

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96%  
BUAH LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*) TERHADAP PROGRESIVITAS  
PERTUMBUHAN *Lactobacillus gasseri* SEBAGAI BIOMARKER  
MIKROBIOM SERVIKOVAGINAL**

**SKRIPSI**



**UMSU**  
Unggul | Cerdas | Terpercaya

Oleh:  
**ASSYIFA CINDYKIA**  
2008260125

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA  
MEDAN 2024**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96%  
BUAH LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*) TERHADAP PROGRESIVITAS  
PERTUMBUHAN *Lactobacillus gasseri* SEBAGAI BIOMARKER  
MIKROBIOM SERVIKOVAGINAL**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
kelulusan Sarjana Kedokteran**



**UMSU**

Unggul | Cerdas | Terpercaya

Oleh:  
**ASSYIFA CINDYKIA (2008260125)**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA  
MEDAN  
2024**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri dan sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Assyifa Cindykia  
NPM : 2008260125  
Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Buah Legundi (*Vitex trifolia L.*) Terhadap Progresivitas Pertumbuhan *Lactobacillus gasseri* sebagai Biomarker Mikrobiom Servikovaginal

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 26 Januari 2024



Assyifa Cindykia



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI PENELITIAN & PENGEMBANGAN PIMPINAN PUSAT MUHAMMADIYAH  
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

UMSU Terakreditasi A Berdasarkan Keputusan Badan Akreditasi Nasional Perguruan Tinggi No. 89/SK/BAN-PT/Akred/PT/III/2019  
Jl. Gedung Arca No. 53 Medan, 20217 Telp. (061) - 7350163, 7333162, Fax. (061) - 7363488  
<https://fk.umsu.ac.id> [fk@umsu.ac.id](mailto:fk@umsu.ac.id) [umsu](#) [umsu](#) [umsu](#) [umsu](#)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

**HALAMAN PENGESAHAN**

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Assyifa Cindykia  
NPM : 2008260125  
Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Buah Legundi (*Vitex trifolia* L.) Terhadap Progresivitas Pertumbuhan *Lactobacillus gasseri* sebagai Biomarker Mikrobiom Servikovaginal

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing

(Assoc. Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M. Ked (PA), Sp. PA)  
NIDN: 0115077401

Penguji 1

(dr. Rini Syahrani Harahap, M.Ked (PA), Sp. PA)  
NIDN: 0119068205

Penguji 2

(Dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M.Kes)  
NIDN: 0105048103

Mengetahui,

Dekan FK UMSU

(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL (K))  
NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi  
Pendidikan Dokter  
FK UMSU

(dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked)  
NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan  
Tanggal : 26 Januari 2024

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh,*

Puji serta syukur saya panjatkan kehadirat Allah *Subhanahu Wata'ala* atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini apabila tanpa adanya dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak akan sangat sulit dalam proses penyelesaiannya. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
2. dr. Desi Isnayanti, M.Pd. Ked selaku Ketua Prodi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
3. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked(PA), Sp.PA sebagai dosen pembimbing yang selalu bersedia meluangkan waktu dan tenaganya untuk berdiskusi dan membimbing penelitian ini.
4. dr. Rini Syahrani Harahap, M.Ked(PA)., Sp. PA selaku dosen penguji 1 yang telah memberikan saran dan arahan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M.Kes selaku dosen penguji 2 yang telah memberikan saran dan arahan dalam penyusunan skripsi ini.
6. Asisten laboratorium biokimia dan mikrobiologi yang telah membantu penulis dalam menjalani serangkaian proses penelitian hingga penelitian selesai.
7. Kedua orang tua tercinta, Ayahanda Syamsul dan Ibunda Sri Yeni Widianti, sebagai pemberi motivasi dan dukungan berupa doa yang tiada henti agar penulis dapat menyelesaikan studi dan menulis tugas akhir ini di FK UMSU.
8. Diri saya sendiri, yang telah kooperatif dalam mengerjakan tugas akhir ini.
9. Adikku, Khalifah Mulia yang menjadi sumber kebahagiaan dan ketenangan ketika muncul kejenuhan dalam penulisan skripsi ini.

10. Teman-teman "Wanita Hebat" Jasmine dan Pia yang telah menyemangati penulis dan senantiasa memberikan kata-kata positif selama proses penyelesaian tugas akhir ini.
11. Teman-teman mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Angkatan 2020 yang telah menjadi tempat untuk berdiskusi dan saling berbagi ilmu yang yang bermanfaat selama masa kuliah pendidikan dokter.

Dalam penulisan tugas akhir ini, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan kesalahan. Oleh karena itu, penulis menerima segala bentuk kritik maupun saran untuk perbaikan di masa yang akan datang.

Akhir kata, saya berharap Allah *Subhanahu Wata'ala* berkenan membalas kebaikan semua pihak yang telah membantu saya. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

*Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh,*

Medan, 26 Januari 2024

Penulis,



Assyifa Cindykia

## HALAMAN PERNYATAAN PUBLIKASI

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Assyifa Cindykia  
NPM : 2008260125  
Fakultas : Kedokteran

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas skripsi saya yang berjudul: **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Buah Legundi (*Vitex trifolia L.*) Terhadap Progresivitas Pertumbuhan *Lactobacillus gasseri* sebagai Biomarker Mikrobiom Servikovaginal.** Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan  
Pada Tanggal : 26 Januari 2024

Yang Menyatakan



(Assyifa Cindykia)

## Abstrak

**Pendahuluan:** Kanker serviks merupakan kanker terbanyak keempat pada wanita. Selain infeksi dari *Human papillomavirus (HPV)*, kanker serviks juga dapat disebabkan oleh progresivitas pertumbuhan *Lactobacillus gasseri* yang merupakan bakteri flora normal pada vagina yang memegang peranan dalam mengontrol pertumbuhan dan perkembangan patogen. Apabila terjadi proliferasi yang berlebihan dari *Lactobacillus* ini akan terjadi perubahan pada homeostasis mikrobiom manusia dapat merusak hubungan simbiosis antara host dan mikroorganisme, mendorong perubahan fisiologis pada individu, dan mengarah pada perkembangan penyakit seperti kanker. **Metode penelitian:** Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* dan *in silico*. **Hasil penelitian:** Analisis *in vitro* melalui uji One-way Anova menunjukkan hasil  $P < 0,05$  berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi terhadap progresivitas. Uji beda dengan *post hoc* pada seluruh konsentrasi dan kelompok kontrol  $P < 0,05$  berarti terdapat perbedaan, kecuali konsentrasi 10% terhadap 20%. *In silico* pada interaksi *Levansucrase* dengan *Doxorubicin* didapatkan *binding affinity* yang lebih negatif dibandingkan dengan *Labdane-type diterpene*, tetapi *Labdane-type diterpene* lebih banyak terdapat ikatan hidrogen dan tidak memiliki efek samping dibandingkan *Doxorubicin*. **Kesimpulan:** Berdasarkan analisis *in vitro* disimpulkan bahwa terjadi penurunan progresivitas *Lactobacillus gasseri* sehingga ada pengaruh pada progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* pada kejadian kanker serviks setelah pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi. Sedangkan pada penelitian *in silico* simulasi molekuler didapatkan interaksi antar kedua ligan dengan protein baik, tetapi yang lebih baik yaitu pada *Levansucrase* dan *Doxorubicin* namun lebih banyak menimbulkan efek samping dibandingkan dengan *Labdane-type diterpene*. **Kata kunci:** buah legundi, kanker serviks, *lactobacillus gasseri*, *labdane-type diterpene*



## Abstract

**Introduction:** Cervical cancer is the fourth most common cancer in women. In addition to infection from Human papillomavirus (HPV), cervical cancer can also be caused by the progressive growth of *Lactobacillus gasseri* which is a normal bacterial flora in the vagina that plays a role in controlling the growth and development of pathogens. If there is excessive proliferation of *Lactobacillus*, there will be changes in the homeostasis of the human microbiome, which can damage the symbiotic relationship between the host and microorganisms, promote physiological changes in individuals, and lead to the development of diseases such as cancer.

**Research method:** This study is an *in vitro* and *in silico* study. **Results:** *In vitro* analysis through One-way Anova test showed the results of  $P < 0.05$  means there is a significant effect between the administration of 96% ethanol extract of Legundi fruit on progressivity. Differential test with post hoc on all concentrations and control groups  $P < 0.05$  means there is a difference, except for 10% concentration against 20%. *In silico* on the interaction of Levansucrase with Doxorubicin obtained a more negative binding affinity compared to Labdane-type diterpene, but Labdane-type diterpene has more hydrogen bonds and has no side effects compared to Doxorubicin. **Conclusion:** Based on *in vitro* analysis, it is concluded that there is a decrease in the progressivity of *Lactobacillus gasseri* so that there is an influence on the progressivity of *Lactobacillus gasseri* bacterial growth on the incidence of cervical cancer after administering 96% ethanol extract of Legundi fruit. While in *in silico* research molecular simulations obtained interactions between the two ligands with good proteins, but the better ones are Levansucrase and Doxorubicin but more side effects compared to Labdane-type diterpene.

**Key word:** legundi fruit, cervical cancer, *Lactobacillus gasseri*, labdane-type diterpene

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PUBLIKASI.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Bidang Penelitian .....	6
1.4.2. Bagi Pendidikan .....	6
1.4.3. Bagi Peneliti .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1. Serviks Uteri.....	7
2.1.1. Anatomi Serviks .....	7
2.1.2. Histologi Serviks .....	8
2.2. Kanker serviks/carcinoma cerviks/cervical cancer .....	9
2.2.1. Epidemiologi kanker serviks .....	9
2.2.2. Etiologi kanker serviks .....	10
2.2.3. Faktor risiko kanker serviks .....	11

2.2.4. Patogenesis kanker serviks .....	12
2.2.5. Proses inflamasi dengan kanker serviks .....	13
2.2.6. Siklus sel, proliferasi, dan gen yang berperan dalam kanker serviks.....	16
2.2.7. <i>Human papillomavirus</i> (HPV) dan karsinogenesis .....	17
2.3. <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	18
2.3.1. Kategori Hirarki Taksonomi <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	19
2.4. Bakteriosin pada <i>Lactobacillus</i> .....	19
2.5. Cytochrome P450 .....	20
2.6. P-glikoprotein.....	20
2.7. Buah Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> L.) .....	21
2.7.1. Kategori Hirarki Taksonomi Buah Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> L.) .....	22
2.7.2. <i>Labdane-type diterpene</i> dari buah legundi ( <i>Vitex trifolia</i> L.) .....	23
2.8. Agen Kemoterapi.....	24
2.9. Antibakteri .....	24
2.10. Uji Aktivitas antibakteri .....	25
2.10.1. Metode Dilusi.....	25
2.10.2. Metode Difusi.....	26
2.11. Prinsip kerja analisis <i>in silico</i> .....	26
2.12. Metode ekstraksi .....	27
2.13. Skrining Fitokimia.....	27
2.14. Prinsip Kerja <i>Spektroskopi Fourier Transform InfraRed (FTIR)</i> .....	28
2.15. Prinsip Kerja <i>Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)</i> .....	28
2.16. Kerangka Teori .....	29
2.17. Kerangka Konsep .....	30
2.18. Hipotesis.....	30
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
3.1. Definisi Operasional.....	31
3.2. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	32
3.3. Tempat dan Waktu Penelitian .....	33
3.4. Populasi dan Sampel Penelitian .....	33

3.4.1. Populasi Penelitian .....	33
3.4.2. Sampel Penelitian .....	33
3.4.3. Besar Sampel.....	33
3.5. Teknik Pengumpulan Data .....	34
3.5.1. Bahan dan Alat yang digunakan.....	34
3.5.1.1. Bahan.....	34
3.5.1.2. Alat .....	34
3.5.2. Persiapan Ekstrak dan Presparasi sampel.....	34
3.5.3. Skrining Fitokimia.....	35
3.5.4. Analisis <i>Spektroskopi Fourier Transform InfraRed (FTIR)</i> .....	36
3.5.5. Analisis <i>Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)</i> .....	36
3.5.6. Analisis <i>in silico</i> .....	36
3.5.6.1. Pencarian asam amino penyusun protein target .....	36
3.5.6.2. Pencarian struktur senyawa aktif <i>Labdane-type diterpene</i> dari buah legundi.....	37
3.5.6.3. Pemodelan struktur 3D protein .....	37
3.5.6.4. <i>Docking</i> dan visualisasi antara <i>protein-ligand</i> .....	37
3.5.6.5. Analisis interaksi ikatan antara protein dengan ligan .....	38
3.5.6.6. Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik Senyawa .....	38
3.5.6.7. Analisis Toksisitas Senyawa.....	38
3.5.7. Pengenceran Ekstrak buah Legundi.....	38
3.5.8. Analisis <i>in vitro</i> dengan <i>treatment</i> buah legundi.....	39
3.6. Metode Analisis Data .....	41
3.6.1. Pengolahan Data.....	40
3.6.2. Analisis Data .....	41
3.7. Alur Penelitian.....	42
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
4.1. Hasil Penelitian .....	44
4.1.1 Hasil Identifikasi Tumbuhan .....	44
4.1.2. Hasil Uji Buah Legundi.....	44
4.1.3. Hasil Skrining Fitokimia .....	45

4.1.4. Hasil Analisis <i>FTIR</i> .....	46
4.1.5. Hasil Analisis GC-MS .....	47
4.1.6. Hasil Analisis <i>In silico</i> .....	48
4.1.6.1. Hasil Simulasi Docking Molekuler .....	48
4.1.6.2. Hasil Farmakokinetik <i>Labdane-type diterpene</i> dan <i>Doxorubicin</i> .....	49
4.1.6.3. Hasil Farmakokimia <i>Labdane-type diterpene</i> dan <i>Daxorubicin</i> .....	51
4.1.6.3.1. Fisikokimia.....	51
4.1.6.3.2. Lipophilicity .....	52
4.1.6.3.3. Water Solubility.....	52
4.1.6.4. Hasil Uji toksisitas senyawa <i>Labdane-type diterpene</i> dan Doxorubicin.....	53
4.1.7. Hasil Analisis <i>In vitro</i> dengan treatment buah Legundi .....	54
4.1.7.1. Hasil Analisis <i>In Vitro</i> dengan Metode Dilusi Cair .....	54
4.1.7.2. Hasil Analisis <i>In Vitro</i> dengan Metode Dilusi Padat .....	55
4.1.7.3. Hasil Analisis <i>In Vitro</i> dengan Metode Difusi.....	57
4.1.8. Hasil Analisis Data .....	59
4.1.8.1. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas .....	59
4.1.8.2. Hasil Analisis One-way Anova dengan Nilai Rata-rata dan Standar Deviasi .....	61
4.1.8.3. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> .....	61
4.2. Pembahasan .....	64
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>69</b>
5.1. Kesimpulan.....	69
5.2. Saran.....	70
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>71</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Anatomi Serviks .....	7
Gambar 2.2. Penyuplai Arteri Serviks.....	8
Gambar 2.3. Histologi Serviks .....	9
Gambar 2.4. Zona Transformasi Serviks.....	9
Gambar 2.5. Progresivitas Cervical Intraepithelial Neoplasia .....	13
Gambar 2.6. Dampak disbiosis microbiota pada karsinogenesis .....	14
Gambar 2.7. Gambaran efek <i>Lactobacillus</i> pada kanker serviks .....	15
Gambar 2.8. Fase siklus sel dan kompleks kinase yang bergantung pada Cyclin Dependent Kinase (CDK)/Kompleks Cyclin .....	16
Gambar 2.9. Pengorganisasian genom <i>HPV</i> .....	17
Gambar 2.10. <i>Lactobacillus</i> pada sekresi vagina normal.....	18
Gambar 2.11. <i>Lactobacillus</i> pada sekresi vagina dengan infeksi.....	19
Gambar 2.12. Tanaman Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> L.).....	22
Gambar 2.13. Diagram alir kerangka terori penelitian.....	29
Gambar 2.14. Kerangka konsep penelitian .....	30
Gambar 3.1. Diagram alir alur penelitian.....	43
Gambar 4.1. Spektrum gugus fungsi ekstrak buah Legundi .....	46
Gambar 4.2. Senyawa aktif Labdane-type <i>diterpene</i> .....	48
Gambar 4.3. MS Spektrum pada Labdane-type diterpene ekstrak buah Legundi.....	48
Gambar 4.4. Interaksi antara protein Levansucrase terhadap ligan Doxorubicin.....	49
Gambar 4.5. Interaksi antara <i>Levansucrase</i> dengan <i>Labdane-type diterpene</i> . 50	
Gambar 4.6. Radar toksisitas <i>Labdane-type diterpene</i> .....	54
Gambar 4.7. Kadar Hambat Minimum.....	55
Gambar 4.8. Kadar Bunuh minimum pada tiap konsentrasi dan kelompok kontrol .....	56
Gambar 4.9. Hasil pengujian In vitro metode difusi dengan treatment buah Legundi.....	59

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Klasifikasi respon hambatan pada pertumbuhan bakteri.....	26
Tabel 3.1. Definisi Operasional.....	31
Tabel 3.2. Volume Ekstrak buah Legundi yang dibutuhkan oada penelitian...	39
Tabel 4.1. Hasil Uji buah Legundi .....	44
Tabel 4.2. Hasil Skrining Fitokimia .....	45
Tabel 4.3. Jenis Senyawa Serapan Gelombang pada Hasil Uji FTIR .....	47
Tabel 4.4. Hasil simulasi Docking molekuler .....	49
Tabel 4.5. Hasil Penilaian Farmakokinetik .....	51
Tabel 4.6. Hasil Penilaian Fisikokimia.....	52
Tabel 4.7. Hasil Penilaian Lipophilicity.....	52
Tabel 4.8. Hasil Penilaian Water Solubility.....	53
Tabel 4.9. Hasil Penilaian uji toksisitas.....	53
Tabel 4.10. Hasil KHM ekstrak buah Legundi.....	54
Tabel 4.11. Hasil KBM ekstrak buah Legundi .....	56
Tabel 4.12. Daya hambat pada konsentrasi ekstrak buah Legundi dan Kelompok Kontrol.....	57
Tabel 4.13. Hasil analisis Uji Normalitas Shaphiro-wilk dan Homogenitas....	60
Tabel 4.14. Hasil One-way anova dengan nilai rata-rata dan standar deviasi..	61
Tabel 4.15. Hasil uji <i>Post Hoc</i> konsentrasi 10% dengan konsentrasi 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif .....	62
Tabel 4.16. Hasil uji <i>Post Hoc</i> konsentrasi 20% dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif.....	62
Tabel 4.17. Hasil uji <i>Post Hoc</i> konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif.....	63
Tabel 4.18. Hasil uji <i>Post Hoc</i> konsentrasi 50% dengan konsentrasi 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif .....	63
Tabel 4.19. Hasil uji <i>Post Hoc</i> konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100% kontrol positif, dan kontrol negatif.....	64
Tabel 4.20. Hasil uji <i>Post Hoc</i> Konsentrasi 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif .....	64

## DAFTAR SINGKATAN

BAL	: Bakteri Asam Laktat
CDK	: <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CIN	: <i>Cervical intraepithelial Neoplasia</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
CT	: <i>Computerized Tomography</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FIGO	: <i>International Federation of Gynaecology and Obstetric</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform InfraRed</i>
GC-MS	: <i>Gas Chromatography and Mass Spectroscopy</i>
GLOBOCAN	: <i>Global Cancer Observatory</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	: <i>Human Papillomavirus</i>
HSIL	: <i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i>
INOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
KBM	: Kadar bakterisidal Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
LCR	: <i>Long Control Region</i>
LEEP	: <i>Loop Electrosurgical Excision Procedure</i>
LLETZ	: <i>Large Loop Excision of the Transformation Zone</i>
LSIL	: <i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i>
MCM2	: <i>Mini Chromosome Maintenance Protein 2</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MMP-9	: <i>Matrix metalloproteinase enzyme-9</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	: <i>National Institute of Health</i>
NLM	: <i>United States National Library of Medicine</i>
N/C	: <i>Ratio Nucleus Cytoplasm</i>
OUI	: <i>Ostium Uteri Internum</i>
OVCA-1	: <i>Ovarian Cancer gene 1</i>
PET	: <i>Positron Emission Tomography</i>
pRb	: Protein Retinoblastoma
p16	: Protein 16
p53	: Protein 53
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCC	: <i>Squamous Cell Carcinoma</i>
STI	: <i>Sexually Transmitted Infections</i>
URR	: <i>Upper Regulatory Region</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Komisi Etik Penelitian .....	78
Lampiran 2. Surat Identifikasi Tanaman .....	79
Lampiran 3. Surat izin Laboratorium Mega Global Safety Indonesia .....	80
Lampiran 4. Surat Izin Penggunaan Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UMSU.....	81
Lampiran 5. Hasil GC-MS Senyawa buah Legundi.....	82
Lampiran 6. Uji Normalitas dan homogenitas menggunakan <i>IBM SPSS statistics version 26</i> .....	85
Lampiran 7. Uji One-way menggunakan <i>IBM SPSS statistics version 26</i> .....	89
Lampiran 8. Uji <i>Post Hoc Least Significant Difference</i> menggunakan <i>IBM SPSS statistics version 26</i> . ....	89
Lampiran 9. Dokumentasi Kegiatan Penelitian.....	91
Lampiran 10. Draft Artikel Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.....	97
Lampiran 11. Biodata Penulis .....	106

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker serviks merupakan kanker terbanyak keempat pada wanita, setelah kanker payudara, paru-paru dan kolorektal, dengan 527.600 kasus baru dan lebih dari separuh angka kematian atau 265.700 kematian di seluruh dunia. Kanker ini merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker pada wanita.<sup>1</sup> Jenis kanker serviks yang paling umum adalah karsinoma sel skuamosa, yang muncul dari perkembangan neoplasia intraepitel serviks.<sup>2</sup>

Pada daerah Sumatera Utara prevalensi kanker serviks terus meningkat setiap tahun. Tahun 2010 ditemukan 475 kasus kanker serviks, tahun 2011 terdapat 548 kasus kanker serviks, di tahun 2012 ditemukan 681 kasus, selanjutnya pada tahun 2014 kasus kanker serviks bertambah banyak yaitu sebanyak 786 kasus.<sup>3</sup>

Infeksi *Human Papillomavirus (HPV)* salah satu agen penyebab kanker serviks yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kasus kanker. Infeksi *HPV* dapat memengaruhi gen yang bekerja pada manusia terutama dalam proses apoptosis, siklus sel dan proliferasi diantaranya *Cyclin D-1*.<sup>4</sup> Integrasi *Deoxyribonucleic Acid (DNA) HPV* ke dalam genom epitelosit serviks yang dapat menyebabkan persistensi onkogen virus *E6* dan *E7*, oncoprotein ini dapat berpengaruh terhadap faktor epigenetik dan *splicing*. Perubahan ini menyebabkan proliferasi yang tidak terkontrol dan induksi karsinogenesis.<sup>4,5</sup>

Selain infeksi *Human Papillomavirus (HPV)*, kanker serviks juga dapat disebabkan oleh adanya proliferasi yang tidak terkontrol.<sup>6</sup> Bakteri yang secara fisiologis dalam keadaan normal merupakan bakteri flora normal yang berada di vagina untuk mempertahankan keseimbangan dinamis, ketika terjadi proliferasi secara berlebihan dapat menjadi penyebab dari berbagai penyakit, diantaranya *multiple gynecological disease* yaitu koleitis, dan *high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN)* dan kanker serviks. Flora normal yang terdapat di vagina antara lain *Mycoplasma genitalium*, jenis bakteri *Lactobacillus* yaitu *L. crispatus*, *L. Iners*, *L. jensenii* and *L. gasseri*, *Staphylococcus epidermidis*,

*Enterococcus*, *Escherichia coli*, dan spesies dari *Bacteriodes*.<sup>7</sup> *Lactobacillus* vagina memegang peranan dalam mengontrol pertumbuhan dan perkembangan patogen dengan memproduksi hidrogen peroksida, asam laktat, *bacteriocins*, dan kehadiran dalam adhesi epitelium vagina secara kompetitif. Aktivasi sistem komplemen dan respon sistem imun lokal.<sup>6</sup>

*Lactobacillus* dan metabolitnya dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh. Pengaktifan sistem kekebalan tubuh yang dilakukan oleh *Lactobacillus* dapat mempengaruhi imunitas selular dan humoral. Bakteri ini juga dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel turunan timus (sel T). *Lactobacillus* dapat berproliferasi karena adanya infeksi yang persisten dari *HPV*, infeksi inilah penyebab peradangan pada tubuh manusia. Sehingga apabila terjadi proliferasi yang berlebihan dari *Lactobacillus* ini akan terjadi perubahan pada homeostasis mikrobiom manusia dapat merusak hubungan simbiosis antara host dan mikroorganisme, mendorong perubahan fisiologis pada individu, dan mengarah pada perkembangan penyakit seperti kanker.<sup>6</sup> Keseimbangan dinamis dari lingkungan mikroba terganggu, efek negatif dari bakteri anaerob akan menangkalkan efek positif dari *Lactobacillus*.<sup>8</sup>

Pada keadaan normal stabilitas genom dipertahankan oleh beberapa gen setelah kerusakan *DNA*. Hal ini dilakukan dengan cara menghambat kerja siklus sel pada fase G0/G1 dan G2/M dan menginduksi apoptosis pada sel yang bertugas untuk membantu mencegah terjadinya mutasi sel dan sel neoplastik serta memengaruhi ekspresi berbagai protein yang terlibat dalam induksi apoptosis, regulasi siklus sel, menghambat proses pertumbuhan dan angiogenesis, dan pada proses intraseluler lainnya.<sup>4</sup> Siklus sel dikendalikan oleh mesin yang terdiri dari keluarga protein kinase yaitu *Cyclin Dependent Kinase (CDK)*. Kerja *CDK1* diatur secara ketat oleh interaksi protein-protein dan fosforilasi. Secara khusus, diperlukan pengikatan subunit *Cyclin* untuk mengaktifasi *CDK* termasuk *CDK1*.<sup>9</sup>

Penelitian Lubis (2018) terhadap hewan coba yang telah diinduksi oleh zat karsinogen yang dapat menyebabkan kanker kulit. Penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak etanol yang terkandung dalam buah legundi memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas proliferasi dan pertumbuhan tumor.<sup>10</sup> Hingga saat ini

pilihan utama dalam pengobatan kanker serviks adalah kemoterapi. Walaupun kemoterapi diketahui banyak memberikan efek samping yang serius karena memiliki sitotoksitas yang dapat merugikan sel normal dan dapat menyebabkan kemoresistensi. Dalam beberapa tahun terakhir, senyawa alami dengan aktivitas potensial antikanker telah diisolasi dari banyak tanaman dan telah diteliti secara ekstensif.

Buah Legundi umumnya digunakan oleh negara Cina sebagai pengobatan tradisional untuk mengobati pusing, sakit kepala, migrain, kanker, dan antituberculosis.<sup>11,12</sup> Ekstrak Legundi telah ditemukan sitotoksik terhadap beberapa *cell line* kanker dan memiliki aktivitas antimikroba.<sup>12</sup> Dengan demikian buah Legundi diduga memiliki aktivitas yang potensial dalam menginduksi apoptosis dan menghambat siklus sel serta memiliki sifat antineoplastik.

Pada legundi terdapat beberapa senyawa kimia yang diekstraksi menggunakan etanol 96% diantaranya golongan *flavonoid* (*Castisin*; *3,6,7-trimetil kuersetagetin*; *Vitexin*; *Artemetin*; *5-metil artemetin*; *7-desmetil artemetin*; *Luteolin*; *Luteolin-7-O-<sup>2</sup>-D-glukuronida*; *Luteolin-3-O-<sup>2</sup>- D-glukuronida* dan *Isoorientin*), *Terpenoid*, maupun *Sterol* (*<sup>2</sup>-sitosterol* dan *<sup>2</sup>-sitosterol-<sup>2</sup>-D-glukosid*).<sup>13</sup> Penelitian lain membuktikan didalam buah legundi ditemukan adanya senyawa sabinene (13.17%), eucalyptol (23.07%), terpinen-4-ol (4.26%),  $\alpha$ -terpineol (5.19%), d-Limonene (7.25%), and caryophyllene (14.72%).<sup>14</sup> Senyawa aktif buah legundi golongan terpenoid yaitu *Labdane type-diterpene* ditemukan dalam bentuk *1,1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene*.<sup>15</sup>

Penelitian Ban *et al.* 2018 menemukan bahwa senyawa *diterpene* 1-5 dapat bekerja dengan menghambat proses proliferasi, serta menginduksi kematian sel yang terprogram (apoptosis), dan ekstrak Legundi juga dapat menghambat perkembangan siklus sel dari *cell line tsFT210* dan *K562* pada fase G0/G1. Dengan demikian, kelima *Labdane type-diterpene* tersebut dinilai memiliki efek kemoterapi kanker dan Legundi dapat digunakan untuk menyembuhkan kanker tertentu.<sup>16</sup> Penelitian *in vitro* menyimpulkan konsentrasi ekstrak legundi (*Vitex trifolia* L.) yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* mulai dari konsentrasi 10% dengan daya hambat 8 mm, konsentrasi

15% dengan daya hambat sebesar 8,84 mm, konsentrasi 20% dengan daya hambat sebesar 9,84 mm, konsentrasi 25% dengan daya hambat sebesar 10,54 mm, hal ini menandakan semakin besar konsentrasi maka semakin besar daya hambat pertumbuhan bakteri.<sup>17</sup>

Beberapa penelitian *in vitro* menunjukkan adanya interaksi antara ekstrak Legundi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak Legundi memiliki efek antibakterial dalam menghambat pertumbuhan bakteri.<sup>14</sup> *Lactobacillus crispatus* dan *Lactobacillus gasseri* telah membuktikan melalui studi *in vitro* bahwa bakteri ini dapat memberikan efek sitotoksik pada sel kanker serviks *HeLa* dalam keadaan tertentu.<sup>8</sup> Studi *in silico* terbukti senyawa  $\alpha$ -terpineol yang terkandung didalam Legundi memiliki aktivitas pengikatan dan interaksi yang kuat terhadap *tyrosyl-tRNA synthetase* dari *Staphylococcus aureus*. Sehingga, ekstrak Legundi berpotensi menghambat *tyrosyl-tRNA synthetase* pada bakteri *Staphylococcus aureus*.<sup>14</sup>

Sejauh ini belum ada penelitian tentang *Labdane-type diterpene* pada ekstrak Legundi terutama pada kanker serviks dengan pembahasan tentang keterlibatan *Lactobacillus gasseri*. Melalui penelitian ini, dapat dimanfaatkan sumber daya tanaman obat yaitu buah Legundi (*Vitex trifolia L.*) yang banyak ditemukan di Sumatera Utara. Penelitian ini menginvestigasi potensi senyawa aktif golongan *Labdane-type diterpene* dari ekstrak etanol 96% buah Legundi (*Vitex trifolia L.*) sebagai antimikroba dengan metode *in vitro* dan *in silico* sebagai pembuktian teori lingkungan mikro serviks karena adanya kehadiran *Lactobacillus gasseri*. Serta dapat memahami mekanisme kerja antimikroba sehingga dapat diaplikasikan dalam terapi klinis di masa depan.

## 1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana interaksi (*molecular docking*) antara senyawa golongan *Labdane type-diterpene* dan agen kemoterapi *Doxorubicin* terhadap protein *Levansucrase*?

2. Bagaimana sifat fisikokimia, lipofilisitas, kelarutan air, farmakokinetik, dan toksisitas obat/senyawa?
3. Apakah terdapat pengaruh pada progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* setelah pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi?

### 1.3. Tujuan Penelitian

#### 1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah:

1. Simulasi molekuler antara senyawa golongan *Labdane type-diterpene* dan agen kemoterapi *Doxorubicin* terhadap protein *Levansucrase*
2. Menganalisis sifat fisikokimia, lipofilisitas, kelarutan air, farmakokinetik, dan toksisitas obat/senyawa.
3. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi terhadap progresivitas pertumbuhan biomarker mikrobiom servikovaginal bakteri *Lactobacillus gasseri*.

#### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menilai interaksi antara ligan *Labdane-type diterpene* dengan protein *Levansucrase* dan agen kemoterapi *Doxorubicin* melalui studi *in silico* di ruang hampa yang dinilai berdasarkan nilai *binding affinity*, jumlah ikatan hidrogen dan hidrofobik serta jenis ikatan hidrogen dan hidrogen.
2. Menilai sifat fisikokimia berdasarkan berat molekul, jumlah hidrogen yang diterima, jumlah hidrogen donor, *molar refractivity*, dan TPSA.
3. Menilai sifat lipofilisitas berdasarkan nilai  $\text{Log } P_{o/w}$
4. Menentukan kelas solubilitas berdasarkan nilai  $\text{Log } S$
5. Menganalisis sifat farmakokinetik berdasarkan ADME
6. Menganalisis sifat toksisitas senyawa/obat berdasarkan predicted  $\text{LD}_{50}$ , golongan kelas toksisitas, dan organ yang terlibat.
7. Mengidentifikasi pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi dengan konsentrasi bertingkat yaitu konsentrasi 10%, konsentrasi 20%, konsentrasi 25%, konsentrasi 50%, konsentrasi 75%, dan konsentrasi 100% terhadap progresivitas pertumbuhan biomarker mikrobiom servikovaginal bakteri *Lactobacillus gasseri*.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Bidang Penelitian**

1. Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk menganalisis senyawa *Labdane-type diterpene* pada ekstrak etanol 96% buah Legundi (*Vitex trifolia* L.) sebagai efek antimikroba dalam menurunkan progresivitas biomarker mikrobiom servikovaginal *Lactobacillus gasseri*.
2. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi data yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan mengenai pengobatan alternatif pada kanker serviks.

