



PENDEKATAN METABOLOMIK UNTUK MENGIDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER PADA TUMBUHAN OBAT INDONESIA

DEWI ANGGRAINI SEPTANINGSIH



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Pendekatan Metabolomik untuk Mengidentifikasi Senyawa Bioaktif Antikanker pada Tumbuhan Obat Indonesia” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum 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 di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, November 2022

Dewi Anggraini Septaningsih
G461190011

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

DEWI ANGGRAINI SEPTANINGSIH. Pendekatan Metabolomik untuk Mengidentifikasi Senyawa Bioaktif Antikanker pada Tumbuhan Obat Indonesia. Dibimbing oleh IRMA HERAWATI SUPARTO, SUMINAR SETIATI ACHMADI, dan MOHAMAD RAFI.

Senyawa antikanker dari produk herbal terus diteliti untuk meningkatkan potensi kekayaan alam Indonesia. Namun, sejauh ini pencarian senyawa aktif dengan metode *bioassay-directed fractionation and isolation* (BDFI) terkendala oleh proses yang panjang dan terkadang senyawa isolatnya memiliki aktivitas yang lebih rendah daripada ekstrak. Pendekatan metabolomik menjadi metode alternatif karena waktu analisis yang relatif lebih singkat. Selama ini, penelitian hanya terbatas menduga keberadaan senyawa aktif pada suatu ekstrak tertentu (berdasarkan pustaka memiliki aktivitas antikanker) tanpa pembuktian aktivitas. Fokus penelitian ini adalah mengkaji penggunaan pendekatan metabolomik untuk menemukan senyawa aktif antikanker dari tumbuhan obat Indonesia dan mengevaluasi hasil prediksi senyawa tersebut. Penelitian ini dibagi dalam tiga tahap kegiatan, yaitu (1) pemilihan tumbuhan obat berpotensi antikanker, (2) pemprofilan metabolit dan identifikasi senyawa aktif antikanker dengan pendekatan metabolomik, dan (3) evaluasi senyawa target antikanker.

Dalam tahap pemilihan senyawa target, aktivitas antikanker ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*), sambung nyawa (*Gynura procumbens*), keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*), dan tapak dara (*Catharanthus roseus*) diuji pada sel MCF7. Ekstrak daun sirsak menunjukkan potensi tertinggi dengan nilai IC_{50} 24,45 $\mu\text{g/mL}$ dan 32,44 $\mu\text{g/mL}$ pada ekstrak etanol p.a. dan 80%, dilanjutkan dengan tapak dara (78,41 $\mu\text{g/mL}$), sambung nyawa (86 $\mu\text{g/mL}$), dan keladi tikus (616,79 $\mu\text{g/mL}$). Sementara untuk aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, urutannya ialah daun sambung nyawa (144,68 $\mu\text{g/mL}$) yang lebih berpotensi, diikuti tapak dara (327,46 $\mu\text{g/mL}$), sirsak (474,63 $\mu\text{g/mL}$), dan keladi tikus (693,48 $\mu\text{g/mL}$). Berdasarkan hasil ini, analisis pada sampel daun sirsak dilanjutkan dengan pendekatan metabolomik karena berpotensi sebagai antikanker tertinggi dibandingkan tiga tumbuhan lainnya.

Pada tahap berikutnya, komponen metabolit yang terdapat dalam ekstrak daun sirsak dengan berbagai pelarut dianalisis menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa (LC-HRMS) dengan pendekatan metabolomik taktarget. Tiga puluh lima metabolit telah berhasil diidentifikasi secara putatif dalam ekstrak, yang diketahui berasal dari golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan asetogenin. Aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara MCF7 dari ekstrak etanol p.a. menunjukkan aktivitas tertinggi dengan nilai IC_{50} 22,86 $\mu\text{g/mL}$, diikuti oleh ekstrak etanol 50% (97,52 $\mu\text{g/mL}$), etanol 80% (154,92 $\mu\text{g/mL}$), air (363,41 $\mu\text{g/mL}$), dan etanol 30% (1713,47 $\mu\text{g/mL}$). Berdasarkan informasi aktivitas terhadap sel kanker tersebut dan metabolit dalam ekstrak, disiapkan model untuk mendapat informasi senyawa target antikanker. Senyawa aktif dicari dengan pendekatan metabolomik menggunakan informasi kandungan senyawa sebagai prediktor dan aktivitas antikanker sebagai respons. Teknik multivariat *orthogonal partial least square discriminant analysis* (OPLS-DA) memperlihatkan bahwa tiga metabolit, yaitu annoretikuin, skuadiolin C, dan xilopina, serta enam



metabolit (golongan asetogenin) yang belum berhasil teridentifikasi, diduga sebagai senyawa bioaktif antikanker dari daun sirsak. Hasil ini membuktikan bahwa metabolomik yang taktertarget dapat mengidentifikasi senyawa antikanker pada daun sirsak.

Penelitian tahap tiga difokuskan pada evaluasi senyawa target secara *in silico* dan *in vitro*. Evaluasi secara *in silico* membuktikan bahwa ada interaksi yang kuat antara struktur senyawa target dan makromolekul protein 3ERT dari sel kanker. Nilai afinitas pengikatan senyawa annoretikuin, skuadiolin C, dan xilopina mendekati doksorubisin, yakni obat antikanker komersial. Evaluasi lebih lanjut dilakukan dengan fraksionasi dari ekstrak daun sirsak dan analisis target senyawa aktif. Evaluasi secara *in vitro* terhadap enam fraksi menunjukkan peningkatan persentase penghambatan sel kanker (80–96%) lebih tinggi daripada hasil ekstrak etanol (73%). Hasil ini mempertegas bahwa senyawa dugaan dari pendekatan metabolomik dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif antikanker tumbuhan obat.

Penelitian ini membuktikan pendekatan metabolomik dapat menjadi metode dalam penemuan senyawa aktif antikanker dari tumbuhan obat Indonesia dan dapat menjadi metode efektif dengan mengevaluasi senyawa aktif yang teruji. Untuk penelitian selanjutnya, disarankan pemurnian senyawa dugaan terhadap aktivitas antikanker dan pembuktian aktivitas terhadap sel kanker lainnya. Ke depannya, pendekatan metabolomik dapat dikembangkan untuk aktivitas hayati lainnya.

Kata kunci: *Annona muricata*, antikanker, LC-HRMS, metabolomik, tumbuhan obat Indonesia

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



SUMMARY

DEWI ANGGRAINI SEPTANINGSIH. Metabolomic Approach to Identify Anticancer Bioactive Compounds in Indonesian Medicinal Plants. Supervised by IRMA HERAWATI SUPARTO, SUMINAR SETIATI ACHMADI, and MOHAMAD RAFI.

Research related to the discovery of anticancer compounds from herbal products continues to be carried out to increase the potential of Indonesia's natural wealth. However, the search for active compounds using the bioassay-directed fractionation and isolation (BDFI) technique has faced obstacles, like the lengthy process. Sometimes isolated compounds have lower activity than extracts. The metabolomics approach is an alternative method because of the relatively faster analysis time. So far, only limited research has been conducted to evaluate the presence of active compounds in a particular extract (based on the literature having anticancer activity) without any evidence of activity. The focus of this research is to examine the use of a metabolomic approach to find active anticancer compounds from Indonesian medicinal plants and evaluate the predictive results of anticancer compounds. This experiment was conducted in 3 stages, (1) selection of potential anticancer medicinal plants, (2) metabolite profile and identification of active anticancer compounds using a metabolomic approach, and (3) evaluation of anticancer target compounds.

In the first study to select target compounds, anticancer activity was tested on the leaves of *Annona muricata*, *Gynura procumbens*, *Typhonium flagelliforme*, and *Catharanthus roseus*. In selecting Indonesian medicinal plants, *A. muricata* leaf extract showed the highest potency with IC_{50} of 24,45 $\mu\text{g/mL}$ and 32,44 $\mu\text{g/mL}$ in the two solvents, followed by *C. roseus* (78,41 $\mu\text{g/mL}$), continued *G. procumbens* (86 $\mu\text{g/mL}$), and *T. flagelliformis* (616,79 $\mu\text{g/mL}$). Meanwhile, for antioxidant activity using the DPPH method, *G. procumbens* (144,68 $\mu\text{g/mL}$) was the most potent, followed by *C. roseus* (327,46 $\mu\text{g/mL}$), *A. muricata* (474,63 $\mu\text{g/mL}$), and *T. flagelliformis* (693,48 $\mu\text{g/mL}$). Based on these results, *A. muricata* was selected for further analysis by a metabolomic approach because it has the highest potential as an anticancer.

In the second study, the metabolite components contained in *A. muricata* leaf extract with various solvents were analyzed using mass spectrometer liquid chromatography (LC-HRMS) with an untargeted metabolomics approach. Thirty-five metabolites have been putatively identified in the extract, known to come from the group of alkaloids, flavonoids, and acetogenins. Anticancer activity against MCF7 breast cancer cells obtained by p.a ethanol extract showed the highest activity with an IC_{50} value of 22,86 pm, followed by 50% ethanol (97,52 $\mu\text{g/mL}$), 80% ethanol (154,92 $\mu\text{g/mL}$), water (363,41 $\mu\text{g/mL}$), and 30% ethanol (1713,47 $\mu\text{g/mL}$). Information on the extract's activity against MCF7 breast cancer cells and metabolites was carried out to form a model to obtain information on anticancer target compounds. The search for active compounds was carried out using a metabolomic approach using the information on compound content as a predictor and antioxidant activity as a response. The multivariate OPLS-DA technique showed that three metabolites, namely annoreticuin, squadiolin C, and xylopine, and six metabolites (acetogenin

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

IPB University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



group) that had not been identified were suspected to be anticancer bioactive compounds from soursop leaves. These results prove that untargeted metabolomics can identify anticancer bioactive compounds in soursop leaves.

The third study focused on the evaluation of the target compound. Evaluation of the target compound was carried out *in silico*, and the cytotoxic test of the fraction proved a strong interaction between the target compound and the 3ERT protein macromolecule from cancer cells. The binding affinity values for annoreticuin, squadiolin C, and xylopine compounds were obtained close to doxorubicin, a commercial anticancer drug. Furthermore, the percentage value of the inhibitory power on the development of cancer cells in the fraction was higher than that of *A. muricata* leaf extract. Seven compounds in six fractions showed an increase in the percentage of cancer cell inhibition (80-96%) higher than the yield of ethanol extract (73%). These results confirm that the suspected compounds from the metabolomics approach can be used to identify the active compounds in Indonesian medicinal plants.

The conclusion of this study is to provide evidence that the metabolomics approach can be a method for discovering active anticancer compounds from Indonesian medicinal plants and can be an effective method for evaluating the tested active compounds. The recommendations proposed are purification of the alleged compound for anticancer activity and proof of activity against other cancer cells. The future goal of the metabolomics approach is to expand on other biological activities.

Keywords: *Annona muricata*, anticancer, Indonesian medicinal plants, LC-HRMS, metabolomics

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



PENDEKATAN METABOLOMIK UNTUK MENGIDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER PADA TUMBUHAN OBAT INDONESIA

DEWI ANGGRAINI SEPTANINGSIH

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Doktor Ilmu Kimia

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

- 1 Prof. Dr. Purwantiningsih, M.S.
- 2 Dr. apt. Muhamad Insanu, S.Si., M.Si.

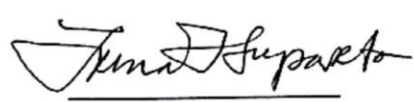
Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

- 1 Prof. Dr. Purwantiningsih, M.S.
- 2 Dr. Yenny Meliana, M.Si

Judul : Pendekatan Metabolomik untuk Mengidentifikasi Senyawa Bioaktif Antikanker pada Tumbuhan Obat Indonesia
Nama : Dewi Anggraini Septaningsih
NIM : G461190011

Disetujui oleh

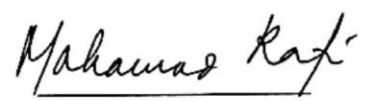
Pembimbing 1:
Dr. dr. Irma Herawati Suparto, M.S.



Pembimbing 2:
Prof. Dr. Ir. Suminar Setiati Achmadi, M.Sc.

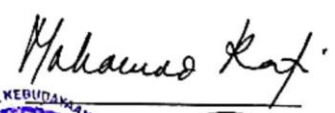


Pembimbing 3:
Dr. Mohamad Rafi, S.Si., M.Si.

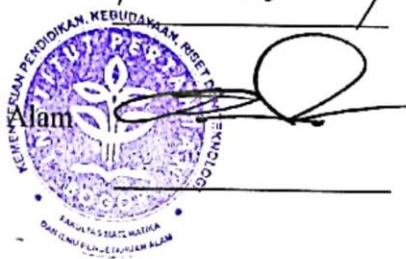


Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Dr. Mohamad Rafi, S.Si., M.Si.
NIP 19770316 200604 1 010



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Dr. Berry Juliandi, M.Si
NIP 19780723 200701 1 001



Tanggal Ujian:
3 Oktober 2022

Tanggal Lulus: 28 OCT 2022

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Agustus 2020 sampai bulan Maret 2022 ini ialah penggunaan pendekatan metabolomik dalam penentuan senyawa aktif antikanker, dengan judul “Pendekatan Metabolomik untuk Mengidentifikasi Senyawa Bioaktif Antikanker pada Tumbuhan Obat Indonesia”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Ibu Dr. dr. Irma Herawati Suparto, M.S., Ibu Prof. Dr. Ir. Suminar Setiati Achmadi, M.Sc, dan Bapak Dr. Mohamad Rafi, S.Si, M.Si, yang telah senantiasa bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi, mengajarkan banyak ilmu, memberikan rasa optimis, motivasi dan bimbingannya. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Purwantiningsih, M.S., Dr. apt. Muhamad Insanu, dan Dr. Yenny Meliana, M.Si sebagai penguji luar komisi pembimbing yang telah memberikan saran-saran berguna dan penting bagi kesempurnaan disertasi ini. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Sekretaris Program Studi Doktor Ilmu Kimia (Dr. Wulan Tri Wahyuni, M.Si.) atas dukungan serta arahnya kepada penulis selama menjalani studi, serta dosen-dosen Program Studi Doktor Ilmu Kimia IPB yang telah membekali ilmu pengetahuan selama penulis menempuh pendidikan Program Doktor.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Unit Laboratorium Riset Unggulan LPPM IPB (Dr. Ir. Irdika Mansur, M.For.Sc) dan Kepala Pusat Studi Biofarmaka Tropika Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM IPB) (Prof. Irmanida Batubara, M.Si) yang telah mengizinkan penulis melaksanakan penelitian di laboratorium. Terima kasih juga disampaikan kepada Ibu Nunuk Kurniati Nengsih, S.Farm., Ibu Laela Wulansari, S.Si., Leni Tria Melati, S.Si., Mas Endi Suhendi, Alfi Hudatul Karomah, M.Si, yang telah membantu selama penelitian dan pengumpulan data, Staf Laboratorium Pusat Studi Satwa Primata (Iin Indriawati, M.Si) yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan pengujian antikanker, Bapak Agus Saputra, M.Si. yang telah membantu terkait pengolahan data *in silico* serta teman-teman seangkatan dan seperjuangan studi program Doktor Ilmu Kimia IPB 2019 (Rudi Heryanto, M.Si, Reza Mulyawan, M.Si, dan Aulia Ul Hafizah, M.Sc., Apt), yang telah memberi semangat, motivasi, dan perhatiannya untuk berbagi suka dan duka bersama, yang telah membantu dalam diskusi penelitian bersama dan membantu dalam pekerjaan, Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah (H. Samino), ibu (Hj. Sunarmi), suami (Teguh Setiawan), kakak (Dania Retno Wulandari), serta seluruh keluarga yang telah memberi dukungan, doa, dan kasih sayangnya kepada penulis selama menjalani pendidikan S-3 di Program Studi Doktor Ilmu Kimia di Departemen Kimia, FMIPA IPB.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, November 2022

Dewi Anggraini Septaningsih



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
1.5 Kebaruan (<i>novelty</i>)	3
1.6 Sistematika Disertasi	3
II PEMILIHAN TUMBUHAN OBAT INDONESIA YANG BERPOTENSI ANTIKANKER	5
2.1 Pendahuluan	5
2.2 Metode	6
2.3 Hasil dan Pembahasan	7
2.4 Simpulan	15
III PENDEKATAN METABOLOMIK DALAM IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF ANTIKANKER	16
3.1 Pendahuluan	16
3.2 Metode	17
3.3 Hasil dan Pembahasan	19
3.4 Simpulan	28
IV EVALUASI FRAKSI AKTIF ANTIKANKER DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK	29
4.1 Pendahuluan	29
4.2 Metode	30
4.3 Hasil dan Pembahasan	31
4.4 Simpulan	36
V PEMBAHASAN UMUM	37
VI SIMPULAN DAN SARAN	41
6.1 Simpulan	41
6.2 Perspektif Masa Depan	41
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	51
RIWAYAT HIDUP	59



DAFTAR TABEL

1	Identifikasi metabolit fenolik dari ekstrak etanol daun sirsak (AM), sambung nyawa (GP), keladi tikus (TF), dan tapak dara (CR) dengan UHPLC-Q-Orbitrap HRMS	12
2	Profil metabolit yang berhasil terkonfirmasi pada berbagai pelarut dari ekstrak daun sirsak	22
3	Informasi lengkap tentang potensi biomarker antikanker dari ekstrak daun sirsak dengan model OPLS-DA	25
4	Afinitas pengikatan dan residu asam amino yang berasosiasi dengan ketiga senyawa dugaan.	27
5	Aktivitas antikanker dalam persen inhibisi dari ekstrak dan fraksi daun sirsak.	35

DAFTAR GAMBAR

1	Ilustrasi skema penelitian. TOI = tanaman obat Indonesia	3
2	Tumbuhan berpotensi sebagai antikanker. Sirsak (a), sambung nyawa b), keladi tikus (c), dan tapak dara (d)	5
3	Aktivitas antioksidan dari ekstrak sirsak, tapak dara, keladi tikus, dan sambung nyawa. Ekstrak dengan pelarut etanol p.a (■) dan etanol 80% (■)	8
4	Aktivitas antikanker pada sel MCF7 dari ekstrak sirsak, tapak dara, keladi tikus, dan sambung nyawa. Ekstrak dengan pelarut etanol p.a (■) dan etanol 80% (■)	10
5	Kromatogram <i>base peak</i> pada mode ionisasi negatif dari ekstrak daun keladi tikus (a), sambung nyawa (b), sirsak (c), dan tapak dara (d)	11
6	Aktivitas antikanker ekstrak daun sirsak ditunjukkan dengan nilai IC ₅₀ . Nilai rata-rata merupakan hasil dari lima kali ulangan dan huruf-huruf yang mengikutinya tidak berbeda dengan uji Tukey ($p > 0,05$)	19
7	Profil kromatogram puncak ekstrak daun sirsak dengan etanol p.a (hitam), etanol 80% (merah), etanol 50% (hijau), etanol 30% (biru), dan air (kuning) dalam mode ionisasi positif. Notasi tersebut menunjukkan informasi tentang senyawa potensial antikanker	21
8	<i>Score plot</i> dari model OPLS-DA untuk group aktif (merah) dan tidak aktif (hijau) pada ekstrak daun sirsak. <i>Score plot</i> OPLS-DA dapat menunjukkan pengelompokan yang baik untuk kedua group. (B) S-plot dalam penentuan senyawa penduga terhadap group aktif	24
9	Kajian penambatan: interaksi protein 3ERT dengan molekul ligan. (A) annonaretikuin (B), skuadiolin C, (C) xilopina, dan (D) doksorubisin	27
10	<i>Base peak</i> kromatogram dari fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol dari ekstrak etanol daun sirsak dengan teknik partisi	32
11	Kromatogram dari proses fraksionasi ekstrak etanol daun sirsak dengan kromatografi kilas	33



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Pengarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

12	Kromatogram <i>base peak</i> dari 8 fraksi hasil fraksionasi ekstrak etanol daun sirsak dengan menggunakan kromatografi kilas. Pola kromatogram untuk keberadaan molekul tertarget dengan BM 596, 612, 295, 560, 616, dan 618	34
13	Perubahan morfologi sel MCF7 karena perlakuan penambahan ekstrak etanol (a), fraksi heksan (b), fraksi etilasetat (c), fraksi etanol (d) daun sirsak dan kontrol negatif (e)	36
14	Alur penelitian yang disarankan untuk identifikasi senyawa aktif antikanker dengan pendekatan metabolomik	38

DAFTAR LAMPIRAN

1	Struktur senyawa dalam ekstrak daun sirsak	52
2	Spektrum massa dari senyawa prediksi antikanker ekstrak daun sirsak	56



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan obat terus dieksplorasi oleh para peneliti untuk digunakan dalam mencegah dan mengobati berbagai penyakit yang ada saat ini. Kanker termasuk sebagai salah satu penyebab kematian di seluruh dunia dan diproyeksikan akan terus meningkat. Temuan senyawa aktif antikanker menjadi tantangan para peneliti dalam mengeksplorasi senyawa untuk mencegah dan mengobati kanker. Senyawa aktif baru dari tumbuhan obat dapat dicari menggunakan pendekatan klasik yang umum dipakai, yaitu *bioassay-directed fractionation and isolation* (BDFI) dengan mengisolasi dan memfraksionasi dengan panduan bioasai. Pendekatan ini menggunakan proses fraksionasi bertahap yang tiap tahapnya ditentukan berdasarkan hasil bioasai teraktif. Proses fraksionasi diakhiri setelah didapatkan isolat senyawa murni teraktif (Weller 2012). Metode BDFI memiliki beberapa keunggulan, tetapi membutuhkan waktu yang relatif panjang dan cukup rumit untuk menemukan senyawa aktif, dan kemungkinan sinergisme tidak dapat dideteksi. Metode ini akan menjadi kurang tepat jika senyawa-senyawa tersebut diyakini menjadi senyawa aktif terhadap aktivitas hayati tertentu. Selain itu, ada beberapa kasus ketika ekstrak kasar memiliki aktivitas lebih tinggi daripada senyawa murni hasil isolasi (Chagas-Paula *et al.* 2015).

Pendekatan metabolomik menawarkan penemuan metabolit aktif yang efektif dan cepat selain pendekatan BDFI (Wu *et al.* 2016). Metode ini merupakan strategi komprehensif yang memungkinkan identifikasi dan kuantisasi semua metabolit dalam suatu ekstrak tumbuhan obat dan juga melihat korelasinya dengan bioaktivitas. Korelasi antara bioaktivitas dan kandungan metabolit diharapkan dapat memberi informasi prediksi senyawa aktif sebelum memulai prosedur isolasi yang pastinya akan membutuhkan waktu panjang. Metabolomik menjadi pendekatan alternatif yang dapat menentukan komposisi dan konsentrasi metabolit berbobot molekul rendah dalam suatu matriks hayati dan dapat digunakan untuk menghasilkan "sidik jari metabolit" dari suatu individu dan penyakit. Sensitivitas dan cakupan metabolit dari proses ini telah meningkat dengan menggabungkan metabolomik dan spektrometri massa (MS) (Martín-Blázquez *et al.* 2019). Pendekatan metabolomik berbasis MS telah diaplikasikan untuk menganalisis profil metabolisme dan pendugaan senyawa aktif pada suatu bioaktivitas seperti senyawa dugaan antioksidan (Septaningsih *et al.* 2018; Won *et al.* 2018), antibiotik (Bose *et al.* 2015), antitripanosomal (Tawfike *et al.* 2019), dan antidiabetes (Nokhala *et al.* 2020). Biomarker pada sel kanker juga pernah diuji dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) dan kromatografi cair-spektrometri massa (LC-MS) (Martín-Blázquez *et al.* 2019; Semreen *et al.* 2019).

Berbagai penelitian bidang metabolomik telah difokuskan pada peningkatan diagnosis dan pencegahan penyakit manusia dengan ditemukannya sejumlah senyawa aktif. Namun, kegunaannya sebagai biomarker yang berpotensi terhadap aktivitas dibatasi oleh rendahnya kadar senyawa aktif tersebut (Carneiro *et al.* 2019). Oleh karena itu, ada kekhawatiran bahwa tanpa proses evaluasi lengkap untuk biomarker, kemajuan ini tidak akan menjadi prognosis atau pengobatan yang efektif (López-López *et al.* 2018). Hal ini menjadi dasar untuk menggunakan

pendekatan metabolomik dalam mengidentifikasi dan mengevaluasi senyawa bioaktif antikanker dari tumbuhan obat Indonesia. Penelitian ini menggunakan kombinasi 2 pendekatan untuk memperoleh senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker. Pada tahap awal digunakan pendekatan metabolomik untuk mencari senyawa aktif antikanker dari beberapa tumbuhan obat Indonesia. Tahap dilanjutkan dengan proses isolasi senyawa aktif dari ekstrak tumbuhan terpilih dengan pengamatan berbasis LC-MS taktarget (*untargeted*) untuk mendapatkan fraksi yang mengandung senyawa aktif. Isolat kandidat senyawa aktif dievaluasi melalui pengujian *in vitro* antikanker dan dicirikan menggunakan LC-MS untuk senyawa target. Selain itu, pendekatan penambatan molekul (*molecular docking*) dilaksanakan untuk memprediksi interaksi antarmolekulnya. Penelitian ini menggunakan tumbuhan obat Indonesia yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker, yaitu daun sirsak (*Annona muricata*) (Syed-Najmuddin *et al.* 2016; Yajid *et al.* 2018), daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) (Tan *et al.* 2016), dan tumbuhan keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) (Purwaningsih *et al.* 2017; Khalivulla *et al.* 2019). Tumbuhan tapak dara (*Catharanthus roseus*) (Moon *et al.* 2018; Taher *et al.* 2019) yang diketahui dan telah banyak diteliti sebagai antikanker digunakan sebagai kontrol positif. Aktivitas antioksidan juga ditentukan karena erat hubungannya dengan aktivitas antikanker.

1.2 Rumusan Masalah

Indonesia memiliki tumbuhan obat yang diketahui berpotensi sebagai antikanker, antara lain sirsak, tapak dara, sambung nyawa, dan keladi tikus. Senyawa aktif antikanker pada keempat tumbuhan tersebut telah diidentifikasi dengan pendekatan BDFI. Waktu analisis yang relatif panjang dan metode yang rumit menjadi kendala untuk mendapatkan senyawa aktif. Pendekatan metabolomik menjadi metode alternatif karena waktu analisis yang relatif lebih singkat. Penelitian metabolomik terdahulu hanya terbatas menduga keberadaan senyawa aktif pada suatu ekstrak tertentu (berdasarkan pustaka memiliki aktivitas antikanker) tanpa mengisolasi dan menguji kembali secara *in vitro*. Pencirian dan pembuktian senyawa aktif atas suatu aktivitas hayati sangat diperlukan. Dengan demikian, identifikasi senyawa aktif antikanker pada tumbuhan obat dengan pendekatan metabolomik serta mengevaluasi dan mencirikan senyawa aktif antikanker perlu dilakukan. Sasaran selanjutnya adalah agar pendekatan ini menjadi metode alternatif dalam pengembangan pencarian senyawa aktif antikanker pada tumbuhan obat Indonesia terpilih dengan aktivitas tertinggi.

