

**STUDI EKSTRAK ETANOL DAUN AZADIRACHTA INDICA
TERHADAP AKTIVITAS ASPARTATE TRANSAMINASE/
ALANINE TRANSAMINASE DAN KADAR ALFA
FETOPROTEIN PADA HEWAN MODEL
KARSINOMA HEPATOSELULER**

TESIS

**Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Sains dalam
Bidang Kimia**



Oleh:

RICADONNA RAISSA

NIM. 186090200111007

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
BIDANG KEKHUSUSAN BIOKIMIA**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

**STUDI EKSTRAK ETANOL DAUN AZADIRACHTA INDICA
TERHADAP AKTIVITAS ASPARTATE TRANSAMINASE/
ALANINE TRANSAMINASE DAN KADAR ALFA
FETOPROTEIN PADA HEWAN MODEL
KARSINOMA HEPATOSELULER**

TESIS

**Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Sains dalam
Bidang Kimia**



Oleh:

RICADONNA RAISSA

NIM. 186090200111007

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
BIDANG KEKHUSUSAN BIOKIMIA**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

LEMBAR PENGESAHAN

STUDI EKSTRAK ETANOL DAUN *AZADIRACHTA INDICA* TERHADAP AKTIVITAS *ASPARTATE TRANSAMINASE/* *ALANINE TRANSAMINASE* DAN KADAR ALFA FETOPROTEIN PADA HEWAN MODEL KARSINOMA HEPATOSELULER

Oleh:

Ricadonna Raissa

186090200111007

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 18 Desember 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam bidang **Ilmu Kimia**

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Ketua

Anggota

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP.19600903 198802 2 001

Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP.19600903 198802 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.
NIP.19720326 200212 2 001

TIM PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

Studi Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* terhadap Aktivitas *Aspartate Transaminase/Alanine Transaminase* dan Kadar Alfa Fetoprotein pada Hewan Model Karsinoma Hepatoseluler

Nama Mahasiswa : Ricadonna Raissa
 NIM : 186090200111007
 Program Studi : S2 Ilmu Kimia
 Bidang Minat : Biokimia

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES.
 Anggota : Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D.

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.
 Dosen Penguji 2 : Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si., M.Si.

Tanggal Ujian : 18 Desember 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ricadonna Raissa

NIM : 186090200111007

Program Studi : S2 Ilmu Kimia

Bidang Minat : Biokimia

Judul Tesis : Studi Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* terhadap Aktivitas *Aspartate Transaminase/Alanine Transaminase* dan Kadar Alfa Fetoprotein pada Hewan Model Karsinoma Hepatoseluler

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat unsur-unsur plagiasi karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini terdapat unsur-unsur plagiasi, maka saya bersedia tesis ini untuk digugurkan, serta diproses sesuai dengan aturan perundang-undangan yang berlaku (UU. No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Demikian pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 18 Desember 2019

Mahasiswa

Ricadonna Raissa
186090200111007

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Data Pribadi

Nama : Ricadonna Raissa
 NIM : 186090200111007
 Tempat, Tanggal Lahir : Bogor, 20 Februari 1995
 Alamat : Jalan Kertosentono, Nomor 23, Malang
 Email : donnabiochem@student.ub.ac.id

Riwayat Pendidikan

- SDN Srogol 1 (2000 – 2007)
- SMPN 2 Bogor (2007 – 2009)
- SMAK Bogor (2009 – 2013)
- S1 Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (2013 – 2017)
- Pendidikan Kedokteran Hewan (2017 - 2018)
- S2 Ilmu Kimia, Khusus Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya (2018 - 2019)

Penelitian/Publikasi

Histopathological Study of Male Rat (*Rattus norvegicus*) Small Intestine Inoculated with Rotavirus Vaccine Seed (Skripsi)

RINGKASAN

Ricadonna Raissa.186090200111007. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. 2019. **Studi Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* terhadap Aktivitas Aspartate Transaminase/Alanine Transaminase dan Kadar Alfa Fetoprotein pada Hewan Model Karsinoma Hepatoseluler**. Ketua Komisi Pembimbing Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES. Anggota Komisi Pembimbing Anna Safitri, S. Si, M.Sc., Ph. D.

Karsinoma hepatoseluler merupakan tumor ganas hepar primer berasal dari hepatosit. Obat antikanker dari herbal dibutuhkan karena mempunyai efek samping yang minimal dan harga produksi yang lebih rendah daripada menggunakan obat kemoterapi. Tanaman *Azadirachta indica* mempunyai potensi sebagai obat antikanker. Tanaman ini merupakan tanaman spesies asli Indonesia dan spesies eksotis Filipina. Perbedaan tempat asal tumbuh akan mempengaruhi kadar metabolit sekunder tanaman yang dipengaruhi oleh iklim, faktor genetik, lingkungan, kadar kimia tanah makro. Penelitian ini bertujuan mendapatkan obat antikanker herbal dari daun *Azadirachta indica* dari Indonesia (EEAII) dan Filipina (EEAIF) yang memiliki efek berpotensi sebagai antikanker paling baik. Pada penelitian ini, digunakan dietilnitrosamin (DEN) dan karbon tetraklorida (CCl₄) sebagai induktor karsinoma hepatoseluler pada hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan. Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahapan, tahapan pertama; yaitu pembuatan EEAII dan EEAIF; tahapan kedua, yaitu penelitian *in silico* interaksi ikatan senyawa bioaktif *Azadirachta indica* terhadap protein anti-apoptosis Bcl-2; tahapan ketiga, yaitu penelitian *in vivo* potensi EEAII dan EEAIF terhadap tikus jantan *Rattus norvegicus* model karsinoma hepatoseluler dengan menganalisa aktivitas enzim aspartat aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) dan kadar alpha fetoprotein (AFP). Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi DEN + CCl₄ yang dibagi dalam enam kelompok terapi dan masing – masing kelompok 4 ekor. Kelompok terapi pertama menggunakan EEAII dosis 500 mg/kgBB/hari, kelompok terapi kedua menggunakan EEAIF dosis 500 mg/kgBB/hari, kelompok terapi ketiga menggunakan obat standar Sorafenib 15 mg/hari, kelompok terapi keempat menggunakan EEAII dosis 500 mg/kgBB + Sorafenib 15 mg/hari, kelompok terapi kelima menggunakan EEAIF dosis 500 mg/kgBB + Sorafenib 15 mg/hari dan kelompok kontrol negatif. Terapi dilakukan selama 30 hari. Hasil terapi karsinoma hepatoseluler pada dosis EEAIF + Sorafenib memiliki presentase penurunan aktivitas AST yang mendekati kemampuan obat standar sorafenib sedangkan untuk presentase penurunan aktivitas ALT yang mendekati kemampuan obat standar sorafenib pada dosis EEAIF. Presentase penurunan kadar AFP terbaik ada pada dosis EEAIF. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa EEAII mengandung senyawa betulin, lupeol, sesamolin, epicatechin yang terbukti menghambat protein anti-apoptosis Bcl-2, menurunkan aktivitas AST/ALT dan kadar AFP pada tikus jantan *Rattus norvegicus* yang mendapat terapi ekstrak etanol *Azadirachta indica*.

SUMMARY

Ricadonna Raissa. 186090200111007. Postgraduate Program, Brawijaya University. 2019. **Study of Ethanol Extract of *Azadirachta indica* Leaves on Aspartate Transaminase / Alanine Transaminase Activity and Alpha Fetoprotein Levels in Animal Models of Hepatocellular Carcinoma.** Supervisor: Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES. Co-Supervisor: Anna Safitri, S. Si, M.Sc., Ph. D.

Hepatocellular carcinoma is a primary malignant tumor originating from hepatocytes. Anticancer drugs from herbs are needed because they have minimal side effects and lower production costs than using chemotherapy drugs. *Azadirachta indica* plant has potential as an anticancer drug. This plant is a plant native to Indonesia and exotic species of the Philippines. The difference in place of origin will affect the levels of plant secondary metabolites that are influenced by climate, genetic factors, environment, and chemical levels of macro soil. This study aims to obtain herbal anticancer drugs from *Azadirachta indica* leaves from Indonesia (EEAII) and the Philippines (EEAIF) which have the potential to be the best anticancer effects. In this study, diethylnitrosamine (DEN) and carbon tetrachloride (CCl₄) are used as hepatocellular carcinomas inducers in male liver (*Rattus norvegicus*) rats. This research is divided into three stages, the first stage; namely the making of EEAII and EEAIF; the second stage, *in silico* research on the interaction of the bioactive compound *Azadirachta indica* to the anti-apoptotic Bcl-2 protein; the third stage, *in vivo* research on the potential of EEAII and EEAIF on male *Rattus norvegicus* models of hepatocellular carcinoma by analyzing the activity of the enzyme aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alpha fetoprotein (AFP) levels. This study used male *Rattus norvegicus* induced by DEN + CCl₄ which were divided into six treatment groups and each group of 4 animals. The first therapy group uses EEAII dose 500 mg / kgBB / day, the second therapy group uses EEAIF dose 500 mg / kgBB / day, the third therapy group uses standard drug Sorafenib 15 mg / day, the fourth therapy group uses EEAII dose 500 mg / kgBB + Sorafenib 15 mg / day, the fifth therapy group uses EEAIF dose 500 mg / kgBB + Sorafenib 15 mg / day and negative control group. Therapy is carried out for 30 days. The results of hepatocellular carcinoma therapy at EEAIF + Sorafenib dose have a decreased percentage of AST activity which is close to the ability of the standard drug sorafenib while for the percentage decrease in ALT activity that approaches the ability of the standard sorafenib drug at EEAIF dose. The best percentage reduction in AFP levels is at EEAIF dose. The conclusion of this study is that EEAII contains compounds such as betulin, lupeol, sesamol, epicatechin which have been shown to inhibit the Bcl-2 anti-apoptotic protein, reduce AST / ALT activity and AFP levels in male *Rattus norvegicus* mice receiving ethanol extract *Azadirachta indica*.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wa Rahmatullahi wa Barokatuh

Segala puji kehadiran Allah SWT, atas segala nikmat dan petunjuk yang telah diberikan serta shalawat kepada Rasul Nya Muhammad SAW. Puji syukur kehadiran Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini sebagai salah satu persyaratan untuk mendapatkan gelar magister sains dalam bidang kimia khususnya biokimia fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penyusunan tugas akhir ini dapat terselesaikan tidak lepas dari banyaknya bantuan telah diterima penulis dari banyak pihak, oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

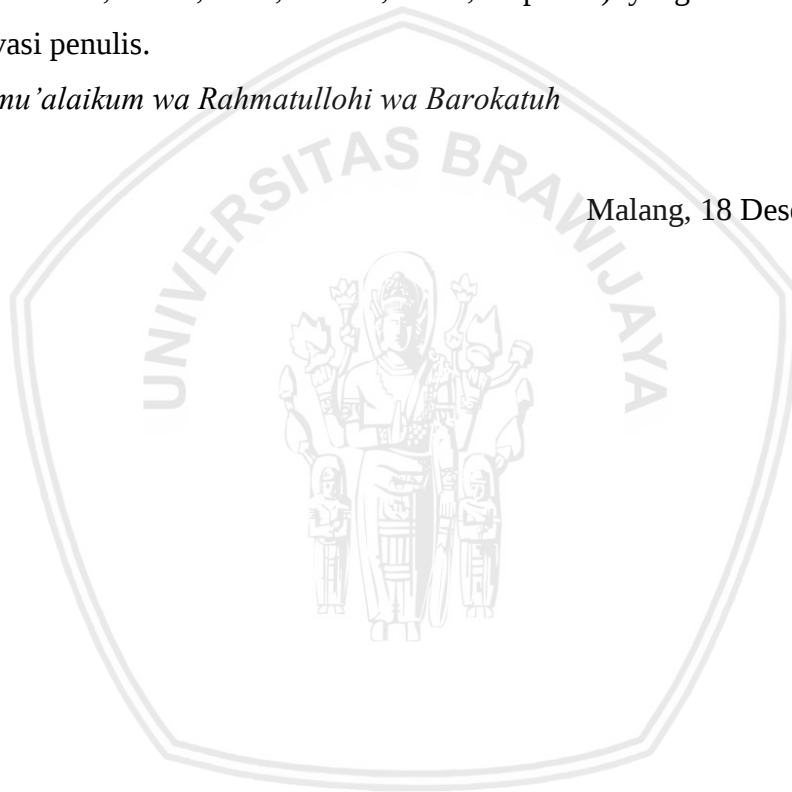
1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. yang telah penulis anggap sebagai orang tua sendiri dan juga selaku penasehat akademik serta dosen pembimbing I atas kesempatan, bimbingan serta pengarahan yang telah diberikan semenjak penulis masih sarjana hingga program pascasarjana ini.
2. Anna Safitri, S.Si, M.Sc, Ph.D, selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan serta arahan dalam permasalahan akademik yang sangat membantu penulis.
3. Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes, selaku Ketua Program Studi S2 dan penguji pertama yang sangat mendukung dan mengarahkan studi S2 penulis.
4. Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si., M.Si., Prof. Dr. Warsito, Prof. Widodo, Ph.D yang banyak memberikan masukan terhadap penelitian dan penulisan Tesis penulis.
5. Mama dan Papa yang selalu mendoakan dan mendukung penuh selama ini.
6. Pak Wibi Riawan yang telah bersedia mendampingi belajar IHK dan berdiskusi tentang penelitian.
7. Ibu Dyah Kinasih yang selalu memberikan semangat.
8. Tri Zulfi Anita, S.Si., M.Si dan Dayshine Nahari, S.Si., M.Si yang telah membantu dan selalu ada di saat susah dan senang
9. AKBP. Nivan Dumatubun yang telah membantu dan memberikan support kepada penulis selama penelitian.

10. Febriana Ambar Wati, drh. Fitri, drh. Abdullah Hasib, drh. Tia Sundari, Pak Bayu Biosains, Pak Maryono, Pak Dimas, Mas Hilman yang selalu bersedia memberikan bantuan selama penelitian.
11. Pak Hari, Mbak Tris terimakasih atas bantuan dalam pengurusan sidang tesis.
12. M. Fikri, M. Risto, Nur Aeni, Mimi S., Risna, Obik, Bang Vander, Mba Angel, Mba Alfi, Mba Tinok, Mba Fifi, Mba Vicky, Fathiya, Ikke, Tiara, Angger, Erica, teman2 asisten praktikum biokimia 2019 (Indi, Bigram, Elsa, Dea, Aulia), Squad S2 Kimia serta teman-teman seperjuangan PMDSU Batch III (Feri, Daniel, Putro, Fitri, Alfian, Dedi, Septiana) yang turut memberikan motivasi penulis.

Wassalamu'alaikum wa Rahmatullohi wa Barokatuh

Malang, 18 Desember 2019

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
TIM PENGUJI TESIS	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.1. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan	3
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tanaman <i>Azadirachta indica</i>	5
2.1.1. Morfologi Daun <i>Azadirachta indica</i>	5
2.1.2. Kegunaan dan Aktivitas Biologi	6
2.2. Karsinoma Hepatoseluler.....	6
2.3. Induksi DEN + CCl ₄ untuk Membuat Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Karsinoma Hepatoseluler.....	7
2.4. Terapi Karsinoma Hepatoseluler dengan <i>Gold Standard Drug</i> Sorafenib.....	10
2.5. Tikus <i>Rattus norvegicus</i> sebagai Hewan Eksperimental	10
2.6. Aspartate aminotransferase (AST) dan alanin aminotransferase (ALT).....	11
BAB III	13

KERANGKA PENELITIAN	13
3.1. Kerangka Teoritis	13
3.2. Kerangka Konsep	14
3.3. Hipotesis	15
BAB IV	16
METODE PENELITIAN	16
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	16
4.2. Alat dan Bahan	16
4.2.1. Alat	16
4.2.2. Bahan	16
4.3. Variabel Penelitian	17
4.3.1. Variabel Bebas	17
4.3.2. Variabel Terikat	17
4.3.3. Variabel Kontrol	17
4.4. Rancangan Penelitian	17
4.5. Prosedur Penelitian	18
4.5.1. Persiapan Sampel Simplisia Daun <i>Azadirachta indica</i>	18
4.5.2. Pembuatan Ekstrak Daun <i>Azadirachta indica</i>	18
4.5.3. Analisis Kandungan Kimia Daun <i>Azadirachta indica</i> dengan LC- HRMS (Liquid Chromatography –High Resolution Mass Spectroscopy)	18
4.5.4 Analisis <i>In Silico</i> Secara Molecular Docking	18
4.5.5. Persiapan Hewan Coba	19
4.5.6. Prosedur Uji Aktifitas Enzim AST dan ALT Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler	21
4.5.7. Prosedur Uji Alpha-fetoprotein Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler dengan ELISA Kit AFP Tikus Elabscience®	22
4.5.8. Analisis Data	22
BAB V	23
HASIL DAN PEMBAHASAN	23
5.1. Kandungan Bioaktif <i>Azadirachta indica</i>	23
5.1.1. Hasil Skrining Fitokimia dan Identifikasi Senyawa bioaktif Menggunakan LC-HRMS	23
5.1.2. Molecular Docking Komponen Aktif <i>Azadirachta indica</i> terhadap Reseptor Bcl-2	24

5.2.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol <i>Azadirachta indica</i> terhadap Aktivitas Enzim AST/ALT pada Hepar Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler	28
5.3.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol <i>Azadirachta indica</i> terhadap Kadar AFP pada Hepar Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler.....	32
BAB VI		34
KESIMPULAN DAN SARAN.....		34
6.1.	Kesimpulan	34
6.2.	Saran	34
DAFTAR PUSTAKA		35
LAMPIRAN.....		40

