction</i> 400 Mpa	9
3.2.3 <i>High-Pressure Extraction</i> 600 Mpa	10

3.2.4 <i>Microwave-Assited Extraction</i>	10
3.2.5 Infusa	11
3.3 Studi <i>In Silico</i>	11
3.3.1 Preparasi Sampel (<i>Virtual Screening</i>)	11
3.3.2 <i>Molecular Docking</i>	12
3.3.3 Analisis <i>Drug Likeness</i>	17
3.3.4 Studi ADMET	19
3.4 Uji IC50 Sel Kanker Payudara T47D	20
3.5 Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak <i>M. Umbellata</i> Terhadap Induksi Apoptosis Pada Sel Kanker T47D	21
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	21
4.1 Kesimpulan	21
4.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	235
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Perbandingan metode terhadap persen rendemen	8
2. Hasil Analisis GC-MS menggunakan ekstraksi bertekanan 200 Mpa	9
3. Hasil Analisis GC-MS menggunakan ekstraksi bertekanan 400 Mpa	10
4. Hasil Analisis GC-MS menggunakan ekstraksi bertekanan 600 Mpa	10
5. Hasil Analisis GC-MS menggunakan metode MAE	11
6. Hasil Analisis GC-MS menggunakan metode Infusa	11
7. Nilai energi bebas ikatan dan residu asam amino yang berikatan dengan protein kanker payudara HER2-positif	14
8. Prediksi Drug likeness menggunakan pkCSM pada senyawa alami dari ekstrak tanaman <i>Melochia umbellata</i> var. <i>deglabrata</i> , Clog P(O/W): Logaritma Koefisien Partisi antara n-octanol dan air, Log S: <i>Solubilitas Air</i> , TPSA: <i>Topological Polar Surface Area</i> , <i>Bioavailability Score</i> , dan <i>Drug-likeness Prediction</i>	18
9. Prediksi Profil Farmakokinetik dan Toksikologi menggunakan SwissADME pada senyawa alami dari ekstrak tanaman <i>Melochia umbellata</i> var. <i>deglabrata</i> , HIA: <i>Human Intestinal Absorption</i> , BBB: <i>Blood Brain-Barrier</i> , CYP450 3A4 (<i>Cytochrome P450 3A4</i>), <i>Hepatotoxicity</i>	20
10. Presentase Viabilitas Sel T47D setelah Perlakuan	21
11. Presentase Sel Kanker Payudara Model T47D dalam menginduksi apoptosis sel	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Perlakuan IC ₅₀ ekstrak <i>M. umbellata</i> pada 96 well plate	6
2. Perlakuan uji aktivitas antikanker ekstrak <i>M. Umbellata</i> pada 96 well plate	7
3. Analisis GCMS pada ekstrak <i>M. umbellata</i>	9
4. Representasi struktur protein target kanker payudara HER2-positif dan ligan aslinya masing-masing.	11
5. Interaksi ikatan hidrogen/van der Waals dari ligan alami dan senyawa 1-7 dengan protein target kanker payudara HER2-positif (3PP0).	15
6. Interaksi ikatan hidrogen/van der Waals dari ligan alami dan senyawa 1-7 dengan protein target kanker payudara HER2-positif (4RJ3)	15
7. Interaksi ikatan hidrogen/van der Waals dari ligan alami dan senyawa 1-7 dengan protein target kanker payudara HER2-positif (3POZ)	16
8. Profil Ekstrak <i>M. umbellata</i> dalam menginduksi apoptosis menggunakan <i>flow cytometry</i>	23
9. Pengambilan sampel	28
10. Penyiapan simplisia	28
11. Ekstraksi dengan metode HPE.	28
12. Freeze Drying.	28
13. Ekstraksi dengan metode MAE	28
14. Ekstraksi dengan metode Infusa	28
15. Analisis GC-MS	28
16. Pengujian <i>in silico</i>	28
17. Pengujian <i>in vitro</i>	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja	27
2. Dokumentasi	28
3. Hasil Pengujian IC ₅₀	29
4. Hasil Pengujian Apoptosis Sel	32