### **1.4.2. Bagi Pendidikan**

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai sumber informasi dalam pengembangan ilmu pengetahuan yang berhubungan dengan pengobatan alternatif kanker serviks yang berbahan dasar alami tanpa efek samping.

### **1.4.3. Bagi Peneliti**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan acuan sebagai penelitian lanjutan dan dapat menjadi sarana bagi peneliti untuk memperluas wawasan pengetahuan dalam bidang pengobatan herbal.

## BAB 2

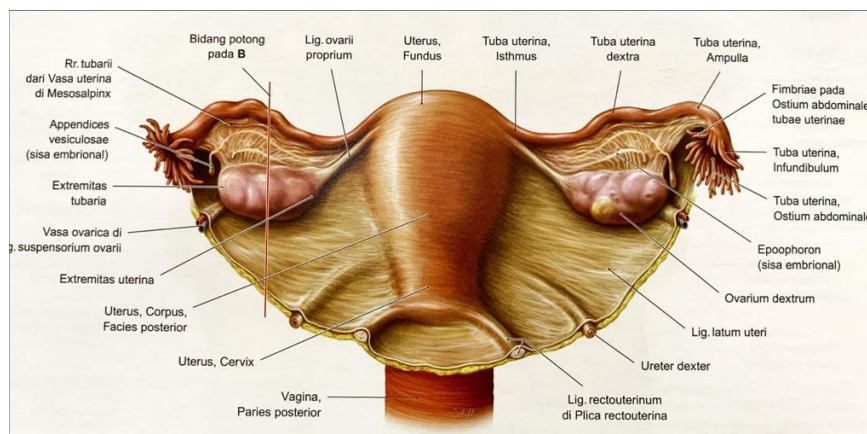
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Serviks Uteri

##### 2.1.1. Anatomi Serviks Uteri

Uterus merupakan organ yang berbentuk buah pir dengan dinding yang tebal dan memiliki otot. Uterus ini hanya terdapat pada wanita dan berfungsi sebagai tempat pemeliharaan fetus (bayi) dan organ partus (persalinan).<sup>18</sup> Organ ini terletak diatas Vesica urinaria (kandung kemih) dan sebelah dorsal dari rectum. Fundus dan corpus dari uterus ditutupi oleh Peritoneum urogenitale.<sup>19</sup> Uterus terdiri dari Corpus uteri (dengan fundus), dan Cervix uteri, keduanya bersambung di Isthmus uteri. Lumen corpus (cavitas uteri, rongga uterus) yang berhubungan dengan lumen vagina melalui isthmus dan canalis cervicis memiliki panjang total 7-8 cm, lebar 5 cm, dan memiliki tebal 2,5 cm. Serviks uteri dibagi menjadi portio supravaginalis dan portio vaginalis.<sup>19,20</sup>

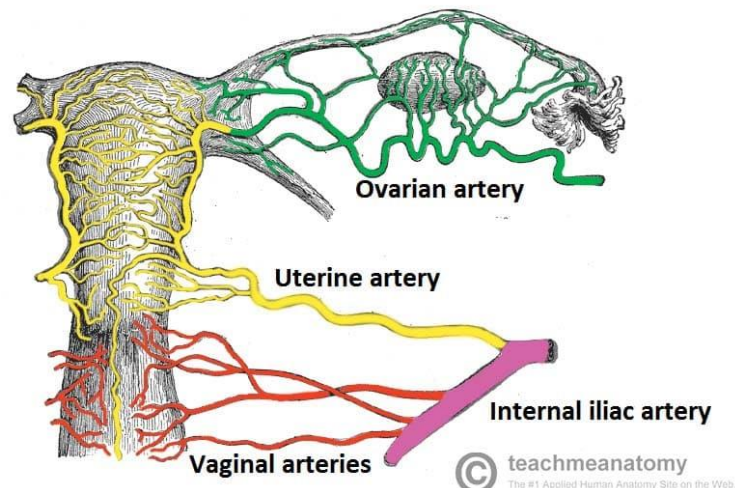
Adapun komponen penyangga terkuat dari serviks uteri pada gambar 2.1, yaitu ligamentum cardinale (mackenroth) yang terletak setentang dengan OUI, atau ligamentum transversum pelvis, yang merupakan jaringan ikat fibrosa yang berjalan di parametrium melalui dinding samping pelvis ke portio supravaginali servicis. Ligamentum lainnya yang terdapat pada serviks uteri yaitu ligamentum uteroscral dan ligamentum pubocervical.<sup>19</sup>



Gambar 2.1 Anatomi Serviks<sup>19</sup>



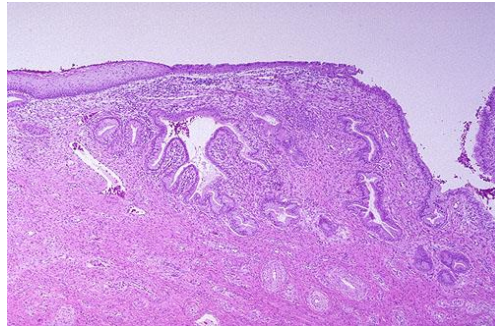
Organ uterus beserta serviks uteri diperdarahi oleh A. uterine yang merupakan percabangan dari A. Iliaca interna. Pembuluh darah vena melakukan drainase melalui plexus venous uterinus dan V. Uterine dialirkan ke V. Iliaca interna. Drainase limfatik melewati NII. Parauterini menuju ke NII. Iliaci interni dan communes (terutama berasal dari corpus) dan NII. Inguinales. Inervasi otonom dari organ uterus berasal dari 2 sistem persarafan yaitu parasimpatis dan simpatis. Sistem saraf parasimpatis pada uterus yaitu Nn. Splanchnici pelvici setinggi sacrum 2-4, sedangkan sistem saraf simpatis yaitu Nn. Splanchnici lumbales dan sebagian sacrales yang melalui plexus hypogastricus inferior.<sup>19,21</sup> Sistem penyuplai arteri serviks diperlihatkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Penyuplai arteri serviks<sup>21</sup>

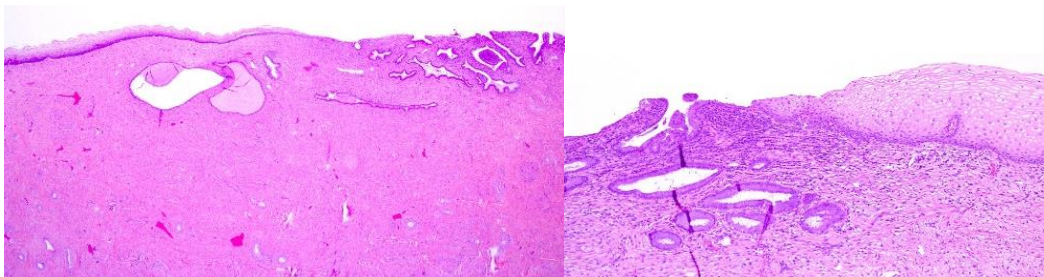
### 2.1.2. Histologi serviks uteri

Bagian dari kanalis serviks dilapisi oleh epitel kanalis servikalis. Epitel serviks juga melapisi kelenjar serviks yang berbentuk tubular dan memiliki percabangan serta memiliki sudut yang miring terhadap kanalis servikalis ke dalam lamina propria.<sup>22</sup> Sebagian dari kelenjar serviks yang tersumbat akan membentuk kista glandularis kecil. Sifat dari jaringan ikat fibrosa yang terdapat di lamina propria serviks lebih fibrous dibandingkan dengan organ uterus.<sup>22</sup> Histologi serviks uteri diperlihatkan pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Histologi serviks uteri<sup>22</sup>

Serviks uteri terdiri dari ektoserviks dan endoserviks. Bagian ektoserviks dari serviks uteri dilapisi oleh jenis *nonkeratinizing stratified squamous epithelium* sedangkan bagian dari endoserviks dilapisi oleh *columnar mucinous epithelium*. Pada serviks uteri terdapat zona peralihan yang disebut dengan zona transformasi. Zona transformasi ini merupakan zona metaplasia yang terdapat diantara ektoserviks dan endoserviks.<sup>23</sup> Zona transformasi serviks diperlihatkan pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Zona transformasi serviks<sup>23</sup>

## 2.2. Kanker serviks/*Carcinoma Cervix/Cervical Cancer*

Meskipun banyak faktor yang dapat menyebabkan kanker serviks, tetapi perkembangannya terutama dikaitkan dengan infeksi *Human Papillomavirus (HPV)* yang ditularkan secara seksual.<sup>24</sup> Infeksi *HPV* dapat memengaruhi gen manusia terutama gen yang bekerja pada proses apoptosis, siklus sel dan proliferasi.<sup>25</sup> Selain itu progresivitas dari pertumbuhan bakteri juga dapat menjadi penyebab kanker serviks.<sup>6</sup>

### 2.2.1. Epidemiologi Kanker Serviks

Kanker serviks menempati urutan keempat kanker tersering pada wanita dengan 527.600 kasus baru dengan angka kematian lebih dari setengah

kejadiannya yaitu 265.700 kematian di seluruh dunia, setelah kanker payudara, paru, dan, kolorektal. Kanker ini menempati urutan ketiga sebagai penyebab kematian akibat kanker pada wanita.<sup>1</sup> GLOBOCAN 2020 melaporkan terdapat 36.633 kasus wanita terdiagnosis kanker serviks. Data ini menempatkan kanker serviks sebagai kanker kedua terbanyak di Indonesia dan kanker ketiga terbanyak penyebab kematian di Indonesia.<sup>26</sup>

Berdasarkan data dari WHO, kanker serviks di Indonesia pada tahun 2019 menjadi penyebab kematian akibat kanker serviks sebanyak 843.000 jiwa dari total populasi wanita 134.400.000 jiwa. Pada tahun 2020 insiden kanker serviks sebanyak 27 jiwa per 100.000 wanita. Rasio mortalitas terhadap kejadian kanker serviks pada tahun 2020 yaitu 0,57%.<sup>27</sup>

Di Daerah Sumatera Utara prevalensi kanker serviks terus meningkat setiap tahun. Tahun 2010 ditemukan 475 kasus kanker serviks, tahun 2011 terdapat 548 kasus kanker serviks, di tahun 2012 ditemukan 681 kasus, selanjutnya pada tahun 2014 kasus kanker serviks bertambah banyak yaitu sebanyak 786 kasus.<sup>3</sup>

Program skrining yang direkomendasikan tidak dapat mengendalikan angka morbiditas dan mortalitas yang semakin meningkat beberapa tahun belakangan ini.<sup>28</sup> Tipe kanker serviks terbanyak adalah jenis karsinoma sel skuamosa yang berkembang dari neoplasia intraepitel serviks.<sup>2</sup>

### **2.2.2. Etiologi Kanker Serviks**

Tipe kanker serviks terbanyak adalah karsinoma sel skuamosa yang timbul dari infeksi *HPV*. Sekitar 95% perempuan dengan kanker serviks terinfeksi dengan satu atau lebih subtype *HPV*, *HPV* 16 dan 18 adalah yang paling umum (*HPV-16* sebanyak 50% dan *HPV-18* sebanyak 10-15%). Sekitar 90% penderita kanker serviks dijumpai pada perempuan dengan sosial ekonomi rendah di mana program skrining tidak dilakukan dengan baik.<sup>29</sup> Selain itu penelitian Zhang *et al*, 2020 mengkonfirmasi bahwa infeksi persisten dari *HPV* risiko tinggi berhubungan erat dengan terjadinya kanker serviks. Ada 14 jenis *HPV* risiko tinggi, yaitu 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 dan 73. Sebuah studi survei cross-sectional multisenter menunjukkan bahwa tingkat infeksi *HPV* risiko tinggi di Cina adalah sekitar 14,3%, dan tipe yang dominan adalah *HPV16* (2,9%), *HPV52* (1,7%),

*HPV58* (1,5%), *HPV33* (1%) dan *HPV18* (0,8%), dan menunjukkan puncak ganda selama masa remaja dan perimenopause.<sup>30</sup> Secara global, *HPV16* memiliki resiko tertinggi terhadap tingkat infeksi, *HPV18* adalah jenis yang paling umum kedua, sementara *HPV33* umum di Asia, *HPV52* dan *HPV58* memiliki tingkat infeksi yang relatif rendah.<sup>29,30</sup>

Secara fisiologis dan dalam keadaan normal, bakteri flora normal yang berada di vagina memegang peranan dalam mempertahankan keseimbangan dinamis, ketika terjadi proliferasi secara berlebihan dapat menjadi penyebab dari berbagai penyakit, diantaranya *multiple gynecological disease* yaitu koleitis, dan *high-grade cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) dan kanker serviks.<sup>6</sup> Flora normal yang terdapat di vagina antara lain *Mycoplasma genitalium*, jenis bakteri *Lactobacillus* yaitu *L. crispatus*, *L. Iners*, *L. jensenii* and *L. gasseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, dan spesies dari *Bacteriodes*.<sup>6,7</sup>

### **2.2.3. Faktor Risiko Kanker Serviks**

Sejumlah faktor risiko untuk kanker serviks terkait paparan terhadap *HPV*. Perkembangan kanker proses invasif bisa memperpanjang hingga 20 tahun dari lesi prekursor yang disebabkan oleh *HPV* menular seksual. Namun, terdapat faktor risiko lainnya seperti faktor reproduksi seksual, faktor perilaku, kanker serviks yang meliputi hubungan seksual pada usia muda usia (<16 tahun), berganti-ganti pasangan seksual dan tidak menggunakan kondom, merokok, tinggi paritas dan tingkat sosial ekonomi yang rendah.<sup>1</sup> Usia rata-rata diagnosis kanker serviks adalah sekitar 49 tahun. Penderita sering terdiagnosis pada stadium lanjut dikarenakan gejala awal yang tidak terlalu jelas.<sup>29</sup>

Faktor resiko berdasarkan *Sexually transmitted infections (STI)* atau infeksi menular seksual yaitu karena adanya infeksi dari *HPV* yang paling lazim ditemukan pada kejadian kanker serviks yaitu *HPV 16* dan *18*, virus ini dapat ditularkan melalui kontak seksual.<sup>30,31</sup> Studi Meta-analisis menunjukkan bahwa prevalensi tertinggi *HPV* terjadi pada usia 25 tahun, yang dapat dikaitkan dengan perubahan perilaku seksual. Puncak kedua terjadinya infeksi *HPV* ialah diatas usia 45 tahun. Selain karena adanya infeksi virus, *HIV* juga menjadi faktor risiko pada kanker serviks, Wanita yang terinfeksi *HIV* berisiko lebih tinggi terkena Infeksi *HPV* pada

usia dini (13–18 tahun) dan berisiko tinggi terkena kanker serviks. Selain *HPV*, *STI* juga dapat disebabkan karena adanya bakteri pada servikovaginal sehingga dapat meningkatkan risiko kejadian kanker serviks.<sup>6,7</sup>

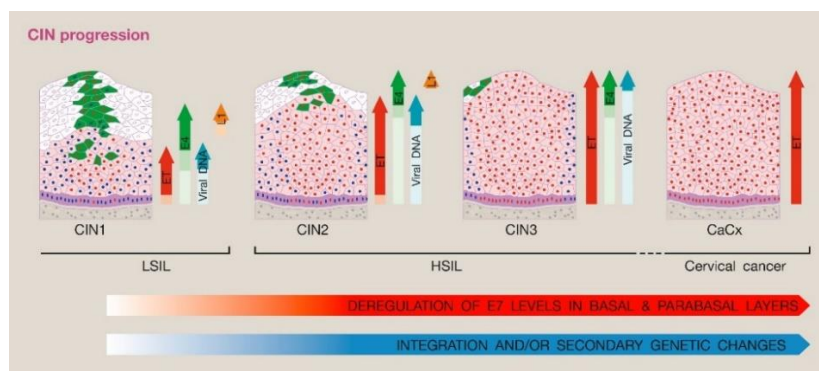
Selain berdasarkan *STI*, faktor reproduksi dan seksual juga dapat menjadi faktor risiko kanker serviks. Peningkatan risiko kanker serviks yang signifikan didapatkan pada individu dengan multipel seksual dibandingkan dengan individu dengan sedikit partner seksual, baik pada penyakit serviks non-ganas dan kanker serviks.<sup>30</sup> Selain itu penggunaan pil kontrasepsi oral juga menjadi faktor risiko dari kanker serviks. Penggunaan pil kontrasepsi oral lebih dari 5 tahun dapat menjadi faktor risiko independen dalam menyebabkan kanker serviks terutama untuk adenokarsinoma.<sup>30,32</sup>

#### **2.2.4. Patogenesis Kanker Serviks**

Infeksi *HPV* dapat memengaruhi gen manusia terutama gen yang bekerja pada proses apoptosis, siklus sel dan proliferasi diantaranya *cyclin D-1*.<sup>4</sup> Terjadi integrasi *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* pada *HPV* kedalam genom epitelosit serviks inang menyebabkan terjadinya persistensi protein onkogen virus *E6* dan *E7* dengan memengaruhi faktor epigenetik dan *splicing*. Perubahan ini menyebabkan proliferasi yang tidak terkontrol dan induksi karsinogenesis.<sup>4,5</sup>

*Human Papillomavirus (HPV)* mengintegrasikan materi *DNA*-nya kedalam sel basal di *columnar junction* (di zona transformasi serviks), virus ini akan menghasilkan onkoprotein *E6* dan *E7* yang dapat menyebabkan *CIN* dan terus berkembang menjadi kanker serviks setelah 10 hingga 20 tahun.<sup>24</sup> Kanker ini dapat dicegah, dengan *skrining smear test* yang mendeteksi lesi pra-kanker. Lesi ini dapat diangkat sebelum berkembang menjadi kanker invasif.

Penilaian *CIN* 1, 2, dan 3 bergantung pada tingkatan diferensiasi epitel skuamosa pada serviks. *CIN* 1 merupakan tergolong ke dalam *low-grade CIN* atau *LSIL* yang ditandai dengan *dysplasia* ringan, *CIN* 2 ditandai dengan *dysplasia* sedang, *CIN* 3 ditandai dengan *dysplasia* berat hingga terjadi *carcinoma in situ*. *CIN* 2 dan *CIN* 3 termasuk kedalam *high-grade CIN* atau *HSIL*. *Dysplasia* akan terus berkembang menjadi suatu karsinoma invasif.<sup>33</sup> Progresivitas cervical intraepithelial neoplasia diperlihatkan pada gambar 2.5.



Gambar 2.5 Progresivitas Cervical Intraepithelial Neoplasia<sup>33</sup>

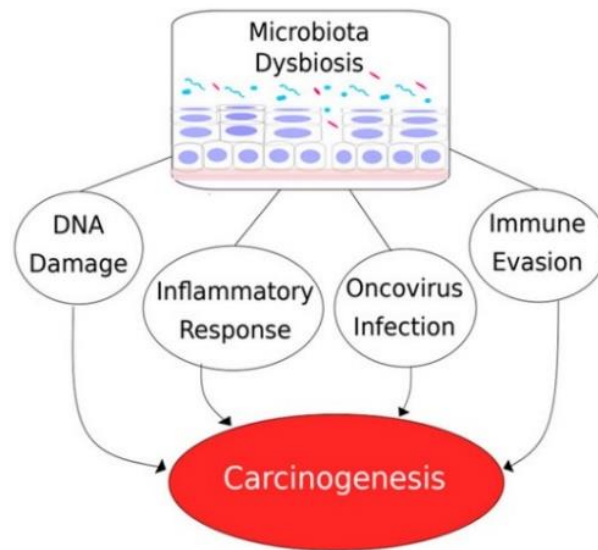
### 2.2.5. Proses inflamasi dengan kanker Serviks

Berbagai iritasi menyebabkan cedera jaringan, peradangan, dan peningkatan proliferasi sel. Reaksi kompleks peradangan terhadap agen mikroba, kimia, atau agen fisik dalam jaringan vaskularisasi mengakibatkan masuknya leukosit yang bersirkulasi, leukosit, jaringan ikat, dan konstituen ekstraseluler yang terdiri dari serat kolagen, elastin dan glikoprotein (fibronectin, laminin, dan proteoglycan).<sup>34</sup>

Gambaran histopatologi pada peradangan akan ditemukan dominasi makrofag dan limfosit, neutrophil, proliferasi pembuluh darah kecil yang heterogen, hiperpermeabel, fibrosis, dan nekrosis.<sup>34,35</sup>

Makrofag dan limfosit yang teraktivasi memiliki sifat interaktif dalam melepaskan mediator inflamasi atau sitokin yang memperkuat reaktivitas imun. Leukosit, sel jaringan ikat, dan sel endotelium akan mengeluarkan mediator inflamasi seperti sitokin. Sitokin akan menunjukkan respons biologi termasuk *interleukins, chemokines, interferons, growth factors, dan Leukocyte colony-stimulating factors*. Tingkat infiltrasi leukosit pada tumor dikendalikan oleh jumlah kemokin yang lokal yang diproduksi oleh sel neoplastic dan sel stroma.<sup>6,7,35</sup>

Sel-sel inflamasi bertindak sebagai jembatan antara tumor dan peradangan. Ada sejumlah besar sel inflamasi di sekitar sel tumor, termasuk makrofag, sel dendritik, dan sel mast. Sel-sel inflamasi ini membentuk lingkungan mikro tumor dengan sel tumor dan sel endotel vascular.<sup>30</sup> Gambar 2.6. memperlihatkan Dampak disbiosis mikrobiota pada karsinogenesis. Mikrobiota disbiotik (batang dan lingkaran biru dan merah muda).

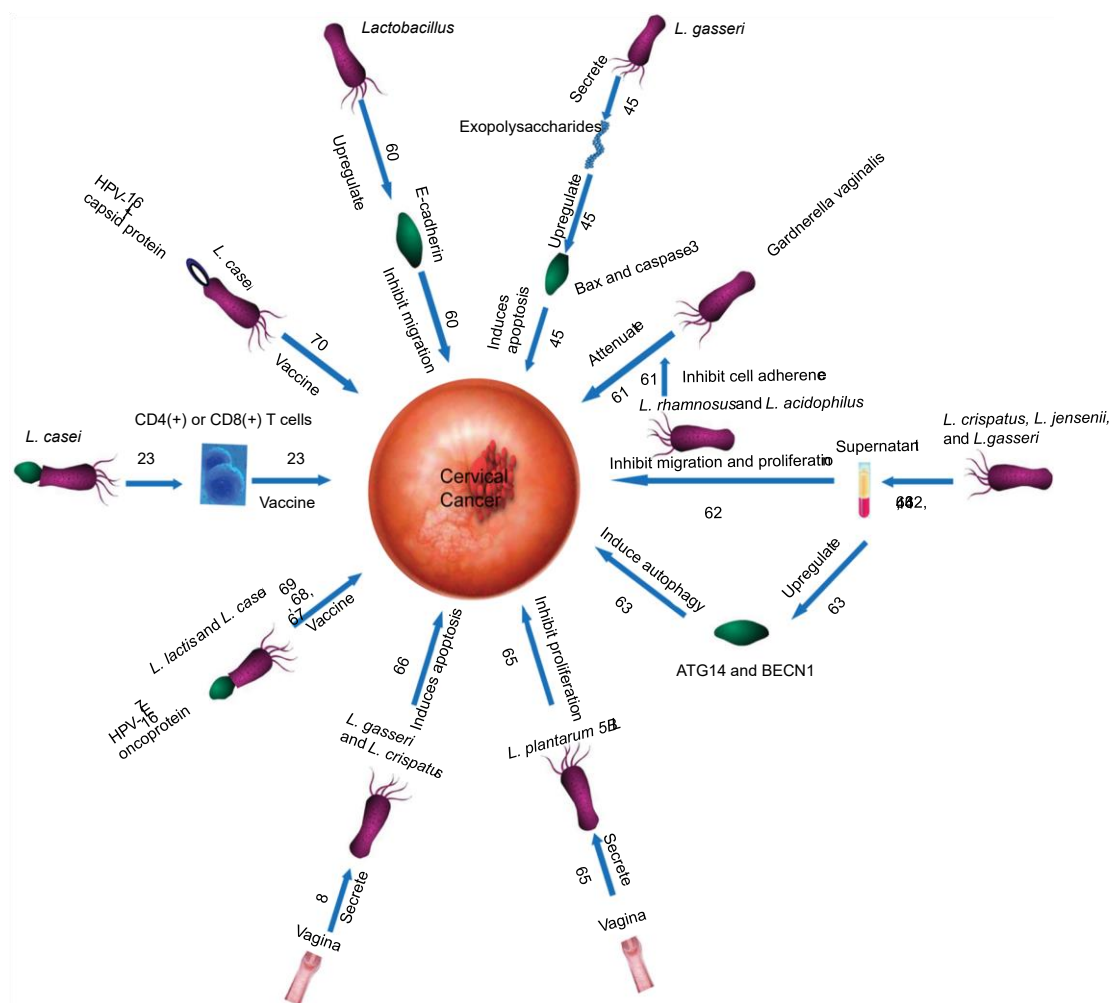


Gambar 2.6 Dampak disbiosis mikrobiota pada karsinogenesis. Mikrobiota disbiotik (batang dan lingkaran biru dan merah muda)<sup>35</sup>

Pada saluran reproduksi wanita, peran *Lactobacillus* menjadi menonjol, dan ketika keseimbangan dinamis dari lingkungan mikroba terganggu, efek negatif dari bakteri anaerob akan menangkal efek positif dari *Lactobacillus*. Disregulasi mikroba dapat melepaskan sejumlah besar sitokin dan kemokin pro-inflamasi, menghasilkan respons inflamasi lokal. Hubungan antara mikroba vagina dan kanker juga telah banyak diteliti. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa bakteri asam laktat memiliki efek sitotoksik pada sel kanker serviks.<sup>8</sup>

Infeksi yang persisten akan terus memicu pengeluaran berbagai molekul inflamasi, diantaranya *Reactive Oxygen Species (ROS)*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-18*, *hypoxia-inducible factor (HIF)*, *cyclooxygenase (COX)*, *inducible nitric oxide synthase (iNOS)*, *Matrix metalloproteinase enzyme-9 (MMP-9)*, dan *chemokines*. Pada kanker serviks, infeksi disebabkan oleh *HPV* yang menetap, dan *Lactobacillus gasseri* berperan menghasilkan asam laktat dan berfungsi memberikan perlindungan dalam melawan bakteri dan virus dari spesies patogenik termasuk *HPV*. *HPV* ini juga dapat memicu terjadinya penurunan respons imun dan infeksi akan terjadi terus-menerus. Hal ini menyebabkan bakteri *lactobacillus* akan berubah menjadi patogen dan mengakibatkan timbulnya lesi prakanker (CIN) bahkan memicu proses perkembangan kanker serviks.<sup>6,30</sup>

Berdasarkan beberapa penelitian menyebutkan bahwa patogenesis kanker serviks memiliki kaitan dengan infeksi persisten. Proses karsinogenesis terdiri dari proses inisiasi yaitu ketika adanya mutasi genetik dan proliferasi sel yang mengarah kepada kerusakan DNA manusia. Proses promosi yaitu ketika terjadi aktivasi gen yang menyebabkan perubahan pada fenotipe yang laten, pada proses ini juga memicu sel untuk terus mengalami proliferasi sehingga dapat mengganggu keseimbangan selular. Proses terakhir yaitu progresi merupakan proses perubahan sel normal menjadi *low to high grade dysplasia* akan menyebabkan *cervical dysplasia* dan *carcinoma in situ*.<sup>35</sup> Gambaran efek *Lactobacillus* pada kanker serviks diperlihatkan pada gambar 2.7.



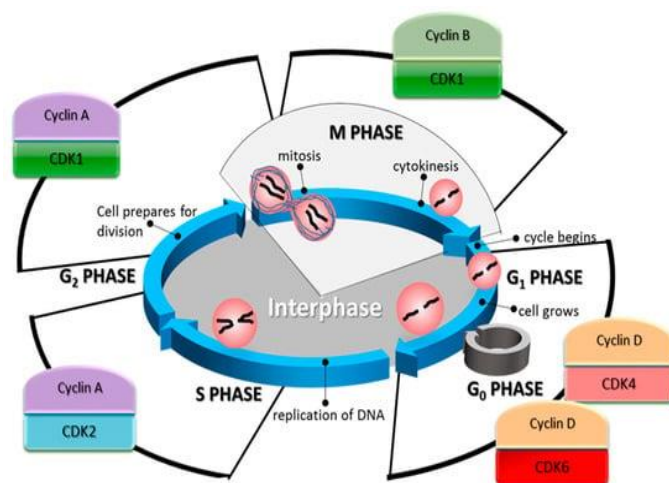
Gambar 2.7 Gambaran efek *Lactobacillus* pada kanker serviks<sup>7</sup>



### 2.2.6. Siklus sel, proliferasi, dan gen yang berperan dalam kanker serviks

Gen utama yang terkait dengan siklus sel dan proliferasi pada kanker serviks termasuk *Ki-67*, *Cyclin Dependent Kinase* dan inhibitorynya, *p16INK4a* dan *p53*. Penanda imunohistokimia yang paling umum digunakan untuk menilai keakuratan fase siklus sel adalah salah satunya adalah *Cyclin-Dependent Kinase (CDK)*, yang diaktifkan oleh subunit *Cyclins D (D1-D3)* terlibat dalam transisi sel dari fase  $G_0$  ke  $G_1$ , *Cyclin E* dari  $G_1$  ke  $S$  dan *Cyclin B* yang memasuki fase mitosis. Secara teori, *Cyclin D1* paling banyak digunakan.<sup>36,32</sup>

Pada beberapa kanker, proliferasi sel disertai dengan ekspresi berlebih *Cyclin D-1* karena amplifikasi gen kromosom 11q13, tidak adanya atau adanya bentuk tidak aktif dari protein *pRb* dalam inti sel, dan peningkatan ekspresi *MCM2 (mini chromosome maintenance protein 2)*.<sup>36</sup> Penelitian tentang ekspresi *Cyclin D-1* pada NIS dan kanker serviks dievaluasi secara komprehensif dengan menilai hubungan antara tingkat ekspresi imunohistokimia dari protein dan *mRNA* dari *Ovarian Cancer gene 1 (OVCA-1)*, *Cyclin D-1*, dan *p16* dengan infeksi *HPV* risiko tinggi. Ditemukan bahwa ekspresi protein *OVCA-1*, *Cyclin D-1*, dan *p16* meningkat pada NIS dan kanker serviks. Dapat dibuktikan bahwa *Cyclin D-1* dapat digunakan sebagai biomarker potensial untuk diagnosis kanker serviks.<sup>37,38,39</sup> Gambar 2.8, memperlihatkan fase siklus sel dan kompleks kinase yang bergantung pada *Cyclin Dependent Kinase (CDK)/Kompleks Cyclin*.

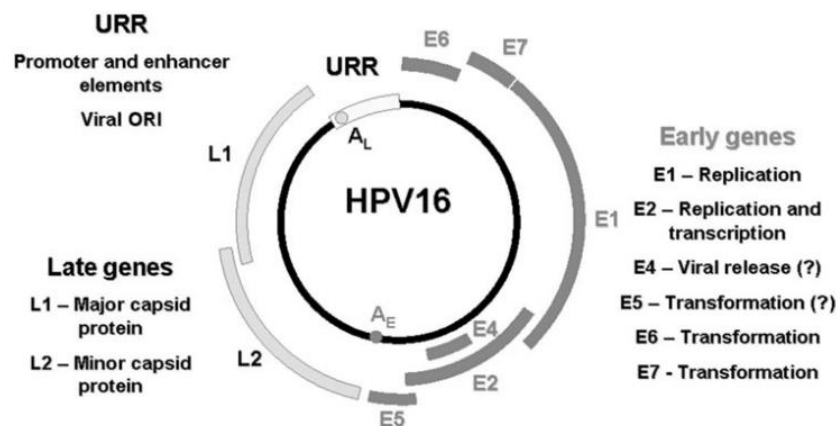


Gambar 2.8 Fase siklus sel dan kompleks kinase yang bergantung pada *Cyclin Dependent Kinase (CDK)/Kompleks Cyclin*<sup>40</sup>

### 2.2.7. *Human Papillomavirus (HPV)* dan karsinogenesis

*HPV* adalah virus termasuk kedalam *Papovaviridae*. *HPV* termasuk virus yang tidak memiliki selubung dan berukuran kecil yaitu sekitar 55 nm. *HPV* memiliki dua protein kapsid, yaitu L1 dan L2. Protein kapsid L1 merupakan protein kapsid utama dari setiap kapsomer. Sedangkan L2 merupakan protein kapsid minor, L2 ini terkandung didalam setiap kapsid virion dengan jumlah salinan sebanyak 12 salinan. Genom *HPV* terdiri dari molekul tunggal dari *double-stranded, circular DNA*.<sup>41</sup> Pengorganisasian genom *HPV* ditunjukkan pada gambar 2.9.

