

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker menempati urutan teratas sebagai penyebab kematian dan penghalang penting dalam meningkatkan angka harapan hidup di setiap negara di dunia. Menurut perkiraan dari Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2019, kanker adalah penyebab kematian pertama atau kedua sebelum usia 70 tahun di 112 dari 183 negara (Sung et al., 2021). Kanker payudara, kanker paru-paru, dan kanker kolorektal menyumbang 51% dari seluruh diagnosis baru kanker. Kanker payudara sendiri menyumbang 32% dari seluruh kasus (Siegel et al., 2024). Kanker payudara merupakan jenis kanker paling umum yang didiagnosis pada wanita di sebagian besar negara (157 dari 185 negara) dan penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita secara global. Pada tahun 2022, diperkirakan terdapat 2,3 juta kasus baru kanker payudara, mewakili 11,6% dari total kasus kanker baru secara global (Geneva & Lyon, 2024). Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (*Riskesdas*) tahun 2018 meskipun prevalensi kanker di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter sebesar 0,18% tampak kecil, kanker tetap menjadi masalah kesehatan yang signifikan mengingat dampaknya yang besar terhadap individu dan masyarakat (Kementerian Kesehatan RI, 2018).

Kanker merupakan tantangan medis serius yang memerlukan pendekatan terapi yang tepat dengan efek samping yang lebih sedikit. Pengobatan kanker payudara saat ini melibatkan berbagai pendekatan, termasuk kemoterapi, radioterapi, terapi hormon, dan terapi target. (Waks & Winer, 2019). Kemoterapi adalah modalitas terapi yang melibatkan berbagai obat yang bekerja pada sel ganas dan sel sehat, dan menyebabkan efek samping yang mematikan (Monla et al., 2020). Banyak fasilitas dan penelitian sekarang berfokus pada pengembangan obat antikanker baru yang dapat meningkatkan pengobatan kemoterapi dan mengurangi tingkat kematian. Baru-baru ini, rumput laut (*seaweeds*) atau makroalga telah dieksplorasi secara *in vitro* dan *in vivo* sebagai agen antikanker yang potensial. Beberapa studi menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari makroalga, seperti polisakarida sulfat, memiliki potensi sebagai agen antikanker dengan toksisitas rendah terhadap sel normal, menjadikannya kandidat menjanjikan untuk terapi kanker yang lebih selektif dan aman (Wijesinghe & Jeon, 2014; De Jesus Raposo et al., 2015).

Makroalga laut telah menjadi perhatian dalam beberapa tahun terakhir karena potensinya dan merupakan sumber nutrisi penting dan komponen obat tradisional. Makroalga merupakan makhluk eukariotik fotosintetik, multiseluler, dan mikroskopis. Berdasarkan warnanya dan tergantung pada klasifikasi taksonominya, mereka dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yakni *Rhodophyta* (alga merah), *Ochrophyta* (alga coklat), dan *Chlorophyta* (alga hijau) (Pomin, 2012). Makroalga saat ini menjadi semakin populer di seluruh dunia karena nilai gizi dan khasiat obatnya yang unggul. Hal ini sejalan dengan peningkatan produksi

makroalga dalam skala global dan penelitian mendalam mengenai komposisi dan bioaktivitas makroalga selama 20 tahun terakhir. Makroalga memiliki komponen yang sangat kaya dan beragam seperti polisakarida (karagenan, agar, alginat, fukoidan, dan lain lain), komponen kecil biomassa seperti terpen, polifenol, dan fukoxantin. Komposisi makroalga bervariasi tidak hanya antar kelompok tetapi juga antar spesies. Dengan demikian, ekstrak makroalga yang berbeda dapat menunjukkan banyak bioaktivitas, seperti antioksidan, antijamur, antivirus, antikoagulan, antibakteri, agen neuroprotektif hingga agen antikanker (Baghel et al., 2023).

Makroalga merah (*Rhodophyta*) adalah kekayaan hayati laut tinggi yang dimiliki Indonesia sebagai salah satu negeri kepulauan terbesar di dunia. Filum alga merah terdiri dari beberapa spesies genus *Eucheuma* diantaranya yaitu *E. denticulatum* atau *E. spinosum*, *Kappaphycus alvarezii* atau *E. cottonii*, *Chondrus crispus* dan *Halymenia durvillae*. Senyawa bioaktif yang telah teridentifikasi dalam alga merah antara lain polisakarida, lipid, polifenol, steroid, glikosida, flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, triterpenoid, antrakuinon, dan glikosida jantung. (Shah et al., 2022). Komposisi kimia makroalga merah bervariasi tergantung pada spesies. Pertumbuhan lingkungan dan masa panen juga mempengaruhi komposisi biokimia dalam makroalga. Secara umum komponen utama makroalga merah adalah polisakarida dengan kisaran 30–76% berat kering. Berbeda dengan tumbuhan *terrestrial*, polisakarida dalam makroalga mengandung lebih sedikit selulosa dan hemiselulosa (masing-masing 2–10% dan 9% berat kering), tetapi fraksi utama karbohidratnya adalah hidrokoloid (10–40%), yang merupakan salah satu komponen berharga dalam makroalga. (Bayu et al., 2021)

Karagenan sebagai kelompok hidrokoloid, merupakan polisakarida utama yang terkandung dalam makroalga merah dan banyak diteliti karena potensi aktivitas biologisnya, terutama dalam aplikasi biomedis. Sumber utama karagenan adalah makroalga merah *Kappaphycus alvarezii* (*E. cottonii*), *E. denticulatum* (*E. spinosum*) dan *Chondrus crispus* (Bayu et al., 2021). Karagenan adalah kelas polisakarida hidrofilik yang terdiri dari residu D-galaktosa dan terdapat dalam tiga jenis utama, yaitu kappa (κ), iota (ι), dan lambda (λ), yang berbeda dalam kandungan dan posisi gugus ester sulfat. Ekstraksi karagenan dari makroalga merah menghasilkan κ -karagenan dari *K. alvarezii* dan ι -karagenan dari *E. denticulatum* (*E. spinosum*) (Shah et al., 2022). Iota-karagenan dari *E. denticulatum* yang tersusun atas D-galaktosa dan 3,6-anhidro-D-galaktosa (D-AHG) tersulfasi dalam rantai linear α -(1,3) dan β -(1,4) (Naseri et al., 2020; Bayu et al., 2021). Iota-karagenan yang telah dihidrolisis secara kimia terbukti memiliki aktivitas antikanker melalui penghambatan jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin, yang merupakan jalur penting dalam proliferasi dan kelangsungan hidup sel kanker. Jin et al. (2013) melaporkan bahwa perlakuan sel osteosarkoma manusia dengan degradasi iota-karagenan dapat menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel pada fase G1 melalui penurunan ekspresi LRP6 serta akumulasi β -catenin, sehingga mengganggu transduksi sinyal Wnt. Ekstrak Karagenan dari makroalga merah *Hypnea musciformis*, *Iridaea undulosa*, dan *E. spinosum* yakni jenis κ -, ι -, dan λ -karagenan dihidrolisis menggunakan asam trifluoroasetat (TFA) pada suhu 60–

80 °C untuk menghasilkan oligosakarida dan disakarida, termasuk κ -karrabiosa dan ι -karrabiosa. Oligosakarida hasil hidrolisis parsial tersebut menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara LM2 dengan nilai IC_{50} sekitar $0,074 \pm 0,009$ mg/ml untuk κ -oligosakarida dan $0,183 \pm 0,015$ mg/ml untuk ι -oligosakarida, yang mengindikasikan bahwa penurunan berat molekul dapat meningkatkan potensi antikanker yang signifikan (Calvo et al., 2019). Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa produk hidrolisis karagenan berpotensi kuat untuk dikembangkan sebagai agen antitumor alami dengan mekanisme kerja yang melibatkan gangguan adhesi sel dan penghambatan kemampuan metastasis sel kanker.

Tingginya prevalensi kanker payudara dan efek samping dari terapi konvensional mendorong pencarian kandidat agen antikanker alami yang lebih aman. *E. denticulatum*, makroalga merah penghasil iota-karagenan, menunjukkan potensi antikanker melalui induksi apoptosis dan modulasi jalur pensinyalan seluler. Meski studi *in vitro* telah menunjukkan efek biologis senyawa ini, pendekatan *in silico* untuk memetakan interaksi molekul targetnya masih terbatas. Padahal, pendekatan komputasional tersebut penting untuk memperkuat dasar mekanistik dan efisiensi pengembangan kandidat obat. Berdasarkan hal tersebut, peneliti bermaksud melakukan studi berjudul **“Uji Efektivitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Karagenan *Eucheuma denticulatum* terhadap Jalur Apoptosis: Studi *In silico* dan *In Vitro* pada Sel Kanker Payudara MCF-7”**

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, rumusan masalah penelitian ini adalah

1. Bagaimana karakteristik senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* berdasarkan analisis kimia dan struktur?
2. Bagaimana profil farmakokinetik, toksisitas, dan prediksi aktivitas biologis senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* berdasarkan pendekatan *in silico*?
3. Bagaimana potensi interaksi senyawa bioaktif dengan protein-protein target yang terkait jalur apoptosis berdasarkan pendekatan *in silico*?
4. Apakah senyawa hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* efektif menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menguji efektivitas senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan *E. denticulatum* terhadap jalur apoptosis pada kanker payudara MCF7 berdasarkan metode studi *in silico* dan *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengkarakterisasi senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* sebagai kandidat antikanker.
2. Menganalisis sifat farmakokinetik, toksisitas, dan potensi aktivitas biologis senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* secara *in silico*.