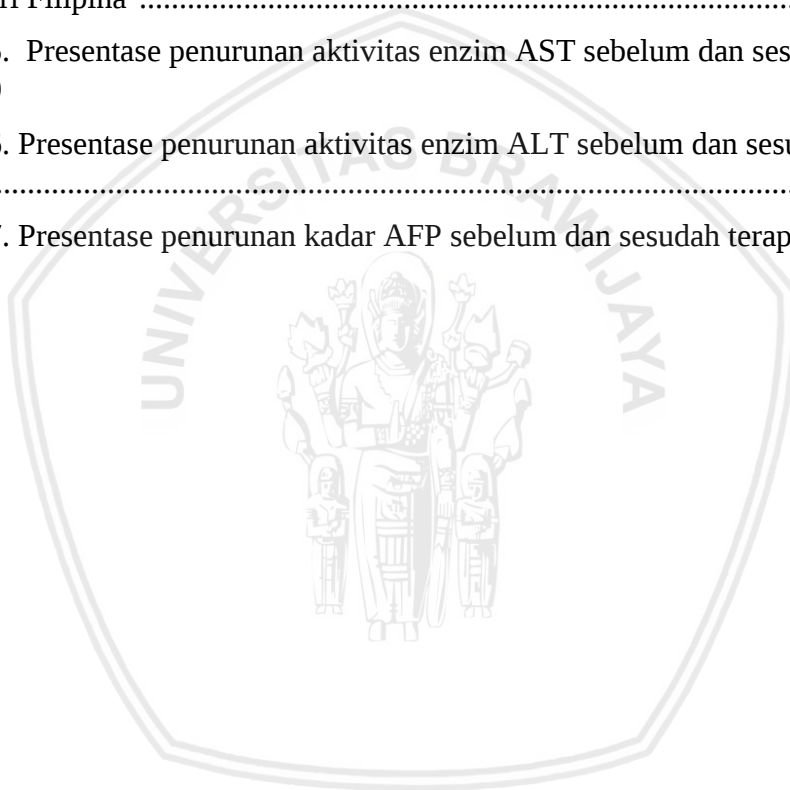


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Daun dan biji <i>Azadirachta indica</i> (kiri), pohon <i>Azadirachta indica</i> (kanan).....	5
Gambar 2.2. Struktire azadirachtin, nimbolide, quercetin	6
Gambar 2.3. Preparat sel hepatosit normal dan sel neoplastik (kiri), makroskopis nodul - nodul pada hepar (kanan).....	7
Gambar 2.4. Struktur senyawa dietilnitrosamin.....	8
Gambar 2.5. Biotransformasi DEN saat dimetabolisme (Tolba et al., 2015)	8
Gambar 2.6. Struktur senyawa karbon tertraklorida	9
Gambar 2.7. Struktur senyawa Sorafenib	10
Gambar 3.1. Alur kerangka teori	13
Gambar 3.2. Alur kerangka konseptual	14
Gambar 5.1. Interaksi senyawa bioaktif <i>Azadirachta indica</i> dengan asam amino	27
Gambar 5.2. Grafik aktivitas enzim AST pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi	28
Gambar 5.3. Grafik aktivitas enzim ALT pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi.....	31
Gambar 5.4. Grafik kadar AFP pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi.	33

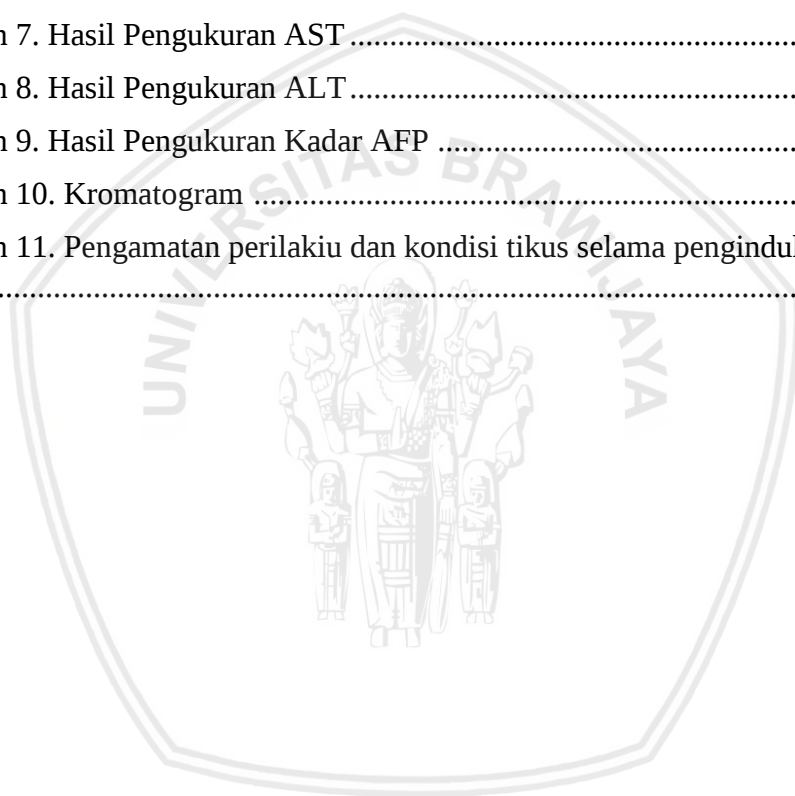
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Tabel jadwal penelitian	21
Tabel 5.1. Hasil skrining fitokimia	23
Tabel 5.2. Hasil skrining fitokimia	24
Tabel 5.3. Komponen senyawa metabolit dalam ekstrak etanol daun <i>Azadirachta indica</i> dari Indonesia.	24
Tabel 5.4. Komponen senyawa metabolit dalam ekstrak etanol Daun <i>Azadirachta indica</i> dari Filipina	25
Tabel 5.5. Presentase penurunan aktivitas enzim AST sebelum dan sesudah terapi..	29
Tabel 5.6. Presentase penurunan aktivitas enzim ALT sebelum dan sesudah terapi.....	31
Tabel 5.7. Presentase penurunan kadar AFP sebelum dan sesudah terapi.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Operasional	41
Lampiran 2. Diagram Kerja Penelitian	42
Lampiran 3. Tabel Konversi Berat Badan Tikus.	45
Lampiran 4. Preparasi Larutan	46
Lampiran 5. Penentuan Dosis	47
Lampiran 6. Pembuatan Larutan Kimia	48
Lampiran 7. Hasil Pengukuran AST	49
Lampiran 8. Hasil Pengukuran ALT	52
Lampiran 9. Hasil Pengukuran Kadar AFP	55
Lampiran 10. Kromatogram	56
Lampiran 11. Pengamatan perilaku dan kondisi tikus selama penginduksian CCl ₄	56



DAFTAR SINGKATAN

AFP	Alfa fetoprotein
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AST	<i>Aspartate amiinotransferase</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
DNA	<i>Deoxyribunucleic acid</i>
LC-HRMS	<i>Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karsinoma hepatoseluler merupakan tumor ganas hepar primer berasal dari hepatosit. Pada tahun 2012, terdapat 782.000 kasus terdiagnosis dan 746.000 kematian disebabkan karsinoma hepatoseluler. Karsinoma hepatoseluler menempati peringkat keenam neoplasma paling umum dan peringkat ketiga neoplasma paling mematikan (Forner *et al.*, 2018). Kebanyakan kasus karsinoma hepatoseluler ditemukan pada stadium lanjut karena sulitnya mengenali gejala pada stadium awal dan pesatnya perkembangan tumor (Yang dan Roberts, 2010). Stadium lanjut tidak memungkinkan dilakukannya pengangkatan jaringan tumor. Sehingga salah satu terapi yang dapat digunakan adalah kemoterapi. Terapi kemoterapi menimbulkan efek samping yang dapat merusak sel normal, seperti sel hematopoietik, sel folikel rambut, dan lapisan epitel usus. Efek samping ini membatasi pemberian dosis kemoterapi dan memungkinkan sel kanker menjadi resisten terhadap obat kemoterapi (Chen, 2000).

Upaya menerapi karsinoma hepatoseluler dengan efektifitas tinggi, efek samping minimal adalah menggunakan obat herbal. Penggunaan herbal sebagai obat juga dapat menurunkan tingginya biaya pengobatan kanker. Eksplorasi tanaman yang berlimpah sepanjang tahun di negara tropis membawa daun *Azadirachta indica* terpilih sebagai kandidat antikanker untuk diteliti.

Tanaman *Azadirachta indica* merupakan tanaman spesies asli Indonesia dan spesies eksotis Filipina. Tanaman ini mudah didapatkan di Pulau Jawa dan Madura. Sedangkan di Filipina mudah ditemukan di daerah Camiling. Daerah Madura dan Camiling sama-sama merupakan daerah iklim tropis kering tetapi memiliki kondisi tanah dan lingkungan yang berbeda. Spesies tanaman yang sama tumbuh di bawah kondisi lingkungan yang berbeda mempengaruhi kadar metabolit sekunder tanaman tersebut. Kandungan metabolit sekunder tanaman dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan, kadar kimia tanah makro (Sampaio *et al.*, 2016). Sehingga pada penelitian ini dilakukan skrining kandungan metabolit sekunder menggunakan

teknik *LC-HRMS* untuk mengetahui perbedaan senyawa bioaktif yang terkandung dalam masing-masing ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia (EEAII) dan Filipina (EEAIF).

Induksi apoptosis merupakan salah satu strategi aktif untuk menghentikan proliferasi sel kanker. Kejadian apoptosis diatur oleh protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Protein Bcl-2 merupakan protein anti-apoptosis. Penghambatan protein Bcl-2 dapat menginduksi apoptosis (Czabotar *et al.*, 2014). Penelitian sebelumnya mengenai efek ekstrak kasar etanol daun *Azadirachta indica* terhadap kanker prostat, kanker mammae dan kanker bukal secara *in vivo* terbukti dapat meningkatkan apoptosis (Kumar *et al.*, 2006 ; Subapriya dan Nagini, 2005). Senyawa bioaktif daun *Azadirachta indica* yang berpotensi memicu apoptosis diantaranya adalah nimbolide, quercetin, limonoid (Alzohairy, 2016; Elumalai dan Arunakaran, 2014). Dari data penelitian diatas maka dilakukan studi pendahuluan untuk mengetahui seberapa besar potensi kemampuan senyawa bioaktif EEAII menginduksi apoptosis dengan menggunakan metode *in silico*.

Manifestasi klinik disfungsi hati akibat karsinoma hepatoseluler yang timbul diukur dengan mengamati produk hepatosit yang nekrotik pada sirkulasi. Produk hepatosit yang nekrotik berupa *aspartate aminotransferase* (AST) dan *alanine aminotransferase* (ALT). Oleh karena itu pemeriksaan aktivitas enzim AST dan ALT merupakan petunjuk untuk menentukan kerusakan hepatosit.

Selain AST dan ALT, manifestasi klinis sebagai biomarker spesifik untuk mendeteksi karsinoma hepatoseluler adalah kadar alpha-fetoprotein (AFP) (Wang and Wang, 2018). Sel karsinoma hepatoseluler dapat memodifikasi antigen permukaan mereka sendiri dan mengubah lingkungan mikro di sekitar lesi tumor untuk melaksanakan imunitas. AFP dapat memicu proliferasi sel karsinoma hepatoseluler dan angiogenesis kanker, tetapi juga meningkatkan efek antiapoptosis sel kanker (Zhu *et al.*, 2016). Dengan demikian, AFP memainkan peran penting dalam pengembangan dan perkembangan kanker hati. Peran AFP sudah teruji sebagai *biomarker* karsinoma hepatoseluler, tetapi masih kontroversial dalam pemantauan respon terhadap pengobatan. Sehingga pada penelitian ini akan menganalisis nilai AFP sebelum dan sesudah terapi EEAII dan EEAIF terhadap karsinoma hepatoseluler.

Untuk menemukan daun *Azadirachta indica* yang memiliki potensi efek antikanker pada karsinoma hepatoseluler terbaik antara Indonesia dan Filipina dilakukan studi pendahuluan dengan metode *in silico* mengenai interaksi senyawa nmetabolit sekunder EEAI dan EEAIIF terhadap protein anti-apoptosis Bcl-2 dan studi secara *in vivo* menggunakan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dietilnitrosamin (DEN) dan karbon tetraklorida (CCl₄) dengan manifestasi klinis biokimia aktivitas enzim hepar AST/ALT dan kadar AFP.

1.1. Rumusan Masalah

1. Apa komponen senyawa bioaktif pada EEAI dan EEAIIF serta bagaimana hasil analisis *molecular docking* senyawa bioaktif EEAI dan EEAIIF terhadap protein anti-apoptosis Bcl-2?
2. Apakah terapi EEAI, EEAIIF dan terapi campuran dengan Sorafenib dapat mempengaruhi aktivitas enzim AST dan ALT pada hepar tikus putih model karsinoma hepatoseluler dibandingkan dengan obat Sorafenib sebagai *gold standard*?
3. Apakah terapi EEAI, EEAIIF dan terapi campuran dengan Sorafenib dapat mempengaruhi kadar AFP pada hepar tikus putih model karsinoma hepatoseluler dibandingkan dengan obat Sorafenib sebagai *gold standard*?

1.3. Tujuan

1. Mengidentifikasi senyawa bioaktif ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina serta menentukan secara *in silico* senyawa bioaktif yang berkemampuan sebagai antikanker.
2. Membuktikan bahwa terapi EEAI, EEAIIF dan terapi campuran dengan Sorafenib menurunkan aktivitas enzim AST/ALT pada hepar tikus putih model karsinoma hepatoseluler dibandingkan dengan obat Sorafenib sebagai *gold standard*.
3. Membuktikan bahwa terapi EEAI, EEAIIF dan terapi campuran dengan Sorafenib menurunkan kadar AFP pada hepar tikus putih model

karsinoma hepatoseluler dibandingkan dengan obat Sorafenib sebagai *gold standard*.

1.4. Batasan Masalah

1. Daun *Azadirachta indica* diperoleh dari daerah Indonesia dan Filipina.
2. Analisis senyawa bioaktif ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dilakukan dengan teknik *LC-HRMS*.
3. Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 80% selama 24 jam.
4. Hewan coba yang digunakan diperoleh dari laboratorium Biosains, Malang berupa tikus jantan strain Wistar (*Rattus norvegicus*).
5. Dosis inisiasi DEN 1% yang digunakan adalah 1 mL/kgBB *single injection* secara intraperitoneal.
6. Dosis induksi karbon tertriklorida (CCl₄) 10% yang digunakan adalah 50 mg/kgBB 4x/minggu selama 7 minggu.
7. *Synthetic gold standard drug* untuk terapi hepatoselular karsinoma adalah Sorafenib (Nexavar®) dengan dosis 15 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 2 minggu.
8. Dosis ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina yang digunakan yaitu 500 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 2 minggu.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* Indonesia dan Filipina dalam pengobatan anti kanker karsinoma hepatoseluler.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman *Azadirachta indica*

2.1.1. Morfologi Daun *Azadirachta indica*

Tanaman mimba (*Azadirachta indica*) adalah tanaman yang termasuk dalam famili meliaceae. Daun *Azadirachta indica* adalah daun majemuk menyirip genap dengan jumlah helaian 8 – 16. Helaian anak daun berbentuk memanjang tidak setangkup sampai serupa bentuk bulan sabit. Ujung daun *Azadirachta indica* berbentuk meruncing, pangkal daun miring, tepi daun bergerigi kasar. Taxonomi tanaman *Azadirachta indica* adalah sebagai berikut (Alzohairy, 2016).

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Rutales
Famili	:	Meliaceae
Genus	:	<i>Azadirachta</i>
Spesies	:	<i>A. indica</i>



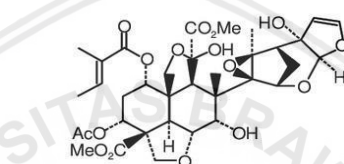
Gambar 2.1. Daun dan biji (kiri) dan pohon (kanan) *Azadirachta indica*.

Tanaman *Azadirachta indica* tumbuh di daerah tropis, di dataran rendah pada ketinggian 300 meter di atas permukaan air laut, ditempat kering (daerah yang memiliki curah hujan dibawah 500 mm per tahun), berbatu, berpasir bahkan di tanah yang miskin mineral. Tanaman *Azadirachta indica* dapat tumbuh juga pada daerah yang memiliki curah hujan tinggi dengan ciri khas tanaman yang akan menghasilkan daun lebih banyak atau vegetatif, namun saat tumbuh pada daerah yang memiliki curah hujan dibawah 5000 mm per tahun tanaman akan menghasilkan biji atau generatif. Tanaman *Azadirachta indica* di Indonesia bisa

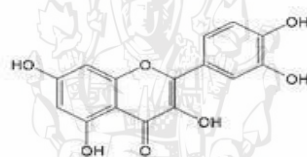
ditemui hampir di semua daerah terutama di Jawa Barat, Jawa Timur dan Madura (Turang, 2016).

2.1.2. Kegunaan dan Aktivitas Biologi

Tanaman *Azadirachta indica* umumnya digunakan pada pengobatan Ayurveda India (Brahmachari, 2004). Daun *Azadirachta indica* memiliki beberapa khasiat pengobatan diantaranya sebagai hipoglikemik (Khosla *et al.*, 2000), anti-jamur (Lloyd *et al.*, 2005), antidiabetes (Mostofa *et al.*, 2007), anti-malaria (Okumu *et al.*, 2007), hepatoprotektif (Pingale, 2010), anti-radang (Jagadeesh *et al.*, 2014).



Azadirachtin



Quercetin

Gambar 2.2. Struktur azadirachtin dan quercetin

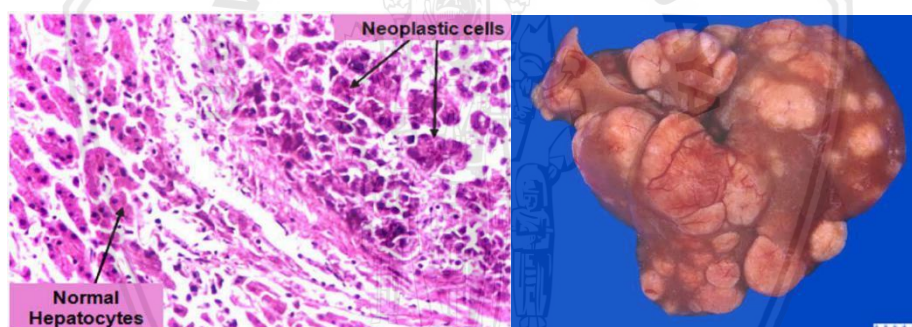
Daun *Azadirachta indica* mengandung senyawa bioaktif diantaranya adalah nimbin, nimbinin, nimbolide, meliantriol, azadirone, nimboline, nimbidin, vilasinin, nomolin, kaemferol, quercetin, rutin, isohammertin (Paul *et al.*, 2011).

2.2. Karsinoma Hepatoseluler

Karsinoma hepatoseluler merupakan kanker degan peringkat kelima terbanyak di dunia dan penyebab kematian ketiga tertinggi yang diakibat kanker. Karsinoma hepatoseluler lebih dominan pada laki-laki daripada perempuan dengan perbandingan 4: 1. Karsinoma hepatoseluler merupakan penyakit neoplasma hepar primer ganas (Bakiri dan Wagner, 2013; Hamilton *et al.*, 2013). Sekitar 90-95% dari seluruh tumor hepar primer adalah karsinoma hepatoseluler yang berasal dari sel parenkim hepar. Predisposisi karsinoma hepatoseluler berhubungan dengan

infeksi virus hepatitis B dan virus hepatitis C, *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), aflatoksin, alkoholik.