Terdapat 3 wilayah fungsional pada genom, wilayah yang pertama yaitu *non-coding upstream regulatory region* yang disebut juga dengan *long control region (LCR)* atau dikenal dengan *upper regulatory region (URR)*. Wilayah kedua adalah *early region (E)* yang terdiri dari protein dan onkoprotein ORFs E1, E2, E4, E5, E6 and E7. Wilayah ke 3 adalah wilayah *late region (L)* yaitu kapsid L1 dan L2.<sup>41</sup>



Gambar 2.9 Pengorganisasian genom *HPV*<sup>41</sup>

Infeksi *HPV* memiliki sifat yang menetap atau persisten serta dapat menyebabkan efek karsinogenik dengan cara mengintegrasikan *DNA* dari virus kedalam genom epitelosit serviks. Kemudian menghilangkan gen *HPV* awal dan akhir yang dikenal dengan istilah E1, E4, E5, L1, dan L2.<sup>42</sup>

Terdapat dua protein virus yang berhubungan dan memiliki potensi onkogenik, yaitu E6 dan E7. Virus ini mampu menembus sel epitel serviks dan

mengekspresikan E6 serta E7 yang akan membuat protein pengatur inang p53 inaktivasi selanjutnya *retinoblastoma protein* (RB).<sup>42</sup>

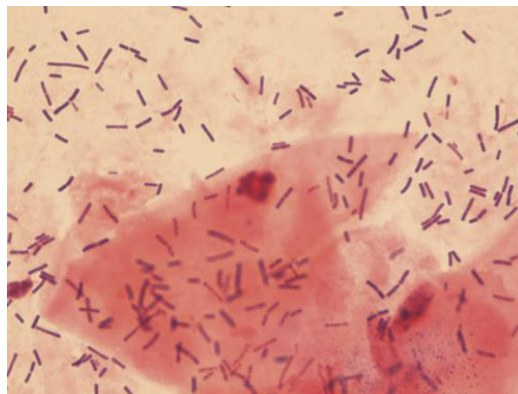
Saat *HPV* bekerja dan memulai integrasi kedalam genom inang yaitu epitelosit serviks maka perubahan atau transformasi keganasan mulai terjadi. Sehingga, onkoprotein E6 dan E7 terlibat dalam aktivitas tersebut.<sup>42</sup>

### 2.3. *Lactobacillus gasseri*

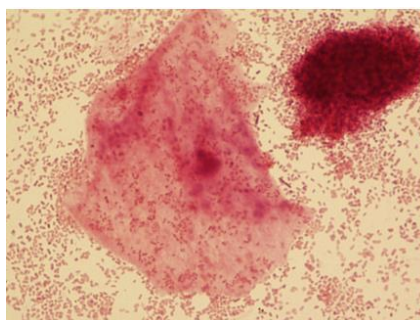
*Lactobacillus* merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang dikenal sebagai bakteri yang menguntungkan. *Lactobacillus* memiliki pH rendah karena memiliki *organic acid lanilla* yang dapat mempertahankan pH dibawah 4,5 (berkisar antara 3,8-4,5). Suhu optimum, toleransi garam yang tinggi, habitat serta potensi patogenitas yang berbeda.<sup>6</sup>

*Lactobacillus gasseri* merupakan bakteri flora normal pada vagina yang memiliki bentuk batang dan merupakan bakteri yang dapat menghasilkan hidrogen peroksida dan bakteriosin. Hidrogen peroksida ini dapat menimbulkan sifat toksik pada organisme lain. Produksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada bakteri asam laktat ini menyebabkan bakteri *Lactobacillus sp.* Ditemukan lebih banyak dibandingkan dengan jumlah bakteri obligat anaerob dengan enzim katalase yang minimal.<sup>7,43</sup>

Dinding *Lactobacillus gasseri* terdiri dari peptidoglikan (mureins). Hampir seluruh jenis *Lactobacillus* adalah jenis *aerotolerant* yang hanya dapat hidup dengan optimal dalam kondisi anaerobik dan merupakan gram positif yang tidak memiliki spora serta tidak bermotil.<sup>6,7</sup> *Lactobacillus* pada sekresi vagina normal dan infeksi diperlihatkan pada gambar 2.10 dan 2.11.



Gambar 2.10 *Lactobacillus* pada sekresi vagina normal<sup>144</sup>



Gambar 2.11 *Lactobacillus* pada sekresi vagina dengan infeksi<sup>44</sup>

### 2.3.1. Kategori Hirarki Taksonomi *Lactobacillus gasseri*

Berdasarkan tingkatan taksonomi *Lactobacillus gasseri* dapat diklasifikasikan sebagai berikut<sup>45</sup>:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Bacillota</i>
Class	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Family	: <i>Lactobacillaceae</i>
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Spesies	: <i>Lactobacillus gasseri</i>

### 2.4. Komponen yang dihasilkan oleh *Lactobacillus*

Bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat yang menunjukkan efek penghambatan terhadap bakteri patogen dan pembusuk. Bakteriosin dibagi kedalam 4 kelas. Kelas I adalah lanti biotik yang terdiri dari 19 sampai lebih dari 50 asam amino. Bakteriosin kelas I bekerja dengan membunuh bakteri dengan mengikat lipid II untuk membentuk pori-pori di membran target atau menghambat biosintesis dinding sel. Bakteriosin kelas II kecil dan stabil terhadap panas peptida dan juga bertindak dengan membuat pori-pori pada membran target. Namun, Kelas I membentuk pori 'Wedge-like'. sedangkan Kelas II membentuk pori-pori sesuai dengan 'Stave barel'. Kelas III adalah antimikroba yang labil terhadap panas protein. Kelas IV merupakan suatu bakteriosin yang mengandung karbohidrat dan lemak.<sup>46</sup>

*Lactobacillus gasseri* mampu memproduksi *Gassericin A* yaitu suatu bakteriosin kelas II. *Gassericin A* dapat bekerja dengan menembus membran dan

menyebabkan bakteriolisis. Bakteriosin ini juga berperan dalam sintesis protein pada *Lactobacillus*.<sup>47</sup>

Selain Gassericin A, *Lacobacillus gasseri* juga memproduksi polimer inulin dan levan. *Levansucrase* sering dijumpai pada gram negatif maupun gram positif. Namun paling sering dijumpai pada bakteri asam laktat. *Levansucrase* mengkatalisis tiga reaksi berbeda, termasuk polimerisasi, transfruktosilasi, dan hidrolisis. Hal ini berperan sebagai biokatalis utama dalam sintesis fruktooligosakarida tipe levan.<sup>48</sup>

## 2.5. Cytochrome P450

Cytochrome P450 (CYP) merupakan suatu sistem pertahanan tubuh yang dapat melindungi tubuh dari senyawa maupun obat-obatan yang berbahaya dan bersifat toksik.<sup>49</sup> Cytochrome ini merupakan suatu hemoprotein yang berperan aktif dalam metabolisme obat, detoksifikasi xenobiotik, serta senyawa endogen lainnya seperti steroid, asam empedu, lemak tak jenuh, prostaglandin, dan leukotrien. CYP juga memainkan peranan penting dalam mengurangi pertumbuhan kanker.<sup>50</sup>

Superfamili dari CYP terdiri dari 13.000 gen yang mewakili 400 keluarga gen. Penamaan CYP diawali dengan huruf “CYP” dan diikuti oleh angka dan huruf yang menunjukkan jenis famili, kemudian diikuti oleh angka selanjutnya yang menandakan suatu gen individu/isoenzim, misalnya “CYP3A4”. Setidaknya terdapat 57 gen CYP berbeda dan 58 pseudogen ada pada manusia. Saat ini gen yang terdapat pada manusia, yaitu CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 dan 3A4 merupakan gen yang paling aktif dalam metabolisme xenobiotik hati.<sup>50</sup>

Apabila adanya hambatan pada berbagai jenis Cytochrome P450 maka dapat menyebabkan terganggunya bioavailabilitas tubuh. Selain itu menghambat kerja enzim ini akan menyebabkan toksik bagi tubuh karena tidak adanya pertahanan tubuh yang diperankan oleh CYP 450 ini. Sehingga penggunaan suatu senyawa maupun obat-obatan baru perlu memperhatikan kerja CYP 450.<sup>49</sup>

## 2.6. P-glikoprotein

P-glikoprotein (P-gp) merupakan suatu transporter yang berperan penting dalam bioavailabilitas obat maupun kecepatan obat mencapai sirkulasi tubuh. P-gp merupakan suatu jenis protein yang dapat memompa transmembrane efluks. Jenis

protein ini berfungsi aktif dalam mengangkut xenobiotic yang berasal dari intraseluler menuju ke ekstraseluler.<sup>49</sup>

P-gp berasal dari superfamily transporter ATP-binding cassette (ABC) yang merupakan suatu perkumpulan protein yang besar dan dapat melintasi membrane sel.<sup>51</sup> Sifat P-gp merupakan protein yang hidrofobik sehingga mempengaruhi absorpsi obat pada gastrointestrtinal. Obat/ senyawa akan berinteraksi dengan P-gp di usus halus dengan bantuan enzim metabolisme. Oleh karena itu, P-gp hampir berperan terhadap farmakokinetik obat, yaitu absorpsi, distribusi,metabolisme, dan eliminasi.<sup>52</sup>

### **2.7. Buah Legundi (*Vitex trifolia* L.)**

Tanaman Legundi (*Vitex trifolia*) merupakan pohon perdu dengan tinggi sekitar 5-meter dan batangnya ditutupi bulu-bulu halus. Daunnya tersusun memanjang secara merata batang dan biasanya merupakan gabungan dari tiga daun linier dengan panjang bervariasi dari 1 hingga 12 cm. Permukaan atas daun berwarna hijau dan bagian bawah berwarna abu-abu kehijauan. Bunganya tumbuh berkelompok hingga sepanjang 18 cm. Bunga tunggal berwarna ungu dengan kombinasi warna biru dan memiliki dua bibir bilah selebar 5 mm. Buahnya berdaging dan sekitar 6 mm berisi 4 biji hitam kecil dengan rasa pahit, pedas dan sejuk.<sup>53</sup> Tanaman ini mudah tumbuh di semua jenis tanah, tetapi lebih disukai di tempat yang agak kering dan terbuka. Tumbuh baik di media budidaya yang terdiri dari campuran pasir, pupuk kandang dan tanah liat.<sup>53</sup>

Buah Legundi (*Vitex trifolia*) merupakan tanaman semak berdaun kecil yang dapat ditemukan di negara-negara Asia termasuk Indonesia. Nama lokal tanaman Legundi yaitu Langgundi (Minangkabau), Gandasari (Palembang), Lagundi (Melayu), Lagondi (Sunda), Legundi (Jawa Tengah), Langghundi (Madura), Galumi (Sumba), Sangan (Bima), Laura (Makassar), Lawarani (Bugis). Sedangkan untuk nama asingnya yaitu Manjingzi (China).<sup>53,54</sup> Tanaman Legundi (*Vitex trifolia* L.) diperlihatkan pada gambar 2.12.



Gambar 2.12 Tanaman Legundi (*Vitex trifolia* L.)<sup>55</sup>

Beberapa senyawa kimia yang terdapat didalam Legundi diantaranya golongan flavonoid (*Castisin*; 3,6,7-trimetil kuersetagetin; *vitexin*; *Artemetin*; 5-metil *Artemetin*; 7-desmetil *Artemetin*; *Luteolin*; *Luteolin-7-O-2-D-glukuronida*; *luteolin-3-O-2-D-glukuronida* dan *Isoorientin*), *Terpenoid*, maupun *Sterol* ( $^2$ -sitosterol dan  $^2$ -sitosterol- $^2$ -D-glukosid).<sup>13</sup> Penelitian lain membuktikan didalam buah legundi ditemukan adanya senyawa sabinene (13.17%), eucalyptol (23.07%), terpinen-4-ol (4.26%),  $\alpha$ -terpineol (5.19%), d-Limonene (7.25%), and caryophyllene (14.72%).<sup>14</sup> Senyawa aktif buah legundi golongan terpenoid yaitu *Labdane type-diterpene* ditemukan dalam bentuk 1,1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene.<sup>15</sup>

### 2.7.1. Kategori Hirarki Taksonomi Buah Legundi (*Vitex trifolia* L.)

Berdasarkan tingkatan taksonomi buah Legundi dapat diklasifikasikan sebagai berikut<sup>53</sup>:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Class	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Lamiales</i>
Famili	: <i>Verbenaceae</i>
Genus	: <i>Vitex</i>
Species	: <i>Vitex trifolia</i>

### 2.7.2. Senyawa *Labdane-type Diterpene* dari Buah Legundi (*Vitex trifolia L.*)

Buah Legundi sering digunakan dalam pengobatan tradisional China untuk mengobati pusing, sakit kepala, migrain, kanker dan TB (Tuberculosis)<sup>11,10</sup>. Selain itu buah Legundi juga dapat digunakan untuk pengobatan bengkak dan nyeri gusi, tumor ganas, dan lainnya.<sup>54</sup>

Ekstrak buah Legundi ditemukan bersifat sitotoksik terhadap beberapa lini sel kanker dan memiliki aktivitas antimikroba. Studi fitokimia buah Legundi sebelumnya difokuskan pada *diterpenoid, flavonoid*.<sup>16</sup> Konstituen asam fenolik yang beberapa telah dibuktikan aktivitas biologisnya secara *in vitro* seperti sitotoksitas terhadap sel kanker mamalia dan penghambatan penyakit yang diperantarai nyamuk.

Penelitian Ban *et al.* 2018 berhasil menemukan lima senyawa aktif antikanker tipe *Labdane-type diterpene* penelitian *in vitro* dengan metode *bioassay-guided separation* yaitu (1) Vitexsilakton, (2) (rel 5S, 6R, 8R, 9R, 10S)-6 asetoksi-9-hidroksi-13 (14)-labden-16, 15-olida, (3) Rotundifuran, (4) Vitetrifolin D, dan (5) Vitetrifolin E. kelima *Labdane-type diterpene* tersebut memiliki efek kemoterapi yang bekerja dengan menghambat proliferasi, menginduksi terjadinya apoptosis pada konsentrasi yang lebih tinggi dan menghambat perkembangan siklus sel dari *cell line tsFT210* dan *K562* pada fase G0/G1 dengan konsentrasi yang lebih rendah.<sup>56</sup> Jenis *Labdane-type diterpene* yang ditemukan didalam buah legundi adalah dalam bentuk 1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene.<sup>15</sup>

Selain pada buah Legundi, senyawa *Labdane-type diterpene* ini juga dapat ditemukan pada daun Legundi. Pada tumbuhan lain juga dapat ditemukan yaitu pada tumbuhan lengkuas (*Alpinia galanga*) ditemukan sebanyak 9 jenis *Labdane-type diterpene* yaitu *galangalditerpenes* A (1, 0.00180%), B (2, 0.00121%), and C (3, 0.00475%), clovane-2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (4, 0.01341%), caryolane-1,9 $\beta$ -diol (5, 0.00916%), (-)-2-oxoisodauc-5-en-12-al (6, 0.00098%), kobusone (7, 0.00066%), galanolactone (8, 0.00148%), dan (E)-15,16-bisnorlabda-8,11-diene-13-one (9, 0.00136%).<sup>57</sup> Pada tumbuhan ganggang hijau (*Chlamydomonas reinhardtii*) yang ditemukan sebanyak 12 jenis dari *Labdane-type diterpene* diantaranya yang paling



banyak yaitu *ent-manoyl oxide* (83.6%), *sclareol* (6.1%), *labda-13-ene-8 $\alpha$ ,15-diol* (5.5%), dan *ent-13-epi-manoyl oxide* (4.8%).<sup>58</sup>

## 2.8. Agen Kemoterapi

Bleomycin (BLM) adalah salah satu agen kemoterapi antibiotik glikopeptida yang memiliki sifat antikanker. BLM sering digunakan dalam pengobatan berbagai jenis kanker. Bleomycin menyebabkan efek samping yang serius melalui kelainan pertahanan antioksidan terhadap Reactive Oxygen Species (ROS).<sup>59,60</sup>

Sebagian besar obat ini menghasilkan radikal bebas tingkat tinggi atau perantara metabolik yang menginduksi kerusakan oksidatif pada DNA dalam sel normal dan menyebabkan resistensi kemoterapi melalui mekanisme anti-apoptosis. Misalnya, *bleomycin* (BLM), agen kemoterapi berbasis antibiotik anti-neoplastik yang diproduksi oleh *Streptomyces verticillus*, dan digunakan terutama untuk mengobati berbagai jenis kanker yang dipengaruhi redoks, termasuk kanker testis, limfoma, dan kanker sel skuamosa dari kepala, leher dan leher Rahim.<sup>59,60</sup>

BLM adalah glikopeptida yang kompleks dengan besi dan menghasilkan superoksida tingkat tinggi dan radikal hidroksil yang menginduksi kerusakan oksidatif pada DNA dan menyebabkan penghambatan proliferasi sel kanker.<sup>59,60</sup>

Selain itu agen kemoterapi lain yang sering digunakan dalam kanker serviks yaitu *Doxorubicin*. Golongan obat ini bekerja dengan 2 mekanisme yaitu (1) Interkalasi *Doxorubicin* ke dalam DNA dan penghambatan topoisomerase II yang menyebabkan perubahan struktur kromatin, (2) Pembentukan radikal bebas dan kerusakan oksidatif pada biomolekul.<sup>61</sup>

Doxorubicin dapat menyebabkan kerusakan DNA, memproduksi Reactive Oksigen Species (ROS), apoptosis, penuaan, autofagi, ferroptosis, dan menyebabkan induksi piroptosis. Obat ini tergolong kedalam anti bakteri antrasiklin, sehingga berefek kepada sistem kekebalan tubuh dan respon imun anti tumor.<sup>62</sup>

## 2.9. Antibakteri

Antibakteri adalah merupakan suatu obat yang digunakan untuk mengganggu bakteri dan mematikan pertumbuhan bakteri yang bersifat patogen

dan merugikan bagi tubuh. Berdasarkan kelompok besarnya mekanisme kerja dan target kerja antibakteri/antibiotik dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu:<sup>63</sup>

1. Antibakteri yang menargetkan dinding sel pada bakteri

Dinding sel merupakan lapisan terluar dari bakteri sehingga menjadi target yang sangat baik pada agen antibakteri. Kerusakan yang terjadi pada dinding sel ini akan membuat pecahnya sel pada bakteri. Contoh antibakteri yang menargetkan dinding sel bakteri yaitu  $\beta$ -laktam, glikopeptida, daptomisin, dan colistin.<sup>63</sup>

2. Antibakteri yang menghambat produksi protein baru/sintesis protein

Bakteri memanfaatkan sumber daya yang tersedia di lingkungan kehidupan bakteri untuk membentuk mikroorganisme baru. Protein yang baru terus diproduksi dengan melibatkan sintesa *mRNA* dari gen *DNA* (transkripsi). Proses sangat efektif digunakan oleh bakteri untuk tumbuh dan multiplikasi bakteri. Contoh antibakteri yang bekerja dengan menghambat sintesis protein adalah golongan aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, glisilsiklin, kloramfenikol, dan klindamisin.<sup>63</sup>

3. Antibakteri yang menargetkan pada *DNA* atau replikasi *DNA*

Molekul *DNA* ini berperan dalam proses transkripsi dan translasi. Oleh karena itu apabila struktur *DNA* terganggu akan memengaruhi seluruh fase pertumbuhan pada bakteri. Golongan antibakteri yang menargetkan pada *DNA* atau replikasi *DNA* adalah rifamisin, kuinolon, sulfa, metronidazole.<sup>63</sup>

## 2.10. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas bakteri dapat dilakukan dengan analisis *in vitro* yang merupakan metode yang digunakan untuk mengisolasi suatu sel, mikroorganisme, jaringan maupun organ pada suatu media aseptik dengan keadaan tertentu agar bahan yang dikultur dapat tumbuh dan memperbanyak diri. Hal ini dilakukan dengan metode difusi yaitu metode untuk menilai adanya pertumbuhan bakteri pada media dan menilai ukuran area jernih yang merupakan zona hambat.<sup>64</sup>

### 2.10.1. Metode Dilusi

Metode dilusi terbagi menjadi 2 jenis yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Jenis dilusi cair dilakukan dengan menilai tingkat kekeruhan pada tabung reaksi yang diisi dengan media cair berupa aquadest maupun larutan ekstrak dan mikroba yang

diuji dalam jumlah tertentu. Tabung tersebut diinkubasi  $\pm 36^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Sedangkan jenis dilusi padat dilakukan pada media agar sesuai dengan mikroba yang dibiakkan. Hal ini dilakukan untuk menilai ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri.<sup>64</sup>

### 2.10.2. Metode Difusi

Metode ini digunakan untuk menilai ukuran zona hambat setelah diberikan antimikroba maupun suatu ekstrak didalam suatu media padat. Pada metode ini yang dinilai berupa *clear zone* pada media padat. Pada metode ini bakteri diinokulasi di media padat dan digunakan kertas cakram yang ditempelkan pada media padat. Semakin kuat daya aktivitas antibakteri maka akan semakin luas daya hambatannya yang digambarkan dengan semakin lebarnya area jernih.<sup>64</sup>

Tabel 2.1 Klasifikasi respon hambatan pada pertumbuhan bakteri<sup>65</sup>

Diameter zona hambat	Respon hambatan pertumbuhan bakteri
$\leq 5$ mm	Lemah/Tidak ada
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
$> 20$ mm	Sangat kuat

### 2.11. Prinsip Kerja Analisis *in silico*

*In silico* merupakan suatu metode yang dilakukan untuk menganalisis, merancang, dan menemukan suatu senyawa bioaktif pada proses pengembangan obat dengan melakukan prinsip bioinformatika dengan memanfaatkan teknologi komputasi dan database yaitu dengan permodelan struktur dan molekul.<sup>66</sup> Simulasi molekuler dilakukan di ruang tiga dimensi dengan memasukkan dua molekul secara bersamaan. Penerapan metode *in silico* ini semakin meningkat dan dianggap penting dikarenakan dapat memprediksi risiko toksik suatu obat-obatan atau bahan kimia terhadap manusia dan lingkungan.<sup>67</sup>

Analisis ini dilakukan dengan simulasi molekuler dengan proses komputasi dengan tujuan untuk memprediksi konformasi antara asam amino maupun protein target dengan ligan. Tujuan dari analisis *in silico* ini yaitu untuk memprediksi struktur antara beberapa molekul yang kompleks antara dua maupun lebih

konstituen molekul. Dalam metode ini yang dinilai berupa energi ikatan. Semakin negatif energi ikatan antara protein dan ligan yang dihasilkan maka akan semakin baik dan stabil aktivitasnya.<sup>66</sup>

Evaluasi kemiripan obat berdasarkan *Lipinski's rule five*, suatu senyawa dikatakan mirip obat apabila berat molekul (*Molecular Weight*) kurang dari 500 Dalton, nilai koefisien partisi log P (*Lipophilicity*) kurang dari 5, molar refractivity diantara 40-130, jumlah donor ikatan hidrogen (*hydrogen bond donor*) kurang dari 5, dan jumlah ikatan hidrogen yang diterima (*hydrogen bond acceptor*) kurang dari 10.<sup>68</sup> Pada analisis *in silico* juga dilakukan uji ADME-Tox yaitu menilai farmakokinetik dari suatu senyawa uji yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksikologi. Hal ini penting untuk menentukan sifat dari suatu kandidat obat dan menilai suatu obat layak atau tidak.<sup>52</sup>

### 2.12. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode selektif pada senyawa dengan kedua pelarut yang tidak dapat bercampur antar kedua pelarut, umumnya pelarut berupa pelarut organik dan pelarut air atau dari padatan ke cairan. Keefektifan metode ekstraksi ini dipengaruhi oleh luas permukaan yang besar sehingga dapat berinteraksi dengan pelarut, waktu kontak antara sampel dan pengeksrak, jumlah pelarut yang digunakan, dan koefisien partisi/distribusi.<sup>69</sup>

Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan, metode paling umum dilakukan dalam ekstraksi adalah metode maserasi. Metode maserasi dilakukan dengan memasukkan simplisia dari tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam suatu wadah inert yang ditutup rapat dengan suhu yang ideal untuk menyimpan yaitu dengan suhu kamar. Kerugian menggunakan metode maserasi ini menggunakan waktu yang lumayan lama, pelarut yang dibutuhkan pada saat pengujian cukup banyak, dan dalam prosesnya tidak menutup kemungkinan bahwa beberapa senyawa dapat hilang. Maserasi dapat menghindari terjadinya kerusakan pada senyawa-senyawa dalam tanaman yang memiliki sifat termolabil.<sup>70</sup>

### 2.13. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi senyawa yang terdapat didalam suatu tumbuhan. Hasil dari skrining

fitokimia dapat berupa perubahan warna pada larutan uji. Melalui perubahan warna inilah dapat ditentukan golongan senyawa yang terkandung didalam suatu tanaman.<sup>71</sup>

Skrining ini meliputi uji reaksi warna dan uji reaksi pengendapan yang dilakukan terhadap beberapa golongan senyawa. Senyawa uji yang dapat dilakukan dalam skrining fitokimia adalah senyawa alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, dan triterpenoid atau steroid.<sup>71</sup>

#### **2.14. Prinsip Kerja Spektroskopi Fourier Transform InfraRed (FTIR)**

Analisis *FTIR* merupakan suatu metode spektroskopi inframerah modern yang dilengkapi dengan teknik *Fourier Transformation* untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Metode spektroskopi yang paling sering digunakan adalah dengan metode absorpsi yaitu dengan menggunakan prinsip perbedaan penyerapan radiasi inframerah oleh molekul suatu materi.<sup>72</sup>

Analisis *FTIR* ini juga dapat digunakan untuk memperoleh informasi berbagai macam gugus fungsi atau ikatan-ikatan molekul yang ada pada suatu jaringan atau tumbuhan yang diisolasi. Analisis gugus fungsi dapat dilakukan dengan cara melihat pada pola penyerapan (pita absorpsi) terhadap radiasi *infrared* yang dapat dilihat dari spektrum *infrared* yang terbentuk.<sup>72</sup>

Proses analisis sampel pada analisis *FTIR* meliputi *the source* ( benda hitam menyala yang dipancarkan oleh energi infrared), interoferometer (spectra encoding), sampel (pemasukan sinar ke kompartemen sampel yang akan diteruskan melalui cermin), *detector* (pengukuran sinar interprogram khusus), dan *computer* (pengukuran sinyal secara digital).<sup>72</sup>

#### **2.15. Prinsip kerja Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)**

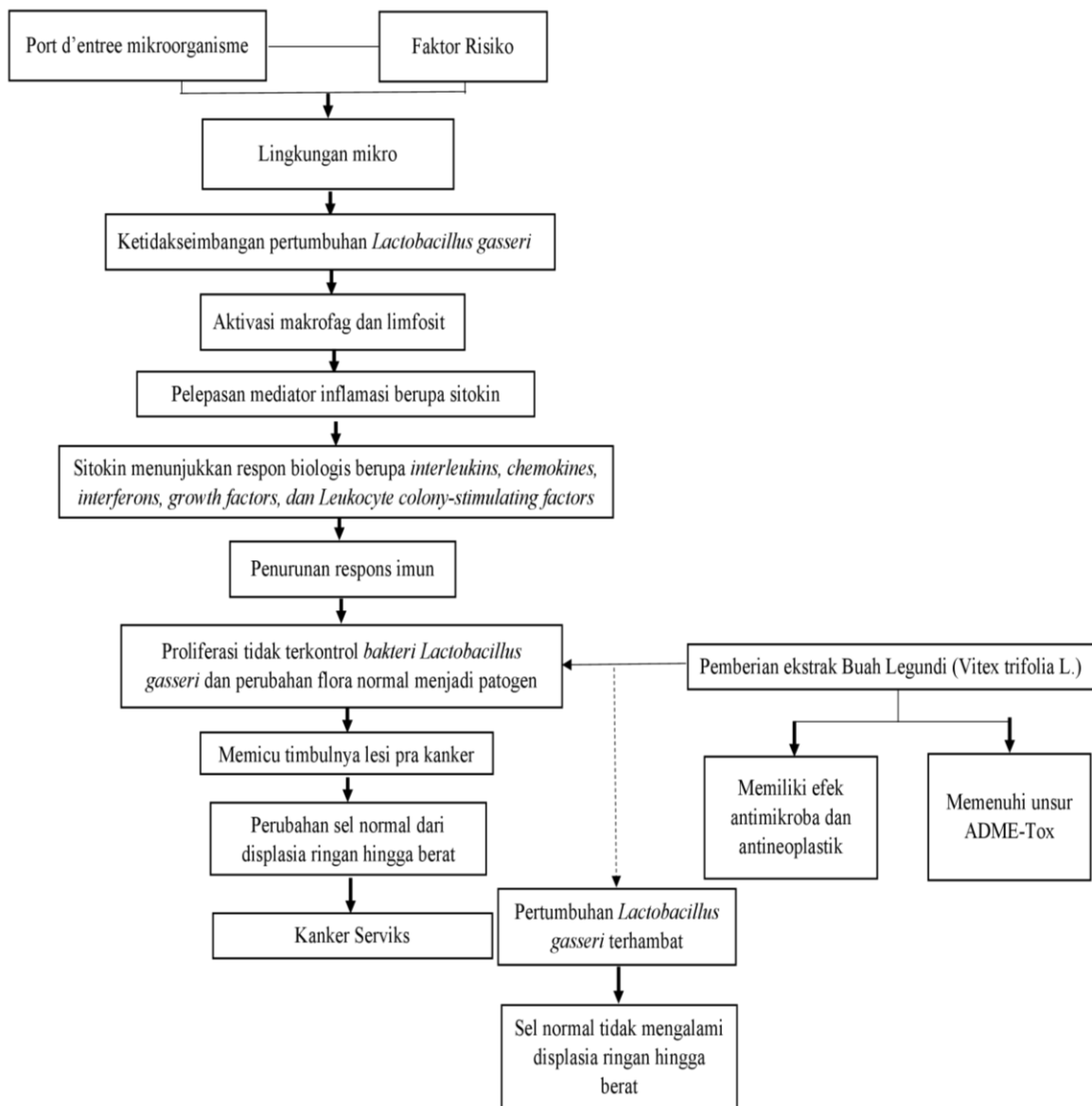
Gas kromatografi merupakan suatu alat yang dapat menjadi alat pemisahan dan menganalisis campuran dari beberapa komponen. Sedangkan MS adalah untuk menentukan suatu jenis senyawa dalam suatu sampel uji.<sup>73</sup>

Gas kromatografi memiliki kemampuan untuk membaca suatu senyawa dengan konsentrasi yang sangat rendah sehingga metabolit sekunder yang terdapat didalam sampel uji dapat teridentifikasi dengan hasil yang dapat berupa kromatogram dan spektrum massa.<sup>73</sup>

Oleh karena itu, analisis *GC-MS* ini perlu dilakukan untuk mengidentifikasi suatu kandungan yang terdapat didalam sampel uji dan struktur yang terdapat didalam sampel uji.

## 2.16. Kerangka Teori

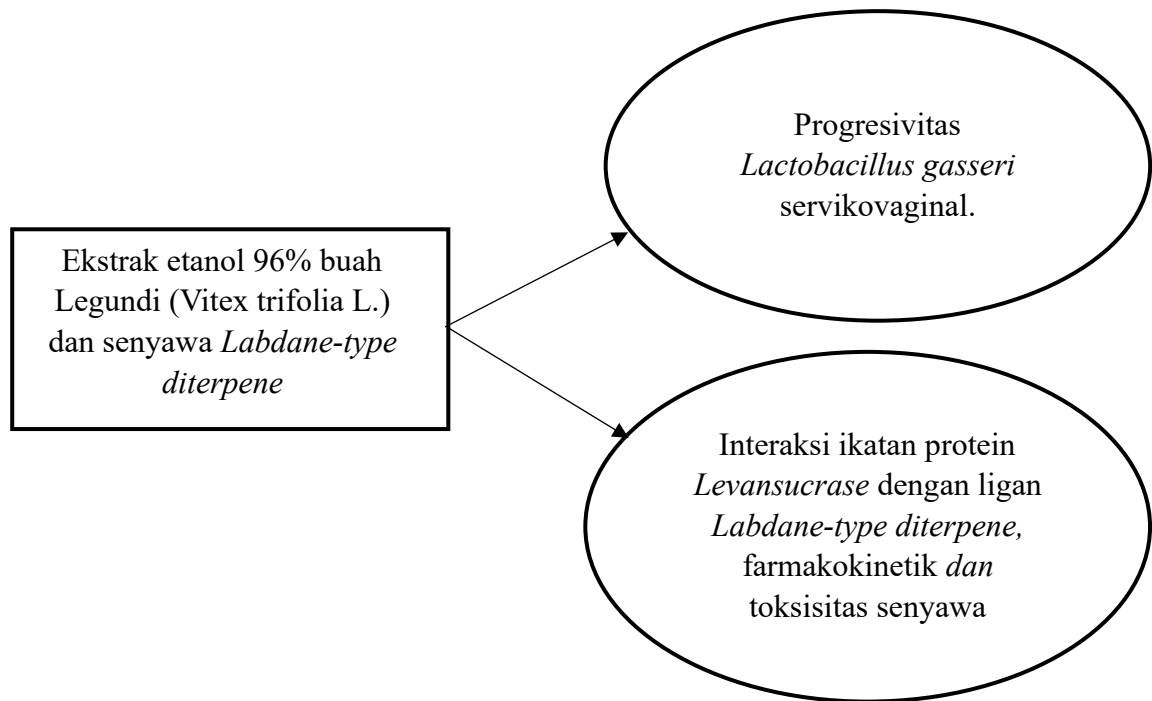
Kerangka teori penelitian diperlihatkan pada diagram alir gambar 2.13.