3. Menilai potensi interaksi senyawa bioaktif dengan protein target apoptosis melalui pendekatan *in silico*
4. Mengevaluasi efektivitas senyawa dalam menurunkan viabilitas dan memicu apoptosis pada sel MCF-7 melalui uji *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

- a. Penelitian ini diharapkan dapat berdampak terhadap pengembangan ilmu dalam bioteknologi dan bioaktif karagenan. Penelitian ini dapat memberikan kontribusi pada pengetahuan tentang senyawa bioaktif dari karagenan *E. denticulatum*, khususnya dalam konteks jalur apoptosis pada sel kanker payudara MCF7
- b. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman tentang jalur molekuler apoptosis yang akan membantu akademisi dalam memahami interaksi molekul dan mekanisme apoptosis yang dipicu oleh senyawa alami

1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Bagi Penulis

Penelitian ini akan memberikan kesempatan bagi penulis untuk meningkatkan keterampilan dan pengalaman dalam melakukan riset bioteknologi, khususnya dalam pemanfaatan senyawa bioaktif dari sumber alam yakni *E. denticulatum* untuk pengembangan terapi kanker. Penulis juga dapat memperluas pengetahuan mengenai metode *in silico* dan *in vitro* dalam penelitian farmasi dan medis.

- b. Bagi Instansi Tempat Penelitian

Instansi tempat penelitian akan mendapatkan manfaat berupa peningkatan reputasi dalam penelitian ilmiah, khususnya dalam bidang pengembangan bahan alami sebagai agen antikanker. Penelitian ini juga dapat membuka peluang kerjasama dengan industri farmasi atau lembaga penelitian lain untuk pengembangan produk berbasis bahan alami yang berpotensi sebagai obat dan komplementer atau alternatif.

1.5 Orisinalitas Penelitian

Penelitian-penelitian yang sudah melaporkan efektivitas dari ekstrak *E. denticulatum* terhadap cell line kanker yakni sebagai berikut:

Peneliti (Tahun)	Judul	Variabel	Hasil
Balasu-bramaniam et.al. (2020)	"Carotenoid composition and antioxidant potential of <i>Eucheuma denticulatum</i> , <i>Sargassum polycystum</i> and <i>Caulerpa lentillifera</i> "	<i>E. denticulatum</i> , Potensi antioksidan	Dua belas jenis karotenoid dideteksi dalam ekstrak etanol rumput laut menunjukkan sifat antioksidan potensial dan efek penangkal radikal peroksid, yang

			setidaknya sebagian disumbangkan oleh keberadaan karotenoid dalam ekstrak.
Sianipar, E., (2023)	<i>Anti-inflammatory activity of Eucheuma denticulatum from Warambadi coast: In-vivo study model of carrageenan-induced paw oedema</i>	<i>Anti-inflammatory activity, Eucheuma denticulatum</i>	Penelitian ini menemukan bahwa <i>E. denticulatum ethyl acetate extract</i> dari pesisir Warambadi memiliki kandungan fenolik yang relatif tinggi. Aktivitas antiinflamasi senyawa fenolik dan flavonoid telah dipelajari melalui beberapa mekanisme, termasuk regulasi aktivitas seluler di dalam sel yang bertanggung jawab atas peradangan dan modulasi penghambatan aktivitas enzim
Kang, Y., et al (2017)	<i>“Characterization and Potential Antitumor Activity of Polysaccharide from Gracilariopsis lemaneiformis”</i>	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> , Potensi anti tumor dan aktivitas polisakarida,	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> (PGL) memiliki potensi antitumor dengan menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis melalui jalur Fas/FasL.
Al-Monla, R., et.al., (2020)	<i>“The Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Brown Algae Colpomenia sinuosa are Mediated by the Generation of Re- active Oxygen Species”</i>	Alga-Coklat, Colpomenia sinuosa, Efek Sitotoksik dan Apoptosis yang dimeidasi Generasi ROS	Potensi berbagai ekstrak alga coklat makro <i>C. sinuosa</i> terbukti hambat viabilitas berbagai tumor padat. Ekstrak soxhlet DM memiliki aktivitas sito-toksik yang signifikan

			terhadap sel kanker usus besar manusia HCT-116.
Yousefi et.al (2018)	" <i>In vitro investigating of anticancer activity of focuxanthin from marine brown seaweed species</i> "	Spesies Rumput laut coklat, Aktivitas anti-kanker dari fucoxantin,	Aktivitas ekstrak rumput laut mengandung fucoxanthin dari empat rumput laut coklat Iran (<i>P. tenuis</i> , <i>C. sinuosa</i> , <i>I. stellate</i> dan <i>D. Indica</i>) yang dikumpulkan menunjukkan aktivitas antikanker terbaik (pada 50 µg /ml dan 24 jam)
Panjaitan et al (2020)	"Ekstraksi Polisakarida Sulfat dari Sargassum Polycystum dengan Metode Microwave Assisted Extraction dan Uji Toksisitasny	Polisakarida Sulfat Sargassum Polycystum, Metode Microwave Assisted Extraction	Hasil uji toksisitas ekstrak polisakarida sulfat menunjukkan sifat toksik dengan nilai LC50 sebesar 113,11 ppm. Ekstraksi polisakarida sulfat menggunakan MAE dapat mempercepat waktu ekstraksi dibandingkan metode konvensional
Suparman, Desi et.al (2021)	Studi <i>In silico</i> dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman (Eupatorium triplinerve Vahl) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF7	Ekstrak etanol Daun Prasman, Kultur sel MCF7, Apoptosis Sel	.Nilai RMSD yang diperoleh adalah 1,898 Ampere. Nilai ini memenuhi suatu kriteria valid suatu metode docking, yakni ≤ 2 Ampere. Ligan J1H adalah analog senyawa ABT-737, yakni suatu inhibitor dengan berat molekul kecil yang diciptakan bekerja secara langsung

			menghambat protein anti-apoptosis dari kelompok keluarga BCL-2
Amelia, Fitri et.al (2024)	<i>Phytoconstituents of Terminalia catappa linn fruits extract exhibit promising antidiabetic activities against α-amylase and α-glucosidase in vitro and in silico</i>	Fitokonstituen, Ekstrak buah linn <i>Terminalia catappa</i> , studi <i>in vitro</i> dan studi <i>in vitro</i>	Ekstrak methanol dan asetat etil dari buah T. catappa menunjukkan aktivitas inhibisi yang signifikan terhadap α -amylase and α -glucosidase, meningkatkan keefektifan inhibitor sintetik acarbose. Studi <i>molecular docking</i> memiliki interaksi yang menjanjikan antar senyawa spesifik seperti rescinn-amine dan gibberrellic acid dengan α -amylase and α -glucosidas
Isa, Auwal et.al (2024)	<i>Potential anti-colon cancer agents: Molecular modelling, docking, pharmacokinetics studies and molecular dynamic simulations</i>	Agen anti kanker kolon potensial, <i>Molecular modelling, docking</i> , dan <i>molecular dynamic simulations</i>	Penelitian ini menggunakan Teknik komputasi tingkat lanjut termasuk 3D-QSAR, molecular docking dan simulasi dinamik molekuler untuk menyelidiki dan mengusulkan terapi sel kanker colon yang lebih efektif. Senyawa dirancang melalui pendekatan ligan menunjukkan interaksi yang kuat dengan reseptor

1.6 Ruang Lingkup Penelitian

Peneliti melakukan penelitian dengan desain penelitian eksperimental. Ruang lingkup penelitian ini mencakup ekstraksi karagenan dari *E. denticulatum* dengan optimasi kondisi ekstraksi seperti daya microwave dan jenis pelarut, dan