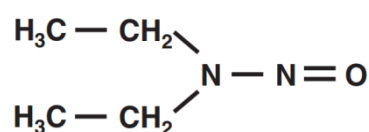
Patobiologi karsinoma hepatoseluler diawali dengan bentuk respon kerusakan hepar yang disebabkan oleh virus, parasit, toksin dan kelainan sistem imun mengakibatkan terjadinya fibrosis. Fibrosis kronis akan mengeraskan atau menghancurkan struktur internal hepar. Sel stelata yang merupakan sel diam akan terkativasi, berproliferasi dan mensintesis jaringan matriks fibrotik kolagen tipe I bila terjadi kerusakan. Hal ini mengakibatkan terjadinya jaringan kolagen yang berlebih. yang akan membuat hepar mengeras. Jaringan hepar yang mengeras menekan pembuluh darah, sehingga aliran darah tak lancar yang mengakibatkan kematian sel hepatosit. Jaringan hepar rusak sehingga sel tidak bisa berapoptosis dengan baik. Sel hepar akan terus proliferasi, sel rusak juga berproliferasi dan beregenerasi. Sehingga timbul nodul.



Gambar 2.3. Preparat sel hepatosit normal dan sel neoplastik (kiri), makroskopis nodul - nodul pada hepar (kanan)

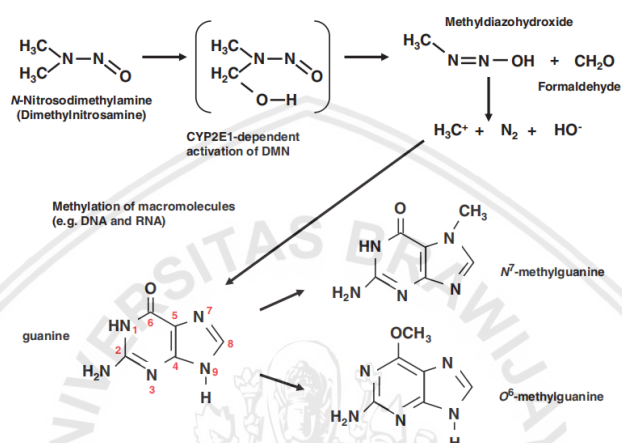
2.3. Induksi DEN + CCl₄ untuk Membuat Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Karsinoma Hepatoseluler

Dietilnitrosamin (DEN) adalah senyawa yang termasuk dalam golongan n-nitrosamin. Nitrosamin merupakan senyawa yang memiliki struktur kimia N-N=O=N-N=O.



Gambar 2.4. Struktur senyawa dietilnitrosamin (DEN)

DEN termasuk zat genotoksik yang digunakan sejak tahun 1960 untuk menginduksi karsinoma hepatoseluler (Bakiri dan Wagner, 2013). Dalam tubuh di dalam sel hepatosit oleh enzim sitokrom P450, DEN mengalami bioaktivasi secara biotransformasi enzimatik menjadi zat karsinogen (Qi *et al.*, 2008).

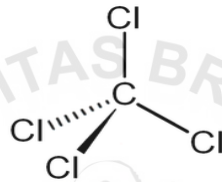
**Gambar 2.5.** Biotransformasi DEN saat dimetabolisme (Tolba *et al.*, 2015)

Biotransformasi DEN oleh sitokrom P450 mengarah pada pembentukan zat antara reaktif yang merupakan penyebab dalam pembentukan dimetilasi makromolekul yaitu nitrosamin primer yang bersifat tidak stabil. Molekul nitrosamin primer mengalami tautomerisasi dengan sebagian besar molekul-molekul selular. Jika terjadi alkilasi pada tingkat DNA maka akan menyebabkan pembentukan N⁷-methylguanine dan O⁶-methylguanine (Gambar 2.5). Dealkilasi DEN menyebabkan aktifnya metabolit mutagenik yang dapat dimodulasi dengan CCl_4 atau phenobarbital (PB) (Tolba *et al.*, 2015)

Selain itu, bioaktivasi DEN oleh cytochrome P450 dapat menghasilkan reactive species oxygen (ROS). ROS memiliki beberapa mekanisme yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Mekanisme yang pertama yaitu dengan menyebabkan peroksidasi lipid di membran dan organel-organel sel. Reaksi antara lipid dan radikal bebas ini akan menghasilkan peroksida yang merusak sel membran secara ekstensif. Mekanisme lainnya yaitu radikal bebas akan merusak rantai DNA,

protein dan lipid yang dapat menyebabkan keganasan dan kematian hepatosit (Bakiri dan Wagner, 2013; Qi *et al.*, 2008)

Dalam penelitian kanker hati dengan hewan percobaan, DEN digunakan sebagai komplet karsinogen atau sebagai inisiator dalam protokol bertingkat. Jika disuntikkan tikus muda kurang dari dua minggu, ketika hepatosit masih aktif berkembang, DEN dapat bertindak sebagai karsinogen lengkap. DEN dapat bertindak insitor, ketika DEN diberikan pada tikus yang lebih dari dua minggu. Setelah proses inisiasi, dibutuhkan sebuah promotor tumor dengan penambahan fenobarbital (PB), karbon tetraklorida (CCl_4) dan diet lemak tinggi (Park *et al.*, 2009; Bakiri dan Wagner, 2013)



Gambar 2.6. Struktur Senyawa CCl_4

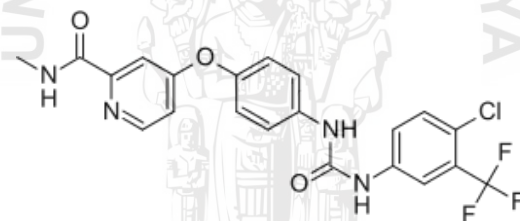
Setelah diinisiasi dengan zat genotoksik DEN, tikus diinduksi CCl_4 secara berulang dengan dosis rendah (3 mL/kg). Dalam tubuh, CCl_4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 yang menghasilkan produk merusak yaitu triklorometil radikal ($\text{CCl}_3\bullet$). Pembentukan selanjutnya peroksi triklorometil radikal, peroksidasi lipid autokatalitik akibat serangan pada seluler membran oleh radikal triklorometil peroksi, kehilangan homeostasis kalsium mengarah ke aktivitas enzim degradatif dan sitotoksisitas, dan perubahan regeneratif dan proliferasif yang berkelanjutan dalam hati sebagai respons untuk hepatotoksisitas. Peningkatan pembelahan sel bertepatan dengan peningkatan dalam frekuensi kerusakan genetik dapat membanjiri mekanisme perbaikan DNA, menghasilkan peningkatan frekuensi mutagenik dan kanker (Manibusan *et al.*, 2007).

Pemberian CCl_4 secara berkepanjangan dapat mengakibatkan perkembangan fibrosis pada jaringan hati. CCl_4 berperan sebagai agen pro-fibrinosis atau promotor tumor (Uehara *et al.*, 2014) Untuk membuat fibrosis hati lanjut, pemberian CCl_4 yang berulang akan menyebabkan anisonukleosis, manifestasi morfologis dari cedera inti sel yang ditandai oleh variasi ukuran inti hepatosit, kondisi ini terkait dengan stres oksidatif hati (Guzman *et al.*, 2011;

Uehara *et al.*, 2014). Hal tersebut dikarenakan CCl_4 dalam tubuh menyebabkan kerusakan hepar melalui radikal bebas proses inflamasi mediasi. Sel kupffer berpotensi lebih sensitif mengalami stres oksidatif dibandingkan sel hepatosit (Dutta *et al.*, 2018).

2.4. Terapi Karsinoma Hepatoseluler dengan *Gold Standard Drug* Sorafenib

Terapi karsinoma hepatoseluler lanjut menggunakan obat antikanker yaitu sorafenib. Aktivitas utama antikanker sorafenib terjadi melalui induksi kematian sel yang berkorelasi dengan aktivasi caspase, peningkatan persentase sel hipodiploid, aktivasi Bax dan pelepasan sitokrom c dari mitokondria menjadi sitosol (Fernando *et al.*, 2012). Sorafenib secara khusus mengaktifkan caspase-3 dan apoptosis pada sel hepatoma ganas tetapi tidak pada hepatosit non-ganas dalam kondisi yang telah diuji *in vitro* atau *in vivo* oleh Sonntag *et al.* (2014).



Gambar 2.7. Struktur senyawa Sorafenib

2.5. Tikus *Rattus norvegicus* sebagai Hewan Eksperimental

Eksperimen hewan adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan penggunaan hewan dalam eksperimen dalam pendidikan, pelatihan, dan penelitian. Dalam penelitian ini digunakan *Rattus norvegicus* sebagai hewan eksperimental. *Rattus norvegicus* mempunyai kepala dan badan lebih pendek dari ekor, dan telinga relatif kecil. Pendengaran dan penglihatan sangat baik. Hal ini cocok untuk tikus sebagai makhluk nokturnal. Tikus jantan digunakan karena kondisi biologisnya lebih stabil jika dibandingkan dengan betina yang dipengaruhi kondisi biologis periode siklus estrus. Taksonomi *Rattus norvegicus* menurut National Center for Biotechnology Information (1993) sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Divisi	:	Chordata
Kelas	:	Mammalia
Ordo	:	Ratia
Subordo	:	Myomorpha
Famili	:	Muridae
Genus	:	<i>Rattus</i>
Spesies	:	<i>norvegicus</i>

Karakteristik utama yang membedakan tikus dengan hewan percobaan yang lain, bahwa tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak biasa di mana kerongkongan bermuara ke perut, sehingga memudahkan proses pengobatan dengan menggunakan tabung pengisi, dan tidak memiliki empedu, kandung kemih. Hewan-tikus digunakan dengan pertimbangan berikut: (1) omnivora, (2) memiliki jenis saluran pencernaan monogastrik (3) kebutuhan nutrisi yang hampir sesuai dengan manusia.

2.6. Aspartate aminotransferase (AST) dan alanin aminotransferase (ALT)

Hati merupakan pusat sintesis protein dan penyaluran asam amino keseluruhan organ-organ yang membutuhkannya, sehingga hati merupakan organ yang sangat banyak mengandung aminotransferase. Dua enzim aminotransferase yang berkaitan dengan kerusakan hepatoseluler adalah AST dan ALT. Bila jaringan mengalami kerusakan akut, karsinoma hepatoseluler, kadar AST/ALT didalam serum akan meningkat (Huang *et al.*, 2006)

Enzim AST memindahkan gugus amino antara asam glutamat dan asam ketoglutarat dan dapat ditemukan pada organ lain selain hati yaitu jantung. Enzim AST berlokasi di mitokondria hepatosit. Kadar enzim AST dapat meningkat secara bermakna pada neoplasma primer dan sekunder. Prinsip rekasi penentuan aktivitas enzim AST adalah mengkatalisis reaksi antara alpha ketoglutarat dengan asam L-aspartat menghasilkan suatu asam L-glutamat. Asam oksaloasetat yang terbentuk, dengan adanya MDH, akan direduksi menjadi asam malat, bersamaan dengan itu NADH menjadi NAD⁺. NADH diabsorpsi pada panjang gelombang 340 nm. Kecepatan penurunan absorpsi pada panjang gelombang tersebut sebanding dengan aktivitas AST (Huang *et al.*, 2006)

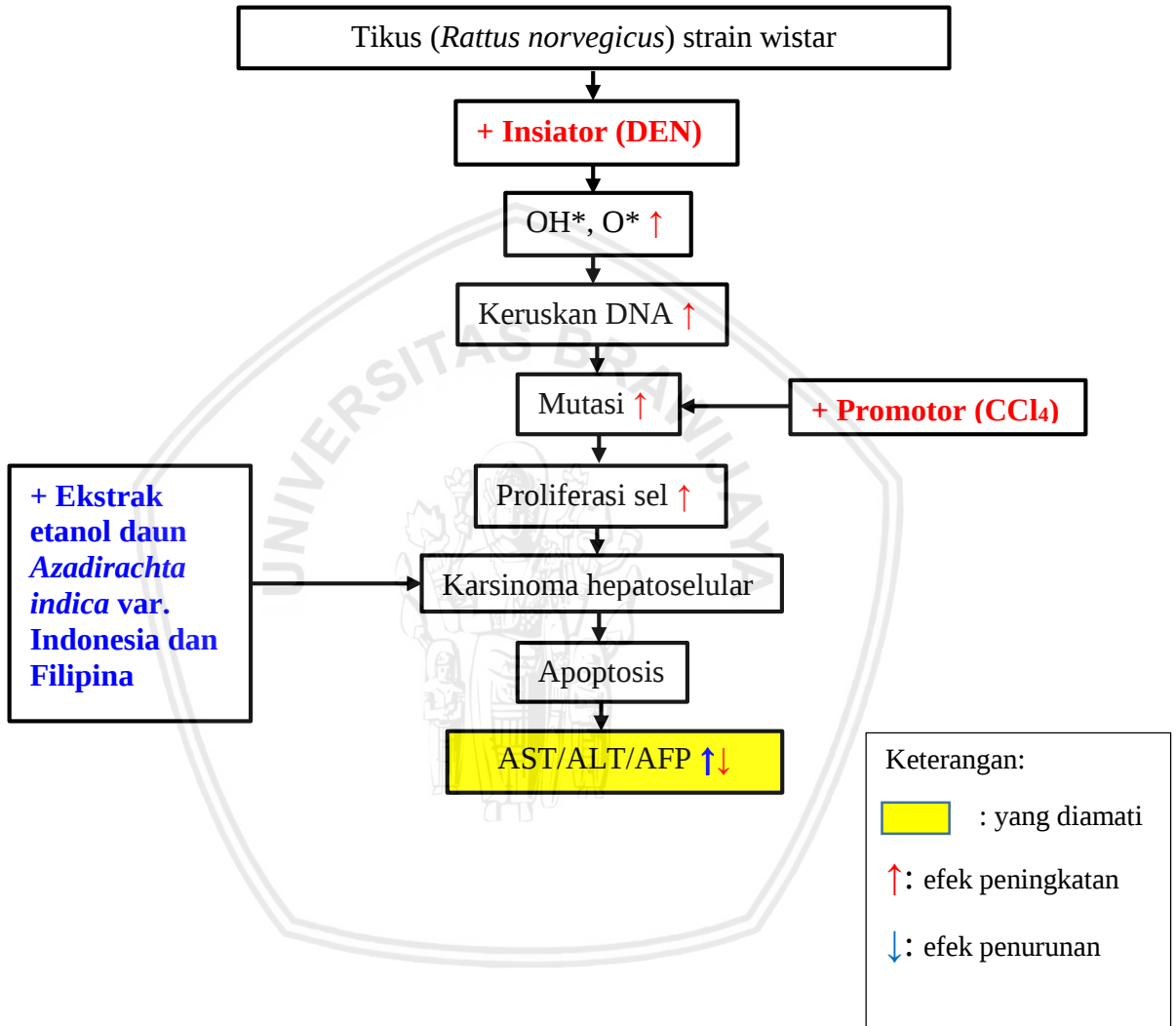
Enzim ALT merantai reaksi antara asam alanin dan alfa ketoglutamat. Kadar enzim ini paling banyak terdapat di hati sedangkan kadarnya rendah pada

ginjal, jantung dan otot. Enzim ini berlokasi di sitoplasma hepatosit. Prinsip reaksi penentuan kadar enzim ALT adalah enzim ALT mengkatalisis reaksi antara alpha ketoglutarat dengan L-alanin menghasilkan suatu asam piruvat dan asam L-glutamat. Asam piruvat yang terbentuk, dengan adanya LDH, akan direduksi menjadi asam laktat, bersamaan dengan itu NADH menjadi NAD⁺. NADH diabsorpsi pada panjang gelombang 340 nm. Kecepatan penurunan absorpsi pada panjang gelombang tersebut sebanding dengan aktivitas AST (Huang *et al.*, 2006).



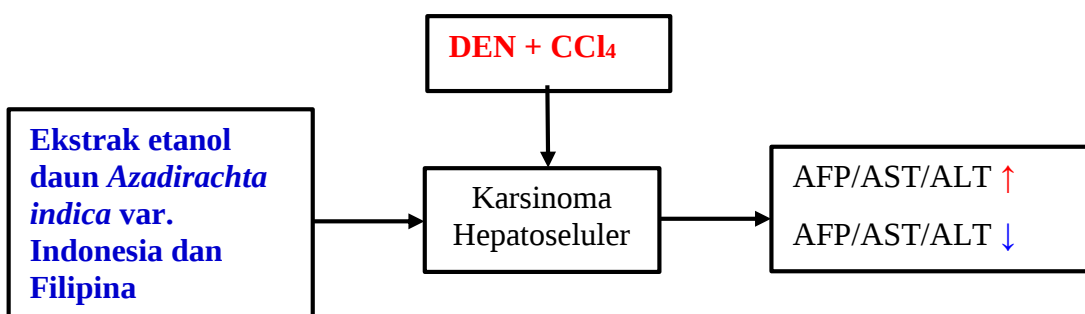
BAB III KERANGKA PENELITIAN

3.1. Kerangka Teoritis



Gambar 3.1. Alur kerangka teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

Hewan model karsinoma hepatoseluler dibuat melalui induksi inisiator tumor diethylnitrosamine (DEN) dan promotor tumor karbon tetraklorida (CCl₄). Paparan awal DEN tidak bersifat karsinogen tetapi setelah dimetabolisme oleh CYP450 di hepar, DEN mengalami bioaktivasi dengan mekanisme biotransformasi enzimatik. Hasil metabolisme tersebut akan menghasilkan senyawa pro-mutagenik yaitu *reactive oxygen species* (ROS) (Verna *et al.*, 1996; Hamid *et al.*, 2017). Kelebihan ROS dapat menyebabkan peroksidasi lipid, oksidasi protein, kerusakan DNA dan mutagenesis terkait dengan berbagai tahap pada peradangan hepar (Kang *et al.*, 2007; Shirakami *et al.*, 2012). Paparan CCl₄ (promotor tumor) sebagai zat genotoksik setelah paparan DEN akan meningkatkan resiko eror genetik, menstimulasi sel berevolusi menjadi neoplasma ganas (Santos *et al.*, 2017). Sehingga memingkatkan terjadinya karsinoma hepatoseluler.

