

***METABOLITE PROFILING* EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos
caudatus*) DENGAN METODE UPLCMS/MS DAN *NETWORK
PHARMACOLOGY* UNTUK PENENTUAN MEKANISME MOLEKULER
PADA PENGOBATAN KANKER KOLON**

SKRIPSI

**Oleh:
FARIDATUL AFIFAH
NIM. 210703110050**



**PROFRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2024**

***METABOLITE PROFILING* EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos
caudatus*) DENGAN METODE UPLCMS/MS DAN *NETWORK
PHARMACOLOGY* UNTUK PENENTUAN MEKANISME MOLEKULER
PADA PENGOBATAN KANKER KOLON**

SKRIPSI

**Oleh:
FARIDATUL AFIFAH
NIM.210703110050**

**Diajukan Kepada: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas
Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang Untuk Memenuhi Salah
Satu Persyaratan dalam Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2024**

**METABOLITE PROFILING EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos
caudatus*) DENGAN METODE UPLCMS/MS DAN NETWORK
PHARMACOLOGY UNTUK PENENTUAN MEKANISME MOLEKULER
PADA PENGOBATAN KANKER KOLON**

SKRIPSI

Oleh:
FARIDATUL AFIFAH
NIM.210703110050

Telah diperiksa dan Disetujui untuk Diuji

Tanggal:

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



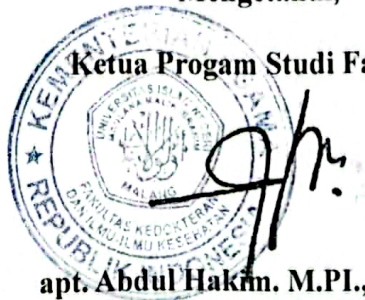
Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, SF., M.
NIP. 19800203 200912 2 003



Dr. apt. Rahmi Annisa., M. Farm
NIP. 19890416 202321 2 051

Mengetahui,

Ketua Progam Studi Farmasi



apt. Abdul Hakim. M.PI., M.Farm
NIP. 19761214 100912 1 002

**METABOLITE PROFILING EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos
caudatus*) DENGAN METODE UPLCMS/MS DAN NETWORK
PHARMACOLOGY UNTUK PENENTUAN MEKANISME MOLEKULER
PADA PENGobatan KANKER KOLON**

SKRIPSI

**Oleh:
FARIDATUL AFIFAH
NIM.210703110050**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Disyaratkan
Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Mmperoleh Gelar Sarjana
Farmasi (S.Farm)
Tanggal:**

**Ketua Penguji : Dr. apt. Rahmi Annisa, M.Farm.
NIP. 19890416 202321 2 051**

**Anggota Penguji : 1. Dr. Begum Fauziyah, SSi, M.Farm.
NIP 19830628 200912 2 004
2. Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes.
NIP 19800203 200912 2 003
3. Muhammad Amiruddin, Lc., M.Pd.
NIP 19780317 20180201 1 218**

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi Farmasi**



**apt. Abdul Hakim, M.P.I., M.Farm
NIP. 19761214 200912 1 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Faridatul Afifah

NIM : 210703110050

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan

Judul : *Metabolite Profiling* Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan Metode UPLC-MS/MS dan *Network Pharmacology* untuk Penentuan Mekanisme Molekuler pada Pengobatan Kanker Kolon

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 November 2024

Yang membuat pernyataan,



Faridatul Afifah
210703110050

MOTTO

Hidup bukan untuk saling mendahului
Bayangan yang diciptakan oleh mentari ada karena maksud terpuji
Untukmu cintai diri sendiri
-Mata air, Hindia-

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'alamin

Puji Syukur tidak henti-hentinya saya ucapkan kepada Allah SWT dan Rasulullah SAW atas kehadiran dan Rahmat-Nya sehingga skripsi ini terselesaikan.

Dengan rasa hormat dan syukur yang teramat dalam, karya tulisan ini penulis persembahkan kepada:

Terimakasih kepada diriku atas segala usaha dan kerja keras yang telah dilakukan. Kepada diriku yang dulu ragu, sekarang aku membuktikan bahwa aku mampu. Terima kasih atas keberanian dan kepercayaan diri yang terus tumbuh.

Kepada Ummi Nurhayati tercinta yang selalu memberikan kasih sayang tanpa batas dan menjadi tempat ternyaman untuk berbagi. Terima kasih atas segala pengorbanan dan dukungan yang tak terhingga.

Kepada cinta pertama saya yaitu almarhum Aba tercinta, Aba Syamsuddin yang selalu berada di hati. Meskipun kita berada di dunia yang berbeda kasih sayang dan doa Aba akan selalu menjadi semangatku. I love you in every universe,
Aba<3

Kepada kakak Imamatus Zahroh dan Nurus Syamsiyah yang selalu menjadi inspirasi. Terima kasih atas segala dukungan dan kasih sayangnya. Kepada adikku tercinta Zain Farhany yang turut mendoakan saya hingga dapat berjuang sampai pada tahap ini. Kepada ponakanku yang lucu menggemaskan Afthan dan Qya yang selalu menjadi *mood booster* dalam menjalani hari-hari.

Terima kasih penulis ucapkan dengan sangat kepada Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes. dan Dr. apt. Rahmi Annisa, M.Farm. atas dukungan serta bimbingannya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Terima kasih kepada sahabat-sahabatku (Dira, Nafila, Rahayu, Karin, Dila, Dita, Ima, Yunita, Laras, Nuris, Lisa, Fatim, Isma) yang selalu menemani, menghibur, dan membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Dengan segala kerendahan hati, puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “*Metabolite Profiling* Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan Metode UPLC-MS/MS dan *Network Pharmacology* untuk Penentuan Mekanisme Molekuler pada Pengobatan Kanker Kolon” ini. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis mengucapkan terima kasih, bersama dengan doa serta harapan kepada seluruh pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini. Ucapan Terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. HM. Zainuddin, MA. selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah memberikan banyak pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Prof. Dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M.Kes., Sp.Rad (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. apt. Abdul Hakim, M.P.I., M.Farm selaku ketua program studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. apt. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes. dan Dr. apt. Rahmi Annisa, M.Farm selaku dosen pembimbing skripsi, yang sudah memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. Dr. Begum Fauziyah, S.Si, M.Farm. dan Ustadz Muhammad Amiruddin, Lc., M.Pd. selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, waktu dan tenaga.
6. Segenap civitas akademika Program Studi Farmasi, khususnya seluruh dosen yang telah memberikan ilmu dan bimbingannya.
7. Bapak dan Ibu tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, dan ridhonya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
8. Kakak dan adik yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
9. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari berbagai pihak.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 28 November 2024

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG, SIMBOL, DAN SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xvi
مستخلص البحث.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	9
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.4. Manfaat Penelitian	10
1.5. Batasan Masalah	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1. Tinjauan Kanker Kolon.....	12
2.1.1. Definisi Kanker Kolon	12
2.1.2. Epidemiologi Kanker Kolon	13
2.1.3. Etiologi dan Faktor Risiko Kanker Kolon	14
2.1.4. Patofisiologi Kanker Kolon	17
2.1.5. Penatalaksanaan Kanker Kolon.....	20
2.2. Tinjauan Tanaman Kenikir	23

2.2.1. Taksonomi <i>Cosmos caudatus</i>	23
2.2.2. Deskripsi Tanaman	24
2.2.3. Morfologi Tanaman	24
2.2.4. Kandungan dan Manfaat	26
2.3. Tinjauan Ekstraksi	30
2.3.1. Ekstraksi Metode Ultrasonic	32
2.4. Tinjauan <i>Metabolite Profiling</i>	37
2.4.1. UPLC-MS/MS	40
2.5. Tinjauan Prediksi Fisikokimia dan Uji Toksisitas	49
2.5.1. Prediksi Fisikokimia	49
2.5.2. Uji Toksisitas	51
2.6. Tinjauan Uji PASS	52
2.6.1. PASS (<i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>)	52
2.6.2. <i>Pubchem</i>	53
2.7. Tinjauan <i>Network pharmacology</i>	55
2.7.1. Definisi	55
2.7.2. Proses dalam Penelitian <i>Network pharmacology</i>	56
2.7.3. Database dan Perangkat Lunak <i>Network pharmacology</i>	60
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	64
3.1. Bagan Kerangka Konseptual	64
3.2. Uraian Kerangka Konseptual	65
BAB IV METODE PENELITIAN	67
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	67
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian	67
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian	67
4.3.1. Populasi	67
4.3.2. Sampel	67
4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	68
4.4.1. Variabel Bebas	68
4.4.2. Variabel Terikat	68
4.4.3. Variabel Kontrol	68
4.5. Definisi Operasional	68
4.6. Alat dan Bahan	71
4.6.1. Alat	71

4.6.2. Bahan	71
4.7. Prosedur Penelitian.....	72
4.7.1. Skema Penelitian	72
4.7.2. Prosedur Kerja	73
4.7.3. Analisis Data.....	76
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	77
5.1. Determinasi Tanaman <i>Cosmos caudatus</i>	77
5.2. Preparasi Sampel Daun <i>Cosmos caudatus</i>	78
5.3. Penentuan Kadar Air Serbuk Daun <i>Cosmos caudatus</i>	79
5.4. Ekstraksi Daun <i>Cosmos caudatus</i>	80
5.5. <i>Metabolite profiling</i> menggunakan UPLC-MS/MS.....	84
5.6. Prediksi Fisikokimia Senyawa	94
5.7. Uji Toksisitas Senyawa	97
5.8. Prediksi Aktivitas Biologis Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	100
5.9. <i>Network pharmacology</i>	102
5.9.1. Hasil Pengumpulan Gen Target melalui <i>GeneCards</i>	102
5.9.2. Hasil Pengumpulan Gen Target Kanker Kolon melalui DisGeNet.....	103
5.9.3. Hasil Prediksi dan Visualisasi Gen Target <i>Cosmos caudatus</i> pada Kanker Kolon.....	104
5.9.4. Analisis Interaksi Protein-Protein (PPI) melalui STRING.....	108
5.9.5. Analisis <i>Gene ontology</i>	109
5.9.6. Analisis Jalur Persinyalan Kanker Kolon.....	118
5.10. Integrasi Penelitian dengan Kajian Al-Qur'an.....	125
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	128
6.1. Kesimpulan	128
6.2. Saran.....	129
DAFTAR PUSTAKA.....	130
LAMPIRAN.....	130

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Perbandingan antara UPLC dan HPLC	18
Tabel 4.1. Metabolite profiling	18
Tabel 4.2. Parameter prediksi fisikokimia	69
Tabel 4.3. Parameter uji toksisitas	69
Tabel 4.4. Parameter uji PASS	70
Tabel 4.5. Database dan perangkat lunak network pharmacology	70
Tabel 5.1. Interpretasi hasil pemprofilan metabolit sekunder dalam daun <i>Cosmos caudatus</i>	89
Tabel 5.2. Hasil prediksi fisikokimia senyawa daun <i>Cosmos caudatus</i>	95
Tabel 5.3. Hasil prediksi toksisitas senyawa daun <i>Cosmos caudatus</i>	98
Tabel 5.4. Hasil prediksi aktivitas biologi tanaman <i>Cosmos caudatus</i> sebagai antikanker melalui PASS online	100
Tabel 5.5. Hasil pengumpulan gen target senyawa melalui <i>GeneCards</i> dengan <i>relevance score</i> ≥ 7	103
Tabel 5.6. Gen target <i>Cosmos caudatus</i> yang beririsan dengan kanker kolon ...	105
Tabel 5.7. Hasil pembacaan visualisasi network pharmacology melalui <i>Cytoscape</i> dari <i>Cosmos caudatus</i> pada kanker kolon	106
Tabel 5.8. Proses biologis gen target <i>Cosmos caudatus</i> dan kanker kolon	110
Tabel 5.9. Fungsi molekuler gen target <i>Cosmos caudatus</i> pada kanker kolon	113
Tabel 5.10. Komponen seluler gen target <i>Cosmos caudatus</i> dan kanker kolon ..	116
Tabel 5.11. KEGG <i>Pathway</i> gen target <i>Cosmos caudatus</i> dan kanker kolon	118

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Anatomi usus besar dan rectum	18
Gambar 2.2. Penampang dinding usus.	19
Gambar 2.3. Tanaman Kenikir.....	25
Gambar 2.4. Efek Kavitasi Ultrasonik.....	33
Gambar 2.5. Mekanisme ekstraksi ultrasonic.....	34
Gambar 2.6. Perpindahan dua komponen dalam suatu campuran.....	41
Gambar 2.7. Skema sistem UPLC.....	44
Gambar 2.8. Sistem UPLC	44
Gambar 2.9. Diagram alir UPLC	46
Gambar 2.10. Alur kerja pkCSM.....	50
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	65
Gambar 4.1 Skema Penelitian	73
Gambar 5.1 Sampel Daun Cosmos caudatus.....	73
Gambar 5.2 Ekstrak kental daun Cosmos caudatus.....	83
Gambar 5.3 Kromatogram sampel daun Cosmos caudatus	88
Gambar 5.4 Diagram venn 106 gen target dari daun Cosmos caudatus terhadap 270 gen target dengan berbagai tipe disease dari kanker kolon.....	104
Gambar 5.5 Visualisasi Network pharmacology melalui cytoscape v3.10.3. ...	105
Gambar 5.6 Interaksi protein-protein senyawa dalam Cosmos caudatus terhadap kanker kolon.....	108
Gambar 5.7 Diagram batang enrichment proses biologis, komponen seluler, dan fungsi seluler	109
Gambar 5.8 Diagram gelembung enrichment dari 10 proses biologis dengan potensi terbesar.....	110
Gambar 5.9 Diagram gelembung dari 10 fungsi molekuler dengan potensi terbesar	113
Gambar 5.10 Diagram gelembung dari 10 komponen seluler dengan potensi terbesar	115
Gambar 5.11 Jalur persinyalan colorectal cancer pada KEGG Pathway.....	120

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Tanaman Kenikir.....	148
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian	149
Lampiran 3 Tabel Hasil	152

DAFTAR LAMBANG, SIMBOL, DAN SINGKATAN

$\geq$	: lebih dari atau sama dengan
$\leq$	: kurang dari atau sama dengan
%	: persen
Å	: Angstrom
WHO	: <i>World Health Organization</i>
UPLC-MS	: <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LD ₅₀	: <i>Lethal Dose</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
NCCN	: <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
TG	: trigliserida
LDL	: <i>low-density lipoprotein</i>
HDL	: <i>high-density lipoprotein</i>
UAE	: <i>Ultrasonic-assisted extraction</i>
GC-MS	: <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
CE-MS	: <i>Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry</i>
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HPLC	: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
TUV	: <i>Tunable Ultraviolet</i>
ELS	: <i>Evaporation Light Scattering</i>
PDA	: <i>Photo Diode Array</i>
FLR	: <i>Fluorescen</i>
MW	: <i>Molecular Weight</i>
HBA	: <i>Hydrogen Bond Acceptors</i>
HBD	: <i>Hydrogen Bond Donors</i>
PSA	: <i>Polar Surface Area</i>
GHS	: <i>Globally Harmonized System</i>
PASS	: <i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>
SMILES	: <i>simplifield molecular-input line-entry system</i>

FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
UNHs	: <i>Unique Ingredient Identifiers</i>
SRS	: <i>Substance Registry Services</i>
EPA	: <i>Environmental Protection Agency</i>
PPI	: <i>Protein-protein Interactions</i>
Pa	: <i>probability activity</i>
ESI	: <i>Electrospray Ionization</i>
CID	: <i>Compound Identifier</i>
Gifts	: <i>GeneCards Inferred Functionally Score</i>
BP	: <i>Biological Process</i>
MF	: <i>Molecular Function</i>
KEGG	: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
CRC	: <i>Colorectal Cancer</i>

ABSTRAK

Afifah, F. 2024. *Metabolite Profiling* Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan Metode UPLC-MS/MS dan *Network Pharmacology* untuk Penentuan Mekanisme Molekuler pada Pengobatan Kanker Kolon. Skripsi. Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Prof. Dr. apt. Roihatul Mutiah, M. Kes; Pembimbing II: Dr. apt. Rahmi Annisa, M. Farm.

Kanker kolon adalah kanker gastrointestinal yang paling umum terjadi. Metode pengobatan yang ada saat ini bersifat nonselektif dapat menimbulkan efek toksik pada sel normal lainnya, sehingga dibutuhkan pendekatan terapi baru untuk kanker yaitu menggunakan tanaman herbal. *Cosmos caudatus* merupakan salah satu tanaman yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi profil metabolit dan mekanisme molekuler ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dalam pengobatan kanker kolon. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksperimental yaitu dengan mengidentifikasi profil metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan UPLC-QToF-MS/MS dan analisis secara *in silico* untuk menentukan mekanisme molekuler senyawa ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Profil metabolit menunjukkan 28 senyawa, dengan beberapa senyawa memiliki aktivitas sebagai antikanker kolon seperti quercetin, adenin, dan 1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine. 3 komponen senyawa tersebut memiliki 18 gen target potensial yang menargetkan berbagai jalur sinyal terkait kanker kolon, seperti Wnt/ β -catenin *signaling pathway*, MAPK *signaling pathway*, ErbB *signaling pathway*, apoptosis dan p53 *signaling pathway*. Quercetin, adenin, dan 1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) berpotensi sebagai antikanker kolon.

Kata kunci: Kenikir (*Cosmos caudatus*), kanker kolon, metabolite profiling, network pharmacology.

ABSTRACT

Afifah, F. 2024. Metabolite Profiling of *Cosmos caudatus* Leaf Extract Using UPLC-MS/MS and Network Pharmacology for Molecular Mechanism Elucidation in Colon Cancer Treatment. Undergraduate Thesis. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisors I: Prof. Dr. apt. Roihatul Mutiah, M. Kes; Suoervisors II: Dr. apt. Rahmi Annisa, M. Farm.

Colon cancer is the most common type of gastrointestinal cancer. Current treatment methods are non-selective, leading to toxic effects on normal cells, highlighting the need for new therapeutic approaches, including the use of herbal plants. *Cosmos caudatus* is one of the plants with potential anticancer activity. This study aimed to identify the metabolite profile and molecular mechanism of *Cosmos caudatus* leaf extract in colon cancer treatment. A descriptive experimental method was employed by analyzing the metabolite profile of the 96% ethanol extract of *Cosmos caudatus* leaves using UPLC-QToF-MS/MS and conducting an in silico analysis to determine the molecular mechanism of the compounds in the 96% ethanol extract of *Cosmos caudatus* leaves. The metabolite profiling identified 28 compounds, some of which exhibited anticancer activity, such as quercetin, adenine, and 1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine. These three compounds targeted 18 potential genes associated with various cancer-related signaling pathways, including the Wnt/ β -catenin signaling pathway, MAPK signaling pathway, ErbB signaling pathway, apoptosis, and p53 signaling pathway. Quercetin, adenine, and 1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine from the 96% ethanol extract of *Cosmos caudatus* leaves demonstrate potential as colon cancer therapeutics.

Keywords: *Cosmos caudatus*, colon cancer, metabolite profiling, network pharmacology.

مستخلص البحث

عفيفة، ف. 2024. تحديد ملامح الميتابوليت لمستخلص أوراق الكينيكير (*Cosmos caudatus*) بواسطة UPLC-MS/MS وطرق علم الأدوية الشبكية لتحديد الآليات الجزيئية في علاج سرطان القولون. البحث الجامعي. قسم الصيدلة، كلية الطب والعلوم الصحية، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانق.المشرفة I: الأستاذة الدكتورة رائحة المطيعة، الماجستير؛ المشرفة II: الدكتورة رهمي النساء، الماجستير

سرطان القولون هو أكثر سرطانات الجهاز الهضمي شيوعًا. طرق العلاج الحالية غير انتقائية وتسبب تأثيرات سامة على الخلايا الطبيعية الأخرى، لذلك هناك حاجة إلى نهج علاجي جديد للسرطان، وهو استخدام النباتات العشبية. كوزموس كوداتوس من النباتات التي لديها القدرة على أن يكون لها نشاط مضاد للسرطان. كوزموس كوداتوس هو من النباتات التي يحتمل أن يكون لها نشاط مضاد للسرطان. استهدف هذا البحث إلى معرفة خصائص المستقبلات والآلية الجزيئية لمستخلص أوراق الكينيكير (*Cosmos caudatus*) في علاج سرطان القولون. ويستخدم هذا البحث طريقة وصفية تجريبية من خلال تحديد ملامح المستقبلات لمستخلص الإيثانول 96 من أوراق الكينيكير (كوزموس كوداتوس) باستخدام UPLC-QToF-MS/MS والتحليل السيليكو لتحديد الآلية الجزيئية لمركب مستخلص الإيثانول 96% من أوراق الكينيكير (كوزموس كوداتوس). أظهر ملف المستقبل 28 مركبًا، مع وجود بعض المركبات التي لها نشاط مضاد للسرطان في القولون مثل الكيرسيتين والأدينين و H-1 بيرازولو(4,3-d)بيريميدين-4-أمين. تحتوي المركبات الثلاثة المكونة على 18 جينًا مستهدفًا محتملاً يستهدف مختلف مسارات الإشارات المتعلقة بسرطان القولون، مثل مسار إشارات Wnt/ β -catenin ، ومسار إشارات MAPK ، ومسار إشارات ErbB ، ومسار إشارات apoptosis ، ومسار إشارات p53. إن الكيرسيتين والأدينين و H-1 بيرازولو(4,3-d)بيريميدين-4-أمين من مستخلص 96% من الإيثانول من أوراق الكينيكير (كوزموس كوداتوس) لها إمكانات مضادة للسرطان في القولون مع الآليات الجزيئية لمسار إشارات Wnt/ β -catenin ومسار إشارات MAPK ومسار إشارات ErbB ومسار إشارات ErbB وموت الخلايا المبرمج ومسار إشارات p53.