Gambar 2.13 Diagram alir Kerangka teori penelitian

## 2.17. Kerangka Konsep


Kerangka konsep penelitian diperlihatkan pada diagram alir gambar 2.14.



Gambar 2.14 Kerangka konsep penelitian

Keterangan:

 : Variabel *Independent* (Bebas)

 : Variabel *Dependent* (Terikat)

## 2.18. Hipotesis

H<sub>a</sub>: Ada pengaruh pada progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* pada kejadian kanker serviks setelah pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi.

H<sub>0</sub>: Tidak ada pengaruh pada progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* pada kejadian kanker serviks setelah pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi.

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1. Definisi Operasional

Definisi operasional pada tabel 3.1, bertujuan untuk memberikan pengertian terkait operasional dan variabel dalam penelitian.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Dependent <i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> : Merupakan bakteri flora normal yang dapat berubah menjadi patogen apabila terjadi proliferasi yang berlebihan hingga dapat memicu terjadinya dysplasia hingga kanker serviks	Menghitung diameter zona jernih di sekitar media pertumbuhan bakteri dengan menggunakan jangka sorong	Ordinal	Menilai daya hambat $\geq 20$ mm $\rightarrow$ kuat 10-20 mm $\rightarrow$ sedang 5-10 mm $\rightarrow$ sedang <5 mm $\rightarrow$ tidak memiliki daya hambat/lemah
Levansucrase	Enzim yang dihasilkan oleh <i>Lactobacillus</i>	Menilai interaksi	Lipinski's rule of five	Semakin negatif binding affinity maka semakin



	<i>gasseri</i> sebagai enzim katalis	ikatan dengan ligan		baik, jumlah ikatan hidrogen donor <5, dan hidrogen yang diterima <10
<b>Independent Ekstrak etanol 96% buah legundi</b>	Buah Legundi merupakan tanaman yang memiliki senyawa dengan sifat antineoplastic dan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.	Dilakukan perhitungan untuk mengatur konsentrasi yang dibutuhkan dengan menggunakan rumus: $V_1M_1=V_2M_2$	Rasio	Didapatkan ekstrak buah Legundi dengan konsentrasi 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%
<b>Senyawa Labdane-type diterpene</b>	Senyawa terpenoid yang terdapat didalam bahan herbal salah satunya yaitu buah Legundi	Menggunakan metode FTIR dan GC-MS	Ordinal	Terdapat senyawa Labdane-type diterpene pada ekstrak buah Legundi

### 3.2. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis desain penelitian ini adalah *Analisis in silico* dan *in vitro*. Selanjutnya sampel diekstraksi, melakukan analisis *FTIR*, *GC-MS*, melakukan analisis *in silico*, dan analisis *in vitro* dengan *treatment* buah Legundi.

### 3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan September-Desember 2023. Identifikasi buah Legundi dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara (USU), karakterisasi senyawa *Labdane-type diterpene* pada buah Legundi dilakukan di PT. Multi Global Safety, Ekstraksi sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia FK UMSU, Studi *in silico* dilakukan di FK UMSU dan *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FK UMSU.

### 3.4. Populasi dan sampel penelitian

#### 3.4.1. Populasi Penelitian

Populasi yang ditargetkan dalam penelitian ini yaitu interaksi antara protein *Levansucrase* pada bakteri *Lactobacillus gasseri* dan agen kemoterapi *Doxorubicin* dengan ligan *Labdane-type diterpene* yang didapatkan melalui analisis *in silico*. Analisis *in vitro* dilakukan dengan menggunakan *treatment* buah Legundi dengan melakukan pengamatan metode dilusi yaitu dengan menilai Kadar Hambat Minimum (KHM), Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan difusi.

#### 3.4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Lactobacillus gasseri*

#### 3.4.3. Besar Sampel

Penelitian dibagi menjadi 2 metode yaitu dilusi yang dibagi 2 yaitu dilusi cair sebagai metode pengukuran KHM sedangkan dilusi padat untuk pengukuran KBM. Sedangkan difusi menggunakan kertas cakram. Kelompok perlakuan dibagi menjadi kelompok dengan konsentrasi 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif. Untuk menentukan jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian eksperimental ini dapat digunakan rumus Federer:  $(n-1)(t-1) \geq 15$ .<sup>74</sup>

**Keterangan rumus:** n = Banyak Pengulangan

t = Jumlah Kelompok

Melalui rumus federer tersebut, maka dapat dihitung banyak pengulangan sampel yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7) \geq 15$$

$$(7n-7) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$n \geq 3,1 \rightarrow$  dibulatkan menjadi 3

Berdasarkan hasil perhitungan banyak pengulangan sampel menggunakan rumus Federer pengulangan yang dibutuhkan sebanyak 3 kali pada tiap kelompok perlakuan. Sehingga total perlakuan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah 30 perlakuan.

### 3.5. Teknik Pengumpulan Data

Adapun Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menentukan jumlah dan jenis ikatan yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik antara protein *Levansucrase* dengan *Doxorubicin* dan ligand *Labdane-type diterpene*. Sedangkan data penelitian *in vitro* diukur dengan menilai Kadar Hambat Minimum (KHM), Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan difusi.

#### 3.5.1. Bahan dan Alat yang digunakan

##### 3.5.1.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu buah Legundi, etanol 96%, aquabidest, aquadest, asam asetat anhidrat, HCL 2N, FeCl<sub>3</sub>, serbuk Mg, reagen dragendorff, pereaksi mayer, *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992, Steptomisin (S), *blank disc*, Man rogosa sharpe agar (MRSA), man rogosa sharpe broth (MRSB).

##### 3.5.1.2. Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu kolom kromatografi *Amberlite FPA900 UPS Cl*, *laminar air flow*, oven, autoklaf, *hotplate*, timbangan, rak, *erlenmeyer*, *magnetic stirrer*, pinset, lampu Bunsen, cawan petri, gelas ukur dan *beacker*, pipet tetes, spatula, *destilator*, *rotary evaporator*, wadah maserator, *shaker*, *software OpenBabel*, *Ramachandran plot*, *Chimera 1.6.2* dan *Discovery Studio 4.1*.

#### 3.5.2. Persiapan ekstrak dan Presparasi sampel

Buah Legundi yang diperoleh selanjutnya dilakukan determinasi dan identifikasi tanaman. Dua ribu lima ratus gram buah Legundi dibersihkan, dicuci,

dikeringkan dan dihaluskan. Simplisia dibuat menjadi ekstrak dengan metode maserasi dengan cara simplisia direndam etanol 96% (1:10) selama 3 hari dengan beberapa kali diaduk dalam penyimpanan tempat gelap. Disaring dengan *vaccum filtration* dan kertas saring Whatman no. 40, diuapkan dengan *rotary evaporator* T=62<sup>0</sup>C, P=80 mBar.

### **3.5.3. Skrining Fitokimia**

#### **a. Uji Tanin**

Ekstrak etanol 96% buah Legundi diteteskan pada pelat tetes dengan menambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Apabila terjadi perubahan warna pada larutan menjadi biru atau hitam kehijauan maka hasil dinyatakan positif.

#### **b. Uji Alkaloid**

Ekstrak etanol 96% buah Legundi 0,5 g ditambahkan 1 mL HCL 2N dan 9 Ml aquades, kemudian panaskan selama 2 menit dan dinginkan. Pisahkan filtrat menjadi 2 tabung, tabung 1 diberikan reagen Dragendorff (kalium tetraidobismutat) dan tabung 2 diberikan pereaksi mayer. Apabila didapatkan endapan berwarna coklat kemerahan/merah bata pada reagen Dragendorff sedangkan pada pereaksi mayer berwarna/terdapat endapan putih atau kuning, maka hasil dinyatakan positif.

#### **c. Uji Triterpenoid dan Steroid**

Ekstrak etanol 96% buah Legundi sebanyak 0,5 g ditambahkan 2 mL etanol lalu dilakukan pemanasan. Tambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat lalu homogenkan. Apabila dijumpai warna merah atau ungu maka hasil positif untuk terpenoid, tetapi apabila warna yang terbentuk adalah hijau maka hasil positif untuk steroid.

#### **d. Uji Flavonoid**

Ekstrak etanol 96% buah legundi diberikan serbuk Mg dan HCl pekat 1 mL, dan tambahkan etanol, kemudian dikosok dengan kuat dan tunggu hingga terpisah. Apabila dijumpai warna jingga maka ekstrak positif mengandung flavonoid.

#### e. Uji Saponin

Ekstrak etanol 96% buah Legundi sebanyak 0,5 g ditambahkan dengan 10 mL aquadest kemudian lakukan pemanasan dan dinginkan. Kocok dengan kuat selama 10 detik, apabila terbentuk buih/busa yang dapat bertahan selama 10 menit tambahkan 1 tetes HCL 2N, apabila masih terdapat buih/busa maka saponin positif.

#### 3.5.4. Analisis *Spektroskopi Fourier Transform InfraRed (FTIR)*

Analisis ini dilakukan di PT. Multi Global Safety. Spektroskopi inframerah (*IR*) digunakan untuk mengetahui jenis gugus fungsi dalam suatu jaringan tumbuhan yang diisolasi. Tampilan spektrum menunjukkan puncak-puncak yang menunjukkan gugus-gugus tertentu dengan grafik perbandingan serapan bilangan gelombang terhadap transmittan (%T). Sampel ekstrak etanol 96% dari buah Legundi sebanyak 5-10% dimasukkan pada permukaan sel dan dilakukan pengukuran.

#### 3.5.5. Analisis *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)*

Analisis *GC-MS* dilakukan di PT. Multi Global Safety dan dilakukan dengan cara memisahkan Sampel buah Legundi terlebih dahulu dengan alat *GC*, kemudian diidentifikasi dengan alat *MS*.

#### 3.5.6. Analisis *in silico*

Setelah senyawa buah Legundi diidentifikasi, selanjutnya dilakukan analisis *in silico* untuk menginvestigasi *docking* molekuler antara protein bakteri *Levansucrase* dengan ligan *Labdane-type diterpene* dan agen kemoterapi *Doxorubicin*.

##### 3.5.6.1. Pencarian asam amino penyusun protein target

Sekuens asam amino penyusun protein ligan didapatkan dari *database National Center for Biotechnology Information (NCBI), United States National Library of Medicine (NLM), National Institute of Health (NIH)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dan UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Struktur 3D protein ligan dalam bentuk format file \*.sdf, akan dikonversi menjadi file \*.pdb dengan menggunakan *software OpenBabel*.<sup>75</sup>

Protein target yang dicari pada UniProt (<https://www.uniprot.org/>) *Levansucrase*, dengan Primary accession D3WYW0, Entry Name LEVS\_LACGS, Gene levG.

### **3.5.6.2. Pencarian struktur senyawa aktif *Labdane-type diterpene* dari buah Legundi**

Struktur 3D komponen senyawa aktif buah Legundi *Labdane-type diterpene* (Compound CID: 609227) diperoleh dari *PubChem Open Chemistry Database*. Struktur 3D dari berbagai senyawa tersebut dalam bentuk format file \*.sdf, akan dikonversi menjadi file \*.pdb dengan menggunakan *software OpenBabel*.<sup>75</sup>

### **3.5.6.3. Pemodelan struktur 3D protein**

Struktur 3D dari protein-protein target diprediksi menggunakan *web server SWISS-MODEL* dengan metode *homology modelling*. Struktur 3D protein kemudian divalidasi dengan menggunakan *Ramachandran plot*.

### **3.5.6.4. Docking dan visualisasi antara *protein-ligand***

Ligan *Labdane-type diterpene* diambil dari *PubChem Open Chemistry Database* dalam bentuk 3D. Struktur 3D yang telah didapatkan kemudian diminimisasi untuk memperoleh konformasi struktur yang paling stabil dengan menggunakan *software OpenBabel* atau menggunakan *software PyRx*. Jika proses minimisasi sudah selesai, kemudian klik kanan pada hasil minimisasi, pilih *convert to ligand pdbqt*. File yang mula-mula dalam bentuk SDF akan tersimpan dalam bentuk file pdbqt. Format file pdbqt berfungsi menunjukkan adanya muatan parsial pada masing-masing atom. Struktur 3D *Labdane-type diterpene* didapatkan dengan memasukkan urutan asam amino pada program *PyRx* dan hasil yang diperoleh adalah data dalam bentuk format PDB file.<sup>75</sup>

Preparasi asam amino *Lactobacillus gasseri* dilakukan menggunakan *PyMOL* dengan menghilangkan molekul air dan menambahkan beberapa hal seperti hidrogen nonpolar, muatan dan atom. Kemudian *grid* diatur maximize hingga menutupi permukaan protein target. Proses *molecular docking* ligan dengan *Levansucrase* dan *Doxorubicin* dilakukan dengan program *PyMOL*.

Luaran dari *docking* berupa pose ligan pada sisi aktif dan *score* afinitasnya. Analisis hasil *docking* dilakukan terhadap residu yang berinteraksi dengan ligan,

parameter hasil *binding affinity*, konformasi struktur, dan ikatan hidrogen antara *Labdane-type diterpene* dengan *Levansucrase* dan *Doxorubicin*.

#### 3.5.6.5. Analisis interaksi ikatan antara protein dengan ligan

Visualisasi hasil *molecular docking* antara ligan dan protein dilakukan menggunakan *software Edu PyMOL*. Visualisasi menggunakan *software Edu PyMOL* dengan bertujuan untuk mengklarifikasi sisi pengikatan ligan dengan protein. *Web server Protein plus* (<https://proteins.plus/>) digunakan untuk mengetahui interaksi jumlah ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan residu asam amino yang terlibat dalam interaksi antara ligan dengan protein.<sup>76</sup>

Hasil parameter uji dinilai berdasarkan *Lipinski's rule of five* yaitu jumlah ikatan hidrogen akseptor <10 dan hidrogen donor <5. Sedangkan nilai binding energy dinilai berdasarkan angka yang paling kecil atau angka yang paling negatif energi menunjukkan nilai yang terbaik. Hal ini menunjukkan energi untuk berikatan dengan protein target *Levansucrase* lebih kecil sehingga lebih efektif sebagai antikanker serviks tertuju pada bakteri penyebab.

#### 3.5.6.6. Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik Senyawa

Melakukan analisis dan menilai sifat fisikokimia, farmakokinetik, lipofilitas, kelarutan air, dan sifat kemiripan obat suatu senyawa maupun obat yang menjadi ligan dalam simulasi molekuler pada *web server* SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) dapat dilakukan dengan menggambar struktur ligan ataupun menuliskan smiles pada *web server* tersebut, kemudian klik “Run” maka hasil.

#### 3.5.6.7. Analisis Toksisitas Senyawa

Analisis toksisitas senyawa dianalisis menggunakan *web server* ProTox-II ([https://tox-new.charite.de/prottox\\_II/](https://tox-new.charite.de/prottox_II/)) klik “TOX PREDICTION” masukkan canonical smiles pada kolom. Pilih opsi “Organ Toxicity” dan “Toxicity end points”. Selanjutnya hasil penilaian toksisitas dan radar toksisitas senyawa akan terlihat pada *web server*.

#### 3.5.7. Pengenceran Ekstrak buah Legundi

Pengenceran ekstrak buah Legundi ini menggunakan Aquabidest yang dibagi menjadi 6 konsentrasi yaitu 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, dan 100%.

Pengenceran ekstrak pada berbagai konsentrasi menggunakan rumus berikut:<sup>77</sup>

$$\text{RUMUS: } V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan rumus:

$V_1$  = Volume larutan yang akan dilakukan pengenceran (mL)

$M_1$  = Konsentrasi ekstrak buah Legundi yang tersedia (%)

$V_2$  = Volume larutan yang diinginkan (mL)

$M_2$  = Konsentrasi ekstrak buah Legundi yang akan dibuat (%)

Tabel 3.2 Volume ekstrak buah Legundi yang dibutuhkan pada penelitian

$M_1$	$V_2$	$M_2$	$V_1$	$V_1 \times 3$
100%	1 mL	10%	0,1 mL	0,3 mL
100%	1 mL	20%	0,2 mL	0,6 mL
100%	1 mL	25%	0,25 mL	0,75 mL
100%	1 mL	50%	0,5 mL	1,5 mL
100%	1 mL	75%	0,75 mL	2,25 mL
100%	1 mL	100%	1 mL	3 mL

### 3.5.8. Analisis *in vitro* dengan *treatment* buah Legundi

Analisis *in vitro* dengan pendekatan dilusi dan difusi untuk membuktikan teori lingkungan mikro pada serviks dengan kehadiran mikrobiom *Lactobacillus gasseri* akan memengaruhi kerja cepat dari infeksi *HPV* dalam menginvasi jaringan epitel dan mukosa pada serviks.

Metode dilusi cair dalam uji *in vitro* ini digunakan untuk mengukur dan menilai KHM (kadar hambat minimum) sedangkan metode dilusi padat digunakan untuk menilai KBM (kadar bunuh minimum). Metode difusi digunakan untuk menguji sensitivitas bakteri terhadap agen antimikroba.



Langkah uji yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Tabung reaksi yang sudah disterilkan dan diberi tanda berupa I, II, III, IV, V, VI, Kontrol positif, dan kontrol negatif, setiap tabung diisi 1 ml medium aquadest.
2. Tabung I diisi dengan filtrat konsentrasi 100% sebanyak 2 ml
3. Tabung II diisi dengan filtrat konsentrasi 75% sebanyak 2 ml
4. Tabung III diisi dengan filtrat konsentrasi 50% sebanyak 2 ml
5. Tabung IV diisi dengan filtrat konsentrasi 25% sebanyak 2 ml
6. Tabung V diisi dengan filtrat konsentrasi 20% sebanyak 2 ml
7. Tabung VI diisi dengan filtrat konsentrasi 10% sebanyak 2 ml
8. Media Kontrol positif, diberikan antibiotik Streptomisin
9. Media kontrol negatif, diberikan *Aquabidest*
10. Seluruh tabung ditambah dengan suspensi bakteri sebanyak 1 ml yang akan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam waktu 24 jam.
11. Dari tabung II – hingga tabung VI diambil sampel menggunakan cotton swab untuk dioleskan pada media *de Man Rogosa Sharpe agar* (MRSA) yang telah diberi label sesuai konsentrasi ekstrak buah Legundi.
12. KHM dapat diperoleh dan ditentukan melalui pengamatan kekeruhan dan kejernihan dari setiap medium uji yang telah diinkubasi kemudian dibandingkan dengan larutan kontrol media. Konsentrasi yang paling rendah menandakan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan tingkat kejernihan pada medium uji.
13. KBM diperoleh dan ditentukan dengan pengamatan ada atau tidaknya bakteri yang tumbuh didalam media agar setelah dilakukan proses inkubasi. Konsentrasi terendah yang dapat memperlihatkan kematian pada bakteri (menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri).
14. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan kertas cakram. Bakteri diinokulasikan kedalam media agar, kemudian dimasukkan kertas cakram dan diisi dengan menggunakan senyawa uji. Penilaian dalam metode ini berupa pengamatan pada area jernih pada permukaan media agar. Jika terdapat kejernihan permukaan media agar menunjukkan adanya keberhasilan dalam

menghambat pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba serta melakukan perhitungan ukuran dari area jernih.<sup>64</sup>

15. Kelompok kontrol dalam penelitian ini terdiri dari 2 kelompok kontrol, yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberikan antibiotic streptomisin, sedangkan kelompok kontrol negatif diberikan *aquabidest*.

### **3.6. Metode Analisis Data**

#### **3.6.1. Pengolahan Data**

Pengolahan data dalam penelitian kuantitatif merupakan suatu proses yang dilakukan untuk mendapatkan data yang berasal dari setiap variabel penelitian. Pengolahan data terdiri dari pengeditan data (*editing*), transformasi data (*coding*), pemasukan data (*entry data*), dan pengecekan kembali data yang dimasukkan (*recheck*).

a. Pengeditan data (*editing*)

Pengeditan data (*editing*) dilakukan untuk meminimalisir adanya kesalahan data yang akan dimasukkan dengan melakukan koreksi data yang tidak memenuhi syarat.

b. Transformasi data (*coding*)

Transformasi data (*coding*) merupakan tahapan pemberian kode pada suatu data dapat berupa huruf maupun angka yang akan memberikan identitas bagi data. Coding ini dapat dilakukan sebelum ke lapangan (tertutup), sebelum dan setelah ke lapangan (setengah terbuka), dan setelah selesai dari lapangan (terbuka).

c. Pemasukan data (*entry data*)

Pemasukan data (*entry data*) merupakan teknik memasukkan data untuk melakukan pengolahan dan analisis data dengan menggunakan *IBM SPSS statistics version 26*.

d. Pengecekan kembali data (*recheck*)

Pengecekan kembali data dilakukan untuk mengoreksi kesalahan yang ditemukan pada saat data dimasukkan.

#### **3.6.2. Analisis data**

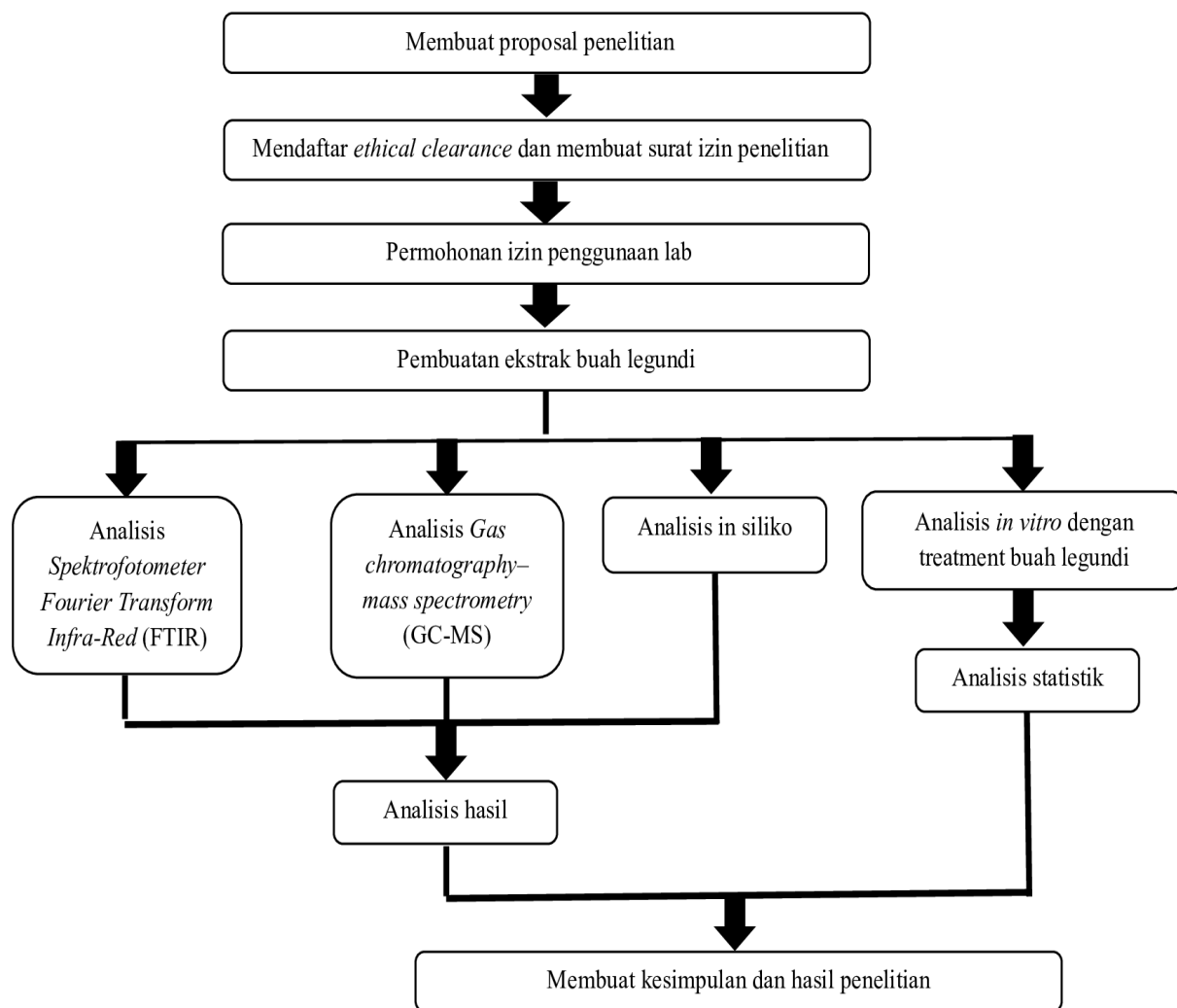
Analisis dilakukan secara analisis *in silico* terlebih dahulu selanjutnya data yang telah didapat dianalisis kembali dengan menggunakan prinsip bioinformatika.

Analisis *in silico* merupakan penilaian yang dilakukan untuk melihat jumlah dan jenis ikatan yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan van Der Waals antara protein *Lactobacillus gasseri* yaitu *Levansucrase* dan agen kemoterapi *Doxorubicin* dengan ligand *Labdane-type diterpene*. Setelah menilai interaksi antara protein dan ligand, tahapan selanjutnya adalah mengevaluasi energi ikatan dan titik ikatan antara ligand dengan senyawa aktif.

Analisis *in vitro* dengan *treatment* buah Legundi menggunakan pendekatan dilusi dan difusi. Data yang telah terkumpul dari uji *in vitro* akan dianalisis dan ditafsirkan secara statistik dan deskriptif. Data yang telah terkumpul dari uji *in vitro* dianalisis menggunakan uji normalitas yaitu uji *ShapiroWilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* dengan nilai signifikansi nilai 95% ( $p \geq 0.05$ ). Jika data berdistribusi normal dan homogen maka tahap selanjutnya melakukan uji statistik parametrik, yaitu uji *One-way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95%. Kemudian dilanjutkan menggunakan uji *post hoc Least Significant Difference* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok secara signifikan.

### 3.7. Alur Penelitian

Alur penelitian diperlihatkan pada diagram alir gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir alur penelitian

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, yang didasarkan dengan adanya persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan dari Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara dengan No. 1052/KEPK/FKUMSU/2023 yang dapat dilihat pada (**lampiran 1**), hasil identifikasi tanaman di Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara (USU) (**lampiran 2**), surat izin pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (**lampiran 3**), Laboratorium Mega Global Safety Indonesia untuk dilakukan analisis *FTIR* dan *GC-MS* (**lampiran 4**), Hasil GC-MS buah Legundi (**Lampiran 5**), Hasil analisis data SPSS (**lampiran 7**, **lampiran 8**, dan **lampiran 9**).

##### 4.1.1. Hasil Identifikasi Tumbuhan

Hasil identifikasi tumbuhan yang dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara (USU) menunjukkan bahwa tumbuhan yang diuji termasuk dalam famili *Lamiaceae*, genus *Vitex*, spesies *Vitex trifolia L.* Nama lokal tanaman ini disebut dengan buah Legundi.

##### 4.1.2. Hasil Uji Buah Legundi

Berdasarkan hasil karakterisasi buah legundi, didapati hasil seperti yang terdapat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Uji Buah Legundi

No.	Jenis Sampel	Kriteria Uji	Hasil Uji	Metode pengujian
1	Buah Legundi 2,5 kg	Berat kering	1000 gram	Pengeringan
2	Simplisia Buah Legundi	Ekstrak Cair	5,7 L, Coklat bening	Maserasi

3	Ekstrak Legundi	Buah	Bentuk	Kental	Organoleptik
			Bau	Khas	Organoleptik
			Warna	Cokelat Kehitaman	Organoleptik
			Rasa	Pahit	Organoleptik
		Hasil Ekstrak	40,07 grams		Evaporasi, Waterbath kental
		Hasil Rendemen Ekstrak	4,45 %		Evaporasi, Waterbath

#### 4.1.3. Hasil Skrining Fitokimia

Uji ini dilakukan untuk menilai kandungan fitokimia dari ekstrak etanol 96% buah Legundi. Sebelum dilakukan skrining fitokimia, terlebih dahulu dilakukan uji bebas etanol. Hasil uji bebas etanol menunjukkan hasil negatif etanol, bau yang dikeluarkan setelah dipanaskan adalah bau murni ekstrak buah Legundi. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Skrining Fitokimia

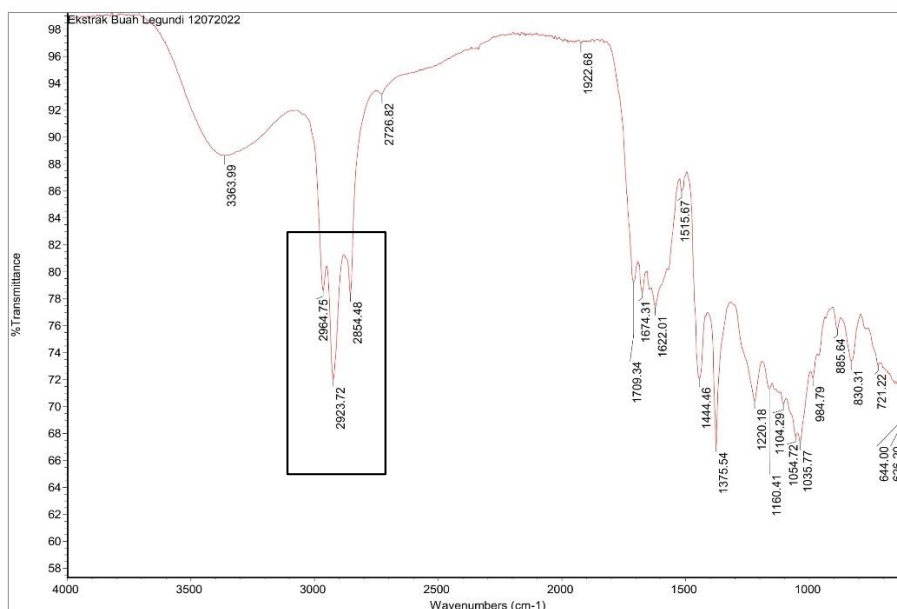
Pengujian	Metode	Hasil	Keterangan
Tanin	FeCl <sub>3</sub> Test	Terbentuk warna hijau kehitaman	Positif (+)
Alkaloid	Mayer	terbentuk kekuningan	Positif (+)
	Dragendorff	Terbentuk berwarna merah bata	Positif (+)
Triterpenoid/ Steroid	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dan CH <sub>3</sub> COOH	Terbentuk warna ungu	Positif (+) triterpenoid
Flavonoid	Serbuk Magnesium	Terbentuk warna kehijauan	Positif (+)
Saponin	Foam Test	Terdapat busa	Positif (+)

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang disajikan pada tabel 4.2 ditemukan bahwa ekstrak buah Legundi mengandung senyawa Tanin, alkaloid dengan menggunakan pereaksi dragendorff dan mayer, triterpenoid, flavonoid, dan saponin.

#### 4.1.4. Hasil Analisis *FTIR*

Pada grafik uji FTIR terdapat 2 sumbu yaitu sumbu x dan y. Sumbu X menunjukkan bilangan gelombang sedangkan sumbu y menunjukkan transmitansi persen. Terdapat puncak karakteristik yang menandakan adanya serapan khas pada suatu senyawa uji yang akan dituju.