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Arti dan Penjelasan
3D	3 Dimensi
ADMET	Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, Toksikologi
ASP	Aspartate
BBB	Blood Brain Barrier
BM	Bobot Molekul
CID	Chemical Identifier
ClogP	Calculated Logarithm of The Partition Coefficient
CO ₂	Karbon Dioksida
CYP450	Cytochrome P450
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GC MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GLU	Glutamate
GLY	Glycine
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIA	Human Intestinal Absorption
HPE	High Pressure Extraction
IC ₅₀	Half-Maximal Inhibitory Concentration
LEU	Leucine
LL	Lower Left
Log S	Logarithm Solubility
LR	Lower Right
LYS	Lysine
<i>M. Umbellata</i>	<i>Melochia umbellata</i> (Houtt.) Stapf var. Deglabrata
MAE	Microwave-Assited Extraction
MPa	Megapascal
NIST	National Institute of Standards and Technology
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PI	Propidium Iodine
R.O	Reverse Osmosis
RM	Rumus Molekul
RMSD	Root Mean Square Deviation
Rpm	Revolution Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SER	Serine
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System
T47D	Tumor 47 Diethylstilbestrol-Induced
THR	Threonine
TPSA	Topological Polar Surface Area
UL	Up Left
UR	Up Right
VAL	Valine
WHO	World Health Organization
WST-1	Water-Soluble Tetrazolium Salt-1

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Melochia umbellata (Houtt.) Stapf var. *deglabrata* merupakan tanaman yang berasal dari suku Malvaceae yang dikenal sebagai Paliasa oleh masyarakat Sulawesi Selatan, Indonesia (Tayeb et al., 2005). Secara turun-temurun telah lama digunakan dalam mengobati beberapa penyakit seperti; hepatitis, diabetes, hipertensi, dan kanker hati (Rahim et al., 2020). Secara ilmiah beberapa penelitian telah menguji daun paliasa dan terdapat beberapa kandungan senyawa kimianya seperti cardenolin, saponin, antrakuinon, bufadieno, kaempferol, skopoletin, quarecetin, sikloarten triterpenoid, dan sianogenik (Usman, 2020). Studi aktivitas farmakologi dari tumbuhan *Melochia umbellata* (Houtt.) Stapf var. *deglabrata* memiliki efek yaitu antidiabetes, antihipertensi, antihiperlipidemia, dan antikanker (Rahim et al., 2020)(Usman, 2020). Senyawa fitokimia yang bersumber dari bahan alam akan terus menjadi bagian terpenting dalam penemuan obat dengan pendekatan keberlanjutan. Salah satu jenis kanker masih menjadi masalah kesehatan yang sangat serius bagi perempuan yaitu kanker payudara.

Menurut data dari Globocan (2021) menyatakan bahwa kanker payudara berada pada urutan pertama di dunia dengan persentase sekitar 11,7 % kasus baru ditemukan dan tercatat mortalitas kanker payudara sekitar 684.996 kasus kematian (Sung et al., 2021). Sedangkan di Indonesia bahwa kanker payudara berada pada urutan pertama dengan persentase 16,7% kasus baru dan mortalitas kanker payudara sekitar 207.210 kasus kematian (WHO, 2020). Dalam Penegakan diagnostik berdasarkan pemeriksaan patologi bahwa pemeriksaan status HER2 (c-erbB-2, HER2/neu) saat ini telah direkomendasikan untuk karsinoma payudara invasif (Panigroro et al., 2019), HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) memiliki aktivitas dimerisasi reseptor dan menghasilkan autofosforilasi residu tirosin pada sitoplasma sehingga menginisiasi terjadinya proliferasi sel dan tumorigenesis. Hasil HER2 positif terjadi sekitar 15-30% yang menginvasi kanker payudara dan telah menjadi biomarker prognostik dan prediktif (Cavallaro et al., 2023)(Iqbal & Iqbal, 2014).

Sifat kemopreventif suatu senyawa pada tanaman telah banyak ditemukan dalam pengobatan kanker. Penemuan fitosenyawa pada tanaman dapat meminimalisir efek samping yang terjadi. Penggunaan metode ekstraksi juga perlu diperhatikan untuk mendapatkan senyawa tanaman. *High Pressure Extraction* (HPE) menjadi solusi dalam mengesktraksi senyawa dengan keuntungan yang lebih ramah lingkungan karena menggunakan air sebagai pelarut (Ağcam et al., 2021). In-silico dapat memberikan pemahaman secara mendasar tentang aktivitas farmakologi pada senyawa.