الكلمات المفتاحية: كينيكير (كوزموس كوداتوس)، سرطان القولون، تحديد ملامح المستقبل، علم الأدوية الشبكي.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan terjadinya proliferasi sel-sel abnormal yang tidak terkendali dan berpotensi menyebar ke bagian tubuh lain (Hapsari dan Setyawan, 2023). Sampai saat ini kanker menjadi salah satu penyakit utama yang banyak menyerang kesehatan manusia dan mempunyai angka kematian yang tinggi. Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* dari WHO pada tahun 2022, kejadian kanker secara global mencapai 19.976.499 jiwa dengan angka kematian mencapai 9.743.832 jiwa. Indonesia sendiri tercatat memiliki kejadian kanker sebanyak 408.661 jiwa dengan angka kematian mencapai 242.988 jiwa. Kanker yang paling umum terjadi adalah kanker payudara dengan presentase 16,2%, diikuti kanker paru-paru dengan presentase 9,5%, diikuti kanker serviks dengan presentase 9,0%, dan kanker kolon dengan presentase 8.7% dari total kasus. Insiden dan prevalensi kanker secara keseluruhan meningkat karena peningkatan faktor risiko seperti merokok, obesitas, dan gaya hidup yang tidak sehat (Douaiher *et al.*, 2017).

Kanker kolon adalah kanker gastrointestinal yang paling umum terjadi (Ozogul *et al.*, 2014). Angka kejadian kanker kolon diperkirakan meningkat sebesar 80% pada tahun 2035, mencapai sekitar 2,4 juta kasus dan menyumbang 1,3 juta kematian di seluruh dunia (Douaiher *et al.*, 2017). Saat ini, di Indonesia kanker kolon merupakan kanker terpopuler kedua pada pria dengan angka

kejadian sebanyak 21.903 kasus dan kanker keempat yang terjadi pada wanita dengan angka kejadian sebanyak 13.773 kasus. Kanker kolon menjadi penyebab kematian terbanyak kelima akibat kanker dengan angka kejadian sebanyak 19.255 kasus kematian pada tahun 2022 (Ferlay *et al.*, 2022). Angka tersebut akan berbeda pada setiap negara tergantung pada tingkat pembangunan ekonomi. Hal ini karena sebagian besar faktor risiko berkaitan dengan pola makan dan gaya hidup (Gandomani *et al.*, 2017).

Pengobatan kanker yang umum dilakukan adalah dengan pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi (Hapsari dan Setyawan, 2023; Sirait dan Astuti, 2019). Pemilihan terapi tersebut tergantung pada jenis tumor dan penggunaannya (Muti'ah *et al.*, 2020). Salah satu tujuan pengobatan kanker adalah untuk memperpanjang hidup pasien dan memastikan kualitas hidup pasien (Lee *et al.*, 2019). Akan tetapi terapi konvensional yang umum dilakukan masih bersifat nonselektif karena menimbulkan efek toksik pada sel normal lainnya. Terapi radiasi dapat merusak sel, organ, dan jaringan yang sehat. Sementara obat-obatan kemoterapi dapat merusak sel-sel sehat, terutama sel-sel yang membelah dan tumbuh dengan cepat. Kemudian kesulitan dalam menentukan dosis, kurangnya spesifisitas, dan metabolisme obat yang cepat juga menjadi keterbatasan dari kemoterapi, meskipun kemoterapi ini telah mampu mengurangi morbiditas dan mortalitas kanker (Debela *et al.*, 2021). Selain itu, pengobatan-pengobatan tersebut dinilai mahal dan memiliki efek samping yang serius (Hapsari dan Setyawan, 2023). Oleh karena itu, perlu pengembangan bahan obat baru dalam terapi kanker yang meningkatkan dan mempertahankan efek terapeutik, memiliki

target terapi yang spesifik, aman terhadap sel normal, serta biaya terjangkau dengan memanfaatkan senyawa dari bahan alam.

Selama beberapa tahun terakhir, telah digunakan beberapa bentuk pengobatan komplementer dan alternatif. Adapun bentuk-bentuk pengobatan komplementer dan alternatif berupa penggunaan bahan alam, terapi jasmani dan rohani, serta praktik pengobatan tradisional (Keene *et al.*, 2019). Penggunaan pengobatan komplementer dan alternatif bertujuan untuk meningkatkan kekebalan tubuh, menghilangkan rasa sakit, mengendalikan efek samping yang disebabkan oleh penyakit atau pun pengobatan, serta meningkatkan kualitas hidup pasien saat dan setelah pengobatan (Lee *et al.*, 2019).

Bahan alam berasal dari tumbuhan, hewan, bakteri, dan jamur, yang digunakan sebagai sediaan obat baik dalam bentuk ekstrak maupun dalam bentuk isolat murni (Safitri *et al.*, 2020). Di bidang kesehatan, bahan alam dimanfaatkan sebagai bahan dasar obat atau sebagai salah satu bahan pendukung, hal ini karena penggunaan bahan alam dinilai lebih aman daripada pengobatan dengan bahan kimia (Pahlani *et al.*, 2021). Sumber daya alam Indonesia yang melimpah dapat dimanfaatkan sebagai alternatif obat berbasis bahan alam. Pemanfaatan tumbuhan sebagai alternatif pengobatan kanker saat ini sudah mulai dilirik oleh masyarakat dan terus ditingkatkan seiring dengan perkembangan teknologi dan ilmu pengetahuan. Hal tersebut merupakan tanda bahwa Allah SWT menciptakan manusia sekaligus dengan kebutuhan hidupnya yakni tumbuh-tumbuhan yang bisa dimanfaatkan seperti buah-buahan dan sayur-sayuran untuk kesenangan hidup, sebagai obat, bahan pakan, dan lain-lain. Firman Allah dalam Al-Qur'an Surah 'Abasa ayat 24-32 sebagai berikut:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ۚ ٢٤ أَنَّا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ٢٥ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ٢٦

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ٢٧ وَعِنَبًا وَقَضْبًا ٢٨ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ٢٩ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ٣٠ وَفَاكِهَةً وَأَبًّا ٣١

مَتَّعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ ٣٢

Artinya: “Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya Kami telah mencurahkan air (dari langit) dengan berlimpah. Kemudian, Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya. Lalu, Kami tumbuhkan padanya biji-bijian, anggur, sayur-sayuran, zaitun, pohon kurma, kebun-kebun (yang) rindang, buah-buahan, dan rerumputan. (Semua itu disediakan) untuk kesenanganmu dan hewan-hewan ternakmu.” (Q.S. ‘Abasa: 24-32).

Menurut tafsir al-misbah, dalam firman Allah SWT di atas mengandung makna bahwa mengajak manusia untuk berfikir luas ke depan dimana Allah SWT menumbuhkan tumbuhan dengan kemampuan dapat berkembang biak sendiri menggunakan bagian dari tubuhnya sehingga tumbuhan dapat tumbuh dengan baik dan bermanfaat (Shihab, 2002). Manusia dituntut untuk memiliki pola pikir yang cerdas secara luas terhadap tumbuhan dimana tumbuhan tidak akan diciptakan oleh Allah SWT tanpa memiliki manfaat di muka bumi ini, sehingga manusia harus menggali khasiat yang terkandung di dalam tumbuh-tumbuhan tersebut. Tumbuh-tumbuhan yang baik yaitu memiliki berbagai manfaat di dalamnya bagi hamba-Nya baik hewan maupun manusia, salah satunya yaitu sebagai tanaman obat.

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brazil dengan jumlah jenis tanaman lebih dari 30.000 jenis tanaman (Triatmoko *et al.*, 2020). Keanekaragaman tersebut dapat dimanfaatkan oleh masyarakat untuk berbagai keperluan salah satunya sebagai tanaman obat. Sejak dahulu masyarakat Indonesia telah mengenal dan memanfaatkan tumbuhan

berkhasiat obat sebagai salah satu upaya untuk menanggulangi masalah kesehatan. Terdapat banyak tanaman yang terbukti dapat digunakan sebagai tanaman obat pada beberapa penyakit salah satunya yaitu kenikir. Kenikir (*Cosmos caudatus*) merupakan tanaman tropis yang termasuk dalam keluarga Astraceae dan berasal dari Amerika Tengah serta beberapa wilayah tropis lainnya (Indriyani *et al.*, 2021).

Cosmos caudatus telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia secara empiris untuk mengobati batuk, sakit gigi, melancarkan buang air besar, dan infeksi cacing (Triatmoko *et al.*, 2020). Penelitian-penelitian sebelumnya telah dilakukan pada ekstrak *Cosmos caudatus* terutama pada daunnya mengungkapkan berbagai sifat farmakologi seperti antibakteri, antiinflamasi, agen pelindung tulang, antidiabetes, dan antikanker (Moshawih *et al.*, 2017; Safitri *et al.*, 2020; Uzbek dan Shahidan, 2019; Yusoff *et al.*, 2022). *Cosmos caudatus* mengandung berbagai senyawa aktif antara lain flavonoid, saponin, terpenoid, alkaloid, tannin, karotenoid, asam fenolik, dan minyak atsiri (Dwiyanti *et al.*, 2014; Herlina *et al.*, 2021). Flavonoid yang terdapat pada *Cosmos caudatus* berupa quercetin, quercitrin, avicularin, rutin, isoquercitrin, dan vitexin (Rafi *et al.*, 2023). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder berupa senyawa flavonoid pada *Cosmos caudatus* berperan sebagai antikanker dengan aktivitas sitotoksik, apoptosis, dan antiproliferasi terhadap sel kanker (Adawiyah *et al.*, 2017). Penelitian sebelumnya mengenai *moleckular docking Cosmos caudatus* mengungkapkan bahwa kandungan senyawa lutein pada kenikir berpotensi sebagai antikanker dengan menstimulasi caspase-8 sehingga menginduksi apoptosis sel kanker (Safitri *et al.*, 2020). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Ramadhan *et al* (2018) mengungkapkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam daun kenikir

memiliki sifat sitotoksik yang berpotensi sebagai antikanker (Ramadhan *et al.*, 2018).

Kualitas dan khasiat dari suatu tanaman obat dipengaruhi oleh komposisi serta jumlah senyawa aktif terutama metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya (Rafi *et al.*, 2018). Efek farmakologi dan kemanjuran ekstrak kenikir tersebut merupakan cerminan dari ratusan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya, bukan satu atau beberapa senyawa. Oleh karena itu penting untuk dilakukan pengidentifikasian dan pemprofilan metabolit sekunder dari daun kenikir agar dapat diketahui jumlah senyawa kimia serta profil metabolit sekundernya. Profil metabolit dapat didefinisikan sebagai kumpulan semua kandungan metabolit atau turunannya (sudah teridentifikasi atau pun belum diketahui) yang terdeteksi dengan menganalisis sampel menggunakan teknik analisis tertentu, ditambah dengan perkiraan kuantitasnya (Villas-Bôas *et al.*, 2005). Peran profil metabolite dalam dunia farmasi sangat penting dalam melakukan studi penemuan dan pengembangan obat baru, dalam karakterisasi keadaan patologis serta gangguan sel dan organisme, dalam studi fisiologis dan taksonomi, dan dalam metabolomik (Burhan *et al.*, 2020; Villas-Bôas *et al.*, 2005). Identifikasi dan kuantifikasi metabolit yang dihasilkan suatu tanaman merupakan hal penting dalam penemuan dan pengembangan obat baru berbasis bahan alam. Selain itu, informasi struktural metabolit sangat penting dalam penemuan obat baru untuk mengidentifikasi dan menetapkan profil metabolit serta laju biotransformasi obat dengan cepat (Saurina and Sentellas, 2017).

Penentuan profil metabolit pada ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan metode UPLC-MS/MS memiliki signifikansi yang penting dalam

penelitian ilmiah. UPLC-MS menghasilkan data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif didapatkan dari penemuan senyawa pada setiap puncak kromatogram dan data kuantitatif didapatkan dari presentase kadar setiap senyawa berdasarkan luas area puncak kromatogram (Hakim *et al.*, 2018). Metode ini memungkinkan identifikasi dan karakterisasi lebih tepat terhadap senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam suatu ekstrak (Susanti dan Istianasari, 2022). Selain itu, metode UPLC-MS/MS ini memiliki kinerja resolusi yang optimal dalam menghasilkan data kromatogram yang ideal, proses analisis dan kontrol data yang cepat, pengukuran massa dan informasi data struktural yang akurat, penggunaan pelarut yang minim, teknologi partikel kimia yang stabil, optimalisasi sistem, desain detektor, pemrosesan data yang cepat, kemampuan mendeteksi metabolit secara luas, sensitivitas dan selektivitas yang tinggi sehingga menghasilkan data yang konsisten dan akurat, waktu dan biaya berkurang (Annisa *et al.*, 2020 ; Mutiah *et al.*, 2018 ; Chawla and Ranjan, 2016). Kemudian *double MS* dapat menghasilkan pengukuran massa monoisotop yang lebih akurat, spektra dengan resolusi tinggi untuk mengkonfirmasi target senyawa yang sudah terdeteksi maupun senyawa yang belum terdeteksi, dengan proses yang lebih cepat tanpa menurunkan resolusi massa (Ma'arif *et al.*, 2019).

Mengingat data pada penelitian sebelumnya masih sangat terbatas, penentuan profil metabolit ini dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai komposisi kimia dari tanaman kenikir tersebut. Informasi dan data yang diperoleh dari profil metabolit dapat menjadi dasar untuk penelitian lanjutan mengenai aktivitas biologis, potensi farmakologis, serta potensi pengembangan produk-produk terapeutik berbasis tanaman kenikir. Dengan demikian, penentuan profil

metabolit menggunakan metode UPLC-MS/MS memiliki dampak yang signifikan dalam mengembangkan pengetahuan tentang potensi serta manfaat dari ekstrak daun kenikir dalam bidang kesehatan.

Salah satu cara untuk mempelajari lebih lanjut tentang bagaimana zat aktif dari ekstrak daun kenikir menghasilkan efek terapeutik adalah dengan memprediksi jaringan gen yang dipengaruhi oleh senyawa aktif dari tanaman obat (Noor *et al.*, 2022). *Network pharmacology* atau farmakologi jaringan berperan dalam penemuan dan pengembangan obat dengan mengintegrasikan pengobatan sistematis dengan ilmu informasi (Dong *et al.*, 2021). *Network pharmacology* merupakan pendekatan *in silico* integratif untuk membangun jaringan “protein-senyawa atau penyakit-gen” untuk menjelaskan mekanisme yang mendasari efek terapeutik sinergis dari suatu obat-obatan tradisional (Noor *et al.*, 2022).

Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui potensi tanaman *Cosmos caudatus* dan mekanisme yang akan terjadi di dalam tubuh tidak terbatas pada satu target dan satu jalur persinyalan, namun dapat memaparkan keseluruhan aktivitas yang terjadi atau disebut dengan multitarget. Selain itu profil fisikokimia dan toksisitas juga perlu dilakukan untuk memperoleh obat dengan bioavailabilitas yang baik dan aman. Terwujudnya *Network pharmacology* senyawa ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) diharapkan dapat memberikan kontribusi untuk penelitian selanjutnya dalam pengembangan daun kenikir sebagai agen pengobatan kanker kolon sehingga dapat membantu para penderita dalam mengatasi kanker kolon dan memberikan solusi terhadap kegagalan terapi.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang didapatkan dari analisis hasil UPLC-QToF-MS/MS?
2. Apakah senyawa mayor yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*)?
3. Apakah senyawa metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang memiliki aktivitas antikanker kolon berdasarkan nilai *probability activity*, memenuhi hukum lima Lipinski, dan memiliki nilai LD₅₀ yang aman secara *in silico*?
4. Apakah gen target senyawa metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berhubungan dengan kanker kolon?
5. Apakah jalur persinyalan paling potensial dari senyawa metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berhubungan dengan kanker kolon?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang didapatkan dari analisis hasil UPLC-QToF-MS/MS
2. Mengetahui senyawa mayor yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*).
3. Mengetahui senyawa metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang memiliki aktivitas antikanker kolon berdasarkan nilai *probability activity*, memenuhi hukum lima Lipinski, dan memiliki nilai LD₅₀ yang aman secara *in silico*
4. Mengetahui gen target senyawa metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berhubungan dengan kanker kolon.

5. Mengetahui jalur persinyalan yang paling potensial dari senyawa metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berhubungan dengan kanker kolon.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Data berupa kandungan serta struktur kimia, gen target, dan jalur persinyalan dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berpotensi dalam pengobatan kanker kolon dapat menjadi acuan dalam penelitian selanjutnya untuk dikembangkan menjadi obat alternatif bagi penderita kanker kolon.

1.4.2. Manfaat Praktis

Data yang didapat mampu dijadikan landasan pemanfaatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai alternatif dalam pengembangan bahan obat untuk pengobatan kanker kolon.

1.5. Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*).
2. Digunakan metode ultrasonik dalam proses ekstraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan pelarut etanol 96%.
3. Analisis profil metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) menggunakan instrument UPLC-MS/MS.
4. Senyawa yang dilakukan *Network pharmacology* yaitu senyawa yang memenuhi hukum lima Lipinski, uji toksisitas, dan uji PASS

5. Bioaktivitas meliputi antineoplastik, kemopreventif, apoptosis, antikanker kolon
6. Penyakit yang menjadi tujuan penelitian adalah kanker kolon secara umum.
7. Software yang digunakan adalah *Cytoscape*.
8. Database yang digunakan adalah *Pubchem*, *PASS Online*, *PkCSM*, *Protox 3 Online Tools*, *GeneCards*, *DisGeNet*, *STRING*, dan *KEGG Pathway*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Kanker Kolon

2.1.1. Definisi Kanker Kolon

Saat ini kanker merupakan salah satu penyakit utama yang mempengaruhi kesehatan manusia dan memiliki angka kematian yang tinggi (Pacal *et al.*, 2020). Kanker merupakan penyakit tidak menular yang terjadi saat peningkatan dan pertumbuhan sel yang tidak normal di dalam tubuh. Pertumbuhan dan pengembangan sel kanker ini bersifat destruktif atau merusak sel (Retnaningsih *et al.*, 2022).

Kanker kolon adalah kanker yang menyerang daerah jaringan usus besar. Kanker kolon bersal dari polip yang merupakan hasil dari epitel pelapis kolon yang mengalami mutasi sehingga tumbuh menjadi polip yang merupakan lesi prekursor neoplastik. Mutasi ini menyebabkan hiperproliferasi, penipisan musin, dan disintegrasikan sel goblet sehingga homeostasis usus terganggu dan terjadi proses inflamasi secara terus menerus (Haliza *et al.*, 2023).

Kanker kolon merupakan kanker gastrointestinal yang paling umum terjadi (Ozogul *et al.*, 2014). Angka kejadian kanker kolon menyumbang 6,1% dari seluruh kasus kanker yang dilaporkan, dan menyumbang angka kematian sebesar 9,2% (Lubis dan Bestari, 2023). Diperkirakan pada tahun 2035, jumlah kematian akibat kanker kolon akan meningkat sebesar 71,5% (Sawicki *et al.*, 2021). Angka-angka tersebut akan berbeda pada setiap negara tergantung pada tingkat pembangunan ekonomi. Peningkatan angka kejadian kanker kolon juga dipengaruhi oleh gaya

hidup dan pola makan. Oleh karena itu, kanker kolon ini dikenal luas sebagai penanda pembangunan sosial-ekonomi suatu negara (Sawicki *et al.*, 2021). Selain itu kejadian kanker kolon juga meningkat sesuai dengan usia, banyak terjadi pada usia 55 tahun ke atas, pada pasien yang memiliki riwayat keluarga penderita kanker kolon, penyakit inflamasi usus kronis, dan polip (Retnaningsih *et al.*, 2022).

Kanker kolon sebagian besar adalah adenokarsinoma yang muncul dari kelenjar penyusun kolon dan umumnya disebabkan oleh mutasi sporadik. Perkembangan kanker kolon berhubungan dengan faktor risiko yang tidak dapat dikendalikan dan dapat dimodifikasi. Beberapa faktor risiko berasal dari riwayat individu, riwayat keluarga dan risiko genetik, serta gaya hidup (Holle *et al.*, 2020).

2.1.2. Epidemiologi Kanker Kolon

Kanker usus besar atau biasa juga disebut dengan kanker kolon merupakan penyakit kanker ganas ketiga terbanyak di dunia (Retnaningsih *et al.*, 2022). Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* dari WHO pada tahun 2022, kejadian kanker kolon secara global mencapai 1.926.425 jiwa dengan angka kematian mencapai 904.019 jiwa (Globocan, 2024). Pada negara-negara maju secara ekonomi seperti Amerika Serikat, Australia, Selandia Baru, dan Eropa Barat, angka kejadian dan kematian kanker kolon cenderung stabil dan menurun. Hal ini berbeda dengan negara-negara yang memiliki indeks pembangunan sedang hingga rendah, seperti Eropa Timur, Asia, dan Amerika Selatan, dimana angka kejadian dan kematian kanker kolon meningkat pesat. Peningkatan tersebut terkait dengan peningkatan prevalensi faktor risiko yang terkait dengan westernisasi, seperti pola makan yang tidak sehat, obesitas, dan gaya hidup. Tingkat kejadian terendah terjadi

di wilayah kurang berkembang seperti Afrika, Asia Tengah, dan Asia Selatan (Holle *et al.*, 2020).

Kanker kolon lebih banyak terjadi pada laki-laki dengan presentase kejadian 21,9 % dibandingkan pada perempuan yang presentase kejadiannya 15,2%. Perbedaan kejadian kanker kolon terdapat di antara kelompok etnis di Amerika Serikat, dimana kejadian tertinggi terjadi pada orang kulit hitam non-Hispanik, diikuti oleh penduduk asli Amerika Indian/Alaska, kulit putih non-Hispanik, Hispanik/Latin, dan penduduk Asia/Pasifik. Faktor budaya dan genetik serta kesenjangan akses terhadap layanan kesehatan mempengaruhi risiko di antara kelompok populasi tersebut. Faktor-faktor yang mempengaruhi penurunan angka kematian akibat kanker kolon secara keseluruhan meliputi penurunan angka kejadian, program skrining dengan pengangkatan polip dini, dan pengobatan yang lebih efektif dan dapat ditoleransi dengan lebih baik (Holle *et al.*, 2020)

2.1.3. Etiologi dan Faktor Risiko Kanker Kolon

Terdapat dua faktor utama yang mempengaruhi terjadinya kanker kolon, yaitu faktor yang tidak dapat dimodifikasi seperti umur dan genetik, serta faktor yang dapat dimodifikasi seperti gaya hidup (alkohol, merokok, konsumsi daging merah yang tinggi, konsumsi serat yang rendah, dan aktivitas fisik yang rendah) serta obesitas (Lewandowska *et al.*, 2022).