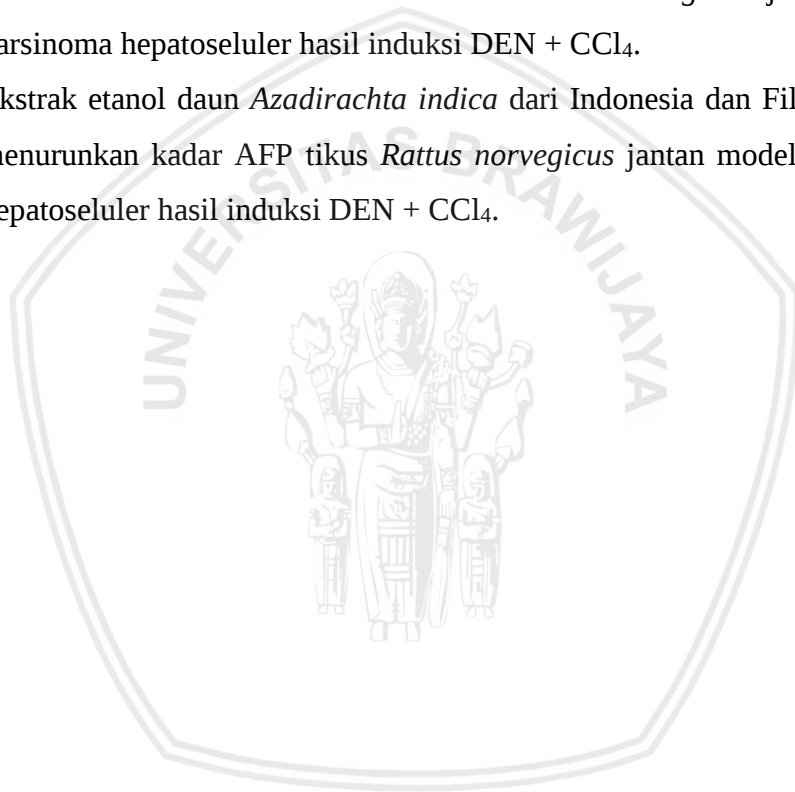
Daun *Azadirachta indica* mempunyai senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker seperti, nimbolide, limonoid, azadirone 1, azadirachtin A. Daun *Azadirachta indica* yang berasal dari dua tempat yang berbeda yaitu Indonesia dan Filipina berpotensi memiliki kandungan senyawa metabolik yang berbeda. Karena perbedaan asal tempat tumbuh akan mempengaruhi kadar metabolit sekunder (terpene dan flavonoid) tanaman.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antikanker terbaik antara ekstrak daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina. Dimana pada penelitian ini, dilihat potensi senyawa bioaktif daun *Azadirachta indica* sebagai antikanker secara *in silico* dan aktivitas enzim AST/ALT dan kadar AFP tikus (*Rattus norvegicus*) jantan model karsinoma hepatoseluler hasil diinduksi

DEN + CCl₄ setelah dilakukan terapi ekstrak daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina.

3.3. Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina memiliki senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai obat antikanker dilihat secara *in silico* terhadap protein anti-apoptosis Bcl-2.
2. Ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina menurunkan aktivitas AST/ALT tikus *Rattus norvegicus* jantan model karsinoma hepatoseluler hasil induksi DEN + CCl₄.
3. Ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina dapat menurunkan kadar AFP tikus *Rattus norvegicus* jantan model karsinoma hepatoseluler hasil induksi DEN + CCl₄.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret 2019 hingga Oktober 2019. Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Lab Riset Bersama, Fakultas Kedokteran Hewan, sedangkan perawatan dan pembedahan hewan coba dilakukan di laboratorium hewan coba Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang.

4.2. Alat dan Bahan

4.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah preparat kaca, penutup kaca, tabung, penggiling, pipet tetes, tabung reaksi, labu ukur, gelas ukur, pipet volumetrik, pipet mikro, neraca analitik, blender, rotavapor, sonde, syringe, *moist chamber*, mikroskop, penangas air, *hot plate*, magnetic stirrer, ELISA reader, *Pentra C*.

4.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Azadirachta indica* yang berasal dari Indonesia dan Filipina, yaitu: diethylnitrosamine (Merck®), karbon tetraklorida (Sigma Aldrich®), etanol 10%, etanol 80%, etanol 95%, etanol 100% (Merck®), xylene (Merck®), larutan NaCl fisiologis (Otsuka®), buffer formalin 10%, *Rat Alpha-fetoprotein ELISA Kits* (Elabscience®), Reagen 1 (Reiged Diagnostic®) Tris buffer: 100 mmol/l, pH 7,8; L-aspartate: 300 mmol/l; NADH: 0.23 mmol/l (*yeast*); MDH D 0,53 U/ml (*porcine heart*); LDH D 0,75 U/ml (*microorganisms*) dan Reagen 2 AST (Reiged Diagnostic®) ketoglutarate: 75 mmol/l, Reagen 1 ALT (Reiged Diagnostic ®) (Tris buffer: 125 mmol/l, pH 7.3; L-alanine, 625 mmol/l; NADH: 0.23 mmol/l (*yeast*), LDH D 1.5 U/ml (*microorganisms*), Reagen 2 ALT (Reiged Diagnostic ®) (Ketoglutarate: 94

mmol/l), hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan umur 2 minggu dengan berat badan rata-rata 9 – 20 gram.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Dosis ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* yang berasal dari Indonesia dan Filipina sebesar 500mg/kgBB p.o dan Sorafenib 15 mg/hari p.o.

4.3.2. Variabel Terikat

Aktivitas *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT), kadar alpha fetoprotein (AFP).

4.3.3. Variabel Kontrol

Umur dan berat badan tikus, jenis dan strain tikus, kondisi eksperimental.

4.4. Rancangan Penelitian

Hewan coba yang digunakan merupakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan umur 2 minggu dengan berat badan rata-rata 9 – 20 gram. Tikus diperoleh dari Institut Biosains Universitas Brawijaya. Hewan coba terbagi atas empat kelompok. Penentuan banyaknya sampel minimal diperoleh dari rumus Federer (Kasprianti, 2012). Berdasarkan hasil perhitungan dibawah ini, jumlah ulangan minimal setiap kelompok adalah 6 ekor.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20/5, \text{ maka, } r \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok = 4

r = jumlah pengulangan tiap terapi

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Persiapan Sampel Simplisia Daun *Azadirachta indica*

Daun *Azadirachta indica* diperoleh dari daerah Indonesia dan Filipina. Daun *Azadirachta indica* yang telah dikumpulkan, dicuci dengan air yang mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya tanaman dikering-anginkan selama 3 hari. Daun *Azadirachta indica* yang sudah kering dilakukan penggilingan untuk mendapatkan serbuk dengan ukuran 60 mesh. Serbuk halus yang diperoleh siap dimaserasi.

4.5.2. Pembuatan Ekstrak Daun *Azadirachta indica*

Serbuk kering daun *Azadirachta indica* sebanyak 50 gram dimaserasi dengan 150 mL etanol 80% (1:3) selama 24 jam. Maserat diperoleh dengan penyaringan. Kemudian dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kasar.

$\% \text{Rendemen} = (\text{Jumlah ekstrak yang dihasilkan (g)}) / (\text{Jumlah simplisia yang diekstraksi (g)}) \times 100\%$

4.5.3. Analisis Kandungan Kimia Daun *Azadirachta indica* dengan LC-MS (*Liquid Chromatography –High Resolution Mass Spectroscopy*)

Ekstrak daun *Azadirachta indica* dipisahkan dan diidentifikasi secara kualitatif menggunakan *LC-HRMS*. Prediksi senyawa dalam ekstrak dapat ditentukan berdasarkan pada berat molekul dari senyawa yang terdeteksi oleh instrumen. Pemisahan kromatografi cair (*liquid chromatography*) dipisahkan menggunakan kolom hypersil gold (1,9 μm x 2,2 mm x 100 mm. Eluen yang digunakan disesuaikan dengan sifat dari pada senyawa target yang akan dianalisis.

4.5.4 Analisis *In Silico* Secara Molecular Docking

Ligan adalah senyawa terpene dan flavonoid yang teridentifikasi hasil LC-MS dan ditambahkan senyawa *gold standard drug* karsinoma hepatoseluler (Sorafenib). Preparasi ligan dilakukan dengan menggambar senyawa dengan *ChemDraw Ultra 12* dan disimpan dalam bentuk .sdf. BCL-2 (PDB: 2O21) berupa protein dan ligan (43B) yang diperoleh dari <http://rcsb.org>. Preparasi reseptor menggunakan program Pymol dengan menghilangkan ligan dan air yang telah berikatan dengan protein yang akan didocking. Selain itu, protein dihilangkan chain B, C dan D. Optimasi ligan dilakukan dengan program “babel” sedangkan

specific docking dilakukan dengan program Autodock Vina pada *software* PyRx 0.8. *Specific docking* dilakukan pada *Center* (X: 1,8991; Y:7,9645; Z:2,1727). *Dimensions (Angstrom)* (X: 19,1149; Y:29,26614; Z:16,5648). Hasil *docking* berupa kekuatan ikatan interaksi antara ligan dan reseptor. Analisis interaksi dengan asam amino digunakan program Ligplot+ v.2.

4.5.5. Persiapan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 2 minggu dengan berat badan 9 - 20 gram sebanyak 24 ekor. Suhu dan kondisi ruangan diatur untuk percobaan, serta pencahayaan ruangan dibuat 12:12 jam (12 jam ditempat terang, 12 jam ditempat gelap). Akhir proses aklimatisasi, tikus dibagi menjadi 6 kelompok.

Kelompok pertama (kelompok terapi A) adalah tikus model dibuat dengan cara diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu. Pada minggu ke 15 tikus diterapi dengan EEAI dosisi 500 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 30 hari.

Kelompok kedua (kelompok terapi B) adalah tikus model dibuat dengan cara diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu. Pada minggu ke 15 tikus diterapi dengan EEAI dosisi 500 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 30 hari.

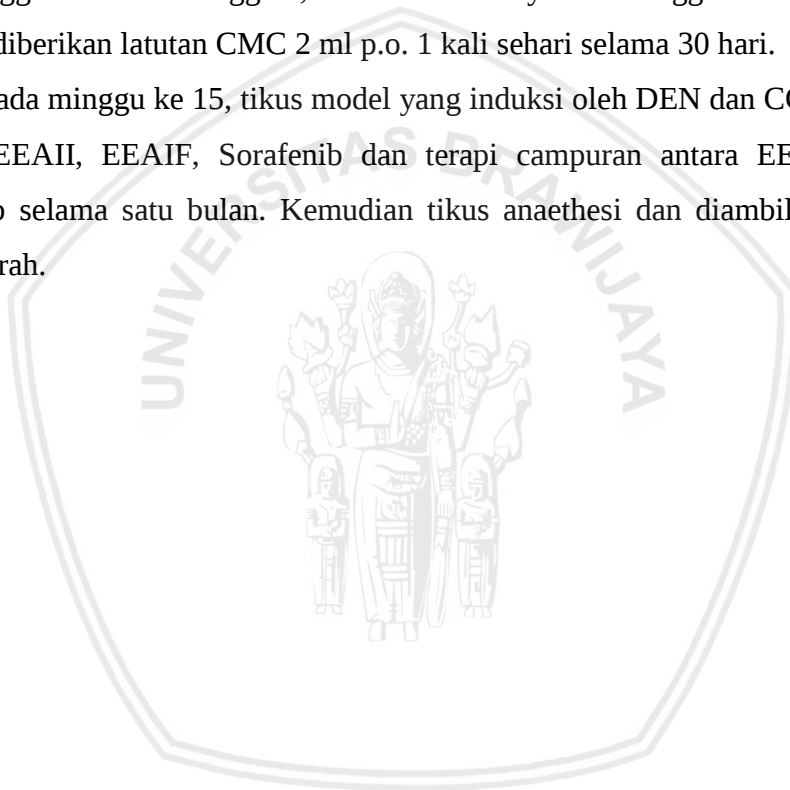
Kelompok ketiga (kelompok terapi C) adalah tikus model dibuat dengan cara diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu. Pada minggu ke 15 tikus diterapi dengan Sorafenib 15 mg/ hari p.o selama 30 hari.

Kelompok keempat (kelompok terapi D) adalah tikus model dibuat dengan cara diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu. Pada minggu ke 15 tikus diterapi dengan Sorafenib 15 mg/ hari p.o dan EEAI dosisi 500 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 30 hari.

Kelompok kelima (kelompok terapi E) adalah tikus model dibuat dengan cara diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu. Pada minggu ke 15 tikus diterapi dengan Sorafenib 15 mg/kgBB/hari p.o dan EEAlF dosis 500 mg/kgBB p.o. 1 kali sehari selama 30 hari.

Kelompok keenam (kelompok kontrol negatif) adalah tikus kontrol. Kelompok tikus ini tidak diinduksi dengan DEN tetapi diberikan minyak zaitun pada minggu ke 8 – 14 minggu 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu. Pada minggu ke 15 tikus diberikan larutan CMC 2 ml p.o. 1 kali sehari selama 30 hari.

Pada minggu ke 15, tikus model yang induksi oleh DEN dan CCl₄, diterapi dengan EEAlI, EEAlF, Sorafenib dan terapi campuran antara EEAlI dengan Sorafenib selama satu bulan. Kemudian tikus anaesthesi dan diambil organ dan serum darah.



Tabel 4.1. Tabel jadwal penelitian

	2	Minggu 8 - 14	15 - 18
Grup A	DEN 1% 20 mg/Kg single injection i.p.	CCl ₄ 10% 0,3 mL/ ekor 4x/minggu s.c.	Ekstrak Etanol daun <i>Azadirachta indica</i> dari Indonesia (500 mg/kgBB/hari p.o.)
Grup B	DEN 1% 20 mg/Kg single injection i.p.	CCl ₄ 10% 0,3 mL/ekor 4x/minggu s.c.	Ekstrak Etanol daun <i>Azadirachta indica</i> dari Filipina (500 mg/kgBB/hari p.o.)
Grup C	DEN 1% 20 mg/Kg single injection i.p.	CCl ₄ 10% 0,3 mL/ekor 4x/minggu s.c.	Sorafenib 15 mg/ hari p.o
Grup D	DEN 1% 20 mg/Kg single injection i.p.	CCl ₄ 10% 0,3 mL/ekor 4x/minggu s.c.	Ekstrak Etanol daun <i>Azadirachta indica</i> dari Indonesia (500 mg/kgBB/hari p.o.) + Sorafenib 15 mg/ hari p.o
Grup E	DEN 1% 20 mg/Kg single injection i.p.	CCl ₄ 10% 0,3 mL/ekor 4x/minggu s.c.	Ekstrak Etanol daun <i>Azadirachta indica</i> dari Indonesia (500 mg/kgBB/hari p.o.) + Sorafenib 15 mg/hari p.o
Kontrol Negatif	-	Minyak zaitun 0,3 mL/ekor s.c.	CMC-Na 2 ml/ekor p.o

4.5.6. Prosedur Uji Aktifitas Enzim AST dan ALT Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler

Sampel darah vena diambil dari jantung sebanyak 2 ml. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam tabung dengan antikoagulan (EDTA). Tabung berisi darah didiamkan selama kurang lebih 15-30 menit kemudian di sentrifuge selama 20 menit

pada kecepatan 3000 rpm. Serum sampel dipisahkan dan dimasukan ke dalam botol berlabel untu dilakukan pemeriksaan (Gandasoebrata, 2013). Pemeriksaan menggunakan alat *Automated Clinical Chemistry Analyzer* Pentra C® 200.

4.5.7. Prosedur Uji Alpha-fetoprotein Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler dengan ELISA Kit AFP Tikus Elabscience®

Tahap persiapan, semua reagen disimpan pada suhu kamar sebelum digunakan. Mikroplat disiapkan dan dipanaskan selama 15 menit sebelum pengukuran densitas optikal. Tahap uji AFP ELISA dimulai dengan menambahkan larutan standar ke dua pertama. Setiap konsentrasi larutan (100 μ L) yang ditambahkan ke sumur mikroplat diduplikasi. Kemudian sebanyak 100 μ L sampel ditambahkan ke sumur mikroplat. Tutup plat dengan sealer. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 90 menit. Setelah diinkubasi, buang semua cairan dari mikroplat, tanpa dicuci. *Biotinylated detection AB working solution* ditambahkan kedalam setiap sumur. Mikroplat ditutup dengan sealer dan kocok plate dengan lembut. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 1 jam. Larutan di dalam sumur diaspirasi. Buffer pencuci ditambahkan ke dalam setiap sumur dan didiamkan selama 1 – 2 menit. Setelah itu dikeringkan dengan tisu. Pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. *HRP conjugate working solution* ditambahkan 100 μ L dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Larutan dalam sumur kembali diaspirasi dan dicuci dengan buffer pencuci sebanyak 5 kali. Substrat sebanyak 90 μ L ditambahkan dan diinkubasi pada 37°C selama 15 menit. Stop solution sebanyak 50 μ L kedalam setiap sumur. Kemudian nilai densitas optikal dibaca pada *reader microplate* pada panjang gelombang 450 nm.

4.5.8. Analisis Data

Hasil pemisahan senyawa bioaktif menggunakan *LC-HRMS* diidentifikasi berdasarkan pola puncak pemisahan pada tiap senyawa target. Potensi antikanker senyawa bioaktif dilihat dari hasil *molecular docking* terhadap protein Bcl-2 berdasarkan nilai energi ikat yang rendah dan banyak terikat dengan asam amino pada sisi aktif yang sama dengan ligan acuan. Data aktivitas enzim AST/ALT dan kadar AFP dilakukan deskripsi. Data hasil dilakukan uji normalitas dan homogenitas dengan uji One Way ANOVA untuk melihat beda nyata terkecil dengan kepercayaan 0,05. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan *Tukey test* jika ditemukan perbedaan.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Kandungan Bioaktif *Azadirachta indica*

5.1.1. Hasil Skrining Fitokimia dan Identifikasi Senyawa bioaktif Menggunakan LC-HRMS

Hasil maserasi EEAI dan EEAIIF yang dipekatkan menghasilkan ekstrak kental berwarna hijau kecoklatan. Kedua ekstrak yang telah diperoleh dilakukan uji fitokimia. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil uji fitokimia EEAI dan EEAIIF

Komponen	Tes Fitokimia	Ekstrak etanol	
		Indonesia	Filipina
Alkaloid	Dragendorff's Test	-	-
	Mayer's Test	-	-
Flavonoid	Hydrochloric acid Test	+	+
Saponin	Froth Test	+	+
Tannin	Ferric chloride Test	+	+
Terpenoids	Salkowski's Test	+	+

Keterangan (-) = tidak terdeteksi, (+) = terdeteksi

Tabel 5.2. Komponen senyawa metabolit dalam EEAI

No.	Nama Senyawa	Grup	Rumus Molekul	Berat Molekul	[M+H] ⁺ (m/z)
1.	Betulin	Terpenoid	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.728	443
2.	Ginsenoside		C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	785.025	786
3.	Caryophyllene oxide		C ₁₅ H ₂₄ O	220.356	221
4.	Soyasaponin I	Saponin	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943.134	944
5.	Ecgonine	Alkaloid	C ₉ H ₁₅ NO ₃	185.223	186
6.	Scutellarin	Flavonoid	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	462.363	463
7.	Epicatechin		C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.271	291
8.	Icariin		C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	676.668	677
9.	Sesamolin		C ₂₀ H ₁₈ O ₇	370.357	371
10.	Lupeol		C ₃₀ H ₅₀ O	426.729	427

Tabel 5.3. Komponen senyawa metabolit dalam EEAIIF

No	Nama Senyawa	Grup	Rumus Molekul	Berat Molekul	[M+H] ⁺ (m/z)
1.	Betulin	Terpenoid	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.728	443
2.	Caryophyllene oxide		C ₁₅ H ₂₄ O	220.356	221
3.	Andrographolide		C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350.455	351
4.	10-Deacetylbaicatin III		C ₂₉ H ₃₆ O ₁₀	544.597	545
5.	3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid		C ₃₂ H ₄₈ O ₅	512.731	513
6.	O-chloroacetylcarbamoyle umagillol	Flavonoid	C ₁₉ H ₂₈ ClNO ₆	401.884	402
7.	Rutin		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.521	611

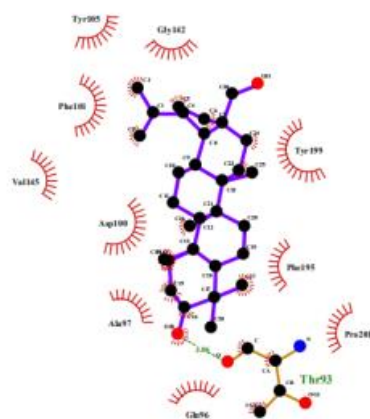
5.1.2. Molecular Docking Komponen Aktif *Azadirachta indica* terhadap Reseptor Bcl-2

Betulin, *caryophyllene oxide*, sesamolin, scutellarin, ecgonine, epicatechin, lupeol, rutin diduga memiliki efek sebagai antinflamasi sehingga dilakukan uji *in silico* untuk mengetahui interaksi senyawa pro-apoptosis yang berasal dari *Azadirachta indica* dengan reseptor Bcl-2 secara *molecular docking* dengan menggunakan *software* Autodock. Pada uji *in silico* ini akan diketahui senyawa yang berikatan dengan reseptor Bcl-2 pada tingkat molekuler.