1.3 Tujuan

Tujuan umum penelitian ini ialah menggunakan pendekatan metabolomik dalam mengidentifikasi senyawa aktif antikanker pada tumbuhan obat Indonesia serta mengevaluasi dan mencirikan senyawa aktif tersebut. Adapun tujuan khususnya ialah (1) menganalisis aktivitas antikanker secara *in vitro* pada sel kanker MCF7 dengan metode mikrotetrazolium (MTT) dari empat tumbuhan obat Indonesia (keladi tikus, sirsak, sambung nyawa, dan tapak dara), (2) menganalisis data informasi aktivitas antikanker pada sel MCF7 dan kandungan metabolit menggunakan LC-MS sistem taktarget dengan pendekatan metabolomik guna menduga senyawa aktif antikanker, (3) mengevaluasi dan mencirikan senyawa

aktif antikanker secara *in silico* dan *in vitro* yang didampingi dengan analisis menggunakan sistem target berbantuan LC-MS.

1.4 Manfaat

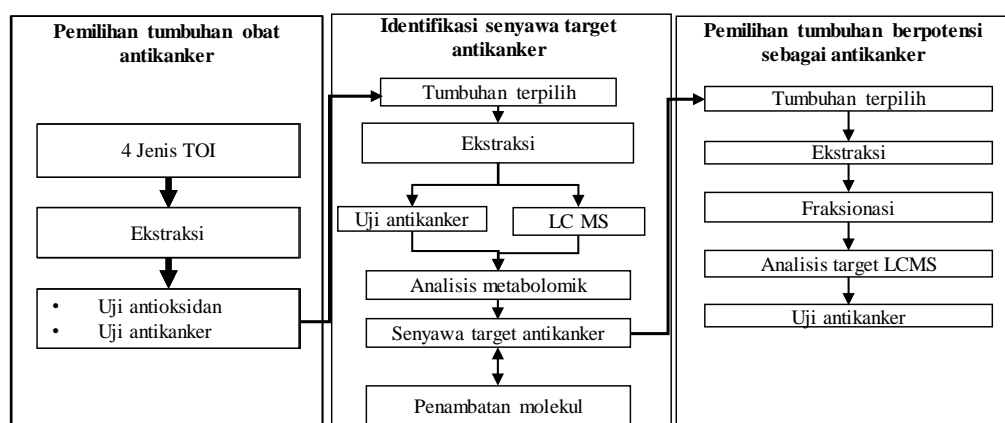
Metabolit yang merupakan indikator penting dari keadaan fisiologis atau patologis dapat memberi informasi untuk identifikasi biomarker awal suatu penyakit dan membantu memahami perkembangannya. Metabolomik berpotensi untuk mengidentifikasi metabolit pada sistem hayati, memilih biomarker potensial, dan menginformasikan perihal patofisiologi. Selain itu, teknik ini merupakan teknik yang sederhana dan hemat biaya tetapi tetap memiliki sensitivitas tinggi dan sifat spesifik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengadvokasi pendekatan metabolomik dalam memberikan informasi biomarker antikanker pada tumbuhan obat Indonesia. Teknik ini juga diharapkan menjadi alternatif dalam pengembangan pencarian senyawa yang memiliki aktivitas antikanker atau dapat diterapkan pada aktivitas hayati lainnya.

1.5 Kebaruan (*novelty*)

Berikut ini adalah kebaruan penelitian ini. (1) Empat tumbuhan obat Indonesia terungkap potensi aktivitas antikankernya dan dapat diamati distribusi metabolitnya. (2) Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang menggunakan pendekatan metabolomik untuk profil metabolit dan dugaan senyawa aktif antikanker dari ekstrak daun sirsak dengan teknik ekstraksi menggunakan berbagai pelarut yang diizinkan dalam makanan dan obat. (3) Lebih lanjut, evaluasi senyawa dugaan secara *in silico* membuktikan aktivitas yang sama terhadap obat referensi antikanker. (4) Di sisi lain, evaluasi dengan teknik fraksionasi mengonfirmasi terjadinya peningkatan aktivitas antikanker dari fraksi jika dibandingkan dengan aktivitas ekstrak kasarnya.

1.6 Sistematika Disertasi

Disertasi ini difokuskan pada pendekatan metabolomik untuk mendapat senyawa aktif antikanker dari tumbuhan obat Indonesia. Tiga tahap penelitian dijelaskan secara mendalam pada Bab 2 hingga Bab 4 seperti pada Gambar 1. Bab 2 menjelaskan pemilihan tumbuhan obat Indonesia berpotensi antikanker dan



Gambar 1 Ilustrasi skema penelitian. TOI = tanaman obat Indonesia



antioksidan difokuskan untuk mendapatkan senyawa aktif antikanker. Profil metabolit dan aktivitas antioksidan dari tiga tumbuhan telah terbit di *Indonesian Journal of Chemistry* (2021, 21(5):1140–1147) serta telah didiseminasikan pada *International Postgraduate Symposium in Biology, Biotechnology, and Bioengineering* (2021). Selain itu, profil daun dan batang sambung nyawa diterima untuk diterbitkan di *Indonesian Journal of Chemistry* (2022) dan di *The 9th International Conference of Indonesian Chemical Society 2021*. Informasi senyawa aktif dari tumbuhan obat terpilih menggunakan pendekatan metabolomik telah dibuat dalam bentuk draft naskah untuk dikirimkan ke jurnal internasional. Perkembangan terbaru dalam spektrometri massa dan teknik pemisahan yang digunakan dalam studi metabolomik dijelaskan dalam Bab 3. Fraksionasi dan evaluasi terkait senyawa aktif tersebut terhadap aktivitas antikanker disajikan dalam Bab 4. Pembahasan umum terkait penelitian disertasi ini dijelaskan pada Bab 5, diakhiri dengan kesimpulan dan pandangan pada Bab 6.

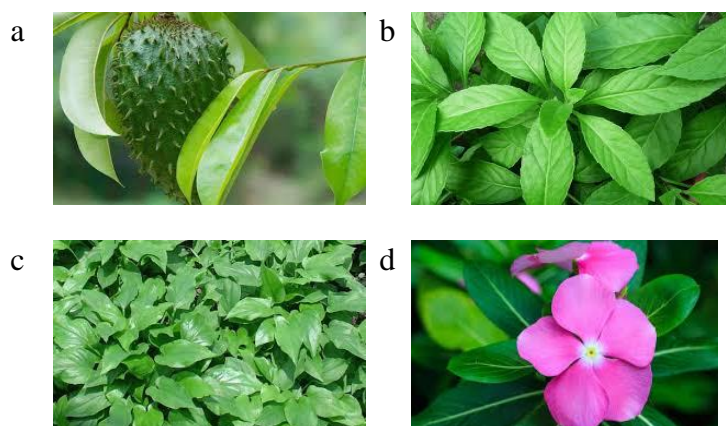
IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

II PEMILIHAN TUMBUHAN OBAT INDONESIA YANG BERPOTENSI ANTIKANKER

2.1 Pendahuluan

Indonesia kaya akan tumbuhan-tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat herbal karena memiliki berbagai aktivitas hayati tertentu. Berbagai uji terhadap tumbuhan obat Indonesia terus berkembang untuk menemukan aktivitas hayati. Hal ini akan meningkatkan pemanfaatan tumbuhan obat tersebut sebagai obat herbal. Salah satu pemanfaatan obat herbal yang dipercaya masyarakat adalah dapat mengobati penyakit kanker. Kanker merupakan penyebab kematian kedua yang diprediksi sekitar 10 juta kematian setiap tahun (WHO 2018). Pengobatan alternatif dengan obat herbal banyak dipilih karena memiliki efek samping yang relatif lebih rendah. Beberapa tumbuhan obat Indonesia yang telah diketahui berpotensi sebagai antikanker adalah tapak dara (*Catharanthus roseus*), sambung nyawa (*Gynura procumbens*) (Nasiruddin dan Sinha 2020), keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) (Farida *et al.* 2014), dan sirsak (*Annona muricata*) (Orak *et al.* 2019) (Gambar 2).



Gambar 2 Tumbuhan berpotensi sebagai antikanker. Sirsak (a), sambung nyawa (b), keladi tikus (c), dan tapak dara (d)

Aktivitas hayati dari suatu ekstrak tumbuhan obat akan sangat dipengaruhi oleh keberadaan suatu metabolit. Pengetahuan mengenai kandungan metabolit di dalam sampel dapat menambah informasi untuk mengetahui aktivitas tumbuhan obat tersebut. Tapak dara dilaporkan menghasilkan dua alkaloid indol terpenoid dimerik, yakni vinblastin dan vinkristin, yang banyak digunakan dalam kemoterapi kanker (Taher *et al.* 2019). Tumbuhan sirsak menunjukkan tingkat sitotoksitas yang berbeda terhadap sel lestari kanker payudara. Ekstrak daun sirsak yang dipilih mengurangi ukuran dan bobot tumor (Syed-Najmuddin *et al.* 2016). Senyawa bioaktif asetogenin yang menginduksi sitotoksitas dengan menghambat kompleks I mitokondria yang terlibat dalam sintesis ATP, sehingga dampaknya energi di dalam sel kanker pun berhenti dan akhirnya sel kanker mati (Yajid *et al.* 2018). Tumbuhan sambung nyawa memiliki aktivitas sebagai antikanker karena keberadaan senyawa flavonoid dan steroid (Tan *et al.* 2016).

Sementara, keladi tikus diduga dipengaruhi senyawa golongan terpenoid sebagai antikanker (Widowati dan Mudahar 2009).

Antioksidan merupakan salah satu uji aktivitas yang sangat penting sebagai awal untuk pengujian terhadap aktivitas yang lain. Antioksidan berperan penting dalam mencegah oksidasi sehingga dapat melindungi sel dari bahaya radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal lainnya (Kaneria *et al.* 2017). Keberadaan senyawa antioksidan dalam produk herbal dapat mencegah terjadinya kerusakan sel dan mencegah kanker. Senyawa ini bekerja dengan mengambil elektron sehingga radikal bebas tidak mengakibatkan kerusakan sel. Dengan adanya kandungan antioksidan dalam tubuh, radikal bebas akan aman terkendali, sehingga diharapkan pertumbuhan sel kanker dapat dihindari.

Studi ini bertujuan menentukan aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak tumbuhan obat Indonesia, yaitu daun keladi tikus, sambung nyawa, sirsak, dan tapak dara, dengan pelarut etanol 80% dan etanol p.a. Kedua pelarut dipilih untuk mengevaluasi pengaruh perubahan kepolaran pelarut terhadap aktivitas dan profil. Bagian daun umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan kumarin (Ben Salah *et al.* 2019). Umumnya senyawa antioksidan dari tumbuhan berasal dari golongan senyawa turunan fenol seperti flavonoid (kuersetin) (Song *et al.* 2020), turunan senyawa asam hidroksamat (Liu *et al.* 2008; Razzaghi-Asl *et al.* 2013), kumarin (Worachartcheewan *et al.* 2020), vitamin (tokoferol) (Selamat *et al.* 2018), asam organik (asam galat) dan vitamin C (asam askorbat) (Kelebek *et al.* 2009; Swallah *et al.* 2020). Senyawa fenolik yang sangat aktif sebagai antioksidan alami terbanyak ditemukan pada tanaman (Moon dan Shibamoto 2009; Swallah *et al.* 2020). Lebih lanjut, kandungan metabolit fenolik dikaji untuk korelasi keberadaan metabolit terhadap aktivitas antioksidan. Profil metabolit fenolik dievaluasi menggunakan UHPLC-ESI-MS Q-Orbitrap sebagai alat analisis yang tepat dengan sensitivitas dan akurasi tinggi.

2.2 Metode

2.2.1 Bahan

Sampel daun sambung nyawa, sirsak, keladi tikus, dan tapak dara dikoleksi dari kebun tumbuhan obat *Tropical Biopharmaca Research Center* (TropBRC), IPB University, Bogor, Indonesia. Etanol untuk ekstraksi sampel diperoleh dari Smart Lab (Tangerang, Indonesia), asetonitril dan air (LC-MS grade) diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang digunakan dalam pengujian antioksidan diperoleh dari Sigma Aldrich (Palo Alto, USA). Filter PTFE 0,22 μm yang digunakan dalam analisis LC-MS diperoleh dari Anpel (Shanghai, China).

2.2.2 Instrumentasi

Pengukuran antioksidan dibaca pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan *microplate reader* (Epoch BioTek, USA). Senyawa fenolik dipisahkan dan diidentifikasi menggunakan Vanquish Flex UHPLC yang ditandem Q Exactive Plus Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometer (HRMS) dan analisis data menggunakan Thermo XCalibur dan Compound Discoverer version 2.2 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

2.2.3 Ekstraksi

Sampel daun tapak dara, sirsak, sambung nyawa dan keladi tikus segar dicuci dan dikeringkan di udara terbuka dengan panas matahari dan kemudian dibuat bubuk dengan alat penghalus menjadi simplisia. Simplisia dari tumbuhan dimaserasi menggunakan etanol 80% dan etanol p.a (1:10) selama 24 jam dengan tiga pengulangan. Filtrat ekstrak dipekatkan menggunakan penguap putar di bawah tekanan rendah untuk menghasilkan ekstrak pekat.

2.2.4 Penentuan aktivitas antioksidan

Ekstrak daun tapak dara, sirsak, sambung nyawa dan keladi tikus dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1 mg/mL, kemudian diencerkan dalam etanol menjadi rentang konsentrasi. Larutan sampel dipipet masing-masing sebanyak 100 μ L ke dalam pelat 96-sumur, ditambahkan 100 μ L larutan DPPH 125 μ M dalam etanol, dan diinkubasi pada kondisi tanpa cahaya dan suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* (pada panjang gelombang 517 nm). Konsentrasi penghambatan 50% (IC_{50}) diperoleh dari persamaan regresi grafik hubungan konsentrasi sampel uji dengan persen inhibisi. Senyawa asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian.

2.2.5 Penentuan aktivitas antikanker secara *in vitro*

Aktivitas antikanker diuji dengan metode 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) terhadap sel MCF-7 (ATCC HTB 22) dengan media penumbuh sel RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS) 5%, penisilin 100 U/mL, dan streptomisin 100 μ g/mL. Ekstrak daun dilarutkan dalam DMSO dan media penumbuh untuk dijadikan larutan stok 10.000 μ g/mL. Sampel dibuat dengan berbagai tingkat konsentrasi. Sebanyak 10 μ L MTT (5 mg/mL dalam PBS) ditambahkan ke setiap sumur dan diinkubasi selama 48 jam (37 °C), selanjutnya absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm, dan nilai absorbansi yang diperoleh dihitung persen inhibisinya. Nilai IC_{50} ekstrak dihitung dari kurva untuk menentukan aktivitas antikanker. Senyawa doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif pengujian antikanker.

2.2.6 Pemisahan dan identifikasi metabolit menggunakan LC-HRMS

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL metanol dan disonikasi selama 30 menit. Selanjutnya larutan disaring menggunakan filter PTFE 0,2 μ m ke dalam vial dan dianalisis dengan menggunakan LC-MS dengan tipe LC Vanquish Tandem Q Exactive Plus Mass Spectrometer (Thermo, Jerman) menggunakan kolom C18 (100 mm \times 2,1 mm \times 1,8 μ m). Fase gerak yang digunakan, yaitu 0,1% asam format dalam air (A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (B) dengan metode gradien 5-95% (A) selama 30 menit.

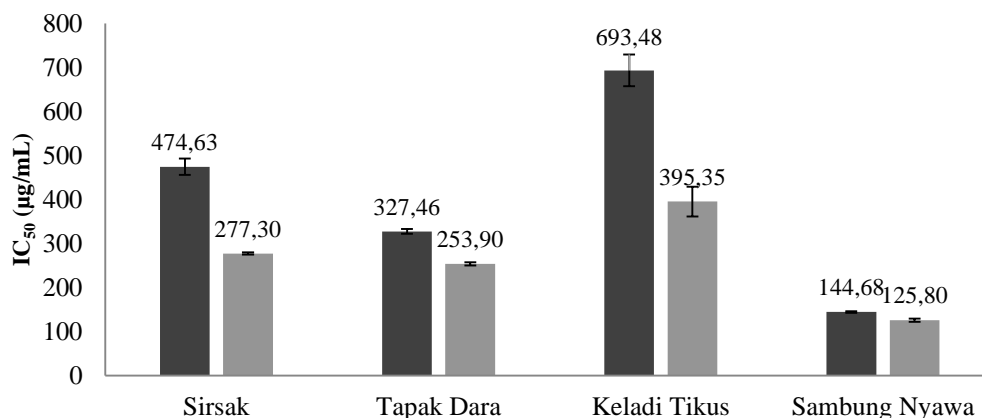
2.3 Hasil dan Pembahasan

2.3.1 Aktivitas antioksidan 4 tumbuhan obat

Antioksidan berfungsi menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh, sehingga dapat mencegah kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas. Radikal bebas yang umum

digunakan di laboratorium sebagai model dalam mengukur daya penangkapan radikal bebas adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil dan memiliki warna ungu gelap yang dapat berubah menjadi warna kuning jika radikal bebas DPPH menerima elektron atau hidrogen dari molekul antioksidan, sehingga menghasilkan molekul DPPH yang stabil (Carmona-Jiménez *et al.* 2014).

Nilai aktivitas antioksidan diekspresikan dengan nilai *inhibition concentration* 50 (IC₅₀), yaitu konsentrasi larutan sampel yang menghasilkan persen penghambatan radikal bebas sebesar 50%. Semakin besar aktivitas antioksidan suatu ekstrak, maka nilai IC₅₀ akan semakin kecil. Hasil aktivitas antioksidan dari ekstrak daun sambung nyawa, sirsak, keladi tikus dan tapak dara ditampilkan pada Gambar 3. Uji signifikansi menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak tumbuhan memiliki nilai IC₅₀ yang berbeda signifikan, ($p < 0,05$). Sambung nyawa memiliki nilai IC₅₀ paling rendah dibandingkan tiga tumbuhan yang lain, baik pada ekstrak etanol 80% maupun ekstrak etanol p.a. Hal ini menjelaskan bahwa tumbuhan ini lebih berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan sirsak, tapak dara, dan keladi tikus. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sambung nyawa tergolong sebagai antioksidan sedang, sedangkan ekstrak yang lainnya tergolong sebagai antioksidan sangat lemah (Molyneux, 2004). Hasil penelitian ini mendekati penelitian sebelumnya dengan IC₅₀ 112,89 ppm (Nasiruddin dan Sinha 2020). Hasil IC₅₀ tapak dara juga mendekati dengan studi yang sudah dilaporkan sebelumnya yaitu 358 µg/mL. Namun, nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan ekstrak daun keladi tikus dan sirsak masih di bawah nilai aktivitas antioksidan yang dilaporkan, yakni 76,10 µg/mL (Adrianta *et al.* 2017) dan 35,51 µg/mL (Qorina *et al.* 2019).



Gambar 3 Aktivitas antioksidan dari ekstrak sirsak, tapak dara, keladi tikus, dan sambung nyawa. Ekstrak dengan pelarut etanol p.a (■) dan etanol 80% (▒)

Perbandingan nilai IC₅₀ antioksidan untuk keempat tumbuhan obat dengan pelarut yang berbeda (etanol 80% dan etanol p.a) lebih tinggi jika dibandingkan dengan asam askorbat sebagai kontrol positif (IC₅₀ 6,10 µg/mL). Hal tersebut berarti aktivitas antioksidan ke empat ekstrak lebih rendah dibandingkan kontrol positif. Ekstrak etanol 80% pada keempat tumbuhan

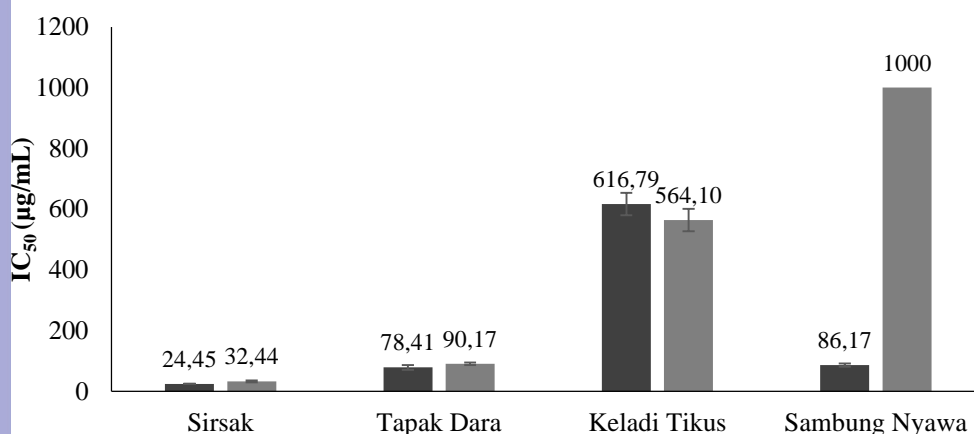
menunjukkan aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut etanol p.a. Nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada ekstrak etanol 80% daun keladi tikus, sedangkan nilai IC_{50} terendah terdapat pada ekstrak etanol p.a daun sambung nyawa. Hal ini menandakan bahwa peningkatan komposisi air pada pelarut etanol 80%, meningkatkan sifat kepolaran pelarut dan mengekstraksi senyawa polar dan lebih aktif sebagai antioksidan sehingga nilai aktivitas antioksidan ekstrak dengan pelarut etanol 80% lebih tinggi. Hal ini terbukti dengan hasil dilaporkan sebelumnya. Senyawa antioksidan lebih banyak bersifat polar. Beberapa penelitian menunjukkan komposisi etanol:air lebih efektif dalam mengekstrak senyawa antioksidan dibandingkan etanol p.a seperti penelitian pada propolis (Sun *et al.* 2015) dan *Linum usitatissimum* (Anwar dan Przybylski 2012). Penambahan komposisi air akan meningkatkan polaritas pelarut sehingga senyawa dengan polaritas tinggi dapat terekstrak lebih banyak.

2.3.2 Aktivitas antikanker pada sel MCF 7

Nilai aktivitas antikanker pada sel MCF 7 dari ekstrak 4 tumbuhan dijelaskan seperti pada aktivitas antioksidan, yaitu menggunakan nilai IC_{50} dan ditampilkan pada Gambar 4. Ekstrak daun sirsak menghasilkan nilai IC_{50} paling rendah, baik pada pelarut etanol p.a dan 80% dibandingkan 3 ekstrak lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak paling berpotensi sebagai antikanker terhadap sel MCF7 dengan metode MTT *assay*. Sel MCF7 digunakan dalam penelitian ini karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, dan homogenitas tinggi. Tumbuhan kedua yang berpotensi sebagai antikanker pada sel MCF 7 adalah tapak dara yang sudah dipercaya masyarakat memiliki potensi sebagai antikanker karena ada nya senyawa vinblastine dan vinkristin. Hasil yang cukup berbeda pada kedua pelarut adalah keladi tikus dengan etanol p.a memberi hasil IC_{50} lebih besar dibandingkan dengan etanol 80%. Hal ini dapat dipengaruhi karena ada perbedaan tingkat kepolaran yang cukup signifikan pada tumbuhan tersebut. IC_{50} tapak dara yang diperoleh lebih besar dibandingkan laporan sebelumnya sebesar 18 $\mu\text{g/mL}$ untuk bagian daun (Sudevan *et al.* 2016). Ekstrak etanol daun sirsak yang diperoleh lebih besar dari yang sudah dilaporkan yaitu 14 $\mu\text{g/mL}$ (Endrini *et al.* 2014). Hasil aktivitas ekstrak daun sirsak, sambung nyawa, tapak dara, dan keladi tikus aktivitasnya lebih rendah dan berbeda signifikan jika dibandingkan dengan doksorubisin sebagai kontrol positif (obat referensi) dengan nilai $IC_{50} < 0.625 \mu\text{g/mL}$.

Pelarut etanol p.a untuk ekstrak daun sirsak, sambung nyawa, dan tapak dara lebih cenderung aktif dibandingkan dengan pelarut etanol 80%. Hasil ini sejalan dengan studi sebelumnya yaitu kebanyakan agen antikanker bersifat hidrofobik dan dapat dengan mudah menembus membran sel tumor dengan difusi pasif (Anselmi *et al.* 2021). Etanol dapat digunakan sebagai pelarut untuk senyawa hidrofobik, sehingga penambahan air akan menurunkan keberadaan senyawa hidrofobik yang berakibat penurunan aktivitas antikanker. Studi sebelumnya melaporkan bahwa etanol memodulasi pertumbuhan sel dan menekan dosis proliferasi sel secara dependen. Selain itu dilaporkan bahwa etanol mengatur apoptosis atau nekrosis dengan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) atau menginduksi penghentian sementara pembelahan sel

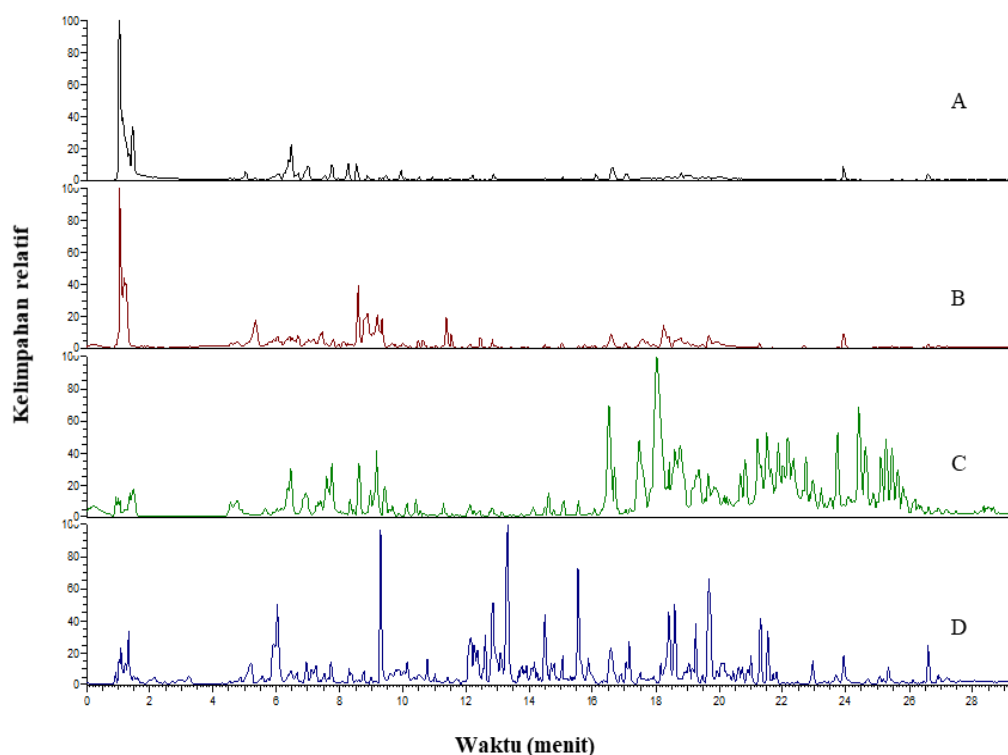
(Jamalzadeh *et al.* 2016). Pengaruh penggunaan pelarut etanol p.a dan etanol 80% terhadap aktivitas antikanker berbeda pada tumbuhan keladi tikus. Nilai IC₅₀ pada etanol p.a daun keladi tikus lebih tinggi dibandingkan pada etanol 80%, menjelaskan bahwa pelarut etanol 80% lebih efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker dibandingkan etanol p.a. Aktivitas tertinggi terdapat pada ekstrak etanol p.a daun sirsak dari ketiga tumbuhan lain. Hasil yang sama jika dibandingkan dengan pelarut etanol 80%. Hal ini menginformasikan senyawa antikanker sirsak lebih bersifat semipolar.