2.1.3.1. Riwayat Medis

a. Usia

Seiring dengan bertambahnya usia, risiko terkena kanker kolon semakin meningkat secara progresif. lebih dari 90% kasus kanker kolon terjadi pada orang yang berusia lebih dari 50 tahun. Angka insidensinya 50 kali lebih tinggi pada orang dengan usia 60-79 tahun dibandingkan orang dengan usia di bawah 40 tahun

(Cronin *et al*, 2018). Usia rata-rata saat didiagnosis kanker kolon adalah 67 tahun pada pria dan 71 tahun pada wanita (Holle *et al.*, 2020). Data tersebut diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Lewandowska *et al* (2022) yang menunjukkan bahwa puncak kejadian terjadi pada kelompok usia 56-66 tahun dengan presentase insidensi 53% dan 67-77 tahun dengan presentase insidensi 33% (Lewandowska *et al.*, 2022).

b. Polip adenomatosa

Individu dengan riwayat polip adenomatosa dengan ukuran 10 mm atau lebih sebelumnya memiliki peningkatan faktor risiko kanker kolon. Individu yang sebelumnya didiagnosis menderita kanker kolon memiliki risiko lebih besar terkena kanker baru di area lain di usus besar jika dibandingkan dengan individu yang tidak memiliki riwayat kanker kolon sebelumnya (Holle *et al.*, 2020).

c. Penyakit radang usus

Individu dengan penyakit radang usus kronis, seperti kolitis ulserativa, memiliki risiko dua kali lipat lebih besar terkena penyakit kanker kolon dibanding dengan individu yang tidak memiliki penyakit radang usus. Risiko ini semakin meningkat seiring dengan meningkatnya luas, durasi, dan tingkat keparahan penyakit. Secara keseluruhan, individu yang didiagnosis dengan penyakit radang usus kronis menyumbang sekitar 1% hingga 2% dari seluruh kasus baru kanker kolon setiap tahunnya (Holle *et al.*, 2020).

2.1.3.2. Riwayat Keluarga dan Risiko Genetik yang Diwarisi

a. Sindrom keturunan

Dua bentuk paling umum dari kanker usus besar hereditas adalah *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) dan sindrom *Lynch*. Kedua bentuk tersebut dihasilkan dari mutasi *germline* tertentu. FAP adalah sifat dominan autosomal

langka yang disebabkan oleh mutasi inaktivasi dari gen *Adenomatous polyposis coli* (APC) dan menyumbang sekitar 1% dari semua kanker kolon. Penyakit ini dimanifestasikan oleh ratusan hingga ribuan polip adenomatosa sesil kecil yang melapisi usus besar dan rektum, biasanya muncul pada masa remaja. Polip terus berkembang biak di seluruh usus besar, dan akhirnya berubah menjadi ganas (Holle *et al.*, 2020).

Sindrom *Lynch* adalah sindrom bawaan autosomal dominan. Pasien dengan sindrom *Lynch* cenderung terkena berbagai jenis kanker (seperti kanker endometrium, perut, ovarium, dan kolorektal). Mutasi germline pada salah satu gen perbaikan ketidakcocokan DNA (MMR), paling sering terjadi MLH1, MSH2, MSH6, atau PMS2, atau molekul adhesi sel epitel (EpCAM), dan berpengaruh pada sindrom *Lynch* (Holle *et al.*, 2020)

b. Polimorfisme Enzim

Polimorfisme genetik pada enzim yang memetabolisme obat, seperti N-asetiltransferase (NAT1 dan NAT2), isoenzim sitokrom P450 (CYP), enzim glutathione-S-transferase, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), dan mutase gen hemochromatosis, dapat menyebabkan kerentanan genetik terhadap kanker kolon. Variasi tertentu dalam genotip enzim yang memetabolisme obat dapat memberikan kerentanan yang lebih besar terhadap karsinogen makanan atau lingkungan (Holle *et al.*, 2020).

2.1.3.3. Faktor Pola Hidup

a. Obesitas dan Kurangnya Aktivitas Fisik

Ketidakaktifan fisik dan peningkatan massa tubuh (BMI) berhubungan dengan peningkatan risiko adenoma usus besar, kanker usus besar, dan kanker rektum. Individu dengan Tingkat aktivitas yang lebih tinggi memiliki risiko paling

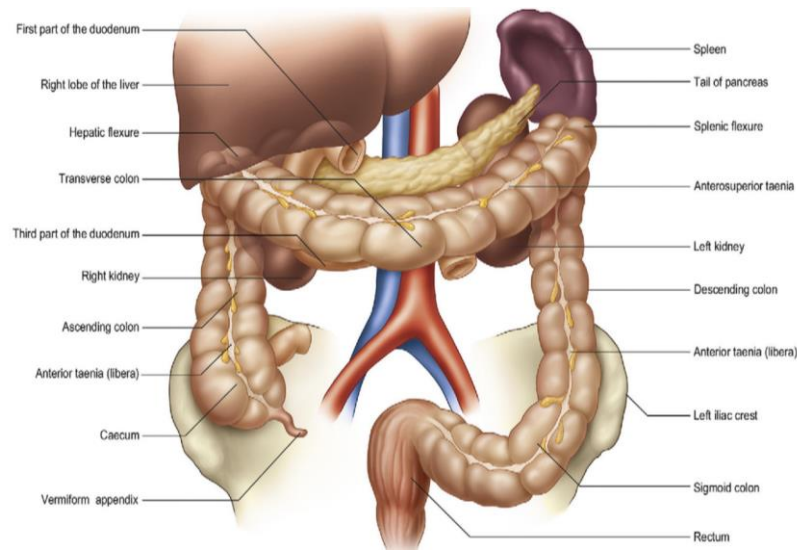
rendah, sekitar 45% lebih rendah dibandingkan dengan individu yang tidak aktif secara fisik. Peningkatan BMI dan kelebihan berat badan atau obesitas merupakan faktor risiko kanker kolon, karena obesitas meningkatkan resistensi insulin, peradangan kronis, dan peningkatan kadar faktor pertumbuhan yang dapat merangsang proliferasi sel (Holle *et al.*, 2020).

b. Konsumsi Alkohol dan Merokok

Mengonsumsi alkohol dalam jumlah sedang hingga berat menjadi faktor risiko utama kanker kolon. Individu yang mengonsumsi 2 hingga 3 minuman beralkohol per hari memiliki risiko 21% lebih tinggi terkena kanker kolon. Selain itu, merokok juga menjadi faktor risiko kanker kolon dan kejadian kematian jika dibandingkan dengan individu yang tidak merokok. Risiko perkembangan kanker kolon meningkat dengan semakin lamanya durasi merokok dan jumlah rokok yang dikonsumsi setiap hari (Holle *et al.*, 2020).

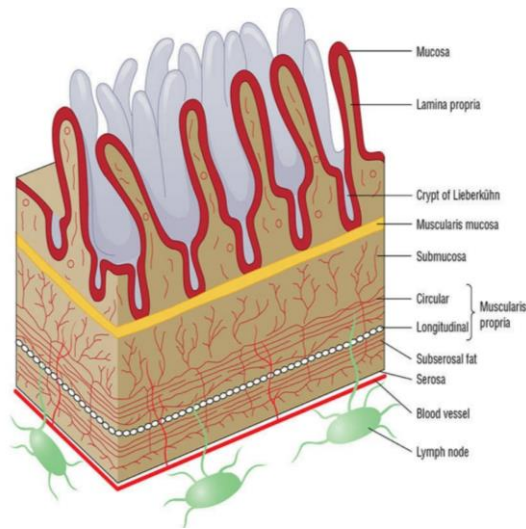
2.1.4. Patofisiologi Kanker Kolon

Usus besar terdiri dari usus buntu (*appendix*), sekum; kolon *ascending*, *transversal*, *descending* serta sigmoid, dan rektum seperti pada Gambar 2.1. Pada orang dewasa, panjangnya sekitar 1,5 m dan diameternya berkisar 8 cm di sekum hingga 2 cm di kolon sigmoid. Penyerapan cairan dan zat terlarut terjadi di kolon sebelah kanan hingga bagian tengah dari kolon transverse, sementara penyimpanan feses pada bagian kolon sebelah kiri (Mahadevan, 2020).



Gambar 2.1. Anatomi Usus Besar dan Rectum (Mahadevan, 2020).

Terdapat empat lapisan jaringan utama mulai dari lumen ke arah luar yaitu mukosa, submucosa, muskularis propia, dan serosa seperti pada gambar 2.2. Lapisan mukosa berfungsi menyerap sisa nutrisi (air dan vitamin). Pada submucosa dan muskularis propia kaya akan system kapiler limfatik, dimana kapiler limfatik tersebut tidak meluas sampai ke mukosa. Muskularis propia terdiri dari otot polos sirkular dan otot polos longitudinal. Kontraksi dari kelompok otot ini menggerakkan material kolon menuju anus. Lapisan terluar dari usus besar, yaitu serosa, menghasilkan kelenjar serosa yang berfungsi melindungi usus besar dari ruptur atau luka ketika bergesekan dengan organ atau jaringan lainnya (Holle *et al.*, 2020).



Gambar 2.2. Penampang dinding usus (Holle *et al.*, 2020).

Pembentukan kanker kolon terdiri dari fase inisiasi, promosi, dan progresi.

Pada fase inisiasi terjadi kerusakan genetik yang bersifat *irreversible* yang mempengaruhi sel-sel epitel mukosa usus yang terpengaruh terhadap transformasi neoplastik berikutnya. Pada fase promosi, sel-sel yang diinisiasi berkembang biak menghasilkan pertumbuhan yang abnormal (kanker). Pada tahap progresi terjadi perkembangan sel-sel kanker jinak menjadi ganas dan berpotensi metastasis (Sawicki *et al.*, 2021). Prekursor kanker kolon berupa polip yang dengan seiring waktu berubah menjadi sel kanker. Perkembangan neoplasma kolorektal melibatkan beberapa perubahan genetik dan fenotipik struktur dan fungsi epitel usus normal, yang menyebabkan pertumbuhan sel, poliferasi, dan perkembangan tumor yang tidak teratur. Sebagian besar kanker kolon berkembang secara sporadis. Pada tahap awal tumorigenesis, sel-sel tumor yang muncul dieliminasi oleh sistem kekebalan tubuh sebagai pertahanan awal terhadap perkembangan kanker. Sel-sel ini pada akhirnya lolos dari pengawasan sistem kekebalan tubuh karena lingkungan mikro tumor menjadi immunosupresif. Perubahan genetik dalam patogenesis kanker kolon meliputi ketidakstabilan mikrosatelit yang disebabkan oleh gen metilasi DNA

yang menyimpang; mutasi pada gen adenomatous polyposis coli (APC) atau kelainan pada β -catenin yang menyebabkan aktivasi jalur pensinyalan Wnt tidak tepat; aktivasi mutasi siklooksigenase-2 (COX-2) dan gangguan degradasi prostaglandin akibat hilangnya 15-prostaglandin *dehydrogenase* (15-PGDH); peningkatan sinyal *epidermal growth factor reseptor* (EGFR); dan mutasi gen penekan tumor SMAD4, PTEN, P53. Ciri umum penyakit yang berkembang secara sporadis adalah adanya ketidakstabilan kromosom, namun faktor penyebabnya belum diketahui secara pasti (Holle *et al.*, 2020).

2.1.5. Penatalaksanaan Kanker Kolon

Tujuan utama dari pengobatan kanker kolon yaitu terapi kuratif untuk penyakit lokal dan terapi paliatif untuk kanker metastatik. Untuk pasien yang melakukan pengobatan dengan tujuan bersifat kuratif, dilakukan reseksi bedah tumor primer. Tergantung pada luasnya penyakit dan apakah tumor berasal dari usus besar atau rektum. Sementara untuk pasien tertentu dengan metastasis yang dapat direseksi, dapat dilakukan pembedahan. Namun, bagi sebagian besar pasien dengan metastasis, pengobatan utamanya adalah dengan kemoterapi sistemik, dan kemoradiasi mungkin juga berguna untuk meringankan penyakit dengan gejala lokal. Pasien dengan penyakit metastasis yang tidak menunjukkan gejala dapat dilakukan inisiasi terapi dan pengobatan berkelanjutan (Holle *et al.*, 2020).

2.1.5.1. Operasi

Pasien dengan kanker kolon stadium I, II, dan III yang dapat dioperasi harus menjalani reseksi bedah lengkap pada massa tumor primer dengan limfadenektomi regional sebagai pendekatan kuratif untuk penyakitnya. Pembedahan untuk kanker usus besar umumnya dilakukan reseksi lengkap tumor dengan batas usus bebas

tumor minimal 5 cm dan limfadenektomi regional. Selain itu, kolektomi juga dapat dilakukan, dimana teknik ini memberikan hasil yang sama seperti pembedahan konvensional, dengan kelebihan berupa sayatan bedah yang lebih kecil, masa rawat inap yang lebih singkat, durasi ileus yang lebih singkat, dan rasa sakit yang lebih sedikit dirasakan (Holle *et al.*, 2020).

2.1.5.2.Terapi Radiasi Adjuvan

Terapi kemoradiasi atau XRT adjuvant dengan fluoropyrimidine pra-operasi untuk meningkatkan resktabilitas. Efek samping yang ditimbulkan dari XRT dapat bersifat akut atau kronis. Efek samping akut meliputi depresi hematologi, disuria, diare, kram perut dan proktitis. Sementara efek samping kronis yang bertahan selama berbulan-bulan setelah penghentian XRT dapat berupa diare persisten, proktitis atau enteritis, obstruksi usus kecil, nyeri perineum, disfungsi seksual, dan gangguan penyembuhan luka (Holle *et al.*, 2020).

2.1.5.3.Kemoterapi Adjuvan

Terapi tambahan diberikan setelah reseksi tumor lengkap dalam upaya menghilangkan sisa penyakit mikrometastatik, sehingga mengurangi kekambuhan tumor dan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup. Pasien dengan kanker kolon stadium II memiliki risiko lebih tinggi untuk kambuh, oleh karena itu diberikan pilihan untuk dilakukan terapi tambahan. Kemudian pasien stadium III dengan keterlibatan kelenjar getah bening memiliki risiko tinggi untuk kambuh, dan risiko kematian dalam waktu 5 tahun setelah reseksi bedah menjangapai 70%, tergantung pada jumlah kanker kolon. Kemoterapi adjuvant secara signifikan menurunkan risiko kekambuhan dan kematian akibat kanker serta merupakan standar perawatan (Holle *et al.*, 2020).

2.1.5.3.1. Regimen Kemoterapi untuk Pengobatan Adjuvan

a. Regimen Fluorouracil + Oxaliplatin

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) merekomendasikan FOLFOX (fluorouracil/leucovorin dan oxaliplatin) sebagai pengobatan pilihan untuk pasien dengan kanker kolon stadium III yang dapat mentoleransi terapi kombinasi. FOLFOX dikaitkan dengan peningkatan risiko paresthesia, neutropenia, dan toksisitas gastrointestinal (mual, muntah, dan diare). Toksisitas dari fluorourasil berbeda-beda berdasarkan dosis, rute, dan jadwal pemberian. Jika diberikan secara IV akan memberikan efek toksisitas leukopenia, diare, stomatitis, dan mual muntah. Adapun toksisitas yang berbeda seperti eritrodismetia palmaplantar dan stomatitis dapat terjadi jika diberikan infus IV kontinyu dengan pembatasan dosis. Pemberian leucovorin sebelum pemberian fluorourasil menjadi pendekatan yang paling efektif untuk memungkinkan akumulasi folat tereduksi intraseluler sebelum pemberian fluorourasil (Holle *et al.*, 2020).

Oxaliplatin memiliki toksisitas ginjal yang minimal, mielosupresi, serta mual dan muntah. Oxaliplatin berhubungan dengan neuropati akut dan persisten. Neuropati akut terjadi dalam 1 hingga 2 hari setelah pemberian dosis dan sembuh dalam 2 minggu. Sementara neuropati persisten biasanya merupakan efek samping kumulatif yang terjadi setelah 8 hingga 10 siklus, neuropati ini ditandai dengan paresthesia, dysesthesia, dan hypoesthesia (Holle *et al.*, 2020).

b. Regimen Fluorourasil/Leucovorin

Infus IV secara terus menerus memungkinkan peningkatan intensitas dosis fluorourasil, yang mungkin menjelaskan tingkat respons yang lebih tinggi. Paling umum, fluorourasil diberikan melalui injeksi bolus IV dan infus IV berkelanjutan (Holle *et al.*, 2020).

c. Regimen Capecitabine

Capecitabine telah dievaluasi sebagai pengganti untuk fluorouracil dalam upaya untuk meningkatkan keamanan dan kemudahan pemberian regimen kemoterapi. CapeOx (capecitabine + oxaliplatin) telah terbukti memperpanjang kelangsungan hidup bebas penyakit selama 3 tahun dibandingkan dengan bolus fluorouracil saja pada pasien dengan kanker kolon stadium III, namun tidak ada perbedaan dalam kelangsungan hidup secara keseluruhan. Efek samping dari CapeOx berupa peningkatan risiko neutropenia (Holle *et al.*, 2020).

2.2. Tinjauan Tanaman Kenikir

2.2.1 Taksonomi *Cosmos caudatus*

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Infrakingdom: Streptophyta

Superdivision: Embryophyta

Division: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytina

Class: Magnoliopsida

Superorder: Asteranae

Order: Asterales

Family: Asteraceae

Genus: *Cosmos* Cav.- *Cosmos*

Species: *Cosmos caudatus* Kunth – Wild

(Moshawih *et al.*, 2017)

2.2.2 Deskripsi Tanaman

Cosmos caudatus dikenal secara lokal sebagai kenikir yang termasuk dalam famili Asteraceae (Purnobasuki *et al.*, 2022). Memiliki tinggi antara 0,5-2 m, daunnya hampir tidak berbulu, beruas-ruas dan bertangkai, panjangnya sekitar 5-15 cm, berbentuk lanset, dan ujungnya berbentuk apikal. Termasuk jenis tanaman sub perdu yang tumbuh secara individua tau berkelompok, bunga bertangkai dan berwarna merah jambu, merah, kuning, dan putih dengan kuntum kuning di tengahnya (Moshawih *et al.*, 2017).

2.2.3 Morfologi Tanaman

Cosmos caudatus merupakan tanaman tahunan (Purnobasuki *et al.*, 2022) dengan bentuk Semak (Phong *et al.*, 2022) dan tumbuh berkelompok (Uzbek and Shahidan, 2019). Spesies ini memiliki akar tunggang berwarna coklat keputihan (Nurmalasari *et al.*, 2020). *Cosmos caudatus* mempunyai batang tegak dengan bentuk persegi panjang dan lonjong (Purnobasuki *et al.*, 2022). Batangnya Sebagian besar berwarna hijau, namun ada di beberapa bagian berwarna ungu atau merah. Warna ungu tersebut disebabkan karena adanya antosianin dan biasanya berada pada cabang bagian atas (Bunawan *et al.*, 2014; Phong *et al.*, 2022; Saleh *et al.*, 2020). Daunnya tersusun berhadapan, menyirip, dan terbagi menjadi 5 helai daun (Murugesu *et al.*, 2020). Ruas daun berbentuk lonjong dengan tepi daun rata dan ujung runcing. Permukaan daunnya mempunyai warna berbeda-beda, sisi abaksial berwarna lebih gelap sedangkan sisi adaksial berwarna lebih terang (Widyawati and Zulchi, 2019).



Gambar 2.3. Tanaman Kenikir (Ahda *et al.*, 2023)

Cosmos caudatus memiliki bunga majemuk. Tangkai bunganya memiliki panjang +/- 25 cm. Tanaman ini mempunyai bunga yang tumbuh di ketiak daun bagian atas atau pucuk batang. Biasanya terdapat dua jenis bunga berbeda dalam satu punuk, yaitu bunga cakram (bunga berbentuk tabung) di tengah, dan bunga ray (bunga berbentuk pita) di tepinya (Purnobasuki *et al.*, 2022). Mahkota bunga umumnya berjumlah delapan buah, berwarna merah jambu, merah, kuning, dan putih (Moshawih *et al.*, 2017) dengan ukuran panjang sekitar 1-1,5 cm (Purnobasuki *et al.*, 2022). Putiknya ditutupi bulu-bulu halus dan mempunyai 2 cabang (Fitmawati dan Erwina 2017). Putik berwarna hijau kekuningan, sedangkan benang sari berbentuk tabung dengan kepala sari berwarna cokelat (Purnobasuki *et al.*, 2022). Bunga tersebut pada akhirnya akan berubah menjadi buah setelah penyerbukan. Buahnya bertekstur keras berwarna hitam dengan panjang 1-3 cm. Setiap buah mengandung satu biji, dan ujung buah yang menghadap ke atas memiliki struktur menyerupai mata panah yang terdiri dari 2-3 buah (Purnobasuki *et al.*, 2022)

2.2.4 Kandungan dan Manfaat

Cosmos caudatus merupakan tanaman herbal yang mempunyai manfaat bagi kesehatan manusia. Secara tradisional digunakan sebagai antidiabetes (Ahmad *et al.*, 2018), agen antibakteri (Triatmoko *et al.*, 2020), antijamur (Rasdi *et al.*, 2010; Salehan *et al.*, 2013), antihiperlipidemia (Perumal *et al.*, 2014) dan antikanker (Ramadhan *et al.*, 2018). Studi pendahuluan mengenai fitokimia daun kenikir menunjukkan adanya senyawa metabolit aktif seperti flavonoid serta turunannya, non-flavonoid, dan minyak atsiri. Senyawa flavonoid dan turunannya meliputi quercetin, kaempferol, myricetin, catechin, luteolin, apigenin, quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin), quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-xyloside, quercetin 3-O-arabinofuranoside, dan rutin (Ahda *et al.*, 2023).