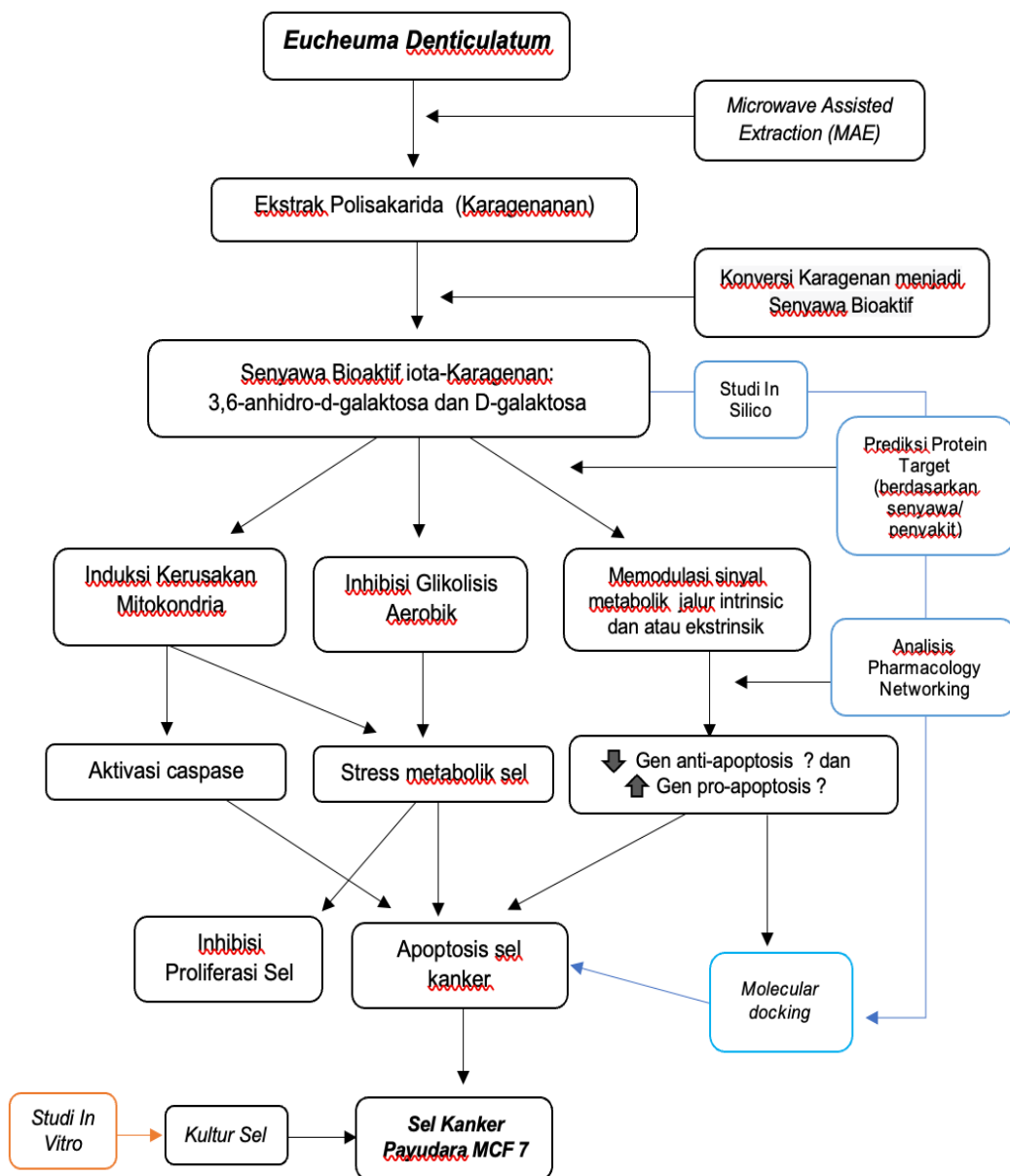
penentuan senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan serta analisis viabilitas sel atau uji *in-vitro*. Penelitian ini juga melibatkan studi komputasional mencakup Prediksi Bioaktivitas senyawa, ADMET senyawa, Prediksi Target protein berdasarkan senyawa dan penyakit, Network pharmacology, Prediksi Ekspresi Gen dan *Molecular Docking*. Tujuan utamanya adalah menentukan efektivitas senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan *E. denticulatum* dengan harapan memberikan kontribusi terhadap pengembangan agen antikanker baru yang lebih aman dan efisien.

1.7 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- BAB I : Pendahuluan menggunakan latar belakang, tujuan penelitian, manfaat penelitian, ruang lingkup penelitian, sistematika penulisan, kerangka teori, kerangka konsep, hipotesis, definisi operasional, alur penelitian dan penelitian yang relevan.
- BAB II : Metode penelitian mencakup tempat dan waktu penelitian, alat dan bahan, instrument penelitian, desain penelitian, populasi dan sampel, Analisa data, izin penelitian dan kelayakan etik
- BAB III : Hasil mencakup analisis univariat, analisis bivariat, dan analisis Multivariat.
- BAB IV : Pembahasan mencakup uraian penjelasan hasil
- BAB V : Penutup membahas Kesimpulan dan Saran serta daftar pustaka

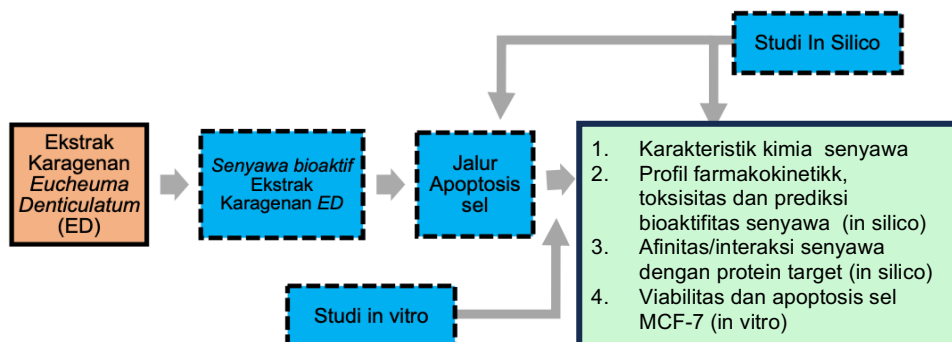
1.8 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

((Baghel et al., 2023; Bayu et al., 2021; Brown et al., 2014; El-Beltagi et al., 2022; Geneva & Lyon, 2024; Kang et al., 2017; Laporan Risesdas 2018 Nasional, n.d.; Monla et al., 2020; Naseri et al., 2020; Pomin, 2012; Shah et al., 2022; Sianipar & Jap, 2023; Siegel et al., 2024; Sosa-Hernández et al., 2018; Sung et al., 2021; Waks & Winer, 2019))

1.9 Kerangka Konsep



Keterangan :

: Variabel Bebas (*Independent Variable*)

: Variabel antara (*Independent Variable*)

: Variabel terikat (*Dependent variable*)



: Hubungan variabel yang diteliti

Gambar 2. Kerangka Konsep Penelitian

1.10 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang diatas, maka hipotesis dari penelitian ini adalah senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan *E. denticulatum* pada pengujian *in silico* dan *in vitro* adalah efektif menghambat pertumbuhan sel kanker payudara.

1. Senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* memiliki karakteristik kimia yang mendukung potensinya sebagai agen antikanker.
2. Senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* menunjukkan profil farmakokinetik yang baik dan tingkat toksisitas yang rendah serta diprediksi memiliki aktivitas biologis antikanker berdasarkan analisis *in silico*.
3. Senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* memiliki kemampuan berinteraksi dengan protein target yang relevan dalam jalur apoptosis berdasarkan hasil molecular docking.
4. Senyawa bioaktif hasil hidrolisis karagenan dari *E. denticulatum* efektif menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel kanker MCF-7 berdasarkan hasil uji *in vitro*.

1.11 Definisi Operasional

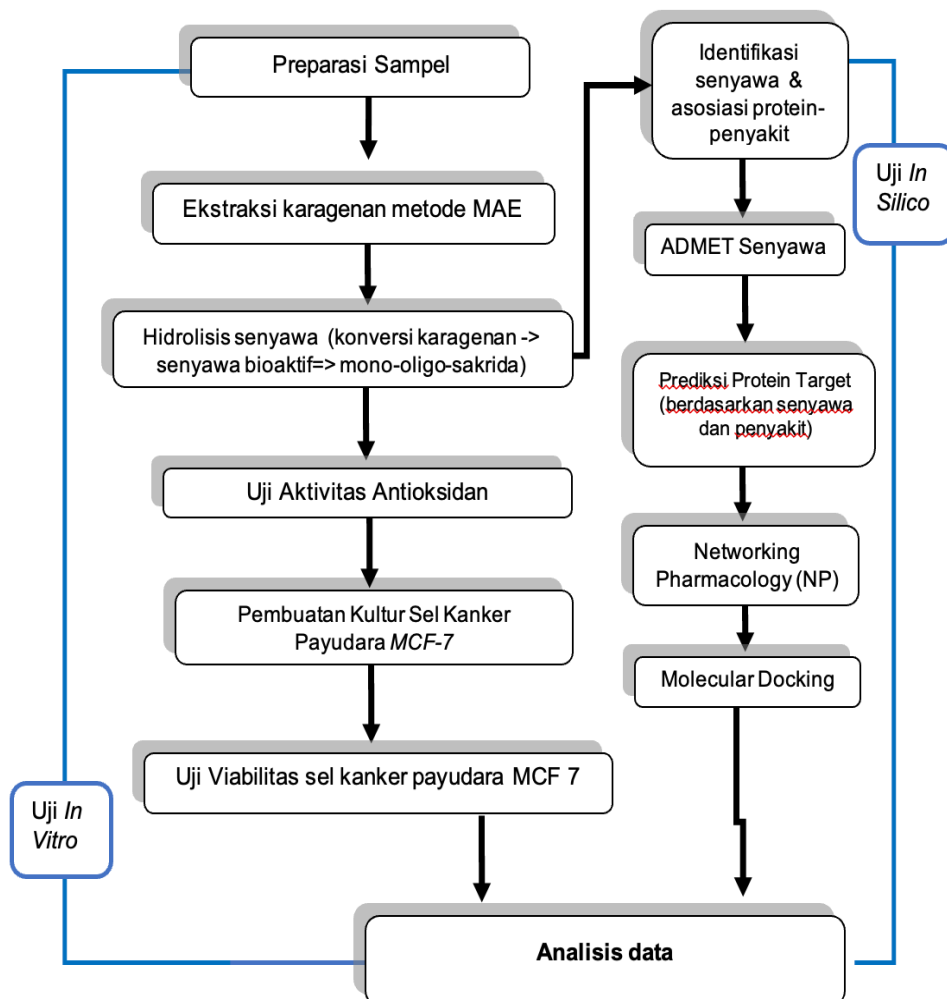
Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Kriteria Objektif	Skala
Variabel Independen			
<i>E. denticulatum</i>	Ekstrak yang diperoleh dari makroalga merah <i>E. denticulatum</i> menggunakan metode	Kehadiran dan konsentrasi senyawa bioaktif dalam ekstrak, khususnya D-AHG. Kadar diukur dalam	Rasio