Gambar 4 Aktivitas antikanker pada sel MCF7 dari ekstrak sirsak, tapak dara, keladi tikus, dan sambung nyawa. Ekstrak dengan pelarut etanol p.a (■) dan etanol 80% (■)

2.3.3 Profil metabolit senyawa fenolik

Profil metabolit merupakan salah satu analisis dengan pendekatan metabolomik untuk menggambarkan profil senyawa metabolit sekunder dalam suatu sampel. Metabolomik merupakan ilmu multidisiplin untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi metabolit yang merupakan produk dari suatu metabolisme dalam sampel hayati. Metode ini dapat diterapkan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi metabolit yang bertanggung jawab dalam metabolisme; mengevaluasi dampak metabolit pada keamanan dan kemanjuran obat, dan memanfaatkan informasi metabolisme obat untuk memaksimalkan kekayaan intelektualnya (Muhamad dan Na-Bangchang 2020). Metabolit pada ekstrak etanol empat tumbuhan diidentifikasi menggunakan UHPLC-ESI-MS Q-Orbitrap. Gambar 5 menunjukkan kromatogram *base peak* dengan mode ionisasi negatif pada ekstrak daun keladi tikus, sambung nyawa, sirsak, dan tapak dara. Analisis senyawa difokuskan pada analisis senyawa golongan fenolik. Fenolik merupakan golongan senyawa yang memiliki gugus hidroksil dan terbanyak terdapat dalam tanaman. Metabolit sekunder golongan flavonoid dan fenolik yang terkandung pada tumbuhan diketahui berpotensi sebagai antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker (Kopustinskiene *et al.* 2020; Matulja *et al.* 2022).



Gambar 5 Kromatogram *base peak* pada mode ionisasi negatif dari ekstrak daun keladi tikus (a), sambung nyawa (b), sirsak (c), dan tapak dara(d)

Sebanyak 40 senyawa berhasil diidentifikasi berdasarkan konfirmasi nilai ion perkursor dan pola fragmentasi MS2 dari pustaka (Tabel 1). Metabolit yang teridentifikasi pada daun sambung nyawa, sirsak, keladi tikus, dan tapak dara secara berurut adalah 29, 8, 15, dan 6 senyawa fenolik yang masuk ke dalam golongan flavon, flavanol, asam hidroksinamat, dan beberapa golongan lainnya. Kandungan metabolit golongan fenolik lebih banyak terdapat pada daun sambung nyawa dibandingkan ketiga sampel lainnya. Hal ini menunjukkan adanya korelasi antara kandungan metabolit dan aktivitas antioksidan yang dimiliki daun sambung nyawa lebih tinggi daripada sampel yang lain.

2.3.4 Flavon

Senyawa **3-7** teridentifikasi sebagai apigenin-7-O-rutinosida, orientin (luteolin 8-C glukosida), apigenin C-heksosida-C-pentosida, sirsilineol, dan viteksin yang termasuk dalam golongan flavon. Apigenin-7-O-rutinosida (**1**) teridentifikasi dengan m/z 577 $[M-H]^-$ dan MS2 269 $[M-H-308]^-$ yang menunjukkan keberadaan apigenin. Hilangnya 308 menunjukkan keberadaan rutinosida, sehingga puncak ini diidentifikasi sebagai apigenin 7-O-rutinosida. Senyawa orientin atau luteolin 8-C glukosida (**2**) menghasilkan m/z 327 $[M-H-120]^-$, 285 $[M-H-162]^-$. Senyawa apigenin C-heksosida-C pentosida (**3**) teridentifikasi dengan adanya pola fragmen MS2 pada m/z 545 $[M-H-18]^-$, 443 $[M-H-120]^-$, 431 $[M-H-132]^-$, 341 $[M-H-132-90]^-$, dan 311 $[M-H-132-120]^-$. Pola spektrum MS2 tersebut mengonfirmasi substitusi mono-C-heksosida-C-pentosida di posisi 6 dan 8 (Al-Yousef *et al.* 2020).

Senyawa ini hanya terdeteksi pada ekstrak daun keladi tikus. Viteksin (5) menunjukkan m/z pada 431 (molekul terdeprotonasi), 341 $[M-H-90]^-$ dan 311 $[M-H-120]^-$ sebagai ion penciri pada MS2 mode negatif (Krasteva dan Nikolov 2008).

Tabel 1 Identifikasi metabolit fenolik dari ekstrak etanol daun sirsak (AM), sambung nyawa (GP), keladi tikus (TF), dan tapak dara (CR) dengan UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

No	Senyawa dugaan	Rumus	BM	tR (min)	MS ²	Tumbuhan			
						AM	GP	TF	CR
Flavon									
1	Apigenin 7-O-rutinosida	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,1677	5,83	269; 225		√		
2	Orientin (Luteolin 8-C glukosida)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1010	8,93	327;285		√		
3	Apigenin C-heksosida-C-pentosida	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564,1487	7,29	545, 443, 431, 341, 311			√	
4	Sirsilineol	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344,0889	14,38	345		√		
5	Viteksin (Apigenin 8-C-glukosida)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,1056	8,24	431; 341; 311; 269			√	
Flavonol									
6	Kaempferol 3-O-rutinosid	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,1591	8,62	287	√	√	√	
7	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0475	12,51	257, 153, 133, 121		√	√	√
8	Kuersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0424	11,1	273; 179; 151; 121		√		√
9	Kuersetin 7-O-rutinosid	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,1538	7,99	301; 271; 255	√	√		
10	Kaempferol metill eter	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0637	1,31	284		√		
11	Mirisetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,0382	8,23	271; 151; 137		√		
12	Kuersetin 3-O-glucosida	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0961	8,29	303; 205; 153		√		
13	Kaempferol 3-O-heksosida		448,1009	8,72	285;284		√		
14	Kaempferol 3-O-(6"-asetil-galaktosida)-7-O-rhamnosida	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	636,1694	8,54	325; 337			√	
Isoflavonoid									
15	2-Hidroksiformononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,0501	8,30	287; 253		√		
16	2,7-Dihidroksi-4,5-dimetoksi isoflavon	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,0787	15,74	315; 300; 137		√		
Hidroksibenzaldehida									
17	4-Hidroksibenzaldehida	C ₇ H ₆ O ₂	122,0482	1,25	123			√	
18	<i>p</i> -Anisaldehyda	C ₈ H ₈ O ₂	136,0517	9,59	135; 93		√	√	
Asam hidroksibenzoat									
19	Asam protokatekuat	C ₇ H ₆ O ₄	154,0260	2,53	109		√		√
20	Asam <i>p</i> -kumarat	C ₉ H ₈ O ₃	164,0470	7,48	119; 96	√	√	√	
21	Asam kuinat	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0630	1,08	146;102	√	√	√	√
22	Asam 3-kafeoilkuinat	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0954	5,42	191		√		
23	Asam 4-kafeoilkuinat	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0954	6,04	191; 173; 135		√		
24	Asam 3,5-dikafeoilkuinat	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1266	10,07	353 191 179 173 161 135		√		
25	Asam 3,4-dikafeoilkuinat	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1267	9,17	353 191 179 173 161 135		√		
26	Asam 4,5-dikafeoilkuinat	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1267	8,92	353 191 179 173 135		√		

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Tabel 1 Identifikasi metabolit fenolik dari ekstrak etanol daun sirsak (AM), sambung nyawa (GP), keladi tikus (TF), dan tapak dara (CR) dengan UHPLC-Q-Orbitrap HRMS (*lanjutan*)

No	Senyawa	Rumus	BM	tR (min)	MS ²	Tumbuhan			
						AM	GP	TF	CR
27	Asam sinamat	C ₉ H ₈ O ₂	148,05234	1,66	128; 110			✓	
28	Asam ferulat	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05810	8,27	193			✓	
29	Asam <i>p</i> -kumarat α -glukosida	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,10081	5,71	163;145			✓	
30	Asam 3- <i>p</i> - kumaroilkuinat	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,11543	16,11	255;147		✓		
31	Asam dihidroksi ferulat	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196,07377	6,05	197;151;103	✓			
32	Asam rosmarinat	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360,08525	9,48	197; 179; 161		✓		
Hidroksikumarin									
33	Koumarin	C ₉ H ₆ O ₂	146,03694	6,16	147; 103; 91			✓	
34	Eskuletin	C ₉ H ₆ O ₄	178,02663	2,98	171; 153;135; 133			✓	
35	Mellein	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,06280	17,04	179; 161; 133	✓	✓		
Asam hidroksipropanoat									
36	Asam kafeat	C ₉ H ₈ O ₄	180,89940	6,64	135	✓	✓	✓	
37	Asam kafeat O-glukosida	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,09569	4,11	179			✓	
Kelompok lainnya									
38	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	152,04747	7,3	151; 136	✓	✓	✓	
39	5-Hidroksi-4,6,4'-trimetoksiauron	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	328,09419	17,43	296; 268; 240				✓
40	Kenusanon C	C ₃₁ H ₃₈ O ₈	538,25688	24,96	451; 407,393				✓

2.3.5 Flavonol

Senyawa flavonol terbanyak teridentifikasi pada empat tumbuhan. Sembilan senyawa yang terdeteksi ialah kaempferol-3-O-rutinosida (**6**), kaempferol (**7**), kuersetin (**8**), kuersetin-7-O-rutinosida (**9**), kaempferol metil eter (**10**), mirisetin (**11**), kuersetin-3-O-glukosida (**12**), kaempferol-3-O-heksosida (**13**), dan kaempferol 3-O-(6''-asetil-galaktosida)-7-O-rhamnosida (**14**). Senyawa kaempferol 3-O-rutinosida (**6**) teridentifikasi di semua ekstrak sampel pada waktu retensi 16 menit. Pola fragmen yang dihasilkan pada *m/z* 593 [M-H]⁻, dan 285 [M-H-308]⁻ menunjukkan keberadaan kaempferol (**7**) dan hilangnya massa 308 yang menunjukkan hilangnya rutinosida. Kaempferol metil eter (**10**) terdeteksi dengan pola fragmen MS2 *m/z* 299 [M-H]⁻ dan 284 [M-H-15]⁻.

Kuersetin (**8**) terdeteksi pada menit ke 11,10 dengan prekursor ion *m/z* 301 [M-H]⁻ dan pola fragmen MS2 pada *m/z* 273 [M-H-28]⁻, 179 [M-H-122]⁻ dan 151 [M-H-122-28]⁻. Seperti pada senyawa **1**, senyawa **6** dengan prekursor ion 609 [M-H]⁻ kehilangan massa 308 Da. Fragmen yang dihasilkan pada *m/z* 301 [M-H-308]⁻, 300 [M-2H-308]⁻, dan 303 menunjukkan keberadaan kuersetin, sehingga teridentifikasi sebagai kuersetin-7-O-rutinosida. Hasil yang sama ditunjukkan oleh senyawa pada menit 8,29 dengan *m/z* 463 dan munculnya *m/z* 301 pada MS2. Hilangnya massa 162 Da mengindikasikan kehilangan gugus glukosida, sehingga ditentukan sebagai kuersetin-3-O-glukosida (**12**). Hal ini juga ditunjukkan oleh senyawa **15** yang teridentifikasi sebagai kaempferol-3-O-heksosida dengan *m/z* 447 [M-H-162]⁻.

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

2.3.6 Isoflavonoid

Senyawa **15** dan **16** terdeteksi dengan ion prekursor m/z 285 dan 315, yang diduga sebagai senyawa 2'-hidroksiformononetin dan 2,7-dihidroksi-4,5-dimetoksi isoflavon. Senyawa 2,7-dihidroksi-4,5-dimetoksiisoflavon ($C_{17}H_{14}O_6$) kecuali ion m/z 137, yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah isoflavon dan dikarakterisasi sebagai dihidroksi-dimetoksiisoflavon (Zhang *et al.* 2015).

2.3.7 Asam hidroksinamat

Senyawa **23-35** teridentifikasi sebagai golongan asam hidroksinamat. Senyawa *p*-asam kumarat (**20**), asam kuinat (**21**), asam sinamat (**27**), dan asam ferulat (**28**) dengan m/z 163 $[M-H]^-$, 191 $[M-H]^-$, 147 $[M-H]^-$, dan 193 $[M-H]^-$. Senyawa **22** dan **23** memiliki prekursor ion m/z 353 $[M-H]^-$. Berdasarkan pustaka, senyawa **17** teridentifikasi sebagai asam 3-kafeoilkuinat dengan m/z 191 sebagai *base peak*. Puncak **23** dengan adanya intensitas m/z 173 dan 135 yang cukup tinggi menunjukkan asam 4-kafeoilkuinat. Senyawa asam 3,5-dikafeoilkuinat (**24**), asam 3,4-dikafeoilkuinat (puncak **27**), asam 4,5-dikafeoilkuinat (**26**) teridentifikasi hanya pada ekstrak daun sambung nyawa. Ketiga senyawa memiliki kesamaan ion perkursor, yaitu m/z 515, tetapi dapat dibedakan berdasarkan intensitas dari fragmen MS2. Senyawa asam 3,5-dikafeoilkuinat memiliki *base peak* MS2 pada m/z 191, sedangkan asam 3,4-dikafeoilkuinat dibedakan dari intensitas m/z 179 lebih tinggi dari m/z 173. Asam 4,5-dikafeoilkuinat dibedakan dari ketiga senyawa lainnya dengan absennya m/z 161 (Chandradevan *et al.* 2020). Senyawa **29-31** menunjukkan asam *p*-kumarat α -glukosida, asam 3-*p*-kumaroilkuinat, dan dihidroksi asam ferulat dengan bobot molekul masing-masing 326, 338, dan 196. Asam rosmarinat (**32**) teridentifikasi dengan m/z 359 $[M-H]^-$ menghasilkan MS2 pada m/z 197 $[M-H-162]^-$ yang merupakan ion radikal dari asam fenilaktat 3,4-dihidroksi ($C_9H_{10}O_5$), dan m/z 179 yang merupakan ion radikal asam kafeat ($C_9H_8O_4$) (Sik *et al.* 2019).

2.3.8 Golongan lain

Senyawa kumarin **33** teridentifikasi dengan prekursor m/z 147 $[M+H]^+$ dan menghasilkan fragmen 103 $[M+H-44]^+$ dan 91 $[M+H-56]^+$ (Ren *et al.* 2016). Senyawa eskuletin (**34**) menghasilkan pola fragmen 177 $[M-H]^-$. Dalam analisis MS/MS, terdeteksi hilangnya CO yang berurutan, pada m/z 149 $[M-H-CO]^-$ dan m/z 119 $[M-H-2CO]^-$, serta m/z 133 $[M-OH-CO]^-$ (Kim *et al.* 2014). Senyawa kumarin dan eskuletin termasuk dalam group hidroksikoumarin.

Senyawa asam kafeat (**36**) dan asam kafeat O-glukosida (**37**) teridentifikasi dalam golongan asam hidroksifenil propanoat. Asam kafeat diidentifikasi dari keberadaan ion molekul yang terdeprotonasi pada m/z 179 $[M-H]^-$ dan ion MS2 pada m/z 135 $[M-H-CO_2]^-$ (Ben Salah *et al.* 2019). Asam kafeat O-glukosida menunjukkan m/z 179 dan hilangnya 162 Da. Senyawa **38** menunjukkan senyawa vanilin dengan fragmen m/z 151 $[M-H]^-$, 136 $[M-H-CH_3]^-$ (Sanz *et al.* 2012).

2.4 Simpulan

Tahap penelitian ini berfokus pada aktivitas antikanker dan antioksidan serta kandungan senyawa fenolik dari tumbuhan obat daun keladi tikus, sambung nyawa, sirsak, dan tapak dara. Di antara keempat tumbuhan obat, ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas antikanker tertinggi dibandingkan ekstrak ketiga tumbuhan lainnya. UHPLC-ESI-MS Q-Orbitrap diaplikasikan untuk profil golongan fenolik dan didapat total 40 metabolit berhasil diidentifikasi untuk keempat tumbuhan dalam golongan flavon, flavanol, asam hidroksinamat, dan beberapa golongan lainnya. Ekstrak daun sambung nyawa terbukti berpotensi sebagai antioksidan dengan didukung kandungan senyawa fenolik yang lebih banyak, yaitu 29 metabolit. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mendalami korelasi antara metabolit yang berpengaruh pada aktivitas antioksidan dan antikanker.

@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



III PENDEKATAN METABOLOMIK DALAM IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF ANTIKANKER

3.1 Pendahuluan

Kanker dilaporkan sebagai penyebab kematian kedua di dunia, bahkan telah mencapai sekitar 10 juta kematian di tahun 2020 (Ferlay *et al.* 2021). Sebagian besar obat antikanker yang digunakan saat ini bekerja dengan cara membunuh atau menghambat mekanisme proliferasi sel kanker. Obat dengan mekanisme ini tidak hanya toksik pada sel kanker tetapi juga pada sel normal, sehingga akan menimbulkan efek samping saat pengobatan atau beberapa waktu setelahnya (Rady *et al.* 2018). Sebagai alternatif, pengembangan agen antikanker baru dari tumbuhan obat terus dikembangkan dan diteliti. Salah satu tumbuhan obat asal Indonesia yang telah banyak dimanfaatkan sebagai antikanker adalah sirsak (*Annona muricata*) (Wahab *et al.* 2018; Rady *et al.* 2018; Naik dan Sellappan, 2020).

Sirsak (famili Annonaceae) memiliki banyak kegunaan selain antikanker, seperti antiapoptosis (Antony *et al.* 2016), antimikrob (Abdel-Rahman *et al.* 2019), antiparasit (Miranda *et al.* 2021), antibakteri (Silva *et al.* 2021), antivirus (Balderrama-Carmona *et al.* 2020), antidiabetik (Alwan *et al.* 2019), antiinflamasi (Ayun *et al.* 2020), dan antioksidan (Justino *et al.* 2018, Balderrama-Carmona *et al.* 2020). Tumbuhan ini kaya dengan metabolit sekunder yang telah terbukti berpotensi sebagai obat di bidang terapeutik, di antaranya golongan asetogenin, megastigmana, isokuinolina, flavonoid, dan alkaloid aporfin (Justino *et al.* 2021). Kehadiran senyawa flavonoid bersama dengan asetogenin sebagai zat aktif dalam daun memberi manfaat tambahan untuk memungkinkan efek terapeutik yang maksimum (Hadisaputri *et al.* 2021). Jadi, untuk memanfaatkan daun sirsak sebagai antikanker secara lebih efektif, diperlukan profil senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang relevan dapat tapis dengan membandingkan perbedaan bioaktivitas dari berbagai penggunaan pelarut untuk mengekstraksi senyawa bioaktif.

Penemuan senyawa bioaktif dari produk alami melalui pendekatan klasik adalah proses berkelanjutan yang panjang dan bertahap. Cara tersebut dimulai dengan penyaringan ekstrak kasar, diikuti dengan prosedur fraksionasi hingga isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif. Meskipun berhasil, cara klasik yang mengarah pada penemuan senyawa kimia memerlukan waktu panjang dan seringkali tidak efisien untuk menemukan senyawa baru. Untuk mengatasi hambatan ini, baru-baru ini dikembangkan teknologi seperti metodologi "omics" untuk mempercepat penemuan dan pengembangan agen terapeutik baru (Quansah dan Karikari 2016; Chandra Mohana *et al.* 2018).

Sebagai bagian dari teknologi omik, metabolomik adalah teknik yang mengacu pada identifikasi dan/atau kuantifikasi metabolit yang dihasilkan oleh sistem hayati pada titik waktu tertentu yang dapat dianalisis dengan teknik yang dipilih (Schmidt *et al.* 2021). Melalui pendekatan metabolomik taktarget (*untargeted*) dapat berfokus pada perolehan data dengan berbagai spesies atau perlakuan, mengidentifikasi metabolit, dan meninjau perubahan metabolisme baik yang diketahui maupun yang tidak diketahui (Schrimpe-Rutledge *et al.* 2016; Ayula *et al.* 2018; Rafi *et al.* 2021). Teknik ini mampu mengungkapkan hubungan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

antara perbedaan metabolit aktif dan bioaktivitas dari beragam spesies tanaman (Umar *et al.* 2020; Alsherbiny *et al.* 2021; More *et al.* 2022). Namun, belum ada penelitian yang mengidentifikasi senyawa bioaktif antikanker pada ekstrak daun sirsak dengan berbagai pelakuan berdasarkan uji bioaktivitas.

Pada studi ini, diterapkan metabolomik dan kemometrik menggunakan *ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry* (UHPLC Q-Orbitrap HRMS) untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif antikanker dari daun sirsak. Selain itu, senyawa prediksi dievaluasi dengan menggunakan pendekatan penambatan molekul. Penelitian ini merupakan penelitian pertama terkait pengujian daun sirsak pada berbagai tingkat konsentrasi pelarut dan prediksi metabolit aktif antikanker menggunakan pendekatan metabolomik.

3.2 Metode

3.2.1 Bahan dan Alat

Simplisia daun sirsak kering diperoleh dari Kebun Pusat Studi Biofarmaka Tropika, IPB University, dengan kode spesimen tanam (BMK0091082016). Etanol sebagai pelarut pengekstraksi diperoleh dari JT Baker (Avantor, Malaysia). Asetonitril dan air (*LC-MS grade*) diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman), sementara PTFE filter 0,22 µm diperoleh dari Anpel (Shanghai, Cina). Instrumen UHPLC Vanquish tandem mass spektrometri Q Exactive Plus Orbitrap HRMS Thermoscientific (Munich, Jerman) digunakan untuk memprofil metabolit.

3.2.2 Ekstraksi

Simplisia diekstraksi dengan teknik maserasi. Simplisia (10 g) direndam dengan 100 mL pelarut selama 24 jam. Pelarut yang digunakan adalah etanol p.a, 80%, 50%, 30%, dan air. Suspensi diaduk setelah 6 jam perendaman dan dilanjutkan dengan perendaman sampai 24 jam. Sampel disaring dan filtrat ditampung dalam wadah. Perendaman diulang 3 kali. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan penguap putar pada suhu 40 °C untuk mendapatkan ekstrak pekat. Setiap proses ekstraksi diulang 5 kali.

3.2.3 Uji antikanker secara *in vitro*

Aktivitas antikanker diuji dengan metode 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) terhadap sel lestari MCF-7 (ATCC HTB 22) dengan media penumbuh sel RPMI 1640, *fetal bovine serum* (FBS) 5%, penisilin 100 U/mL, dan streptomisin 100 µg/mL. Ekstrak daun dilarutkan dalam DMSO dan media penumbuh untuk dijadikan larutan stok 10.000 µg/mL. Sampel disiapkan dengan berbagai tingkat konsentrasi. Sebanyak 10 µL MTT (5 mg/mL dalam PBS) ditambahkan ke setiap sumur dan diinkubasi selama 48 jam (37 °C), selanjutnya absorbans dibaca pada 550 nm, dan nilai absorbans yang diperoleh dihitung persen inhibisinya. Konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀) ekstrak dihitung dari kurva untuk menentukan aktivitas antikanker.

3.2.4 Analisis UHPLC- Q-Orbitrap HRMS

Metabolit dalam ekstrak diprofilkan menggunakan sistem kromatografi UHPLC Vanquish tandem mass spektrometri Q Exactive Plus Orbitrap HRMS. Pemisahan pada UHPLC menggunakan kolom Accucore C18 (100 × 2,1 µm)

dengan ukuran partikel 1,5 μm (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) dan diatur suhu kolom 30 °C. Fase gerak yang digunakan adalah asam format 0,1% dalam air (A) dan asam format 0,1% dalam asetonitril (B). Sistem gradien yang digunakan adalah: menit 0–12,5 (5–30% B); menit 12,5–15 (30–55% B); menit 15–33 (55–95% B); menit 33–38 (95% B), dan menit 38–40 (5% B). Pengaturan sistem MS1 yang digunakan adalah m/z 100–1000 (*mass range*), resolusi 70.000, dan AGC target 1×10^5 , sedangkan pengaturan MS2 adalah resolusi 17.500, AGC target 1×10^5 , (N)CE 18, 35, dan 53. Analisis menggunakan mode ionisasi positif, laju alir *sheath gas* 35, *aux gas* 15, *sweep gas* 0, *spray voltage* 3,8 KV, suhu kapiler 320 °C, S-lens RF level 50, dan *aux gas heater* 38 °C.

3.2.5 Analisis Multivariat

Data dengan format .raw merupakan data hasil analisis dengan UHPLC-HRMS dan dapat ditampilkan atau dipantau menggunakan program peranti lunak Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Metabolit diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan program Compound Discoverer 3.2 (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA). *Inhouse database* genus *Annona* digunakan sebagai database lokal pada pengolahan data. *Inhouse database* merupakan informasi metabolit yang telah dilaporkan terdapat dalam genus *Annona*. Metabolit dikonfirmasi dengan menghitung *error mass* dalam $\mu\text{g/mL}$ dan konfirmasi pola fragmentasi MS2 untuk metabolit tersebut.

Analisis multivariat diterapkan menggunakan area puncak senyawa serta mengkorelasikan dengan aktivitas antikanker dengan teknik *orthogonal partial least square discriminant analysis* (OPLS-DA). Data multivariat diolah menggunakan peranti lunak MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>).

3.2.6 Analisis *in silico*

Secara *in silico*, penambatan molekular diuji menggunakan program PyRx 0.8 (Sargis Dallakyan, The Scripps Research Institute, Amerika), dan Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 (Dassault Systems Biovia Corp 2020). Makromolekul target adalah reseptor estrogen alfa pada manusia (kode pdb 3ERT). Ligan uji adalah struktur dua-dimensi dari senyawa dugaan biomarker antikanker yang dihasilkan dari analisis LC-HRMS. Selain itu, digunakan 4-hidroksitamoksifen (4OHT) sebagai ligan literatur dan doksorubisin sebagai obat referensi. Sebelum dilakukan penambatan, protein dan ligan uji dilakukan preparasi terlebih dahulu dengan menghilangkan molekul air dan heteroatom yang terdapat pada protein. Afinitas pengikatan dipilih sebagai parameter pengujian. Tahap dilanjutkan dengan pembuatan gridbox dengan ukuran dimensi x, y, dan z yang dipilih adalah 30, 0,9, 25 dengan spasi 27, 18, 22 Å. Penambatan ligan uji dan reseptor dijalankan autogrid.