Uji dengan *FTIR* menghasilkan gugus fungsi pada ekstrak buah Legundi seperti tampak pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Spektrum Gugus Fungsi Ekstrak Buah Legundi

Hasil identifikasi ekstrak buah legundi dengan menggunakan spektrofotometer IR menunjukkan adanya serapan yang khas di daerah bilangan gelombang 2964,75 cm<sup>-1</sup>, 2923,72 cm<sup>-1</sup> dan 2854,48 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya ikatan C – H, pada bilangan gelombang 1709,34 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus karbonil C=O, pada bilangan gelombang 1674,31 cm<sup>-1</sup> dan 1622,01 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus C=C, pada bilangan gelombang 1515,67 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus C=C aromatik, pada bilangan gelombang 1444,46 cm<sup>-1</sup> dan 1375,54 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus C–H, pada bilangan gelombang

1220,18 cm<sup>-1</sup> menunjukkan gugus -N=C=O, pada bilangan gelombang 1160,41 cm<sup>-1</sup>, 1104,29 cm<sup>-1</sup> dan 1054,72 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya C-O dan adanya serapan pada bilangan gelombang 3363,99 menunjukkan adanya gugus O-H. Keterangan jenis senyawa serapan gelombang pada hasil uji FTIR pada ekstrak buah Legundi dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Jenis senyawa serapan gelombang pada hasil uji FTIR pada ekstrak buah Legundi

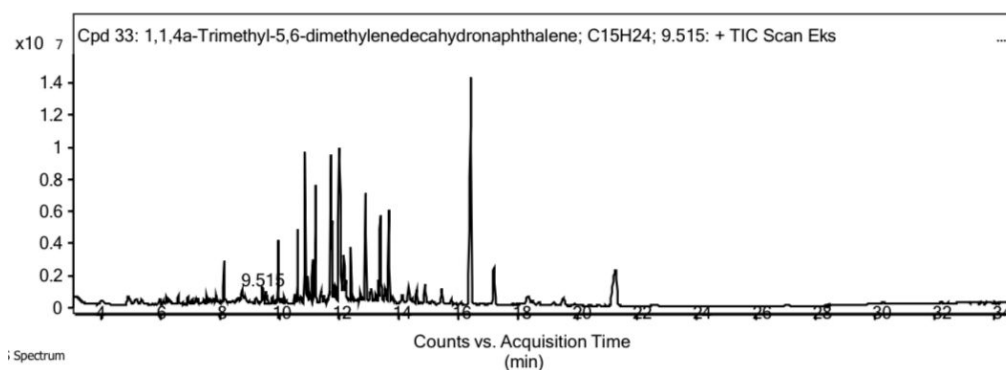
Jenis Ikatan	Jenis Senyawa
C-H	Propanon, aldehid, triterpenoid
C=O	Ester, asam karboksilat, flavonoid
C=C aromatik	Aldehid, saponin
-N=C=O	Amina
C-O	Ester, saponin, alkohol
O-H	Alkohol, fenol, tanin

#### 4.1.5. Hasil Analisis GC-MS

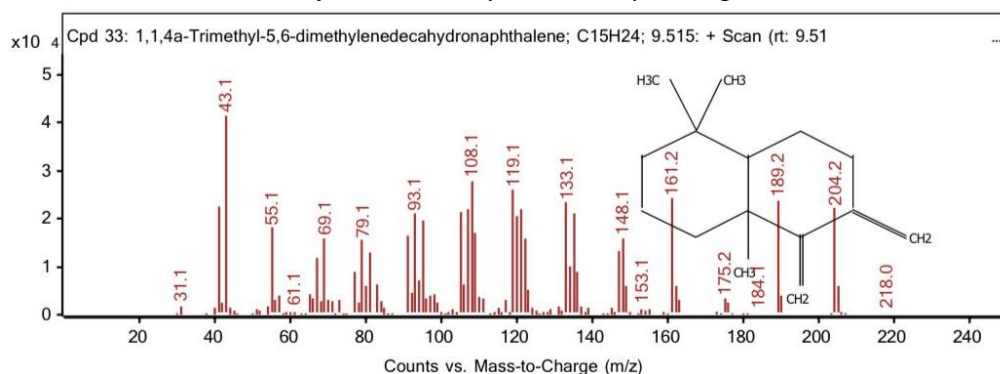
Analisis GC-MS dilakukan untuk membaca suatu senyawa dengan konsentrasi yang sangat rendah sehingga metabolit sekunder yang terdapat didalam sampel uji dapat teridentifikasi dengan hasil yang dapat berupa kromatogram dan spektrum massa.

Berdasarkan hasil analisis GC-MS terdeteksi 107 senyawa pada buah Legundi. Golongan senyawa terpenoid pada ekstrak buah Legundi yang terdeteksi adalah *Labdane-type diterpene* (1,1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene) ditemukan pada *retention time* (rt) 9515 yang diperlihatkan pada gambar 4.2 dan 4.3. Hasil senyawa lainnya yang terdapat didalam buah legundi terlampir pada **lampiran 5**.





Gambar 4.2 Senyawa Aktif *Labdane type-diterpene* dalam bentuk 1,1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene



Gambar 4.3 MS Spektrum pada *Labdane-type diterpene* ekstrak buah Legundi

#### 4.1.6. Hasil Analisis *In silico*

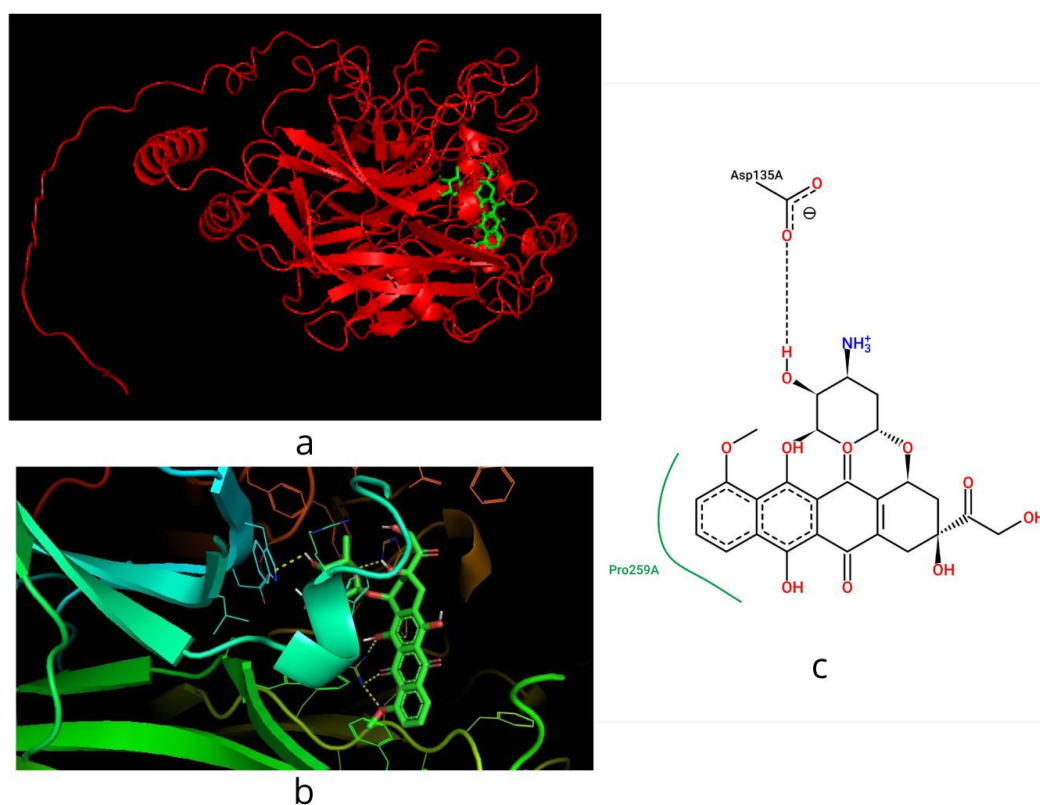
##### 4.1.6.1. Hasil simulasi *docking molekuler*

Simulasi docking molekuler dilakukan untuk mengetahui interaksi antara protein *levansucrase* dengan ligan *labdane-type diterpene*, dan *levansucrase* dengan *doxorubicin*. Berdasarkan hasil simulasi docking tersebut diperoleh *binding affinity* (energi ikatan) pada *Labdane-type diterpene* yaitu sebesar -7,1 kcal/mol. Sedangkan pada agen kemoterapi *Doxorubicin* yaitu sebesar -9,3 kcal/mol. Berdasarkan jumlah ikatan hidrogen *Labdane-type diterpene* didapatkan sebanyak 3 ikatan, sedangkan *Doxorubicin* didapatkan sebanyak 1 ikatan hidrogen. Jumlag ikatan hidrofobik dan jenis ikatan hidrogen pada interaksi antara protein *Levansucrase* terhadap ligan *Labdane-type diterpene* dan *Doxorubicin* 3D dapat dilihat pada tabel 4.4

Tabel 4.4 Hasil simulasi docking molekuler

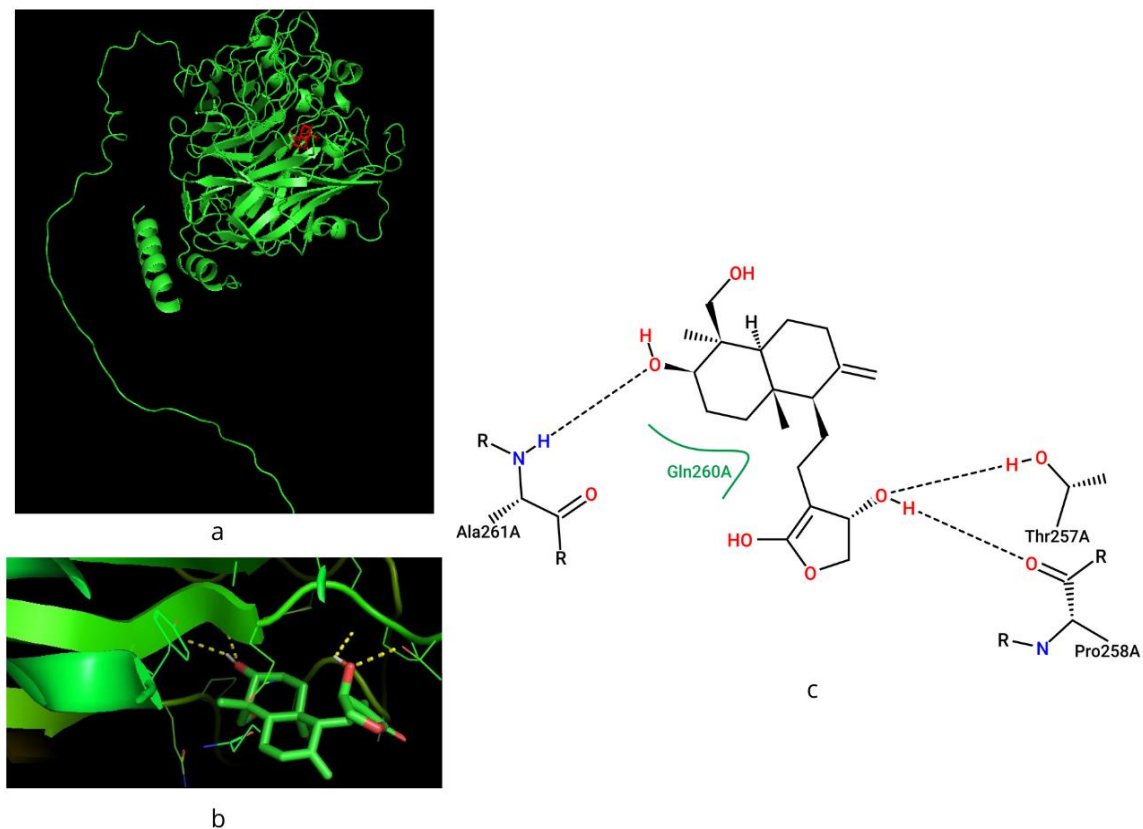
No	Parameter uji	<i>Labdane-type diterpene</i>	<i>Doxorubicin</i>
1	Binding Affinity (kcal/mol)	-7,5 kcal/mol	-9,3 kcal/mol
2	Jumlah ikatan hidrogen	3	1
3	Jumlah ikatan hidrofobik	1	1
4	Jenis ikatan hidrogen	Ala261A, Thr257A, Pro258A	Asp135A
5	Jenis ikatan hidrofobik	Gln260A	Pro259A

Hasil visualisasi disimulasikan menggunakan aplikasi pyMOL antara protein Levansucrase dan Doxorubicin dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 (a) Interaksi antara protein *Levansucrase* terhadap ligan *Doxorubicin* 3D (b) Ligan *Doxorubicin*, (c) Struktur Ligan secara 2D

Hasil visualisasi yang disimulasikan menggunakan aplikasi pyMOL antara protein *Levansucrase* dan *Labdane-type diterpene* dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 (a) Interaksi antara protein *Levansucrase* terhadap ligan *Labdane-type diterpene* 3D (b) Ligan *Labdane-type diterpene*, (c) Struktur Ligan secara 2D

#### 4.1.6.2. Analisis ADME-Tox

Pada hasil analisis ADME-Tox dilakukan menggunakan 2 web yaitu SwissADME untuk melihat farmakokinetik dari *Labdane-type diterpene*, dan Protox-II untuk menilai toksikologi pada *Labdane-type diterpene*.

##### 4.1.6.2.1. Hasil Farmakokinetik *Labdane-type*

Hasil analisis farmakokinetik *Labdane-type diterpene* diperoleh dari web swissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#top>) diperlihatkan pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil penilaian farmakokinetik

Penilaian	<i>Labdane-type diterpene</i>	Parameter Penilaian
GI Absorption	Tinggi	Berdasarkan penilaian
BBB Permeant	Tidak	Food and Drug
P-gp substrate	Ya	Administration (FDA):
CYP1A2 Inhibitor	Tidak	1. Administrasi lewat
CYP2C19 Inhibitor	Tidak	oral harus memenuhi
CYP2C9 Inhibitor	Tidak	seluruh aspek ADME
CYP2D6 Inhibitor	Tidak	(GI absorption yang
CYP3A4 Inhibitor	Tidak	tinggi, dan memenuhi 5
Log $K_p$ (Skin permeation)	-6,92 cm/s	aturan Lipinski's).
		2. Obat dengan sediaan
		dengan permeabilitas
		pada kulit yang tinggi
		dapat digunakan sebagai
		sediaan topikal.

Berdasarkan tabel 4.5, kemampuan farmakokinetik didapatkan absorpsi gastrointestinal yang tinggi pada ligan *Labdane-type diterpene*. *Labdane-type diterpene* memiliki pengikatan dengan P-gp substrate sehingga mempengaruhi bioavailabilitas obat. Pada penghambatan enzim ligan tidak memiliki efek menghambat enzim. Sedangkan nilai Log  $K_p$  (*skin permeation*) dalam rentang nilai yang baik dan memiliki permeabilitas tinggi.

#### 4.1.6.3. Hasil Farmakokimia *Labdane-type diterpene*

uji farmakokimia dilakukan untuk menilai kemampuan suatu obat berdasarkan sifat kimia. Hal ini didapatkan dari web swissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#top>) dengan berdasarkan kriteria dari *Food and Drug Administration* (FDA).

##### 4.1.6.3.1 Fisikokimia

Uji fisikokimia dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya tembus membran pada senyawa *Labdane-type diterpene*, seperti yang pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil penilaian fisikokimia

Penilaian	<i>Labdane-type diterpene</i>	Parameter Penilaian
Molecular Weight	204,35 g/mol	
Num. heavy atoms	25	Berdasarkan penilaian
Fraction Csp <sup>3</sup>	0,73	Lipinski's rule of five:
Num. H-bond acceptors	3	1. Molecular Weight <500 g/mol
Num. H-bond donors	3	2. Num H-bond acceptors <10
Molar Refractivity	95,21	3. Num. H-bond donors <5
TPSA	86,99	4. Molar refractivity 40-130

#### 4.1.6.3.2 Lipophilicity

*Lipophilicity* merupakan kemampuan suatu senyawa atau obat agar dapat larut di dalam lipid, lemak, maupun minyak. *Lipophilicity* sangat penting terhadap sifat farmakokinetik absorpsi, distribusi, permeabilitas, dan rute eliminasi obat. Hasil penilaian *lipophilicity* diperlihatkan pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil penilaian lipophilicity

Penilaian	<i>Labdane-type diterpene</i>	Parameter Penilaian
Consensus Log P <sub>o/w</sub>	2,30	Berdasarkan Penilaian
		Lipinski's rule of five: Lipophilicity < 5

Berdasarkan tabel 4.7 menunjukkan nilai Log P pada *Labdane-type diterpene* yaitu sebesar 2,30. Hal ini menunjukkan *labdane-type diterpene* mampu untuk larut didalam lemak, lipid, maupun minyak baik berdasarkan aturan *Lipinski's rule of five*.

#### 4.1.6.3.3 Water Solubility

Water solubility merupakan kemampuan suatu obat/senyawa untuk larut didalam air. Diperlihatkan pada tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil penilaian Water Solubility

Penilaian	<i>Labdane-type diterpene</i>	<i>Parameter Penilaian</i>
Log S (ESOL) Class	-3,18 <i>Soluble</i>	Berdasarkan Food and Drug Administration (FDA):
Log S (Ali) Class	-3,62 <i>Soluble</i>	Solubilitas yang tinggi pada suatu obat baik untuk sediaan
Log S (SILICOS-IT) Class	-2,69 <i>Soluble</i>	obat yang bersifat hidrofilik

Berdasarkan 3 metode berbeda yang dikalkulasikan didalam swiss ADME didapatkan hasil *water solubility* pada *Labdane-type diterpene* tergolong kedalam kelas *soluble* karena nilai  $<-2$ .

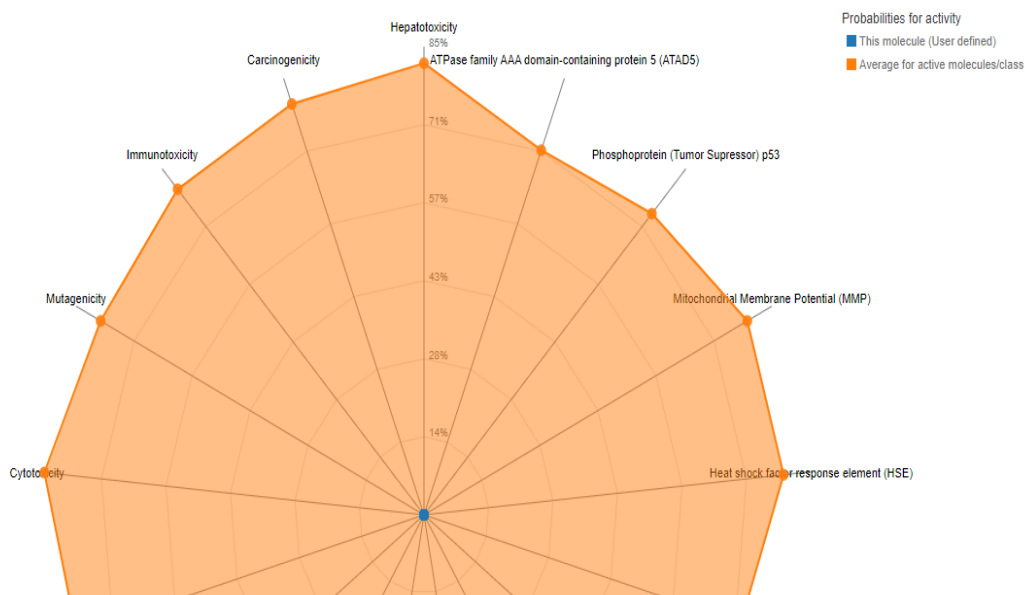
#### 4.1.6.4. Hasil uji toksisitas senyawa *Labdane-type diterpene* dan Doxorubicin

Hasil penilaian uji toksisitas senyawa *Labdane-type diterpene* diperlihatkan pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil penilaian uji toksisitas

Penilaian	<i>Labdane-type diterpene</i>
Predicted LD50	5000 mg/KgBB
Predicted Toxicity Class	5
Hepatotoxicity	<i>Inactive</i>
Carcinogenicity	<i>Inactive</i>
Immunotoxicity	<i>Inactive</i>
Mutagenicity	<i>Inactive</i>
Cytotoxicity	<i>Inactive</i>

Berdasarkan prediksi kelas toksisitas didapatkan bahwa *Labdane type diterpene* pada kelas 5 seperti diperlihatkan gambar 4.5. Hal ini menunjukkan bahwa *Labdane-type diterpene* tidak menimbulkan toksisitas.



Gambar 4.6 Radar toksisitas *Labdane-type diterpene*

#### 4.1.7. Hasil Analisis *In vitro* dengan *treatment* buah Legundi

##### 4.1.7.1. Hasil analisis *In vitro* metode dilusi cair dengan *treatment* buah Legundi

Setelah dilakukan pengamatan hasil penelitian metode dilusi cair (menilai Kadar Hambat Minimum) pada tabung reaksi dengan konsentrasi yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam, maka didapatkan hasil seperti yang disajikan dalam tabel 4.10

Tabel 4.10 Hasil KHM ekstrak buah Legundi

No	Tabung	Visualisasi	Keterangan
1	Konsentrasi 10%	Keruh	Tumbuh mikroba
2	Konsentrasi 20%	Keruh	Tumbuh mikroba
3	Konsentrasi 25%	Jernih	Tidak tumbuh mikroba
4	Konsentrasi 50%	Jernih	Tidak tumbuh mikroba
5	Konsentrasi 75%	Tidak dapat dinilai	Tidak dapat dinilai
6	Konsentrasi 100%	Tidak dapat dinilai	Tidak dapat dinilai
7	Kontrol Positif	Jernih	Tidak tumbuh mikroba
8	Kontrol Negatif	Keruh	Tumbuh mikroba

**Keterangan:**

Tidak dapat dinilai → Ekstrak terlalu pekat dan berwarna gelap sehingga sulit untuk dinilai.

Berdasarkan hasil tabel 4.10, hasil analisis *in vitro* dengan metode dilusi cair dengan treatment buah Legundi dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 25%, 50% serta pada kontrol positif tidak ditemukan adanya kekeruhan sehingga kemampuan buah Legundi dalam menghambat bakteri *Lactobacillus gasseri* terdapat pada konsentrasi tersebut, dengan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat bakteri adalah 25%, sedangkan pada konsentrasi 75%, dan 100% tidak dapat dinilai.

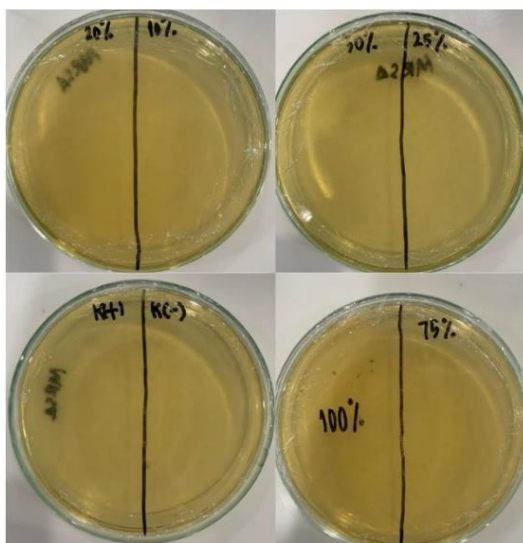


Gambar 4.7 Kadar Hambat Minimum

#### 4.1.7.2. Hasil analisis *In vitro* metode dilusi padat dengan treatment buah Legundi

Metode dilusi padat diperoleh dari hasil dilusi cair yang telah diinkubasi dan ditanamkan kembali pada media agar *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) untuk menilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) dengan menilai ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada tiap konsentrasi dan kelompok kontrol. Hasil *in vitro* dengan dilusi padat diperlihatkan pada gambar 4.8.





Gambar 4.8 Kadar Bunuh Minimum pada tiap konsentrasi dan kelompok kontrol

Berdasarkan gambar 4.8 hasil KBM ekstrak buah Legundi disajikan dalam tabel 4.11.

Tabel 4.11 Hasil KBM ekstrak buah Legundi

No	Media	Visualisasi	Keterangan
1	Konsentrasi 10%	Terlihat bintik putih berkoloni	Tumbuh mikroba
2	Konsentrasi 20%	Terlihat bintik putih berkoloni	Tumbuh mikroba
3	Konsentrasi 25%	Tidak terlihat bintik putih berkoloni	Tidak tumbuh mikroba
4	Konsentrasi 50%	Tidak terlihat bintik putih berkoloni	Tidak tumbuh mikroba
5	Konsentrasi 75%	Tidak terlihat bintik putih berkoloni	Tidak tumbuh mikroba
6	Konsentrasi 100%	Tidak terlihat bintik putih berkoloni	Tidak tumbuh mikroba
7	Kontrol Positif	Tidak terlihat bintik putih berkoloni	Tidak tumbuh mikroba
8	Kontrol Negatif	Terlihat bintik putih berkoloni	Tumbuh mikroba

**Keterangan:** terlihat adanya bintik putih berkoloni pada media agar MRSA yang menandakan adanya pertumbuhan mikroba.

Berdasarkan hasil tabel 4.11, hasil analisis *in vitro* dengan metode dilusi padat dengan treatment buah Legundi dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 25%,50%,75%,100% serta pada kontrol positif tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri sehingga kemampuan buah Legundi dalam membunuh bakteri *Lactobacillus gasseri* terdapat pada konsentrasi tersebut, dengan konsentrasi terkecil yang mampu membunuh bakteri adalah pada konsentrasi 25%.

#### 4.1.7.3. Hasil analisis *In vitro* metode difusi dengan *treatment* buah Legundi

Hasil metode difusi diperoleh dari pemberian konsentrasi berbeda dari buah legundi serta kontrol positif menggunakan antibiotik streptomisin dan kontrol negatif menggunakan aquabidest. Maka diperoleh hasil uji daya hambat bakteri seperti yang disajikan dalam tabel 4.12.

Tabel 4.12 Daya hambat pada konsentrasi ekstrak buah Legundi dan kelompok kontrol

Diameter zona hambat pertumbuhan <i>Lactobacillus gasseri</i> (mm)								
Pengulangan	Konsentrasi Ekstrak buah Legundi ( <i>Vitex trifolia L.</i> )						Kelompok kontrol	
	10%	20%	25%	50%	75%	100%	-	+
Pengulangan 1	13,68	14,72	17,21	20,33	23,58	25,12	0	28,15
Pengulangan 2	13,37	15,03	17,02	19,65	24,07	25,85	0	28,35
Pengulangan 3	13,07	14,09	17,55	18,03	23,39	26,03	0	29,05

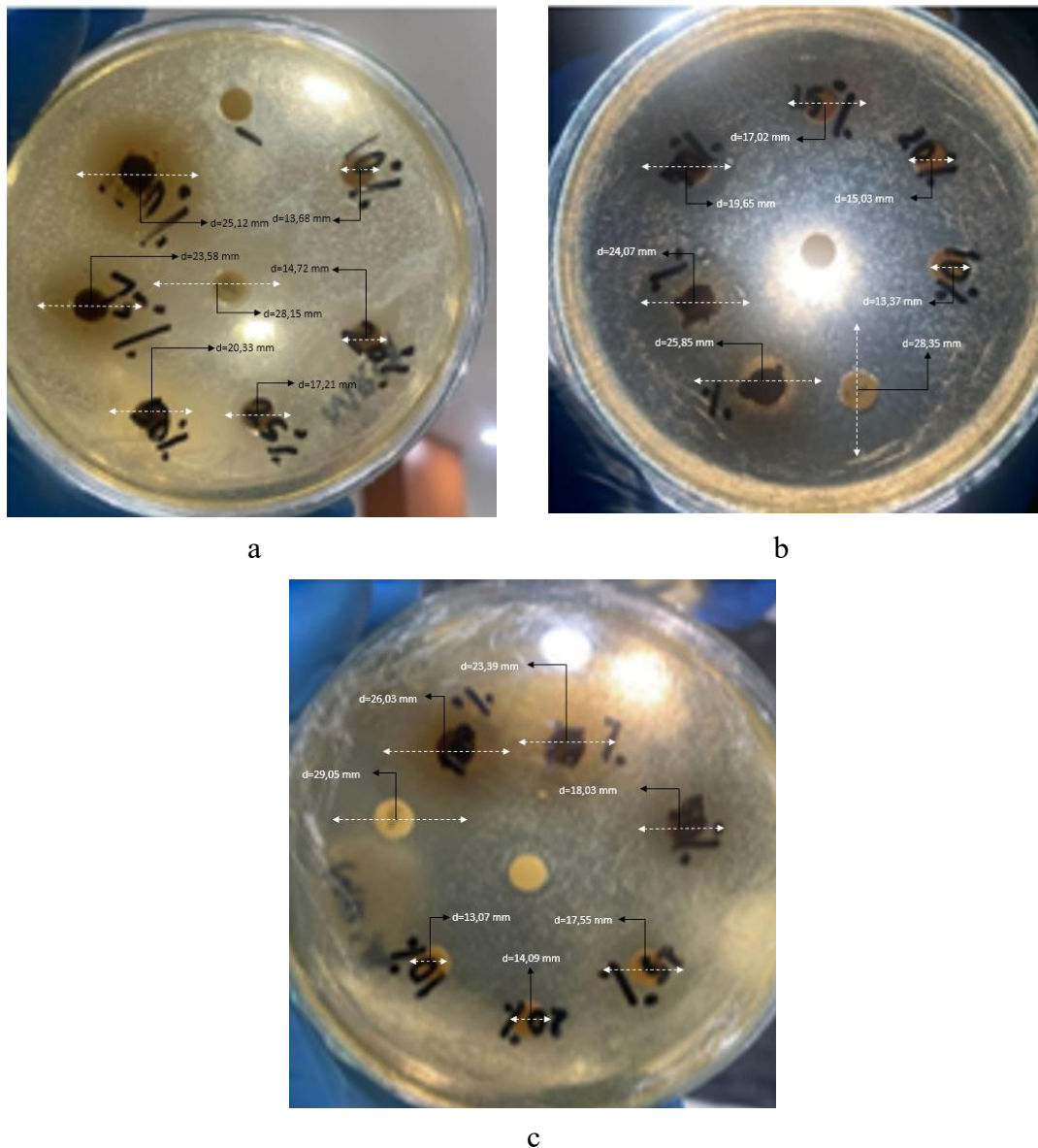
Pada tabel 4.12, didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak buah Legundi dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan diameter zona hambat yang berbeda. Pada konsentrasi 10% didapatkan diameter terpanjang yaitu pada pengulangan ke 1 yaitu sebesar 13,68 mm. Pada konsentrasi 20% didapatkan nilai

diameter zona hambat terpanjang yaitu pada pengulangan ke 2 dengan ukuran 15,03 mm. Konsentrasi 25% didapatkan diameter terpanjang yaitu pada pengulangan ke 3 dengan diameter 17,55 mm.

Konsentrasi 50% didapatkan ukuran diameter terpanjang yaitu pada pengulangan ke 1 yaitu sebesar 20,33 mm. Pada konsentrasi 75% didapatkan diameter zona hambat terpanjang yaitu pada pengulangan ke 2 yaitu sebesar 24,07 mm. Sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu konsentrasi 100% diperoleh zona hambat terpanjang pada pengulangan ke 3 dengan diameter 26,03 mm. Pada kelompok kontrol ditemukan daya hambat yang paling tinggi yaitu pada pengulangan ke 3 dengan diameter 29,05 dan pada kontrol negatif tidak ditemukan adanya zona hambat (area jernih)

Pada tabel 4.12 diperlihatkan juga bahwa pada pengulangan 1, konsentrasi 10% daya hambat 13,68 (kuat), konsentrasi 20% daya hambat 14,72 (kuat), konsentrasi 25% daya hambat 17,21 (kuat), konsentrasi 50% daya hambat 20,33 (sangat kuat), konsentrasi 75% daya hambat 23,58 (sangat kuat), konsentrasi 100% daya hambat 25,12 (sangat kuat), dan kontrol positif 28,15 (sangat kuat). Pengulangan 2 memperlihatkan konsentrasi 10% daya hambat 13,37 (kuat), konsentrasi 20% daya hambat 15,03 (kuat), konsentrasi 25% daya hambat 17,02 (kuat).

Konsentrasi 50% daya hambat 19,65 (kuat), konsentrasi 75% daya hambat 24,07 (sangat kuat), konsentrasi 100% daya hambat 25,85 (sangat kuat), dan kontrol positif 28,35 (sangat kuat). Pada pengulangan 3, menunjukkan konsentrasi 10% daya hambat 13,07 (kuat), konsentrasi 20% daya hambat 14,09 (kuat), konsentrasi 25% daya hambat 17,55 (kuat), konsentrasi 50% daya hambat 18,03 (kuat), konsentrasi 75% daya hambat 23,39 (sangat kuat), konsentrasi 100% daya hambat 26,03 (sangat kuat), dan kontrol positif 29,05 (sangat kuat). Gambar 4.9 menunjukkan hasil pengujian *In vitro* metode difusi dengan *treatment* buah Legundi.



Gambar 4.9 Hasil pengujian *In vitro* metode difusi dengan *treatment* buah Legundi (a) Pengulangan 1 (b) Pengulangan 2 (c) Pengulangan 3

#### 4.1.8. Hasil analisis data

##### 4.1.8.1. Uji normalitas dan uji homogenitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan dilakukan uji homogenitas. Apabila pada uji normalitas didapatkan nilai *Sig. (P Value)*  $<0,05$  maka data tidak berdistribusi normal, tetapi apabila *Sig. (P Value)*  $>0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi secara normal.

Sedangkan pada uji homogenitas apabila nilai *Sig. (P Value) Based on Mean*  $< 0,05$  berarti data tidak homogen, tetapi apabila nilai *Sig. (P Value) Based on Mean*  $> 0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa data homogen. Hasil analisis data uji normalitas dan homogenitas dapat dilihat pada tabel 4.13.

Tabel 4.13 Hasil analisis uji Normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji Homogenitas pada diameter zona hambat

Kelompok	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji homogenitas
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 10%	0,982	
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 20%	0,629	
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 25%	0,691	
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 50%	0,557	0,068
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 75%	0,524	
Konsentrasi Ekstrak Buah Legundi 100%	0,359	
Kontrol Positif (Streptomisin)	0,407	
Kontrol Negatif (aquabidest)	0,000	

Pada hasil uji normalitas diameter zona hambat pada konsentrasi ekstrak buah Legundi 10% adalah 0,982 ( $P > 0,05$ ), konsentrasi 20% sebesar 0,629 ( $P > 0,05$ ), konsentrasi 25% sebesar 0,691 ( $P > 0,05$ ), konsentrasi 50% sebesar 0,557 ( $P > 0,05$ ), konsentrasi 75% sebesar 0,524 ( $P > 0,05$ ), dan pada konsentrasi 100% sebesar 0,359 ( $P > 0,05$ ). Sedangkan pada kelompok kontrol positif diperoleh nilai uji normalitas sebesar 0,407 ( $P > 0,05$ ). Kesimpulan hasil uji normalitas adalah seluruh data yang dimasukkan berdistribusi normal.