	<i>microwave-assisted extraction</i> (MAE)	Miligram per liter (mg/L) atau mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)	
Variabel Antara			
Senyawa Bioaktif	Senyawa kimia spesifik yang diisolasi dari hasil hidrolisis karagenan ekstrak <i>E. denticulatum</i> , yang diduga memiliki aktivitas biologis terhadap sel kanker	Konsentrasi senyawa dari hasil ekstraksi karagenan <i>E. denticulatum</i> yang diukur dalam Miligram per liter (mg/L) atau mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio
Ekstrak Karagenan	senyawa polisakarida yang diekstraksi dari alga merah <i>E. denticulatum</i> menggunakan metode MAE	Konsentrasi Karagenan dari spesies <i>E. denticulatum</i> yang diukur dalam Miligram per liter (mg/L) atau mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio
Jalur Apoptosis	Proses biokimia terprogram yang mengarah pada kematian sel secara terkendali, penting dalam menjaga keseimbangan seluler. Pada penelitian ini, jalur apoptosis merujuk pada serangkaian mekanisme molekuler yang diaktivasi dalam sel kanker payudara MCF7	Keterlibatan senyawa hasil hidrolisis karagenan dalam jalur apoptosis ditentukan secara objektif melalui tiga pendekatan: (1) interaksi molekuler senyawa terhadap protein apoptosis (hasil <i>docking</i> dan <i>target prediction</i>), (2) keterlibatan target protein dalam jaringan apoptosis (dari STRING. (3) ekspresi gen target apoptosis yang signifikan pada jaringan kanker berdasarkan GEPIA2. Validasi efek sitotoksik terhadap sel MCF7 secara <i>in vitro</i> memperkuat dugaan aktivasi jalur apoptosis secara fungsional.	Rasio
Uji In silico	Serangkaian analisis komputasional yang digunakan untuk mengevaluasi potensi	1) Senyawa menunjukkan profil ADMET yang mendukung mencakup: (a) memenuhi aturan Lipinski	Rasio

	farmakologis dan keamanan labot molekul ≤ 500 Da, senyawa 3,6-Anhidro-D-$\log P \leq 5$, nHD ≤ 5, nHA ≤ 10). (b) Prediksi H-HT galaktosa dan D-galaktosa, yang mencakup prediksi sifat <i>(human hepatotoxicity)</i> farmakokinetik (ADMET), menunjukkan hasil non-kepatuhan terhadap aturan <i>hepatotoxic</i>. (c) Prediksi Lipinski, potensi toksisitas, DILI <i>(drug-induced liver injury)</i> menunjukkan status aktivitas biologis, dan afinitas <i>negatif</i> atau <i>non-DILI concern</i>. interaksi dengan target protein jalur apoptosis menggunakan berbagai platform bioinformatika.	2) Senyawa memiliki nilai prediksi aktivitas biologis ($P_a \geq 0,7$ dari PASS Online. 3) Senyawa menunjukkan interaksi dengan protein target apoptosis berdasarkan prediksi dari <i>Swiss Target Prediction</i>, SEA, dan Super-PRED. 4) Nilai <i>binding affinity</i> dari molecular docking $\leq -6,0$ kcal/mol menunjukkan interaksi stabil terhadap target protein. 5) Gen target menunjukkan ekspresi diferensial signifikan pada kanker payudara berdasarkan analisis GEPIA2.	
Uji In Vitro	Uji in vitro adalah pengujian langsung pada kultur sel kanker payudara MCF7 untuk menilai efek sitotoksik dan kemampuan induksi apoptosis oleh senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan.	Hasil Pengukurannya dinyatakan dalam: • Kepadatan Sel: Jumlah sel per satuan volume media (sel/mL). • Viabilitas Sel: sel hidup setelah intervensi (%). • Proliferasi Sel: Tingkat pembelahan sel diukur dalam satuan waktu (Abs MTT assay). Apoptosis Sel: sel mati terprogram (%).	Rasio
Variabel Dependen			

Sel Kanker Payudara MCF7	Sebuah garis sel kanker epitel yang diisolasi dari pleural effusion seorang pasien wanita dengan adenokarsinoma payudara pada tahun 1970. Sel ini sering digunakan sebagai model in vitro untuk penelitian kanker payudara karena karakteristik biologisnya yang baik.	Subkultur sel MCF7 dari T-Flask 25 cm ² ke 96-well plate dengan kepadatan 5000 sel/sumuran dan 100 mikroliter menggunakan medium kultur (DMEM, 10% FBS, 1% Amphotericin B, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Gentamycin) tiap sumuran. Kultur sel ini digunakan untuk menilai viabilitas sel dan efek sinergisitas.	Numerik
---------------------------------	--	---	---------

1.12 Alur Penelitian



BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk mengevaluasi potensi sitotoksik senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan *E. denticulatum* terhadap sel kanker payudara MCF7 diawali dengan tahapan ekstraksi dan hidrolisis, analisis *in silico*, serta validasi *in vitro*. Proses ekstraksi karagenan menggunakan metode *microwave-assisted extraction* (MAE), diikuti hidrolisis asam untuk menghasilkan senyawa aktif berupa 3,6-anhidro-D-galaktosa (3,6 D-AHG) dan D-galaktosa yang kemudian dianalisis menggunakan FTIR serta uji kandungan gula. Kedua senyawa ini dianalisis secara *in silico* yang mencakup prediksi ADMET, prediksi bioaktivitas senyawa (PASS), dan pemetaan target protein berdasarkan senyawa menggunakan *Swiss Target Prediction*, *SEA Target*, dan *Super-PRED*, dan berdasarkan data kanker payudara dari *Genecards*, *Disgenet*, dan *OpenTargets*. Analisis *network pharmacology* dilakukan melalui STRING dan Cytoscape untuk identifikasi *hub protein*, serta evaluasi ekspresi gen menggunakan GEPIA2. Simulasi *Molecular docking* dilakukan dengan *AutoDock Vina* dan divisualisasikan melalui *Discovery Studio*. Uji *in vitro* dilakukan pada sel MCF7 menggunakan uji MTT dan pewarnaan Trypan Blue untuk menilai sitotoksitas dan viabilitas. Pendekatan terpadu ini diharapkan dapat mengungkap potensi senyawa hasil hidrolisis karagenan sebagai kandidat antikanker yang efektif dan spesifik terhadap jalur apoptosis.

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di beberapa tempat. Proses ekstraksi sampel dan konversi senyawa dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, sedangkan prosedur uji *in vitro* akan dilaksanakan di Laboratorium HUMRC Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin serta prosedur uji *in silico* dilakukan di perangkat komputer peneliti. Penelitian ini akan dilakukan mulai dari bulan Januari hingga Juni tahun 2025.

2.3 Instrumen Penelitian

2.3.1 Alat yang Digunakan

a. Uji *In-Silico*

Perangkat komputer peneliti: Asus Vivobook E1404FA-FHD322M/ RAM 8GB/ 256 GB SSD 14"

b. Preparasi sampel hingga uji *in-vitro*

Tabel 1. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama	Fungsi
1	Baskom	Sebagai wadah udara mencuci alat dan bahan
2	Gunting	Untuk menggunting bagian rumput yang tidak perlu dan memotong simplisia kecil-kecil

3 Keranjang	Untuk menyimpan alat dan bahan dengan rapi
4 Peniris	Untuk meniriskan rumput yang telah dibersihkan
5 Nyiru	Wadah saat proses pengeringan
6 Koran/Kertas	Pelapis wadah saat proses pengeringan
7 Toples Kaca Bening	Untuk menyimpan ekstrak dan sebagai wadah untuk menyimpan simplisia
8 Pencampur	Untuk menghancurkan simplisia
9 Erlenmeyer (pirex)	Sebagai penampung hasil maserasi, dan wadah larutan bahan pengujian
10 Kain bersih	Untuk menyaring hasil maserasi
11 Corong (pyrex)	Untuk melewatkan hasil maserasi dengan baik
12 Gelas ukur	Untuk mengukur/mengetahui takaran secara kasar
13 Neraca analitik	Untuk menimbang bahan dalam jumlah yang sedikit
14 Pusaran	Untuk menghomogenkan larutan
15 Spektrofotometer	Untuk mengukur absorbansi
16 Gelas kimia	Sebagai wadah penyimpanan sementara
17 Labu takar	Sebagai wadah pembuatan lingkungan
18 Botol vial	Sebagai wadah larutan saat pengujian dan pembuatan varian konsentrasi
19 Botol gelap	Sebagai wadah untuk menyimpan lingkungan yang minim cahaya
20 Penjepit	Untuk menjepit wadah larutan saat diinkubasi
21 Batang pengaduk	Untuk menghomogenkan larutan
Pipet Ukur dan Filler/Rubber	Untuk mengambil dan memindahkan lingkungan
22 Bulb	Untuk membungkus wadah berisi simplisi, larutan uji dan bahan pengujian
23 Kertas Alumunium	Untuk menginkubasi larutan
24 Pemandian air	Untuk mengeringkan alat-alat
25 Oven	Untuk menyimpan bahan uji dan larutan uji
26 Lemari es	Untuk membersihkan alat yang telah digunakan
27 Penyiksaan botol	

28 gelombang mikro	Untuk mengeringkan simplisia
29 mikrotiter	Wadah sampel dan reagen
30 Plat 96 sumur (Nunc)	Wadah sampel dan reagen
31 Ayakan 100	Untuk menyaring bubuk alga