3.2.7 Analisis Data

Analisis data aktivitas antikanker yang digunakan adalah uji statistik One Way ANOVA. Analisis data dilakukan menggunakan analisis deskriptif dan analisis perbandingan nilai rata-rata. Semua pengukuran aktivitas dilakukan

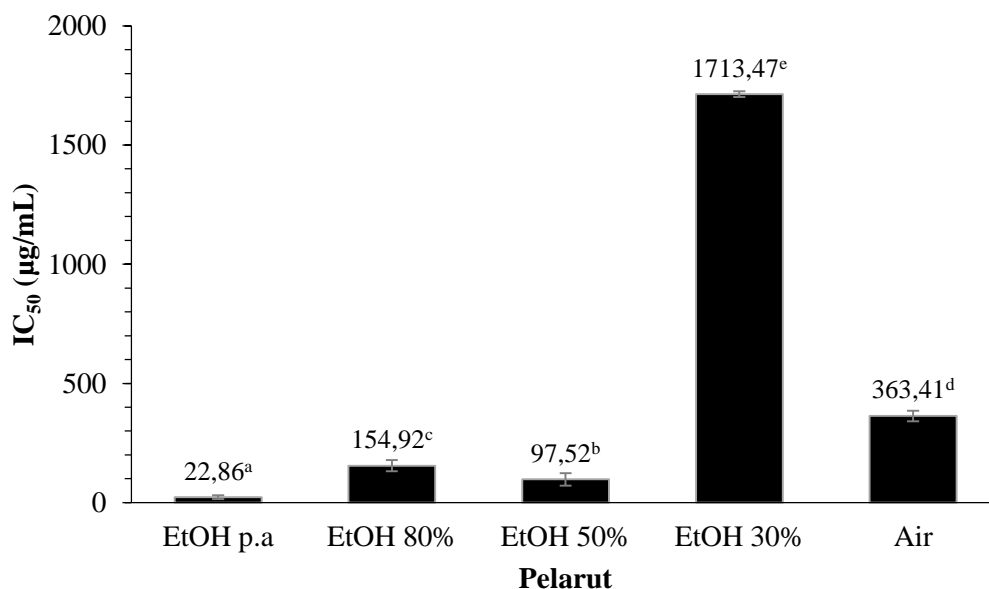
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

sebanyak 5 ulangan. Semua data kuantitatif ditampilkan sebagai rata-rata \pm standar deviasi (SD). Analisa perbandingan nilai rata-rata dilakukan dengan uji t saling bebas dan ANOVA ($p < 0,05$) menggunakan program SPSS 14. Uji lanjutan adalah uji Uji Tukey untuk menentukan tingkat perbedaan yang signifikan dari penggunaan pelarut ekstraksi.

3.3 Hasil dan Pembahasan

3.3.1 Aktivitas Antikanker

Secara tradisional, daun sirsak telah digunakan sebagai obat antikanker. Berbagai aktivitas antikanker telah diuji baik secara *in vitro*, *in vivo*, maupun uji klinis. Hasil pengujian aktivitas antikanker secara *in vitro* dengan sel MCF7 (sel lestari kanker payudara) menunjukkan nilai IC_{50} yang berbeda pada setiap ekstrak dengan pelarut berbeda (Gambar 6). Ekstrak etanol p.a memberikan nilai IC_{50} terendah (22 $\mu\text{g/mL}$), sedangkan ekstrak etanol 30% menunjukkan nilai IC_{50} tertinggi (1713 $\mu\text{g/mL}$). Hasil ini mengungkapkan kelima ekstrak memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan dengan doksorubisin sebagai kontrol positif (IC_{50} di bawah 0,625 $\mu\text{g/mL}$). Berdasarkan nilai IC_{50} dari lima ekstrak, ekstrak etanol p.a dapat menghambat viabilitas sel MCF-7 tertinggi, diikuti etanol 50%, 80%, air, dan etanol 30%, secara berurutan. Nilai IC_{50} yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dari penelitian sebelumnya, yaitu 5,3 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etanol p.a (Hadisaputri *et al.* 2021), dan 220 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak air (Mariam *et al.* 2018). Dalam studi lain, nilai IC_{50} ekstrak etanol dan air yang dihasilkan berturut-turut 14 dan 538 $\mu\text{g/mL}$ (Endrini *et al.* 2014). Penelitian terkait penggunaan campuran etanol dan air sebagai pelarut pada daun sirsak belum dilaporkan aktivitas antikankernya.



Gambar 6 Aktivitas antikanker ekstrak daun sirsak ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nilai rata-rata merupakan hasil dari lima kali ulangan dan huruf-huruf yang mengikutinya tidak berbeda dengan uji Tukey ($p > 0,05$)

Hasil uji nyata (uji Tukey) pada ekstrak daun menunjukkan jenis pelarut berpengaruh signifikan pada aktivitas antikanker ($p > 0,05$). Berdasarkan nilai IC_{50} di bawah $200 \mu\text{g/mL}$, pelarut etanol p.a, etanol 80%, dan etanol 50% dapat digolongkan sebagai grup aktif menghambat viabilitas sel kanker (Chothiphirat *et al.* 2019). Sebaliknya, ekstrak etanol 30% dan air menunjukkan nilai IC_{50} di atas $200 \mu\text{g/mL}$ sehingga dapat disimpulkan tidak aktif sebagai antikanker. Namun, hasil yang menarik adalah ekstrak air lebih mampu menghambat sel kanker dibandingkan dengan etanol 30%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diasumsikan bahwa ekstrak air lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar dibandingkan dengan terdapat senyawa sangat polar yang memengaruhi sel MCF-7. Polaritas pelarut yang digunakan dalam penelitian ini dipengaruhi oleh tingginya konsentrasi air yang terkandung dalam etanol. Semakin banyak air yang terkandung di dalamnya, semakin tinggi polaritasnya dibandingkan dengan etanol absolut (Hikmawanti *et al.* 2021). Ekstraksi menggunakan pelarut yang berbeda menunjukkan perbedaan bioaktivitas. Pelarut ekstraksi yang lebih polar menghasilkan nilai IC_{50} lebih besar, yang berarti aktivitasnya menurun.

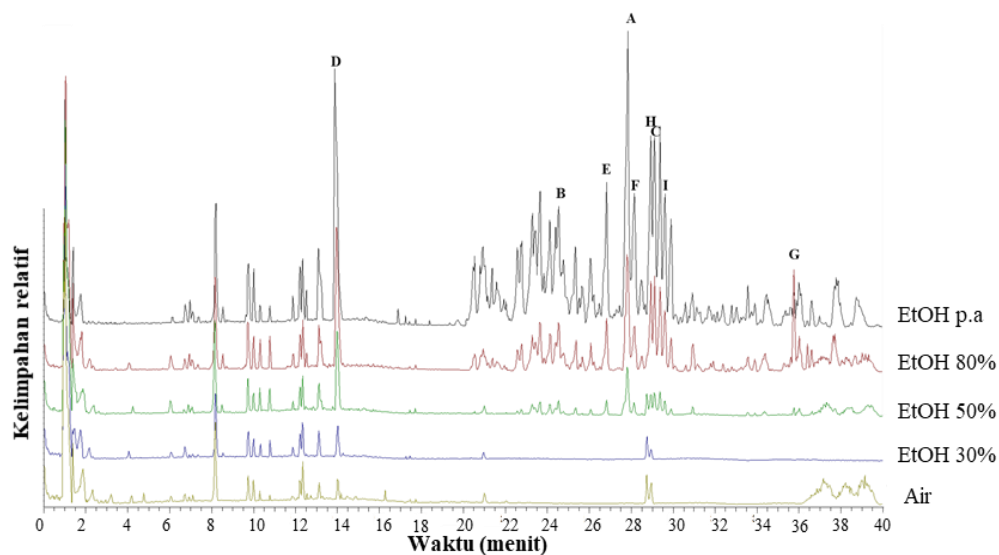
3.3.2 Profiling metabolit

Metabolit dalam ekstrak diprofilkan dengan UHPLC Q-Orbitrap HRMS menggunakan kolom fase terbalik C18 untuk mendapatkan pemisahan yang baik. Teknik ini merupakan salah satu teknik metabolomik guna memperoleh informasi kandungan metabolit dalam sampel. Hasil kromatogram *base peak* mode ionisasi positif menunjukkan bahwa pola yang dihasilkan berbeda untuk berbagai ekstrak (Gambar 7). Pola pelarut etanol p.a, 80%, dan 50% secara nyata lebih banyak menghasilkan puncak daripada ekstrak etanol 30% dan air, yang mengindikasikan bahwa keragaman metabolit lebih banyak terdapat pada ekstrak etanol daripada ekstrak air. Pada puncak menit ke-14, semakin besar tingkat konsentrasi etanol menunjukkan semakin tinggi puncak. Penggunaan pelarut memengaruhi level konsentrasi senyawa yang terekstraksi. Kesamaan pola untuk semua ekstrak ditunjukkan pada waktu retensi 0–20 menit; perbedaan hanya pada ketinggian puncak. Pola tersebut menunjukkan bahwa senyawa polar terdapat pada semua ekstrak. Ekstrak etanol p.a, 80%, dan 50% menunjukkan pola kromatogram yang sama pada waktu retensi 20–40 menit, yaitu puncak kompleks. Oleh karena gradien fase gerak berkisar antara 2% dan 95% asetonitril, berarti sebagian besar senyawa yang diperoleh bersifat semi-polar.

Metode metabolomik *untargeted* digunakan untuk mengkarakterisasi setiap ekstrak daun sirih dan mengidentifikasi senyawa bioaktif. Profil metabolit dengan menggunakan UHPLC Q-Orbitrap HRMS menunjukkan keberadaan 35 senyawa dalam ekstrak (Tabel 2 dan Lampiran 1). Semua senyawa diidentifikasi dengan teknik *full scan*, dan data diolah menggunakan peranti lunak Compound Discoverer 3.2. Tahapan seleksi spektrum, deteksi senyawa, *alignment*, dan prediksi formula molekul digunakan dalam pengolahan data. Selain itu, identifikasi senyawa ditentukan dengan mengonfirmasi MS1 berdasarkan *in-house* database dan pola fragmentasi MS2 berdasarkan literatur. Nilai massa akurat kemudian dipilih untuk massa formula molekul yang cocok dengan galat massa di bawah 5 ppm. Enam belas senyawa

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

berhasil diidentifikasi sebagai golongan asetogenin, 14 termasuk dalam golongan alkaloid, dan 5 termasuk dalam golongan flavonoid. Kehadiran ion m/z yang terkait dengan alkaloid, flavonoid, dan asetogenin dikonfirmasi dalam analisis pola fragmentasi dengan mode ionisasi positif. Alkaloid aporfin diidentifikasi dengan hilangnya CH_3OH diikuti oleh CO pada gugus hidroksil dan metoksi (Huang *et al.* 2019). Keberadaan gugus asetogenin terdeteksi dengan ciri pola fragmentasi $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-$



Gambar 7 Profil kromatogram puncak ekstrak daun sirsak dengan etanol p.a (hitam), etanol 80% (merah), etanol 50% (hijau), etanol 30% (biru), dan air (kuning) dalam mode ionisasi positif. Notasi tersebut menunjukkan informasi tentang senyawa potensial antikanker

$3\text{H}_2\text{O}]^+$, dan $[\text{M}+\text{H}-4\text{H}_2\text{O}]^+$ (Avula *et al.* 2018). Untuk kelompok flavonoid, beberapa penelitian mempresentasikan hasil analisis MS/MS dari aglikon flavonoid, tetapi tidak cukup untuk mengidentifikasi subkelompok senyawa yang diperiksa. Kehilangan molekul kecil dan/atau radikal dari ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, seperti kehilangan 18 Da (H_2O), 28 Da (CO), 42 Da (CH_2CO) biasanya diamati (Tsimogiannis *et al.* 2007).

Alkaloid dan flavonoid diidentifikasi pada waktu retensi (t_R) 7–16 menit. Koklaurin (1), metilkoklaurin (2), stefarin (3), (*S*)-norkoridin (5), reticulin (6), isokoridin (7), asimilobin (8), anolobin (9), magnoflorin (10), nornusiferin (11), annonain (12), xilopin (13), aterospermidin (15), dan aterosperminin (18) adalah alkaloid yang terdeteksi dalam ekstrak daun sirsak. Alkaloid diketahui bermanfaat merangsang sistem syaraf, meningkatkan tekanan darah, dan melawan infeksi mikroba (Nugraha *et al.* 2019). Asetogenin memiliki struktur kimia rantai panjang, tetapi beberapa ikatan rangkap dan lakton membuatnya sedikit polar dibandingkan dengan alkaloid dan flavonoid; sehingga asetogenin terdeteksi pada akhir proses elusi (t_R 20–40 menit). Selain itu, kelompok asetogenin menunjukkan aktivitas hayati dan dapat memberikan efek sitotoksik

pada berbagai jenis sel kanker (Hernández-Fuentes *et al.* 2019; Jacobo-Herrera *et al.* 2019; Ma *et al.* 2019; Shi *et al.* 2020).

Tabel 2 Profil metabolit yang berhasil terkonfirmasi pada berbagai pelarut dari ekstrak daun sirsak

No	MW teoritis	tR [min]	Error (ppm)	Formula	MS2	Senyawa	Golongan
1	285,1359	7,052	-1,99	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	269, 254, 175, 143, 107	Koklaurin	Alkaloid
2	299,1515	7,173	-2,08	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	276	Metilkoklaurin	Alkaloid
3	297,1359	7,223	-2,17	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	281, 250, 249	Stefarin	Alkaloid
4	290,0785	7,365	-2,01	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291, 273	Katekin	Flavonoid
5	327,1462	7,482	-2,53	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	297, 265, 178, 151	(S)-norkoridin	Alkaloid
6	329,1618	8,294	-2,68	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	192, 177, 148	Retikulin	Alkaloid
7	341,1621	9,503	-1,81	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	311, 296, 279, 265	Isokoridin	Alkaloid
8	267,1254	9,848	-2,09	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	251, 219, 191	Asimilobin	Alkaloid
9	281,1046	10,858	-2,19	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	265	Anolobin	Alkaloid
10	341,162	11,97	-2,16	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	297, 282, 265, 237, 222, 219, 191, 165	Magnoflorin	Alkaloid
11	281,141	13,193	-2,23	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	251, 236, 219, 191	Nornusiferin	Alkaloid
12	265,1098	13,29	-1,89	C ₁₇ H ₁₅ NO ₂	249, 234, 219, 191	Annonain	Alkaloid
13	295,1201	14,023	-2,56	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	281, 249, 221, 206	Xilopina	Alkaloid
14	302,0419	14,716	-2,43	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303, 257	Kuersetin	Flavonoid
15	305,0683	15,485	-1,72	C ₁₈ H ₁₁ NO ₄	291, 263, 251, 235	Aterospermidin	Alkaloid
16	286,047	15,767	-2,64	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287,	Luteolin	Flavonoid
17	286,047	16,167	-2,59	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287, 288, 289	Fisetin	Flavonoid
18	309,1723	16,265	-3,08	C ₂₀ H ₂₃ NO ₂	249, 265, 310	Aterosperminin	Alkaloid
19	286,047	16,359	-2,51	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287, 285, 257, 151	Kaempferol	Flavonoid
21	640,4902	27,033	-1,99	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	569, 551	Montanasin A	Asetogenin
22	638,475	27,569	-1,21	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	621, 603, 585, 567, 549, 531	Bullatanosin	Asetogenin
23	596,4636	27,908	-2,69	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	418, 519, 561, 579,	Annoretikuin	Asetogenin
24	622,4782	28,841	-4,27	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	605, 587, 569, 551, 533, 523	Motrilin	Asetogenin

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

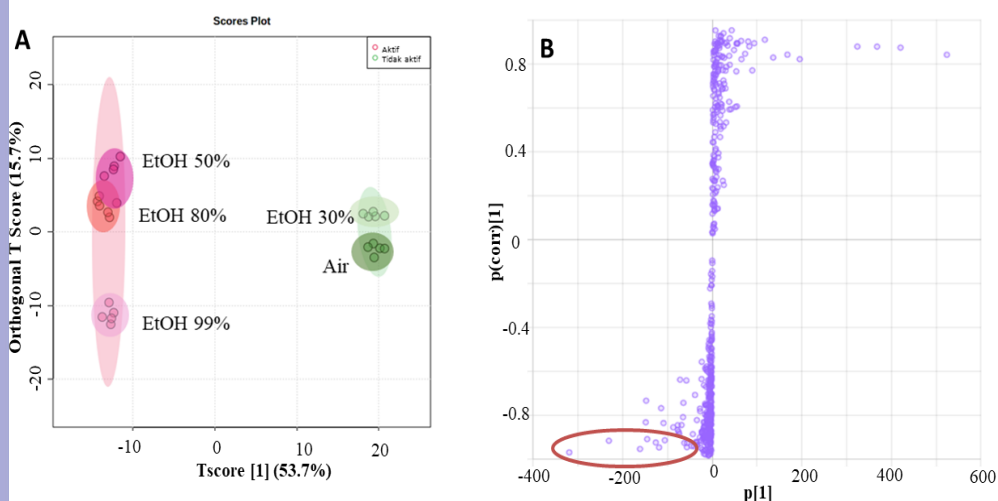
Tabel 2 Profil metabolit yang berhasil terkonfirmasi pada berbagai pelarut dari ekstrak daun sirsak (*lanjutan*)

No	MW teoritis	tR [min]	Error (ppm)	Formula	MS2	Senyawa	Golongan
25	596,4636	29,209	-2,62	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	579, 561, 543, 525, 507	Skuadiolin C	Asetogenin
26	596,4637	29,707	-2,52	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	579, 561, 543, 525, 507	Annonasin	Asetogenin
27	596,4637	29,993	-2,51	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	579, 561, 543, 525, 507	Glausafilin	Asetogenin
28	580,4689	30,18	-2,45	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	563, 545, 527, 509	Murisolin	Asetogenin
29	624,4946	30,632	-3,02	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	607, 589, 571, 535	Annomontasin	Asetogenin
30	622,4789	30,962	-3,09	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	605, 587, 569, 551, 533	Skuamosin	Asetogenin
31	622,4792	31,549	-2,65	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	605, 587, 569, 551, 533	Bullatasin	Asetogenin
32	624,4947	31,778	-2,93	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	607, 589, 509, 407, 307	<i>cis</i> -Annomontasin	Asetogenin
33	624,4946	32,091	-1,9	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	625	Xylomatisin	Asetogenin
34	580,4688	33,214	-2,61	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	563, 545, 527, 509	Longifolisin	Asetogenin
35	530,4687	39,221	-2,18	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	513, 471, 251, 151	Epoksimurin A	Asetogenin

3.3.3 Prediksi senyawa antikanker menggunakan OPLS-DA

Informasi dari pendekatan metabolomik yang telah diperoleh lebih lanjut dikombinasikan dengan kemometrik untuk menganalisis perbedaan profil dari informasi aktivitas biologis, yaitu aktivitas antikanker. Penggunaan analisis OPLS-DA pada data UHPLC Q-Orbitrap HRMS dimaksudkan untuk mengevaluasi senyawa yang berperan dalam aktivitas antikanker. Platform yang digunakan adalah metode *supervised* menggunakan informasi bobot molekul dan area senyawa (data LC-HRMS) dengan respons aktivitas antikanker (aktif dan non-aktif). Hasil analisis OPLS-DA menunjukkan bahwa kedua kelompok dapat dipisahkan sesuai kelompoknya masing-masing pada plot skor OPLS-DA (Gambar 8A). Kuadran kiri didominasi oleh ekstrak etanol p.a, 80%, dan 50% yang termasuk aktif sebagai antikanker, sedangkan kuadran kanan terdiri atas ekstrak etanol 30% dan ekstrak air yang cenderung tidak aktif. Hasil ini menunjukkan kemampuan prediksi model OPLS-DA untuk membedakan antara kelompok dalam ekstrak. Selanjutnya, evaluasi model diperlukan untuk mengetahui ada tidaknya korelasi karena jumlah sampel terbatas dengan banyak variabel (Aziz *et al.* 2021). Kualitas model dinilai berdasarkan *goodness of fit* dan variasi pada variabel X (R²X) dan Y (R²Y), dan skor prediktabilitas (Q²), sehingga menegaskan bahwa model tersebut

efektif dengan akurasi yang dapat diprediksi (Silva *et al.* 2021). OPLS-DA loading S-plot menunjukkan kovarians dan korelasi profil pembebanan kedua kelompok yang diwakili oleh nilai m/z . Melalui *preprocessing sample normalization by sum*, model ini menghasilkan $R^2 = 0,875$ ($R^2Xcum = 0,812$, $R^2Ycum = 0,997$) dan $Q^2 = 0,870$, yang menunjukkan kesesuaiannya untuk membedakan antara metabolit aktif dan tidak aktif. Model mengadopsi kriteria keberhasilan $R^2 > 0,7$ dan $Q^2 > 0,4$.



Gambar 8 *Score plot* dari model OPLS-DA untuk group aktif (merah) dan tidak aktif (hijau) pada ekstrak daun sirsak. *Score plot* OPLS-DA dapat menunjukkan pengelompokan yang baik untuk kedua group. (B) S-plot dalam penentuan senyawa penduga terhadap group aktif

Metabolit yang signifikan secara statistik menjadi sasaran analisis OPLS-DA untuk mengidentifikasi metabolit yang membedakan senyawa aktif dari yang lain. Berdasarkan pola S-plot (Gambar 8B), informasi nilai negatif dari $p[1]$ kemudian dikembangkan untuk menentukan MW yang berkontribusi besar pada aktivitas antikankernya. Sembilan metabolit berhasil dipertimbangkan sebagai biomarker antikanker karena memenuhi kriteria ($p < 0,05$ dikoreksi untuk FDR, $VIP > 1$, dan *fold change* $> 1,5$) (Tabel 3) (Subramani *et al.* 2022). *Variable importance of projection* (VIP) mencerminkan bobot pemuatan untuk setiap variabel bobot molekul dan variabilitas respons yang dijelaskan oleh nilai ini. *Fold change* merupakan ukuran yang menggambarkan perubahan kuantitas antara pengukuran asli dan pengukuran berikutnya.

Tiga metabolit telah diidentifikasi dalam sampel tetapi enam lainnya belum teridentifikasi. Prediktor paling aktif sebagai antikanker adalah **senyawa A** dengan BM 596,4636 (tR 27,908 menit dan rumus $C_{35}H_{64}O_7$), diidentifikasi sebagai annoretikuin. Sejalan dengan penelitian ini, annoretikuin menunjukkan aktivitas sitotoksitas terhadap sel karsinoma hepatoma pada manusia (Hep G2) (Ragasa *et al.* 2012). Penambatan molekul annoretikuin pada protein *Murine Double Minute 2* (MDM2) dan T-Box transcriptional factor-5 (TBX5) juga membuktikan potensi antikanker (Ravi *et al.* 2015). Skuadiolin C (**senyawa C**) dengan bobot molekul yang sama dengan annoretikuin juga

diduga memiliki aktivitas antikanker. Skuadiolin C adalah asetogenin tipe mono-tetrahidrofuran. Berbeda dengan annoretikuin, belum ada informasi tentang aktivitas antikanker skuadiolin C. Selanjutnya, senyawa yang diprediksi sebagai antikanker adalah xilopin (**senyawa D**). Xilopin telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker dan memberikan IC₅₀ sebesar 12 μ M dalam menghambat viabilitas sel MCF7 (Santos *et al.* 2017).

Tabel 3 Informasi lengkap tentang potensi biomarker antikanker dari ekstrak daun sirsak dengan model OPLS-DA

	BM	tR	Rumus	VIP	Fold change	Nilai p	FDR	Koef Y	Senyawa dugaan
A	596,464	27,91	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	1,32	27,93	5,6E-16	3,9E-14	-1,8E-07	Annoretikuin
B	612,459	24,57	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	1,25	25,62	1,7E-10	1,5E-09	-4,7E-10	Tidak terdeteksi
C	596,464	29,21	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	1,30	49,78	2,8E-13	7,2E-12	-7,6E-08	Skuadiolin C
D	295,120	14,02	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	1,26	2,15	4,6E-11	5,4E-10	-4,3E-08	Xilopin
E	596,464	26,91	C ₃₆ H ₆₀ N ₄ O ₃	1,29	34,61	1,2E-12	2,5E-11	-1,8E-08	Tidak terdeteksi
F	596,464	28,24	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	1,25	50,24	2,3E-10	2,0E-09	-2,2E-09	Tidak terdeteksi
G	560,443	36,15	C ₃₅ H ₆₀ O ₅	1,26	35,83	1,0E-10	1,0E-09	-1,0E-08	Tidak terdeteksi
H	616,429	29,00	C ₃₂ H ₆₀ N ₂ O ₉	1,29	21,59	1,3E-12	2,7E-11	-6,8E-08	Tidak terdeteksi
I	618,445	29,60	C ₃₂ H ₆₂ N ₂ O ₉	1,26	19,30	2,4E-11	3,3E-10	-7,0E-08	Tidak terdeteksi

Biomarker dipilih berdasarkan persyaratan hasil uji-*t* (koreksi FDR; $p < 0,05$), *fold change* ($< 0,6 - > 1,5$) dan VIP (> 1). Potensinya sebagai biomarker antikanker dipilih berdasarkan pengaruhnya pada pengelompokan aktif sebagai antikanker pada *loading plot*.

Enam senyawa dugaan yang belum teridentifikasi berada pada *tR* 24,54–36,13 menit. Berdasarkan waktu retensinya, keenam senyawa dapat diduga merupakan golongan asetogenin. Dugaan golongan asetogenin pada **senyawa B** (*tR* 24,54 menit dan rumus C₃₅H₆₄O₈) adalah berdasarkan keberadaan fragmen *m/z* 541, khas cincin lakton ([M-112Da+Na]⁺), dan jumlah gugus hidroksil pada rantai alkil ([M-xH₂O+H]⁺) (Lampiran 2). Beberapa senyawa dugaan adalah murikatosin A, annopentosin A, annopentosin B, annopentosin C, murikapentosin, murikatalin, murikatin A, dan muricatin B. **Senyawa G** BM 560,4427 (*tR* 36,13 menit dan rumus C₃₅H₆₀O₅), menunjukkan pola MS2 dari keberadaan *m/z* 583 yang menunjukkan [M+Na]⁺. Kemunculan puncak *m/z* 535 diduga karena kehilangan C₂H₂, yakni ikatan rangkap dalam struktur. **Senyawa F** (BM 596,4637) memiliki pola yang mendekati dengan senyawa skuadiolin C, yakni keberadaan *m/z* 543 dan 525. Selain itu senyawa **F** mengindikasikan *m/z* 544 dan 526, tetapi senyawa ini belum dapat teridentifikasi lebih jelas. Terdapat kemungkinan beberapa senyawa asetogenin tetapi belum dapat diprediksi dengan tepat berdasarkan pola MS2-nya. Hal yang sama terdapat pada **senyawa E** yang juga memiliki bobot molekul yang sama tetapi pola yang dihasilkan berbeda, yakni *m/z* 525 [M+H-2H₂O]⁺ dan *m/z* 465 [M+H-2H₂O-60]⁺. Selanjutnya, prediksi rumus **senyawa H** dengan C₃₂H₆₀N₂O₉ menunjukkan pola fragmentasi [M+H-240]⁺,

tetapi senyawa ini juga belum dapat diidentifikasi dan belum pernah dilaporkan dalam kajian sebelumnya. Hal yang sama terjadi pada **senyawa I** ($C_{32}H_{62}N_2O_9$), yang menghasilkan fragmentasi m/z 531 dengan kehilangan 88 Da, dan dilanjutkan kehilangan 165 Da.