Berdasarkan hasil uji homogenitas (*Significancy Test Homogeneity of Variance*) menunjukkan hasil 0,068 ( $P > 0,05$ ), hasil ini menunjukkan data yang dimasukkan homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan uji one-way anova.

#### 4.1.8.2. Hasil analisis one-way anova dengan nilai rata-rata dan standar deviasi pada diameter zona hambat

Hasil analisis One-way anova diameter zona hambat diperlihatkan pada tabel 4.14.

Tabel 4.14 Hasil analisis One-way anova dengan nilai rata-rata dan standar deviasi pada diameter zona hambat

Kelompok	n	Minimum±Maximum	P
Konsentrasi 10%	3	13,07±13,68	
Konsentrasi 20%	3	14,09±15,03	
Konsentrasi 25%	3	17,02±17,55	
Konsentrasi 50%	3	18,03±20,33	0,000
Konsentrasi 75%	3	23,39±24,07	
Konsentrasi 100%	3	25,12±26,03	
Kontrol Positif	3	28,15±29,05	
Kontrol Negatif	3	00,00±00,00	

Berdasarkan hasil analisis One-way anova pada tabel 4.14, diperoleh nilai rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 10% adalah 13,3. Pada konsentrasi 20% diperoleh 14,61. Pada konsentrasi 25% diperoleh 17,26. Pada konsentrasi 50% diperoleh 19,33. Pada konsentrasi 75% diperoleh 23,68. Pada konsentrasi 100% diperoleh 25,66. Pada kontrol positif diperoleh nilai 28,51. Serta pada kontrol negatif diperoleh nilai 00,00.

#### 4.1.8.3. Hasil uji *Post Hoc*

Uji *Post hoc* merupakan uji beda yang dilakukan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan antara daya hambat satu konsentrasi dengan konsentrasi lainnya maupun dengan kelompok kontrol yang disebut dengan signifikan. Hasil dikatakan signifikan apabila didapatkan nilai  $P < 0,05$  sedangkan apabila  $P > 0,05$  dikatakan tidak signifikan yang berarti tidak terdapat perbedaan.

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.15, menunjukkan uji beda diameter zona hambat ekstrak buah legundi konsentrasi 10% dengan konsentrasi 20% sebesar 0,165 (tidak signifikan) yaitu tidak adanya beda atau pengaruh yang signifikan pada

konsentrasi tersebut. Konsentrasi 10% terhadap 25%, 50%, 75%, 100% didapatkan nilai  $<0,05$  yang berarti signifikan atau terdapat perbedaan.

Tabel 4.15 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat pada konsentrasi 10% dengan konsentrasi 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif diameter zona hambat

Kelompok	n	P	Keterangan
Ekstrak Buah Legundi 20%	3	0,165	Tidak Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 25%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 50%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 75%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 100%	3	0,000	Signifikan
Kontrol positif (Streptomisin)	3	0,000	Signifikan
Kontrol negatif (Aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Tabel 4.16 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat konsentrasi 10% dengan konsentrasi 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif

Kelompok	n	P	Keterangan
Ekstrak Buah Legundi 25%	3	0,001	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 50%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 75%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 100%	3	0,000	Signifikan
Kontrol positif (Streptomisin)	3	0,000	Signifikan
Kontrol negatif (Aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.16, menunjukkan uji beda diameter zona hambat ekstrak buah legundi konsentrasi 20% terhadap 25%, 50%, 75%, 100% didapatkan nilai  $<0,05$  yang berarti signifikan atau terdapat perbedaan pada konsentrasi tersebut.

Tabel 4.17 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat pada konsentrasi 25% dengan konsentrasi 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif

	Kelompok	N	P	Keterangan
Ekstrak	Ekstrak Buah Legundi 50%	3	0,005	Signifikan
Buah	Ekstrak Buah Legundi 75%	3	0,000	Signifikan
Legundi	Ekstrak Buah Legundi 100%	3	0,000	Signifikan
25%	Kontrol positif (Streptomisin)	3	0,000	Signifikan
	Kontrol negatif (Aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.17, menunjukkan uji beda diameter zona hambat ekstrak buah legundi konsentrasi 25% terhadap konsentrasi 50%, 75%, 100% didapatkan nilai  $<0,05$  yang berarti signifikan atau terdapat perbedaan.

Tabel 4.18 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat pada konsentrasi 50% dengan konsentrasi 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif

	Kelompok	n	P	Keterangan
	Ekstrak Buah Legundi 75%	3	0,000	Signifikan
	Ekstrak Buah Legundi	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah	100%			
Legundi 50%	Kontrol positif (Streptomisin)	3	0,000	Signifikan
	Kontrol negatif (Aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.18, menunjukkan diameter zona hambat pada uji beda ekstrak buah legundi konsentrasi 50% terhadap konsentrasi 75%, 100%, dan kelompok kontrol adalah  $<0,05$  yang berarti terdapat perbedaan antar konsentrasi.



Tabel 4.19 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat pada konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif

Kelompok	N	P	Keterangan
Ekstrak Buah	3	0,007	Signifikan
Legundi 100%	3	0,000	Signifikan
Ekstrak Buah			
Legundi 75%			
Kontrol positif (Streptomisin)			
Kontrol negatif (Aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.19, menunjukkan diameter zona hambat pada uji beda ekstrak buah legundi konsentrasi 75% terhadap konsentrasi 100% dan kelompok kontrol  $<0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar konsentrasi.

Tabel 4.20 Hasil uji *Post Hoc* diameter zona hambat pada konsentrasi 100% dengan kontrol positif, dan kontrol negatif

Kelompok	n	P	Keterangan
Kontrol positif (Streptomisin)	3	0,001	Signifikan
Ekstrak Buah Legundi 100%			
Kontrol negatif (aquabidest)	3	0,000	Signifikan

Pada hasil uji *post hoc* tabel 4.20, menunjukkan diameter zona hambat pada uji beda ekstrak buah legundi konsentrasi konsentrasi 100% dengan kontrol positif  $<0,05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

## 4.2. Pembahasan

Penentuan standar ekstrak memiliki parameter tertentu untuk mencapai tingkat kualitas standar meliputi identitas, organoleptik, senyawa kimia yang larut dalam air dan etanol, serta kandungan kimia. Metode ekstraksi yang paling sering digunakan adalah metode maserasi dikarenakan dapat mengekstrak bahan yang

bersifat termolabil (tanpa pemanasan). Selain itu, maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana karena dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif.<sup>76</sup> Zat aktif akan larut dan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dengan di luar sel menyebabkan larutan yang terpekat keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dengan di luar sel.<sup>78</sup>

Berdasarkan gambar 4.12, penilaian zona hambat bakteri dengan melakukan perhitungan diameter zona jernih pada disk kontrol yang disediakan. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak buah legundi (*Vitex trifolia* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, terpenoid, alkaloid, tannin, dan saponin. Hal ini sesuai dengan hasil uji skrining fitokimia yang termuat didalam tabel 4.2.

Pada gambar 4.1 diperoleh hasil *FTIR* menunjukkan adanya serapan yang khas dan juga gugus-gugus pada beberapa bilangan gelombang. Serapan disebabkan oleh adanya regangan ikatan ganda gugus karbonil C=O dari amida sekunder. Dari kata *stretching* menandakan regangan dalam ikatan sehingga terjadi perubahan jarak dan akan bergerak terus menerus seiring dengan suhu tinggi. Pada bilangan gelombang 2964,75 cm<sup>-1</sup>, 2923,72 cm<sup>-1</sup> dan 2854,48 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya ikatan C – H tekuk yang merupakan ciri khas senyawa triterpenoid. Gugus C=O menunjukkan asam karboksilat atau fenol suatu flavonoid. Gugus C-O menunjukkan senyawa saponin dan gugus O-H menunjukkan senyawa tanin.<sup>79</sup>

Pada gambar 4.2, hasil *GC-MS* yang didapatkan adanya senyawa *Labdane-type diterpene* dalam bentuk 1,1,4a-Trimethyl-5-6-dimethylenedecahydronaphthalene sesuai dengan penelitian Indrayudha P, Cahyani (2020) bahwa tanaman legundi (*Vitex trifolia* L.) diketahui menghasilkan berbagai diterpenoid.<sup>80</sup> sehingga membuktikan bahwa kandungan terpenoid memang benar terdapat didalam buah Legundi. Senyawa senyawa *Labdane-type diterpene* dalam bentuk 1,1,4a-Trimethyl-5-6- dimethylenedecahydronaphthalene pada web server PubChem dengan PubChem Compound CID: 609227.

Pada analisis *in silico* didapatkan *binding affinity* yang paling negatif adalah pada *Doxorubicin* dibandingkan dengan *Labdane-type diterpene*. *Binding affinity* menunjukkan kemampuan obat/senyawa untuk berikatan dengan reseptor. Semakin

negatif *binding affinity* maka akan semakin tinggi afinitas antara ligan dan reseptor. Sedangkan jumlah ikatan hidrogen pada labdane-type diterpene lebih banyak ditemukan dibandingkan *Doxorubicin*.

Pada tabel 4.5 menunjukkan hasil farmakokinetik senyawa *Labdane-type diterpene*, menunjukkan hasil penyerapan pada gastrointestinal yang tinggi sesuai dengan kriteria obat oral berdasarkan food and drug administration (FDA) serta hanya melanggar paling banyak 3 aturan dari lipinski's rule of five.<sup>81</sup> FDA menyetujui 35 senyawa entitas molekul baru (EMB) dan 15 lisensi biologis baru (LBB) tahun 2021, dari jumlah obat tersebut seluruhnya hanya melanggar 1-3 lipinski's rule of five, sehingga FDA juga mengacu pada aturan *Lipinski's rule of five*.<sup>81,82</sup>

*Labdane-type diterpene* juga tidak menghambat kinerja dari enzim CYP 450 sehingga tubuh masih dapat terhindar dari suatu zat yang bersifat toksik dan mematikan organisme, sebagaimana yang disajikan pada tabel 4.5. Penelitian Manikandan & Nagini, 2018 menyebutkan bahwa CYP 450 bekerja di hati dan usus halus untuk melindungi tubuh dari racun, sehingga apabila enzim ini dihambat akan berbahaya bagi tubuh.<sup>50</sup> Senyawa labdane-type diterpene dapat berikatan pada tubuh sehingga berpengaruh terhadap bioavailabilitas obat yaitu proses farmakokinetik obat.<sup>51</sup>

Evaluasi kemiripan obat berdasarkan *Lipinski's rule five*, suatu senyawa dikatakan mirip obat apabila berat molekul (*Molecular Weight*) kurang dari 500 Dalton, nilai koefisien partisi log P (*Lipophilicity*) kurang dari 5, molar refractivity diantara 40-130, jumlah donor ikatan hidrogen (*hydrogen bond donor*) kurang dari 5, dan jumlah ikatan hidrogen yang diterima (*hydrogen bond acceptor*) kurang dari 10.<sup>68</sup>

*Labdane-type diterpene* memiliki ikatan hidrogen donor berjumlah 3, menerima 3 ikatan hidrogen, berat molekul 204,35 g/mol, molar refractivity 95,21, dan log P <5. Berdasarkan lipinski's rule of five, hal tersebut telah memenuhi kriteria dengan kemiripan suatu obat. Berdasarkan penelitian Nusantoro YR, Fadlan A (2020) tersebut maka *Labdane-type diterpene* baik untuk menjadi kandidat obat karena telah memenuhi seluruh aturan lipinski's (*Lipinski's rule of five*).<sup>68</sup>

Uji toksisitas obat menurut *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemical* (2021) berdasarkan LD<sub>50</sub> diklasifikasikan menjadi 6 kelas. Kelas I (LD<sub>50</sub> ≤ 5) dan Kelas II (5 < LD<sub>50</sub> ≤ 50) tergolong fatal apabila tertelan, Kelas III (50 < LD<sub>50</sub> ≤ 300) tergolong toksik apabila tertelan. Kelas IV (300 < LD<sub>50</sub> ≤ 2000) tergolong berbahaya jika tertelan. Kelas V (2000 < LD<sub>50</sub> ≤ 5000) mungkin dapat berbahaya apabila tertelan. Kelas VI (LD<sub>50</sub> > 5000) merupakan kelas yang paling ringan yang bersifat tidak toksik.<sup>83</sup> Hasil penelitian ligan *Labdane-type diterpene* tergolong kedalam kelas 5 yaitu mungkin dapat berbahaya apabila tertelan.

Pada hasil analisis *in vitro* yang telah dilakukan membuktikan bahwa semakin besar konsentrasi yang digunakan maka akan semakin tinggi daya hambat pada bakteri dan semakin tinggi pula kemampuan ekstrak buah Legundi dalam membunuh dan menghentikan progresivitas pertumbuhan bakteri, hal ini sesuai dengan penelitian Fatmawati D et al, (2020) yang membuktikan ekstrak etanol buah Legundi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% menunjukkan semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka zona hambat yang dihasilkan juga semakin besar.<sup>84</sup> Hal ini terbukti pada hasil penelitian *in vitro* pada metode dilusi dan metode difusi dalam penelitian ini.

Pada metode dilusi menunjukkan bahwa pada konsentrasi 10% dan 20% masih ditemukan adanya kekeruhan dan pertumbuhan bakteri, sehingga pada konsentrasi tersebut bakteri *Lactobacillus gasseri* masih dapat tumbuh, sedangkan pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% sudah tidak ditemukan kekeruhan. Begitu pula dengan metode difusi, semakin besar konsentrasi maka semakin panjang pula diameter zona hambatnya.

Penelitian Indriatie & Masruri 2023, membuktikan penelitian *in vitro* dengan metode difusi, menunjukkan bahwa legundi mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan baik. Hal ini sejalan dengan penelitian *in vitro* metode difusi yang termuat pada tabel 4.12 bahwa ekstrak etanol 96% buah Legundi mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang berbeda yaitu *Lactobacillus gasseri* dengan kategori kuat hingga sangat kuat.<sup>14</sup>

Berdasarkan tabel 4.12, ukuran diameter didapatkan karena berbagai

mekanisme kerja dari senyawa yang terkandung didalam buah Legundi. Senyawa flavonoid dapat digunakan sebagai antibakteri yang bekerja sama dengan protein ekstra seluler sehingga membentuk senyawa kompleks yang dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein pada sel-sel bakteri dan merusak membrane sel pada bakteri.<sup>84</sup> Terpenoid juga dapat menjadi antibakteri karena mekanisme kerja yang menyerupai senyawa flavonoid, yaitu dengan merusak membran sel pada bakteri. Senyawa alkaloid dapat bekerja dengan mengganggu komponen penyusun dinding sel peptidoglikan pada bakteri dan merubah susunan asam amino pada bakteri.<sup>85</sup>

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data tentang pengaruh progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* pada kejadian kanker serviks setelah pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada analisis *in silico* ditemukan interaksi simulasi molekuler yang baik antara protein bakteri *Lactobacillus gasseri* yaitu *Levansucrase* dengan ligan *Labdane-type diterpene* dan *doxorubicin*, dinilai berdasarkan *binding affinity*, jumlah ikatan hydrogen.
2. Sifat fisikokimia pada *Labdane-type diterpene* memiliki sifat kemiripan dengan obat yang dinilai dengan parameter *lipinski's rule of five* (berat molekul, jumlah ikatan hidrogen yang diterima, jumlah ikatan hidrogen donor, dan Log P<sub>o/w</sub>) tidak terdapat pelanggaran aturan sehingga baik apabila digunakan sebagai kandidat obat.
3. Berdasarkan nilai Log P<sub>o/w</sub> nilai *Labdane-type diterpene* tergolong kedalam golongan lipofilik.
4. Berdasarkan kelarutan air Log S, *Labdane-type diterpene* dapat bersifat soluble/hidrofilik.
5. Berdasarkan farmakokinetik ADME, kandungan *Labdane-type diterpene* buah Legundi baik dijadikan sediaan obat oral dikarenakan hasil penyerapan gastrointestinal yang tinggi.
6. *Labdane-type diterpene* buah Legundi bersifat tidak toksik dan tidak melibatkan kerusakan organ dengan toksisitas kelas 5 dan LD<sub>50</sub> sebesar 5000 mg/KgBB.
7. Terdapat Pengaruh pemberian ekstrak etanol 96% buah Legundi dengan konsentrasi bertingkat yaitu konsentrasi 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, dan 100% terhadap progresivitas pertumbuhan bakteri *Lactobacillus gasseri* pada kejadian kanker serviks.

## 5.2. Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji penelitian *in silico* dengan senyawa buah Legundi dan protein target lainnya untuk menganalisis interaksi antara protein dan ligan dengan lebih bervariasi sehingga data yang didapatkan lebih kompleks. Selanjutnya dapat dilakukan pula uji *In vivo* pada hewan coba untuk membuktikan efektivitas ekstrak buah legundi yang tertuju langsung pada organ yang terlibat yaitu serviks. Kepada peneliti selanjutnya dapat memanfaatkan penelitian ini sebagai sumber informasi dan referensi terkait pengobatan herbal tanpa efek samping khususnya buah Legundi dalam menurunkan progresivitas pertumbuhan bakteri yang menjadi biomarker mikrobiom servikovaginal *Lactobacillus gasseri* dan merupakan salah satu penyebab kanker serviks.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Agustiansyah P, Rizal Sanif, Siti Nurmaini, Irfannuddin, Legiran. Epidemiology and Risk Factors for Cervical Cancer. *Biosci Med J Biomed Transl Res*. 2021;5(3):626-633. doi:10.32539/bsm.v5i3.326
2. Chen YF, Shen MR. The important role of ion transport system in cervical cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1). doi:10.3390/ijms23010333
3. Hasugian SA, Lubis K, Doan H V. JBIO : Jurnal Biosains ( The Journal Of Biosciences ) Profile Of Histopathology Of Cervical Cancer Tissues In Patients Of The Dr. 2020;6(3):90-97.
4. Volkova L V., Pashov AI, Omelchuk NN. Cervical carcinoma: Oncobiology and biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):1-22. doi:10.3390/ijms222212571
5. Gilham C, Sargent A, Kitchener HC, Peto J. HPV testing compared with routine cytology in cervical screening: Long-term follow-up of ARTISTIC RCT. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2019;23(28):1-43. doi:10.3310/hta23280
6. Kovachev SM. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. *Arch Microbiol*. 2020;202(2):323-327. doi:10.1007/s00203-019-01747-4
7. Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, Zhang C, Han S. Role of Lactobacillus in cervical cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:1219-1229. doi:10.2147/CMAR.S165228
8. Zhou ZW, Long HZ, Cheng Y, Luo HY, Wen DD, Gao LC. From Microbiome to Inflammation: The Key Drivers of Cervical Cancer. *Front Microbiol*. 2021;12(November):1-15. doi:10.3389/fmicb.2021.767931
9. Lau HW, Ma HT, Yeung TK, et al. Quantitative differences between cyclin-dependent kinases underlie the unique functions of CDK1 in human cells. *Cell Rep*. 2021;37(2):109808. doi:10.1016/j.celrep.2021.109808
10. Lubis HML. Kajian Molekuler p53 Pemanfaatan Tanaman Herbal Buah Legundi ( *Vitex trifolia* L ) terhadap Massa Tumor Jaringan Kulit Molecular Study of p53 , Utilization of Legundi Fruit Herbs ( *Vitex trifolia* L ) in Skin Tissue Tumor Mass. *Bul FARMATERA J Kedokt Univ Muhammadiyah Sumatera Utara*. 2018;3(1):41-48.
11. Aye MM, Aung HT, Sein MM, Armijos C. A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected myanmar medicinal plants. *Molecules*. 2019;24(2). doi:10.3390/molecules24020293
12. Dwiyantri A, Mulyani S, Yulhan OA, Lubis HML, Roslina A. Effects of AntiMycobacterium Tuberculosis Nanoherbal Legundi Leaf Extract (*Vitex trifolia*). *Mutiara Med J Kedokt dan Kesehat*. 2021;21(1):45-50. doi:10.18196/mmjkk.v21i1.6497
13. Lubis, Humairah Medina Liza; Hariaji I. Ekstrak Buah Legundi (*Vitex trifolia*) Mampu Menghambat Pembelahan dan Pertumbuhan Sel Tumor Kulit Tikus. *Mutiara Med J Kedokt dan Kesehat*. 2017;17(Vol 17 No 1: January 2017):1-6. <http://journal.umy.ac.id/index.php/mm/article/view/3676>



14. Indriatie R, Masruri M. Antibacterial Activity of Legundi Leaf ( *Vitex trifolia* ) Essential Oil Using in-vitro and in-silico Methods. *J Pure App Chem Res.* 2023;12(April):26-37. doi:10.21776/ub.jpacr.2023.012.001.738
15. Medina H, Lubis L, Purwoningsih E. Anti-Cervical Cancer Study of a Labdane-type Diterpene Obtained from Legundi Fruit ( *Vitex trifolia* L .) Targeting the Bcl-2 Gene. *Bul FARMATERA J Kedokt Univ Muhammadiyah Sumatera Utara.* 2022;7(3):41-49.
16. Pinto C, Cidade H, Pinto M, Tiritan ME. Chiral flavonoids as antitumor agents. *Pharmaceuticals.* 2021;14(12). doi:10.3390/ph14121267
17. Marpaung JK, Sitorus P, Nasution P, Yanti RD. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Legundi (*Vitex trifolia* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*. *J Farmanesia.* 2020;7(2):9-14. doi:10.51544/jf.v7i2.2770
18. Elad D, Jaffa AJ, Grisaru D. Biomechanics of early life in the female reproductive tract. *Physiology.* 2020;35(2):134-143. doi:10.1152/physiol.00028.2019
19. Schunke, Michael and Schulte, Erik and Schumacher U. Prometheus Atlas Anatomi Manusia Organ Dalam. *EGC, Jakarta.* Published online 2016.
20. Prendiville W, Sankaranarayanan R. *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer.*; 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568392/>
21. L. T. The Uterus. *Teach Me Anat.* Published online 2019. <https://teachmeanatomy.info/pelvis/female-reproductive-tract/uterus/>.
22. Brelje TC SR. Histology Guide. *Dep Genet Cell Biol Dev.* Published online 2021.
23. Kyle Devins, M.D., Lauren Schwartz MD. Histology. *Pathol website.* Published online 2023. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixnormalhistology.html>
24. Almeida, A. M., Queiroz, J. A., Sousa, F., & Sousa Â. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. *Drug Discov Today.* 2019;24(10)(2044–2057). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.07.011%0D>
25. Evriarti PR, Yasmon A. Patogenesis Human Papillomavirus (HPV) pada Kanker Serviks. *J Biotek Medisiana Indones.* 2019;8(1):23-32. doi:10.22435/jbmi.v8i1.2580
26. (IARC). IA for R on C. Cervix uteri factsheet. Published online 2020. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&populatio](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&populatio)
27. World Health Organisation. Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer as a Public Health Problem and Its Associated Goals and Targets for the Period 2020 – 2030. 2020;2.
28. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021;149(4):778-789. doi:10.1002/ijc.33588
29. Liu Z. Prognostic Role of Squamous Cell Carcinoma Antigen in Cervical Cancer : A Meta-analysis. *Dis Markers.* 2019;2019.
30. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk

- factors and screening. *Chinese J Cancer Res.* 2020;32(6):720-728. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05
31. Jary A, Teguate I, Sidibé Y, et al. Prevalence of cervical HPV infection, sexually transmitted infections and associated antimicrobial resistance in women attending cervical cancer screening in Mali. *Int J Infect Dis.* 2021;108:610-616. doi:10.1016/j.ijid.2021.06.024
  32. Agustiansyah P, Rizal Sanif, Siti Nurmaini, Irfannuddin, Legiran. Epidemiology and Risk Factors for Cervical Cancer. *Biosci Med J Biomed Transl Res.* 2021;5(7):624-631. doi:10.32539/bsm.v5i7.326
  33. Shiraz A, Majmudar T. Colposcopy and cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynaecol Reprod Med.* 2017;27(6):177-183. doi:10.1016/j.ogrm.2017.04.002
  34. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(2):69-83. doi:10.3322/canjclin.56.2.69
  35. Liu Y, Li L, Li Y, Zhao X. Research Progress on Tumor-Associated Macrophages and Inflammation in Cervical Cancer. *Biomed Res Int.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/6842963
  36. Islam S, Rahi S, Jahangir CA, et al. In Vivo Anticancer Activity of Basella alba Leaf and Seed Extracts against Ehrlich's Ascites Carcinoma ( EAC ) Cell Line. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2018;2018:11.
  37. Tong RUI, Yang Q, Wang C, Bi F, Jiang B. OVCA1 expression and its correlation with the expression levels of cyclin D1 and p16 in cervical cancer and intraepithelial neoplasia. *Oncol Lett.* 2017;13(5):2929-2936. doi:10.3892/ol.2017.5848
  38. Jones MC, Askari JA, Humphries JD, Humphries MJ. Cell adhesion is regulated by CDK1 during the cell cycle. *J Cell Biol.* 2018;217(9):3203-3218. doi:10.1083/jcb.201802088
  39. Deng YR, Chen XJ, Chen W, et al. Sp1 contributes to radioresistance of cervical cancer through targeting g2/m cell cycle checkpoint CDK1. *Cancer Manag Res.* 2019;11:5835-5844. doi:10.2147/CMAR.S200907
  40. García-Reyes B, Kretz AL, Ruff JP, et al. The emerging role of cyclin-dependent kinases (CDKs) in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):9-11. doi:10.3390/ijms19103219
  41. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 2020;40(5):602-608. doi:10.1080/01443615.2019.1634030
  42. Soheili M, Keyvani H, Soheili M, Nasser S. Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. *Med J Islam Repub Iran.* 2021;35(1):1-16. doi:10.34171/mjiri.35.65
  43. Curty G, de Carvalho PS, Soares MA. The role of the cervicovaginal microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1). doi:10.3390/ijms21010222
  44. Martin DH, Ferris MJ. *Endogenous Microbiota of the Genitourinary Tract.* Vol 1-2. Fourth Edi. Elsevier; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-415847-

- 4.00007-0
45. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(4):2782-2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107
  46. Sun Z, Wang X, Zhang X, et al. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018;45(3):213-227. doi:10.1007/s10295-018-2008-6
  47. Surachat K, Sangket U, Deachamag P, Chotigeat W. In silico analysis of protein toxin and bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* SD1 genome and available online databases. *PLoS One*. 2017;12(8). doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183548
  48. Phengnoi P, Thakham N, Rachphirom T, Teerakulkittipong N, Lirio GA, Jangiam W. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon*. 2022;8(12):e12137. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e12137
  49. Zhao M, Ma J, Li M, et al. Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):1-16. doi:10.3390/ijms222312808
  50. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2018;19(1):38-54. doi:10.2174/1389450118666170125144557
  51. Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 2022;8(6):e09777. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09777
  52. Ku, E., Bogman, K., Peyer, A. and To M. Pengaruh P-Glycoprotein (P-GP) Terhadap Bioavailabilitas Atorvastatin. *HMG-CoA reductase Inhib P-glycoprotein Modul pp 1183–1192*. 2001;16:1183-1192.
  53. Khairul U, Vemithasa C. Potensi *Vitex trifolia* (Verbenaceae) sebagai insektisida botani untuk mengendalikan hama *Crocidolomia pavonana* (Lepidoptera: Crambidae). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 2018;4(Heyne 1987):169-172. doi:10.13057/psnmbi/m040212
  54. Gong G, Shen YL, Lan HY, et al. The Cyr61 Is a Potential Target for Rotundifuran, a Natural Labdane-Type Diterpene from *Vitex trifolia* L., to Trigger Apoptosis of Cervical Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/6677687
  55. Suchitra M, Cheriyan BV. *Vitex trifolia*: An ethnobotanical and pharmacological review. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(Special Issue 4):12-14. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11s4.31689
  56. Ban NK, Thoa NTK, Linh TM, et al. Chemical constituents of *vitex trifolia* leaves. *Nat Prod Commun*. 2018;13(2):129-130. doi:10.1177/1934578x1801300205
  57. Manse Y, Ninomiya K, Nishi R, et al. Labdane-type diterpenes, galangalditerpenes A-C, with melanogenesis inhibitory activity from the

- fruit of *Alpinia galanga*. *Molecules*. 2017;22(12):1-11. doi:10.3390/molecules22122279
58. Papaefthimiou D, Diretto G, Demurtas OC, et al. Heterologous production of labdane-type diterpenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*. 2019;167(November 2018):112082. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112082
  59. Alshatwi AA, Periasamy VS, Athinarayanan J, Elango R. Synergistic anticancer activity of dietary tea polyphenols and bleomycin hydrochloride in human cervical cancer cell: Caspase-dependent and independent apoptotic pathways. *Chem Biol Interact*. 2016;247:1-10. doi:10.1016/j.cbi.2016.01.012
  60. Sitkovskaya AO, Kit OI, Filippova SY, et al. Synergistic cytostatic effect of bleomycin with cisplatin on HeLa cells. *J Clin Oncol*. 2022;40(16\_suppl):e15002-e15002. doi:10.1200/jco.2022.40.16\_suppl.e15002
  61. Taymaz-nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Sci Rep*. 2018;(March):1-14. doi:10.1038/s41598-018-31939-9
  62. Mujwar S, Kołat D, Kciuk M, Giełeci A, Kałuzi Z. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*. 2023;(4):26-32.
  63. Anggita D, Nuraisyah S, Wiriansya EP. Mekanisme Kerja Antibiotik. *UMI Med J*. 2022;7(1):46-58.
  64. Fitriana YAN, Fatimah VAN, Fitri AS. Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *Sainteks*. 2020;16(2):101-108. doi:10.30595/st.v16i2.7126
  65. Albab LU, Husin UA, Azhali BA, Respati T, Astuti RDI. Efek Antibakteri Ekstrak Aquades Buah Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) Varietas Ajwa terhadap *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *J Integr Kesehatan Sains*. 2020;2(2):135-139. doi:10.29313/jiks.v2i2.5769
  66. Kesuma D, Siswandono S, Purwanto BT, Hardjono S. Uji in silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan N-(Benzoil)-N'-feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *JPSCR J Pharm Sci Clin Res*. 2018;3(1):1. doi:10.20961/jpscr.v3i1.16266
  67. Rim KT. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. *Toxicol Environ Health Sci*. 2020;12(3):191-202. doi:10.1007/s13530-020-00056-4
  68. Nusantoro YR, Fadlan A. Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoilhidrazon dan kompleks logam transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kim Indones*. 2020;5(2):114. doi:10.12962/j25493736.v5i2.7881
  69. Yulianti W, Ayuningtyas G, Martini R, Resmeiliana I. Pengaruh Metode Ekstraksi Dan Polaritas Pelarut Terhadap Kadar Fenolik Total Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.). *J Sains Terap*. 2021;10(2):41-49. doi:10.29244/jstsv.10.2.41-49
  70. Badaring DR, Sari SPM, Nurhabiba S, Wulan W, Lembang SAR. Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri

- Escherichia coli dan Staphylococcus aureus. *Indones J Fundam Sci.* 2020;6(1):16. doi:10.26858/ijfs.v6i1.13941
71. Ningsih AW, Nurrosyidah IH, Hisbiyah A. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Rendemen dan Skrining Fitokimia. *J Pharm Anwar Med.* 2018;2(2):49-57. doi:10.36932/jpcam.v2i2.27
  72. Bayu A, Nandiyanto D, Oktiani R, Ragadhita R. Indonesian Journal of Science & Technology How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indones J Sci Technol.* 2019;4(1):97-118.
  73. Hotmian E, Suoth E, Fatimawali F, Tallei T. Analisis Gc-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) Ekstrak Metanol Dari Umbi Rumpuk Teki (*Cyperus rotundus L.*). *Pharmacon.* 2021;10(2):849. doi:10.35799/pha.10.2021.34034
  74. Annisah R, Batubara DE, Roslina A, Yenita. Uji Efektivitas Ekstrak Kencur (*Kaempferia Galanga L.*) Terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans* Secara In Vitro. *Ibnu Sina Biomedika.* 2018;2(1).
  75. Stanzione F, Giangreco I, Cole JC. *Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery.* Vol 60. 1st ed. Elsevier B.V.; 2021. doi:10.1016/bs.pmch.2021.01.004
  76. Crampon K, Giorkallos A, Deldossi M, Baud S, Steffanel LA. Machine-learning methods for ligand – protein molecular docking. Published online 2021.
  77. Yogi Y, Galib M. Invigorasi Benih Kedelai (*Glycine Max L Merrill*) Dengan Menggunakan Berbagai Dosis Dan Waktu Perendaman Hormon Giberelin. *AGrotekMAS J Indones J Ilmu ....* 2023;4(1):119-125. <https://jurnal.fp.umi.ac.id/index.php/agrotekmas/article/view/319>
  78. Rahmi N, Salim R, Miyono M, Rizki MI. Pengaruh Jenis Pelarut Dan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antibakteri Dan Penghambatan Radikal Bebas Ekstrak Kulit Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*). *J Penelit Has Hutan.* 2021;39(1):13-26. doi:10.20886/jphh.2021.39.1.13-26
  79. Radiena MSY. Identifikasi Senyawa Aktif Triterpenoid Dari Ekstrak Alga Laut Hijau Silpau (*Dictyosphaeria Versluisii*) Dengan Spektrofotometer Ftir Identification Of Triterpenoid Active Compounds From Algae Green. *EjournalKemenperinGold/Bpbiam.* 2019;15 (01)(ISSN: 2548-4842):33-40.
  80. Indrayudha P, Cahyani IG. Cytotoxic Activity of Ethanol Extract Legundi Leaf (*Vitex trifolia L.*) and N-Hexan, Ethyl Acetate and Ethanol-Water Fraction against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Syst Rev Pharm.* 2020;11(11):779-785.
  81. Arief I. Profil ADME dari Entitas Molekul Baru yang Disetujui oleh FDA Tahun 2021: Suatu Kajian In Silico. *JambJChem.* 2022;4(2):1-11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
  82. Brown DG, Wobst HJ. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010-2019): Trends and Future Directions. *J Med Chem.* 2021;64(5):2312-2338. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01516
  83. Supandi, Yeni, Merdekawati F. In silico study of pyrazolylaminoquinazoline toxicity by Lazar, ProTox, and ADMET predictor. *J Appl Pharm Sci.*

- 2018;8(9):119-129. doi:10.7324/JAPS.2018.8918
84. Fatmawati D, Mahmudati N, Wahyuni S, Rahardjanto A, Fatmawati D. Ekstrak buah legundi (*Vitex trifolia* Linn.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Pros Semin Nas V*. Published online 2020.
  85. Wulansari ED, Lestari D, Khoirunissa MA. Kandungan Terpenoid Dalam Daun Ara (*Ficus Carica* L.) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon*. 2020;9(2):219. doi:10.35799/pha.9.2020.29274

**LAMPIRAN**  
**Lampiran 1. Surat Komisi Etik Penelitian**



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
 HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE  
 FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA  
 FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
 DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL  
 "ETHICAL APPROVAL"  
 No : 1052/KEPK/FKUMSU/2023

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :  
 The Research protocol proposed by

Peneliti Utama : Assyifa Cindykia  
 Principal in investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara  
 Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah Sumatera Utara

Dengan Judul  
 Title

**"PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 96% BUAH LEGUNDI (*Vitex trifolia L.*) TERHADAP PROGRESIVITAS PERTUMBUHAN LACTOBACILLUS GASSERI SEBAGAI BIOMARKER MIKROBIOM SERVIKOVAGINAL"**

**"THE EFFECT OF 96% ETHANOL EXTRACT OF LEGUNDI FRUIT (*Vitex trifolia L.*) ON THE GROWTH PROGRESSIVITY OF LACTOBACILLUS GASSERI AS A BIOMARKER OF THE CERVICOVAGINAL MICROBIOME"**

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah  
 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan  
 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 05 September 2023 sampai dengan tanggal 05 September 2024  
 The declaration of ethics applies during the periode September 05, 2023 until September 05, 2024




Medan, 05 September 2023

Ketua

Dr. dr. Nuradly, MKT

## Lampiran 2. Surat Identifikasi Tanaman



**HERBARIUM MEDANENSE**  
**(MEDA)**  
**UNIVERSITAS SUMATERA UTARA**  
JL. Bioteknologi No.1 Kampus USU, Medan – 20155  
Telp. 061 – 8223564 Fax. 061 – 8214290 E-mail. [nursaharapasaribu@yahoo.com](mailto:nursaharapasaribu@yahoo.com)

---

Medan, 13 Juni 2022


No. : 900/MEDA/2020  
Lamp. : -  
Hal : Hasil Identifikasi

Kepada YTH,  
Ketua : Muhammad Zikri Agung Ramadhan  
NIM : 2008260143  
Anggota : Leonardo Rovi  
NIM : 2008260107  
Anggota : Assyifa Cindykia  
NIM : 2008260125  
Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Dengan hormat,  
Bersama ini disampaikan hasil identifikasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke Herbarium Medanense, Universitas Sumatera Utara, sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Dicotyledoneae  
Ordo : Lamiales  
Famili : Lamiaceae  
Genus : Vitex  
Spesies : *Vitex trifolia* L.  
Nama Lokal: Buah Legundi

Demikian, semoga berguna bagi saudara.