2.3.2 Bahan yang Digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2. Bahan yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Bahan	Fungsi
1	Sel MCF7 yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin	Objek penelitian
2	Dimethyl sulfoxide (DMSO) (DMSO 99,5% pro GC)	Sebagai reagensia
3	phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich)	Sebagai reagensia
4	3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich)	Sebagai reagensia
5	Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Sebagai reagensia
7	sodium dodesil sulfat (SDS) (Merck)	Sebagai reagensia
9	Etanol 70%	Sebagai pelarut
10	DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil)	Sebagai peraksi
11	Asam askorbat	Sebagai kontrol positif
14	Asam galat	Sebagai kontrol positif
15	Etanol 80%	Sebagai pelarut
16	Akuades	Sebagai pelarut
17	CaCl ₂	Sebagai peraksi
18	Sarung tangan (glove)	Sebagai APD
19	Tissue dan Aluminium foil	Sebagai bahan kebersihan

2.4 Populasi dan Sampel

2.4.1 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini pada tahap uji *in-silico* adalah protein target dari database Uniprot yang akan berinteraksi dengan. Pada uji *in-vitro* adalah *cell line* kanker payudara MCF7. Sel MCF7 diperoleh dari Laboratorium HUMRC Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

2.4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian eksperimental ini berasal dari makroalga spesies *E. denticulatum* yang diambil dari makroalga basah di pesisir pantai daerah Kecamatan Pasi Kolaga, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi

Tenggara (5°0'32.0"S 122°47'1.7"E). Spesies makroalga tersebut telah dikonfirmasi marine botanis dosen professor dari fakultas perikanan dan kelautan Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawarsi Tenggara. Sampel diambil pada bulan Januari 2025 pagi hari sekitar pukul 08.00-10.00 WITA. Selama dalam proses pengangkutan dari pantai ke laboratorium, sampel disimpan di dalam cooler box untuk mem pertahankan kesegarannya. Di laboratorium, sampel segar dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan sisa-sisa karang yang melekat. Penyimpanan sampel dilakukan di dalam freezer. Tahap selanjutnya, sampel *E. denticulatum* diidentifikasi spesiesnya di Fakultas Perikanan Universitas Halu Oleo, Kendari. Sedangkan sampel penelitian pada uji in-silico berupa senyawa-senyawa terkait dari hasil tahap ekstraksi, hidrolisis, dan identifikasi dalam laboratorium. Data dari senyawa-senyawa terkait yang diambil dikumpulkan datanya dari bank data Pub-Chem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Melalui server tersebut dikoleksi data SMILES. SMILES adalah *Simplified Molecular Input Line Entry System*, merupakan sebuah sistem notasi linear yang digunakan untuk mendeskripsikan struktur molekul kimia menggunakan string pendek karakter ASCII. Notasi ini dirancang agar mudah dibaca dan ditulis baik oleh manusia maupun komputer, sehingga memfasilitasi penyimpanan dan pertukaran data struktur kimia dalam database (Kim et al., 2021).

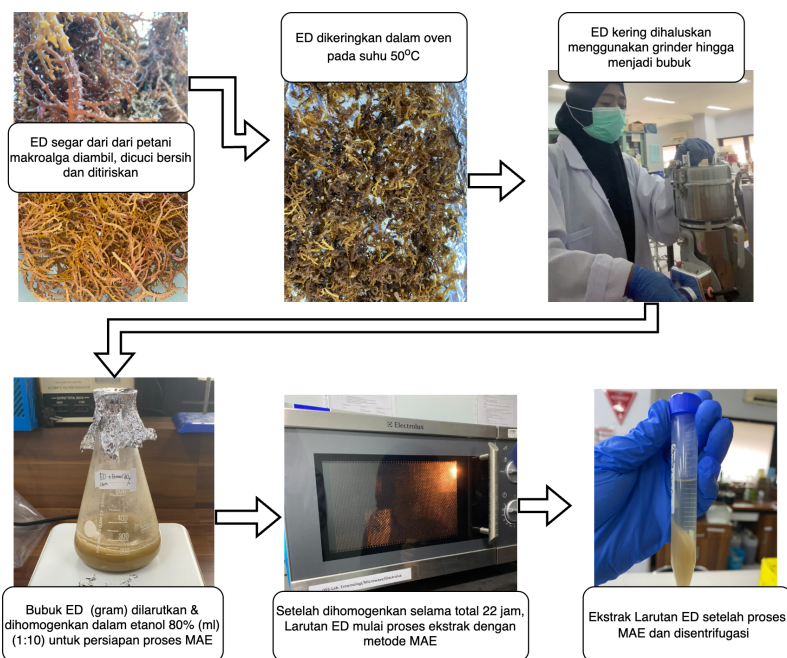
2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Persiapan Sampel

Sampel *E. denticulatum* dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, dan diangin-anginkan selama 5 hari lalu ditimbang. Sebanyak 1 kg *E. denticulatum* dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C. Proses pengeringan menghasilkan *E. denticulatum* sebesar 0,250 kg, kemudian dipotong kecil-kecil dan digiling menjadi tepung menggunakan penggiling makanan kering (FGD-Z300). Tepung *E. denticulatum* diayak kemudian disimpan dalam wadah tertutup dengan silika gel (Gambar 3).

2.5.2 Ekstraksi Sampel dengan MAE (*microwave assisted extraction*)

Preparasi sampel dengan menyiapkan 20 gram bubuk *E. denticulatum* kering yang direndam dalam 200 mL larutan etanol 80%. diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 18 jam dilanjutkan pada suhu 70°C selama 4 jam untuk menghilangkan pigmen, protein, manitol, dan garam. Setelah disentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit, pelet yang diperoleh dikeringkan. Selanjutnya, pelet kering hasil preparasi seberat 0,23 gram diekstraksi menggunakan dengan akuades sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 selama 5 menit menggunakan *Microwave Electrolux EMM2308X*. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh ditambahkan CaCl₂ 2% (w/v), didiamkan semalam pada suhu 4°C, lalu disentrifugasi kembali untuk menghilangkan alginat endapan karagenan (Panjaitan & Natalia, 2021). Ekstraksi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali



Gambar 3. Tahap-tahap ekstraksi karagenan dari *E. denticulatum* (ED) dengan metode MAE

2.5.3 Prosedur Identifikasi Senyawa Bioaktif dari Keragenan

2.5.3.1 Hidrolisis Asam

Sebanyak 10 mL larutan ekstrak karagenan dari prosedur MAE kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL, lalu ditambahkan 20 mL dari larutan asam 0,2 M H_2SO_4 . Campuran ini selanjutnya diaduk 5 menit hingga homogen. Selanjutnya proses hidrolisis asam dimulai dengan campuran tersebut dipanaskan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit. Setelah proses hidrolisis selesai, filtrat yang dihasilkan kemudian didinginkan dan disimpan dalam vial steril, sehingga hasil hidrolisat dari ekstrak karagenan (HEK) metode MAE siap untuk pemeriksaan selanjutnya.

2.5.3.2 Uji FTIR (*Fourier transform Infrared Spectroscopy*) Ekstrak Kareganan dan HEK

Ekstrak karagenan *E. denticulatum* kental sebanyak 1mL, dikeringkan selama 24 jam dan digerus bersama 100mg Kalium Bromida (kbr) hingga homogen untuk membentuk pelet tipis yang sesuai untuk perangkat FTIR. Pelet ditempatkan pada kompartemen sampel FTIR Spektrometer. Spektrum inframerah direkam pada rentang bilangan gelombang 4000-500 cm^{-1} , untuk mengidentifikasi gugus-gugus fungsi khas yang terdapat dalam senyawa. Prosedur yang sama juga dilakukan pada hidrolisat dari ekstrak karagenan setelah tahap ekstraksi MAE sebelumnya.

2.5.3.3 Uji Kandungan Gula Kualitatif

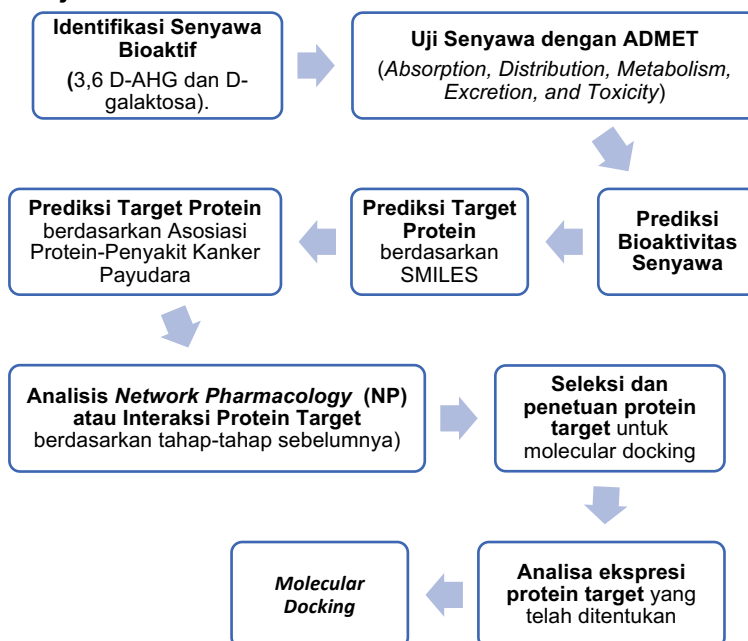
HEK sebanyak 0,5 mL sampel hasil hidrolisis karagenan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL reagen Benedict. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam

penangas air mendidih selama 5 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi. Terbentuknya endapan berwarna hijau, kuning, jingga, atau merah bata mengindikasikan adanya gula pereduksi dalam sampel.