3.3.4 Evaluasi senyawa secara *in silico*

Senyawa prediksi antikanker yang telah teridentifikasi dievaluasi dengan uji *in silico* menggunakan Vina Autodock pada PyRx. Tiga senyawa (xilopin, skuadiolin C, dan annoretikuin) ditambahkan pada makromolekul target antikanker reseptor estrogen alfa (3ERT). Gambar 9 memperlihatkan interaksi antara makromolekul dan ligan (tiga senyawa yang teridentifikasi dan doksorubisin). Interaksi pada setiap ligan berada pada posisi yang sama dengan protein 3ERT. Lebih lanjut interaksi ligan pada tapak aktif reseptor, kemudian konformasi diurutkan berdasarkan fungsi penilaian afinitas dan interaksi hidrogen dan hidrofobik.

Hasil *in silico* menggambarkan terjadinya interaksi antara dua senyawa yang dinilai berdasarkan energi ikatan atau energi bebas Gibbs untuk menilai kestabilan kompleks yang terbentuk (Meng *et al.* 2011). Semakin negatif energi bebas Gibbs yang dihasilkan, reaksi berlangsung semakin spontan. Berdasarkan Tabel 4, ketiga ligan dari senyawa uji memiliki energi ikatan lebih rendah daripada ligan standar makromolekul, yaitu 4-hidroksi-tamoksifen ($-9,5$ kkal/mol). Hal ini mengindikasikan bahwa ketiga senyawa berpotensi dalam berikatan dengan tapak aktif 3-ERT seperti dari ligan standarnya, tetapi tetap mampu berikatan. Hasil menarik adalah bahwa ketiga senyawa mendekati nilai afinitas pengikatan dengan doksorubisin sebagai obat referensi ($-7,4$ kkal/mol). Penambatan protein 3ERT dengan annoretikuin dan xilopina memiliki kesamaan jumlah interaksi ikatan hidrogen sebanyak 1 ikatan. Jumlah interaksi yang lebih banyak adalah kompleks protein 3ERT dengan skuadiolin C, yakni 3 interaksi. Dua di antaranya memiliki kesamaan dengan 4 hidroksitamoksifen, yaitu Asp351 dan Glu353. Perbedaan jumlah residu asam amino yang berinteraksi menjadi salah satu yang memengaruhi nilai ikatan afinitas atau energi bebas Gibbs (ΔG). Jika diamati, skuadiolin C memiliki nilai afinitas ikatan lebih rendah. Hasil ini sesuai karena semakin banyak jumlah ikatan hidrogen semakin baik afinitasnya, ditunjukkan dengan nilai ΔG semakin negatif (Prasetiawati *et al.* 2021). Oleh karena itu, analisis *in silico* menegaskan temuan studi metabolomik yang diharapkan efektif sebagai antikanker, dengan skuadiolin C lebih aktif dibandingkan annoretikuin dan xilopina.

@Hak cipta milik IPB University

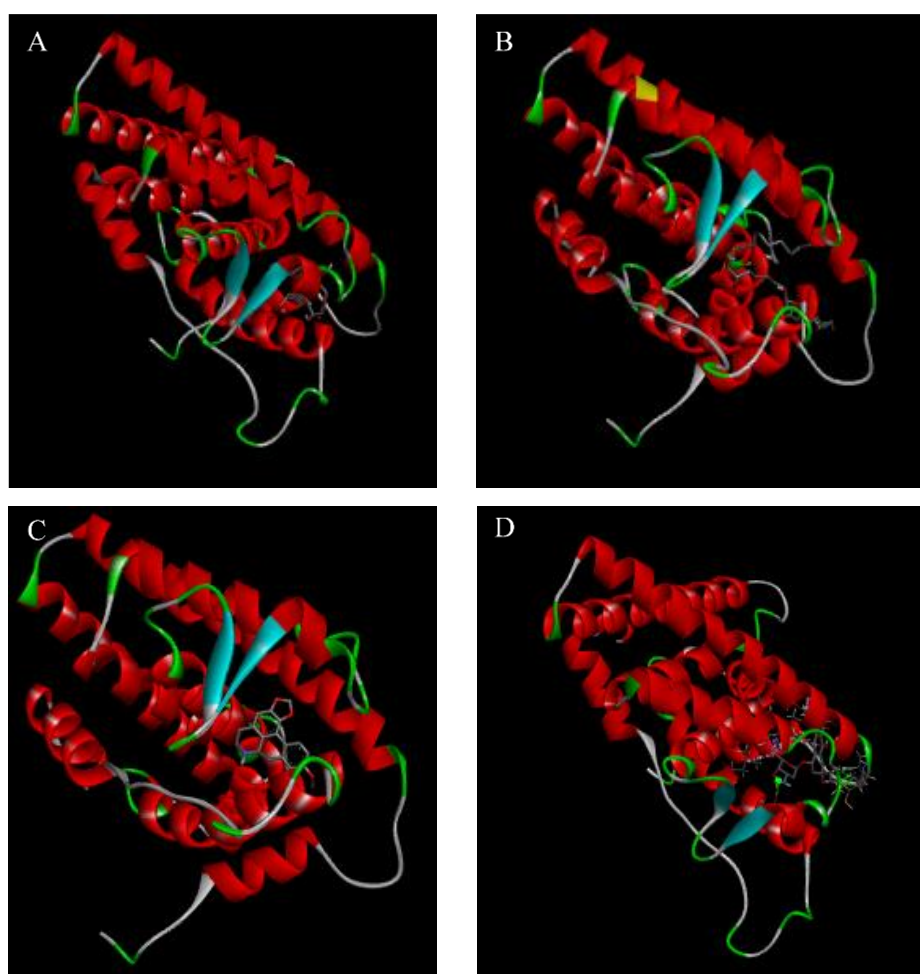
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 9 Kajian penambatan: interaksi protein 3ERT dengan molekul ligan. (A) annonaretikuin (B), skuadiolin C, (C) xilopina, dan (D) doksorubisin

Tabel 4 Afinitas pengikatan dan residu asam amino yang berasosiasi dengan ketiga senyawa dugaan

No	Senyawa dugaan	Afinitas ikatan (kkal/mol)	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
1	Annoretikuin	-7,4	Asp351	Leu536; Leu525; Trp383; Leu354; Leu384; Ala350; Met421; Leu387; Met388; Leu346; Leu349; Leu391; Leu428; Phe404
2	Skuadiolin C	-7,5	Thr347; Glu353; Arg394	Val533; Cys530; Lys529 Leu525; Met388; Met421; Leu428; Leu387; Leu391
3	Xilopina	-7,4	Glu353	Met421; Leu428; Ala350; Leu391; Met388; Leu525; Leu346
4	Doksorubisin	-7,4	Asp351; Cys530	Leu354; Met522; Leu536
5	4 OHT	-9,5	Glu353; Arg394	Met421; Met388; Ile424; Leu428; Leu391; Leu525; Ala350; Leu387

3.4 Simpulan

Kajian ini adalah yang pertama dalam karakterisasi metabolomik komponen bioaktif yang relevan dari ekstrak daun sirsak menggunakan berbagai konsentrasi etanol. Ekstrak etanol p.a., 80%, dan 50% dapat menghambat viabilitas sel MCF-7; dengan demikian ekstrak ini paling potensial sebagai sumber antikanker. Untuk menyimpulkan senyawa bioaktif antikanker, telah dikaji hubungan antara aktivitas dan teknik metabolomik taktarget berbasis MS. Untuk sementara, telah teridentifikasi 35 senyawa dalam ekstrak sebagai alkaloid, flavonoid, dan asetogenin. Pendekatan metabolik dan kemometrik pada data UHPLC Q-Orbitrap HRMS dan aktivitas antikanker menampilkan annoretikuin, skuadiolin C, dan xilopina yang diduga merupakan senyawa antikanker aktif. Evaluasi biomarker dengan studi *in silico* membuktikan bahwa nilai afinitas pengikatannya mirip dengan doksorubisin sebagai obat referensi. Penelitian ini menemukan enam metabolit yang belum diketahui yang diperkirakan aktif sebagai antikanker. Dengan demikian, metabolomik dapat mendeteksi senyawa biomarker antikanker dalam ekstrak etanol daun sirsak.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

IV EVALUASI FRAKSI AKTIF ANTIKANKER DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK

4.1 Pendahuluan

Kanker dianggap sebagai sindrom metabolik yang terparah, diperkirakan 7,6 juta kematian (~13% dari semua kematian) di seluruh dunia dan diperkirakan akan meningkat hingga 13,1 juta pada tahun 2030 (WHO Cancer fact sheet 2017). Meskipun terjadi kemajuan luar biasa dalam penelitian kanker, masalah utama dengan obat yang tersedia untuk pencegahan kanker sangat mahal dengan efek samping jangka panjang. Telah ada minat dalam mengidentifikasi agen kemoterapi yang lebih baru atau efisien dengan efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan obat yang tersedia. Studi mengungkapkan bahwa ekstrak tumbuhan lebih aman, hemat biaya, dan lebih efisien untuk mengobati kanker dibandingkan dengan kemoterapi (Pezzuto 1997; Wu *et al.* 2002). Tanaman obat telah dianggap sebagai salah satu sumber penting dan dapat diandalkan untuk menemukan agen terapeutik yang menjanjikan dalam sejumlah kasus, termasuk obat kemo-preventif kanker (Cragg dan Newman 2009). Sekitar 55% obat kemoterapi baru-baru ini dilaporkan berasal dari tanaman atau obat tradisional (Newman dan Cragg, 2012).

Tumbuhan sirsak mulai dari bagian buah, biji, daun, akar, dan bahkan kulit telah banyak dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi penting untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya antikanker. Sampel ekstrak kasar daun sirsak menunjukkan tingkat sitotoksitas yang berbeda terhadap sel lestari kanker payudara. Ekstrak daun sirsak yang dipilih terbukti mengurangi ukuran dan bobot tumor (Syed-Najmuddin *et al.* 2016). Senyawa bioaktif golongan asetogenin yang menginduksi sitotoksitas dengan menghambat kompleks I mitokondria yang terlibat dalam sintesis ATP. Asetogenin masuk dan menempel di reseptor dinding sel dan merusak ATP di dinding mitokondria, sehingga energi di dalam sel kanker pun berhenti dan akhirnya sel kanker mati (Yajid *et al.* 2018). Oleh karena itu tumbuhan sirsak digunakan sebagai terapi sitotoksik. Mempertimbangkan potensi terapeutik yang luas dari spesies ini, maka pembuktian senyawa bioaktif dari tumbuhan sirsak perlu dilakukan.

Dalam bab sebelumnya telah dilaporkan efek antikanker dari ekstrak daun sirsak terhadap sel kanker payudara MCF7. Telah ditunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis sel MCF7. Sebagai kelanjutan dari studi sebelumnya, penelitian evaluasi ini dirancang dalam dua tahap. Tahap pertama adalah untuk mengembangkan sidik jari kimia melalui UHPLC-HRMS untuk mengidentifikasi keberadaan konstituen fitokimia tertentu yang terlibat sebagai antikanker dari informasi pendekatan metabolomik. Tahap kedua, untuk mengevaluasi dan memastikan klaim senyawa dugaan dari hasil analisis metabolomik sebagai antikanker dengan memeriksa sitotoksitas, selektivitas dan kerentanan ekstrak etanol dan fraksi dari daun sirsak yang dipandu aktivitasnya terhadap sel kanker payudara (MCF-7). Percobaan dilakukan dengan fraksionasi ekstrak etanol untuk mendapatkan fraksi bioaktif. Fraksi tersebut selanjutnya dievaluasi berkaitan dengan penghambatan siklus sel dan sifat menginduksi apoptosis terhadap garis sel kanker payudara MCF7.

4.2 Metode

4.2.1 Bahan Kimia

Pelarut yang digunakan etanol (Merck, Jerman). Asetonitril yang digunakan untuk kromatografi kilas adalah HPLC grade LC (Merck, Jerman). Silika gel (Merck, Jerman) digunakan sebagai penjerap ekstrak dalam teknis kromatografi tersebut.

4.2.2 Ekstraksi tanaman

Sebanyak 10 g simpisia kering daun sirsak dimaserasi dengan 100 mL etanol p.a. selama 24 jam. Sampel disaring dan filtrat ditampung. Sampel direndam kembali dengan etanol p.a. dan diulang 2 kali. Filtrat selanjutnya dikumpulkan dan diuapkan sampai kering di bawah tekanan rendah.

4.2.3 Fraksionasi dengan partisi cair-cair

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol p.a. daun sirsak dilarutkan dalam 100 ml etanol p.a dan dituangkan dalam corong pisah. Sebanyak 100 ml pelarut heksana ditambahkan, dikocok, dan didiamkan hingga terbentuk dua fase. Fase organik ditampung. Pelarut heksana ditambahkan kembali dan dilakukan prosedur yang sama sebanyak 2 ulangan. Fraksi organik digabungkan menjadi fraksi heksana. Selanjutnya, sebanyak 100 mL pelarut etil asetat ditambahkan dan dilakukan prosedur yang sama hingga didapatkan fraksi etil asetat. Fraksi akhir disebut sebagai fraksi etanol.

4.2.4 Fraksionasi dengan kromatografi kilas

Pada 0,5 g ekstrak etanol p.a. daun sirsak ditambahkan 2 g silica (Merck, Jerman) dan pelarut etanol. Campuran selanjutnya dievaporasi hingga kering. Pemisahan preparatif dilakukan pada sistem kromatografi Sepacore® (Büchi Labortechnik, Flawil, Swiss) yang terdiri atas dua modul pompa C 605, unit kontrol C 620, detektor UV C 635 dan pengumpul fraksi C 660. Sistem dikendalikan oleh perangkat lunak SepacoreControl 1.0. Senyawa dipisahkan pada kolom Ecoflax C18 50µm, *irregular* 4 g. Panjang gelombang UV yang digunakan 220 nm, 254 nm, 280 nm, dan 320 nm. Fase gerak yang digunakan adalah air (A) dan asetonitril (B) dengan 5–30 %B dari menit 0–25 menit, 25–30 menit 30–55 %B, 30–65 menit 55–95 %B, dan 65–70 menit 95%B dengan laju alir 10 mL/menit.

4.2.5 Analisis UHPLC- Q-Orbitrap HRMS

Metabolit dalam fraksi dari pemisahan diprofilkan menggunakan sistem kromatografi UHPLC Vanquish tandem mass spektrometri Q Exactive Plus Orbitrap HRMS. Pemisahan pada UHPLC menggunakan kolom Accucore C18, 100 × 2,1 µm, dengan ukuran partikel 1,5 µm (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) dan diatur suhu kolom 30 °C. Fase gerak yang digunakan adalah asam format 0,1% dalam air (A) dan asam format 0,1% dalam asetonitril (B). Sistem gradien yang digunakan adalah sebagai berikut: menit 0–12,5 (5–30% B); menit 12,5–15 (30–55% B); menit 15–33 (55–95% B); menit 33–38 (95% B), dan menit 38–40 (5% B). Pengaturan sistem MS1 yang digunakan adalah m/z 100–1000 (*mass range*), resolusi 70.000, dan AGC target 1×10^5 ,

sedangkan pengaturan MS2 adalah resolusi 17.500, AGC target 1×10^5 , (N)CE 18, 35, dan 53. Analisis dilakukan pada mode ionisasi positif, laju alir *sheath gas* 35, *aux gas* 15, *sweep gas* 0, *spray voltage* 3,8 KV, suhu kapiler 320 °C, S-lens RF level 50, dan *aux gas heater* 38 °C. Fraksi yang mengandung senyawa target selanjutnya dihilangkan pelarutnya dengan penguap putar.

4.2.6 Uji antikanker secara *in vitro*

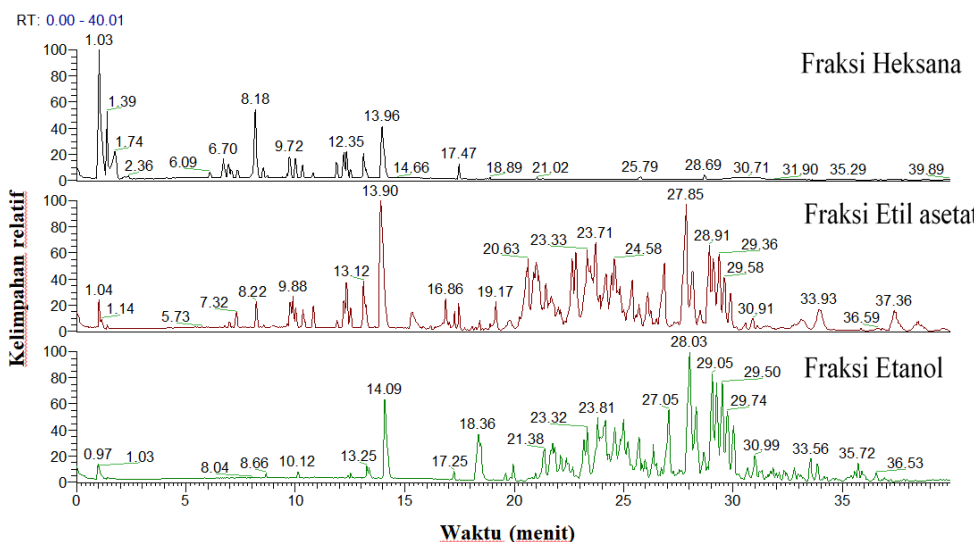
Aktivitas antikanker dari fraksi yang dihasilkan diuji dengan metode 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) terhadap sel MCF-7 (ATCC HTB 22) dengan media penumbuh RPMI 1640, *fetal bovine serum* (FBS) 5%, penisillin 100 U/mL, dan streptomisin 100 µg/mL. Ekstrak daun dilarutkan dalam DMSO dan media penumbuh untuk dijadikan larutan stok 10000 µg/mL. Sampel dibuat dengan berbagai tingkat konsentrasi. Sebanyak 10 µL MTT (5 mg/mL dalam PBS) ditambahkan ke setiap sumur dan diinkubasi selama 48 jam (37 °C), dan selanjutnya absorbans dibaca pada 550 nm. Nilai absorbans yang diperoleh dihitung persen inhibisinya.

4.3 Hasil dan Pembahasan

Pada studi sebelumnya terbukti bahwa ekstrak etanol berpotensi sebagai antikanker tertinggi dan telah diprediksi senyawa aktifnya dengan pendekatan metabolomik. Pengujian selanjutnya ialah mengevaluasi prediksi senyawa target antikanker. Pada tahap ini, proses isolasi untuk mendapatkan senyawa target tidak dilakukan sehingga evaluasi berdasarkan fraksi yang diduga mengandung senyawa tersebut. Dua teknik fraksionasi dilakukan, yaitu fraksi partisi cair-cair dan kromatografi kilas.

4.3.1 LC-HRMS untuk identifikasi fraksi partisi cair-cair ekstrak etanol daun sirsak

Kromatogram LC-HRMS dari hasil partisi cair-cair bertingkat ekstrak etanol dari fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol menunjukkan pola kromatogram yang berbeda (Gambar 10). Berdasarkan pola, fraksi heksana menghasilkan puncak lebih banyak pada menit 0–18 menit. Mengacu hasil identifikasi pada Bab 3 fraksi heksana lebih banyak mengekstraksi senyawa golongan alkaloid pada daun sirsak. Senyawa dugaan yang terdapat dalam fraksi heksana adalah senyawa xilopina yang merupakan golongan alkaloid. Fraksi etil asetat menghasilkan lebih banyak puncak terutama pada menit 20–40 menit yang menunjukkan keberadaan senyawa golongan asetogenin. Meskipun demikian, masih terdapat beberapa puncak untuk senyawa golongan alkaloid. Dalam fraksi etanol atau fraksi akhir tidak terdeteksi golongan alkaloid akan tetapi menunjukkan keberadaan puncak golongan asetogenin. Dari hasil ini dapat diprediksi bahwa dalam fraksi etil asetat dan fraksi etanol terdapat delapan senyawa target antikanker yang termasuk dalam golongan asetogenin.

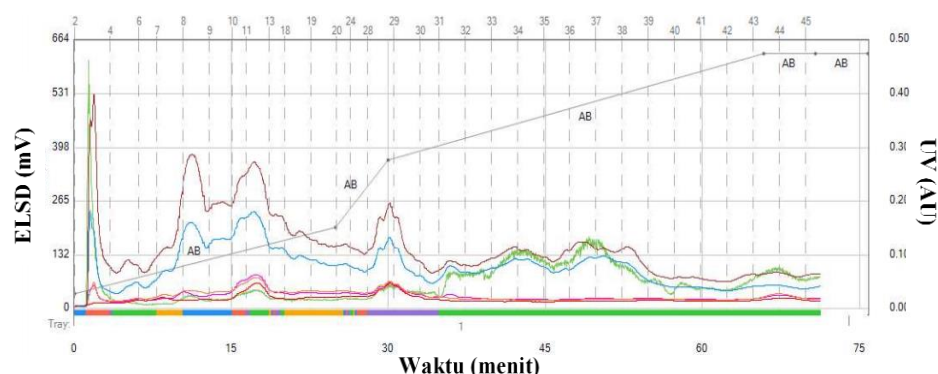


Gambar 10 *Base peak* kromatogram dari fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol dari ekstrak etanol daun sirsak dengan teknik partisi

4.3.2 LC-HRMS untuk fraksi dari kromatografi kilas untuk identifikasi fraksi partisi cair-cair ekstrak etanol daun sirsak

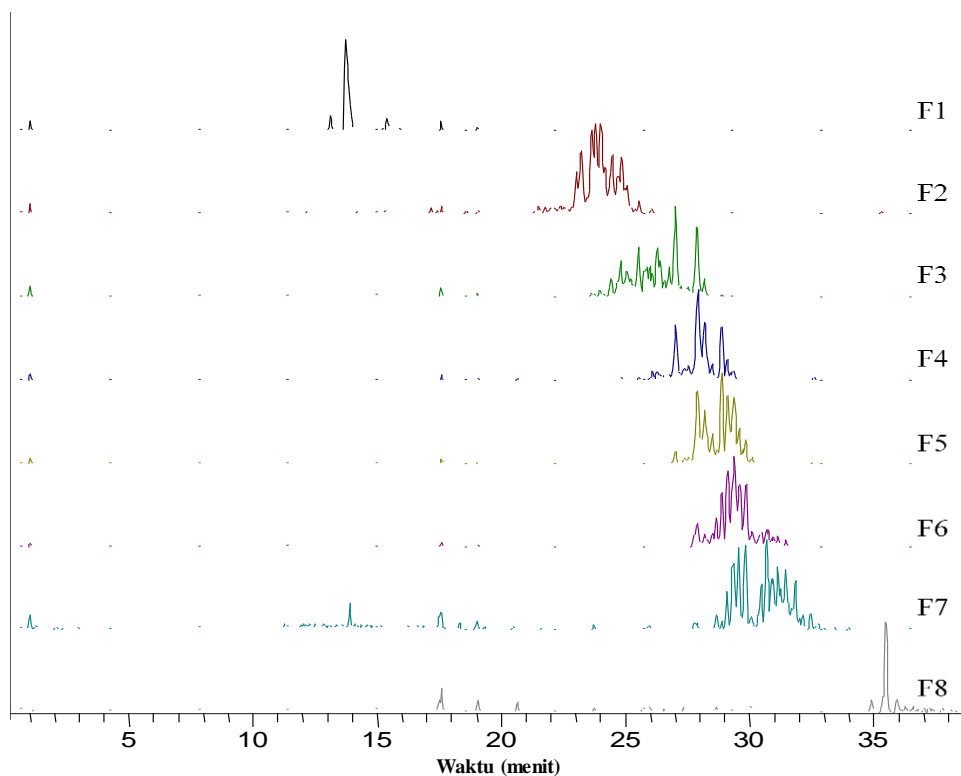
Target selanjutnya dalam mendapatkan senyawa aktif antikanker dari ekstrak daun sirsak ialah dengan menggunakan teknik kromatografi kilas (*flash*). Teknik ini merupakan pemurnian yang dirancang untuk pemisahan cepat dengan menggunakan tekanan udara. Kromatografi kilas konvensional, yang digunakan untuk mengisolasi produk alami, tidak dapat mendeteksi senyawa non-kromoforik (Agatonovic-Kustrin *et al.* 2022). Penggunaan *evaporative light scattering detection* (ELSD) menjadi alternatif, selain deteksi UV, yang memungkinkan pendeteksian dan isolasi senyawa kromofor dan non-kromofor (kekurangan kromofor penyerap UV) dalam sekali-jalan.

Daun sirsak dimaserasi untuk memaksimalkan ekstraksi metabolit. Etanol digunakan sebagai pelarut pada tahap ini karena menghasilkan nilai aktivitas antikanker pada sel MCF7 yang tertinggi. Ekstrak pekat disiapkan dalam pelarut asetonitril untuk diinjeksikan pada fraksionasi dengan menggunakan kromatografi kilas. Ekstrak difraksionasi menggunakan asetonitril dan air sebagai fase gerak A dan B. Kolom pemisahan menggunakan kartrij fase terbalik dan kondisi komposisi fase gerak disesuaikan dengan analisis menggunakan LC-HRMS. Mengingat konstituen dalam ekstrak biasanya mencakup kisaran polaritas yang luas, kondisi gradien diterapkan pada pemisahan ekstrak etanol daun sirsak. Kinerja kartrij pra-kemas dibandingkan dengan LC-HRMS. Efisiensi pemisahan kromatografi kilas tidak cukup untuk memungkinkan resolusi pemisahan yang baik dari ekstrak etanol seperti pada LC-HRMS (Gambar 11). Oleh karena itu, senyawa dugaan dievaluasi dalam bentuk fraksi. Fraksi yang terkumpul kemudian dianalisis melalui LC-HRMS untuk mendeteksi fraksi dengan kandungan senyawa dugaan sebagai antikanker.