In-silico adalah suatu metode komputasi dalam menggambarkan dan memprediksi ikatan afinitas dan interaksi terbaik antara suatu senyawa dengan molekul target. Hasil yang didapatkan dapat divisualisasikan dan memprediksi suatu senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas efek farmakologi. (Ekins et al., 2007)(Saravanan et al., 2022). Untuk membuktikan adanya aktivitas antikanker Setaeh diuji insilico maka perlu adanya pengujian in-vitro antikanker yang spesifik pada kanker payudara model sel line T47D yang dianalisis keefektifannya yang membuat sel kanker dapat mengalami apoptosis.

1.2 Tujuan

Tujuan utama penelitian kami Pada penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi senyawa dari daun Paliasa (*Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *deglabrata*) menggunakan metode *High Pressure Extraction* (HPE) dan dilanjutkan pengujian *in silico* dan *in vitro* senyawa aktif yang memiliki efek antiestrogen yang spesifik HER2. Hal ini menjadi hal yang menjanjikan masa depan dalam mengembangkan penemuan obat, yang dapat dikembangkan lebih luas dan bisa dieksplorasi sehingga bisa menjadi salah satu pengobatan terapi kanker.

BAB II

METODE KERJA

2.1 Alat dan bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: alat gelas(Pyrex®), alat Microwave-Assited Extraction, blender, cawan porselin, eksikator, ekstraktor *high pressure*, Elisa Reader ELX 808, *filtration mechine ultra membrane 0,1 micron*, *filter syringe*, *flow cytometry*, *freeze drying*, GC-MS (Model GC-MS-QP 2010, Ultra Shimadzu, Japan), gelas ukur, *hematocytometer*, inkubator CO₂, kolom kapiler, *laminar flow hood*, mikropipet 10 µL, mikropipet 100 µL, mikropipet 200 µL, mikropipet 1000 µL, mikrotube, oven, pengayak nomor 4/18, sentrifugasi, seperangkat *software docking* (Chimera dan Biovia Discovery), Spoit 10 mL, T Flask (Botol Kultur), tabung propilen, thermometer, timbangan analitik, dan vial, waterbath, well plate 96

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air R.O, annexin V-FITC, daun paliasa *Melochia umbellata* (Houtt.) Stapf var. *deglabrata*, *fetal bovine serum* (FBS), helium, dan kertas filter ultra membran 0,1 mikron, media kultur *Roswell Park Memoria Institute* (RPMI), Sel T47D, penicillin-streptomisin, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Propidium Iodine* (PI), trypsin-EDTA

2.2 Cara kerja

2.2.1 Pengambilan Sampel

Daun Paliasa (*Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. *deglabrata*) diambil dari Karampuang, Kec. Panakkukang, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan (5°08'44.0"S 199°27'05.9"E). Sampel dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.2.2 Penyiapan Simplisia

Sampel disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat pada daun. Selanjutnya, sampel dikeringkan menggunakan oven simplisia dengan suhu 50°C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan sortasi kering lalu sampel dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan pengayak nomor 4/18. Sampel disimpan ke dalam wadah tertutup yang berisi silika gel.

2.2.3 Penyiapan Ekstrak

2.2.3.1 High Pressure Extraction (HPE)

Proses ekstraksi simplisia daun *Melochia umbellata* var. *deglabrata* dilakukan menggunakan HPE, serbuk simplisia yang ditimbang sebanyak 100,0 g dan direndam ke dalam larutan air R.O (*Reverse Osmosis*). Ekstraksi dilakukan masing-masing pada tekanan 200 MPa, 400 Mpa, dan 600 MPa selama 15 menit. Hasil ekstraksi disaring menggunakan mesin membra ultra filtrasi. Hasil yang diperoleh diuapkan menggunakan *freeze drying* sehingga didapatkan ekstrak kering.

2.2.3.2 Microwave Assited Extraction (MAE)

Proses ekstraksi simplisia daun *Melochia umbellata* var. *deglabrata* dilakukan dengan menimbang 10 gram, kemudian dilarutkan dengan air R.O, lalu dimasukkan ke dalam alat MAE, selanjutnya alat diatur selama 5 menit. Hasil yang diperoleh diuapkan menggunakan waterbath sehingga didapatkan ekstrak cair

2.2.3.3 Infusa

Proses ekstraksi simplisia daun *Melochia umbellata* var. *deglabrata* dilakukan dengan menimbang 10 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur, selanjutnya dilarutkan dengan pelarut air R.O, lalu, suhu diatur hingga mencapai suhu 90 °C, dan ditunggu selama 15 menit. Hasil yang diperoleh diuapkan menggunakan waterbath sehingga didapatkan ekstrak cair