2.5.3.4 Uji Kandungan Gula Kuantitatif

Sampel hidrolisat karagenan disiapkan dalam dua varian volume, yaitu 0,5 mL dan 1 mL. Secara terpisah, disiapkan juga serangkaian larutan standar D-galaktosa dengan variasi konsentrasi 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, dan 10,0 mg/mL. Masing-masing sampel hidrolisat dan larutan standar D-galaktosa kemudian diambil 0,5 mL dicampur dengan 0,5 mL reagen Benedict dan dipanaskan hingga mendidih untuk memastikan reaksi berlangsung sempurna. Setelah pemanasan, semua campuran didinginkan lalu disentrifugasi untuk memisahkan endapan tembaga(I) oksida yang terbentuk. Absorbansi supernatan dari setiap sampel dan standar diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm, untuk menentukan konsentrasi gula pereduksi dalam sampel hidrolisat berdasarkan kurva standar yang dihasilkan dari larutan D-galaktosa.

2.5.4 Prosedur Uji In-Silico



Gambar 4. Alur tahap-tahap penelitian pada pendekatan uji *in silico*

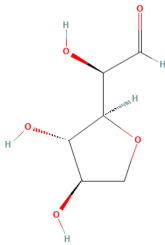
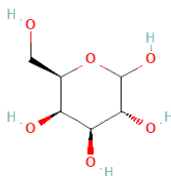
Pemilihan target protein dalam penelitian ini dilakukan secara bertahap melalui pendekatan *in silico* yang terintegrasi, dimulai dari analisis sifat farmakokinetik dan toksikologi senyawa (ADMET), dilanjutkan dengan prediksi bioaktivitas melalui PASS Online, serta identifikasi target protein menggunakan basis data SwissTargetPrediction, SEA, dan SUPER-PRED. Protein-protein yang terprediksi selanjutnya dipetakan terhadap kumpulan target yang relevan pada kanker payudara berdasarkan data dari

GeneCards, DisGeNET, dan Open Targets. Proses ini kemudian dilanjutkan dengan analisis *network pharmacology* untuk mengevaluasi posisi strategis masing-masing protein dalam jaringan interaksi biologis menggunakan data dari STRING dan divisualisasikan melalui Cytoscape. Penilaian dilakukan menggunakan parameter *centrality* dan konektivitas jaringan untuk mengidentifikasi protein dengan peran fungsional penting. Protein yang memenuhi kriteria tersebut selanjutnya dipilih sebagai kandidat untuk dianalisis lebih lanjut pada tahap *molecular docking*.

2.5.4.1 Identifikasi Senyawa Bioaktif

Tahap pertama penelitian dimulai dengan identifikasi senyawa bioaktif dari ekstrak karagenan *E. denticulatum*. Senyawa bioaktif diidentifikasi menggunakan metode phytochemical screening dengan mengacu pada telusur dan telaah literatur, dan basis data online seperti PubChem. Basis data ini digunakan untuk mencari dan memverifikasi senyawa yang terdapat dalam ekstrak karagenan yang berpotensi memberikan efek biologis, terutama terkait aktivitas antikanker. Seperti yang dijelaskan sebelumnya pada pendahuluan bahwa Karageenan *E. denticulatum* terdiri dari beberapa senyawa setelah dihidrolisis yakni beberapa diantaranya 3,6 D-AHG dan D-galaktosa. Struktur 2D senyawa 3,6 D-AHG dan D-galaktosa diperoleh dari database PubChem (Tabel 1). Kedua senyawa tersebut merupakan senyawa-senyawa hidrolisat polisakarida sulfat atau karagenan dari sumber ilmiah yang telah dijelaskan pada bagian pendahuluan. Format SMILES ini akan digunakan sebagai input untuk analisis prediksi bioaktivitas, ADMET, prediksi protein target.

Tabel 3. Informasi senyawa 3,6 D-AHG dan D-galaktosa dari database PubChem

No.	Nama Molekul	Formula Molekul	Berat Molekul (g/mol)	Struktur 2D (PubChem CID)	SMILES & Sumber
	3,6- Anhydro-D- galactose (3,6- AHG)	C ₆ H ₁₀ O ₅	162.14		C1[C@H]([C@H]([C@H](O1)O)O)O https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
	D- galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16		C([C@H]1[C@H]([C@H]([C@H](O1)O)O)O)O https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

2.5.4.2 Uji ADMET Senyawa (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*)

Prosedur uji ADMET dalam studi *in silico* bertujuan untuk memprediksi karakteristik farmakokinetik dan toksikologi suatu senyawa secara komputasi sebelum pengujian selanjutnya dengan menggunakan server (<https://admetmesh.scbdd.com/service/screening/molecule>) ADMET Lab 2.0 untuk mengevaluasi parameter farmakokinetik dan toksikologi dari struktur senyawa bioaktif dan algoritma yang mengestimasi potensi penyerapan (*absorption*) oleh tubuh, distribusi dalam jaringan (*distribution*), metabolisme (*metabolism*) terutama di hati, ekskresi (*excretion*) dari tubuh, serta risiko toksisitas (*toxicity*) pada berbagai sistem biologis. Prediksi ADMET secara *in silico* ini memanfaatkan basis data struktur kimia dan sifat fisikokimia senyawa untuk menghitung skor atau indeks yang mewakili efektivitas dan keamanannya. ADMETLab 2.0 dikembangkan untuk membantu peneliti dalam mengevaluasi potensi suatu senyawa sebagai kandidat obat. Ia dapat memprediksi 17 sifat fisikokimia, 13 sifat kimia medisinal, 23 sifat ADME, 27 endpoint toksisitas, dan 8 aturan toksikofor. Dengan mengevaluasi parameter-parameter ini, penelitian ini dapat memprediksi efektivitas dan keamanan senyawa. ADMETLab 2.0 menggunakan model QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship) yang dilatih dengan kerangka kerja multi-task graph attention (MGA) berdasarkan data ADMET eksperimental (Xiong et al, 2021).

Kriteria farmakokinetik dan toksikologi senyawa dalam uji *in silico* umumnya merujuk pada parameter ADMET yang ideal, di mana senyawa diharapkan memenuhi aturan Lipinski untuk menunjang bioavailabilitas oral. Kriteria ini meliputi bobot molekul ≤ 500 Dalton, nilai $\log P \leq 5$, jumlah donor hidrogen (nHD) tidak lebih dari 5, dan jumlah akseptor hidrogen (nHA) tidak lebih dari 10. Selain itu, senyawa dengan potensi terapeutik yang baik seharusnya memiliki profil toksikologi yang aman, seperti hasil prediksi *human hepatotoxicity* (H-HT) yang menunjukkan non-hepatotoxic, serta status negatif atau non-DILI concern pada prediksi *drug-induced liver injury* (DILI). Parameter-parameter ini penting untuk menilai kelayakan awal senyawa sebagai kandidat obat dari sisi keamanan dan kestabilan biologis.

2.5.4.3 Prediksi Bioaktivitas Senyawa

Prediksi bioaktivitas senyawa dari database Way2Drug PASS berbasis webserver (<https://www.way2drug.com/PASSOnline/>) dengan cara memasukkan data SMILES dari 3,6-D-AHG dan D-Galactose. Platform ini kemudian akan menghasilkan prediksi aktivitas biologis, termasuk aktivitas sebagai agen potensial terhadap antiikanker. Nilai Pa (kemungkinan aktif) dan Pi (kemungkinan tidak aktif) yang dihasilkan oleh PASS Online merupakan hasil prediksi aktivitas biologis suatu senyawa berdasarkan struktur kimianya. Rentang nilai Pa dan Pi berkisar antara 0 hingga 1. Senyawa dengan nilai Pa $\geq 0,7$ dianggap memiliki potensi aktivitas biologis yang tinggi, sedangkan senyawa dengan nilai Pa antara 0,3 dan 0,7 memiliki potensi aktivitas biologis yang moderat (Filimonov et al., 2014). Dalam

penelitian ini data potensi yang diambil adalah hanya yang memiliki nilai $\geq 0,7$ dan paling berhubungan dengan aktivitas antikanker pada jalur moleukler.

2.5.4.4 Prediksi Target Protein Senyawa berdasarkan SMILES

Identifikasi target protein potensial dari SMILES senyawa aktif 3,6 D-AHG dan D-galaktosa yang diinputkan ke dalam tiga platform prediksi target yang berbeda, yaitu SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), Similarity Ensemble Approach (SEA) (<https://sea.bkslab.org/>) dan Super-PRED (<https://prediction.charite.de/>) ketiga server tersebut diakses pada. Masing-masing platform ini menggunakan algoritma dan basis data yang beragam untuk memprediksi protein mana saja dalam tubuh manusia yang kemungkinan besar akan berinteraksi dengan senyawa uji berdasarkan kemiripan struktural, farmakofor, atau model prediktif lainnya.

Kriteria interaksi senyawa dengan target molekuler apoptosis dalam studi *in silico* ditentukan berdasarkan hasil prediksi dari platform SwissTargetPrediction, SEA (Similarity Ensemble Approach), dan Super-PRED. Senyawa yang ideal adalah senyawa yang teridentifikasi memiliki kemungkinan interaksi dengan protein-protein kunci jalur apoptosis. Dalam evaluasi ini, standar nilai spesifik digunakan untuk mengidentifikasi kandidat yang paling potensial:

- a) **SEA (Similarity Ensemble Approach):** Platform ini menggunakan koefisien Tanimoto (Max Tc) untuk mengukur kesamaan antara senyawa uji dengan ligan yang diketahui. Nilai **Max Tc yang dianggap signifikan adalah 0.4 atau lebih tinggi**. Semakin tinggi nilai ini, semakin besar kemiripan struktural dan kemungkinan besar memiliki target protein yang sama.
- b) **SwissTargetPrediction:** Platform ini menyajikan hasil dalam bentuk probabilitas. Sebuah interaksi dianggap memiliki kemungkinan yang baik dan signifikan jika nilai **probabilitasnya lebih besar dari 0.5**. Nilai di atas ambang batas ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut kemungkinan besar berinteraksi dengan target protein yang diprediksi.
- c) **Super-PRED:** Prediksi dari platform ini didasarkan pada Z-score dan E-value, di mana **E-value yang rendah (di bawah 1.0)** menunjukkan bahwa prediksi tersebut signifikan secara statistik dan bukan hasil kebetulan. Selain itu, Super-PRED juga mempertimbangkan kesamaan struktural, di mana Tanimoto coefficient di atas 0.85 dianggap memiliki akurasi yang tinggi.