Senyawa non-flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kenikir berupa fenolat, turunan asam benzoate, asam askorbat, diterpenoid, costunolide, stigmasterol, likopen, dan lutein (Ahda *et al.*, 2023). Senyawa-senyawa aktif tersebut diidentifikasi dari daun kenikir menggunakan analisis HPLC-MS. Komponen bioaktif berbeda ditemukan dalam daun kenikir menggunakan analisis GC-MS berupa α -Cadinene, (E)-Ocimene, 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, α -Copaene, β -Elemene, caryophyllene, α -Humulene, γ -Muurolene, bergamotene, β -Selinene, bicyclogermacrene, α -Farnesene, and δ -Cadinen (Ahda *et al.*, 2023).

2.2.4.1. Aktivitas Antidiabetes

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Ahmad *et al* (2018), *Cosmos caudatus* merupakan sumber yang kaya akan senyawa bioaktif dan dapat menjadi bahan prospektif untuk pengembangan agen antidiabetes baru (Ahmad *et al.*, 2018). Tingginya potensi dari daun kenikir sebagai agen antidiabetes berasal dari beberapa fitokonstituen berupa quercetin, kaempferol, myricetin, catechin, luteolin, apigenin,

quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin), quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-arabinofuranoside, rutin, asam fenolik, asam klorogenat, asam α -Linolenat, Myo-inositol, diterpenoid, costunolide, stigmasterol, asam α -linolenat, α -D-glukopirinosida dan α -tokoferol diketahui secara in vitro memiliki sifat antidiabetes (Ahmad *et al.*, 2018; Javadi *et al.*, 2014). Quercetin mengurangi kadar glukosa darah melalui penghambatan difusi terfasilitasi dari glucose transporter-2 (GLUT2) dan dengan penghambatan sodium-dependent vitamin C transporter-1 (SVCT1). Penurunan kadar glukosa darah ini dengan memperlambat penyerapan glukosa melalui penghambatan enzim hidrolisis karbohidrat seperti α -glukosidase di saluran pencernaan (Javadi *et al.*, 2014), dan dengan penghambatan α -amilase pankreas. Penghambatan kedua enzim tersebut menyebabkan perpanjangan waktu pencernaan karbohidrat sehingga dapat mengurangi kadar glukosa plasma postprandial (Loh and Hadira, 2011).

2.2.4.2 Aktivitas Antibakteri

Hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Lee dan Vairappan (2011) mengungkapkan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam daun kenikir mampu bertindak sebagai agen antibakteri. Senyawa aktif tersebut berupa minyak atsiri yang diekstraksi dari daun segar, sedangkan flavonoid dan turunannya diperoleh dari ekstrak etanol. Aktivitas antibakteri pada minyak atsiri yang diekstrak dari daun segar dapat menghambat *Salmonella* sp. Beberapa senyawa yang terdapat dalam minyak atsiri seperti α -Cadinene, (E)-Ocimene, 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, α -Copaene, β -Elemene, caryophyllene, α -Humulene, γ -Muurolene, Bergamotene, β -Selinene, Bicyclogermacrene, α -Farnesene, and δ -Cadinene berpotensi sebagai agen antibakteri. Ekstrak etanol daun kenikir dapat menghambat

bakteri lain seperti *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Vibrio cholerae*. Selain itu ekstrak metanol daun kenikir dapat menghambat pertumbuhan microflora pada jamur tiram, seperti *E. coli* dan *S. aureus*. Adapun beberapa senyawa yang terdapat pada ekstrak daun kenikir berupa quercetin, catechin, luteolin, quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin), quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-arabinofuranoside, asam benzoat, asam klorogenat, 4 ,4' bipyridine, diterpenoid, dan stigmasterol, yang berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri (Lee and Vairappan, 2011).

2.2.4.3 Aktivitas Antijamur

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rasdi *et al* (2010), ekstrak daun kenikir menunjukkan potensi antijamur yang besar karena menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Rasdi *et al.*, 2010). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Salehan *et al* (2013) menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir dapat menghambat strain jamur yang ditemukan di pohon seperti *P. palmivora* (ditemukan di *Theobroma cacao*), *C. gloeosporioides* (ditemukan di *Carica papaya*), *C. gloeosporioides* (ditemukan di *Mangifera indica*). Daun dan akar kenikir terbukti mengandung hidroksieugenol dan oniferil alkohol sebagai agen antijamur (Salehan *et al.*, 2013).

2.2.4.4 Aktivitas Antihiperlipidemia

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Perumal *et al* (2014), ekstrak daun kenikir memiliki pengaruh profil lipid pada hewan yang diinduksi hiperlipidemia, yaitu menurunkan plasma trigliserida (TG), kolesterol total, *low-density lipoprotein* (LDL), glukosa dan indeks aterogenik, serta meningkatkan *high-density lipoprotein* (HDL), lebih banyak dibandingkan dengan atorvastatin

sebagai control positifnya. Ekstrak daun kenikir mampu menurunkan glukosa darah sedangkan atorvastatin meningkatkan kadar glukosa darah dengan menurunkan sensitivitas insulin. Kandungan quercetin dan catechin yang terdapat pada ekstrak kenikir memiliki efek besar pada hiperlipidemia. Quercetin menurunkan peroksidasi lipid, meningkatkan regulasi paraoxonase-1 terkait serum HDL, dan meningkatkan glutathione intraseluler sebagai antioksidan (Perumal *et al.*, 2014).

2.2.4.5 Aktivitas Antikanker

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Adawiyah *et al* (2017), ekstrak daun kenikir memiliki aktifitas sitotoksik dengan nilai IC50 dari fraksi etil asetat terhadap sel T47D yaitu 120,6 µg/ml, masuk ke dalam kategori cukup aktif dan berpotensi dikembangkan sebagai obat antikanker. Selain itu kandungan flavonoid pada ekstrak daun kenikir menyebabkan apoptosis sel T47D. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis sel adalah melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, memodulasi *signaling pathway*, menurunkan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, meningkatkan ekspresi gen Bax dan Bak, serta mengaktivasi endonuclease (Adawiyah *et al.*, 2017). Namun dalam penelitian lain mengungkapkan bahwa ekstrak daun kenikir memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel leukemia murine P388 dan sel HeLa (Lee and Vairappan, 2011; Nurhayati *et al.*, 2018).

Selain itu hasil penelitian *molekular docking* yang dilakukan oleh Fita dkk (2015) menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak methanol daun kenikir dan doksorubiksin memiliki kemampuan menekan viabilitas sel kanker payudara T47D karena mengandung glikosida quercetin. Glikosida quersetin merupakan golongan flavonoid yang mampu mengatur siklus sel kanker dengan pengeblokan siklus sel

pada fase G2/M atau pada transisi B1/S. Pengeblokan siklus sel pada fase G2/M atau pada transisi G1/S. Pengeblokan pada siklus G1/S melalui *up-regulation* di p21, p27, dan p53. Secara khusus, p21 menghambat Cdk2-cyclin akibat penghambatan CDK2 dependent fosforilasi pRb dan penyerapan E2F1 sehingga transkripsi gen dan fase S akan terhambat. Dalam kondisi tertentu p27 mampu menghambat kompleks Cdk4-cyclin D dan CDK6-cyclin D. Tumor supresor p53 mampu mengkodekan inhibitor siklus sel dan memacu apoptosis. Selain berperan dalam siklus sel, quercetin mampu menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria, yaitu quercetin mampu mengganggu MMP sehingga memicu pelepasan sitokrom c dalam sitoplasma serta pengaktifan caspase-3 dan caspase-7. Namun potensi dari glikosida quercetin dalam memicu apoptosis sel kanker payudara T47D akan rendah jika diberikan secara tunggal (Fita *et al.*, 2017).

2.3. Tinjauan Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan berdasarkan sifat kelarutan suatu senyawa dalam suatu pelarut melalui proses perpindahan zat dari suatu fasa ke fasa lainnya. Gaya tarik antar molekul pelarut dengan molekul zat terlarut menyebabkan terjadinya peristiwa larutnya senyawa (Amperawati *et al.*, 2019). Metode pemisahan ekstraksi menggunakan prinsip kelarutan *like dissolve like* dimana senyawa polar larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar larut dalam pelarut non-polar (Wijaya dan Rukayyah, 2022). Prinsip ekstraksi didasarkan pada sebaran atau distribusi zat terlarut dalam senyawa aktif dengan penggunaan perbandingan dua pelarut yang tidak saling bercampur karena perbedaan polaritas (Handoyo, 2020). Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit yang terkandung dalam bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai. Hasil dari ekstraksi berupa

ekstrak. Ekstrak merupakan sediaan kental dan pekat yang diperoleh dari proses ekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani (Saputra dan Yulian, 2020).

Adapun beberapa parameter dasar yang mempengaruhi kualitas suatu ekstrak yaitu bagian tumbuhan yang digunakan, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, dan metode ekstraksi (Tiwari *et al.*, 2011). Pada bahan alam yang berbahan dasar tumbuhan bisa menggunakan berbagai bagian tumbuhan seperti kulit kayu, daun, bunga, buah, biji, dan lain-lain, karena setiap bagian tumbuhan mungkin mengandung komponen aktif (Tiwari *et al.*, 2011). Kemudian untuk mencapai hasil ekstraksi yang optimal, pemilihan pelarut menjadi hal yang fundamental agar mencapai proses ekstraksi yang optimal (Maksum dan Purbowati, 2017). Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan pelarut adalah jumlah fitokimia yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, perbedaan senyawa yang akan diekstraksi, kemudahan penanganan ekstrak selanjutnya, toksisitas pelarut, dan potensi kesehatan (Tiwari *et al.*, 2011). Sifat-sifat pelarut yang baik dalam ekstraksi tumbuhan meliputi, toksisitas rendah, penguapan pada suhu rendah, mempercepat penyerapan fisiologis ekstrak, dan ketidakmampuan yang menyebabkan ekstrak menjadi kompleks atau tradisional (Tiwari *et al.*, 2011). Selanjutnya yang terakhir adalah pemilihan metode ekstraksi. Hal ini tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi/dipisahkan (Mukhrani, 2014). Hasil ekstraksi akan mencerminkan tingkat keberhasilan metode yang dipakai, oleh karena itu pemilihan metode ekstraksi sangat penting untuk dilakukan (Handayani *et al.*, 2016). Sebelum memilih metode ekstraksi, perlu ditentukan target ekstraksi meliputi; senyawa bioaktif yang tidak diketahui, senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme,

dan sekelompok senyawa di dalam suatu organisme yang saling berhubungan secara structural. Beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan meliputi maserasi, ultrasound-assisted solvent extraction, perkolasi, Soxhlet, reflux dan destilasi uap (Mukhriani, 2014).

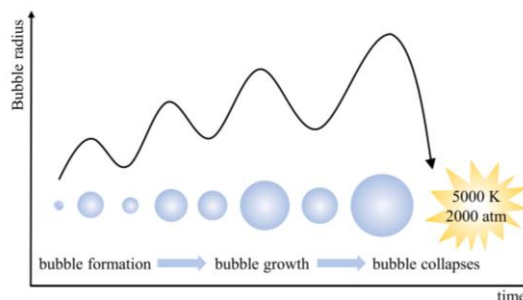
2.3.1. Ekstraksi Metode Ultrasonic

Ultrasonic-assisted extraction (UAE) merupakan salah satu metode ekstraksi dengan bantuan gelombang, yaitu gelombang ultrasonik. Gelombang ultrasonik merupakan gelombang suara dengan frekuensi diatas pendengaran manusia (≥ 20 kHz), bersifat mekanis dan dapat merambat melalui media padat, cair, dan gas (Shen *et al.*, 2023; Sholihah *et al.*, 2017). Teknik ultrasonik terbukti sebagai teknologi yang ramah lingkungan karena kemampuannya menurunkan biaya konsumsi pelarut, mengurangi waktu pengoperasian, menurunkan konsumsi energi, dan meningkatkan kualitas dan hasil ekstraksi (Shen *et al.*, 2023).

2.3.1.1.Prinsip UAE

Ultrasonic-assisted extraction (UAE) menggunakan efek suhu, efek mekanis, dan efek kavitasi untuk mengekstrak komponen bioaktif. Efek suhu ultrasonik yaitu terjadi ketika getaran energi ultrasonik yang diserap oleh media kemudian diubah menjadi panas, sehingga suhu media meningkat. Nilai suhu dipengaruhi oleh sifat media, daya ultrasonik, dan waktu pemaparan. Efek mekanis ultrasonik yaitu terjadi karena penerapan ultrasonik pada suatu media menginduksi getaran partikel dalam media yang menyebabkan peningkatan pergerakan partikel sehingga mempercepat proses perpindahan massa. Efek kavitasi yaitu terjadi ketika perambatan gelombang ultrasonik yang kuat dalam cairan. Kavitasi timbul dari tekanan negatif yang mencapai nilai kritis tertentu ketika cairan dapat ditarik keluar

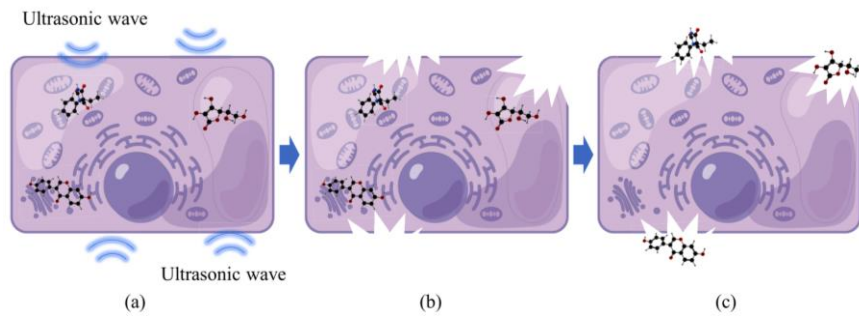
membentuk rongga gas atau uap. Tekanan negatif kritis yang menarik cairan keluar disebut ambang kavitasi. Adanya tekanan negatif dapat memfasilitasi kavitasi yang disebabkan oleh banyak gelembung kecil yang disebut sebagai “inti kavitasi” (Wen *et al.*, 2018). Pada umumnya terdapat dua klasifikasi gelembung kavitasi yaitu, gelembung kavitasi stabil dan gelembung kavitasi sementara. Gelembung kavitasi stabil relatif lebih lama dibandingkan dengan gelembung kavitasi sementara yang hanya ada dalam waktu yang sangat singkat (Shen *et al.*, 2023). Gelembung-gelembung yang sangat kecil (inti kavitasi) di dalam cairan mengalami getaran, pemuaian, dan akumulasi energi yang berkelanjutan dari medan akustik menyebabkan gelembung kavitasi pecah. Ketika gelembung kavitasi pecah menghasilkan tumbukan yang besar disertai dengan suhu dan tekanan tinggi (5000 K, 2000 atm). Selama kavitasi, terjadi gaya geser hidrodinamik yang kuat, yang mengakibatkan pembentukan radikal bebas dan peningkatan tekanan dan suhu (Shen *et al.*, 2023).



Gambar 2.4. Efek Kavitasi Ultrasonik (Shen *et al.*, 2023).

Metode *Ultrasonic-assisted extraction* (UAE) menggunakan prinsip kavitasi akustik untuk memproduksi gelembung spontan (kavitasi) dalam fase cair dibawah titik didihnya yang merusak dinding sel, sehingga pelarut dapat masuk ke dalam bahan (Kristina *et al.*, 2022). Ketika gelombang ultrasonik diterapkan pada permukaan sel, gelembung kavitasi akan pecah secara asimetris dan menghasilkan

jet mikro yang cepat menuju permukaan sel. Jet mikro yang dihasilkan dari pecahnya gelembung kavitasi menyebabkan pengelupasan permukaan, erosi, kerusakan dinding sel, dan keluarnya isi sel, sehingga berbagai senyawa dapat diekstraksi dari bahan alam (Wen *et al.*, 2018).



Gambar 2.5. Mekanisme ekstraksi ultrasonik. (a) menunjukkan ultrasonik akan bekerja pada sel utuh. (b) menunjukkan pecahnya sel. (c) menunjukkan komponen bioaktif dilepaskan (Shen *et al.*, 2023).

2.3.1.2.Keunggulan UAE

Pertama, hasil ekstraksi jauh lebih tinggi dibandingkan metode tradisional. Hal ini karena sifat fisik dari gelombang ultrasonik yang efektif merusak jaringan sel tanaman menyebabkan pecahnya dinding sel, sehingga ekstraksi lebih optimal. Kedua, waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi lebih singkat dengan tetap mempertahankan efisiensi ekstraksi yang tinggi. Ketiga, memerlukan suhu ekstraksi yang rendah. Kisaran optimal untuk metode UAE ditetapkan antara 40°C-60°C. Hal ini sangat penting untuk senyawa yang rentan terhadap degradasi, hidrolisis, atau oksidasi pada suhu yang lebih tinggi. Selain itu, penggunaan suhu ekstraksi yang lebih rendah lebih menghemat energi, sehingga berkontribusi terhadap pengurangan konsumsi energi selama proses ekstraksi. Keempat, metode UAE memerlukan sedikit pelarut untuk proses ekstraksinya sehingga mengurangi konsumsi pelarut. Kelima, komponen bioaktif yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi. Keenam, metode UAE cocok untuk mengekstraksi berbagai komponen dari

berbagai jenis tanaman karena tidak dibatasi oleh polaritas komponen atau berat molekul. Ketujuh, metode UAE sederhana dan mudah dioperasikan karena perawatan peralatan yang mudah dan biaya pengoperasian yang murah. Metode UAE dianggap sebagai teknologi ekstraksi ramah lingkungan. Metode UAE tidak terbatas pada skala kecil di laboratorium tetapi juga dapat diterapkan pada skala besar seperti industri (Shen *et al.*, 2023).

Namun dibalik semua keunggulan metode UAE, terdapat beberapa kelemahannya. Salah satu masalah yang paling umum adalah timbulnya suara kebisingan sekitar 65 dB yang dihasilkan oleh peralatan ultrasonik selama pengoperasian. Untuk mengatasi masalah ini, solusinya adalah dengan menggunakan pelindung suara. Selain itu, masalah parameter metode UAE yang perlu dioptimalkan. Beberapa variabel dapat mempengaruhi hasil UAE. Parameter ekstraksi komponen bioaktif yang berbeda pada substrat yang berbeda tidaklah sama, sehingga perlu melalui banyak percobaan untuk mengoptimalkan parameter ekstraksi. Tantangan lain dalam proses UAE adalah kebutuhan untuk mengoptimalkan parameter ekstraksi. Banyak faktor yang dapat memengaruhi efektivitas UAE, dan parameter ini dapat bervariasi untuk berbagai komponen bioaktif dan substrat. Akibatnya, diperlukan eksperimen untuk menentukan dan menyempurnakan parameter untuk setiap kasus tertentu. Proses optimasi berulang ini memastikan bahwa teknik UAE disesuaikan untuk mencapai hasil ekstraksi terbaik berdasarkan komponen bioaktif target dan karakteristik substrat (Shen *et al.*, 2023).

2.3.1.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi UAE

Parameter fisik metode UAE meliputi daya ultrasonik, intensitas daya ultrasonik, frekuensi ultrasonik, siklus kerja ultrasonik, waktu ekstraksi, dan geometri reaktor. Daya ultrasonik berbanding lurus dengan amplitude ultrasonik. Daya ultrasonik yang tinggi meningkatkan efisiensi hasil ekstraksi metode UAE. Peningkatan intensitas daya ultrasonik menyebabkan peningkatan jumlah gelembung kavitasi, namun intensitas daya ultrasonik yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi zat bioaktif, yang pada akhirnya menyebabkan penurunan efisiensi ekstraksi. Selain itu, frekuensi ultrasonik mempunyai dampak yang besar terhadap efek kavitasi selama proses ekstraksi. Seiring dengan meningkatnya frekuensi ultrasonik, gelembung kavitasi pada cairan berkurang secara bertahap. Sebaliknya, ketika frekuensi ultrasonik menurun, menghasilkan gelombang mekanis yang lebih kuat dan efek kavitasi yang lebih nyata. Selanjutnya yaitu waktu reaksi. Semakin panjang waktu ekstraksi, hasil ekstraksi semakin meningkat. Namun, hal ini juga berisiko terjadinya degradasi komponen bioaktif tanaman karena paparan yang terlalu lama. Terakhir yaitu geometri reaktor. Bentuk dan ukuran reaktor penting untuk dipertimbangkan guna mengurangi hilangnya energi akibat pantulan gelombang ultrasonik pada permukaan padat. Untuk meminimalkan pantulan gelombang, diperlukan pemilihan reaktor dengan alas datar seperti erlenmeyer (Shen *et al.*, 2023; Wen *et al.*, 2017)

Seperangkat parameter penting lainnya yang perlu dioptimalkan adalah jenis pelarut, dan rasio pelarut dengan bahan. Pemilihan pelarut tergantung pada kelarutan dan polaritas ekstrak. Air biasanya digunakan untuk mengekstrak asam, basa, gula, asam amino, dan zat polar lainnya. Etanol digunakan untuk mengekstrak fenol, aldehid, keton, ester, dan senyawa polar lainnya. Kloroform digunakan untuk

mengekstrak minyak nabati, rempah-rempah, asam lemak dan zat terlarut lemak lainnya. Eter juga umumnya digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang larut dalam lemak. Benzene digunakan untuk mengekstraksi fenol, asam fenilasetat, benzaldehida dan senyawa aromatik lainnya. Pelarut yang berbeda memiliki sifat yang berbeda-beda, menyebabkan efek kavitasi ultrasonik yang berbeda walaupun pada kondisi yang sama. Pertama, polaritas dan kelarutan senyawa target dalam pelarut dapat berdampak terhadap efisiensi ekstraksi. Kedua, viskositas dari pelarut yang lebih kental dapat mengurangi efek kavitasi. Terakhir, volatilitas pelarut harus dipertimbangkan agar mendapatkan hasil yang optimal (Shen *et al.*, 2023). Volume pelarut yang lebih besar menghasilkan hasil ekstraksi yang lebih tinggi. Hal ini karena peningkatan rasio pelarut terhadap bahan mengurangi kepadatan campuran yang memungkinkan transfer energi lebih efektif, sehingga meningkatkan efisiensi ekstraksi (Shen *et al.*, 2023).