2.2.4 Analisis GC-MS

Analisis GC-MS pada tanaman Daun Paliasa (*Melochia umbellata* (Houtt) Stapf. *deglabrata*) dijalankan menggunakan GC-MS (Model GC-MS-QP 2010, Ultra Shimadzu, Japan) yang dilengkapi kolom kapiler silica dengan panjang 30 m, diameter 0.25 mm, dan ketebalan 0,25 µm. Sample uji ditambahkan Etanol 96% (p.a) 5 mL. Ekstraksi dengan menggunakan Ultrasonic selama 30 menit pada suhu 55°C. Saring dengan menggunakan kertas saring whatman No. 42, lalu diinjeksikan ke GCMS. Kondisi instrumen GC-MS: Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu solvent cut 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisa 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan *library* NIST 17 dan Wiley 9.

2.2.5 Pengujian *In-Silico*

2.2.5.1 Preparasi Sampel (*Virtual Screening*)

Senyawa hasil analisis GC-MS dilakukan proses molecular docking dengan terlebih dahulu dilakukan pencarian dan pengunduhan struktur senyawa (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pada Pubchem tersebut akan didapatkan data informasi terkait struktur senyawa dan atau didapatkan data SMILES (*Simplified Molecular Input Life Entry System*) dan mengunduh struktur saat melakukan proses docking. Struktur dapat diunduh dalam bentuk 3 dimensi (3D) dengan format file pdb. Pada molekuler docking, protein target dapat diunduh pada protein data bank (<https://www.rcsb.org/>) dengan format file pdb. Pada penelitian ini disiapkan reseptor makromolekuler untuk menguji aktivitas antiestrogen 3PP0, 4RJE, dan 3POZ (Wali Sait, 2020) (Rampogu et al., 2018) (Renadi et al., 2023) (Reyhani et al., 2023).

2.2.5.2 Molekular Docking

Optimasi ligan dilakukan menggunakan program Chimera 1.17.3 (UCSF Chimera; <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). PyMOL version 2.5 (<https://pymol.org/2>) digunakan untuk mengoreksi struktur pada protein dan menghilangkan ligan dan air. Versi PyRx AutoDock Vina (<https://pyrx.sourceforge.io/>) digunakan untuk menghitung ikatan afinitas, RMSD, residu asam amino, dan jenis ikatan untuk ligan dan reseptor yang dioptimalkan. Biovia Discovery Studio Visualizer (<https://www.3dsbiovia.com>) digunakan untuk memvisualisasikan hasil docking antara ligan dan reseptor. Hasil nilai ikatan terendah atau nilai docking tertinggi dan memiliki ikatan hydrogen dipilih sebagai kandidat terbaik (Umar et al., 2023)(Hendrarti et al., 2024).

2.2.5.3 Studi ADMET

Pada tahap ini, dilakukan prediksi pengujian drug-likeness yang menggunakan web server <https://www.swissadme.ch/index.php>, dan untuk menguji Adminstrasi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksikologi pada senyawa.tanaman *Melochia umbellata* var. *deglabrata* menggunakan web server <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>

2.2.6 Pengujian Antikanker T47D Sel Kanker Payudara Metode WST-Assay

2.2.6.1 Kultur Sel T47D

Sel T47D dikultur menggunakan medium RPMI Komplit (ThermoFisher Cat. No. 1187503) yang terdiri dari Nutrisi 10% fetal bovine serum (FBS) yang memiliki kandungan 1% Antibiotik (Penisilin-Streptomisin). Sel diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Kemudian diamati pertumbuhan sel tiap 24 jam sekali yang