Prediksi protein target yang melampaui standar terbaiknya akan memperkuat dugaan awal bahwa senyawa dapat berperan dalam modulasi proses apoptosis, yang menjadi mekanisme utama dalam terapi kanker.

2.5.4.5 Prediksi Target Protein berdasarkan Penyakit Kanker Payudara

Proses ini melibatkan penelusuran dan pengumpulan data komprehensif dari tiga database biomedis utama, Genecard di

<https://www.genecards.org/>, Opentarget di <https://www.opentargets.org/>, dan Disgenet di <https://www.disgenet.org/>. Database-database ini mengagregasi informasi dari berbagai sumber literatur, data eksperimental, dan studi genetika untuk menyajikan daftar gen dan protein yang terasosiasi dengan patogenesis, perkembangan, atau sebagai biomarker kanker payudara. Data yang didapatkan pada tahap ini akan dibuat tumpang tindih dengan data target protein berdasarkan senyawa yang didapatkan sebelumnya sehingga irisan (diagram Venn) target protein dari kedua tahap menghasilkan pilihan target protein yang paling sesuai antara kedua metode penentuan target protein.

Dalam pemilihan protein yang berasosiasi dengan penyakit, khususnya kanker payudara, pemetaan dilakukan terhadap kumpulan target yang tersedia dalam database GeneCards (GC), Open Targets (OT), dan DisGeNET, yang masing-masing menyediakan informasi berbasis data genetika, bukti eksperimental, dan asosiasi klinis. Kriteria terbaik dalam pemilihan protein target didasarkan pada nilai skor asosiasi yang tinggi, yang mencerminkan kekuatan hubungan antara suatu gen atau protein dengan penyakit tertentu. Pada GeneCards, skor relevansi (relevance score) ≥ 10 dianggap sangat signifikan, sementara pada DisGeNET dan Open Targets, nilai *disease association score* $\geq 0,5$ menunjukkan hubungan yang kuat dan didukung oleh banyak sumber data, termasuk publikasi ilmiah, uji klinis, dan anotasi biologis. Protein yang memenuhi ambang batas ini dianggap lebih layak diprioritaskan karena memiliki bukti kuat berperan dalam patogenesis penyakit dan berpotensi sebagai target terapi. Pemilihan protein berdasarkan skor tinggi dari ketiga basis data tersebut memperkuat validitas biologis dan klinis dalam tahap selanjutnya seperti analisis jaringan maupun *molecular docking*.

2.5.4.6 Analisis Network Pharmacology (NP)

Network pharmacology digunakan untuk melihat interaksi mechanism of action (moa) dari suatu senyawa dengan multiple protein. Tujuan penggunaan multiple protein karena seringkali penyakit disebabkan oleh disfungsi dari regulatory network dibandingkan karena mutasi satu gene saja. Akibatnya, tujuan untuk mendiagnosis dan mengobati gangguan yang rumit mungkin tidak dapat dicapai hanya dengan menargetkan satu gen sehingga menargetkan jaringan biologis yang mendasari penyakit dapat membantu memahami jalur molekuler yang mengatur prognosis penyakit. Tiga komponen utama dalam NP adalah: senyawa, protein target senyawa, dan protein yang berkaitan dengan disease / mekanisme yang akan dikaji.

Tahapan sudah dimulai dari saat identifikasi senyawa bioaktif sebelumnya menjadi titik awal penentuan analisis interaksi protein. Irisan target protein senyawa dianalisis melalui pendekatan komputasional sebelumnya yakni, protein yang terkait mekanisme senyawa dikonsolidasi dengan protein target yang terkait penyakit kanker payudara, menggunakan diagram Venn. akan menjadi database pada model interaksi target protein di tahap ini. Protein-protein tersebut dianalisis dalam jaringan interaksi

menggunakan STRING dan divisualisasikan dengan CytoScape untuk mengidentifikasi protein kunci (*hub protein*).

Setiap protein direpresentasikan sebagai simpul (*node*) yang saling terhubung melalui sisi (*edge*) berdasarkan hubungan fungsional atau fisik. Untuk menilai posisi strategis dan peran fungsional suatu protein dalam jaringan, digunakan beberapa parameter *centrality*, antara lain *degree*, *betweenness centrality*, dan *closeness centrality*.

- a) **Degree**: menunjukkan jumlah koneksi langsung suatu protein dengan protein lain; semakin tinggi nilainya, semakin besar peran protein tersebut sebagai simpul interaksi utama.
- b) **Betweenness centrality**: mengukur frekuensi suatu protein menjadi jalur penghubung antara dua simpul lain, sehingga mencerminkan peran sebagai pengatur aliran informasi dalam jaringan.
- c) **Closeness centrality**: menunjukkan seberapa cepat suatu protein dapat berinteraksi dengan semua simpul lain dalam jaringan.

Nilai terbaik dari masing-masing parameter secara umum, protein yang memiliki *degree* ≥ 3 , *betweenness centrality* $\geq 0,1$, dan *closeness centrality* $\geq 0,5$ dianggap memiliki peran sentral dalam sistem dan layak diprioritaskan sebagai target biologis atau terapeutik.

2.5.4.7 Analisis Ekspresi Gen

Analisis target utama protein yang diperoleh sebelumnya kemudian dilanjutkan untuk analisis ekspresi gen beberapa protein tersebut menggunakan webserver <http://gepia2.cancer-pku.cn>. GEPIA2 (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2*) adalah platform analisis berbasis data RNA-seq dari proyek The Cancer Genome Atlas (TCGA) dan Genotype-Tissue Expression (GTEx), yang menyediakan visualisasi ekspresi gen pada jaringan tumor dan normal, analisis survival, korelasi antar gen, serta ekspresi diferensial. fitur “Expression DIY” digunakan untuk memvisualisasikan ekspresi diferensial gen target antara jaringan kanker payudara (BRCA) dan jaringan payudara normal (Tang et al., 2019).

TCGA (The Cancer Genome Atlas) adalah sebuah proyek raksasa yang bertujuan untuk membuat katalog lengkap dari perubahan genomik dan molekuler yang menjadi penyebab kanker. Proyek ini mengumpulkan dan menganalisis ribuan sampel jaringan tumor (kanker) dari berbagai jenis kanker. Pengumpulan data dan analisisnya secara umum berlangsung dari tahun 2006 hingga 2018, sedangkan GTEx (Genotype-Tissue Expression) adalah proyek yang berfokus untuk membangun database publik yang komprehensif mengenai ekspresi gen pada berbagai jenis jaringan manusia normal (sehat). Periode utama untuk pengumpulan sampel jaringan dari para donor berlangsung antara tahun 2010 dan 2015. Kedua data proyek ini berfungsi sebagai data pembandingan atau baseline untuk mengetahui seperti apa tingkat ekspresi gen pada kondisi non-penyakit dan agar peneliti bisa dengan mudah membandingkan ekspresi gen antara sel kanker dan sel normal yang ditunjukkan pada grafik *box plot*.

Hasil ekspresi akan menjadi salah satu landasan uji interaksi molekuler dan hasil *molecular docking*, untuk memperkuat relevansi biologis dan terapeutik dari senyawa 3,6-D-AHG terhadap target-target yang memiliki ekspresi signifikan dan berdampak pada kelangsungan hidup pasien.

2.5.4.8 **Molecular Docking**

Molecular docking dilakukan secara sistematis dalam empat tahap utama untuk memprediksi dan menganalisis interaksi antara senyawa uji (ligan) dengan protein target.

- a) **Persiapan Ligan:** yaitu mengoptimasi struktur 3D senyawa berdasarkan format SMILES menggunakan perangkat lunak yang sesuai, guna memperoleh konformasi ligan yang paling stabil secara energi. Senyawa uji dipilih berdasarkan hasil analisis *network pharmacology*, prediksi senyawa aktif, dan tinjauan pustaka yang relevan.
- b) **Preparasi Protein Target:** mencakup pengambilan struktur kristal 3D dari basis data Uniprot PDB. Struktur protein kemudian disiapkan dengan menghilangkan molekul air, menambahkan atom hidrogen yang hilang, dan melakukan minimisasi energi untuk memperoleh keadaan protein yang representatif secara biologis. Protein target ini sebelumnya telah dipilih berdasarkan potensi keterlibatan biologisnya dan dianalisis untuk menentukan kantong pengikatan (binding site) menggunakan server PrankWeb.
- c) **Proses Docking:** dijalankan menggunakan perangkat lunak PyRx, yang mengintegrasikan *AutoDock Vina* dan Open Babel.