Selanjutnya parameter lingkungan yang meliputi suhu ekstraksi dan tekanan udara. Suhu larutan sampel sangat penting dan harus dijaga pada nilai optimalnya. Ketika suhu dinaikkan, energi kinetik molekul fluida yang mengekstraksi juga akan meningkat. Peningkatan energi kinetik ini dapat mempercepat laju difusi senyawa, sehingga proses ekstraksi lebih efisien. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat berdampak buruk bagi bahan yang diekstraksi. Sementara tekanan udara berdampak pada kekuatan pecahnya gelembung kavitasi (Shen *et al.*, 2023).

2.4. Tinjauan Metabolite Profiling

Pada tumbuhan, sebagian besar karbon, nitrogen, dan energi digunakan untuk penyusunan molekul-molekul utama seperti karbohidrat, lemak, protein, dan asam nukleat, yang disebut sebagai metabolit primer. Namun terdapat juga sebagian kecil

karbon, nitrogen, dan energi digunakan untuk mensintesis molekul organik yang tidak berperan secara langsung dalam pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan, disebut sebagai metabolit sekunder (Anggraito *et al.*, 2018). Metabolit sekunder pada tumbuhan berfungsi spesifik namun tidak bersifat esensial. Metabolit sekunder disintesis oleh bagian-bagian tertentu dari tumbuhan, seperti akar, daun, bunga, buah, dan biji. Metabolit sekunder berfungsi sebagai pertahanan terhadap herbivora (vertebrata dan serangga), mikroba (bakteri, jamur, dan virus), sebagai pelindung dari sinar UV, dan sebagai penyimpanan-N bagi tumbuhan yang menghasilkannya. Konsentrasi dan komposisi metabolit sekunder dipengaruhi oleh faktor interna (genetic, kondisi kesehatan tanaman, umur) dan faktor eksternal (lingkungan, perawatan dengan obat) (Hanwar *et al.*, 2015).

Aktivitas biologis yang dimiliki oleh suatu tanaman berasal dari *multicompound* yang saling bersinergi dalam memberikan aktivitas biologis tertentu. Kualitas dan khasiat yang ditimbulkan oleh tanaman ditentukan oleh komposisi dan jumlah senyawa aktif terutama metabolit sekunder dalam suatu tanaman (Rafi *et al.*, 2018). Tanaman yang digunakan sebagai bahan baku obat harus dilakukan standarisasi dengan pengendalian kualitas metabolomnya. Metabolom adalah total metabolit yang terkandung dalam tumbuhan. Komposisinya dipengaruhi oleh beberapa faktor meliputi salinitas, cahaya, iklim, suhu, cuaca, kelembaban, kekeringan, dan unsur hara (Mutiah *et al.*, 2018). Pengendalian mutu tanaman obat dapat dilakukan melalui teknik analisis metabolik yang disebut *Metabolite profiling*, yaitu teknik analisis untuk mengidentifikasi dan menentukan kuantitatif dari sejumlah besar metabolit, yang umumnya berhubungan dengan jalur metabolit spesifik (Hanwar *et al.*, 2015). Teknik ini menganalisis

seluruh analit yang terdeteksi pada sampel yang digunakan dan mengidentifikasi metabolit yang dinyatakan berbeda pada sampel yang mempunyai klasifikasi jelas (Mutiah *et al.*, 2018).

Metabolite profiling penting untuk dilakukan guna memastikan otentikasi, khasiat, dan keamanan karena dapat mengidentifikasi profil metabolit bahan baku obat dan produk akhir (Mutiah *et al.*, 2023). *Metabolite profiling* digunakan untuk membaca semua metabolit atau produk turunannya baik yang teridentifikasi maupun tidak diketahui dengan menganalisis sampel menggunakan teknik analisis yang sesuai (Villas-Boas *et al.*, 2005). Selain itu, *Metabolite profiling* secara luas digunakan untuk studi penemuan kandidat obat baru, produk metabolisme obat, dan efek perawatan terapi (Burhan *et al.*, 2020).

Pada umumnya, pemprofilan metabolit menggunakan beberapa teknik analisis seperti NMR, serta kombinasi teknik analisis seperti, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS), atau *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry* (CE-MS). Teknik-teknik ini dapat memberikan profil kromatografi yang detail dari sampel serta angka pengukuran absolut dan relatif dari senyawa yang terdeteksi. Namun, setiap teknik mempunyai kelebihan dan kekurangannya masing-masing, tidak ada teknik analisis yang serbaguna (Mutiah *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2012). GC-MS merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis metabolit yang mudah menguap. Teknik ini memiliki sensitivitas dan kekuatan resolusi yang tinggi, reproduktibilitas yang sangat baik, sehingga berpotensi menghasilkan identifikasi yang baik. Selain itu instrument GC-MS mudah digunakan dan biaya penanganan rendah. Namun penerapan GC-MS kurang luas jika dibandingkan dengan LC-MS karena persiapan

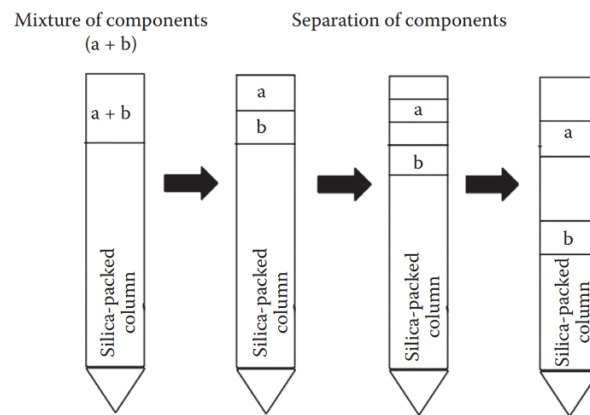
sampel yang rumit, memakan waktu, dan rawan terjadi kesalahan serta terbatas pada analisis molekul kecil yang mudah menguap dan molekul yang dapat dibuat mudah menguap (Theodoridis *et al.*, 2017; Saurina and Sentellas, 2017). CE-MS memiliki resolusi dan sensitivitas yang unggul dalam menganalisis metabolit polar seperti asam amino, asam organik, dan nukleotida. Namun CE-MS tidak digunakan secara luas dalam pemrofilan metabolit karena stabilitas system analitiknya tidak setinggi GC-MS atau LC-MS (Theodoridis *et al.*, 2017).

Teknik analisis untuk pemrofilan metabolit yang baik harus cepat, sensitif, bisa diotomatisasi, reliabel, dan mampu menganalisis metabolit dalam jumlah banyak (Hanwar *et al.*, 2015). Oleh karena itu LC-MS menjadi teknik analisis yang banyak digunakan dalam pemrofilan metabolit, karena LC-MS bisa diterapkan untuk menganalisis berbagai senyawa semi-polar termasuk banyak metabolit sekunder serta dapat mencegah terjadinya derivatisasi kimia (Zhang *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini digunakan teknik analisis UPLC-MS/MS yang merupakan pengembangan dari teknik analisis LC-MS untuk menganalisis suatu senyawa. UPLC yang dikombinasikan dengan MS menjadi instrument untuk mengidentifikasi dan mengukur senyawa yang terkandung dalam bahan (Mutiah *et al.*, 2019).

2.4.1. UPLC-MS/MS

Kromatografi cair merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan sampel menjadi masing-masing bagiannya. Pemisahan ini terjadi berdasarkan interaksi sampel dengan fase gerak dan fase diam. Komponen-komponen campuran dipisahkan dalam kolom berdasarkan afinitas masing-masing komponen terhadap fase gerak (Naushad *et al.*, 2014). Terlihat dari gambar 2.6 bahwa pada

langkah pertama, campuran dua komponen (a dan b) berada di puncak kolom. Ketika fase gerak melewati kolom, kedua komponen mulai terpisah. Dalam contoh ini, komponen “b” memiliki afinitas yang lebih kuat terhadap fase gerak sementara komponen “a” relatif tetap dalam fase diam (Naushad *et al.*, 2014).



Gambar 2.6. Perpindahan dua komponen dalam suatu campuran (Naushad *et al.*, 2014).

Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS) merupakan metode yang banyak digunakan untuk menganalisis senyawa khususnya di bidang penelitian bahan alam. UPLC-MS/MS merupakan salah satu bentuk pengembangan instrumen LC-MS dengan menggabungkan keunggulan UPLC untuk pemisahan kromatografi dan spektrometri massa resolusi tinggi untuk deteksi massa yang akurat dan identifikasi metabolit (Ariyanti *et al.*, 2021). Metode UPLC-MS/MS ini memiliki kinerja resolusi yang optimal dalam menghasilkan data kromatogram yang ideal, proses analisis dan kontrol data yang cepat, pengukuran massa dan informasi data struktural yang akurat, penggunaan pelarut yang minim, teknologi partikel kimia yang stabil, optimalisasi sistem, desain detektor, pemrosesan data yang cepat, kemampuan mendeteksi metabolit secara luas, sensitivitas dan selektivitas yang tinggi sehingga menghasilkan data yang konsisten

dan akurat, waktu dan biaya berkurang (Annisa *et al.*, 2020 ; Mutiah *et al.*, 2018 ; Chawla *and* Ranjan, 2016).

UPLC-MS/MS bekerja dengan memisahkan berbagai senyawa dalam sampel berdasarkan perbedaan polaritasnya dan menghasilkan fragmen ion bermuatan yang kemudian dideteksi massa oleh spektrometri massa dari data spektrum massa yang terekam (Ariyanti *et al.*, 2021). UPLC didasarkan pada prinsip yang sama seperti HPLC, yaitu kromatografi adsorpsi menggunakan adsorben berukuran sangat kecil, untuk meningkatkan luas permukaan dan adsorpsi (Naushad *et al.*, 2014). Ukuran partikel yang sangat kecil ini merupakan perbedaan paling menonjol yang membedakan antara UPLC dan HPLC (Annisa *et al.*, 2020). Ultra-Performance Liquid Chromatography merupakan pemisahan LC menggunakan kolom dengan partikel dibawah 2 μm , dimana ukuran tersebut lebih kecil dari ukuran yang biasa digunakan dalam HPLC yaitu 2,5 – 5 μm . Penggunaan kolom yang mengandung partikel lebih kecil ini meningkatkan efisiensi yang lebih besar per satuan waktu, performa kromatografi yang lebih cepat, serta meningkatkan sensitivitas dikarenakan peak yang dihasilkan lebih tajam (sempit) dan tinggi. Tekanan pada sistem UPLC bisa mencapai 100 MPa, sementara pada sistem HPLC maksimum hanya 35-45 MPa (Annisa *et al.*, 2020).

Karakteristik UPLC dan HPLC serta keunggulan UPLC dibanding HPLC dirangkum dalam Tabel 2.1

Tabel 2.1 Perbandingan antara UPLC dan HPLC (Pramod *and* Navnanth, 2017)

Ciri	UPLC	HPLC
Ukuran partikel	1,7 μm	<4 μm
Tekanan balik maksimum	103,5 MPa	35-40 MPa
Kolom analitis	Acquity UPLC BEH C ₁₈	Alltima C ₁₈
Dimensi kolom	150 $\times$ 2,1 mm	150 $\times$ 3,2 mm
Volume injeksi	3-5 Liter	20 Liter
Batas tekanan	15.000 psi	4000 psi
Total run time	1,5 menit	10 menit
Kepekaan	Lebih tinggi	Lebih sedikit
Koagulasi kolom	Terjadi	Tidak terjadi
Waktu analisis	Lebih sedikit	Lebih banyak

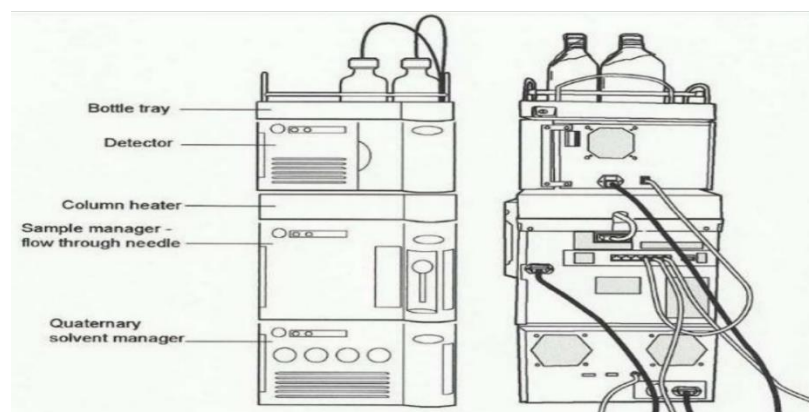
Namun di samping berbagai keuntungan yang dihasilkan tersebut, UPLC juga memiliki beberapa kelemahan. Kelemahan utamanya adalah umur simpan kolom yang pendek karena dalam pengoperasiannya menggunakan tekanan tinggi. Semakin tinggi tekanan semakin pendek masa pakai kolom dan memerlukan perawatan yang lebih banyak. Selain itu, partikel yang lebih kecil dari 2 μm biasanya tidak dapat dihasilkan sehingga penerapannya terbatas (Basharat *et al.*, 2021; Annisa *et al.*, 2020).

UPLC banyak digunakan dalam berbagai kepentingan analisis farmasi antara lain yaitu untuk identifikasi metabolit, deteksi pengotor. uji disolusi, drug discovery, high throughput quantitative analysis, analisis sediaan obat, analisis asam amino, dan analisis pestisida. UPLC merupakan teknik analisis dengan

keunggulan dalam hal kecepatan, resolusi, dan sensitivitas yang tinggi. Keunggulan ini dicapai melalui teknologi instrumentasi yang didukung oleh desain system yang canggih. Diagram skema UPLC serta bagian instrument masing-masing ditunjukkan pada gambar 2.7 dan 2.8. Adapun beberapa komponen utama pada instrument UPLC antara lain:



Gambar 2.7. Skema sistem UPLC (Pramod *and* Navnanth, 2017).

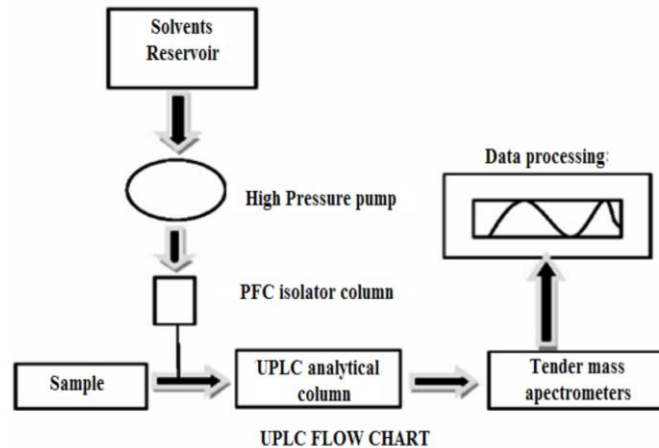


Gambar 2.8. Sistem UPLC (Pramod *and* Navnanth, 2017).

Desain dengan teknologi canggih pada pompa, auto sampler, detektor, data sistem, diagnostik layanan diperlukan untuk memenuhi tujuan tersebut. Instrumentasi dasar UPLC dibahas di bawah ini:

- a) Perangkat pompa (*pumping device*): pompa berfungsi untuk memompa fase gerak dengan kecepatan konstan dan mendorongnya ke kolom. Syarat standar pompa UPLC meliputi volume injeksi sampel kurang dari 3-5 μL , pompa beroperasi dengan tekanan 10.000 psi, serta ukuran partikel bahan pengemas fase diam kurang dari 2 μm . Reservoir pelarut merupakan tempat atau wadah pelarut sebelum dialirkan oleh pompa menuju kolom bersama sampel. UPLC menggunakan dua pompa serial dengan batas tekanan 15.000 psi (sekitar 1000 bar) dan memiliki katup pemilih pelarut internal, yang memiliki kemampuan untuk memilih rasio pelarut yang akurat. Ketika piston yang satu mendorong eluen menuju kolom, piston yang lain menyedot eluen dari reservoir. Jika prinsip ini tidak digunakan, tekanan dan kecepatan aliran yang stabil tidak akan tercapai (Pramod *and* Navnanth, 2017).
- b) Injeksi sampel (*sample injection*): injektor digunakan untuk menambahkan sejumlah kecil larutan yang mengandung sampel dalam fase gerak antara pompa dan kolom yang diukur secara tepat. Suntikannya harus dilakukan secara konsisten dan tepat. Ada berbagai jenis injektor yang tersedia dengan jumlah port injeksi berbeda. Injektor zespoort paling umum digunakan dalam analisis kolom tunggal. Katup injeksi konvensional, baik otomatis maupun manual, tidak dirancang untuk bekerja pada tekanan ekstrem. Untuk melindungi kolom dari fluktuasi tekanan yang ekstrim, proses injeksi harus relatif bebas pulsa (*pulse-free*) dan volume sapuan perangkat juga harus minimal untuk mengurangi potensi penyebaran pita. Waktu siklus injeksi yang cepat diperlukan untuk memanfaatkan kecepatan dari UPLC, yang pada gilirannya memerlukan kapasitas sampel yang tinggi. Suntikan volume rendah dengan sisa minimal juga

diperlukan untuk meningkatkan sensitivitas (Pramod *and* Navnanth, 2017 ; Basharat *et al.*, 2021). Diagram alir UPLC ditunjukkan pada gambar di bawah ini



Gambar 2.9. Diagram alir UPLC (Basharat *et al.*, 2021).

c) kolom UPLC (*UPLC columns*): bagian penting dari UPLC yang merupakan tempat terjadinya pemisahan. Berbagai kolom digunakan untuk zat yang berbeda tergantung pada sifat analitnya. Kolom UPLC terdiri dari partikel kecil berukuran kurang dari 2 μm . partikel-partikel tersebut terikat dalam matriks karena fase diam yang terikat diperlukan untuk menyediakan retensi dan selektivitas saat pemisahan komponen. Ukuran partikel yang kecil tersebut dapat meningkatkan kecepatan pemisahan komponen. Terdapat berbagai jenis kolom yang dapat digunakan dalam teknik UPLC. Kolom dengan partikel berbahan silika memiliki kekuatan mekanik yang baik tetapi memiliki sejumlah kelemahan, seperti kisaran pH yang terbatas dan tailing analit basa. Kolom dengan partikel berbahan polimer dapat mengatasi keterbatasan pH, namun memiliki permasalahan tersendiri termasuk efisiensi yang rendah, kapasitas pemuatan terbatas, dan kekuatan mekanik yang buruk (Pramod *and* Navnanth,

2017 ; Basharat *et al.*, 2021). Faktor- faktor yang mempengaruhi efisiensi kolom yaitu panjang kolom, ukuran partikel, kecepatan linear, faktor retensi, suhu kolom, dan pelarut (Pramod *and* Navnanth, 2017).

- d) Pendingin dan Pemanas Kolom (*Column Manager and Heater Cooler*): ACQUITY UPLC *Column Manager*, dengan peralihan kolom otomatis, ditujukan untuk pemrosesan sampel UPLC dengan produktivitas tinggi, dan pemanas/pendinginnya memungkinkan laboratorium menggunakan suhu sebagai parameter metode. Manajer kolom ACQUITY UPLC memungkinkan pengguna untuk memanfaatkan kinerja UPLC sepenuhnya, rentang fase diam, dan kekuatan mekanik yang ditawarkan oleh kolom ACQUITY UPLC BEH. Manajer kolom menyediakan pengaturan suhu dari 10°C hingga 90°C, peralihan otomatis hingga empat kolom dengan dimensi hingga 2,1 mm dan panjang 150 mm, serta saluran bypass untuk injeksi aliran (Naresh *et al.*, 2014).
- e) Detektor (*Detector*): merupakan instrument yang digunakan untuk mendeteksi analit secara kualitatif dan kuantitatif setelah pemisahan. Detektor UPLC yang digunakan harus mampu memberikan laju pengambilan sampel yang tinggi dengan puncak yang dapat dicapai sempit (lebar puncak setengah tinggi) dan sedikit dispersi puncak sehingga lebih sedikit zat terlarut yang terbuang di kolom. Metodologi UPLC memberikan sensitivitas pemisahan dua hingga tiga kali lipat dari metode HPLC sebelumnya karena metode detektornya. Sistem ini dikonfigurasi dengan detektor TUV, ELS, PDA, dan FLR atau kombinasi keduanya (Pramod *and* Navnanth, 2017; Basharat *et al.*, 2021). Detektor TUV (*Tunable Ultraviolet*) ini adalah dua saluran, detektor serapan, dikendalikan oleh perangkat lunak *Empower* atau *MassLynx* untuk aplikasi LC/MS dan LC.