Gambar 11 Kromatogram dari proses fraksionasi ekstrak etanol daun sirsak dengan kromatografi kilas

Keberadaan senyawa target pada fraksi dikonfirmasi dengan teknik analisis UHPLC Q-Orbitrap HRMS secara tertarget. Teknik yang diterapkan adalah mencocokkan pola fragmentasi MS2 senyawa target sebelumnya dengan pola fragmentasi dari fraksi yang diperoleh. Ini adalah teknik uji yang memastikan keberadaan senyawa tersebut, meskipun mungkin ada senyawa lain. Sistem analisis LC-HRMS yang digunakan adalah tertarget dengan menggunakan informasi bobot molekul dari sembilan senyawa dugaan sehingga selama proses analisis instrumentasi akan mengukur hanya ion dengan bobot molekul yang cocok. *Base peak* kromatogram pada delapan fraksi (F1–F8) yang dihasilkan menunjukkan perbedaan pola kromatogram yang dihasilkan. Pembuktian keberadaan senyawa target pada setiap fraksi berbeda meskipun fraksi F4-F7 memiliki pola bertumpangtindih (Gambar 12). Hasil ini mengindikasikan bahwa dalam setiap fraksi masih mungkin ada senyawa lain yang terdeteksi selain senyawa target atau terjadi tumpang tindih dua senyawa dalam satu fraksi. Dari analisis LC-MS tertarget diperoleh 8 fraksi terpilih berdasarkan kecocokkan pola fragmentasi yang terdapat dalam fraksi dengan pola fragmentasi dari senyawa dugaan antikanker. Sistem analisis LC-MS yang digunakan adalah target terhadap 6 bobot molekul dari senyawa dugaan, yaitu, 596, 612, 295, 560, 616, dan 618, serta disamakan dengan waktu retensi keberadaan senyawa tersebut. Fraksi 1 menunjukkan puncak kromatogram yang muncul di sekitar menit 14. Berdasarkan kesamaan pola fragmentasi, fraksi ini disimpulkan mengandung senyawa xilopina. Hal yang sama ditunjukkan oleh fraksi 2 ($C_{35}H_{64}O_8$ pada m/z 613), fraksi 6 ($C_{32}H_{60}N_2O_9$ pada m/z 617), dan fraksi 8 ($C_{35}H_{60}O_5$ dengan m/z 561). Dalam fraksi 3, 4, dan 5 terdeteksi senyawa m/z 597. Namun, perbedaan waktu retensi dari tiap puncak menunjukkan perbedaan senyawa dugaan. Fraksi 3 diduga mengandung senyawa $C_{36}H_{60}N_4O_3$, dalam fraksi 5 terkandung senyawa $C_{35}H_{64}O_7$, dan dalam fraksi 4 terdapat annoretikuin. Dugaan dua senyawa, yakni yang tak-diketahui ($C_{32}H_{62}N_2O_9$) dan skuadiolin C, terdeteksi pada fraksi 7 karena waktu retensi yang berdekatan.



Gambar 12 Kromatogram *basepeak* dari 8 fraksi hasil fraksionasi ekstrak etanol daun sirsak dengan menggunakan kromatografi kilas. Pola kromatogram untuk keberadaan molekul tertarget dengan BM 596, 612, 295, 560, 616, dan 618

4.3.3 Aktivitas antikanker fraksi dari ekstrak etanol daun sirsak

Sel MCF7 menjadi sasaran uji sitotoksitas 3 fraksi ekstraksi cair-cair dan delapan fraksi ekstrak etanol dengan kromatografi kilas. Untuk memastikan selektivitas sitotoksik spesifik dan keterlibatan fitokonstituen, fraksi 1-8 diuji lebih lanjut pada sel yang sama. Pengamatan morfologi dilakukan di bawah mikroskop sesaat sebelum dilakukan uji sitotoksik pada fraksi. Perlakuan pemberian ekstrak awal dan fraksi setelah 48 jam mengakibatkan perubahan morfologi pada sel MCF-7 jika dibandingkan sel tanpa perlakuan (kontrol). MTT assay digunakan untuk pembuktian aktivitas sitotoksik. Sel hidup akan merubah MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) menjadi kristal formazan berwarna ungu yang dapat dianalisis dengan metode spektrofotometri. Perubahan morfologi diamati pada konsentrasi fraksi 50 $\mu\text{g/ml}$ dan morfologi sel MCF7 berbeda bentuk dan kepadatannya dibandingkan dengan sel MCF7 tanpa perlakuan (kontrol sel). Sel yang diberi perlakuan ekstrak memperlihatkan perubahan morfologi yaitu *membran blebbing*, *cell shrinkage*, (Gambar 13). Adanya perubahan morfologi saat penambahan ekstrak/fraksi menunjukkan terjadinya induksi apoptosis atau bentuk kematian sel terprogram. Ekstrak dan fraksi daun sirsak mampu menginduksi apoptosis sehingga tumbuhan ini dapat sebagai agen antikanker (Tabel 5).

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

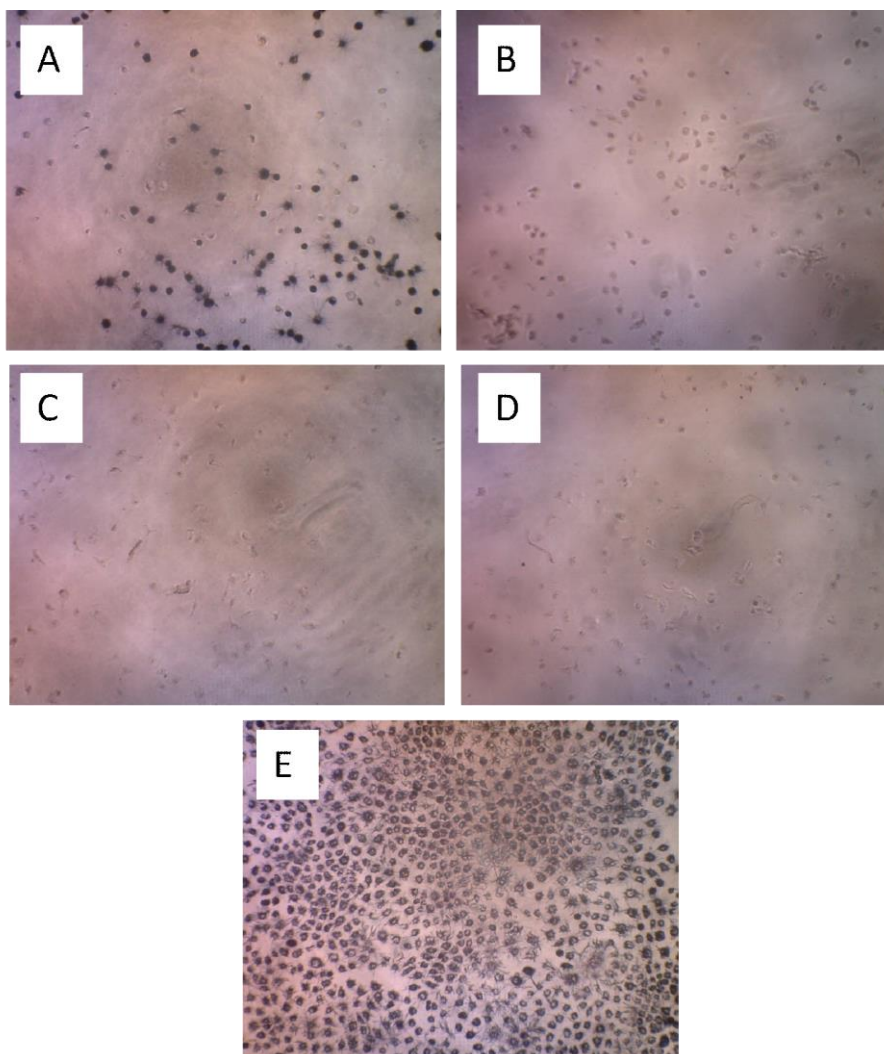
Tabel 5 Aktivitas antikanker dalam persen inhibisi dari ekstrak dan fraksi daun sirsak.

Fraksi/Ekstrak	Dugaan senyawa	Inhibisi (%) (konsentrasi 50 µg/ml)
Ekstrak etanol		73,57 ± 1,27
Fraksi heksana		87,89 ± 5,35
Fraksi etil asetat		95,61 ± 0,59
Fraksi etanol		97,41 ± 0,39
F1	Xilopina	18,38 ± 7,19
F2	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	95,30 ± 0,58
F3	C ₃₆ H ₆₀ N ₄ O ₃	95,38 ± 1,28
F4	Annoretinuin	91,96 ± 3,42
F5	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	93,01 ± 1,95
F6	C ₃₂ H ₆₀ N ₂ O ₉	86,15 ± 1,02
F7	C ₃₂ H ₆₂ N ₂ O ₉	87,13 ± 0,39
	Skuadiolin C	
F8	C ₃₅ H ₆₀ O ₅	18,44 ± 1,93

Efek sitotoksik dari fraksi etil asetat dan fraksi etanol menghasilkan persentase inhibisi yang lebih tinggi daripada fraksi heksana. Hal ini diduga karena pengaruh faktor dari kandungan asetogenin yang lebih banyak pada kedua fraksi. Dugaan ini didukung karena sirsak merupakan tanaman obat tradisional yang dilaporkan mengandung asetogenin sebagai fitokonstituen utama (Padma *et al.* 1997). Senyawa kimia ini telah terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel neoplastik yang menunjukkan potensi penggunaannya sebagai agen antitumor (Ogbu *et al.* 2020). Hasil sitotoksik dari fraksi heksana, etil asetat dan fraksi akhir sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Hadasaputri *et al.* (2021). Fraksi akhir memiliki aktivitas antikanker tertinggi dibandingkan 2 fraksi lainnya.

Efek sitotoksik dari fraksi yang dihasilkan pada kromatografi kilas juga diamati. Persentase penghambatan pertumbuhan fraksi 1–8 terhadap sel kanker MCF-7 disajikan pada Tabel 5. Fraksi 2, 3, 4, dan 5 mengungkapkan sitotoksitas yang kuat dalam kisaran penghambatan 91,96–95,38 % sel yang diuji. Secara bersamaan, fraksi 6 dan 7 juga menyebabkan efek sitotoksik yang cukup besar (86,15–87,13%). Dalam hal profil keamanan, toksisitas yang sangat rendah (18,38% dan 18,44%) diamati pada fraksi 1 dan 8. Secara keseluruhan, efikasi sitotoksik dan profil keamanan dari fraksi daun sirsak merupakan indikasi kuat untuk sitotoksitas dan selektivitas spesifik terhadap sel MCF7.





Gambar 13 Perubahan morfologi sel MCF7 karena perlakuan penambahan ekstrak etanol (a), fraksi heksan (b), fraksi etilasetat (c), fraksi etanol (d) daun sirsak dan kontrol negatif (e)

4.4 Simpulan

Sebagai kesimpulan, data penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi daun sirsak yang diperoleh mengandung target senyawa dugaan yang aktif sebagai antikanker dengan panduan teknik target metabolomik menggunakan UHPLC-HRMS. Fraksi yang diperoleh dari teknik partisi dan kromatografi kilas memiliki efek sitotoksik yang kuat terhadap sel MCF7 dibandingkan ekstrak daun sirsak. Selain itu perubahan morfologi yang diamati menunjukkan fraksi dengan dugaan senyawa aktif dapat menginduksi apoptosis sel sehingga diajukan sebagai agen antikanker. Hasil ini mendukung pendekatan metabolomik yang mampu memprediksi senyawa aktif antikanker. Penyelidikan farmakologis membuka peluang untuk pengembangan senyawa aktif dari daun sirsak dan produk herbal untuk kanker.

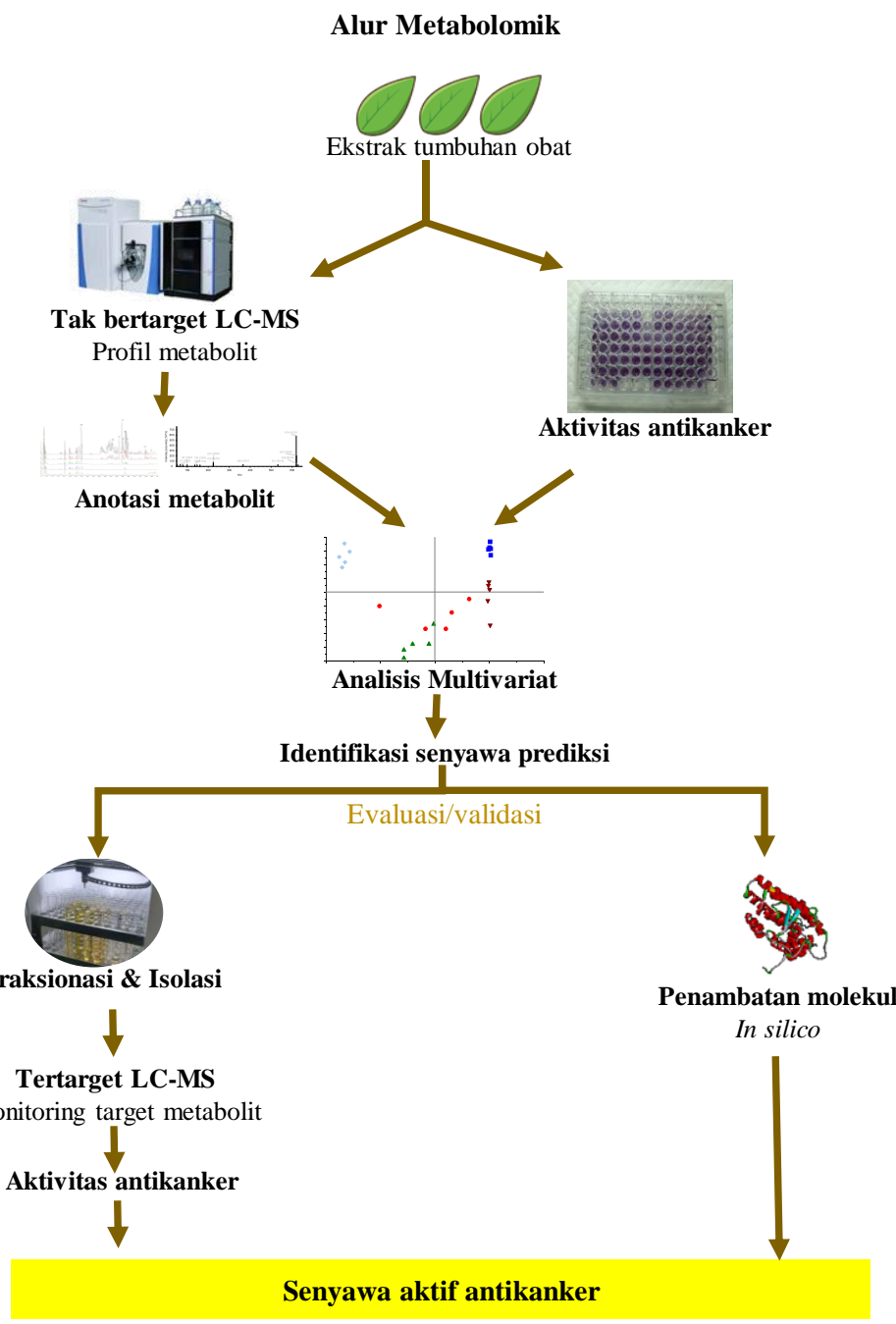
V PEMBAHASAN UMUM

Senyawa antikanker dari produk herbal terus diteliti guna meningkatkan potensi kekayaan alam Indonesia. Namun, sejauh ini pencarian senyawa aktif dengan teknik *bioassay-directed fractionation and isolation* (BDFI) menghadapi kendala, yaitu proses yang panjang dan terkadang senyawa hasil isolasi memiliki aktivitas yang lebih rendah daripada ekstraknya. Fokus penelitian ini adalah mengkaji penggunaan pendekatan metabolomik untuk menemukan senyawa aktif antikanker dari tumbuhan obat Indonesia dan mengevaluasi hasil prediksi senyawa tersebut. Penelitian ini terdiri atas 3 tahap. Sebagai studi pendahuluan, dipilih 3 tumbuhan yang berpotensi sebagai antikanker, yaitu keladi tikus, sambung nyawa, dan sirsak, serta tumbuhan tapak dara sebagai kontrol positif karena sudah diketahui aktif sebagai antikanker. Sel kanker payudara MCF7 digunakan dalam pengujian ini. Tahap selanjutnya adalah penggunaan pendekatan metabolomik untuk profil metabolit dan mengkorelasikan terhadap aktivitas antikanker sehingga dimungkinkan menemukan prediksi senyawa antikanker dari tumbuhan obat terpilih. Langkah terakhir adalah evaluasi fraksi yang diduga mengandung senyawa aktif antikanker secara *in silico* dan *in vitro*. Gambaran alur penelitian yang disarankan untuk penemuan senyawa aktif antikanker dengan pendekatan metabolomik seperti ditampilkan pada Gambar 14.

Berbagai jenis tumbuhan obat dipercaya berpotensi sebagai antikanker, seperti keempat tumbuhan obat yang digunakan pada penelitian ini. Tumbuhan obat dipilih berdasarkan nilai aktivitas tertinggi atau penghambatan sel kanker target dari ekstrak sampel. Dua jenis pelarut yang digunakan adalah etanol p.a. dan etanol 80%. Pelarut ini dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif berdasarkan ketentuan Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Pada Bab 2 ditunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak berpotensi antikanker paling aktif dibandingkan 3 tumbuhan obat lainnya. Hal ini dibuktikan dengan nilai IC_{50} terendah (24,45 $\mu\text{g/mL}$ dan 32,44 $\mu\text{g/mL}$), bahkan lebih rendah jika dibandingkan tapak dara (78,41 $\mu\text{g/mL}$ dan 90,14 $\mu\text{g/mL}$) yang diketahui mengandung senyawa vinblastin dan vinkristin yang telah diketahui sebagai antikanker. Keberadaan senyawa golongan fenol dan flavonoid juga dikaji pada Bab 2 untuk mendapat profil dan distribusi metabolit pada 4 tumbuhan obat.

Untuk mendapatkan informasi senyawa aktif pada daun sirsak, diperlukan beberapa tahap, meliputi ekstraksi, fraksionasi, dan isolasi dari campuran kompleks. Diperlukan teknik ekstraksi yang tepat agar diperoleh senyawa aktif tersebut. Pendekatan klasik BDFI menggunakan proses fraksionasi bertahap yang setiap tahapnya ditentukan berdasarkan hasil bioasai teraktif. Proses fraksionasi diakhiri setelah didapatkan isolat senyawa murni teraktif (Weller 2012). Namun, diperlukan waktu yang relatif panjang dan cukup rumit untuk menemukan senyawa aktif, dan kemungkinan sinergisme tidak dapat dideteksi menjadi kendala dari BDFI.

Pendekatan metabolomik digunakan pada penelitian ini untuk menemukan senyawa aktif antikanker dan dibahas secara lengkap pada Bab 3. Metode metabolomik merupakan strategi komprehensif yang memungkinkan identifikasi dan kuantitatif metabolit. Korelasi antara kandungan metabolit dan suatu bioaktivitas hayati tertentu dengan kombinasi pendekatan metabolomik dan



Gambar 14 Alur penelitian yang disarankan untuk identifikasi senyawa aktif antikanker dengan pendekatan metabolomik

kemometrik diharapkan dapat memberi informasi prediksi senyawa aktif sebelum memulai prosedur isolasi yang sudah tentu membutuhkan waktu lama. Metabolomik menjadi pendekatan alternatif yang dapat menentukan komposisi dan konsentrasi metabolit berbobot molekul rendah dalam suatu matriks hayati dan dapat digunakan untuk menghasilkan "sidik jari metabolit" dari suatu individu. Untuk mengetahui penggunaan metabolomik dalam mendapatkan senyawa aktif

tersebut, pada penelitian ini metabolit diidentifikasi menggunakan instrumen LC-HRMS yang memiliki sensitivitas tinggi. Metabolomik berbasis spektrometri massa adalah bidang yang berkembang pesat baik dalam penelitian maupun diagnosis. Secara umum, metodologi dan jenis instrumen yang digunakan untuk eksperimen kuantifikasi absolut klinis dan lainnya berbeda dari yang digunakan untuk penemuan biomarker dan analisis yang taktertarget. Hal ini karena dibutuhkan instrumen dengan sensitivitas dan jangkauan dinamis yang optimum, serta membutuhkan resolusi dan akurasi massa yang tinggi (Gertsman *et al.* 2014).

Pada Bab 3, tumbuhan sirsak dipilih dalam penemuan senyawa aktif antikanker dengan pendekatan metabolomik. Seperti yang telah dijelaskan, jumlah senyawa yang sangat banyak pada tumbuhan dan dengan sifat fisik dan polaritas yang beragam, tidak mungkin hanya menggunakan satu jenis pelarut. Oleh karena itu, penggunaan campuran pelarut etanol dan air diperlukan untuk mengevaluasi aktivitas antikanker pada sel MCF7 dan distribusi metabolitnya. Hasilnya menunjukkan nilai IC_{50} yang berbeda pada setiap ekstrak, dengan ekstrak etanol p.a. memperlihatkan paling aktif sebagai antikanker (IC_{50} 22 $\mu\text{g/mL}$), diikuti oleh etanol 50%, 80%, air; ekstrak etanol 30% menunjukkan tidak aktif sebagai antikanker (IC_{50} 1713 $\mu\text{g/mL}$). Aktivitas hayati sangat dipengaruhi oleh distribusi metabolit. Kandungan metabolit diinformasikan dengan teknik metabolomik taktertarget menggunakan instrumentasi LC-HRMS. Teknik ini dianggap andal untuk menjelaskan profil metabolit atau identifikasi metabolit yang tidak diketahui (Nassar *et al.* 2017). Sebanyak 35 metabolit telah berhasil diidentifikasi dan terkonfirmasi secara putatif dalam ekstrak daun sirsak, terbagi atas 16 senyawa berhasil diidentifikasi sebagai golongan asetogenin, 14 termasuk golongan alkaloid, dan 5 termasuk golongan flavonoid.

Untuk mengidentifikasi senyawa aktif antikanker digunakan pendekatan multivariat teknik OPLS-DA. Model ini dibangun menggunakan informasi bobot molekul senyawa sebagai prediktor dan menggunakan aktivitas ekstrak sebagai respons. Kualitas model menghasilkan $R^2 = 0,875$ ($R^2X_{cum} = 0,812$, $R^2Y_{cum} = 0,997$) dan $Q^2 = 0,870$, yang menunjukkan kesesuaiannya untuk membedakan antara metabolit aktif dan tidak aktif. Berdasarkan pola S-plot dan syarat kriteria ($p < 0,05$ dikoreksi untuk FDR, $VIP > 1$, dan *fold change* $> 1,5$), sembilan metabolit diidentifikasi dan dipertimbangkan sebagai biomarker antikanker. Tiga metabolit telah berhasil diidentifikasi dalam sampel dan enam senyawa dugaan yang belum teridentifikasi. Senyawa anoretikuin dan xilopina telah dilaporkan dapat menghambat viabilitas sel atau memiliki aktivitas antikanker (Ravi *et al.* 2015; Santos *et al.* 2017).

Berbagai penelitian bidang metabolomik telah difokuskan pada peningkatan diagnosis dan pencegahan penyakit dengan ditemukannya sejumlah senyawa aktif. Namun, kegunaannya sebagai biomarker yang berpotensi terhadap aktivitas dibatasi oleh rendahnya kadar senyawa aktif tersebut (Carneiro *et al.* 2019). Oleh karena itu, akan ada kekhawatiran bahwa tanpa proses evaluasi lengkap untuk biomarker, kemajuan ini tidak akan menjadi prognosis atau pengobatan yang efektif (López-López *et al.* 2018). Sebagai tindak lanjut dari hasil metabolomik, penelitian ini dilanjutkan dengan mengevaluasi senyawa target antikanker untuk menghindari kesalahan interpretasi hasil eksperimen dan untuk mengetahui efek senyawa target yang sebenarnya. Evaluasi pertama dilakukan secara *in silico* dengan menambatkan ligan (senyawa target) pada makromolekul target





antikanker reseptor estrogen alfa (3ERT). Hasil yang menarik ialah bahwa tiga senyawa mendekati nilai afinitas pengikatan dengan doksorubisin sebagai obat referensi antikanker ($-7,4$ kkal/mol). Hasil analisis *in silico* ini menegaskan temuan studi metabolomik yang diharapkan efektif sebagai penemuan senyawa aktif antikanker.

Pada tahap akhir, teknik fraksionasi dimaksudkan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa aktif dari ekstrak yang telah dihasilkan dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fraksionasi yang pertama dengan teknik partisi cair-cair menggunakan tiga pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Dari eksperimen, dihasilkan 3 fraksi, yaitu fraksi heksana, etil asetat, dan etanol. Fraksionasi juga diterapkan dengan menggunakan instrumentasi kromatografi kelas preparatif dan menggunakan konsentrasi bergradien, yang menghasilkan 8 fraksi. Fraksi tersebut telah diuji dengan teknik target bobot molekul pada LC-MS/MS untuk memeriksa keberadaan senyawa target. Sebelas fraksi yang dihasilkan dan ekstrak awal diajukan untuk evaluasi aktivitas pada sel MCF 7 dengan menggunakan uji MTT. Sembilan fraksi terbukti menghambat viabilitas sel dibandingkan ekstrak awal. Dengan demikian, pendekatan metabolomik mampu memprediksi aktivitas senyawa target terhadap aktivitas hayati tertentu. Hasil penelitian lebih lanjut perlu dikembangkan dengan mengisolasi senyawa target hasil metabolomik untuk menegaskan aktivitas antikankernya.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

VI SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Dalam penelitian ini, pendekatan metabolomik berhasil dikembangkan untuk identifikasi senyawa aktif antikanker dari salah satu tumbuhan obat Indonesia. Metode yang dikembangkan menggunakan tumbuhan sirsak bagian daun karena telah terbukti memiliki aktivitas antikanker lebih tinggi dibandingkan tiga tumbuhan lainnya, yaitu daun keladi tikus, sambung nyawa, dan tapak dara. Untuk pertama kalinya, teknik ekstraksi daun sirsak dengan berbagai pelarut komposisi air dan campurannya dengan etanol (30%, 50%, 80%, dan etanol p.a.) dilakukan untuk menilai pengaruh pelarut pada aktivitas antikanker sel kanker payudara MCF7 secara *in vitro*. Aktivitas antikanker dari berbagai pelarut menunjukkan ekstrak etanol p.a. memiliki aktivitas antikanker teraktif dibandingkan ekstrak lainnya. Hasil ini berkorelasi dengan profil metabolit dan pola kromatogram yang dihasilkan pada pelarut etanol p.a. lebih banyak teridentifikasi menggunakan UHPLC-HRMS. Pendekatan metabolomik dalam percobaan ini memberikan informasi terkait dugaan 9 metabolit dalam ekstrak daun sirsak yang aktif sebagai antikanker. Di antaranya, ada 3 senyawa yang berhasil diidentifikasi berdasarkan pola fragmentasi dapat berperan sebagai senyawa aktif, yaitu, annoretikuin, skuadiolin C, dan xilopina. Evaluasi senyawa dugaan secara *in silico* menunjukkan adanya ikatan dengan makromolekul protein antikanker 3ERT dan afinitas pengikatan yang mendekati doksorubisin sebagai obat referensi. Evaluasi senyawa dugaan dari proses fraksionasi, analisis target LC-HRMS, dan secara *in vitro* dengan sel MCF7 membuktikan fraksi yang diperoleh berperan aktif dalam penghambatan sel kanker, dan aktivitas fraksi lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasarnya. Hasil ini menegaskan bahwa pendekatan metabolomik mampu mengidentifikasi senyawa antikanker dari tumbuhan obat Indonesia.