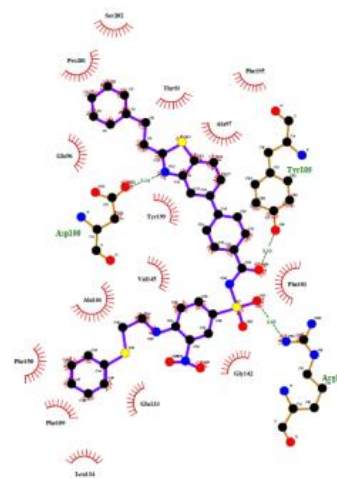
Tabel 5.4. Hasil molecular docking

Senyawa/ligan	Energi ikatan (kkal/mol)	Jarak atomik (Å) ikatan hidrogen	Residu asam amino ikatan hidrogen	Residu asam amino
Sesamolin	-8,3	2,93	arg143 Phe150 , ala146 , glu149, tyr105 , val145 , arg143 , glu133 , leu134 , phe101 , phe109	Tyr105 , arg143 , phe101 , ala146 , glu133 , phe150 , val130 , phe109 , leu134 , gly142
Scutellarin	-7,3	3,08; 3,00; 3,00	tyr105 , arg143	Glu149, tyr105 , val145 , arg143 , glu133 , leu134 , phe101 , phe109 , ala146 , phe150
Sorafenib	-9,8			val145 , gly142 , phe101 , tyr105 , arg143 , ala146 , phe109 , val131 , val130 , phe150 , leu134 , glu133
Betulin	-9,1	3,06	thr93	tyr105 , gly142 , phe101 , val145 , asp100 , ala97 , glu96 , thr93 , pro201 , phe195 , tyr199
Caryophyllene oxide	-6,9			Phe147 , phe150 , ala146 , glu149 , leu134 , phe109 , phe101 , asp108 , glu133 , met112 , val130
Ecgonine	-5,3	2,76	ala146	Phe109 , glu133 , phe150 , ala146 , leu134 , val130
Epicatechin	-7,6	3,12; 2,82	val130 , ala146	val131 , val130 , glu133 , leu134 , arg143 , tyr105 , phe101 , asp108 , phe109 , phe150 , ala146
Lupeol	-9,0	3,02	thr93	tyr105 , phe101 , phe195 , asp100 , thr93 , ala97 , gln96 , pro201 , tyr199
Rutin	-7,1	2,83, 3,35, 2,89, 2,79	tyr199 2,83 dan 3,35; asp100 2,89 dan 2,79	gly142 , phe101 , asp100 , thr93 , ala97 , gln6 , val145 , tyr199

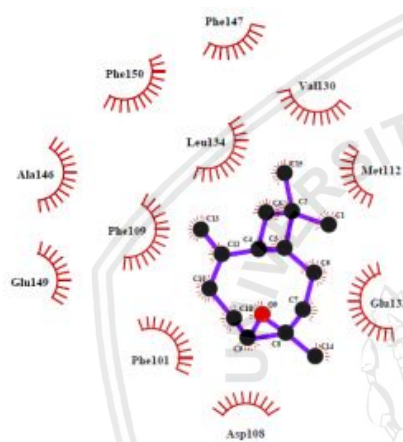
Keterangan: **bold**= asam amino yang sama dengan *inhibitor reference* (43B).



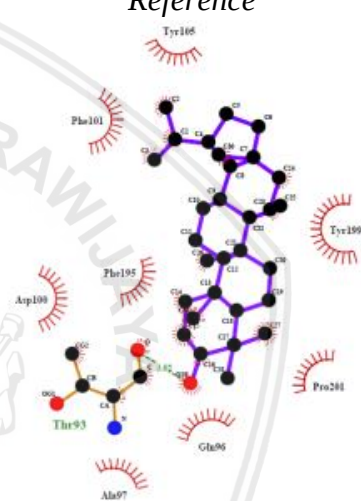
Betulin



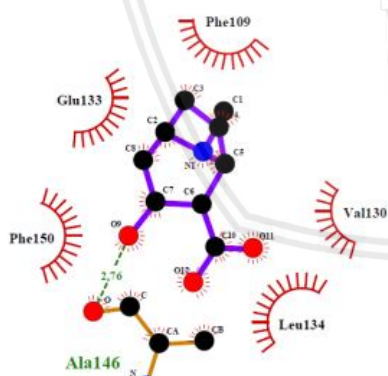
Reference



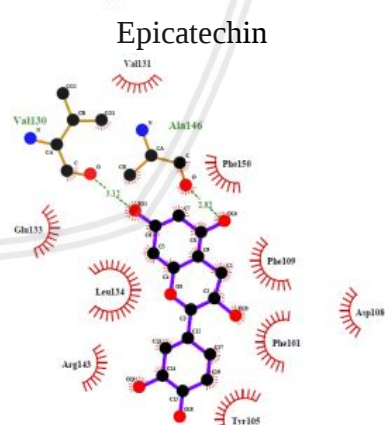
Caryophyllene oxide



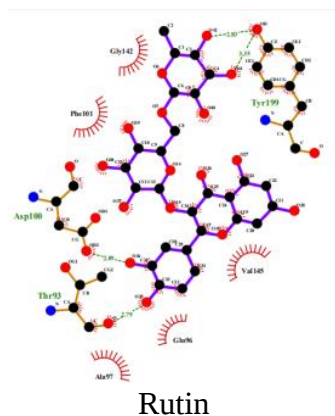
Epicatechin



Ecgonine



Lupeol



Gambar 5.1. Interaksi senyawa bioaktif *Azadirachta indica* dengan asam amino

Semakin kecil nilai RMSD yang diperoleh maka posisi senyawa yang diprediksi semakin mendekati native (Agistia *et al.*, 2013). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa molecular docking ini valid untuk memprediksi stimulasi apoptosis.

Energi ikat merupakan parameter kestabilan konformasi antara reseptor (Bcl-2) dengan ligan (senyawa). Semakin rendah energi ikat, maka semakin stabil dan kuat ikatannya (tidak mudah lepas) (Laksmiani, Paramita and Wirasuta, 2016). Semua senyawa alkaloid yang telah didocking memiliki energi ikat yang rendah yaitu berkisar dari -6,7 sampai -9,8 kkal/mol dan Sorafenib sebagai kontrol obat karsinoma hepatoseluler memiliki energi ikat -9,8 kkal/mol.

Beberapa senyawa memiliki energi ikat yang mendekati dengan kontrol obat Sorafenib. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi sebagai antiikanker. Berdasarkan energi ikatannya dapat diurutkan kemampuan sebagai senyawa yaitu: betulin > lupeol > sesamol > epicatechin > scutellarin > rutin > caryophyllene oxide > ecgonine Selain energi ikat, membandingkan dengan asam amino pengikat dari inhibitor reference perlu dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa telah terikat pada sisi aktif reseptor (Bcl-2) (Ekowati dan Diyah, 2013). Redocking 43B sebagai inhibitor reference didapatkan asam amino yang mengikat meliputi: Ser202, pro201, gln96, asp100, tyr199, val145, ala146, phe150, phe109, leu134, glu133, gly142, arg143, phe101, tyr105, phe195, ala97, thr93.

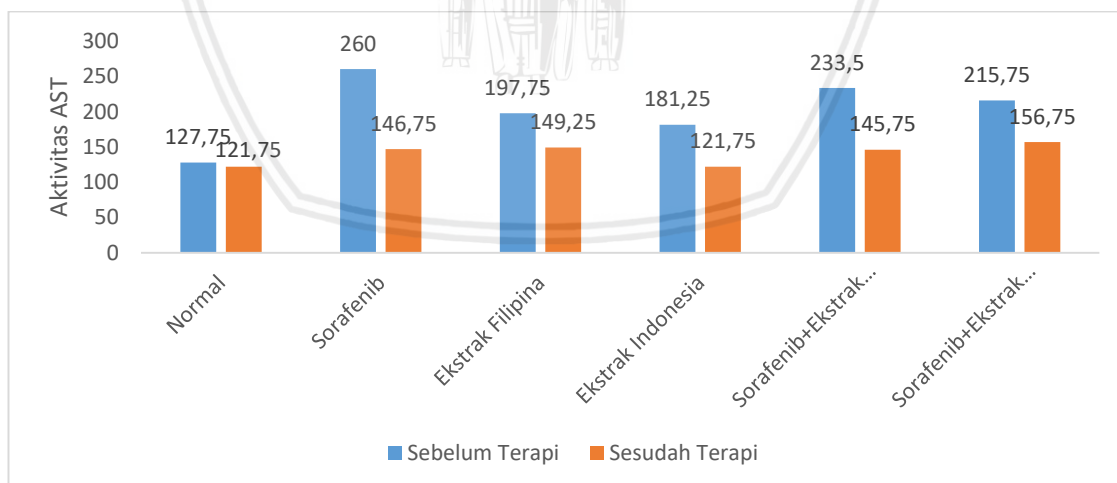
Berdasarkan asam amino yang berikatan dengan senyawa pada Tabel 5.4 didapatkan bahwa seluruh senyawa terpene dan flavonoid dan kontrol obat berinteraksi pada sisi aktif (Bcl-2). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa

senyawa terpena dan flavonoid dari EEAIIF memiliki potensi sebagai antikanker dengan selektif penghambatan Bcl-2 untuk menstimulasi apoptosis.

5.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Azadirachta indica* terhadap Aktivitas Enzim AST/ALT pada Hepar Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler

Disfungsi hati akibat karsinoma hepatoseluler yang timbul diukur dengan mengamati produk hepatosit yang nekrotik pada sistem sirkulasi. Produk hepatosit yang nekrotik berupa aspartate aminotransferase (AST) merupakan petunjuk untuk menentukan kerusakan hepatosit. Pengamatan pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* varian Indonesia (EEAII) dan Filipina (EEAIF) terhadap aktivitas enzim AST pada hepar tikus model karsinoma hepatoseluler yang diperoleh dibandingkan dengan Sorafenib sebagai *gold standard drug*.

Analisis aktivitas enzim AST secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi produk aktivitas enzim AST. Berdasarkan hasil yang diperoleh dilanjutkan dengan uji statistik *One Way Anova* dan dilanjutkan Tukey test dengan kepercayaan 95% menunjukkan adanya pengaruh terapi terhadap aktivitas enzim AST pada hepar.



Gambar 5.2. Grafik aktivitas enzim AST pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi

Pemberian terapi dengan Sorafenib dan ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* varian Indonesia (EEAII) dan Filipina (EEAIF) mempengaruhi aktivitas enzim AST hepar tikus model karsinoma hepatoseluler. Sedangkan pada kelompok terapi normal atau tidak diberikan DEN + CCl₄. Berdasarkan rerata aktivitas enzim

AST (Gambar 5.2), dapat diurutkan kelompok terapi yaitu EEAIF + Sorafenib > EEAIF > EEAI > Sorafenib > EEAI + Sorafenib.

Berdasarkan penelitian Sharp dan Vilano (2012), range kadar normal untuk AST 50 – 150 UI/L. Dari hasil penelitian ini kelompok tikus terapi EEAIF, Sorafenib + EEAIF, EEAI, Sorafenib masuk kedalam range AST normal seperti pada kelompok normal. Sedangkan kelompok terapi EEAI + Sorafenib tidak masuk range normal AST. Hal ini dimungkinkan adanya aktivitas pemberian obat secara oral pada kelompok tersebut mengakibatkan trauma sementara pada sel otot. Trauma tersebut akan meningkatkan kadar AST (Pettersson *et al.*, 2007). Enzim AST sebagian besar dihasilkan oleh hepar, akan tetapi sebagian diproduksi oleh sel otot, jantung, pankreas, dan ginjal (Walker *et al.*, 1990).

Tabel 5.5. Presentase penurunan aktivitas enzim AST sebelum dan sesudah terapi

Kelompok	Sebelum Terapi	Sesudah Terapi	Persentase Penurunan
Normal	127,75	121,75	
Sorafenib	260	146,75	43,5
Ekstrak Filipina	197,75	149,25	24,5
Ekstrak Indonesia	181,25	121,75	32,8
Sorafenib+Ekstrak Filipina	233,5	145,75	37,5
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	215,75	156,75	27,3

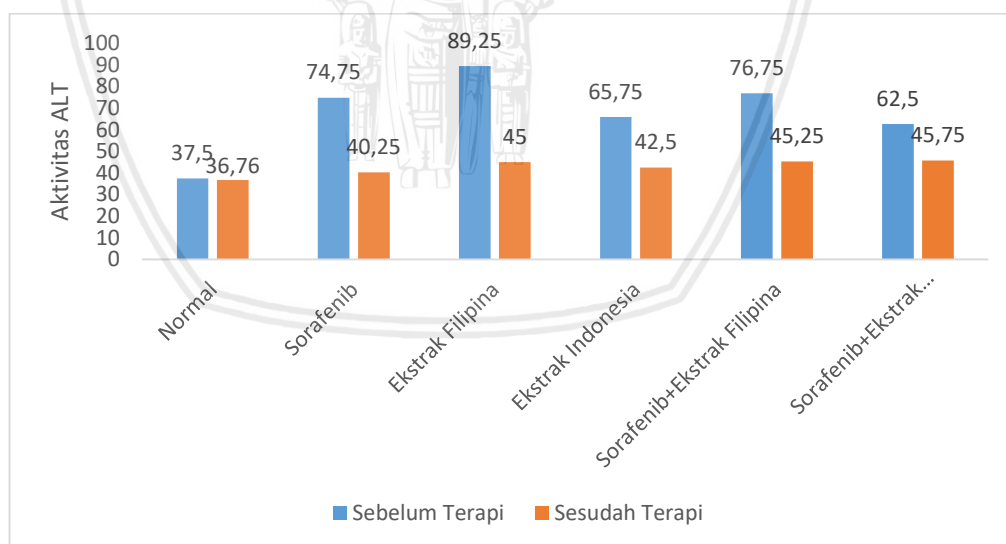
Analisis presentase penurunan aktivitas enzim AST sebelum dan sesudah terapi, menunjukkan bahwa kelompok terapi Sorafenib sebagai standar memiliki presentasi penurunan aktivitas AST paling besar yaitu 43,57% , diikuti dengan terapi campur Sorafenib + Ekstrak Filipina (37,58%), terapi Ekstrak Indonesia (32,82%), terapi Sorafenib + Ekstrak Indonesia (27,34%), terapi Ekstrak Filipina (24,52%). Terapi campur Sorafenib + Ekstrak Filipina (37,58%) terbukti paling baik dalam menurunkan aktivitas AST. Hal ini menunjukkan bahwa, bahwa EEAIF terhadap obat standar karsinoma hepatoseluler (Sorafenib) menjadi booster untuk mengurangi kerusakan hepatosit melalui penurunan kadar AST.

Pemberian terapi dengan Sorfaenib dan EEAI mampu menurunkan aktivitas AST dibandingkan saat kondisi karsinoma hepatoseluler. Manifestasi klinis penurunan aktivitas AST dengan terapi obat dan EEAI diyakini karena keduanya memiliki pontesi aktivitas antikanker dengan cara penghambatan Bcl-2 sehingga

menurunkan tingkat kerusakan hepatosit karena karsinoma hepatoseluler. Sorafenib dan EEAI memiliki kemampuan untuk menghambat Bcl-2 secara *molecular docking*. Senyawa aktif dari EEAI yang memiliki aktifitas penghambatan Bcl-2 meliputi betulin, lupeol, sesamolin, epicatechin.

Kerusakan hepatosit akibat karsinoma hepatoseluler yang timbul diukur dengan mengamati produk hepatosit yang nekrotik pada sistem sirkulasi berupa aspartate aminotransferase (ALT). Peningkatan aktivitas enzim ALT pada kejadian kerusakan jaringan hepar dimungkinkan karena membran plasma yang rusak sehingga terjadi kebocoran protein. Gores *et al.*, 1990 dalam McGill, 2016). Pengamatan ini melihat pengaruh pemberian EEAI dan EEAIIF terhadap aktivitas enzim AST pada hepar tikus model karsinoma hepatoseluler yang diperoleh dibandingkan dengan Sorafenib sebagai *gold standard drug*.

Analisis aktivitas enzim ALT secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi produk aktivitas enzim ALT. Berdasarkan hasil yang diperoleh dilanjutkan dengan uji statistik *One Way Anova* dan dilanjutkan Tukey test dengan kepercayaan 95% menunjukkan adanya pengaruh terapi terhadap aktivitas enzim ALT pada hepar. Hasil Tukey test menunjukkan tidak adanya perbedaan antar terapi.



Gambar 5.3. Grafik aktivitas enzim ALT pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi.

Pemberian terapi dengan Sorafenib dan ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* varian Indonesia (EEAI) dan Filipina (EEAIIF) mempengaruhi aktivitas enzim ALT hepar tikus model karsinoma hepatoseluler. Sedangkan pada kelompok

terapi normal atau tidak diberikan DEN + CCl₄. Berdasarkan rerata aktivitas enzim ALT, dapat diurutkan kelompok terapi yaitu Sorafenib > EEAI > EEAI + Sorafenib > EEAI + Sorafenib.

Berdasarkan penelitian Sharp dan Vilano (2012), range kadar normal untuk ALT 10 – 40 UI/L. Dari hasil penelitian ini kelompok terapi EEAI yang masuk kedalam range ALT normal seperti pada kelompok normal. Kelompok terapi Sorafenib, EEAI, EEAI + Sorafenib, EEAI + Sorafenib tidak masuk range normal ALT.