Proses molecular docking dalam penelitian ini dilakukan menggunakan perangkat lunak PyRx, yang mengintegrasikan dua komponen utama, yaitu AutoDock Vina dan Open Babel, untuk menyederhanakan tahapan persiapan dan simulasi interaksi ligan-protein. Pada tahap awal, Open Babel digunakan untuk optimasi ligan, yaitu dengan mengubah struktur senyawa uji dan pembanding ke dalam format yang sesuai (.pdbqt), menambahkan atom hidrogen, serta melakukan minimisasi energi (energy minimization) untuk memperoleh konformasi ligan yang paling stabil secara termodinamika. Optimasi ini penting agar bentuk ligan yang digunakan pada docking merepresentasikan keadaan alami molekul saat berinteraksi dengan protein target.

Selanjutnya, proses docking dilakukan menggunakan AutoDock Vina, yang berfungsi untuk mengevaluasi ikatan ligan dengan protein berdasarkan prediksi afinitas energi dan posisi ikatan terbaik (pose). Dalam menu AutoDock Vina, parameter yang disesuaikan meliputi ukuran dan posisi grid box sebagai ruang pencarian, serta nilai exhaustiveness untuk menentukan seberapa luas algoritma mengeksplorasi kemungkinan posisi ligan. Proses docking dilakukan secara targeted docking, dengan adanya ketersediaan informasi situs aktif protein dari bantuan PrankWeb. PrankWeb merupakan aplikasi

berbasis web yang memprediksi lokasi potensial situs aktif (ligand binding site) pada struktur protein tiga dimensi. Informasi prediksi dari PrankWeb digunakan sebagai acuan dalam menentukan koordinat pusat grid box agar docking lebih terfokus pada kantong aktif yang relevan secara biologis. Hasil dari docking berupa nilai binding affinity.

- d) **Analisa Hasil Docking** : hasil docking kemudian dianalisis berdasarkan nilai energi ikatan (binding affinity), dimana nilai energi paling negatif menunjukkan ikatan yang paling stabil dan potensial secara biologis. Nilai *binding affinity* $\leq -6,0$ kcal/mol digunakan sebagai acuan untuk menilai potensi interaksi yang kuat dan stabil. Semakin rendah nilai energi ikatan (lebih negatif), semakin besar kemungkinan senyawa berinteraksi secara efisien dengan situs aktif protein target. Oleh karena itu, nilai *binding affinity* tersebut dijadikan sebagai salah satu parameter objektif yang penting dalam mengevaluasi efektivitas pengikatan senyawa pada tingkat molekuler. Visualisasi dan analisis lebih lanjut terhadap interaksi molekuler antara ligan dan protein dilakukan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio BIOVIA, yang memungkinkan pengamatan jenis ikatan, residu aktif yang terlibat, serta interaksi hidrofobik maupun hidrogen yang terjadi untuk menilai potensi ikatan dan efektivitas senyawa terhadap target molekuler kanker

2.5.5 Prosedur Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel hidrolisat dari ekstrak karagenan *E. denticulatum* dilakukan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Prosedur ini diawali dengan pembuatan seri larutan uji dari ekstrak sampel dan larutan standar pembanding, yaitu asam askorbat. Sampel ekstrak diuji pada rentang konsentrasi 10, 20, 40, 80, dan 160 mg/L, sedangkan asam askorbat sebagai kontrol positif diuji pada konsentrasi 0.25, 0.5, 1, 2, dan 4 mg/L. Setiap larutan uji pada berbagai konsentrasi tersebut kemudian direaksikan dengan larutan DPPH. Aktivitas antioksidan ditentukan secara kuantitatif dengan mengukur penurunan absorbansi larutan DPPH setelah penambahan sampel menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang spesifik 515 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dari setiap konsentrasi dibandingkan dengan absorbansi larutan kontrol (tanpa penambahan ekstrak) untuk menghitung persentase aktivitas antioksidan. Selanjutnya, dibuat sebuah kurva regresi linier dengan memplotkan konsentrasi ekstrak sebagai sumbu X dan persentase aktivitas antioksidan sebagai sumbu Y. Dari persamaan garis linier yang terbentuk ($y=mx+c$), nilai IC_{50} dihitung. Nilai IC_{50} ini merepresentasikan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Untuk memastikan validitas dan reproduibilitas hasil, keseluruhan pengujian pada ekstrak sampel dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplo)

2.5.6 Prosedur Kultur Sel kanker dan Uji In-Vitro

2.5.6.1 Prosedur Kultur Sel MCF7

- 1) **Penanaman Sel:** Sel MCF7 dikultur dalam pelat 96 sumur dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumur dalam medium DMEM tanpa glukosa, yang telah disuplementasi dengan 10% FBS, 3% glutamax, 100 mg/dL glukosa, 1% penisilin-streptomisin, 1% amfoterisin B, dan 4,4% NaHCO_3 sebagai medium dasar.
- 2) **Inkubasi Awal:** Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO_2 untuk memastikan keterikatan dan adaptasi sel dalam medium. Sel dipasase setelah mencapai tingkat konfluensi 70-80%.

2.5.6.2 Uji MTT untuk Menilai Sitotoksitas HEK dan κCH terhadap Sel MCF7

Untuk mengevaluasi efek sitotoksik dari HEK (Hidrolisat dari Ekstrak Karagenan metode MAE) dan κCH terhadap sel kanker payudara MCF7, dilakukan uji MTT *in vitro* dengan tahapan sebagai berikut:

1. **Perlakuan Senyawa:** Medium awal kemudian diganti dengan medium perlakuan (masing-masing kelompok diuji dalam 8 ulangan teknis ($n = 8$)), yaitu:
 - a) Kelompok kontrol glukosa: medium dengan 100 mg/dL glukosa
 - b) Kelompok galaktosa: medium dengan 100 mg/dL galaktosa
 - c) Kelompok HEK dan κCH : medium yang mengandung berbagai dosis HEK atau κCH yaitu 2, 5, 10, 20, 50, 100, dan 200 mg/dL.

Dibuatnya empat media tersebut bertujuan untuk membandingkan efek berbagai kondisi terhadap sel, yaitu kontrol glukosa, galaktosa, dan perlakuan dengan hydrolysate KAH serta κCH . Pendekatan ini memungkinkan untuk menilai pengaruh spesifik dari hidrolisat dan perbandingannya terhadap media kontrol, serta memahami bagaimana sel merespons terhadap berbagai sumber energi dan perlakuan yang disediakan.

2. **Uji MTT:** Setelah inkubasi 24 jam, medium dibuang dan sel dicuci dengan PBS. Selanjutnya, ditambahkan 110 μL larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) dalam rasio DMEM:MTT = 10:1 ke setiap sumur, dan diinkubasi selama 4 jam dalam 5% CO_2 pada suhu 37°C .
3. **Pelarutan Kristal Formazan:** Medium dibuang dan ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) ke setiap sumur untuk melarutkan kristal formazan ungu yang terbentuk dari sel hidup.
4. **Pembacaan Absorbansi dan Penentuan IC_{50} :** Absorbansi diukur pada panjang gelombang 570 nm menggunakan pembaca pelat (plate reader). Nilai IC_{50} ditentukan dari kurva dosis-respons untuk masing-masing perlakuan HEK dan κCH .

5.

2.6 Tahap Penelitian

2.6.1 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui dua pendekatan, yaitu secara *in vitro* dan *in silico*. Untuk pendekatan *in vitro*, data

dikumpulkan dari hasil eksperimen laboratorium yang melibatkan kultur sel kanker payudara MCF7, termasuk hasil uji sitotoksitas menggunakan metode MTT dan uji viabilitas sel dengan pewarnaan Trypan Blue. Selain itu, data aktivitas antioksidan dikumpulkan berdasarkan hasil pengukuran absorbansi dari larutan DPPH yang bereaksi dengan ekstrak menggunakan spektrofotometer. Nilai-nilai konsentrasi dan respons biologis (aktivitas antioksidan atau viabilitas sel) kemudian dicatat untuk dianalisis lebih lanjut. Sementara itu, pada pendekatan *in silico*, data dikumpulkan dari database kimia dan biomedis seperti PubChem, ADMETLab, Way2Drug PASS Online, dan SwissTargetPrediction, yang menyediakan data struktur molekul, prediksi bioaktivitas, dan target protein. Setiap tahapan pengumpulan data dilakukan secara sistematis, terdokumentasi, dan dilakukan dalam bentuk triplo atau ulangan teknis untuk meningkatkan akurasi dan reproduibilitas hasil.

2.6.2 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian *in vitro* dianalisis menggunakan pendekatan statistik deskriptif dan analisis regresi linear. Nilai absorbansi dari uji MTT dan uji DPPH diolah menggunakan perangkat lunak Microsoft Excel untuk menghasilkan kurva dosis-respons, dari mana nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persamaan regresi linear ($y = a + bx$) dengan asumsi $y = 50\%$. Nilai koefisien determinasi (R^2) digunakan untuk menilai kekuatan hubungan antara variabel konsentrasi dan respon biologis. Sedangkan untuk data *in silico*, analisis dilakukan secara komputasional melalui simulasi molecular docking untuk menghitung afinitas ikatan antara ligan dan protein target, serta prediksi parameter ADMET untuk mengevaluasi potensi farmakokinetik dan toksikologi. Hasil visualisasi interaksi ligan-protein dan ekspresi gen dianalisis dengan software pendukung seperti PyRx, Discovery Studio, dan GEPIA2, guna mengintegrasikan data secara fungsional dan memperkuat relevansi biologis terhadap jalur apoptosis yang menjadi fokus penelitian.

2.6.3 Izin Penelitian dan Kelayaan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan rekomendasi persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan nomor surat 71/UN4.6.4.5.31/ PP36/ 2025 dan nomor protokol UH25010065.