Kepala Herbarium Medanense.  
Dr. Nursahara Pasaribu, M.Sc  
NIP. 196301231990032001



### Lampiran 3. Surat izin Laboratorium Mega Global Safety Indonesia



Binjai, 29 Juli 2022

No : 104 A/003/VII/Penelitian/2022  
 Lamp : -  
 Perihal : Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian

Kepada Yth  
 Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara  
 Di  
 Tempat

Sesuai dengan tuntutan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Fakultas Kedokteran bahwa mahasiswa sebagai berikut :

No	NPM	Nama	Jabatan
1	2008260143	Muhammad Zikri Agung Ramadhan	Ketua
2	2008260107	Leonardo Rovi	Anggota
3	2008260125	Assyifa Cindykia	Anggota

Judul Penelitian : **Peran Buah Legundi (Vitex Trifolia L.) Sebagai Anti Kanker Serviks Dalam Menghambat Proliferasi dan Pengaktifan Gen Cyclin D-1**

Benar telah selesai melakukan penelitian di PT. Multi Global Safety pada Juni – Juli 2022. Demikianlah surat keterangan ini kami sampaikan untuk dipergunakan sebagaimana mestinya

PT. MULTI GLOBAL SAFETY INDONESIA

Freddy Tulus Tampubolon  
 Direktur

Jl. Raya Medan Binjai km 12 Mulio Rejo Medan Sunggal Deli Serdang Sumatera Utara ,  
 email : mg.safetyindonesia@gmail.com website : mg.safetyindonesia.com

## Lampiran 4. Surat Izin Penggunaan Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UMSU



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI PENELITIAN & PENGEMBANGAN PIMPINAN PUSAT MUHAMMADIYAH

### UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

## FAKULTAS KEDOKTERAN

UMSU Terakreditasi Unggul Berdasarkan Keputusan Badan Akreditasi Nasional Perguruan Tinggi No. 1913/SK/BAN-PT/Ak.KP/PT/XI/2022  
 Jl. Gedung Arca No. 53 Medan, 20217 Telp. (061) - 7350163, 7333162, Fax. (061) - 7363488  
<https://fk.umsu.ac.id> [fk@umsu.ac.id](mailto:fk@umsu.ac.id) [umsumedan](#) [umsumedan](#) [umsumedan](#) [umsumedan](#)

Nomor : 1436/IL.3.AU/UMSU-08/F/2023  
 Lampiran : -  
 Perihal : **Peminjaman Tempat Penelitian**

Medan, 24 Rabiul Awal 1445 H  
 09 Oktober 2023 M

Kepada Yth.  
 1. **Kepala Bagian Biokimia**  
 2. **Kepala Bagian Mikrobiologi**  
**Fakultas Kedokteran UMSU**  
 di-  
 Tempat

*Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh*

Sehubungan dengan surat permohonan peminjaman tempat untuk melakukan penelitian pada Laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, yaitu:

Nama : **Assyifa Cindykia**  
 NPM : **2008260125**  
 Judul Penelitian : **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Buah Legundi (*Vitex trifolia* L.) terhadap Progresivitas Pertumbuhan *Lactobacillus gasseri* sebagai Biomarker Mikrobiom Servikovagina**

maka kami memberikan izin kepada yang bersangkutan, untuk melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Selama proses pemakaian laboratorium, jika terdapat pemakaian alat yang rusak maka akan menjadi tanggungjawab peneliti dan pemakaian Bahan Habis Pakai (BHP) ditanggung oleh peneliti. Peneliti wajib mengikuti peraturan yang berlaku di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian kami ucapkan terima kasih.

*Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh*



Dekah,  
  
**dr. Siti Masluma Siregar, Sp.THT-KL(K)**  
 NIDN: 0106098201

Tembusan Yth :  
 1. *Ad hoc* KTI Mahasiswa FK UMSU  
 2. Pertinggal



### Lampiran 5. Hasil GC-MS pada ekstrak buah Legundi

**Compound Table**

Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	Hits (DB)	Score (Lib)	Library
Cpd 1: 3.161	3.161				0		
Cpd 2: Phenol, 2-methoxy-; C7H8O2; 4.011	4.011		Phenol, 2-methoxy-	C7H8O2	13	78.01	W10N14.L
Cpd 3: 4.269	4.269				0		
Cpd 4: 1,2-Benzenediol; C6H6O2; 4.897	4.897		1,2-Benzenediol	C6H6O2	13	74.24	W10N14.L
Cpd 5: 2-Oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol 1,3,3-trimethyl-; C10H18O2; 5.156	5.156		2-Oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimethyl-	C10H18O2	13	92.1	NIST14.L
Cpd 6: Geraniol; C10H18O; 5.341	5.341		Geraniol	C10H18O	13	87.41	NIST14.L
Cpd 7: 5.525	5.525				0		
Cpd 8: p-Mentha-1,5-dien-8-ol C10H16O; 5.710	5.710		p-Mentha-1,5-dien-8-ol	C10H16O	6	73.21	NIST14.L
Cpd 9: 2-Methoxy-4-vinylphenol C9H10O2; 5.956	5.956		2-Methoxy-4-vinylphenol	C9H10O2	13	86.72	W10N14.L
Cpd 10: trans-4-Hydroxycyclohexanecarboxylic acid C7H12O3; 6.075	6.075		trans-4-Hydroxycyclohexanecarboxylic acid	C7H12O3	9	86	W10N14.L
Cpd 11: 1,2-Cyclohexanediol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-; C10H18O2; 6.190	6.190		1,2-Cyclohexanediol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	C10H18O2	13	86.46	W10N14.L

Cpd 12: Pyridine, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)-; C10H14N2; 6.26	6.26		Pyridine, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)-	C10H14N2	13	72.02	NIST14.L
Cpd 13: 3,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-; C10H18O; 6.578	6.578		3,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	C10H18O	13	86.64	W10N14.L
Cpd 14: Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-; C8H8O3; 6.708	6.708		Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	C8H8O3	13	83.7	W10N14.L
Cpd 15: 6-Methyl-6-nitroheptan-2-one; C8H15NO3; 6.800	6.8		6-Methyl-6-nitroheptan-2-one	C8H15NO3	4	70.84	NIST14.L
Cpd 16: 1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane-6,7-endo,endo-diol; C10H18O3; 6.911	6.911		1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane-6,7-endo,endo-diol	C10H18O3	6	90.1	NIST14.L
Cpd 17: 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha, alpha, 4-trimethyl-; C10H18O; 7.040	7.04		3-Cyclohexene-1-methanol, alpha, alpha, 4-trimethyl-	C10H18O	13	80.64	W10N14.L
Cpd 18: 4-Pentenoic acid, 2-methyl-, pentyl ester; C11H20O2; 7.169	7.169		4-Pentenoic acid, 2-methyl-, pentyl ester	C11H20O2	13	81.38	W10N14.L
Cpd 19: (1S,2S,4R,8S)-2,10-dihydroxy-1,8-cineole; C10H18O3; 7.243	7.243		(1S,2S,4R,8S)-2,10-dihydroxy-1,8-cineole	C10H18O3	5	78.07	W10N14.L
Cpd 20: Caparratriene; C15H26; 7.446	7.446		Caparratriene	C15H26	13	79.47	W10N14.L
Cpd 21: exo-2-Hydroxycineole; C10H18O2; 7.535	7.535		exo-2-Hydroxycineole	C10H18O2	13	81.31	NIST14.L
Cpd 22: 7.631	7.631				0		
Cpd 23: 2-Propanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-; C10H12O3; 7.79	7.79		2-Propanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	C10H12O3	13	89.01	NIST14.L
Cpd 24: 3-(2-Hydroxy-2-methyl-propyl)-cyclohex-2-enone; C10H16O2; 7.855	7.855		3-(2-Hydroxy-2-methyl-propyl)-cyclohex-2-enone	C10H16O2	2	75.12	W10N14.L
Cpd 25: 1-Cyclohexene-1-butanol, alpha, 2,6,6-tetramethyl-; C14H24O; 8.111	8.111		1-Cyclohexene-1-butanol, alpha, 2,6,6-tetramethyl-	C14H24O	13	90.37	W10N14.L
Cpd 26: 8.407	8.407				0		
Cpd 27: Cyclopropanecarboxylic acid, 3-ethenyl-2,2-dimethyl-, cis-; C8H12O2; 8.629	8.629		Cyclopropanecarboxylic acid, 3-ethenyl-2,2-dimethyl-, cis-	C8H12O2	7	73.57	NIST14.L
Cpd 28: alpha-Cadinol; C15H26O; 8.721	8.721		alpha-Cadinol	C15H26O	13	76.39	NIST14.L
Cpd 29: 8.943	8.943				0		
Cpd 30: Inositol, 1-deoxy-; C6H12O5; 9.016	9.016		Inositol, 1-deoxy-	C6H12O5	3	72.63	NIST14.L
Cpd 31: 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-; C15H26O; 9.201	9.201		2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-	C15H26O	13	79.59	W10N14.L
Cpd 32: (E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol; C10H12O3; 9.388	9.388		(E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	C10H12O3	13	94.04	NIST14.L
Cpd 33: 1,1,4a-Trimethyl-5,6-dimethylenedecahydronaphthalene; C15H24; 9.515	9.515		1,1,4a-Trimethyl-5,6-dimethylenedecahydronaphthalene	C15H24	13	92.89	NIST14.L
Cpd 34: Spiro[1,3-dioxolane-2,2'-[6,7]diazabicyclo[3.2.2]non-6-ene]; C9H14N2O2; 9.737	9.737		Spiro[1,3-dioxolane-2,2'-[6,7]diazabicyclo[3.2.2]non-6-ene]	C9H14N2O2	13	73.38	W10N14.L
Cpd 35: Propiolic acid, 3-(1-hydroxy-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)-, ethyl ester; C15H24O3; 9.940	9.94		Propiolic acid, 3-(1-hydroxy-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)-, ethyl ester	C15H24O3	13	84.16	W10N14.L
Cpd 36: Tridecanal; C13H26O; 10.032	10.032		Tridecanal	C13H26O	13	84.52	W10N14.L
Cpd 37: 2,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-(+,-)-; C15H28O; 10.143	10.143		2,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-(+,-)-	C15H28O	10	74.34	NIST14.L
Cpd 38: 1,6,10,14-Hexadecatetraen-3-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, (E,E)-; C20H34O; 10.476	10.476		1,6,10,14-Hexadecatetraen-3-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, (E,E)-	C20H34O	13	83.99	W10N14.L
Cpd 39: Hexadecanoic acid, methyl ester; C17H34O2; 10.587	10.587		Hexadecanoic acid, methyl ester	C17H34O2	13	98.26	W10N14.L
Cpd 40: Bicyclo[3.1.0]hexane-6-methanol, 2-hydroxy-1,4,4-trimethyl-; C10H18O2; 10.697	10.697		Bicyclo[3.1.0]hexane-6-methanol, 2-hydroxy-1,4,4-trimethyl-	C10H18O2	13	76.64	NIST14.L
Cpd 41: n-Hexadecanoic acid; C16H32O2; 10.845	10.845		n-Hexadecanoic acid	C16H32O2	13	97.56	NIST14.L
Cpd 42: 1-Cyclohexene, 1,3,3-trimethyl-2-(1-methylbut-1-en-3-on-1-yl)-; C14H22O; 10.938	10.938		1-Cyclohexene, 1,3,3-trimethyl-2-(1-methylbut-1-en-3-on-1-yl)-	C14H22O	13	82.95	W10N14.L
Cpd 43: Hexadecanoic acid, ethyl ester; C18H36O2; 11.030	11.03		Hexadecanoic acid, ethyl ester	C18H36O2	4	76.66	W10N14.L
Cpd 44: 1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b.alpha.)]-; C20H34O; 11.085	11.085		1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b.alpha.)]-	C20H34O	13	90.31	W10N14.L
Cpd 45: 5-(1-Isopropenyl-4,5-dimethylbicyclo[4.3.0]nonan-5-yl)-3-methyl-2-pentenol acetate; C22H36O2; 11.196	11.196		5-(1-Isopropenyl-4,5-dimethylbicyclo[4.3.0]nonan-5-yl)-3-methyl-2-pentenol acetate	C22H36O2	13	82.92	NIST14.L
Cpd 46: 7,8-EPOXY-ALPHA-IONONE; C13H20O2; 11.362	11.362		7,8-EPOXY-ALPHA-IONONE	C13H20O2	13	77.94	W10N14.L
Cpd 47: 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester; C19H30O2; 11.455	11.455		9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C19H30O2	9	72.2	NIST14.L
Cpd 48: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester; C19H34O2; 11.695	11.695		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	C19H34O2	13	96.65	W10N14.L
Cpd 49: Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester; C17H34O2; 11.861	11.861		Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	C17H34O2	1	70.9	W10N14.L
Cpd 50: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-; C18H32O2; 11.972	11.972		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	C18H32O2	13	97.23	NIST14.L
Cpd 51: LONGIFOLENALDEHYDE; C15H24O; 12.138	12.138		LONGIFOLENALDEHYDE	C15H24O	13	76.49	W10N14.L
Cpd 52: Ethanone, 1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimethyl-4H-cyclohepta[b]furan-5-yl)-; C14H20O2; 12.378	12.378		Ethanone, 1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimethyl-4H-cyclohepta[b]furan-5-yl)-	C14H20O2	13	77.92	W10N14.L
Cpd 53: (2R,3R,4aR,5S,8aS)-2-Hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl)octahydronaphthalen-1(2H)-one; C15H24O2; 12.471	12.471		(2R,3R,4aR,5S,8aS)-2-Hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl)octahydronaphthalen-1(2H)-one	C15H24O2	13	76.27	NIST14.L
Cpd 54: 1-Naphthalenepropanol, alpha-ethenyldodecahydro-2-hydroxy-, alpha, 2,5,5,8a-pentamethyl-, [1R-[1.alpha.(R*),2.beta.,4a.beta.,8a.alpha.]]-; C20H36O2; 12.692	12.692		1-Naphthalenepropanol, alpha-ethenyldodecahydro-2-hydroxy-, alpha, 2,5,5,8a-pentamethyl-, [1R-[1.alpha.(R*),2.beta.,4a.beta.,8a.alpha.]]-	C20H36O2	13	94.25	W10N14.L
Cpd 55: Thunbergol; C20H34O; 12.855	12.855		Thunbergol	C20H34O	13	89.21	NIST14.L

12.855								
Cpd 56: 4a,7,7,10a-Tetramethyldodecahydrobenzo[7]chromen-3-ol; C17H30O2; 13.062	13.062	4a,7,7,10a-Tetramethyldodecahydrobenzo[7]chromen-3-ol	C17H30O2	7	74.8	W10N14.L		
Cpd 57: Octadecanoic acid, 10-oxo-, methyl ester; C19H36O3; 13.210	13.210	Octadecanoic acid, 10-oxo-, methyl ester	C19H36O3	13	82.74	NIST14.L		
Cpd 58: ((1S,4aR,4bR,10aR)-7-Isopropyl-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydrophenanthren-1-yl)methanol; C20H32O; 13.302	13.302	((1S,4aR,4bR,10aR)-7-Isopropyl-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydrophenanthren-1-yl)methanol	C20H32O	13	80.99	NIST14.L		
Cpd 59: Cyclodecacyclotetradecene, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20-ecosahydro-; C22H40; 13.376	13.376	Cyclodecacyclotetradecene, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20-ecosahydro-	C22H40	13	76.76	W10N14.L		
Cpd 60: 1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-; [1R-(1.alpha.,4a.beta.,10a.alpha.)]-; C20H30O; 13.542	13.542	1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-; [1R-(1.alpha.,4a.beta.,10a.alpha.)]-	C20H30O	13	87.03	NIST14.L		
Cpd 61: 13.653	13.653			0				
Cpd 62: (1S,2E,4S,5R,7E,11E)-Cembra-2,7,11-trien-4,5-diol; C20H34O2; 13.815	13.815	(1S,2E,4S,5R,7E,11E)-Cembra-2,7,11-trien-4,5-diol	C20H34O2	2	71.06	NIST14.L		
Cpd 63: Spiro[tetrahydrofuran-2,1'-decalin], 5-methyl-2-methylene-5',8a'-trimethyl-; C18H30O; 14.115	14.115	Spiro[tetrahydrofuran-2,1'-decalin], 5-methyl-2-methylene-5',8a'-trimethyl-	C18H30O	13	79.46	NIST14.L		
Cpd 64: ANDROSTAN-1-ON-2-EN-17-OL ACETATE; C21H30O3; 14.318	14.318	ANDROSTAN-1-ON-2-EN-17-OL ACETATE	C21H30O3	8	71.71	W10N14.L		
Cpd 65: 14.447	14.447			0				
Cpd 66: 1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, 1-acetate, (1R,4aS,10aR)-; C22H32O2; 14.577	14.577	1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, 1-acetate, (1R,4aS,10aR)-	C22H32O2	8	87.15	NIST14.L		
Cpd 67: 14.706	14.706			0				
Cpd 68: 14.854	14.854			0				
Cpd 69: 15.094	15.094			0				
Cpd 70: 15.168	15.168			0				
Cpd 71: 15.315	15.315			0				
Cpd 72: Cedrol; C15H26O; 15.426	15.426	Cedrol	C15H26O	13	80.9	NIST14.L		
Cpd 73: 15.574	15.574			0				
Cpd 74: 4-(2,2,6-Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-1-yl)butan-2-one; C14H24O; 15.740	15.740	4-(2,2,6-Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-1-yl)butan-2-one	C14H24O	13	72.43	NIST14.L		
Cpd 75: 15.870	15.870			0				
Cpd 76: 16.073	16.073			0				
Cpd 77: [1,1'-Bicyclohexyl]-3,3'-dione, 2,2'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-, stereoisomer; C20H30O2; 16.405	16.405	[1,1'-Bicyclohexyl]-3,3'-dione, 2,2'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-, stereoisomer	C20H30O2	13	78.43	W10N14.L		
Cpd 78: 16.793	16.793			0				
Cpd 79: [1,1'-Bicyclohexyl]-3,3'-dione, 2,2'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-, stereoisomer; C20H30O2; 17.181	17.181	[1,1'-Bicyclohexyl]-3,3'-dione, 2,2'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-, stereoisomer	C20H30O2	13	77.64	W10N14.L		
Cpd 80: 17.458	17.458			0				
Cpd 81: (E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene; C16H16O4; 17.828	17.828	(E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene	C16H16O4	1	79.39	W10N14.L		
Cpd 82: 17.975	17.975			0				
Cpd 83: 2-Ethoxyethyl 2-amino-5-(ethoxycarbonyl)indole-3-carboxylate; C16H20N2O5; 18.142	18.142	2-Ethoxyethyl 2-amino-5-(ethoxycarbonyl)indole-3-carboxylate	C16H20N2O5	3	71.35	W10N14.L		
Cpd 84: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z), 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester; C21H38O4; 18.288	18.288	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z), 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	C21H38O4	13	89.31	W10N14.L		
Cpd 85: 18.474	18.474			0				
Cpd 86: 18.696	18.696			0				
Cpd 87: 18.991	18.991			0				
Cpd 88: Ethanone, 1-[2-(5-hydroxy-1,1-dimethylhexyl)-3-methyl-2-cyclopropen-1-yl]-; C14H24O2; 19.19	19.19	Ethanone, 1-[2-(5-hydroxy-1,1-dimethylhexyl)-3-methyl-2-cyclopropen-1-yl]-	C14H24O2	1	70.06	NIST14.L		
Cpd 89: 2,4,6-Trimethoxytoluene; C10H14O3; 19.508	19.508	2,4,6-Trimethoxytoluene	C10H14O3	13	74.43	W10N14.L		
Cpd 90: 19.896	19.896			0				
Cpd 91: 20.044	20.044			0				
Cpd 92: 20.395	20.395			0				
Cpd 93: 20.691	20.691			0				
Cpd 94: 5-Pentafluorophenylmethyl-4-propyl-4,5,6,7-tetrahydro-thieno[3,2-c]pyridine; C17H16F5NS; 21.263	21.263	5-Pentafluorophenylmethyl-4-propyl-4,5,6,7-tetrahydro-thieno[3,2-c]pyridine	C17H16F5NS	2	72.03	W10N14.L		
Cpd 95: 21.817	21.817			0				
Cpd 96: 22.482	22.482			0				
Cpd 97: 22.649	22.649			0				
Cpd 98: 23.351	23.351			0				
Cpd 99: Benzenemethanol, 2-amino-alpha-phenyl-; C13H13NO; 23.960	23.960	Benzenemethanol, 2-amino-alpha-phenyl-	C13H13NO	1	71.15	W10N14.L		
Cpd 100: (2E)-4-Butyl-2-octene; C12H24; 24.644	24.644	(2E)-4-Butyl-2-octene	C12H24	3	76.23	W10N14.L		
Cpd 101: 26.195	26.195			0				
Cpd 102: 27.063	27.063			0				
Cpd 103: 29.779	29.779			0				
Cpd 104: 30.259	30.259			0				
Cpd 105: 30.665	30.665			0				
Cpd 106: Benzyl 2(S)-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-5-bromohept-5-enoate; C18H24BrNO4; 31.367	31.367	Benzyl 2(S)-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-5-bromohept-5-enoate	C18H24BrNO4	1	76.94	W10N14.L		
Cpd 107: 32.993	32.993			0				

**Lampiran 6. Uji Normalitas dan homogenitas menggunakan *IBM SPSS statistics version 26.***

**Case Processing Summary**

	kelompok kontrol	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
besar daya	konsentrasi 10%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
hambat	konsentrasi 20%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	konsentrasi 25%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	konsentrasi 50%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	konsentrasi 75%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	konsentrasi 100%	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	kontrol positif	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%

**Descriptives**

	kelompok kontrol		Statistic	Std. Error	
besar daya	konsentrasi 10%	Mean	1337.3333	17.60997	
hambat		95% Confidence Interval	Lower Bound	1261.5637	
		for Mean	Upper Bound	1413.1029	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		1337.0000	
		Variance		930.333	
		Std. Deviation		30.50137	
		Minimum		1307.00	
		Maximum		1368.00	
		Range		61.00	
		Interquartile Range		.	
Skewness			.049	1.225	
Kurtosis			.	.	
		konsentrasi 20%	Mean	1461.3333	27.65462
	95% Confidence Interval		Lower Bound	1342.3451	
	for Mean		Upper Bound	1580.3215	
	5% Trimmed Mean			.	
	Median			1472.0000	
	Variance			2294.333	
	Std. Deviation			47.89920	

	Minimum	1409.00	
	Maximum	1503.00	
	Range	94.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-.952	1.225
	Kurtosis	.	.
konsentrasi 25%	Mean	1726.0000	15.50269
	95% Confidence Interval	Lower Bound	1659.2973
	for Mean	Upper Bound	1792.7027
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	1721.0000	
	Variance	721.000	
	Std. Deviation	26.85144	
	Minimum	1702.00	
	Maximum	1755.00	
	Range	53.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	.809	1.225
	Kurtosis	.	.
konsentrasi 50%	Mean	1933.6667	68.21860
	95% Confidence Interval	Lower Bound	1640.1457
	for Mean	Upper Bound	2227.1876
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	1965.0000	
	Variance	13961.333	
	Std. Deviation	118.15809	
	Minimum	1803.00	
	Maximum	2033.00	
	Range	230.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1.109	1.225
	Kurtosis	.	.
konsentrasi 75%	Mean	2368.0000	20.25669
	95% Confidence Interval	Lower Bound	2280.8425
	for Mean	Upper Bound	2455.1575
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	2358.0000	

	Variance	1231.000	
	Std. Deviation	35.08561	
	Minimum	2339.00	
	Maximum	2407.00	
	Range	68.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.178	1.225
	Kurtosis	.	.
konsentrasi 100%	Mean	2566.6667	27.82285
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	2446.9546 2686.3787
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	2585.0000	
	Variance	2322.333	
	Std. Deviation	48.19059	
	Minimum	2512.00	
	Maximum	2603.00	
	Range	91.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1.464	1.225
	Kurtosis	.	.
kontrol positif	Mean	2851.6667	27.28451
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	2734.2709 2969.0624
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	2835.0000	
	Variance	2233.333	
	Std. Deviation	47.25816	
	Minimum	2815.00	
	Maximum	2905.00	
	Range	90.00	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.390	1.225
	Kurtosis	.	.
kontrol negatif	Mean	.0000	.00000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	.0000 .0000



5% Trimmed Mean	.0000
Median	.0000
Variance	.000
Std. Deviation	.00000
Minimum	.00
Maximum	.00
Range	.00
Interquartile Range	.00
Skewness	.
Kurtosis	.