Detektor PDA (*Photo Diode Array*) ini adalah detektor optic yang menyerap cahaya UV-Visible yang beroperasi antara 190-500 nm. Detektor ELS (*Evaporation Light Scattering*) dikendalikan oleh perangkat lunak *Empower* atau *MassLynx*, yang menggabungkan nebulizer tipe aliran yang dioptimalkan untuk kinerja sistem UPLC. Detektor FLR (*Fluorescence*) ini adalah detektor multi-saluran, multi panjang gelombang, yang memiliki panjang gelombang eksitasi berkisar antara 200 hingga 890 nm, panjang gelombang emisi berkisar antara 210-900 nm, menawarkan kemampuan pemindaian 3D untuk pengembangan metode yang lebih mudah. Deteksi dengan spektrometri massa juga telah digunakan dalam UPLC. Detektor MS ditingkatkan secara signifikan dengan UPLC. Data berpindah dari detektor ke komputer yang membuat kromatogram. Kromatogram merupakan representasi pemisahan yang terjadi pada analisis. Kromatogram menunjukkan garis dasar yang mewakili fase gerak saat mengalir melalui detektor, maka akan menimbulkan respon. Hal ini menyebabkan puncak pada kromatogram. Ketinggian puncak tergantung pada konsentrasi analit yang melewati detektor pada saat itu (Pramod and Navnanth, 2017).

- f) Perangkat Lunak: sistem ACQUITY UPLC dapat dengan mudah dikontrol, didiagnosis, dan dipantau melalui antarmuka konsol sistem grafis dengan perangkat lunak *Empower*TM dan *MassLynx*TM. *Empower* dan *MassLynx* menyediakan pemrosesan data dinamis dan alat manajemen informasi untuk mengubah hasil yang dihasilkan oleh sistem ACQUITY UPLC menjadi pengetahuan yang berharga (Pramod and Navnanth, 2017).

g) Aksesoris: system ACQUITY UPLC dilengkapi dengan teknologi *eCord*TM, tersedia di semua kolom ACQUITY UPLC. Sampel organizer yang meningkatkan kapasitas system lebih dari 10 kali lipat. Platform system *FlexCart* meningkatkan kegunaan, aksesibilitas, dan kenyamanan (Pramod and Navnanth, 2017).

2.5. Tinjauan Prediksi Fisikokimia dan Uji Toksisitas

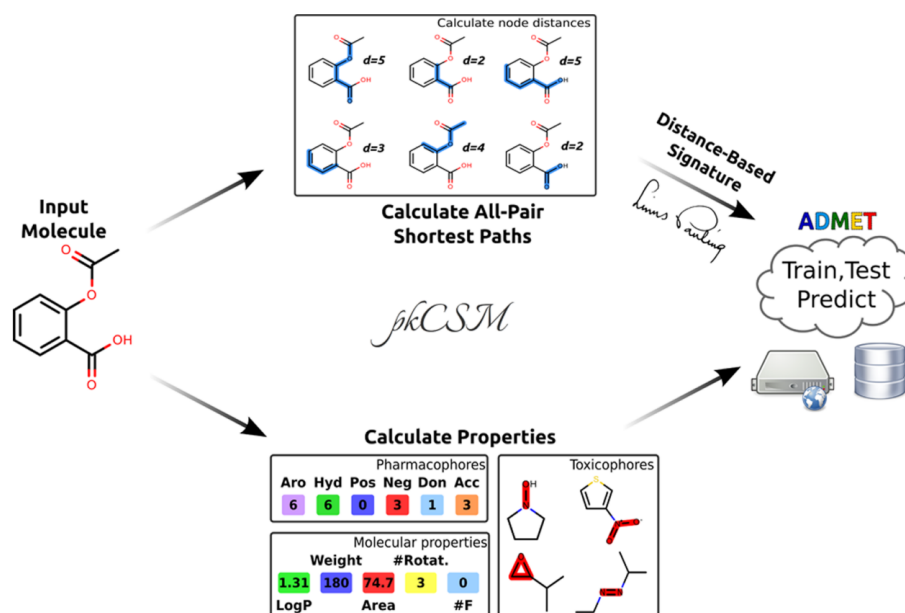
2.5.1. Prediksi Fisikokimia

Prediksi sifat fisikokimia seperti: berat molekul (BM), *logaritma koefisien partisi* oktanol/air (Log P), jumlah ikatan antar atom yang dapat berotasi (Torsion); *Hydrogen Bond Acceptors* (HBA), *Hydrogen Bond Donors* (HBD), dan *Polar Surface Activity* (PSA) (Krihariyani *et al.*, 2020). Prediksi sifat fisikokimia bertujuan untuk memprediksi probabilitas suatu senyawa menjadi obat oral secara *in silico* yang berdasarkan pada aspek Hukum Lima Lipinski. Hukum lima Lipinski atau *Lipinski rule* merupakan aturan atau kriteria senyawa molekul kecil yang dapat dikembangkan menjadi senyawa obat. Dalam lingkup yang lebih kecil, hukum lima Lipinski juga digunakan untuk menentukan apakah suatu senyawa dapat digolongkan sebagai senyawa yang bersifat *orally active* pada manusia, sehingga senyawa tersebut dapat dikategorikan sebagai obat yang dikonsumsi secara oral (Kholifah dan Endah, 2022).

Lipinski *et al* (1997) telah menganalisis 2.245 obat dari data dasar *Word Drugs Index* dan menyimpulkan bahwa senyawa akan sulit diabsorpsi dan permeabilitasnya rendah apabila berat molekulnya > 500; mempunyai nilai log koefisien partisi oktanol/air (log P) > +5; mempunyai ikatan-H donor (HBD) yang dinyatakan dengan jumlah gugus O-H dan N-H, > 5; dan mempunyai ikatan-H

aseptor (HBA), yang dinyatakan dengan jumlah atom O dan N, >10. Analisis tersebut dikenal sebagai hukum lima Lipinski karena semua nilai merupakan kelipatan dari angka 5 (Hardjono, 2017).

Prediksi sifat fisikokimia dilakukan menggunakan pkCSM *online tool* (Krihariyani *et al.*, 2020). PkCSM merupakan alat yang dapat mengkarakterisasi profil farmakokinetik senyawa secara komprehensif. Alat ini digunakan untuk memprediksi keseimbangan antara potensi, keamanan, dan sifat farmakokinetik. Alur kerja pkCSM ditunjukkan pada gambar 2.10.



Gambar 2.10. Alur kerja pkCSM (Pires *et al.*, 2015)

Perbedaan sifat fisikokimia mempengaruhi absorpsi, distribusi, efikasi, metabolisme dan ekskresi dari komponen senyawa tersebut di dalam tubuh. Selain itu perbedaan sifat fisikokimia juga berhubungan dengan interaksi antar komponen senyawa tersebut. Hal ini berkaitan dengan senyawa yang memiliki sifat hidrofobisitas tinggi, berat molekul, fleksibilitas struktur (jumlah ikatan yang dapat diputar), serta selektivitas target yang rendah. Sebagai tambahan, senyawa yang

bermuatan positif dengan pH tinggi mengandung beberapa atom nitrogen yang berhubungan dengan interaksi antar komponen tersebut (Abdullah *et al.*, 2021).

2.5.2. Uji Toksisitas

Toksisitas adalah kemampuan suatu zat kimia untuk menimbulkan kerusakan pada organisme baik pada saat digunakan atau pada saat berada dalam lingkungan (Faqiha *et al.*, 2022). Prediksi toksisitas bertujuan untuk mengetahui toksisitas serta risiko-risiko yang dapat muncul dari suatu senyawa dan bisa memberikan dampak pada manusia (Dewi *et al.*, 2023). Uji toksisitas perlu dilakukan dalam pengembangan suatu kandidat obat dari senyawa tertentu agar nantinya aman saat digunakan oleh manusia (Thahara *et al.*, 2022).

Prediksi toksisitas senyawa dilakukan dengan beberapa parameter termasuk uji LD₅₀. LD₅₀ merupakan pengujian untuk menetapkan potensi toksisitas akut. LD₅₀ menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik, dan mekanisme kematian (Nurmianti dan Gusmarwani, 2020). LD₅₀ adalah sebuah dosis yang diperlukan untuk membunuh 50% dari populasi hewan yang diuji, dimana semakin rendah nilai LD₅₀ maka semakin beracun sebuah senyawa tersebut (Habibullah *et al.*, 2021). Berdasarkan *Globally Harmonized System* (GHS) kelas toksisitas yang didasarkan nilai LD₅₀ dikelompokkan menjadi kelas toksisitas I sampai VI. Keenam kelas toksisitas tersebut menggunakan ambang batas LD₅₀ dari 5, 50, 300, 2000, dan 5000 mg/kg berat badan dengan pengklasifikasian sebagai Berikut: rentang nilai $LD_{50} \leq 5$ mg/kg masuk ke dalam kelas I (fatal jika tertelan), rentang nilai $5 < LD_{50} \leq 50$ mg/kg masuk ke dalam kelas II (fatal jika tertelan), rentang nilai $50 < LD_{50} \leq 300$ mg/kg masuk ke dalam kelas III (beracun jika tertelan), rentang nilai $300 < LD_{50} \leq 2000$ mg/kg masuk ke dalam kelas IV (berbahaya jika tertelan),

rentang nilai $2000 < LD_{50} \leq 5000$ mg/kg masuk ke dalam kelas V (bisa berbahaya jika tertelan), dan rentang nilai $LD_{50} > 5000$ mg/kg masuk ke dalam kelas VI (tidak beracun) (Naufa *et al.*, 2022)

Pengujian toksisitas secara *in silico* lebih efektif dan efisien dalam penggunaan waktu, pendanaan serta mengurangi faktor coba-coba seperti penggunaan hewan uji karena adanya masalah etika. Untuk menentukan toksisitas suatu kandidat obat dapat dilakukan menggunakan ProTox-II (Ortiz *et al.*, 2019). *Webserver* ProTox-II adalah alat akses terbuka yang dapat memprediksi toksisitas suatu senyawa. Kemampuan prediktifnya hanya mengandalkan struktur dua dimensi dari senyawa yang akan diteliti. Sensitivitas, spesifitas, dan presisi metode ProTox-II ini masing-masing sebesar 76%, 95%, dan 75%. *Webserver* ProTox-II menggunakan persamaan kimia dan mengidentifikasi fragmen beracun untuk memprediksi toksisitas secara akirat. Selain itu, sistem ini menggabungkan fitur unik prediksi kelas toksisitas melalui metode berbasis persamaan dan fragmen, serta menunjukkan potensi target toksisitas (Noga *et al.*, 2024). ProTox-II memberikan prediksi nilai toksisitas oral, prediksi sitotoksitas, mutagenesis, hepatotoksitas, imunotoksitas, dan karsinogenitas. Selain itu, ProTox-II juga memberikan gambaran apakah senyawa yang dianalisis akan berikatan dengan protein yang diketahui dapat menimbulkan reaksi merugikan terhadap obat (Ortiz *et al.*, 2019).

2.6. Tinjauan Uji PASS

2.6.1. PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*)

Prediction of Activity Spectra for Substances merupakan suatu perangkat lunak berbasis computer yang memberikan informasi tentang aktivitas biologis suatu senyawa kimia berdasarkan struktur kimianya (Dash *et al.*, 2020). PASS digunakan

untuk memprediksi sifat farmakologis, mekanisme kerja, efek toksik dan efek samping, interaksi dengan enzim metabolisme obat dan transporter, dan pengaruh terhadap gen (Rudik *et al.*, 2019). PASS dapat memprediksi lebih dari 3750 aktivitas biologis, mekanisme biokimia, toksisitas spesifik, dan istilah metabolik berdasarkan struktur 2D atau *simplified molecular-input line-entry system* (SMILES) kanonik dengan akurasi rata-rata 95% untuk menentukan spektrum aktivitas biologis suatu molekul berdasarkan nilai *probability active* (Pa) dan *probability inactive* (Pi) (Dash *et al.*, 2020). Prediksi ini didasarkan pada analisis hubungan aktivitas struktur set pelatihan yang terdiri dari lebih dari 205.000 senyawa yang menunjukkan lebih dari 3.750 jenis aktivitas biologis (Anand *et al.*, 2017). Nilai Pa dan Pi menunjukkan aktivitas biologis suatu senyawa (Tessema *et al.*, 2023). Nilainya berada dalam kisaran 0,000 – 1,000. (Dash *et al.*, 2020). Interpretasi hasil prediksi didasarkan pada nilai Pa (skor probabilitas untuk menjadi aktif) yang dituliskan oleh Tessema *et al* (2023) adalah sebagai berikut:

- i. Jika $Pa > 0,7$, senyawa tersebut sangat aktif dan kemungkinan besar akan menunjukkan aktivitas yang disebutkan dalam percobaan.
- ii. Jika $0,5 < Pa < 0,7$, kemungkinan besar menunjukkan aktivitas dan peluangnya lebih rendah dalam percobaan.
- iii. Jika $Pa < 0,5$, senyawa tersebut tidak mungkin menunjukkan aktivitas yang disebutkan dalam percobaan.

2.6.2. Pubchem

Pubchem merupakan database kimia publik, yang dikembangkan dan dikelola oleh *National Institutes of Health* (NIH) Amerika Serikat (Kim *et al.*, 2021). *Pubchem* diluncurkan pada tahun 2004 dan telah berkembang menjadi

sumber informasi kimia di berbagai bidang termasuk kimia informatika, biologi kimia, kimia medis dan penemuan obat baru. *Pubchem* menjadi situs web kimia populer dengan jumlah pengguna sekitar tiga juta pengguna interaktif per bulan (Kim *et al.*, 2019).

Pubchem mengatur datanya menjadi tiga database yang saling terkait yaitu zat, senyawa, dan *BioAssay*. Basis data zat (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>) menyimpan informasi yang dikontribusikan deposan. Struktur kimia didapatkan dari basis data zat dan disimpan dalam basis data majemuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). Basis data *BioAssay* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay>) menyimpan deksripsi pengujian biologis pada bahan kimia. Pengidentifikasi utama zat, senyawa, dan basis data *BioAssay* masing-masing adalah SID (*SubstanceID*), CID (*CompoundID*) dan AID (*AssayID*) (Kim *et al.*, 2016).

Data *Pubchem* disediakan oleh 350 lebih kontributor (<https://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/sources/>) seperti laboratorium universitas, instansi pemerintah, Perusahaan farmasi, vendor bahan kimia, penerbit dan sejumlah sumber daya kimia biologi. Data yang diberikan oleh kontributor ini tidak hanya terbatas pada molekul kecil saja, tetapi termasuk juga siRNAs, miRNAs, karbohidrat, lipid, peptide, makromolekul yang dimodifikasi secara kimia dan lain-lain. *Pubchem* berisi sejumlah besar data bioaktivitas zat kimia yang diperoleh dari literatur, yang didapatkan secara manual dari puluhan ribu artikel ilmiah oleh kontributor data seperti ChEMBL dan BindingDB. Selain itu melalui integrasi dengan data *DrugBank*, *Hazardous Substances Data Bank*.

Pubchem juga menampung data dari *Food and Drug Administration* (FDA), *Unique Ingredient Identifiers* (UNII), *Environmental Protection Agency* (EPA), dan *Substance Registry Services* (SRS). Hasilnya, *Pubchem* memiliki sekitar 6 juta dokumen paten dan lebih dari 16 juta struktur kimia, dengan lebih dari 329 juta tautan paten bahan kimia yang mencakup paten Amerika Serikat, Eropa, dan *World Intellectual Property Organization* (Kim *et al.*, 2016).

Isi data *Pubchem* dan database lainnya saling melengkapi. *ChEMBL* berfokus pada data bioaktivitas molekul yang ditentukan dari berbagai jenis pengujian (pengujian pengikatan, pengujian fungsional, dan pengujian ADMET). Fokus utama dari *BindingDB* bertujuan untuk mengumpulkan afinitas pengikatan kompleks protein-ligan yang ditentukan secara eksperimental, namun tidak termasuk data bioaktivitas dari uji fungsional dan uji ADMET yang dimiliki oleh *ChEMBL*. *Pubchem* berisi sejumlah besar data bioaktivitas (Kim *et al.*, 2016).

2.7. Tinjauan *Network pharmacology*

2.7.1. Definisi

Network pharmacology atau farmakologi jaringan merupakan pendekatan *in silico* integrativ untuk membangun jaringan “protein-senyawa atau penyakit-gen” untuk menjelaskan mekanisme yang mendasari efek terapeutik sinergis dari suatu obat-obatan tradisional (Noor *et al.*, 2022). Prinsip utama *Network pharmacology* melibatkan penerapan pendekatan berbasis jaringan untuk membangun jaringan bertingkat (jalur-gen-obat-penyakit) untuk mengeksplorasi efek terapeutik dan mekanisme kerja obat dalam terapi kompleks (Dong *et al.*, 2021). *Network pharmacology* dapat direkonstruksi dengan jaringan molekuler yang mengintegrasikan konsep multidisiplin termasuk biomedis, biokimia,

bioinformatika, system biologi, farmakologi, ilmu komputasi, dan bidang keilmuan terkait lainnya. Hal ini bermanfaat untuk memperkirakan efek yang sesuai target dengan efisiensi yang lebih tinggi, sehingga dapat meningkatkan potensi penemuan obat melalui mode “beberapa target, banyak efek, penyakit kompleks” (Lee *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2013). Selain itu, *Network pharmacology* memberikan pendekatan untuk memahami pathogenesis penyakit, dan dapat digunakan untuk identifikasi target dan prediksi indikasi. *Network pharmacology* berfokus pada pengobatan “multi-target, multi-komponen” terhadap penyakit (Li *et al.*, 2017).

Keuntungan *Network pharmacology* antara lain sebagai berikut: pengaturan jalur sinyal dengan banyak saluran, peningkatan kemanjuran obat, pengurangan efek samping, peningkatan Tingkat keberhasilan uji klinis, dan penurunan biaya penemuan obat (Zhang *et al.*, 2013).

2.7.2. Proses dalam Penelitian *Network pharmacology*

a. Pengumpulan dan Validasi Data

Identifikasi senyawa aktif tanaman obat dan target terkait penyakit menjadi Langkah awal dalam penelitian *Network pharmacology*. Setelah mendapatkan senyawa aktif, SMILES kanonik dari senyawa aktif diambil dari database public yang tersedia, dilanjutkan dengan memprediksi gen dari SMILES kanonik yang didapat. Prediksi gen terkait penyakit merupakan Langkah awal untuk mengeksplorasi mekanisme molekuler tanaman obat untuk mengobati berbagai penyakit dan kelainan (Noor *et al.*, 2022).

b. Analisis dan Visualisasi Network

Diagram *Venn* digunakan untuk mengidentifikasi target penyakit dan senyawa yang tumpang tindih. Hal ini bertujuan untuk memprediksi gen terkait

penyakit, dan selanjutnya mengidentifikasi gen umum antara penyakit dan senyawanya. Analisis *network* dilakukan untuk memahami mekanisme tanaman obat dalam pengobatan penyakit. Interaksi protein-protein (PPI) sangat signifikan karena memiliki fleksibilitas, kemampuan beradaptasi, dan spesifitas yang tinggi. Jaringan target utama PPI (gen umum) diperoleh melalui database yang menyediakan interaksi fungsional di antara target utama. Analisis *network* dilakukan untuk memprediksi gen hub yang memiliki tingkat konektivitas terbaik. Analisis *network* mengungkap target penting, bahan aktif, dan jalur terkaitnya dengan mengidentifikasi target (Noor *et al.*, 2022).

Visualisasi *network* diterapkan untuk mendapatkan informasi dari data interasosiasi dan mengubahnya menjadi visual dari *network* menggunakan alat visualisasi. Terdapat dua Langkah dalam proses visualisasi jaringan, yaitu: (1) memperkaya atribut *network*, menambahkan *node network*, dan peningkatan kekuatan koneksi antar *network*; (2) mendeskripsikan *network* untuk menggambarkan secara jelas dan intuitif mewakili *network*. Saat ini, Sebagian besar visualisasi *Network pharmacology* adalah melalui *online tools* seperti *Cytoscape*, *GUESS*, dan *Pajek* (Zhang *et al.*, 2013).

c. Validasi Hasil

Berbagai metode validasi untuk mengkonfirmasi efikasi target molekuler yang diprediksi. Metode *in vitro* dan *in vivo* umumnya dianggap sebagai metode yang paling layak, namun metode tersebut memakan waktu dan memerlukan biaya tinggi untuk mendapatkan hasil yang benar. Munculnya teknologi menghadirkan pendekatan *in silico* dengan menyediakan platform yang berguna untuk validasi hasil (Noor *et al.*, 2022).

Sebagian besar peneliti menggunakan pendekatan *molecular docking* untuk validasi. *Molecular docking* reseptor-ligan digunakan untuk memprediksi Lokasi docking bahan aktif dan target utama yang berasal dari *Network pharmacology*. Oleh karena itu, *Network pharmacology* dan *molecular docking* efektif menjembatani kesenjangan antara pengobatan modern dan herbal serta dapat memfasilitasi studi mekanistik tentang tindakan sinergis obat-obatan herbal. *Molecular docking* memungkinkan prediksi interaksi yang mengikat ligan dengan protein terkait dalam keadaan terikat. *Molecular docking* bertujuan untuk memvalidasi keberhasilan aktivitas senyawa aktif terhadap target gen potensial. Informasi yang diperoleh melalui *molecular docking* dapat membantu peneliti dalam memahami banyak aspek biomedis, mulai dari sintesis protein hingga Kesehatan dan penyakit. Gabungan *Network pharmacology* dan analisis molekuler docking dilakukan untuk mengungkap target molekuler dan mekanisme senyawa untuk pengobatan penyakit (Noor *et al.*, 2022).

Analisis *Gene expression microarray* juga merupakan teknik untuk memvalidasi hasil prediksi, *Gene expression microarray* adalah pengukuran aktivitas ribuan gen sekaligus untuk memberikan gambaran tentang proses seluler. Profil ini dapat digunakan untuk membedakan sel-sel yang aktif membelah atau untuk menggambarkan bagaimana sel merespons terapi tertentu. *Microarray* berdensitas tinggi adalah salah satu metode yang paling kuat dan serbaguna untuk menganalisis pola ekspresi sejumlah besar gen di berbagai jaringan atau dalam jaringan yang sama dalam berbagai eksperimental. Meluasnya penggunaan teknologi *microarray* menghasilkan data dalam jumlah besar, yang mendorong pengembangan metode analisis yang lebih baik untuk mengantisipasi aktivitas gen

target. Salah satu penerapan utama teknologi ini sebagai alat penelitian adalah penilaian cepat dan akurat terhadap perubahan ekspresi gen akibat patofisiologi, fisiologi, dan perkembangan (Noor *et al.*, 2022).