6.2 Perspektif Masa Depan

Identifikasi senyawa aktif dari suatu tumbuhan obat berperan penting dalam aplikasi dan pengembangan produk obat herbal untuk evaluasi mutu, keamanan, dan khasiatnya. Aktivitas suatu bahan baku produk dapat dievaluasi dengan menerapkan pengujian yang berorientasi pada senyawa aktif atau analisis penanda dari bahan tersebut. Senyawa yang berpotensi aktif biasanya memerlukan proses panjang melalui teknik dengan *bioassay-directed fractionation and isolation* (BDFI). Keterbatasan lain dari BDFI adalah bahwa isolat yang diperoleh ternyata menurun aktivitasnya karena proses fraksionasi tersebut. Hal ini menjadi tantangan bagi ilmuwan ke depan untuk mendapatkan metode cepat dalam menemukan senyawa aktif baru dari suatu bahan terhadap aktivitas hayati tertentu. Tumbuhan obat sendiri seperti diketahui mengandung ratusan bahkan ribuan senyawa sehingga diperlukan instrumen canggih untuk identifikasi. Perkembangan terkini pencarian senyawa aktif melibatkan teknik analisis sampel, analisis data, dan penggunaan instrumentasi *high throughput*. Teknik preparasi, pembacaan informasi, dan pengolahan data perlu terus dikembangkan agar data



yang diperoleh mewakili. Ketiga parameter ini diharapkan memberikan informasi yang akurat.

Pandangan yang kedua, metabolomik yang merupakan kajian interdisiplin, melibatkan profil kuantitatif metabolit yang berperan dalam proses metabolisme dalam suatu bahan alam dapat menjadi pendekatan yang baik sebagai pengendali kualitas bahan. Dengan mengetahui profil kimia yang diperoleh dari suatu bahan, kemudian data nilai aktivitas diolah dengan kemometrika, maka pengaruh pada aktivitas hayati tersebut dapat diprediksi. Aktivitas hayati suatu produk dapat dipengaruhi oleh satu senyawa atau campuran senyawa. Informasi senyawa aktif yang diperoleh dapat dikaji lebih mendalam, apakah keberadaan senyawa tersebut bersama dengan senyawa lain akan meningkatkan atau menurunkan kualitas produk bahan alam tersebut.

IPB University

IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Rahman T, Hussein A-S, Beshir S, Hamed AR, Ali E, El-Tanany SS. 2019. Antimicrobial Activity of Terpenoids Extracted from *Annona muricata* Seeds and its Endophytic *Aspergillus niger* Strain SH3 Either Singly or in Combination. *Open Access Maced J Med Sci*. 7(19):3127-3131. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.793>.
- Adrianta KA, Udayano NNW, Meriyani H. 2017. Antioxidant activity of leaf extract ethanol rodent tuber (*Typhonium flagelliforme*) using DPPH (1;1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Jurnal Ilmiah Medicamento*. 3(2):p.97–103.
- Agatonovic-Kustrin S, Gegechkori V, Morton DW, Tucci J, Mohammed EUR, Ku H. 2022. The bioprofiling of antibacterials in olive leaf extracts via thin layer chromatography-effect directed analysis (TLC-EDA). *J Pharm Biomed Anal*. 219:114916. doi:10.1016/j.jpba.2022.114916.
- Al-Yousef HM, Hassan WHB, Abdelaziz S, Amina M, Adel R E-SM. 2020. UPLC-ESI-MS/MS Profile and Antioxidant, Cytotoxic, Antidiabetic, and Antiobesity Activities of the Aqueous Extracts of Three Different Hibiscus Species. *Journal of Chemistry* 2020.
- Alsherbiny MA, Bhuyan DJ, Radwan I, Chang D, Li, Chun-G. 2021. Metabolomic Identification of Anticancer Metabolites of Australian Propolis and Proteomic Elucidation of Its Synergistic Mechanisms with Doxorubicin in the MCF7 Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2(15): 1422-1467.
- Alwan IA, Lim V, Samad NA, Widyawati T, Yusoff NA. 2019. Effect of *Annona muricata* L. on Metabolic Parameters in Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.*. 8(1). doi : <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.8.1.01>.
- Anselmi M, Borbély A, Figueras E, Michalek C, Kemker I, Gentilucci L, Sewald N. 2021. Linker Hydrophilicity Modulates the Anticancer Activity of RGD-Cryptophycin Conjugates. *Chemistry*. 27(3):1015-1022. doi:10.1002/chem.202003471.
- Antony P, Vijayan R. 2016. Acetogenins from *Annona muricata* as potential inhibitors of antiapoptotic proteins: a molecular modeling study. *Drug Des. Devel. Ther*. 10,1399-1410.
- Anwar F, Przybylski R. 2012. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 11(3):p.293–302.
- Avula B, Bae JY, Majrashi T, Wu TY, Wang YH, Wang M, Ali Z, Khan IA. 2018. Targeted and Non-Targeted Analysis of Annonaceous Alkaloids and Acetogenins from *Asimina* and *Annona* Species using UHPLC-QToF-MS. *J. Pharm. Biomed.*. 159, 548-566.
- Ayun NQ, Kusmardi, Nurhuda, Elya B. 2020. Anti-Inflammation of Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Against Hemorrhoids in Mice Induced by Croton Oil. *Pharmacogn. J*. 12(4), 784-792.
- Aziz Z, Yuliana ND, Simanjuntak P, Rafi M, Mulatsari E, Abdillah S. 2021. Investigation of Yacon Leaves (*Smallanthus sonchifolius*) for α -Glucosidase Inhibitors Using Metabolomics and In Silico Approach. *Plant Foods Hum. Nutr*. 19 doi: 10.1007/s11130-021-00926-3.

- Balderrama-Carmona AP, Silva-Beltrán NP, Gálvez-Ruiz JC, Ruíz-Cruz S, Chaidez-Quiroz C, Morán-Palacio EF. 2020. Antiviral, Antioxidant, and Antihemolytic Effect of *Annona muricata* L. Leaves Extracts. *Plants (Basel)*. 9(12):1650. doi: 10.3390/plants9121650. PMID: 33256023; PMCID: PMC7760998.
- Ben Salah H, Smaoui S, Abdennabi R, Allouche N. 2019. LC-ESI-MS/MS Phenolic Profile of *Volutaria lippii* (L.) Cass. Extracts and Evaluation of Their in Vitro Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, Antidiabetic, and Antibacterial Activities. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* Article ID 9814537, 13 pages.
- Bose U, Hewavitharana AK, Ng YK, Shaw PN, Fuerst JA, Hodson MP. 2015. LC-MS-based metabolomics study of marine bacterial secondary metabolite and antibiotic production in *Salinispora arenicola*. *Mar Drugs*. 13(1):249–266. doi:10.3390/md13010249.
- Carneiro G, Radcenco AL, Evaristo J, Monnerat G. 2019. Novel strategies for clinical investigation and biomarker discovery: A guide to applied metabolomics. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 38(3). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0045>.
- Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, Igartuburu JM., Garcia Barroso C. 2014. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem.* 165, 198–204.
- Chagas-Paula DA, Zhang T, da Costa FB, Edrada-Ebel RA. 2015. A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. *Metabolites*. 5(3):404–430. doi:10.3390/metabo5030404.
- Chandra Mohana N, Yashavantha Rao HC, Rakshith D, Mithun PR, Nuthan BR, Satish S. Omics based approach for biodiscovery of microbial natural products in antibiotic resistance era. *J Genet Eng Biotechnol*. 2018;16(1):1–8. doi:10.1016/j.jgeb.2018.01.006.
- Chandradevan M, Simoh S, Mediani A, Ismail NH, Ismail IS, and Abas F. 2020. UHPLC-ESI-Orbitrap-MS Analysis of Biologically Active Extracts from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. and *Cleome gynandra* L. Leaves. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* Article ID 6749176, 17 pages.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.* 109(7):3012–3043. doi:10.1021/cr900019j.
- Endrini S, Suherman, Widowati W. 2014. *Annona muricata* leaves have strongest cytotoxic activity against breast cancer cells. *Universa Medicina*. 3(3): 180–184.
- Farida Y, Irpan K., Fithriani L. 2014. Antibacterial and Antioxidant Activity of Keladi Tikus Leaves Extract (*Typhonium Flagelliforme*) (Lodd) Blume. *Procedia Chem.* 13:209–213.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.33588. Epub ahead of print. PMID: 33818764.
- Gertsman I, Gangoiti JA, Barshop BA. Validation of a dual LC-HRMS platform for clinical metabolic diagnosis in serum, bridging quantitative analysis and untargeted metabolomics. *Metabolomics*. 2014;10(2):312–323. doi:10.1007/s11306-013-0582-1.

- Hadisaputri YE, Habibah U, Abdullah FF, Halimah E, Mutakin M, Megantara S, Abdulah R, Diantini A. 2021. Antiproliferation Activity and Apoptotic Mechanism of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves Extract and Fractions on MCF7 Breast Cancer Cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 16(13): 447-457.
- Hernández-Fuentes, G. A., García-Argáez, A. N., Peraza, Campos, A. L., *et al.* (2019). Cytotoxic Acetogenins from the Roots of *Annona purpurea*. *Int J Mol Sci*. 20(8):1870. Published 2019 Apr 16. doi:10.3390/ijms20081870.
- Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. 2021. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 755 012060.
- Huang A, Chi Y, Liu J, Wang M, Qin J, Ou L, Chen W, Zhao Z, Zhan R, Xu H. 2019. Profiling and Pharmacokinetic Studies of Alkaloids in Rats After Oral Administration of *Zanthoxylum nitidum* Decoction by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-MS/MS. *Molecules*. 24(3):585.
- Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C, Castro-Torres VA, Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Zentella-Dehesa A. 2019. Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents *Front. Pharmacology*. 10:783. doi: 10.3389/fphar.2019.00783.
- Jamalzadeh L, Ghafoori H, Sariri R, H, Nasirzade J, Hasani H, Aghamaali MR. 2016. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna J Med Biochem*. 4(1): e33453. doi:10.17795/ajmb-33453.
- Justino AB, Miranda NC, Franco RR, Martins MM, Silva NMD, Espindola FS. 2018. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed. Pharmacother*. 100, 83-92.
- Kaneria M, Rakholiya K, Jakasania R, Dave R, Chanda S. 2017. Metabolite Profiling and Antioxidant Potency of *Couropita guianensis* Aubl. Using LC-QTOF-MS Based Metabolomics. *Res J. Phytochem*. 11:150–169.
- Kelebek H, Selli S, Canbas A, Cabaroglu T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchem J*. 91:187–192.
- Khalivulla SI, Mohammed A, Sirajudeen KNS, Shaik MI, Ye W, Korivi M. 2019. Novel Phytochemical Constituents and Anticancer Activities of the Genus, Typhonium. *Curr Drug Metab*. 20(12):946–957. doi:10.2174/1389200220666191118102616.
- Kim JS, Ha TY, Ahn J, Kim S. 2014. Analysis and distribution of esculetin in plasma and tissues of rats after oral administration. *Prev Nutr Food Sci*. 19:321–326.
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 12(2):457. Published 2020 Feb 12. doi:10.3390/nu12020457.
- Krasteva I, Nikolov S. 2008. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. *Quimica Nova*. 31(1):p.59–60.



- Liu YH, Lin SY, Lee CC, Hou WC. 2008. Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonyl hydroxamic acid. *Food Chem.* 109(1):159-166. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.055.
- López-López Á, López-González Á, Barker-Tejeda TC, Barbas C. 2018. A review of validated Biomarkers Obtained Through Metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn.* 18(6):557–575. doi:10.1080/14737159.2018.1481391.
- Ma CY, Lu JH, Li X, Liu X, Chen JW. 2019. Eight new cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Chin J Nat Med.* 17(4):291-297.
- Mariam AWS, Ibrahim J, Areeful HMd, Laiba A. 2018. Exploring the Leaves of *Annona muricata* L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Front Pharmacol.* 9:661.
- Martín-Blázquez A, Díaz C, González-Flores E, Franco-Rivas D, Jiménez-Luna C, Melguizo C, Prados J, Genilloud O, Vicente F, Caba O, *et al.* 2019. Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Sci Rep.* 9(1):1–9. doi:10.1038/s41598-019-55952-8.
- Matulja D, Vranješević F, Markovic MK, Pavelić SK, Marković D. 2022. Anticancer Activities of Marine-Derived Phenolic Compounds and Their Derivatives. *Molecules.* 27(4): 1449. doi: 10.3390/molecules27041449.
- Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. 2011 Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 7(2):146-57. doi: 10.2174/157340911795677602.
- Miranda NC, Araujo ECB, Justino AB, Cariaco Y, Mota CM, Costa-Nascimento LA, Espindola FS, Silva NM. 2021. Anti-parasitic activity of *Annona muricata* L. leaf ethanolic extract and its fractions against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 12, 273:114019. doi: 10.1016/j.jep.2021.114019.
- Moon SH, Pandurangan M, Kim DH, Venkatesh J, Patel RV, Mistry BM. 2018. A rich source of potential bioactive compounds with anticancer activities by *Catharanthus roseus* cambium meristematic stem cell cultures. *J Ethnopharmacol.* 217:107–117. doi:10.1016/j.jep.2018.02.021.
- Moon JK, Shibamoto T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 5, 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>.
- More GK, Vervoort J, Steenkamp PA, Prinsloo G. 2022. Metabolomic profile of medicinal plants with anti-RVSV activity. *Heliyon.* 8(2): e08936,
- Muhamad N, Na-Bangchang K. 2020. Metabolite profiling in anticancer drug development: A systematic review. *Drug Des. Devel. Ther.* 14:p.1401–1444.
- Naik AV, Sellappan K. 2021. Volatile Oil Profiles of Aerial and Underground Plant Parts of *Annona muricata* L. (Annonaceae) Grown in Goa, India. *J Essent Oil-Bear Plants.* 24(4):683-694.
- Nasiruddin M, Sinha SN. 2020. Phytochemical screening and antioxidant, antibacterial efficacy of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Asian J Med Biol Res.* 6:187–195.
- Nassar AF, Wu T, Nassar SF, Wisniewski AV. 2017. UPLC-MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research. *Drug Discov Today.* 22(2):463-470. doi: 10.1016/j.drudis.2016.11.020.

- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75(3):311-335. doi:10.1021/np200906s.
- Nokhala A, Siddiqui MJ, Ahmed QU, Bustamam MSA, Zakaria ZA. 2020. Investigation of α -glucosidase inhibitory metabolites from *Tetracera scandens* leaves by GC-MS metabolite profiling and docking studies. *Biomolecules.* 10(2):1-17. doi:10.3390/biom10020287.
- Nugraha, A. S., Haritakun, R., Lambert, J. M., Dillon, C. T., Keller, P. A. (2019). Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L. *Natural Product Research.* DOI: 10.1080/14786419.2019.1638380.
- Ogbu PN, Ugota EO, Onwuka RU, Ogbu IM, Aloke C. 2020. Effect of acetogenin fraction of *Annona muricata* leaves on antioxidant status and some indices of benign prostatic hyperplasia in rats. *Redox Report.* 25: 80-86; <https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1804711>.
- Orak, H. H., Bahriseft, I. S. and Sabudak, T., 2019, Antioxidant activity of extracts of soursop (*Annona muricata* L.) leaves, fruit pulps, peels, and seeds. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 69, 359-366.
- Padma, P., Chansouria, J.P., & Khosa, R.L. (1997). Effect of alcohol extract of *Annona muricata* on cold immobilization stress induced tissue lipid peroxidation. *Phytother Res.* 11:4.
- Pezzuto JM. 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol.* 53(2):121-133. doi:10.1016/s0006-2952(96)00654-5.
- Prasetiawati R, Suherman M, Permana B, Rahmawati. 2021. Molecular docking study of anthocyanidin compounds against epidermal growth factor receptor (egfr) as anti-lung cancer. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 8(1):8-20. doi:10.24198/ijpst.v8i1.29872 .
- Purwaningsih E, Suciati Y, Widayanti E. 2017. Anticancer Effect of a *Typhonium flagelliforme* L. in Raji Cells Through Telomerase Expression. *Indones J Cancer Chemoprevention.* 8(1):15. doi:10.14499/indonesianjcanchemoprev8iss1pp15-20.
- Qorina F, Arsianti A, Fithrotunnisa Q, Tejaputri NA. 2019. Phytochemistry and antioxidant activity of soursop (*Annona muricata*) leaves. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 11(Special Issue 6):p.1-6.
- Quansah E, Karikari T. 2016. Potential role of metabolomics in the improvement of research on traditional African medicine. *Phytochem. Lett.* 17. 270-277. 10.1016/j.phytol.2016.08.004.
- Rady I, Bloch MB, Chamcheu RN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, Babatunde AS, Kuate JR, Noubissi FK, El Sayed KA, Whitfield GK, Chamcheu JC. 2018. Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxid Med Cell Longev.* 1826170. doi: 10.1155/2018/1826170. PMID: 30151067; PMCID: PMC6091294.
- Rafi M, Septaningsih DA, Karomah AH, Lukman Prajogo B, Amran MB, Rohman A. 2021. Inhibition of alpha-glucosidase activity, metals content, and phytochemical profiling of *Andrographis paniculata* from different geographical origins based on FTIR and UHPLC-Q-Orbitrap HRMS metabolomics. *Biodiversitas.* 22:1535-1542.
- Ragasa CY, Soriano G, Torres OB, Don MJ, Shen CC. 2021. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacogn J.* 4(32), 32-37.



- Ravi L, Bhardwaj V, Khanna G. 2015. Anorecticuin and sabadelin, a potential oncogenic transcriptional factor inhibitors: An in silico analysis. *Der Pharmacia Lettre*. 7(7):204-212.
- Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. 2013. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. *Curr Med Chem*. 20 (36):4436–4450.
- Ren Z, Nie B, Liu T, Yuan F, Feng F, Zhang Y, Zhou W, Xu X, Yao M, Zhang F. 2016. Simultaneous determination of coumarin and its derivatives in tobacco products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules*. 21:1511.
- Saiman MZ, Mustafa NR, Schulte AE, Verpoorte R, Choi YH. 2012. Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 109(3):465–475. doi:10.1007/s11240-011-0111-8.
- Santos LS, Silva VR, Menezes LRA, Soares MBP, Costa EV, Bezerra DP. 2017. Xylopine Induces Oxidative Stress and Causes G2/M Phase Arrest, Triggering Caspase-Mediated Apoptosis by p53-Independent Pathway in HCT116 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 7126872-84.
- Sanz M, De Simón BF, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz AM, Hernández T, Estrella I, Pinto E. 2012. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *J Mass Spectrom*. 47:905–918.
- Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. 2021. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*. 71(4):333-358. doi:10.3322/caac.21670.
- Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. 2016. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectr*. 27(12):1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>.
- Selamat SN, Muhamad II, Idham Z, Pae N. 2018. Retention of alpha Tocopherol and antioxidant activity of encapsulated palm mixed Vitamin E in formulated blends. *MOJ Food Process Technol*. 6:272–278.
- Semreen MH, Alniss HY, Grgic SR, El-Awady RA, Almehdi AH, Mousa MK, Hamoudi RA. 2019. Comparative metabolomics of MCF-7 breast cancer cells using different extraction solvents assessed by mass spectroscopy. *Sci Rep*. 9(1):1–9. doi:10.1038/s41598-019-49509-y.
- Septaningsih DA, Darusman LK, Afendi FM, Heryanto R. 2018. Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) fingerprint combined with chemometrics for identification of metabolites content and biological activities of *Curcuma Aeruginosa*. *Indones J Chem*. 18(1):43–52. doi:10.22146/ijc.25456.
- Shi JF, Wu P, Cheng XL, Wei XY, Jiang ZH. 2020. Synthesis and Cytotoxic Property of Annonaceous Acetogenin Glycoconjugates. *Drug Des. Devel. Ther.*. 14, 4993-5004.
- Sianipar NF, Purnamaningsih R, Rosaria. 2016. Bioactive compounds of fourth generation gamma-irradiated *Typhonium flagelliforme* Lodd. mutants based on gas chromatography-mass spectrometry. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 41(1). doi:10.1088/1755-1315/41/1/012025

- Sik B, Kapcsándi V, Székelyhidi R, Hanczné EL, Ajtony Z. 2019. Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the lamiaceae family. *Nat Prod Commun.* 14.
- Silva CL, Perestrelo R, Capelinha F. *et al.* 2021. An integrative approach based on GC-qMS and NMR metabolomics data as a comprehensive strategy to search potential breast cancer biomarkers. *Metabolomics.* 17:72.
- Song X, Wang Y, Gao L. 2020. Mechanism of antioxidant properties of quercetin and quercetin-DNA complex. *J. Mol. Model.* 26(6):133.
- Subramani, M. Urrea, C.A. Kalavacharla, V. 2022. Comparative Analysis of Untargeted Metabolomics in Tolerant and Sensitive Genotypes of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds Exposed to Terminal Drought Stress. *Metabolites.* 12: 944. doi: 10.3390/metabo12100944.
- Sudevan S, Paramasivam R, Sundar S, VijayarghavanR. 2017. Evaluation Of Metabolic Compounds Of *Catharanthus roseus* And Its Anticancer Activity. *European J Pharm Med Res.* 4(9):282-29.
- Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. 2015. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid.-based Complement. Altern. Med.* 2015:595393.
- Swallah MS, Sun H, Affoh R, Fu H, Yu H. 2020. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *Int J Food Sci.* Article ID 9081686, 8 pages.
- Syed-Najmuddin SUF, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Abd Rahman NM. 2016. Anti-cancer effect of Annona Muricata Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med.* 16(1):1–20. doi:10.1186/s12906-016-1290-y.
- Taher ZM, Agouillal F, Lim JR, Marof AQ, Dailin DJ, Nurjayadi M, Razif ENM, Gomaa SE, El Enshasy HA. 2019. Anticancer molecules from *Catharanthus roseus*. *Indones J Pharm.* 30(3):147–156. doi:10.14499/indonesianjpharm30iss3pp147.
- Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, Lee LH, Goh BH. 2016. *Gynura procumbens*: An overview of the biological activities. *Front Pharmacol.* 7 MAR. doi:10.3389/fphar.2016.00052.
- Tawfike AF, Romli M, Clements C, Abbott G, Young L, Schumacher M, Diederich M, Farag M, Edrada-Ebel RA. 2019. Isolation of anticancer And Anti-Trypanosome Secondary Metabolites From The Endophytic Fungus *Aspergillus Flocculus* Via Bioactivity Guided Isolation and MS based metabolomics. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 1106–1107 October 2018:71–83. doi:10.1016/j.jchromb.2018.12.032.
- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. 2007. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules.* 12(3):593-606.
- Umar AH, Ratnadewi D, Rafi M, Sulistyaningsih YC. 2021. Untargeted Metabolomics Analysis Using FTIR and UHPLC-Q-Orbitrap HRMS of Two Curculigo Species and Evaluation of Their Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Metabolites.* 11:42. <https://doi.org/10.3390/metabo11010>.



- Wahab ASM, Jantan I, Haque MA, Arshad L. 2018. Exploring the Leaves of *Annona muricata* L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Front Pharmacol.* 9:661.
- Weller MG. 2012. A Unifying Review Of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis And Related Techniques. *Sensors (Switzerland)*. 12(7):9181–9209. doi:10.3390/s120709181.
- Widowati, Mudahar. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium Flagelliforme* (Lood) Bl) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 in Vitro. <https://media.neliti.com/media/publications/156140-ID-none.pdf>.
- Won JY, Son SY, Lee Sunmin, Singh D, Lee Sarah, Seok Lee J, Hwan Lee C. 2018. Strategy For Screening Of Antioxidant Compounds From Two Ulmaceae Species Based On Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules*. 23(7). doi:10.3390/molecules23071830.
- Worachartcheewan A. et al. 2020. Rational design of novel coumarins: A potential trend for antioxidants in cosmetics. *EXCLI J.* 19, 209–226.
- Wu C, Choi YH, van Wezel GP. 2016. Metabolic profiling As A Tool For Prioritizing Antimicrobial Compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 43(2–3):299–312. doi:10.1007/s10295-015-1666-x.
- Yajid AI, Ab Rahman HS, Wong MPK, Wan Zain WZ. 2018. Beneficios potenciales de *Annona muricata* en la lucha contra el cáncer: Una revisión. *Malaysian J Med Sci.* 25(1):5–15. doi:10.21315/mjms2018.25.1.2.
- Zhang J, Xu XJ, Xu W, Huang J, Zhu DY, Qiu XH, 2015. Rapid Characterization and Identification of Flavonoids in Radix Astragali by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Coupled with Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometry. *J Chromatog. Sci.* 53:945–952.