Tabel 5.6. Presentase penurunan aktivitas enzim ALT sebelum dan sesudah terapi

Kelompok	Sebelum Terapi	Sesudah Terapi	Persentase Penurunan
Normal	37,5	36,76	
Sorafenib	74,75	40,25	46,1
Ekstrak Filipina	89,25	45	49,5
Ekstrak Indonesia	65,75	42,5	35,3
Sorafenib+Ekstrak Filipina	76,75	45,25	41,0
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	62,5	45,75	26,8

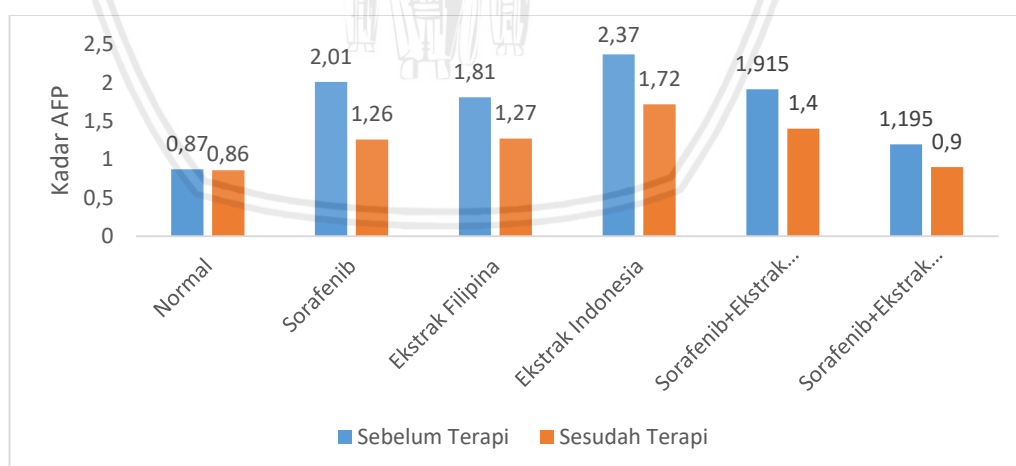
Analisis presentase penurunan aktivitas enzim ALT sebelum dan sesudah terapi, menunjukkan bahwa kelompok terapi Filipina memiliki presentasi penurunan aktivitas ALT paling besar yaitu 49,57% , diikuti dengan terapi Sorafenib (46,15%), terapi Sorafenib + Ekstrak Filipina (41,04%), terapi Ekstrak Indonesia (35,36%), terapi campur Sorafenib + Ekstrak Indonesia (26,8%). Hal ini menunjukkan bahwa, kelompok terapi Filipina memiliki presentasi penurunan aktivitas ALT paling baik.

Pada penelitian ini, tingginya aktivitas AST dan ALT sebelum pemberian terapi EEAI dan EEAI menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan pada jaringan hepar. ALT dan AST diproduksi oleh sel-sel ganas dan non-ganas. Dibandingkan dengan sel normal, aktivitas AST dan ALT meningkat setelah neoplasia hati. AST dan ALT ditemukan dalam serum sebanding dengan jumlah kerusakan sel (Evans, 2009). Sebagian besar sel kanker menghasilkan ATP melalui glikolisis dalam kondisi aerob daripada melalui siklus asam trikarboksilat. Glikolisis diperlukan dalam sel kanker untuk menghasilkan ATP dan prekursor anabolik yang dibutuhkan untuk bertahan hidup, tumbuh, dan invasi. Enzim aspartate aminotransferase mengkatalisis konversi aspartat dan alfa-ketoglutarat menjadi oksaloasetat dan

glutamat. (Washington dan Hoosier, 2012), yang mana glutamat berfungsi sebagai prekursor untuk menyediakan karbon dan nitrogen untuk biosintesis metabolit yang terlibat dalam kelangsungan hidup dan proliferasi kanker. Glutamat telah terbukti mempertahankan siklus TCA dan meningkatkan glukoneogenesis untuk meningkatkan pertumbuhan sel kanker. AST berfungsi bersama dehidrogenase malat untuk mentransfer elektron dari nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) melintasi membran mitokondria bagian dalam, yang terkait erat dengan glikolisis (Shen *et al.*, 2014; Stocken *et al.*, 2008). Jadi, AST dapat dikaitkan dengan prognosis kanker karsinoma hepatoseluler

5.3. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Azadirachta indica* terhadap Kadar AFP pada Hepar Tikus Model Karsinoma Hepatoseluler

Alpha fetoprotein (AFP) merupakan protein plasma yang dihasilkan oleh hati digunakan untuk memantau respons neoplasma sel benih terhadap pengobatan. AFP dapat memicu proliferasi sel karsinoma hepatoseluler dan angiogenesis kanker dan meningkatkan efek antiapoptosis sel kanker (Zhu *et al.*, 2016). Peningkatan kadar AFP menunjukkan perkembangan kanker hati. Pengamatan ini melihat pengaruh pemberian EEAI dan EEAIIF terhadap kadar AFP pada hepar tikus model karsinoma hepatoseluler yang diperoleh dibandingkan dengan Sorafenib sebagai *gold standard drug*.



Gambar 5.4. Grafik kadar AFP pada hepar tikus sebelum dan sesudah terapi.

Analisis presentase penurunan kadar AFP sebelum dan sesudah terapi, menunjukkan bahwa kelompok terapi Filipina memiliki presentasi penurunan kadar

AFP paling besar yaitu 29,83% , diikuti dengan terapi Sorafenib (37,31%), terapi Sorafenib + Ekstrak Filipina (26,89%), terapi Ekstrak Indonesia (27,42%), terapi campur Sorafenib + Ekstrak Indonesia (24,6%). Hal ini menunjukan bahwa, kelompok terapi Filipina memiliki presentasi penurunan kadar AFP paling baik.

Tabel 5.7. Presentase penurunan kadar AFP sebelum dan sesudah terapi

Kelompok	Sebelum Terapi	Sesudah Terapi	Persentase Penurunan
Normal	0,87	0,86	
Sorafenib	2,01	1,26	37,31
Ekstrak Filipina	1,81	1,27	29,83
Ekstrak Indonesia	2,37	1,72	27,42
Sorafenib+Ekstrak Filipina	1,915	1,4	26,89
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	1,195	0,9	24,68

Setelah terapi menggunakan EEAI terjadi penurunan kadar AFP, diduga peristiwa. Sebelum terapi dengan EEAI, kadar AFP serum pada tikus model karsinoma hepatoseluler lebih tinggi daripada kadar pada tikus normal. Jelas, tingkat kadar AFP berkorelasi erat dengan terdapatnya kanker. Pengaruh terapi EEAI dan EAIF terhadap pertumbuhan tumor tercermin dari kadar AFP serum.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan simpulan sebagai berikut:

1. Berdasarkan skrining senyawa dalam ekstrak menggunakan teknik *LC-HRMS*. Terdapat 10 senyawa (4 terpenoid, 1 alkaloid, 2 flavonoid, 2 lignin, 1 saponin) diidentifikasi dari EEAI dan 7 senyawa (6 terpenoid, 1 flavonoid) diidentifikasi dari EEAIIF. Betulin dan caryophyllene oxide teridentifikasi dari kedua ekstrak. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa betulin, lupeol, sesamolin, epicatechin berpotensi sebagai antikanker.
2. Terapi EEAIIF + Sorafenib memiliki kemampuan paling baik diantara terapi lainnya, mendekati kemampuan Sorafenib dalam menurunkan aktivitas aspartate transaminase (AST). EEAIIF memiliki kemampuan paling baik diantara terapi lainnya, mendekati kemampuan Sorafenib dalam menurunkan aktivitas aspartate transaminase (ALT).
3. EEAIIF memiliki kemampuan paling baik diantara terapi lainnya, mendekati kemampuan Sorafenib dalam menurunkan kadar alpha fetoprotein (AFP).

6.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap histopatologis jaringan hati dan pengamatan ekspresi kejadian apoptosis pascaterapi

DAFTAR PUSTAKA

- Alzohairy, M.A., 2016. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/7382506>
- Bakiri, L., Wagner, E.F., 2013. Mouse models for liver cancer. Mol. Oncol. 7, 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.01.005>
- Beltran, M.A.G., Robertson, A., Martin, R.J., n.d. Pengaruh Sembilan Tanaman Asal Filipina Terhadap Infeksi Larva *Oesophagostomum dentatum* 10.
- Chen, X., 2000. Protection of Normal Proliferating Cells Against Chemotherapy by Staurosporine-Mediated, Selective, and Reversible G1 Arrest. J. Natl. Cancer Inst. 92, 1999–2008. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.24.1999>
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J.M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Dhillon, A., & Steadman, R. H. (2012). Liver Diseases. Anesthesia and Uncommon Diseases, 162–214. doi:10.1016/b978-1-4377-2787-6.00005-x.
- Dutta, S., Chakraborty, A.K., Dey, P., Kar, P., Guha, P., Sen, S., Kumar, A., Sen, A., Chaudhuri, T.K., 2018. Amelioration of CCl4 induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. PLOS ONE 13, e0196411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196411>
- Elumalai, P., Arunakaran, J., 2014. Review on Molecular and Chemopreventive Potential of Nimbolide in Cancer. Genomics Inform. 12, 156. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.4.156>
- Fernando, J., Sancho, P., Fernández-Rodriguez, C.M., Lledó, J.L., Caja, L., Campbell, J.S., Fausto, N., Fabregat, I., 2012. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. J. Cell. Physiol. 227, 1319–1325. <https://doi.org/10.1002/jcp.22843>

- Hamid N. M. A., Salama A. F., El-Sheekh M., Sarhan N., Gabr A. M., 2017. Oxidative stress predominates apoptosis during experimental hepatocellular carcinoma, *J Contemp Med Sci*, Vol. 3, No. 12, 295–299.
- Hamilton J.P., Gurakar A., Koteish A., Li Z.P., Mezey E., 2013. Liver Cancer: 39th Annual topics in gastroenterology and hepato-biliary update conference, US: Maryland.
- Huang, X.-J., Choi, Y.-K., Im, H.-S., Yarimaga, O., Yoon, E., Kim, H.-S., 2006. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors* 6, 756–782. <https://doi.org/10.3390/s6070756>
- Khosla P., Bhanwra S., Singh J., Seth S., Srivastava R. K., 2000. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits, *Indian J Physiol Pharmacol.*, 44(1):69-74.
- Lloyd A. C. C., Menon T., Umamaheshwari K., 2005. Anticandidal activity of *Azadirachta indica*, *Indian Journal of Pharmacology* 37:386-389.
- Mostofa M., Choudhury M. E., Hossain M. A., Islam M. Z., Islam M. S., Sumon M. H., 2007. Antidiabetic Effects of *Catharanthus Roseus*, *Azadirachta Indica*, *Allium Sativum* and *Glimepride* in Experimentally Diabetic Induced Rat, *Bangl. J. Vet. Med* 5: 99–102.
- Jagadeesh K, 2014. Anti Inflammatory Effect of *Azadirachta Indica* (Neem) In Albino Rats-An Experimental Study. *IOSR J. Pharm. IOSRPHR* 04, 34–38. <https://doi.org/10.9790/3013-0411-34-38>
- Kang, J.S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F.J., Fukushima, S., 2007. Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis *In vivo*. *Cancer Res.* 67, 11141–11146. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1369>
- Kumar, S., Suresh, P.K., Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Arunakaran, J., 2006. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). *J. Ethnopharmacol.* 105, 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.006>
- Manibusan, M.K., Odin, M., Eastmond, D.A., 2007. Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. *J. Environ. Sci. Health Part C* 25, 185–209. <https://doi.org/10.1080/10590500701569398>

- Mostofa, M., Choudhury, M.E., Hossain, M.A., Islam, M.Z., Islam, M.S., Sumon, M.H., n.d. Antidiabetic Effects Of *Catharanthus Roseus*, *Azadirachta Indica*, *Allium Sativum* And Glimepride In Experimentally Diabetic Induced Rat .
- Okumu, F.O., Knols, B.G., Fillinger, U., 2007. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6, 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-63>
- Park, D.-H., Shin, J.W., Park, S.-K., Seo, J.-N., Li, L., Jang, J.-J., Lee, M.-J., 2009. Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat. *Toxicol. Lett.* 191, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.016>
- Paul, R., Prasad, M., Sah, N.K., 2011. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): A mini review. *Cancer Biol. Ther.* 12, 467–476. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.6.16850>
- Pingale S. S., 2010. Hepatoprotection Study of Leaves Powder of *Azadirachta Indica* A. Juss., *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*.
- Qi, Y., Chen, X., Chan, C., Li, D., Yuan, C., Yu, F., Lin, M.C., Yew, D.T., Kung, H.-F., Lai, L., 2008. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 122, 2682–2688. <https://doi.org/10.1002/ijc.23464>
- Sampaio, B.L., Edrada-Ebel, R., Da Costa, F.B., 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* 6, 29265. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Santos, N.P., Colaço, A.A., Oliveira, P.A., 2017. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biol.* 39, 101042831769592. <https://doi.org/10.1177/1010428317695923>
- Shen, S.-L., Fu, S.-J., Chen, B., Kuang, M., Li, S.-Q., Hua, Y.-P., Liang, L.-J., Guo, P., Hao, Y., Peng, B.-G., 2014. Preoperative Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio is an Independent Prognostic Factor for Hepatitis B-Induced Hepatocellular Carcinoma After Hepatic Resection. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 3802–3809. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3771-x>

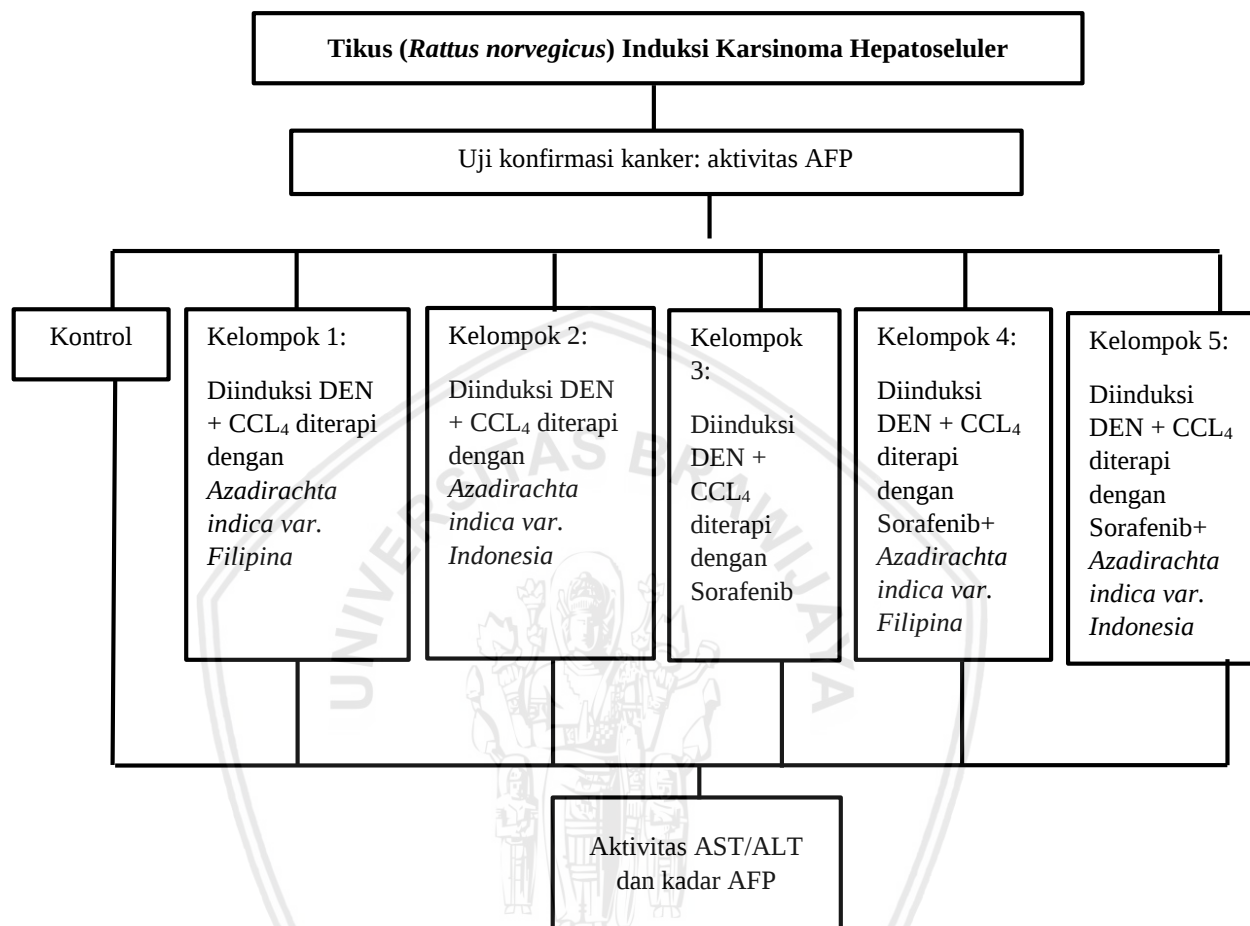
- Shirakami, Y., Gottesman, M.E., Blaner, W.S., 2012. Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis* 33, 268–274. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr275>
- Sonntag, R., Gassler, N., Bangen, J.-M., Trautwein, C., Liedtke, C., 2014. Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 5, e1030–e1030. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.557>
- Stocken, D.D., Hassan, A.B., Altman, D.G., Billingham, L.J., Bramhall, S.R., Johnson, P.J., Freemantle, N., 2008. Modelling prognostic factors in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 99, 883–893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604568>
- Subapriya, R., Nagini, S., 2005. Medicinal Properties of Neem Leaves: A Review. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* 5, 149–156. <https://doi.org/10.2174/1568011053174828>
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., Weiskirchen, R., 2015. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab. Anim.* 49, 59–69. <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>
- Uehara, T., Pogribny, I.P., Rusyn, I., 2014. The DEN and CCl₄-Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 66. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1430s66>
- Wang, X., Wang, Q., 2018. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/9049252>
- Yang, J.D., Roberts, L.R., 2010. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 448–458. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.100>. Guzman G., Chennuri R., Voros A., Boumendjel R., Locante A., Patel R., Valyi-Nagy T., 2011. Nucleometric study of anisonucleosis, diabetes and oxidative damage in liver biopsies of orthotopic liver transplant recipients with chronic hepatitis C virus infection. *Pathol. Oncol. Res.* 17:191-199.