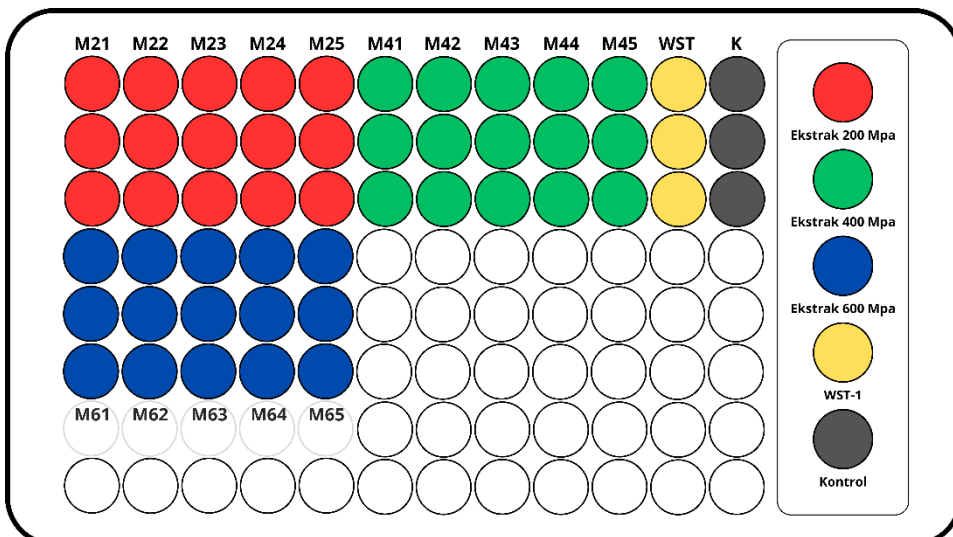
diikuti dengan pergantian medium RPMI. Sel kanker yang telah diinkubasi, siap panen jika konfluensi sel mencapai 90-100%. Sel kultur yang dipanen menggunakan cara tripsinasi untuk memisahkan sel yang melekat dari tempat biakan.

2.2.6.2 IC₅₀ Ekstrak *M. Umbellata* pada Sel T47D

Penentuan dosis ekstrak *M. umbellata* yang akan digunakan pada penelitian ini dengan cara mencari nilai IC₅₀. Langkah awal yang perlu dilakukan yaitu dengan menanamkan sel T47D yang telah dipanen pada 96 *well plate* dimana setiap well ditanam 6000 sel pada medium kultur RPMI sebanyak 100 μ l (Gambar. 1) Kemudian plate diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel kultur telah konfluen 100%, maka dilakukan perlakuan dosis yaitu

- K : Kontrol tanpa Pelakuan
- WST : Kontrol Medium WST
- M21 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 200 MPa 500 μ g/ml
- M22 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 200 MPa 250 μ g/ml
- M23 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 200 MPa 125 μ g/ml
- M24 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 200 MPa 62,5 μ g/ml
- M25 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 200 MPa 31,25 μ g/ml
- M41 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 400 MPa 500 μ g/ml
- M42 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 400 MPa 250 μ g/ml
- M43 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 400 MPa 125 μ g/ml
- M44 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 400 MPa 62,5 μ g/ml
- M45 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 400 MPa 31,25 μ g/ml
- M61 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 600 MPa 500 μ g/ml
- M62 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 600 MPa 250 μ g/ml
- M63 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 600 MPa 125 μ g/ml
- M64 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 600 MPa 62,5 μ g/ml
- M65 : Perlakuan Ekstrak *M. umbellata* 600 MPa 31,25 μ g/ml

Gambar 1. Perlakuan IC₅₀ ekstrak *M. Umbellata* pada 96 *well plate*



Kemudian dilakukan inkubasi sel pada plate dengan suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan analisis viabilitas sel dalam penentuan IC₅₀ dilakukan dengan cara medium kultur diganti dengan RPMI komplet sebanyak 100µl, lalu ditambahkan dengan reagen WST-1 (Roche Cat. No. 05015944001) dan diinkubasi selama 3 jam. Selanjutnya dianalisis menggunakan alat elisa Reader ELX 808 pada panjang gelombang 450 nm. Terakhir hasil yang didapatkan dianalisis menggunakan metode regresi linear. Rumus presentase viabilitas sel pada persamaan berikut:

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi Sampel} - \text{Absorbansi Medium}}{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Medium}} \times 100\%$$

2.2.6.3 Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak *M. Umbellata* pada Sel T47D

Analisis Apoptosis sel dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Annexin V-PI (BioLegend Cat. No. 640906). Sel kultur T47D ditanam pada 96 well plate dan diinkubasi pada suhu 37°C kadar CO₂ 5% kemudian diberi perlakuan ekstrak *M. Umbellata*. Setelah diberi perlakuan selama 24 jam sel dipanen dan disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit suhu 10°C. Kemudian *supernatant* dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan Annexin V-PI dan diinkubasi pada kondisi gelap selama 20 menit. Setelah itu suspensi sel ditambahkan 500 µl PBS dan dimasukkan kedalam kuvet FCM untuk dapat dilakukan analisis dengan *flow cytometry* (BioLegend Protocol)

Gambar 2. Perlakuan uji aktivitas antikanker ekstrak *M. Umbellata* pada 96 well plate