@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

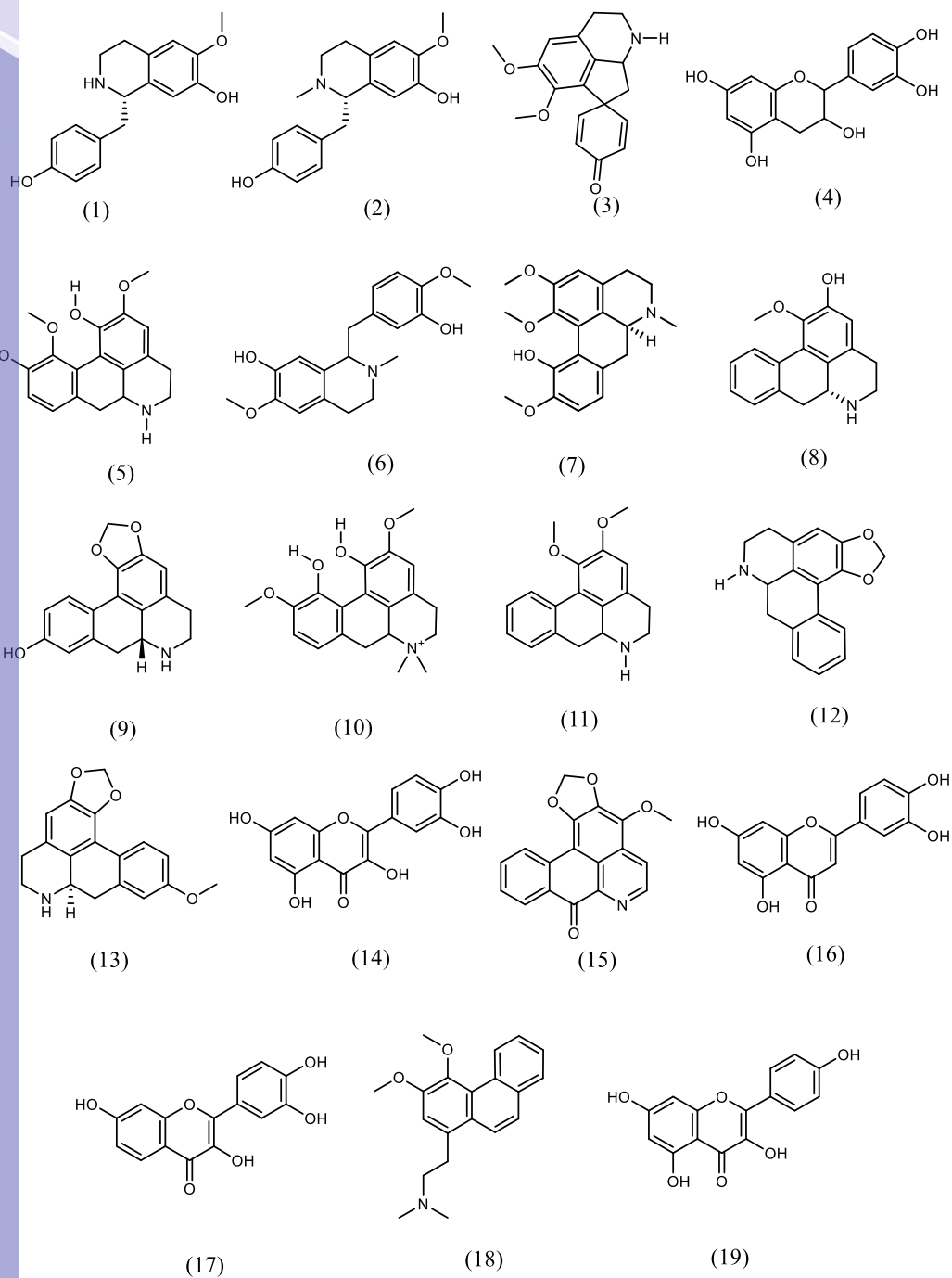


LAMPIRAN

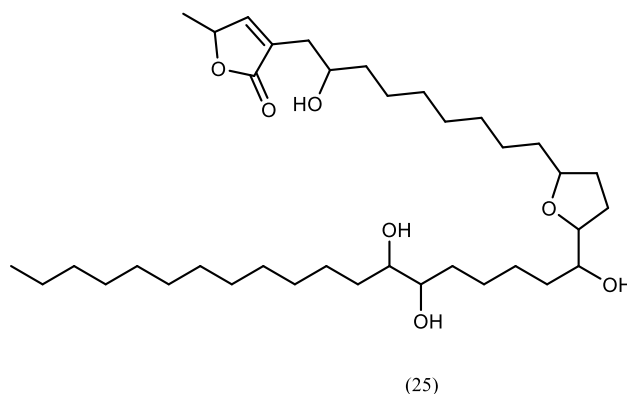
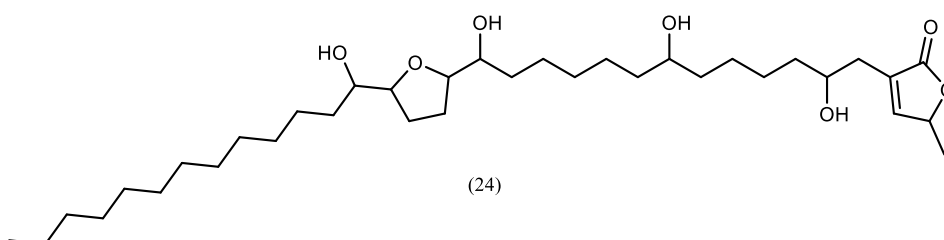
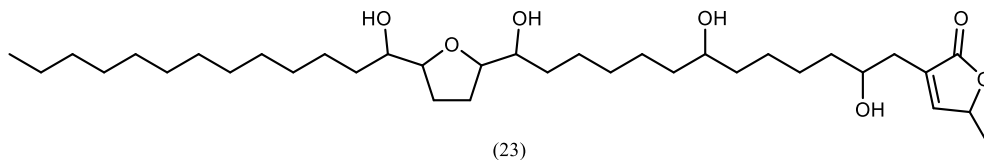
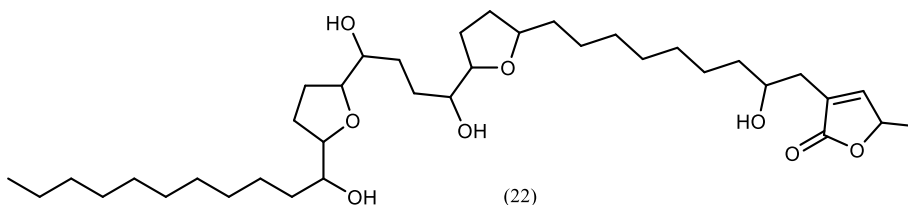
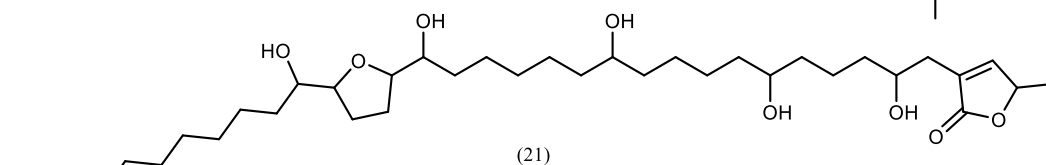
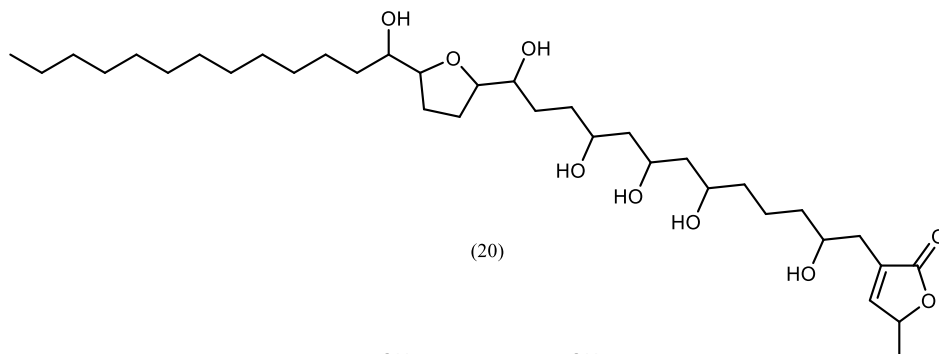
- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1 Struktur 35 senyawa dalam ekstrak daun sirsak

@Hak cipta milik IPB University

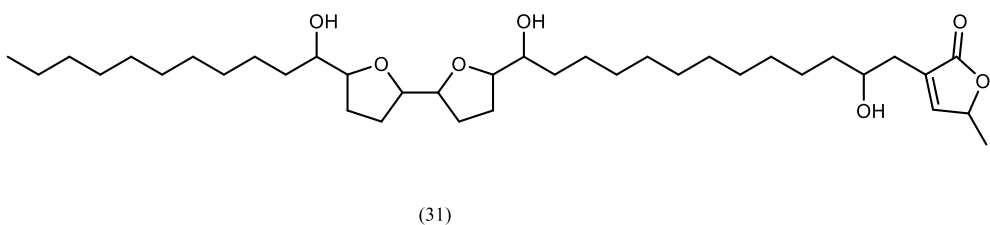
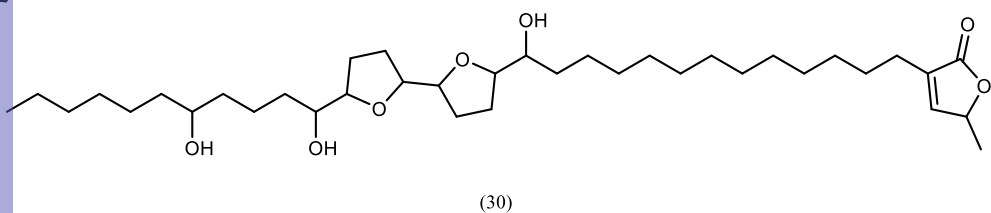
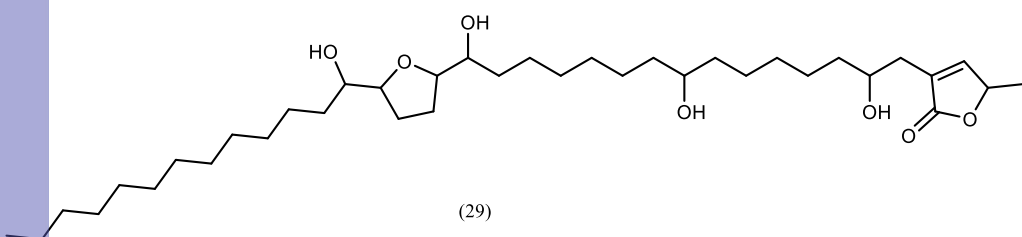
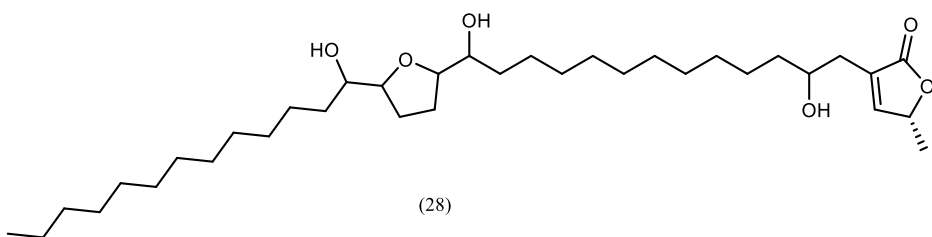
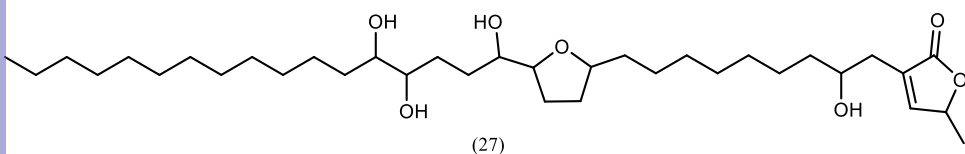
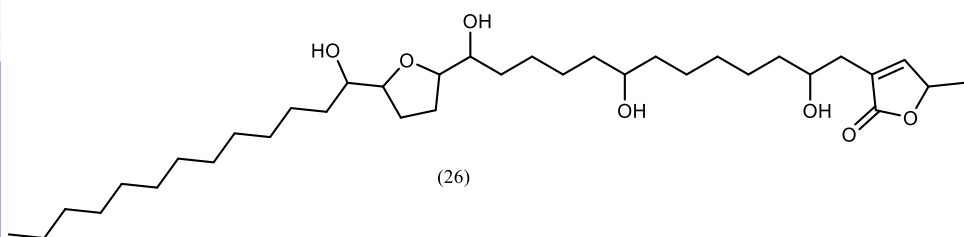


- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

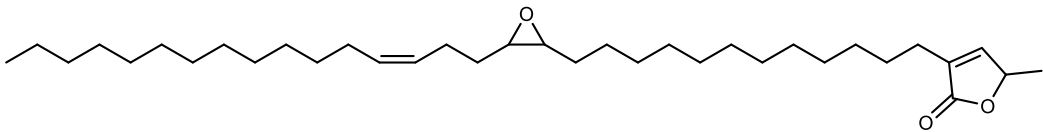
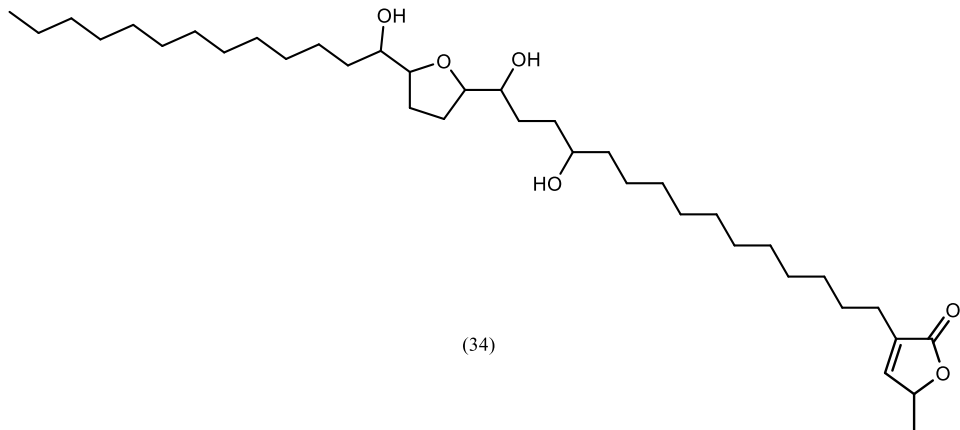
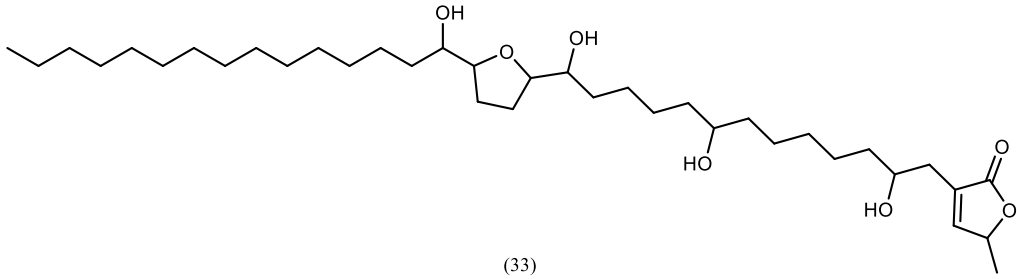
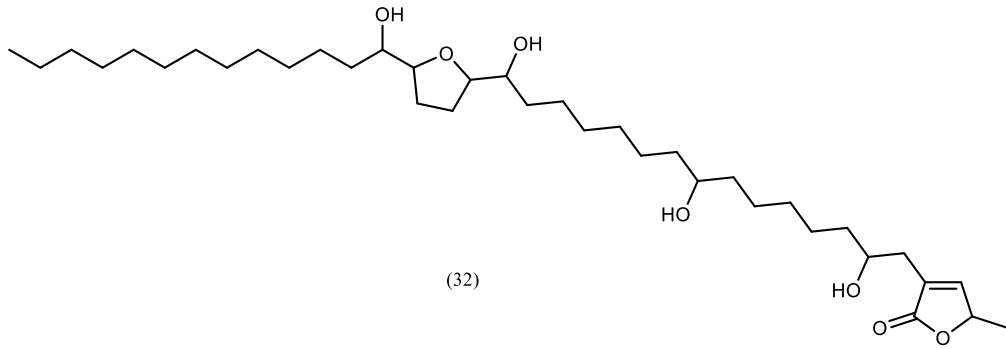
Lampiran 1 Struktur 35 senyawa dalam ekstrak daun sirsak (*lanjutan*)

Lampiran 1 Struktur 35 senyawa dalam ekstrak daun sirsak (*lanjutan*)

@Hak cipta milik IPB University



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1 Struktur 35 senyawa dalam ekstrak daun sirsak (*lanjutan*)

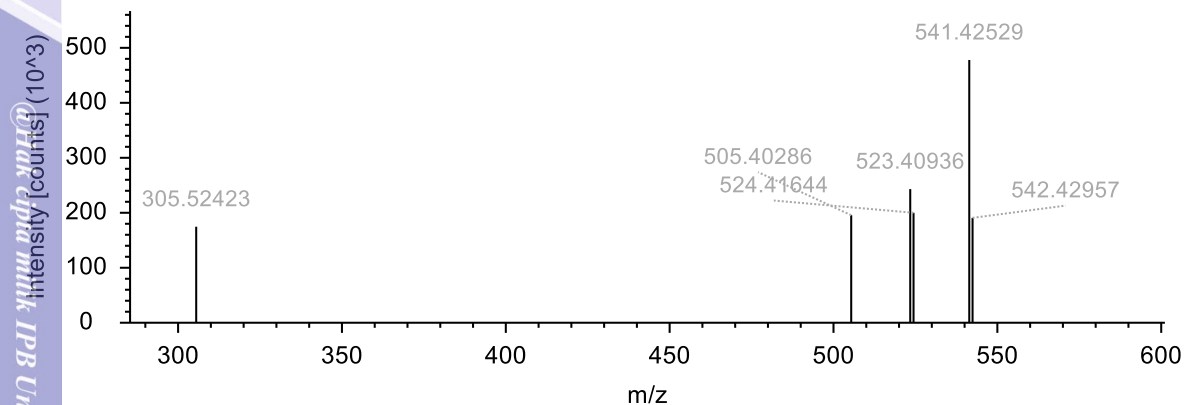
@Hak cipta milik IPB University

IPB University

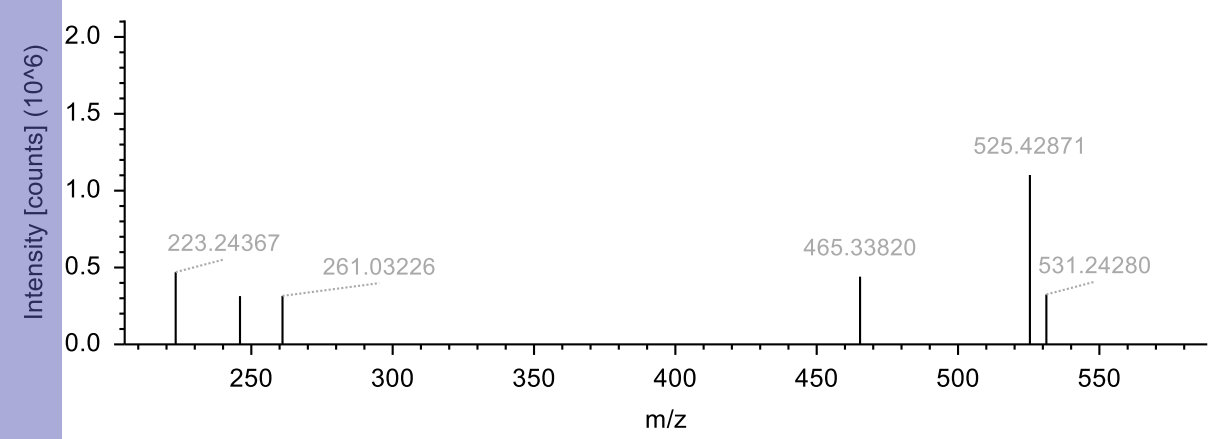


Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

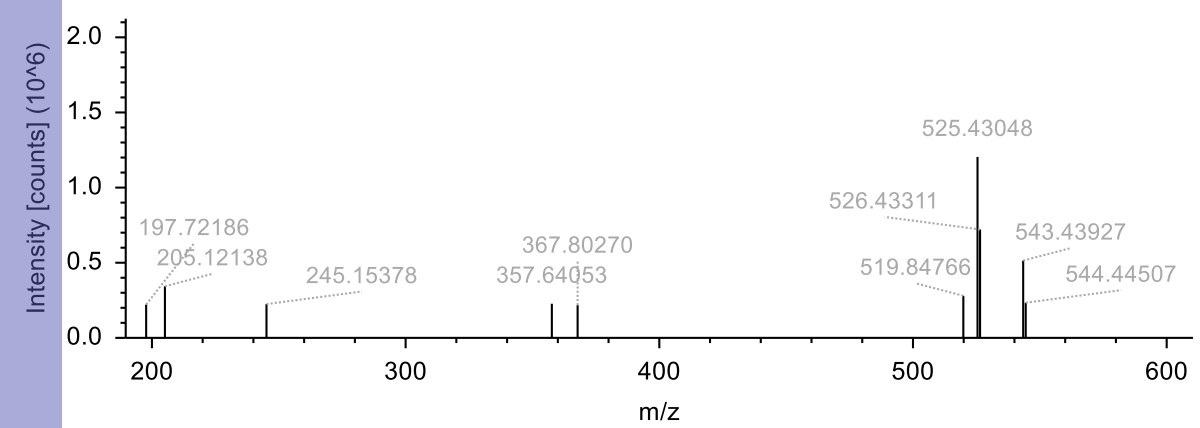
Lampiran 2 Spektrum massa dari senyawa prediksi antikanker ekstrak daun sirsak



Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{35}H_{64}O_8$, m/z 612,4585, dan waktu retensi 24,54 menit.



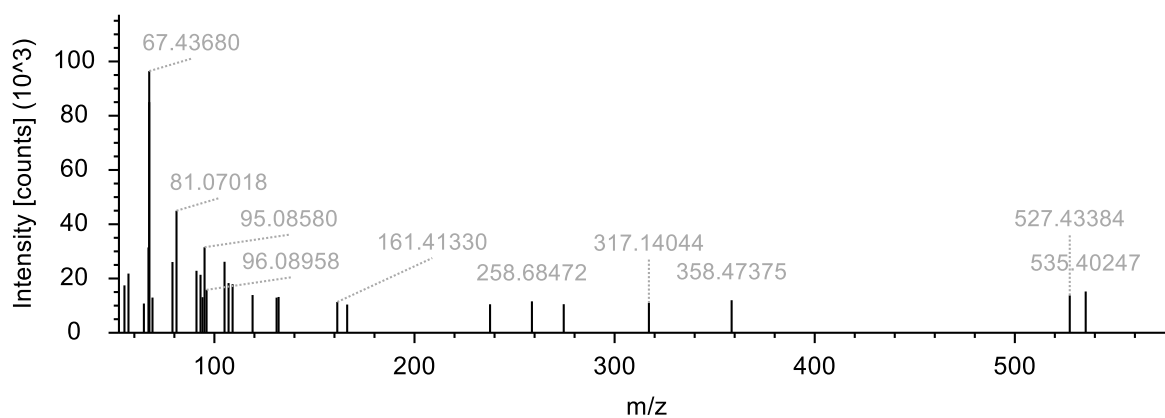
Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{35}H_{64}O_7$, m/z 596,4637, dan waktu retensi 26,91 menit.



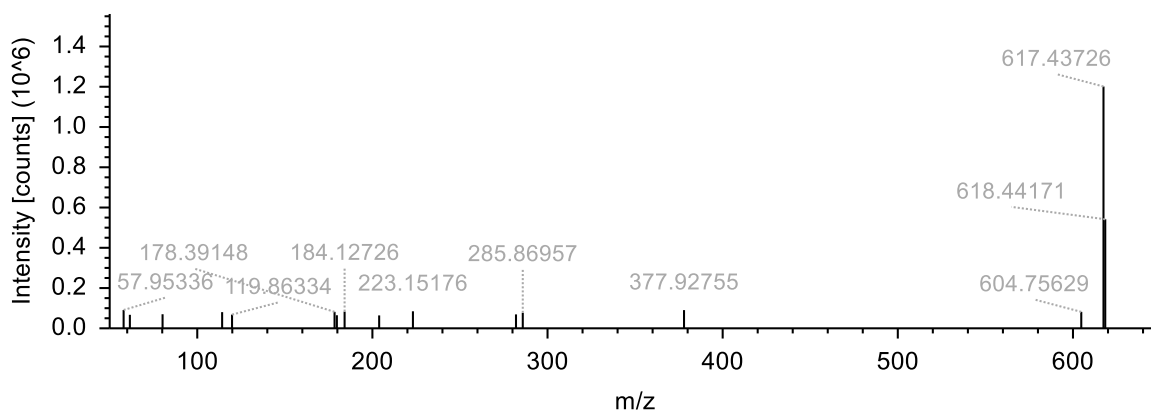
Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{35}H_{64}O_7$, m/z 596,4637, dan waktu retensi 28,24 menit.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

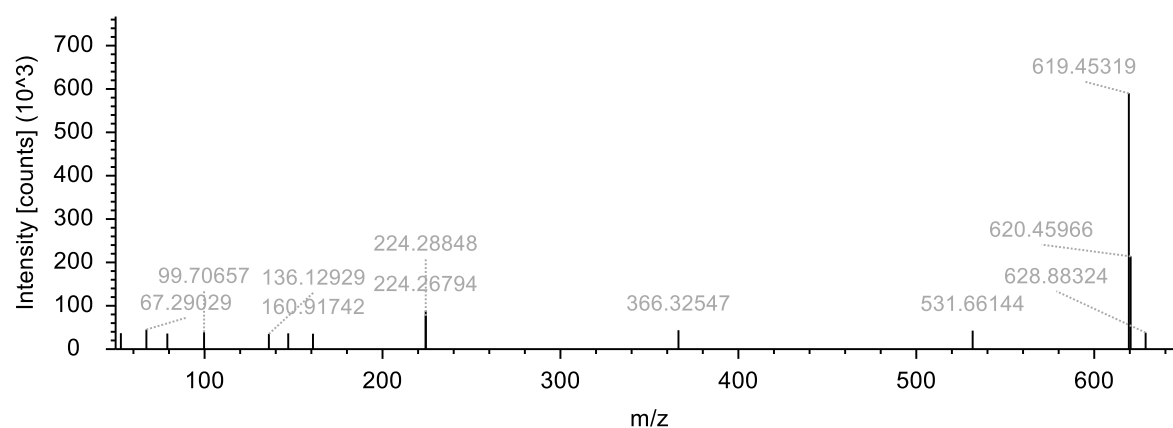
Lampiran 2 Spektrum massa dari senyawa prediksi antikanker ekstrak daun sirsak (lanjutan)



Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{35}H_{60}O_5$, m/z 561,4637, dan waktu retensi 36,13 menit.



Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{32}H_{60}N_2O_9$, m/z 616,4290, dan waktu retensi 28,99 menit.



Spektrum senyawa tak-diketahui: rumus $C_{32}H_{62}N_2O_9$; m/z 618,4453, dan waktu retensi 29,598 menit



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 2 September 1986 sebagai anak ke- 2 dari pasangan Bapak Samino dan Ibu Sunarmi. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, dan lulus pada tahun 2008. Pada tahun 2012, penulis diterima sebagai mahasiswa program magister (S-2) di Program Studi Kimia pada Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor dan menamatkannya pada tahun 2015. Kesempatan untuk melanjutkan ke program doktor pada program studi Doktor Ilmu Kimia Sekolah Pascasarjana IPB diperoleh pada tahun 2019 dengan biaya sendiri.

Penulis bekerja sebagai teknisi laboratorium di Unit Laboratorium Riset Unggulan IPB sejak tahun 2019 dan ditempatkan di Laboratorium Metabolomik. Selain itu, penulis bertugas sebagai asisten peneliti di Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM IPB tahun 2015–2019 dan Asisten Praktikum di Departemen Kimia FMIPA IPB dan Sekolah Vokasi IPB. Saat ini penulis juga sebagai dosen Program Studi Kimia Fakultas MIPA Militer di Universitas Pertahanan RI.

Selama mengikuti program S-3, penulis aktif melaksanakan penelitian terkait bidang metabolomik. Karya ilmiah berjudul “Phenolics Profiling and Free Radical Scavenging Activity of *Annona muricata*, *Gynura procumbens*, and *Typhonium flagelliforme* Leaves Extract” telah disajikan pada International Postgraduate Symposium of Biology, Biotechnology, and Bioengineering 2021 dan dipublikasi di *Indonesian Journal of Chemistry* (2021). Karya ilmiah kedua dengan judul “Phytochemical Profiling of *Gynura procumbens* Leaves and Stem Extracts Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS” telah disajikan pada International Conference of the Indonesian Chemical Society 2021 dan dipublikasi di *Indonesian Journal of Chemistry* (2022). Naskah ilmiah ketiga terkait identifikasi senyawa aktif antikanker dari daun sirsak dengan pendekatan metabolomik dalam tahap persiapan untuk dipublish pada jurnal internasional. Karya-karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari program S-3 penulis.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.