Western blotting merupakan teknik lain yang tidak perlu dipertanyakan lagi dan dapat diandalkan untuk validasi tingkat ekspresi gen target. Para peneliti biasanya menggunakan *Western blotting* ini untuk mevalidasi hasil yang diperoleh menggunakan jaringan interaksi jalur-target. Keakuratan dan keandalan hasil yang diberikan oleh analisis *Western blot* ini meningkatkan kepercayaan diri para peneliti, yang pada akhirnya menghasilkan penemuan-penemuan inovatif di bidang penemuan dan pengembangan obat (Noor *et al.*, 2022).

Terakhir, kuantifikasi data yang divalidasi dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa pendekatan terintegrasi seperti proteomic, transkriptomik, genomic, metabolomic, dan skrining *high-throughput screening* (HTS). Metode lain adalah dengan memvalidasi interaksi molekuler yang ada dalam jaringan. Metode ini menghasilkan perspektif baru dalam konteks pemahaman mekanisme aktivitas obat dan validasi jaringan obat atau model prediksi (Noor *et al.*, 2022).

Singkatnya, farmakologi jaringan bersama dengan teknik validasi membantu dalam penemuan mekanisme farmakologi utama dari jamu/formula herbal. Pendekatan terpadu ini meletakkan dasar untuk pengobatan penyakit kompleks dengan menggunakan tanaman obat. Oleh karena itu, strategi yang lebih inovatif dan baru harus diterapkan untuk memahami sepenuhnya mekanisme terapeutik tanaman obat (Noor *et al.*, 2022).

2.7.3. Database dan Perangkat Lunak *Network pharmacology*

2.7.3.1. *GeneCards*

GeneCards adalah basis data internasional terbesar untuk *Homo sapiens* yang berisi informasi komprehensif tentang data genetik, genom, dan penyakit manusia untuk memfasilitasi studi kesehatan (Lin and Hu, 2021). Basis data ini menggabungkan informasi >150 sumber terpilih terkait gen, protein, ncRNAs, elemen pengatur, senyawa kimia, obat-obatan, SNPs, molekul pemberi sinyal, protokol diferensiasi, jalur biologis, sel induk, uji genetik, uji klinis, penyakit, publikasi, serta memberdayakan *Next Generation Sequencing* (NGS), Kumpulan gen, *descriptor*, dan *tools* analisis *query* (Safran *et al.*, 2021). *GeneCards* memiliki kemampuan pencarian yang luas sehingga memungkinkan pengguna untuk mencari dengan kata kunci yang relevan dengan penyakit untuk mengidentifikasi gen yang paling relevan (Dahary *et al.*, 2019).

2.7.3.2. *DisGeNET*

DisGeNET merupakan platform akses terbuka yang mengintegrasikan informasi tentang gen dan varian yang terkait dengan penyakit manusia serta ciri-ciri normal dan abnormal dari beberapa sumber dengan informasi yang didapatkan dari literatur ilmiah. *DisGeNET* mencakup penyakit manusia, termasuk sifat dan fenotipe yang diukur sebagai manifestasi penyakit atau akibat pengobatan obat (efek samping obat). Informasi terintegrasi yang ada di dalam *DisGeNET* distandarisasi dengan terminologi dan ontology berbasis komunitas, sesuai dengan prinsip data FAR, dan dianotasi dengan atribut dan metrik yang berbeda untuk membantu pencarian, menyaring dan memvisualisasikan informasi (Piñero *et al.*, 2021). Konsep inti dalam struktur database *DisGeNET* adalah *Gene-Disease Association* (GDA) dan *Variant-Disease Association* (VDA), yang disusun dari

sumber data yang berbeda. Integrasi dari berbagai sumber data ini meliputi standarisasi gen, varian penyakit (penyakit, gejala, dan ciri-ciri) yang tepat, dan asosiasi menggunakan ontology berbasis komunitas dan terkontrol (Piñero *et al.*, 2019).

2.7.3.3.STRING

STRING merupakan database yang mengintegrasikan interaksi protein-protein, baik interaksi fisik maupun asosiasi fungsional yang dikumpulkan secara sistematis. Data berasal dari beberapa sumber seperti literatur ilmiah, prediksi interaksi komputasi, konteks genomik, basis data eksperimen interaksi, dan jalur yang diketahui dari sumber yang akurasi. Cakupan hubungan protein-protein dalam STRING adalah “asosiasi fungsional”, dimana protein dinggap berhubungan ketika ada bukti yang menunjukkan hubungan fungsional yang berevolusi dan spesifik antara keduanya (Szklarczyk *et al.*, 2023).

2.7.3.4.KEGG

KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) merupakan basis pengetahuan untuk analisis sistematis fungsi gen, menghubungkan informasi genom dengan informasi fungsional tingkat tinggi (Kanehisa and Goto, 2000). KEGG terdiri dari delapan belas basis data yang terbagi dalam empat kategori yaitu informasi kesehatan, informasi genom, informasi kimia, dan informasi fungsional. Informasi genom disimpan dalam *database GENES*, yang merupakan kumpulan katalog gen untuk semua genom yang diurutkan secara lengkap dan beberapa genom parsial dengan anotasi fungsi gen. Informasi fungsional tingkat tinggi disimpan dalam database *PATHWAY*, yang berisi representasi grafis dari proses seluler, seperti metabolisme, transportasi membrane, transduksi sinyal, dan siklus

sel. Informasi kimia disimpan dalam database *LIGAND*, yang berisi senyawa kimia, molekul enzim, dan reaksi enzimatik. Informasi kesehatan disimpan dalam database *MEDICUS*, yang berisi tentang penyakit manusia, obat, dan kelompok obat (Kanehisa *et al.*, 2017).

2.7.3.5. Gene ontology

Gene ontology (GO) merupakan sumber daya komprehensif mengenai fungsi gen dan produk gen (protein dan RNA nonkode). *Gene ontology* menyediakan representasi fungsi gen yang komprehensif dan terstruktur mengenai gen dari organisme seluler atau virus. Model dasar yang mendasari *Gene ontology* adalah “*molecular biology paradigm*”, di mana terdapat tiga aspek karakteristik fungsional yang digunakan untuk menggambarkan fungsi gen (Aleksander *et al.*, 2023):

- a. Fungsi molekuler: aktivitas yang dilakukan oleh produk gen pada tingkat molekuler
- b. Komponen seluler: lokasi, relatif terhadap struktur seluler
- c. Proses biologis: suatu “program biologis” yang terdiri dari aktivitas molekuler yang bekerja Bersama untuk mencapai hasil tertentu, pada Tingkat sel atau pada Tingkat organisme multiseluler

Setiap *ontology* menggambarkan aspek tertentu dari suatu gen atau fungsi produk gen, serta hubungan antar istilah. Relasi ini dapat berupa hubungan ‘*is_a*’, ‘*part_of*’, ‘*has_part*’, atau ‘regulasi’ (Plessis *et al.*, 2011).

2.7.3.6. Cytoscape

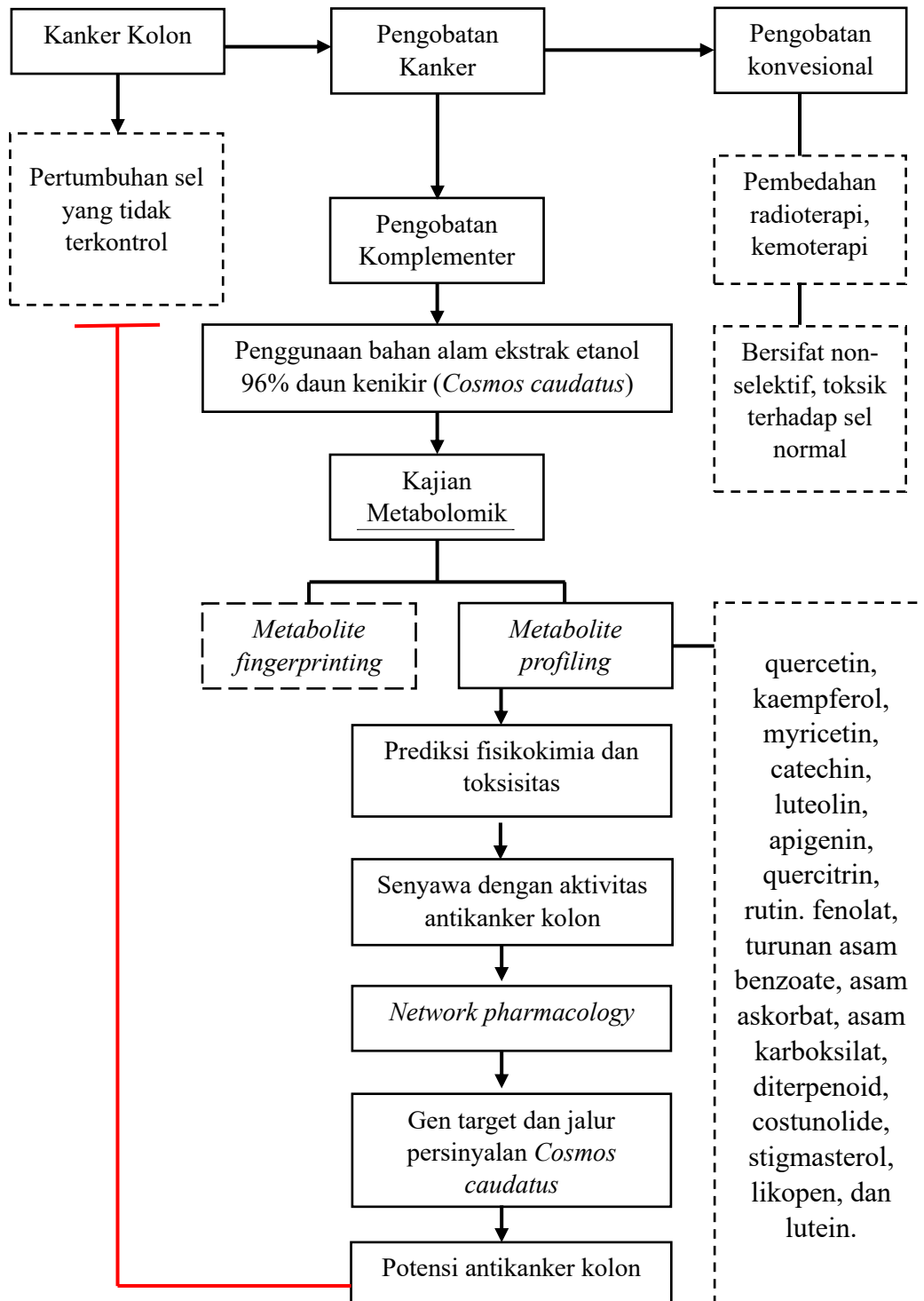
Cytoscape (<http://cytoscape.org>) merupakan perangkat lunak yang digunakan untuk menganalisis dan memvisualisasikan interaksi jaringan. *Cytoscape* dapat menyediakan pemetaan visual yang kuat melalui sistem data biologi,

proteomika, dan genomik. Selain itu, dalam *cytoscape* berisi “aplikasi” atau *plugin* yang dapat digunakan untuk menganalisis jaringan dan mendukung integrasi sumber data eksternal seperti *Gene ontology*. *Cytoscape* menggunakan grafik algoritma tata letak untuk memvisualisasikan interaksi jaringan (Al-Harazi *et al.*, 2019). Selain dapat mengimpor jaringan dari berbagai sumber, *Cytoscape* memungkinkan pengguna mengimpor data *node* tabular dan memvisualisasikannya ke dalam jaringan (Legeay *et al.*, 2020). *Cytoscape* berperan dalam konstruksi jaringan, yang dapat membangun peta jaringan topologi dua dimensi dalam setiap *node* berdasarkan tepinya dan kemudian secara ringkas dan jelas menganalisis dasar farmakologi dan mekanisme tanaman obat. Setiap jenis simpul (protein, senyawa, dan penyakit) serta kekuatan hubungannya dapat dianalisis secara terpisah (Yi *et al.*, 2018).

BAB III

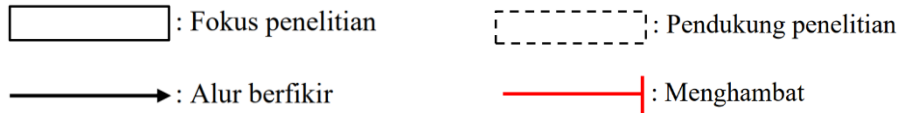
KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan:



3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Prekursor kanker kolon berupa polip yang dengan seiring waktu berubah menjadi sel kanker. Perkembangan neoplasma kolorektal melibatkan beberapa perubahan genetik dan fenotipik struktur dan fungsi epitel usus normal, yang menyebabkan pertumbuhan sel, proliferasi, dan perkembangan tumor yang tidak teratur (Holle *et al.*, 2020). Pengobatan kanker konvensional yang umum dilakukan adalah dengan pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi (Hapsari dan Setyawan, 2023; Sirait dan Astuti, 2019). Akan tetapi terapi konvensional masih bersifat non-selektif menimbulkan efek toksik pada sel normal lainnya (Debela *et al.*, 2021).

Efek samping tersebut menjadi landasan penting untuk penemuan pengobatan alternatif. Pengobatan herbal dari tanaman merupakan bagian dari pengobatan komplementer dan alternatif, dimana hal tersebut bertujuan untuk meningkatkan kekebalan tubuh, menghilangkan rasa sakit, mengendalikan efek samping yang disebabkan oleh penyakit atau pun pengobatan, serta meningkatkan kualitas hidup pasien saat dan setelah pengobatan (Lee *et al.*, 2019). Penggunaan daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai obat herbal yang tersusun dari multi komponen metabolit sekunder yang dapat menjadi salah satu obat alternatif yang dapat meringankan efek samping. Kenikir mengandung berbagai senyawa aktif antara lain flavonoid, saponin, terpenoid, alkaloid, tannin, karotenoid, asam fenolik, dan minyak atsiri (Dwiyanti *et al.*, 2014; Herlina *et al.*, 2021). Flavonoid yang

terdapat pada kenikir berupa quercetin, quercitrin, avicularin, rutin, isoquercitrin, dan vitexin (Rafi *et al.*, 2023). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder berupa senyawa flavonoid pada kenikir berperan sebagai anti-kanker dengan aktifitas sitotoksik, apoptosis, dan antiproliferasi terhadap sel kanker (Adawiyah *et al.*, 2017).

Terdapat beberapa tahapan yang perlu dilakukan pada kandidat obat baru sebelum *Network pharmacology* yaitu seleksi terhadap senyawa hasil metabolit profiling yang memiliki aktivitas antikanker pada kanker kolon dilihat dari nilai $P_a > 0,7$ melalui database PASS *Online*, kemudian senyawa yang lolos tersebut dilakukan prediksi fisikokimia dan uji toksisitas. Prediksi fisikokimia bertujuan untuk memprediksi probabilitas suatu zat menjadi obat oral dengan menggunakan hukum lima lipinski sebagai dasar pengukurannya (Nauфа *et al.*, 2022). Sedangkan uji toksisitas bertujuan untuk mengetahui toksisitas tumbuhan dan ambang batas penggunaannya sebagai obat (Arif *et al.*, 2021). Senyawa metabolit *Cosmos caudatus* yang telah memenuhi hukum lima lipinski dan toksisitas kemudian akan dilanjutkan dengan *Network pharmacology* untuk mengetahui mekanisme farmakologi atau jalur persinyalannya terhadap kanker kolon. Meskipun terdapat beberapa penelitian yang mengatakan bahwa daun kenikir (*Cosmos caudatus*) berpotensi untuk pengobatan kanker kolon, namun belum ada yang menjelaskan mekanisme farmakologi dan jalur persinyalan antara *Cosmos caudatus* dengan kanker kolon. Atas dasar permasalahan tersebut peneliti melakukan pengujian *Network pharmacology* yang dapat menunjukkan mekanisme farmakologi dan jalur persinyalan *Cosmos caudatus* dari perspektif multi target yang berpotensi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker kolon.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksperimental, yaitu dengan mengidentifikasi profil metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) dengan UPLC-QToF-MS/MS dan analisis secara *in silico* untuk menentukan mekanisme molekuler senyawa ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) pada pengobatan kanker kolon.

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus 2024. Preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Riset, program studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Identifikasi sampel dilakukan di Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Kepolisian Negara R.I. Sentul, Kabupaten Bogor.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berasal dari kebun di daerah Batu.

4.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berasal dari kebun di daerah Batu.

4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1. Variabel Bebas

Ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) untuk *Metabolite profiling*

4.4.2. Variabel Terikat

Profil metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*), Nilai *Pa*, *Molecular Weight* (MW), logaritma koefisien partisi oktanol/air (Log P), *Hydrogen Bond Acceptors* (HBA), *Hydrogen Bond Donors* (HBD), *Polar Surface Area* (PSA), LD50, aktivitas antikanker kolon, gen target yang terkait dengan kanker kolon, dan jalur persinyalan yang terkait dengan kanker kolon

4.4.3. Variabel Kontrol

Pelarut etanol 96%, ekstraksi (suhu 40°C, 30 menit, metode UAE), bioaktivitas uji PASS yaitu antineoplastic, antikanker kolon, apoptosis, kemopreventif, *database* (*GeneCards* dan *DisGeNET* dengan nilai relevance score ≥ 7)

4.5. Definisi Operasional

a. *Metabolite Profiling*

Tabel 4.1. *Metabolite profiling*

No	Istilah	Keterangan
1	Ekstrak etanol 96% daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>)	Ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi daun <i>Cosmos caudatus</i> dengan pelarut etanol 96%
2	UPLC-QToF-MS/MS	instrumen untuk pemisahan kromatografi dan spektrometri massa resolusi tinggi untuk deteksi massa yang akurat dan identifikasi metabolit (Ariyanti <i>et al.</i> , 2021), serta dapat menghasilkan pengukuran massa monoisotop yang lebih akurat, spektra dengan resolusi tinggi (Ma'arif <i>et al.</i> , 2019).

- 3 Profil metabolite Senyawa-senyawa dalam ekstrak yang ekstrak *Cosmos* diperoleh dari hasil interpretasi data spektrak *caudatus* menggunakan UPLC-QToF-MS/MS

b. Parameter Prediksi Fisikokimia

Tabel 4.2. Parameter prediksi fisikokimia

No	Jenis Parameter	Parameter	Keterangan
1.	<i>Molecular weight</i> (g/mol)	≤ 500 g/mol	Berat molekul
2.	Log P	≤ 5	Nilai log koefisien partisi pktanol/air yang menunjukkan hidrofobik
3.	<i>Hydrogen Bond</i> <i>Donors</i> (HBD)	≤ 5	Donor ikatan hydrogen
4.	<i>Hydrogen Bond</i> <i>Acceptors</i> (HBA)	≤ 10	Akseptor ikatan hydrogen
5.	<i>Polar Surface</i> <i>Area</i> (PSA)	$\leq 140 \text{ \AA}$	Daerah permukaan polar

c. Parameter Uji Toksisitas

Tabel 4.3. Parameter uji toksisitas

No	Jenis Parameter	Parameter	Keterangan
1.	LD ₅₀	Kelas I (LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg) Kelas II ($5 < \text{LD}_{50} \leq$ 50 mg/kg) Kelas III ($50 < \text{LD}_{50}$ ≤ 300 mg/kg) Kelas IV ($300 <$ LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg)	Fatal apabila tertelan Fatal jika tertelan Toksik apabila tertelan Berbahaya apabila tertelan

Kelas V ($2000 < LD_{50} \leq 5000$ mg/kg)	Kemungkinan bisa berbahaya apabila tertelan
Kelas VI ($LD_{50} > 5000$ mg/kg)	Tidak beracun (Naufa <i>et al.</i> , 2022)

d. Parameter Uji PASS

Tabel 4.4. Parameter uji PASS

No	Jenis	Parameter	Keterangan
	Parameter		
1.	Nilai P_a (<i>probability activity</i>)	Nilai $P_a > 0,7$ Nilai P_a 0,5-0,7 Nilai $P_a < 0,5$	Sangat mungkin menunjukkan aktivitas dalam percobaan Cenderung menunjukkan aktivitas dalam percobaan Tidak mungkin menunjukkan aktivitas dalam percobaan

e. *Network Pharmacology*

Tabel. 4.5. Database dan perangkat lunak *network pharmacology*

No	Istilah	Keterangan
1	<i>GeneCards</i>	Basis data seluruh gen manusia
2	<i>DisGeNET</i>	Basis data gen dan varian terkait penyakit manusia
3	STRING	Basis data interaksi protein-protein
4	<i>KEGG Pathway</i>	Basis data jalur sistematis fungsi gen
5	<i>Gene ontology</i>	Basis data fungsi gen

6	<i>Cytoscape</i>	Perangkat lunak untuk menganalisis dan memvisualisasikan interaksi jaringan biomolekuler
---	------------------	--