- Verna L., Whysner J., Williams G.M., 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation, *J. Pharmacol Ther*, 71:57–81
- Washington, I. M., & Van Hoosier, G. (2012). *Clinical Biochemistry and Hematology. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 57–116. doi:10.1016/b978-0-12-380920-9.00003-1
- Zhu, M., Lu, Y., Li, W., Guo, J., Dong, X., Lin, B., Chen, Y., Xie, X., Li, M., 2016. Hepatitis B Virus X Protein Driven Alpha Fetoprotein Expression to Promote Malignant Behaviors of Normal Liver Cells and Hepatoma Cells. *J. Cancer* 7, 935–946. <https://doi.org/10.7150/jca.13628>



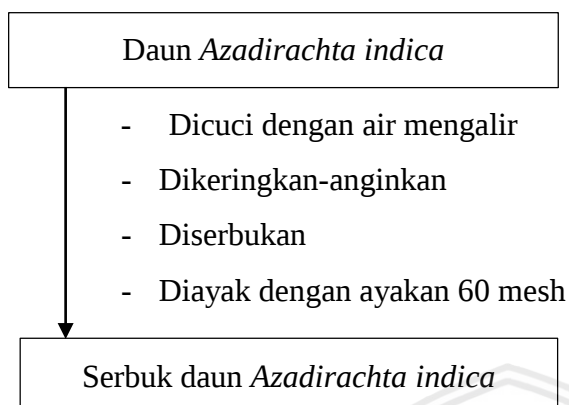
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Operasional

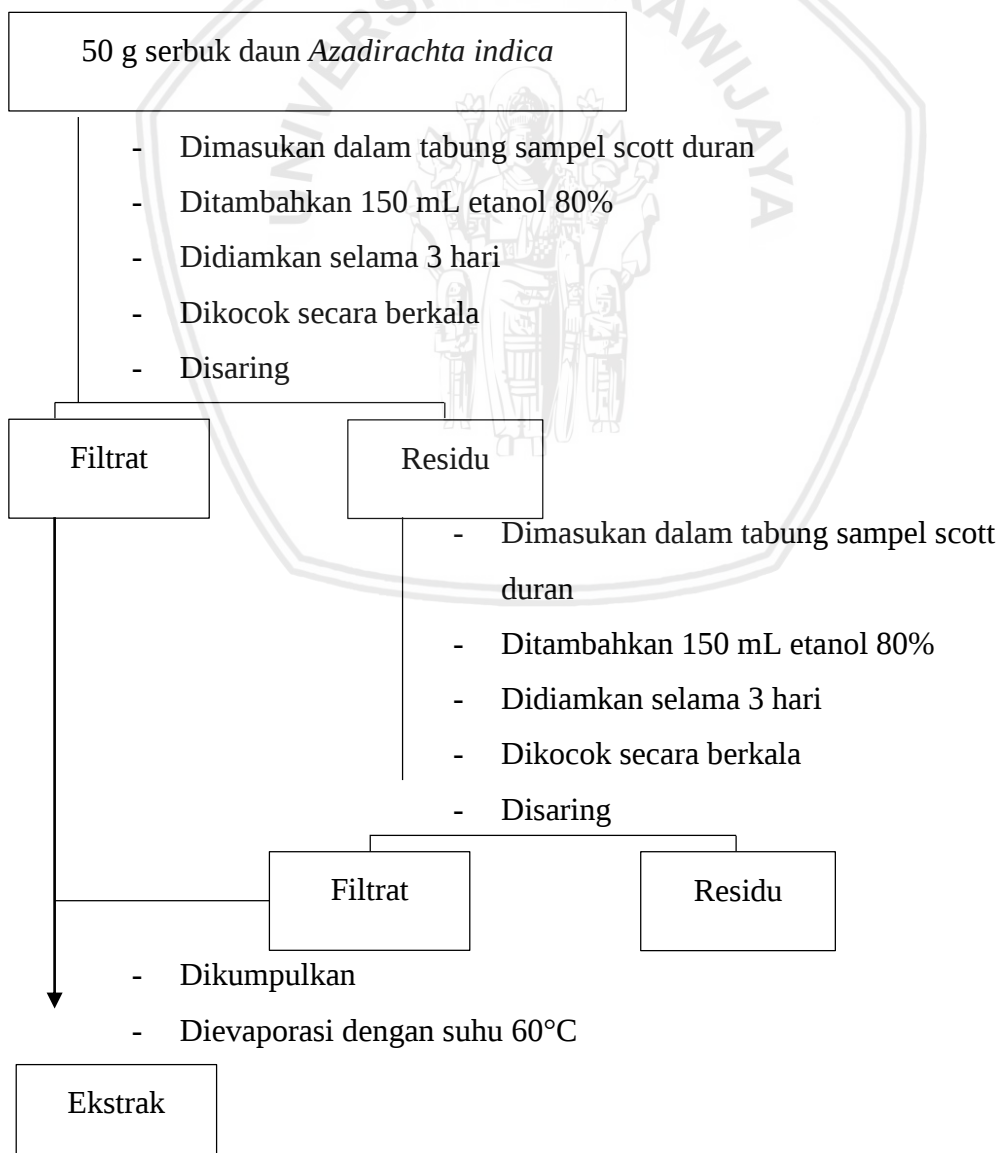


Lampiran 2. Diagram Kerja Penelitian

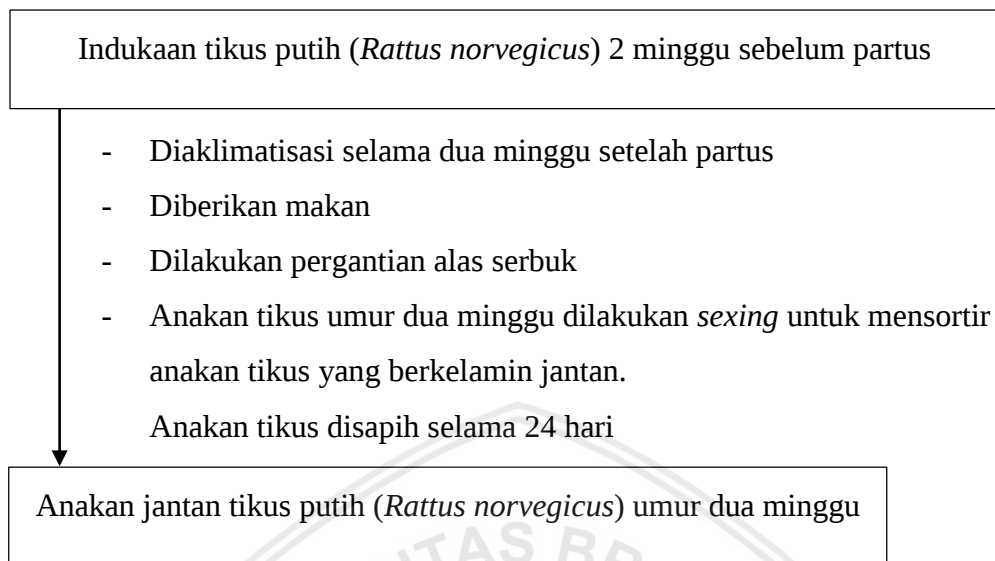
Lampiran 2.1. Pembuatan Simplisia Daun *Azadirachta indica*



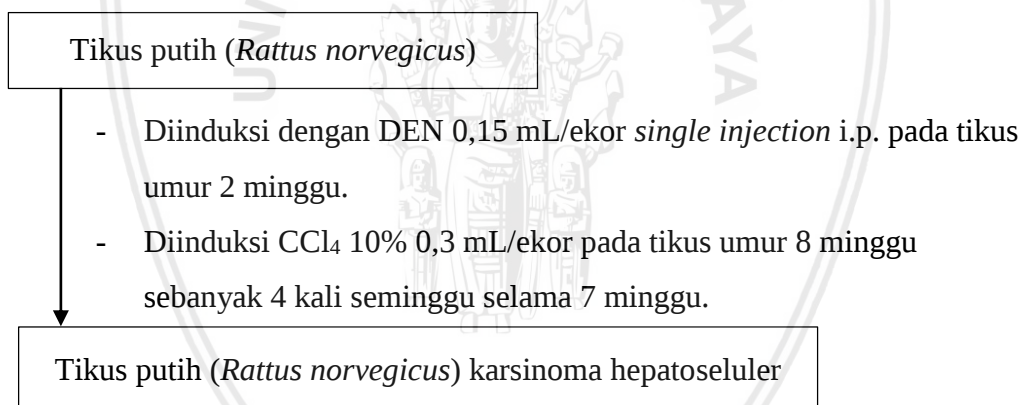
Lampiran 2.2. Ekstraksi Daun *Azadirachta indica*



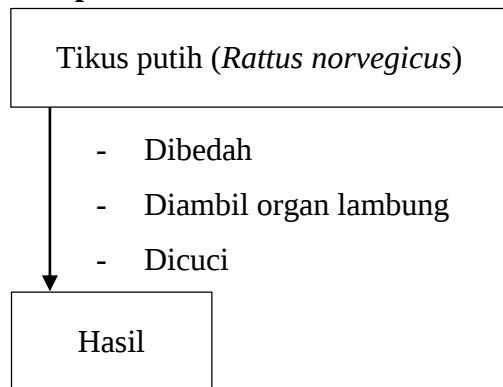
Lampiran 2.3. Persiapan Hewan Coba



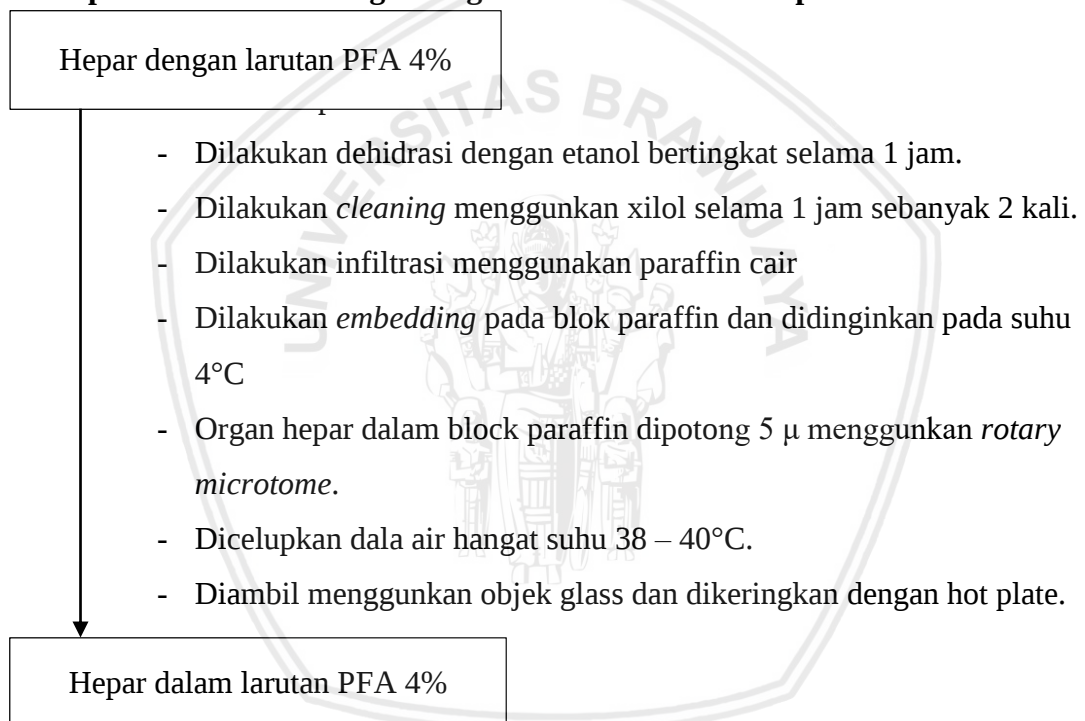
Lampiran 2.4. Pembuatan Karsinoma Hepatoseluler



Lampiran 2.5. Pembedahan Hewan Coba



Lampiran 2.6. Embedding Jaringan dan Pembuatan Prepararat



Lampiran 3. Tabel Konversi Berat Badan Tikus

Dicari/Diketahui	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,80	29,7	64,10	124,20	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,20	9,20	17,80	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,40	5,20	10,20	31,50
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,40	4,50	14,20
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,20	4,10	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,43	0,1	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	1,24	0,52	1,0	3,10
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Laurence D.R., Bacharach A. L., (1964). Evaluation of drug activities. London: Academic Press.

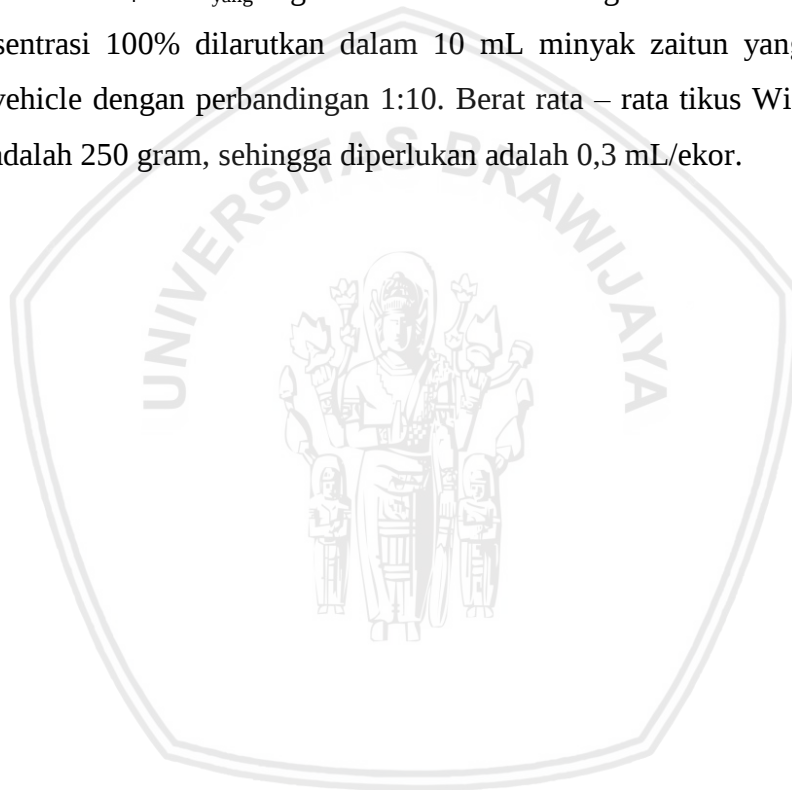
Lampiran 4. Preparasi Larutan

Pembuatan Larutan DEN 1% sesuai Dosis

Dosis induksi DEN 1% yang digunakan adalah 50 mg/kgBB tikus. Sediaan 1000 mg DEN dilarutkan dalam 100 mL larutan fisiologis. Dalam 0,1 mL larutan DEN mengandung 1 mg DEN. Berat rata – rata tikus Wistar umur 1 minggu adalah 30 gram, sehingga DEN diperlukan adalah 0,15 mL/ekor.

Pembuatan Larutan CCl₄ sesuai Dosis

Dosis induksi CCl₄ 10% yang digunakan adalah 1 mL/kgBB tikus. Sediaan 1 mL CCl₄ konsentrasi 100% dilarutkan dalam 10 mL minyak zaitun yang berfungsi sebagai vehicle dengan perbandingan 1:10. Berat rata – rata tikus Wistar umur 8 minggu adalah 250 gram, sehingga diperlukan adalah 0,3 mL/ekor.



Lampiran 5. Penentuan Dosis

Dosis Pemberian Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* var Indonesia dan Filipina

Tikus karsinoma hepatoseluler diterapi dengan ekstrak etanol daun *Azadirachta indica* dari Indonesia dan Filipina dengan dosis 500 mg/KgBB sebanyak 14 kali (14 hari berturut-turut). Berat rata – rata tikus Wistar umur 14 minggu adalah 300 gram, sehingga yang diperlukan adalah 1,5 gram ekstrak etanol untuk dosis 500 mg/KgBB selama 14 hari. Selanjutnya ekstrak yang telah dihitung volumenya ditambahkan dengan air dengan total 1 mL sesuai dengan volume lambung tikus.

Dosis Pemberian Sorafenib

Tikus karsinoma hepatoseluler diterapi dengan Sorafenib dengan dosis 400mg/KgBB manusia sebanyak 14 kali (14 hari berturut-turut) adalah 7 mg. Selanjutnya dosis sorafenib yang telah dihitung volumenya ditambahkan dengan air dengan total 1 mL sesuai dengan volume lambung tikus.

*Dosis Sorafenib pada manusia 800mg/hari.

*Dosis Sorafenib tikus yang dibutuhkan perhari = $400 \text{ mg} \times 0,018 = 7,2 \text{ mg} \sim 7 \text{ mg}$.

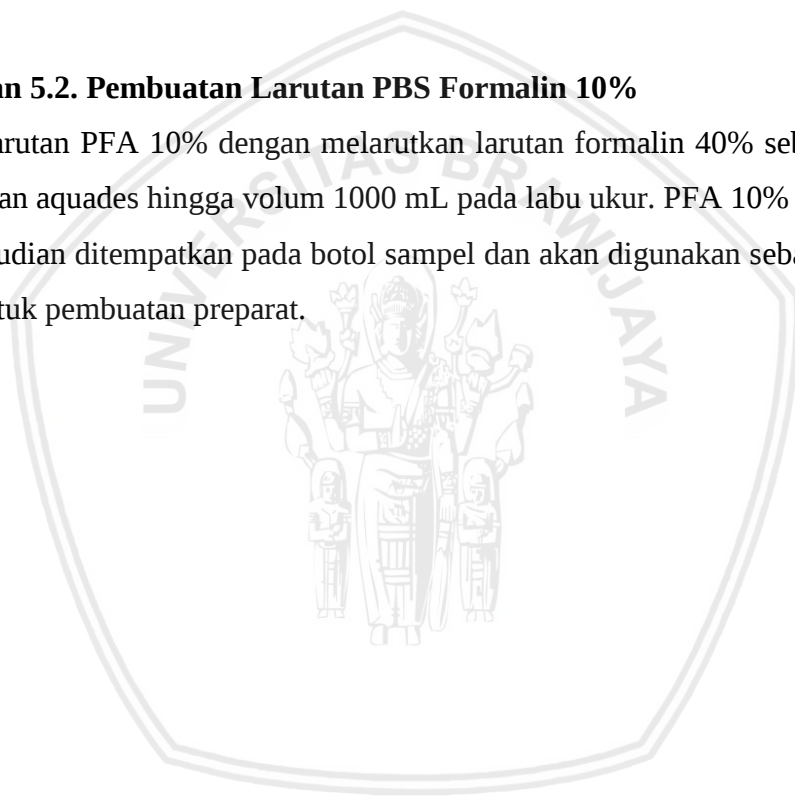
* 0,018 adalah faktor konversi perhitungan dosis manusia ke tikus.