### Tests of Normality

	kelompok kontrol	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
besar daya	konsentrasi 10%	.176	3	.	1.000	3	.982
hambat	konsentrasi 20%	.255	3	.	.963	3	.629
	konsentrasi 25%	.241	3	.	.974	3	.691
	konsentrasi 50%	.271	3	.	.947	3	.557
	konsentrasi 75%	.279	3	.	.939	3	.524
	konsentrasi 100%	.315	3	.	.891	3	.359
	kontrol positif	.304	3	.	.907	3	.407

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
besar daya hambat	Based on Mean	2.568	6	14	.068
	Based on Median	.735	6	14	.630
	Based on Median and with adjusted df	.735	6	5.449	.643
	Based on trimmed mean	2.384	6	14	.085

**Lampiran 7. Uji One-way menggunakan IBM SPSS statistics version 26.**

**ANOVA**

besar daya hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5946253.619	6	991042.270	292.791	.000
Within Groups	47387.333	14	3384.810		
Total	5993640.952	20			

**Lampiran 8. Uji Post Hoc Least Significant Difference menggunakan IBM SPSS statistics version 26.**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: besar daya hambat





Tukey HSD






(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
kontrol	kontrol						
	konsentrasi 10%						
	konsentrasi 20%	-124.00000	44.43503	.165	-277.8408	29.8408	
	konsentrasi 25%	-388.66667*	44.43503	.000	-542.5074	-234.8259	
	konsentrasi 50%	-596.33333*	44.43503	.000	-750.1741	-442.4926	
	konsentrasi 75%	-1030.66667*	44.43503	.000	-1184.5074	-876.8259	
	konsentrasi 100%	-1229.33333*	44.43503	.000	-1383.1741	-1075.4926	
kontrol positif	kontrol negatif	-1514.33333*	44.43503	.000	-1668.1741	-1360.4926	
	kontrol negatif	1337.33333*	44.43503	.000	1183.4926	1491.1741	
	kontrol negatif	kontrol					
		konsentrasi 10%	124.00000	44.43503	.165	-29.8408	277.8408
		konsentrasi 25%	-264.66667*	44.43503	.000	-418.5074	-110.8259
		konsentrasi 50%	-472.33333*	44.43503	.000	-626.1741	-318.4926
		konsentrasi 75%	-906.66667*	44.43503	.000	-1060.5074	-752.8259
konsentrasi 100%		-1105.33333*	44.43503	.000	-1259.1741	-951.4926	
kontrol positif		-1390.33333*	44.43503	.000	-1544.1741	-1236.4926	
kontrol positif	kontrol negatif	1461.33333*	44.43503	.000	1307.4926	1615.1741	
	kontrol negatif	kontrol					
		konsentrasi 10%	388.66667*	44.43503	.000	234.8259	542.5074
		konsentrasi 20%	264.66667*	44.43503	.000	110.8259	418.5074
		konsentrasi 50%	-207.66667*	44.43503	.005	-361.5074	-53.8259
		konsentrasi 75%	-642.00000*	44.43503	.000	-795.8408	-488.1592
		konsentrasi 100%	-840.66667*	44.43503	.000	-994.5074	-686.8259
kontrol positif		-1125.66667*	44.43503	.000	-1279.5074	-971.8259	


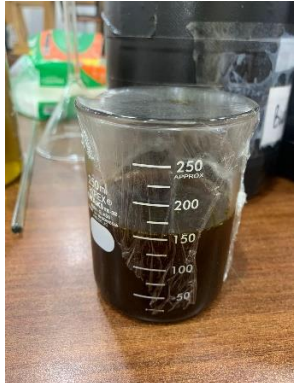


	kontrol negatif	1726.00000*	44.43503	.000	1572.1592	1879.8408
konsentrasi 50%	konsentrasi 10%	596.33333*	44.43503	.000	442.4926	750.1741
	konsentrasi 20%	472.33333*	44.43503	.000	318.4926	626.1741
	konsentrasi 25%	207.66667*	44.43503	.005	53.8259	361.5074
	konsentrasi 75%	-434.33333*	44.43503	.000	-588.1741	-280.4926
	konsentrasi 100%	-633.00000*	44.43503	.000	-786.8408	-479.1592
	kontrol positif	-918.00000*	44.43503	.000	-1071.8408	-764.1592
	kontrol negatif	1933.66667*	44.43503	.000	1779.8259	2087.5074
konsentrasi 75%	konsentrasi 10%	1030.66667*	44.43503	.000	876.8259	1184.5074
	konsentrasi 20%	906.66667*	44.43503	.000	752.8259	1060.5074
	konsentrasi 25%	642.00000*	44.43503	.000	488.1592	795.8408
	konsentrasi 50%	434.33333*	44.43503	.000	280.4926	588.1741
	konsentrasi 100%	-198.66667*	44.43503	.007	-352.5074	-44.8259
	kontrol positif	-483.66667*	44.43503	.000	-637.5074	-329.8259
	kontrol negatif	2368.00000*	44.43503	.000	2214.1592	2521.8408
konsentrasi 100%	konsentrasi 10%	1229.33333*	44.43503	.000	1075.4926	1383.1741
	konsentrasi 20%	1105.33333*	44.43503	.000	951.4926	1259.1741
	konsentrasi 25%	840.66667*	44.43503	.000	686.8259	994.5074
	konsentrasi 50%	633.00000*	44.43503	.000	479.1592	786.8408
	konsentrasi 75%	198.66667*	44.43503	.007	44.8259	352.5074
	kontrol positif	-285.00000*	44.43503	.000	-438.8408	-131.1592
	kontrol negatif	2566.66667*	44.43503	.000	2412.8259	2720.5074
kontrol positif	konsentrasi 10%	1514.33333*	44.43503	.000	1360.4926	1668.1741
	konsentrasi 20%	1390.33333*	44.43503	.000	1236.4926	1544.1741
	konsentrasi 25%	1125.66667*	44.43503	.000	971.8259	1279.5074
	konsentrasi 50%	918.00000*	44.43503	.000	764.1592	1071.8408
	konsentrasi 75%	483.66667*	44.43503	.000	329.8259	637.5074
	konsentrasi 100%	285.00000*	44.43503	.000	131.1592	438.8408
	kontrol negatif	2851.66667*	44.43503	.000	2697.8259	3005.5074
kontrol negatif	konsentrasi 10%	-1337.33333*	44.43503	.000	-1491.1741	-1183.4926
	konsentrasi 20%	-1461.33333*	44.43503	.000	-1615.1741	-1307.4926
	konsentrasi 25%	-1726.00000*	44.43503	.000	-1879.8408	-1572.1592
	konsentrasi 50%	-1933.66667*	44.43503	.000	-2087.5074	-1779.8259
	konsentrasi 75%	-2368.00000*	44.43503	.000	-2521.8408	-2214.1592
	konsentrasi 100%	-2566.66667*	44.43503	.000	-2720.5074	-2412.8259
	kontrol positif	-2851.66667*	44.43503	.000	-3005.5074	-2697.8259


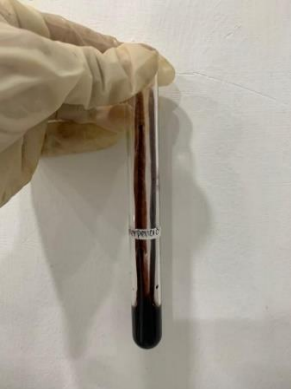


\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

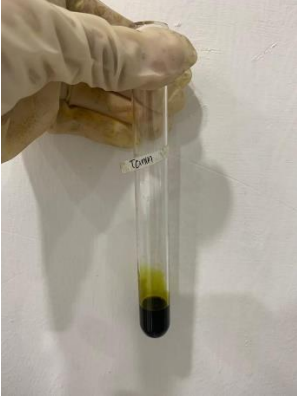



### Lampiran 9. Dokumentasi Kegiatan Penelitian

No	Tanggal	Kegiatan	Dokumentasi
1	21 September 2023	Proses penimbangan buah Legundi kering	
2	24 september 2023	Proses penghalusan simplisia	
3	25 September 2023	Proses penyaringan serbuk simplisia	
4	25 September 2023	Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam masing-masing wadah maserator	

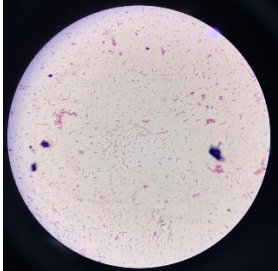



5	25 September 2023	Perendaman serbuk simplisia dengan etanol 96%	
6	25 September 2023	Pembalutan wadah maserator	
7	26 September 2023	Proses pengadukan yang dilakukan selama 3 hari setiap 6 jam	
8	29 September 2023	Penyaringan hasil maserasi	
9	29 September 2023	Didapatkan hasil penyaringan untuk dilakukan evaporasi	

10	29 September 2023	Proses pemisahan ekstrak buah Legundi dan etanol 96% dengan alat <i>Rotary Evaporator</i>	
11	30 September 2023	Ekstrak buah Legundi setelah dilakukan pemisahan	
12	5 Oktober 2023	Pengentalan ekstrak dengan <i>Hotplate</i>	
13	9 Oktober 2023	Didapatkan ekstrak buah Legundi kental	

14	9 Oktober 2023	Uji bebas etanol	
15	9 Oktober 2023	Uji triterpenoid/steroid	
16	9 Oktober 2023	Uji flavonoid	
17	9 Oktober 2023	Uji saponin	

18	9 Oktober 2023	Uji tanin	
19	9 Oktober 2023	Uji Alkaloid dengan reaksi mayer	
20	9 Oktober 2023	Uji alkaloid dengan reaksi dragendroff	
21	26 oktober 2023	Pembuatan media agar dan penanaman bakteri	



22	27 oktober 2023	Pewarnaan gram dan pembacaan bakteri pada mikroskop	
23	30 oktober 2023	Pembuatan suspensi bakteri	
24	31 oktober 2023	Perlakuan metode difusi	
25	31 oktober 2023	Pelakuan metode dilusi	

## Lampiran 10. Draft Artikel: Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia



### Role of Legundi Fruit as a Cervical Cancer Drug Candidate by Inhibiting *Levansucrase* Protein of *Lactobacillus gasseri*

Assyifa Cindykia<sup>1</sup>, Humairah Mrdina Liza Lubis<sup>2\*</sup>, Rini Syahrani Harahap<sup>2</sup>, Emni Purwoningsih<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, North Sumatra, Indonesia.

<sup>2</sup>Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, North Sumatra, Indonesia.

\* Corresponding Author. E-mail: [humairahmedina@umsu.ac.id](mailto:humairahmedina@umsu.ac.id)

Received: 0 Month 201X / Revised: 0 Month 201X / Accepted: 0 Month 201X

**ABSTRACT:** Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, after breast, lung and colorectal cancer. In addition to infection from *Human papillomavirus (HPV)*, cervical cancer can also be caused by the progressive growth of *Lactobacillus gasseri*, which is a bacterium in the vagina that plays a role in controlling the growth and development of pathogens. When excessive proliferation of *Lactobacillus* occurs, changes in the homeostasis of the human microbiome can damage the symbiotic relationship between the host and microorganisms, promote physiological changes in individuals, and lead to the development of diseases such as cancer. The levansucrase protein functions in catalyzing toxic substances and sustaining the life of *Lactobacillus gasseri*. Labdane-type diterpene is a terpenoid compound of legundi fruit. Several studies have shown that legundi fruit contributes as an antibacterial and anticancer. This study is an *in silico* study to assess the interaction between Labdane-type diterpene of legundi fruit with *Levansucrase* protein. This study found a good interaction value and no toxicity in the Labdane-type diterpene compound, so it has the potential to be used as a candidate for cervical cancer drugs.

**KEYWORDS:** cervical cancer, labdane-type diterpene, legundi fruit, levansucrase

#### 1. INTRODUCTION

Based on data from WHO, cervical cancer in Indonesia in 2019 caused 843,000 deaths from a total female population of 134,400,000. In 2020 the incidence of cervical cancer was 27 people per 100,000 women.<sup>(1)</sup> The mortality ratio to the incidence of cervical cancer in 2020 is 0.57%. cervical cancer as the second most common cancer in Indonesia and the third most common cancer causing death in Indonesia.<sup>(2)</sup>

About 95% of women with cervical cancer are infected with one or more *HPV* subtypes, *HPV 16* and *18* are the most common (*HPV-16* by 50% and *HPV-18* by 10-15%).<sup>(3)</sup> About 90% of cervical cancer patients are found in women with low socioeconomic conditions where screening programs are not well implemented.<sup>(4)</sup> In addition, the study by Zhang *et al*, 2020 confirmed that persistent infection of high-risk *HPV* is closely related to the occurrence of cervical cancer.<sup>(5)</sup> Physiologically and under normal circumstances, the normal bacterial flora residing in the vagina plays a role in maintaining a dynamic balance, when excessive proliferation occurs it can be the cause of various diseases, including *multiple gynecological diseases*, namely *choleitis*, and *high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN)* and cervical cancer.<sup>(6)</sup>

Persistent infection will continue to trigger the release of various inflammatory molecules, including *Reactive Oxygen Species (ROS)*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-18*, *hypoxia-inducible factor (HIF)*, *cyclooxygenase (COX)*, *inducible nitric oxide synthase (iNOS)*, *Matrix metalloproteinase enzyme-9 (MMP-9)*, and *chemokines*. In cervical cancer, infection is caused by persistent *HPV*, and *Lactobacillus gasseri* plays a role in producing lactic acid and serves to provide protection against bacteria and viruses from pathogenic species including *HPV*.<sup>(6),(5)</sup> *HPV* can also trigger a decreased immune response and persistent infection. This causes the *lactobacillus* bacteria to turn into pathogens and result in the onset of precancerous lesions (CIN) and even trigger the development of cervical cancer.<sup>(7)</sup> *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri* have proven through *in vitro* studies that these bacteria can exert cytotoxic effects on *HeLa* cervical cancer cells under certain circumstances.<sup>(7)</sup>

*Lactobacillus gasseri* also produces inulin and levan polymers. *Levansucrase* is often found in gram-negative and gram-positive bacteria. However, it is most commonly found in lactic acid bacteria. *Levansucrase* catalyzes three different reactions, including polymerization, transfructosylation, and hydrolysis. It acts as the main biocatalyst in the synthesis of levan-type fructooligosaccharides.<sup>(8)</sup>

**How to cite this article:** Surname N, Surname N. Title of the manuscript. JIFI. 2022; 23(6): 1-XX.

© 2024 Universitas Pancasila Press  
ISSN: 0000-0000

<https://doi.org/00.0000/JIFI.2022.00>

Legundi fruit extract was found to be cytotoxic against several cancer cell lines and has antimicrobial activity.<sup>(9)</sup> *In vitro* research concluded that the concentration of legundi (*Vitex trifolia* L.) extract that most effectively inhibits the growth of *Staphylococcus epidermidis* bacteria. Several *in vitro* studies have shown an interaction between Legundi extract and *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* bacteria. The study proved that Legundi extract has an antibacterial effect in inhibiting bacterial growth.<sup>(9),(10)</sup> *In silico* studies have shown that the *α-terpineol* compound contained in Legundi has strong binding and interaction activity with *tyrosyl-tRNA synthetase* from *Staphylococcus aureus*. Thus, Legundi extract has the potential to inhibit *tyrosyl-tRNA synthetase* in *Staphylococcus aureus* bacteria.<sup>(10)</sup>

This study will assess the content of legundi fruit, namely *Labdane type-diterpene* by *molecular docking* between *labdane-type diterpene* and *doxorubicin* with *levansucrase* protein and assess the *pharmacokinetics, physicochemistry, and toxicity of labdane-type diterpene compounds* as an initial study to detect the content of single fruit substances that have the potential as cervical anticancer aimed at the cervicovaginal microbiome. The ultimate goal of this research is to find an alternative treatment for cervical cancer that is herbal/natural based through the target of cervicovaginal microbiome biomarkers.

## 2. MATERIALS AND METHODS

This research is an *in silico* study using a computer program to assess protein and ligand interactions, as well as determine the physicochemistry, pharmacokinetic, and toxicity properties of compounds.

### 2.1. Spectroscopy Fourier Transform InfraRed (FTIR) Analysis

This analysis was carried out at PT Multi Global Safety. Infrared (IR) spectroscopy is used to determine the type of functional groups in an isolated plant tissue. The spectrum display shows peaks that indicate certain groups with a graph comparing the wave number absorption to transmittance (%T). Samples of 96% ethanol extract from Legundi fruit as much as 5-10% were put on the cell surface and measurements were taken.

### 2.2. Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS) Analysis

GC-MS analysis was carried out at PT Multi Global Safety and was carried out by separating Legundi fruit samples first with GC tools, then identified with MS tools.

### 2.3. In silico analysis

After the Legundi fruit compounds were identified, further *in silico* analysis was carried out to investigate the *molecular docking* between *Levansucrase* bacterial protein with *Labdane-type diterpene* ligand and *Doxorubicin* chemotherapeutic agent.

#### 2.3.1. Search for amino acid sequences of target proteins

The amino acid sequences of the ligand proteins were obtained from the *databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), United States National Library of Medicine (NLM), National Institute of Health (NIH)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and UniProt(<https://www.uniprot.org/>). The 3D structure of the ligand protein in the form of a \*.sdf file format, will be converted into a \*.pdb file using *OpenBabel software*.<sup>75</sup>

Target protein searched on UniProt(<https://www.uniprot.org/>) *Levansucrase*, with Primary accession D3WYW0, Entry Name LEVS\_LACGS, Gene levG.

#### 2.3.2. Structure search of active compound Labdane-type diterpene from Legundi fruit

The 3D structure of Legundi fruit active compound component *Labdane-type diterpene* (Compound CID: 609227) was obtained from *PubChem Open Chemistry Database*. The 3D structures of the various compounds in the form of \*.sdf file format will be converted into \*.pdb files using *OpenBabel software*.

#### 2.3.3. Protein 3D structure modeling

The 3D structures of the target proteins were predicted using the *SWISS-MODEL web server* with the *homology modeling* method. The 3D structure of the protein was then validated using *Ramachandran plot*.

#### 2.3.4. Docking and protein-ligand visualization

*Labdane-type diterpene* ligands were retrieved from *PubChem Open Chemistry Database* in 3D form. The 3D structure that has been obtained is then minimized to obtain the most stable structural conformation using *OpenBabel* software or using *PyRx* software. If the minimization process is complete, then right-click on the minimization result, select *convert to ligand pdbqt*. The file that was originally in SDF form will be saved as a *pdbqt* file. The *pdbqt* file format serves to show the partial charge on each atom. The 3D structure of *Labdane-*

*type diterpene* is obtained by entering the amino acid sequence in the PyRx program and the results obtained are data in the form of PDB file format.<sup>75</sup>

Amino acid preparation of *Lactobacillus gasseri* was carried out using PyMOL by removing water molecules and adding several things such as nonpolar hydrogen, charge and atoms. Then the *grid* is set to maximize until it covers the surface of the target protein. The *molecular docking* process of ligand with *Levansucrase* and *Doxorubicin* was done with PyMOL program.

The output of *docking* is the ligand pose on the active side and its affinity score. The analysis of *docking* results was carried out on the residues that interact with the ligand, the parameters of *binding affinity* results, structural conformation, and hydrogen bonding between *Labdane-type diterpene* with *Levansucrase* and *Doxorubicin*.

### 2.3.5. Analysis of bond interaction between protein and ligand

Visualization of *molecular docking* results between ligand and protein was performed using Edu PyMOL software. Visualization using Edu PyMOL software with the aim of clarifying the binding side of the ligand with protein. *Protein plus web server* (<https://proteins.plus/>) is used to determine the number of hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and amino acid residues involved in the interaction between ligands and proteins.

### 2.3.6. Physicochemical and Pharmacokinetic Analysis of Compounds

Analyzing and assessing the physicochemical properties, pharmacokinetics, lipophilicity, water solubility, and drug similarity properties of a compound or drug that becomes a ligand in molecular simulations on the SwissADME *web server* (<http://www.swissadme.ch/>) can be done by drawing the ligand structure or writing smiles on the *web server*, then clicking "Run" then the results.

### 2.3.7. Toxicity Analysis of Compounds

Toxicity analysis of compounds is analyzed using the ProTox-II *web server* ([https://tox-new.charite.de/prottox\\_II/](https://tox-new.charite.de/prottox_II/)) click "TOX PREDICTION" enter canonical smiles in the column. Select the "Organ Toxicity" and "Toxicity end points" options. Furthermore, the results of the toxicity assessment and toxicity radar of the compound will be visible on the *web server*.

## 3. RESULTS

### 3.1. FTIR Analysis Results

On the FTIR test graph there are 2 axes, namely the x and y axes. The x-axis shows the wave number while the y-axis shows the percent transmittance. There are characteristic peaks that indicate the presence of typical absorption in a test compound that will be targeted.

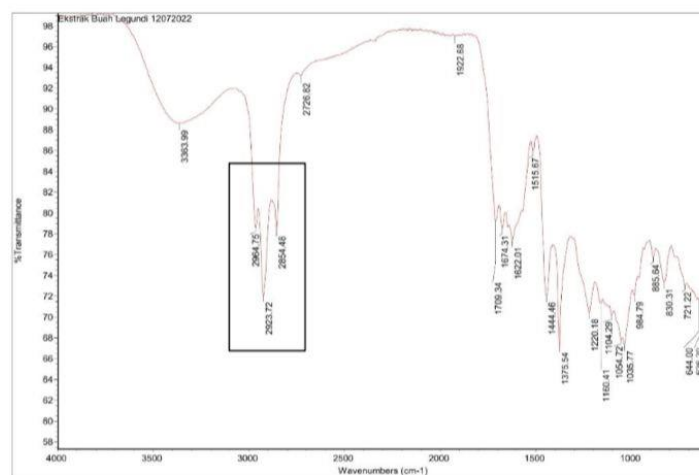


Figure 1. Function group spectrum of Legundi fruit extract

### 3.2. GC-MS Analysis Results

Based on the results of GC-MS analysis, 107 compounds were detected in Legundi fruit. The terpenoid compound group in Legundi fruit extract detected was *Labdane-type diterpene* (1,1,4a-Trimethyl-5,6-dimethylenedecahydronaphthalene) found at retention time (rt) 9.515.

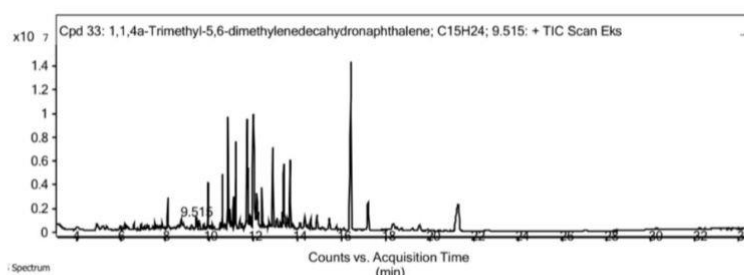


Figure 2. GC-MS Results of Legundi fruit extract

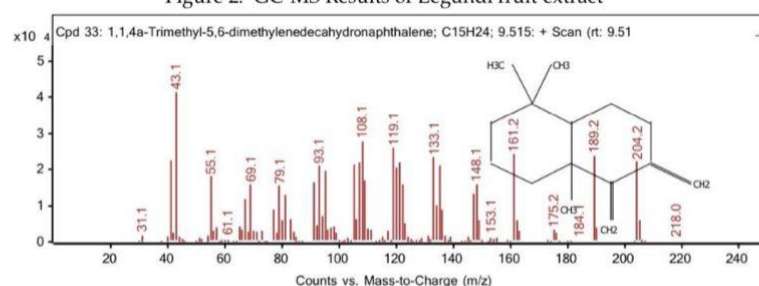


Figure 3. Peak MS Spectrum of Legundi fruit extract

### 3.3. In silico Analysis Results

#### 3.3.1. Molecular docking simulation results

Molecular docking simulation was conducted to determine the interaction between *levansucrase* protein with *labdane-type diterpene* ligand, and *levansucrase* with *doxorubicin*. Based on the results of the docking simulation, the binding affinity (binding energy) of *Labdane-type diterpene* was obtained at -7.1 kcal/mol. While the chemotherapy agent *Doxorubicin* is -9.3 kcal/mol. Based on the number of hydrogen bonds *Labdane-type diterpene* obtained as many as 3 bonds, while *Doxorubicin* obtained as many as 1 hydrogen bond. The number of hydrophobic bonds and types of hydrogen bonds in the interaction between *Levansucrase* protein against *Labdane-type diterpene* and *Doxorubicin* ligands.

Table 1. Molecular docking simulation results

No	Test parameters	<i>Labdane-type diterpene</i>	<i>Doxorubicin</i>
1	Binding Affinity (kcal/mol)	-7,5 kcal/mol	-9,3 kcal/mol
2	Number of hydrogen bonds	3	1
3	Number of hydrophobic bonds	1	1
4	Types of hydrogen bonds	Ala261A, Thr257A, Pro258A	Asp135A

5	Types of hydrophobic bonds	Gln260A	Pro259A
---	----------------------------	---------	---------

Visualization results simulated using pyMOL application between Levansucrase and Doxorubicin in figure 4.

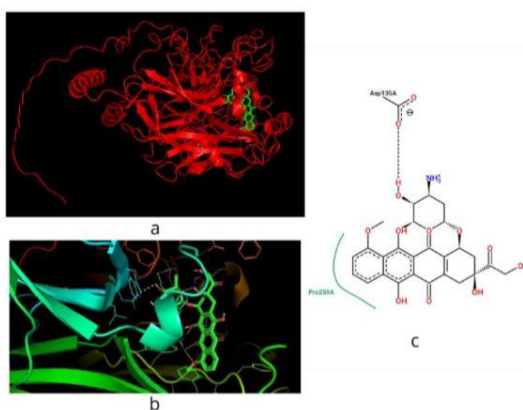


Figure 4. Visualization of Levansucrase and Doxorubicin

Visualization results simulated using pyMOL application between Levansucrase and Labdane-type diterpene in figure 5.

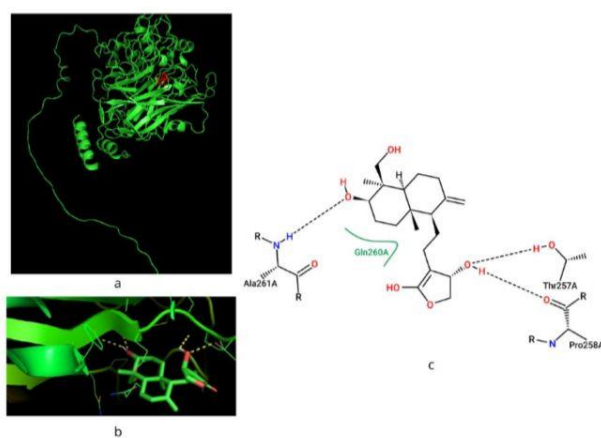


Figure 5. Visualization of Levansucrase and Labdane-type diterpene

### 3.3.2. Labdane-type Pharmacokinetic Results

The results of *Labdane-type diterpene* pharmacokinetic analysis obtained from the swissADME web (<http://www.swissadme.ch/index.php#top>) are shown in table 2.

**Table 2. Pharmacokinetic Results**

Tests Parameters	<i>Labdane-type diterpene</i>	Criteria
GI Absorption	High	Based on the Food and Drug Administration (FDA) assessment:
BBB Permeant	No	
P-gp substrate	Yes	1. Oral administration must fulfill all aspects of ADME (high GI absorption, and fulfill Lipinski's 5 rules).
CYP1A2 Inhibitor	No	
CYP2C19 Inhibitor	No	
CYP2C9 Inhibitor	No	
CYP2D6 Inhibitor	No	
CYP3A4 Inhibitor	No	2. Drugs with preparations with high skin permeability can be used as topical preparations.
Log K <sub>p</sub> (Skin permeation)	-6,92 cm/s	

Pharmacokinetic ability showed high gastrointestinal absorption of *Labdane-type diterpene* ligand. *Labdane-type diterpene* has binding with P-gp substrate thus affecting drug bioavailability. On enzyme inhibition the ligand has no enzyme inhibiting effect. While the Log K<sub>p</sub>(*skin permeation*) value is in a good value range and has high permeability.

### 3.3.3. Physicochemistry Results *Labdane-type diterpene*

Physicochemical tests were conducted to determine the membrane permeability of *Labdane-type diterpene* compounds. *Lipophilicity (Log P)* is the ability of a compound or drug to dissolve in lipids, fats, or oils. *Lipophilicity* is very important to the pharmacokinetic properties of drug absorption, distribution, permeability, and elimination routes as shown in table 3.

**Table 3. Physicochemistry Results**

Test Parameter	<i>Labdane-type diterpene</i>	Criteria
Molecular Weight	204,35 g/mol	Berdasarkan penilaian Lipinski's rule of five:
Num. heavy atoms	25	
Fraction Csp <sup>3</sup>	0,73	1. Molecular Weight <500 g/mol 2. Num H-bond acceptors <10 3. Num. H-bond donors <5 4. Molar refractivity 40-130 5. Log P<5
Num. H-bond acceptors	3	
Num. H-bond donors	3	
Molar Refractivity	95,21	
TPSA	86,99	
Log P	2,30	

### 3.3.4. Toxicity test results of *Labdane-type diterpene* compounds and Doxorubicin

The results of the toxicity test assessment of *Labdane-type diterpene* compounds are shown in table 4.

Tests Parametes	<i>Labdane-type diterpene</i>
Predicted LD50	5000 mg/KgBB
Predicted Toxicity Class	5

Hepatotoxicity	Inactive
Carcinogenicity	Inactive
Immunotoxicity	Inactive
Mutagenicity	Inactive
Cytotoxicity	Inactive

Based on the prediction of toxicity class, it is found that *Labdane-type diterpene* is in class 5 as shown in Figure 4 This indicates that *Labdane-type diterpene* does not cause toxicity.

#### 4. DISCUSSION

In Figure 1, the FTIR results show the presence of typical absorption and also groups at several wave numbers. The absorption is caused by the stretching of the double bond of the C=O carbonyl group of the secondary amide.<sup>(11),(12)</sup> From the word *stretching* indicates the stretch in the bond so that there is a change in distance and will move continuously along with high temperatures. At wave numbers 2964.75 cm<sup>-1</sup>, 2923.72 cm<sup>-1</sup> and 2854.48 cm<sup>-1</sup> indicate the presence of C-H bending bonds which are characteristic of triterpenoid compounds. The C=O group indicates carboxylic acid or phenol of a flavonoid. C-O groups indicate saponin compounds and O-H groups indicate tannin compounds<sup>(11)</sup>

In Figure 2, the GC-MS results obtained for the presence of *Labdane-type diterpene* compounds in the form of 1,1,4a-Trimethyl-5-6- dimethylenedecahydronaphthalene are in accordance with the research of Indrayudha P, Cahyani (2020) that legundi plants (*Vitex trifolia L.*) are known to produce various diterpenoids<sup>(13)</sup> thus proving that terpenoid content is indeed present in Legundi fruit. *Labdane-type diterpene* compound in the form of 1,1,4a-Trimethyl-5-6- dimethylenedecahydronaphthalene on the PubChem web server with PubChem Compound CID: 609227.

In *silico* analysis, the most negative *binding affinity* was found for *Doxorubicin* compared to *Labdane-type diterpene*. *Binding affinity* shows the ability of the drug/compound to bind to the receptor. The more negative the *binding affinity*, the higher the affinity between the ligand and the receptor. While the number of hydrogen bonds in *labdane-type diterpene* is found more than *Doxorubicin*.

Table 2 shows the pharmacokinetic results of the *Labdane-type diterpene* compound, showing high gastrointestinal absorption in accordance with the criteria for oral drugs based on the food and drug administration (FDA) and only violates at most 3 rules from Lipinski's rule of five<sup>(14)</sup> The FDA approved 35 new molecular entity (EMB) compounds and 15 new biological licenses (LBB) in 2021, of these drugs all only violate 1-3 Lipinski's rule of five, so the FDA also refers to Lipinski's rule of five<sup>(14),(15)</sup>

*Labdane-type diterpene* also does not inhibit the performance of the CYP 450 enzyme so that the body can still avoid a substance that is toxic and deadly to the organism, as presented in table 2 Research by Manikandan & Nagini, 2018 states that CYP 450 works in the liver and small intestine to protect the body from toxins, so if this enzyme is inhibited it will be harmful to the body.<sup>(16)</sup> *Labdane-type diterpene* compounds can bind to the body so that it affects the bioavailability of drugs, namely the pharmacokinetic process of drugs.<sup>(17)</sup>

Evaluation of drug similarity based on *Lipinski's rule five*, a compound is said to be drug-like if the molecular weight (*Molecular Weight*) is less than 500 Daltons, the value of the log P partition coefficient (*Lipophilicity*) is less than 5, molar refractivity between 40-130, the number of hydrogen bond donors (hydrogen bond donor) is less than 5, and the number of hydrogen bonds received (*hydrogen bond acceptor*) is less than 10.<sup>(18)</sup>

*Labdane-type diterpene* has 3 donor hydrogen bonds, 3 acceptor hydrogen bonds, a molecular weight of 204.35 g/mol, molar refractivity of 95.21, and log P < 5. Based on Lipinski's rule of five, it has met the criteria with the similarity of a drug. Based on the research of Nusantoro YR, Fadlan A (2020), *Labdane-type diterpene* is good to be a drug candidate because it has fulfilled all Lipinski's rules (*Lipinski's rule of five*).<sup>(18)</sup>

The drug toxicity test according to the *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemical* (2021) based on LD<sub>50</sub> is classified into 6 classes. Class I (LD<sub>50</sub> ≤ 5) and Class II (5 < LD<sub>50</sub> ≤ 50) are classified as fatal if ingested, Class III (50 < LD<sub>50</sub> ≤ 300) is classified as toxic if ingested. Class IV (300 < LD<sub>50</sub> ≤ 2000) is classified as harmful if swallowed. Class V (2000 < LD<sub>50</sub> ≤ 5000) may be harmful if swallowed. Class VI (LD<sub>50</sub> > 5000) is the mildest class that is not toxic.<sup>(19)</sup> The results of the *Labdane-type diterpene* ligand study belong to class 5, which is possibly harmful if swallowed.

#### 5. CONCLUSION



Finally, it demonstrates that a labdane-type diterpene inhibits the levansucrase protein of *Lactobacillus gasserii*. This study will help in the future development of labdane-type diterpenes as drug candidates for the treatment of cervical cancer.

**Acknowledgements:** This research was supported by universitas muhammadiyah sumatera utara.

**Conflict of interest statement:** All co-authors have seen and agreed with the manuscript's contents, and there is no conflict of interest.

## REFERENCES

1. (IARC). IA for R on C. Cervix uteri factsheet [Internet]. 2020. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&populatio](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&populatio)
2. World Health Organisation. Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer as a Public Health Problem and Its Associated Goals and Targets for the Period 2020 - 2030. 2020;2.
3. Almeida, A. M., Queiroz, J. A., Sousa, F., & Sousa Á. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. *Drug Discov Today* [Internet]. 2019;24(10)(2044–2057). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.07.011>
4. Liu Z. Prognostic Role of Squamous Cell Carcinoma Antigen in Cervical Cancer : A Meta-analysis. *Dis Markers*. 2019;2019.
5. Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, Zhang C, Han S. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:1219–29.
6. Kovachev SM. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. *Arch Microbiol* [Internet]. 2020;202(2):323–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01747-4>
7. Zhou ZW, Long HZ, Cheng Y, Luo HY, Wen DD, Gao LC. From Microbiome to Inflammation: The Key Drivers of Cervical Cancer. *Front Microbiol*. 2021;12(November):1–15.
8. Phengnoi P, Thakham N, Rachphirom T, Teerakulkittipong N, Lirio GA, Jangiam W. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon* [Internet]. 2022;8(12):e12137. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12137>
9. Fatmawati D, Mahmudati N, Wahyuni S, Rahardjanto A, Fatmawati D. Ekstrak buah legundi (*Vitex trifolia* Linn.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Pros Semin Nas V*. 2020;
10. Indriatie R, Masruri M. Antibacterial Activity of Legundi Leaf (*Vitex trifolia*) Essential Oil Using in-vitro and in-silico Methods. *J Pure App Chem Res*. 2023;12(April):26–37.
11. Radiena MSY. Identifikasi Senyawa Aktif Triterpenoid Dari Ekstrak Alga Laut Hijau Silpau (*Dictyosphaeria Versluysii*) Dengan Spektrofotometer Ftr Identification Of Triterpenoid Active Compounds From Algae Green. *EjournalKemenperinGold/Bpbiam*. 2019;15 (01)(ISSN: 2548-4842):33–40.
12. Chadijah S, Baharuddin M, Firnanely F. Potensi Instrumen FTIR dan GC-MS dalam Mengkarakterisasi dan Membedakan Gelatin Lemak Ayam, Itik dan Babi. *AI-Kimia*. 2019;7(2).
13. Indrayudha P, Cahyani IG. Cytotoxic Activity of Ethanol Extract Legundi Leaf (*Vitex trifolia* L.) and N-Hexan, Ethyl Acetate and Ethanol-Water Fraction against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Syst Rev Pharm*. 2020;11(11):779–85.
14. Arief I. Profil ADME dari Entitas Molekul Baru yang Disetujui oleh FDA Tahun 2021: Suatu Kajian In Silico. *JambJChem* [Internet]. 2022;4(2):1–11. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
15. Brown DG, Wobst HJ. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010-2019): Trends and Future Directions. *J Med Chem*. 2021;64(5):2312–38.
16. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2018;19(1):38–54.
17. Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon* [Internet]. 2022;8(6):e09777. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777>
18. Nusantoro YR, Fadlan A. Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoilhidrazon dan kompleks logam transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kim Indones*. 2020;5(2):114.
19. Supandi, Yeni, Merdekawati F. In silico study of pyrazolylaminoquinazoline toxicity by lazar, protox,

and admet predictor. J Appl Pharm Sci. 2018;8(9):119-29.

---