Lampiran 6. Pembuatan Larutan Kimia**Lampiran 5.1. Pembuatan Larutan Phosfat Buffer Saline (PBS) pH 7,4**

Ditimbang NaCl padat sebanyak 4 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, KCl padat sebanyak 0,1 gram dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram, dicampur pada gelas kimia 500 mL dan dilarutkan dalam aquades steril 250 mL. Kemudian dilakukan pengadukan menggunakan magnetik stirer. Kemudian diatur pH larutan sebesar 7,4 dengan menambahkan larutan NaOH 1 M sampai pH menjadi 7,4. Larutan kemudian dipindahkan dalam labu ukur 500 mL dan ditandabatkan dengan aquades serta dihomogenisasi.

Lampiran 5.2. Pembuatan Larutan PBS Formalin 10%

Dibuat larutan PFA 10% dengan melarutkan larutan formalin 40% sebanyak 400 mL dengan aquades hingga volum 1000 mL pada labu ukur. PFA 10% yang sudah jadi kemudian ditempatkan pada botol sampel dan akan digunakan sebagai tempat organ untuk pembuatan preparat.



Lampiran 7. Hasil Pengukuran AST

7.1. Data Aktivitas AST

Kelompok Perlakuan	Aktivitas AST Ulangan ke-				Rata-rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	
Normal	122	73	129	163	121,75 $\pm$ 48,11358
Ekstrak Filipina	101	214	129	153	146,75 $\pm$ 50,04248
Ekstrak Indonesia	122	73	129	163	121,75 $\pm$ 18,55341
Sorafenib	167	194	149	77	152,50 $\pm$ 27,50152
Sorafenib+Ekstrak Filipina	125	163	182	113	145,75 $\pm$ 32,22189
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	194	188	120	125	156,75 $\pm$ 39,67682

7.2. Uji Statistika

7.2.1. Uji Normalitas

		Tests of Normality		
		Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.
HAsil_AST	Normal	.961	4	.788
	Sorafenib	.926	4	.571
	Ekstrak Filipina	.960	4	.779
	Ekstrak Indonesia	.961	4	.788
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	.927	4	.578
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	.797	4	.096

a. Lilliefors Significance Correction

7.2.2. Uji Homogenitas

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
HAsil_AST	Based on Mean	.221	5	18	.949
	Based on Median	.182	5	18	.966
	Based on Median and with adjusted df	.182	5	11.807	.964
	Based on trimmed mean	.210	5	18	.954

7.2.3. Uji One Way Anova

ANOVA					
HAsil_AST	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4440.833	5	888.167	.523	.756
Within Groups	30556.500	18	1697.583		
Total	34997.333	23			

7.2.4. Uji Lanjutan *Tukey test***Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HASil_AST

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Sorafenib	-25.00000	29.13403	.952	-117.5890	67.5890
	Ekstrak Filipina	-27.50000	29.13403	.929	-120.0890	65.0890
	Ekstrak Indonesia	.00000	29.13403	1.000	-92.5890	92.5890
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	-24.00000	29.13403	.959	-116.5890	68.5890
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	-35.00000	29.13403	.831	-127.5890	57.5890
Sorafenib	Normal	25.00000	29.13403	.952	-67.5890	117.5890
	Ekstrak Filipina	-2.50000	29.13403	1.000	-95.0890	90.0890
	Ekstrak Indonesia	25.00000	29.13403	.952	-67.5890	117.5890
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	1.00000	29.13403	1.000	-91.5890	93.5890
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	-10.00000	29.13403	.999	-102.5890	82.5890
Ekstrak Filipina	Normal	27.50000	29.13403	.929	-65.0890	120.0890
	Sorafenib	2.50000	29.13403	1.000	-90.0890	95.0890
	Ekstrak Indonesia	27.50000	29.13403	.929	-65.0890	120.0890
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	3.50000	29.13403	1.000	-89.0890	96.0890
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	-7.50000	29.13403	1.000	-100.0890	85.0890
Ekstrak Indonesia	Normal	.00000	29.13403	1.000	-92.5890	92.5890
	Sorafenib	-25.00000	29.13403	.952	-117.5890	67.5890
	Ekstrak Filipina	-27.50000	29.13403	.929	-120.0890	65.0890
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	-24.00000	29.13403	.959	-116.5890	68.5890
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	-35.00000	29.13403	.831	-127.5890	57.5890
Sorafenib+Ekstrak Filipina	Normal	24.00000	29.13403	.959	-68.5890	116.5890
	Sorafenib	-1.00000	29.13403	1.000	-93.5890	91.5890
	Ekstrak Filipina	-3.50000	29.13403	1.000	-96.0890	89.0890
	Ekstrak Indonesia	24.00000	29.13403	.959	-68.5890	116.5890
	Sorafenib+Ekstrak Indonesia	-11.00000	29.13403	.999	-103.5890	81.5890
	Normal	35.00000	29.13403	.831	-57.5890	127.5890

Sorafenib+Ekstrak Indonesia	Sorafenib	10.00000	29.13403	.999	-82.5890	102.5890
	Ekstrak Filipina	7.50000	29.13403	1.000	-85.0890	100.0890
	Ekstrak Indonesia	35.00000	29.13403	.831	-57.5890	127.5890
	Sorafenib+Ekstrak Filipina	11.00000	29.13403	.999	-81.5890	103.5890

HA_{asil}_AST

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05 1
Normal	4	121.7500
Ekstrak Indonesia	4	121.7500
Sorafenib+Ekstrak Filipina	4	145.7500
Sorafenib	4	146.7500
Ekstrak Filipina	4	149.2500
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	4	156.7500
Sig.		.831

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 8. Hasil Pengukuran ALT

8.1. Data Aktivitas ALT

Kelompok Perlakuan	Aktivitas ALT Ulangan ke-				Rata-rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	
Normal	60	50	49	61	36,75 $\pm$ 22,11146
Ekstrak Filipina	48	57	29	46	40,25 $\pm$ 20,36950
Ekstrak Indonesia	37	45	56	32	45,00 $\pm$ 11,69045
Sorafenib	40	50	59	12	42,50 $\pm$ 10,47219
Sorafenib+Ekstrak Filipina	42	60	23	56	45,25 $\pm$ 16,72075
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	39	57	32	55	45,75 $\pm$ 12,20314

8.2. Uji Statistika

8.2.1. Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil_ALT	1.00	.225	4	.	.941	4	.659
	2.00	.245	4	.	.927	4	.576
	3.00	.284	4	.	.935	4	.622
	4.00	.200	4	.	.966	4	.815
	5.00	.240	4	.	.919	4	.529
	6.00	.276	4	.	.881	4	.344

a. Lilliefors Significance Correction

8.2.2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil_ALT	Based on Mean	1.138	5	18	.377
	Based on Median	.990	5	18	.451
	Based on Median and with adjusted df	.990	5	11.161	.466
	Based on trimmed mean	1.140	5	18	.376

8.2.3. Uji One Way Anova

ANOVA					
Hasil_ALT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	249.833	5	49.967	.190	.963

Within Groups	4736.000	18	263.111		
Total	4985.833	23			

Uji Lanjutan *Tukey test*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil_ALT

Tukey HSD

(I) Kelompok (J) Kelompok		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-3.50000	11.46977	1.000	-39.9513	32.9513
	3.00	-8.25000	11.46977	.977	-44.7013	28.2013
	4.00	-5.75000	11.46977	.995	-42.2013	30.7013
	5.00	-8.50000	11.46977	.974	-44.9513	27.9513
	6.00	-9.00000	11.46977	.967	-45.4513	27.4513
2.00	1.00	3.50000	11.46977	1.000	-32.9513	39.9513
	3.00	-4.75000	11.46977	.998	-41.2013	31.7013
	4.00	-2.25000	11.46977	1.000	-38.7013	34.2013
	5.00	-5.00000	11.46977	.998	-41.4513	31.4513
	6.00	-5.50000	11.46977	.996	-41.9513	30.9513
3.00	1.00	8.25000	11.46977	.977	-28.2013	44.7013
	2.00	4.75000	11.46977	.998	-31.7013	41.2013
	4.00	2.50000	11.46977	1.000	-33.9513	38.9513
	5.00	-.25000	11.46977	1.000	-36.7013	36.2013
	6.00	-.75000	11.46977	1.000	-37.2013	35.7013
4.00	1.00	5.75000	11.46977	.995	-30.7013	42.2013
	2.00	2.25000	11.46977	1.000	-34.2013	38.7013
	3.00	-2.50000	11.46977	1.000	-38.9513	33.9513
	5.00	-2.75000	11.46977	1.000	-39.2013	33.7013
	6.00	-3.25000	11.46977	1.000	-39.7013	33.2013
5.00	1.00	8.50000	11.46977	.974	-27.9513	44.9513
	2.00	5.00000	11.46977	.998	-31.4513	41.4513
	3.00	.25000	11.46977	1.000	-36.2013	36.7013
	4.00	2.75000	11.46977	1.000	-33.7013	39.2013
	6.00	-.50000	11.46977	1.000	-36.9513	35.9513
6.00	1.00	9.00000	11.46977	.967	-27.4513	45.4513
	2.00	5.50000	11.46977	.996	-30.9513	41.9513
	3.00	.75000	11.46977	1.000	-35.7013	37.2013
	4.00	3.25000	11.46977	1.000	-33.2013	39.7013
	5.00	.50000	11.46977	1.000	-35.9513	36.9513

Hasil_ALT

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05 1
1.00	4	36.7500
2.00	4	40.2500
4.00	4	42.5000
3.00	4	45.0000
5.00	4	45.2500
6.00	4	45.7500
Sig.		.967

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 9. Hasil Pengukuran Kadar AFP

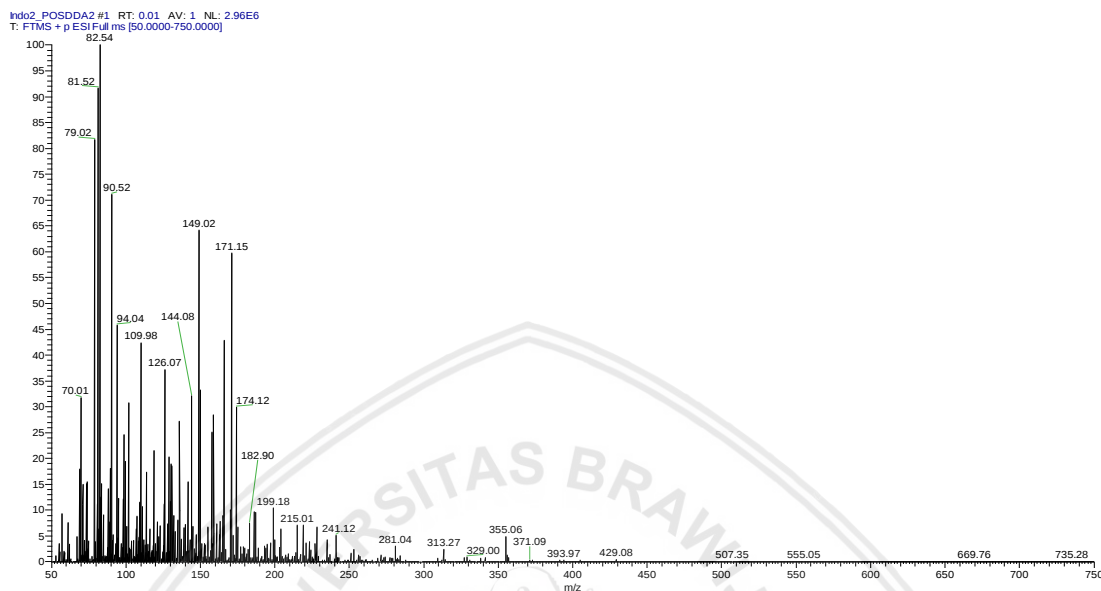
9.1. Data Kadar AFP

Kelompok Perlakuan	Aktivitas AST Ulangan ke-				Rata-rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	
Normal	122	73	129	163	121,75 $\pm$ 48,11358
Ekstrak Filipina	101	214	129	153	146,75 $\pm$ 50,04248
Ekstrak Indonesia	122	73	129	163	121,75 $\pm$ 18,55341
Sorafenib	167	194	149	77	152,50 $\pm$ 27,50152
Sorafenib+Ekstrak Filipina	125	163	182	113	145,75 $\pm$ 32,22189
Sorafenib+Ekstrak Indonesia	194	188	120	125	156,75 $\pm$ 39,67682

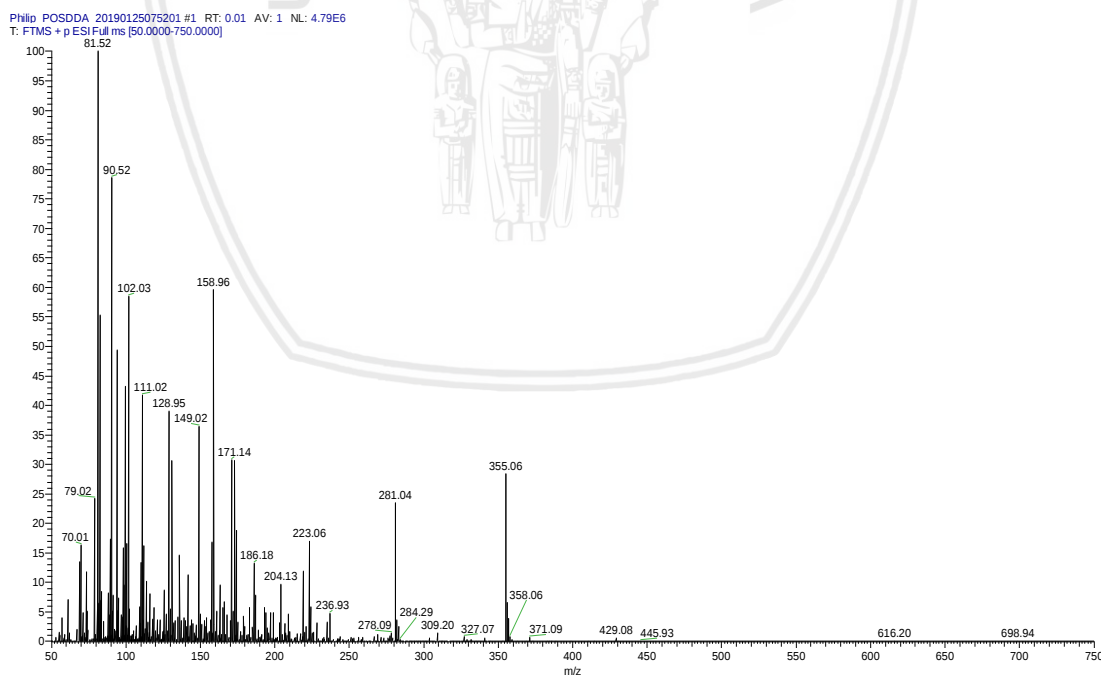


Lampiran 10. Kromatogram

Lampiran 10.1. Kromatogram LC-MS Skrining Senyawa Metabolit dari Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* dari Indonesia.



Lampiran 10.2. Kromatogram LC-MS Skrining Senyawa Metabolit dari Ekstrak Etanol Daun *Azadirachta indica* dari Filipina.



Lampiran 11. Pengamatan perilaku dan kondisi tikus selama penginduksian CCl_4

Tabel Berat badan tikus selama penginduksian CCl_4

Tikus	Minggu Ke -							Rerata	
	8	9	10	11	12	13	14	Tikus Induksi	Tikus Kontrol
1	150	156	160	168	173	190	197	229	
2	145	168	176	198	212	227	255		
3	114	132	148	155	167	182	195		
4	160	184	205	224	232	247	258		
5	150	170	177	189	200	205	217		
6	99	120	133	177	156	173	181		
7	147	149	191	209	234	253	164		
8	167	150	179	198	214	227	234		
9	150	177	185	201	213	259	269		
10	154	178	199	218	241	227	235		
11	196	202	206	222	214	230	237		
12	173	191	212	227	243	263	270		
13	168	194	215	233	257	248	258		
14	81	102	125	150	171	187	200		
15	159	185	200	214	238	258	269		
16	160	113	127	147	164	179	172		
17	130	149	175	196	227	248	255		
18	144	171	188	209	228	249	256		
19	167	187	200	226	249	266	275		264
20	130	170	194	213	227	243	256		
21	162	168	182	213	232	269	270		
22	156	185	193	201	206	214	239		
23	145	151	177	200	239	255	262		
24	170	203	225	239	251	268	280		

Tabel Pengamatan perilaku dan kondisi fisik antara kelompok tikus induksi dengan kelompok tikus normal selama penginduksian CCl₄

Pengamatan	Tikus	
	Induksi	Kontrol
Berat badan	Normal	Normal
Intake pakan	Normal	Normal
Konsumsi air	Normal	Normal
Suhu	Normal	Normal
Pernafasan	Normal	Normal
Urinasi	Normal	Normal
Penampilan Umum	Letargi	Normal
Warna kulit	Tidak ada perubahan	Tidak ada perubahan
Warna mata	Tidak ada perubahan	Tidak ada perubahan
Kematian	Hidup	Hidup



Lampiran 12. Randemen Ekstrak

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

Randemen ekstrak etanol *Azadirachta indica* Indonesia

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{9,1530 \text{ gram}}{150 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 6,10 \%$$

Randemen ekstrak etanol *Azadirachta indica* Filipina

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{2,1304 \text{ gram}}{83 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 2,56 \%$$



 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841
<http://biologi.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0238/UN10.F09.42/03/2018

pala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas IPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Ricadonna Raissa (NIM 186090200111007)

Instansi : Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

rdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 68), volume II, halaman 117 - 120, diidentifikasi sebagai:

Familia : Meliaceae
Genus : Azadirachta
Species : Azadirachta indica A. Juss (Blume) Mig.
Nama lokal : Mimba, Nimba

mikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 3 Desember 2018
Kepala Laboratorium


LABORATORIUM TAKSONOMI TUMBUHAN

Dr. Jati Batoro, M.Si
NIP. 195704251986011001



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1138-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PERBEDAAN EKSTRAK ETANOL DAUN NIMBA
(*Azadirachta indica*) DARI INDONESIA DAN
FILIPINATERHADAP EKSPRESI CD95/FAS
RECEPTOR APOPTOSIS DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*)
PASCA INDUKSI DIETILNITROSAMIN DAN KARBON
TETRAKLORIDA

PENELITI : RICADONNA RAISSA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 2 April 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

19 1044 T



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PASCASARJANA



SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI

Nomor: 3044/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Ricadonna Raissa
NIM : 186090200111007
Program Studi : Program Magister Kimia
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan judul Tesis

Studi in Silico terhadap Reseptor CD95 dan Perbedaan Aktivitas Enzim AST/ALT pada Hewan Kontrol dan Terapi Pasca Diinduksi DEN + CC14

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **9 Desember 2019** dan dinyatakan bebas plagiasi dengan kriteria toleransi $\leq 5\%$.

Direktur

Prof. Dr. Marjono, M. Phil
NIP. 196211161988031004

Malang, 10 Desember 2019
Ketua Badan Penerbitan Jurnal

Indah Yanti, S.Si., M.Si.
NIP. 19791129.200501 2 002