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

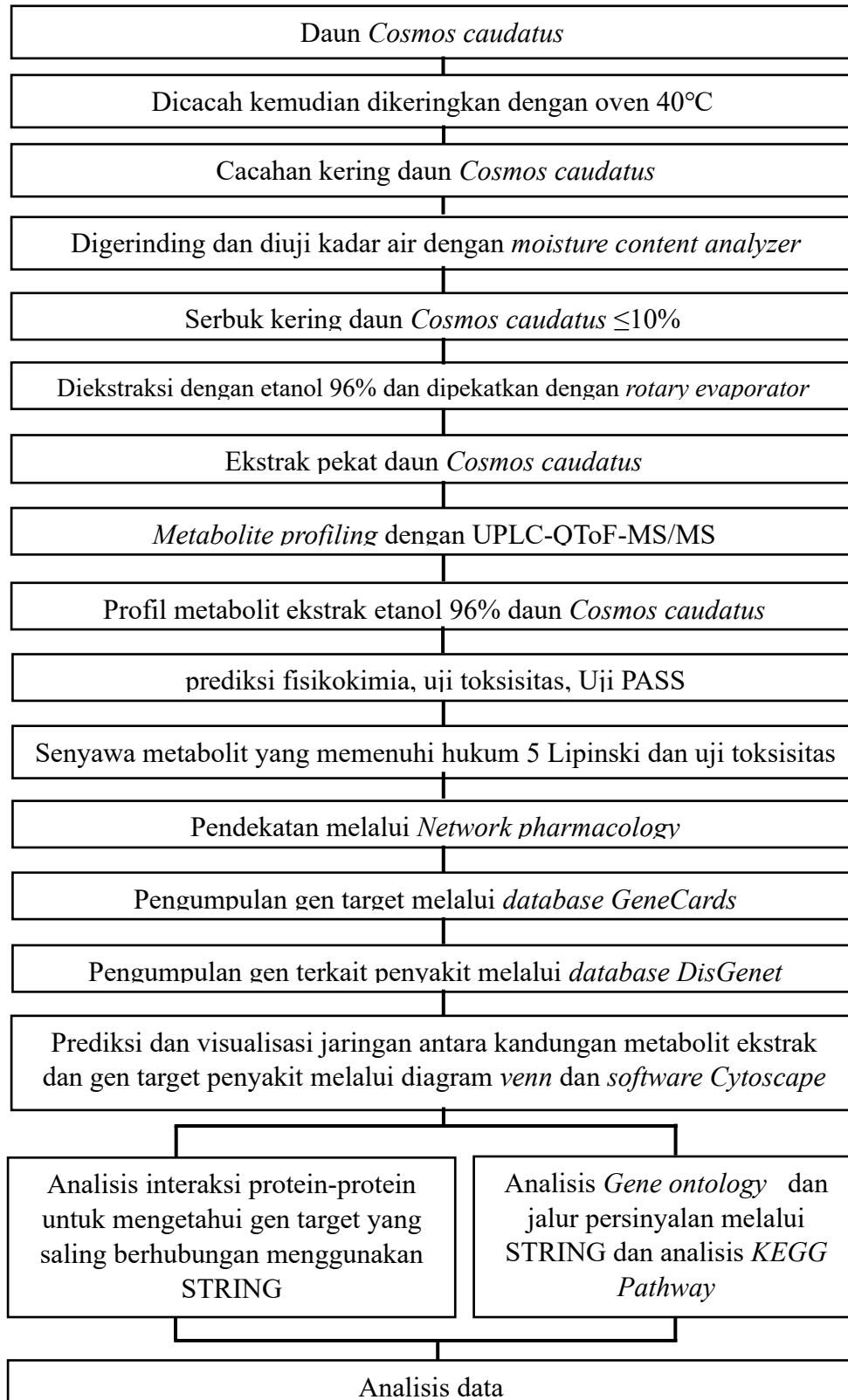
Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu perangkat keras berupa laptop ASUS, prosesor Intel® Core™ i3-10110U CPU @ 2.10GHz 2.59 GHz, RAM 8,00 GB, sistem operasi *Windows 10 Home Single Language*, seperangkat instrumen UPLC-QToF-MS/MS (*Waters*), instrumen UAE, *rotary evaporator*, instrument *moisture content analyzer*, *microsyringe*, oven, gelas ukur, gelas Erlenmeyer, corong, batang pengaduk, cawan porselen, pipet tetes, spatula, kaca arloji, sendok tanduk, dan tabung appendorf. Perangkat lunak yang digunakan yaitu *cytoscape*. Database yang digunakan yaitu *Pubchem*, *PASS Online*, *PkCSM*, *Protox II Online Tools*, *Diagram venn*, *GeneCards*, *DisGenet*, *Cytoscape*, *STRING*, dan *KEGG Pathway*.

4.6.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pelarut etanol 96% (teknis), daun *Cosmos caudatus*, water for injection 0,05%, aquades, asam format, asetonitril, alumunium foil, kertas saring. Protein atau gen target senyawa ekstrak etanol 96% daun kenikir berdasarkan database *GeneCards* (<https://www.GeneCards.org>) dengan *keyword* nama senyawa. Protein target terkait penyakit kanker kolon dari database *DisGeNET* (<http://www.disgenet.org/>) dengan *keyword* “*Colon Cancer*”.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Skema Penelitian



Gambar 4.1 Skema Penelitian

4.7.2. Prosedur Kerja

4.7.2.1. Preparasi Sampel

Tanaman kenikir (*Cosmos caudatus*) dideterminasikan untuk memperoleh bukti kebenaran bahwa tanaman yang disiapkan sesuai dengan tanaman yang diperlukan sebagai sampel penelitian. Kemudian dipilih daun segar dicuci dengan air mengalir agar tidak ada pengotor fisik yang menempel. Daun yang sudah dicuci bersih selanjutnya dirajang dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C hingga diperoleh daun kering dengan bobot konstan. Irisan yang sudah kering digiling hingga menjadi serbuk simplisia dengan derajat kehalusan yang sesuai.

4.7.2.2. Analisis Kadar Air

Serbuk simplisia selanjutnya diuji kadar airnya menggunakan instrument *moisture content analyzer*. Instrumen dinyalakan, sesaat setelah itu *analyzer* menunjuk pada sample pan handler. Selanjutnya penutup wadah sampel diturunkan sehingga instrument memperlihatkan 0,000 pada layar yang mengartikan bahwa instrument sedang ditara. Kemudian ± 0.5 gram sampel dimasukkan di *sample pan* dan ditutup. Perangkat mulai mengukur kadar air secara akurat dan otomatis hingga layar menampilkan hasil pengukuran sebagai presentase kadar air simplisia.

4.7.2.3. Ekstraksi

Ekstraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dilakukan dengan menggunakan metode Ultrasonik. Ultrasonik merupakan metode yang tepat mengingat waktu dan jumlah pelarut yang lebih efektif dan efisien, sehingga dihasilkan ekstrak yang optimal. Dilakukan ekstraksi pada serbuk daun kenikir dengan penyari etanol 96%

(1:10). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan UAE selama 30 menit dengan suhu optimal 40°C, amplitude 65% (Nafisa *et al.*, 2023). Selanjutnya ekstrak daun kenikir disaring dan filtrate dipekatkan dengan *rotary evaporator* (tekanan 175 mbar, suhu 40°C, kecepatan 70 rpm) hingga pelarut menguap dan menyisakan ekstrak pekat daun kenikir (Nafisa *et al.*, 2023). Ekstrak pekat ditampung di dalam cawan petri dan dioven pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kering. Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen dari ekstrak kering yang dihasilkan. Rendemen merupakan perbandingan antara bobot kering dari produk dan bobot kering bahan baku (Silsia *et al.*, 2021).

Perhitungan rendemen dapat dilakukan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot kering ekstrak}}{\text{bobot kering serbuk}} \times 100\%$$

Selanjutnya 10 mg ekstrak kering ditampun dalam tabung appendorf untuk digunakan pada analisis berikutnya.

4.7.2.4. Metabolite profiling Menggunakan UPLC-MS/MS

Dilakukan preparasi sampel sebelum menginjeksikannya ke dalam UPLC-MS/MS. Sebanyak 10 mg ekstrak daun kenikir dilarutkan dalam 10 ml etanol 96%. Sebanyak 5 µl filtrat yang dihasilkan diinjeksikan ke dalam instrument UPLC/MS dengan menggunakan *microsyringe*. Pengaturan eluen yang digunakan dalam proses eluasi sangat dibutuhkan agar menghasilkan hasil pemisahan maksimal. Kromatogram dan spektrum sampel yang merupakan hasil pemisahan yang dilakukan oleh alat ini diproses dengan menggunakan aplikasi *masslynx* untuk menghasilkan informasi luas puncak, waktu retensi, *measured mass*, *calculated mass*, dan rumus puncak yang terdeteksi. Nama komponen yang ditemukan

kemudian ditentukan dengan menginterpretasikan data menggunakan situs web *Pubchem*, sehingga didapatkan profil metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*)

4.7.2.5. Prediksi Fisikokimia

Prediksi Fisikokimia dilakukan dengan langkah sebagai berikut.

1. Disalin kode SMILES senyawa metabolit daun kenikir dari *Pubchem*.
2. Dilakukan prediksi fisikokimia dengan memasukkan kode SMILES pada *database PkCSM*.
3. Dipilih senyawa yang memenuhi aturan Lima Lipinski.

4.7.2.6. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilaksanakan dengan langkah sebagai berikut.

1. Disalin kode SMILES senyawa metabolit daun kenikir dari *Pubchem*.
2. Dilakukan uji toksisitas senyawa dengan memasukkan kode SMILES pada *database Protox II Online Tools*

4.7.2.7. Uji PASS

Uji PASS diawali dengan mencari kode SMILES dari senyawa hasil metabolit yang telah diskriminasi sifat fisikokimianya dan telah diuji toksisitas melalui *database Pubchem*. Langkah berikutnya adalah memasukkan kode SMILES senyawa ligan ke dalam *database PASS* dan dilakukan prediksi aktivitas.

4.7.2.8. Pendekatan *Network pharmacology*

Pendekatan melalui *Network pharmacology* diawali dengan pengumpulan gen target melalui *database GeneCards*, kemudian dilakukan pengumpulan gen terkait penyakit melalui *database DisGeNet*. Gen target yang terkumpul dilakukan prediksi gen target yang saling berhubungan melalui diagram venn, kemudian hasil

yang diperoleh yaitu gen target antara kandungan metabolit ekstrak dan gen target penyakit divisualisasikan menggunakan *software Cytoscape*. Untuk mengetahui interaksi protein-protein, gen ontology yang terdiri dari fungsi molekuler, proses biologis dan komponen seluler serta analisis jalur pensinyalan dilakukan melalui STRING dan *KEGG Pathway*.

4.7.3. Analisis Data

Analisis data dilaksanakan menurut hasil uji PASS, prediksi fisikokimia, uji toksisitas dan *Network pharmacology*. Uji PASS bertujuan untuk menyeleksi senyawa yang memiliki aktivitas antikanker terhadap kanker payudara yang dilakukan berdasarkan nilai *probability activity*, prediksi fisikokimia dinilai berdasarkan hukum 5 Lipinski. Uji toksisitas dilakukan berdasarkan parameter LD₅₀. Hasil prediksi fisikokimia dan toksisitas akan disajikan dalam bentuk tabel. Analisis data dari hasil *Network pharmacology* ditentukan dari hasil gen target yang terkumpul, gen-gen yang terkait dengan penyakit, prediksi gen target yang saling berhubungan melalui diagram venn, visualisasi pada *cytoscape*, hasil analisis interaksi protein-protein, informasi terkait gen seperti fungsi molekuler, proses biologi dan komponen seluler, serta jalur persinyalan gen target.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman *Cosmos caudatus*

Sampel daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dilakukan determinasi di UPT Materia Medika Batu untuk memastikan keasliannya. kunci determinasi adalah cara atau Langkah untuk mengenali tumbuhan atau hewan dan mengelompokkannya pada takson makhluk hidup yang berisi deskripsi ciri-ciri yang disajikan dengan karakter berlawanan terdiri dari sederetan pernyataan yang berlawanan (Indriyati, 2019). Hasil kunci determinasi yang diperoleh yaitu: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a-41b-42b-43a-44b-45a-46a:Compositae-1b-12a-13b-15a:*Cosmos*-14:*C. caudatus*

Berdasarkan surat keterangan determinasi, dibenarkan bahwa sampel yang digunakan merupakan tanaman kenikir yang merupakan tanaman dengan habitus perdu, tinggi 75-100 cm, bau khas. Batangnya tegak, beralur, membujur, bercabang banyak, muda berbulu, beruas, dan berwarna hijau keunguan. Daunnya majemuk, bersilang berhadapan, berbagi menyirip, ujungnya runcing, tepi rata, berwarna hijau dengan panjang sekitar 15-25 cm. bunganya majemuk, berbentuk bongkol, terletak di ujung batang, tangkai panjang 25 cm, terdiri dari 8 daun mahkota dengan panjang 1 cm, benang sari berbentuk tabung, kepala sari berwarna cokelat kehitaman, dan putik berambut. Buahnya keras, berbentuk jarum, ujung berambut, berwarna hijau saat masih muda, berwarna coklat saat sudah tua. Bijinya keras, kecil, berbentuk jarum dengan panjang 1 cm, berwarna hitam. Akarnya berupa akar tunggang (Steenis, 2008). Lembar determinasi yang dimaksud terlampir pada lampiran 1.

5.2 Preparasi Sampel Daun *Cosmos caudatus*

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Cosmos caudatus* yang diambil dari kebun yang terletak di Kecamatan Batu, Kota Batu. Daun yang telah dipanen dilakukan penyortiran basah dengan cara membuang bagian-bagian yang tidak diperlukan sebelum dilakukan pencucian. Sortasi basah merupakan kegiatan pemilihan hasil panen ketika tanaman masih segar (Paramita *et al.*, 2023). Sortasi dilakukan terhadap bahan tanaman lain atau bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan serta bagian tanaman yang rusak (dimakan ulat atau sebagainya). Selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan air untuk menghilangkan berbagai jenis kotoran atau benda asing lainnya yang melekat pada daun tersebut dan juga bahan-bahan yang tercemar pestisida. Setelah dicuci, dilakukan perajangan untuk meningkatkan luas permukaan, sehingga mempercepat proses pengeringan. Perajangan dilakukan dengan menggunakan pisau sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran sesuai yang dikehendaki. Selanjutnya dilakukan pengeringan. Tujuan dari dilakukannya pengeringan simplisia adalah untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, serta mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama (Paramita *et al.*, 2023). Pada proses pengeringan terjadi pengeluaran air dari sampel secara termal sehingga menghasilkan produk kering. Faktor eksternal yang mempengaruhi proses pengeringan adalah suhu, kelembaban, tekanan udara dan kecepatan. Faktor internal yang mempengaruhi antara lain kadar air, bentuk, luas permukaan dan kondisi fisik sampel (Handoyo *et al.*, 2020). Pengeringan dilakukan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Hal ini dipilih karena bobot kering yang dihasilkan konstan serta terbukti lebih mampu memperthankan senyawa biokimia dalam simplisia

dibandingkan dengan menggunakan sinar matahari yang bersifat degradative (Ariani *et al.*, 2022).



Gambar 5.1 Sampel Daun *Cosmos caudatus*

Kemudian dilakukan sortasi kering. Sortasi kering adalah pemilihan bahan setelah mengalami proses pengeringan. Sortasi kering dilakukan dengan cara memisahkan simplisia kering dari bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering. Simplisia yang sudah kering kemudian digiling dengan menggunakan mesin penggiling untuk memperkecil ukuran partikel serta memperluas permukaan sehingga kontak antara sampel dengan penyari lebih besar. Hal ini menyebabkan proses penarikan senyawa aktif dalam ekstraksi lebih optimal (Rianti *et al.*, 2019).

5.3 Penentuan Kadar Air Serbuk Daun *Cosmos caudatus*

Penentuan kadar air ini bertujuan untuk mengetahui jumlah air yang masih terdapat di dalam sampel setelah melalui proses pengeringan untuk mengetahui ketahanan dalam proses penyimpanan. Sampel serbuk daun *Cosmos caudatus* diukur nilai kadar airnya menggunakan *Moisture Content Analyzer* merk Mettler Toledo HC 103. *Moisture Content Analyzer* merupakan instrument yang dapat diaplikasikan untuk menganalisis kadar air simplisia atau bentuk sediaan farmasi tertentu secara praktis dan efisien. Prinsip kerja dari *Moisture Content Analyzer* adalah pengurangan berat sampel karena adanya pemanasan dari lampu halogen.

Proses pemanasan sampel dengan lampu halogen pada moisture analyzer akan menghasilkan massa sampel berkurang, proses ini akan berakhir ketika massa sampel tidak dapat lagi berkurang (Sembiring dan Ranti, 2021). Penggunaan moisture analyzer untuk menganalisis moisture content juga lebih efektif karena waktu yang dibutuhkan cukup cepat yaitu setidaknya 2-10 menit untuk menunggu nilai MC keluar pada panel moisture analyzer (Rodhiyah *et al.*, 2024).

Hasil penetapan kadar air pada sampel diperoleh 7,14%. Syarat kadar air serbuk simplisia adalah <10% (Depkes RI, 2017). Syarat tersebut ditetapkan karena apabila kadar air lebih dari 10% maka akan mudah terjadi pertumbuhan kapang dan bakteri. Kadar air yang terkandung dalam simplisia daun *Cosmos caudatus* tergolong baik dan memenuhi syarat. Penetapan kadar air simplisia sangat penting untuk memberikan Batasan maksimal kandungan air di dalam simplisia, karena jumlah air yang tinggi dapat menjadi media tumbuhnya bakteri dan jamur yang dapat merusak senyawa yang terkandung di dalam simplisia (Sinaga *et al.*, 2024).

5.4 Ekstraksi Daun *Cosmos caudatus*

Ekstraksi merupakan metode dalam menyari atau mendapatkan senyawa target yang dibutuhkan oleh peneliti dari suatu simplisia nabati atau simplisia hewani, dengan menggunakan prinsip like dissolve like (Hakim *et al.*, 2021). Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit yang terkandung dalam bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai. Hasil dari ekstraksi berupa ekstrak. Ekstrak merupakan sediaan kental dan pekat yang diperoleh dari proses ekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani (Saputra dan Yulian, 2020).

Proses ekstraksi daun *Cosmos caudatus* dalam penelitian ini dilakukan dengan metode *Ultrasonic-assisted extraction* (UAE), yaitu dilakukan dengan bantuan gelombang ultrasonik menggunakan instrument Sonicator. Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik adalah teknologi baru ramah lingkungan yang cocok untuk meningkatkan skala dan meningkatkan efisiensi ekstraksi senyawa bioaktif (Wen *et al.*, 2017). Metode UAE memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya yaitu, hasil ekstraksi jauh lebih tinggi dibandingkan metode tradisional, waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi lebih singkat dengan tetap mempertahankan efisiensi ekstraksi yang tinggi, memerlukan suhu ekstraksi yang rendah, komponen bioaktif yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi, cocok untuk mengekstraksi berbagai komponen dari berbagai jenis tanaman karena tidak dibatasi oleh polaritas komponen atau berat molekul, metode UAE sederhana dan mudah dioperasikan karena perawatan peralatan yang mudah dan biaya pengoperasian yang murah (Shen *et al.*, 2023).

Ekstraksi daun *Cosmos caudatus* pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:10 [b/v], dimana serbuk simplisia *Cosmos caudatus* sebanyak 85 gram dilarutkan dengan 850 ml etanol 96%. Penggunaan perbandingan tersebut telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Nafisa *et al* (2023) dan dapat menarik senyawa yang ada pada simplisia dengan optimal. Volume pelarut yang lebih besar menghasilkan hasil ekstraksi yang lebih tinggi. Hal ini karena peningkatan rasio pelarut terhadap bahan mengurangi kepadatan campuran yang memungkinkan transfer energi lebih efektif, sehingga meningkatkan efisiensi ekstraksi (Shen *et al.*, 2023).

Etanol merupakan pelarut yang universal digunakan mengikat berbagai senyawa aktif, baik senyawa polar hingga senyawa non polar (Suharyanto dan Hayati, 2021). Pelarut etanol 96% dipilih karena bersifat selektif, netral, tidak beracun, absorpsi baik, dapat mencegah pertumbuhan kapang dan bakteri pada ekstrak, serta suhu yang diperlukan untuk pemekatan lebih rendah, sehingga dapat meminimalkan risiko penyusutan senyawa aktif akibat pemanasan. Pelarut etanol 96% lebih dipilih dari pada etanol 70% karena lebih mudah menguap sehingga membutuhkan suhu yang tidak terlalu tinggi dan waktu yang lebih cepat saat proses pemekatan ekstrak (Suharyanto dan Hayati, 2021). Selain itu, etanol 96% merupakan pelarut pengestraksi yang mempunyai extractive power yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alcohol, saponin dan flavonoid. Pada pelarut campuran alcohol air dengan perbandingan 7:3 (alcohol 70%) paling sesuai untuk bahan baku simplisia berupa akar, batang atau bagian berkayu dari tanaman, sedangkan perbandingan 1:1 (alcohol 50%) sangat berguna untuk menghindari klorofil, senyawa resin atau polimer yang biasanya tidak mempunyai aktivitas berarti tetapi seringkali menimbulkan masalah-masalah farmasetis misalnya terjadi pengendapan yang sulit dihilangkan (Arifianti *et al.*, 2014).

Hasil ekstraksi ultrasonik ini berupa ekstrak cair berwarna hijau yang kemudian dipisahkan antara filtrat dan residu menggunakan kertas saring. Ekstrak yang diperoleh masih mengandung banyak pelarut, oleh karena itu perlu dilakukan penguapan menggunakan rotary evaporator dan oven agar didapatkan ekstrak kental. Prinsip kerja rotary evaporator adalah untuk menguapkan pelarut ekstraksi dan hanya meninggalkan senyawa yang dihasilkan dari ekstraksi (Shofia *et al.*,

2024), yaitu dengan adanya penurunan tekanan sehingga pelarut akan menguap pada suhu di bawah titik didihnya. Hal ini dikarenakan adanya pompa vakum yang berfungsi untuk menurunkan tekanan, sehingga titik didih pelarut akan turun dan akan lebih mudah menguap. Uap dari pelarut terkondensasi menjadi bentuk cair yang tertampung dalam labu penampung pelarut, sementara ekstrak tetap tertampung dalam labu penampung ekstrak (Wardaniati dan Gusmawarni, 2021). Proses penguapan pelarut menggunakan rotary evaporator dengan tekanan 175 mbar, suhu 40°C, kecepatan 70 rpm. Penggunaan suhu 40°C pada proses penguapan karena etanol memiliki titik didih berkisar antara 60°C-78°C sehingga dipakai suhu di bawah titik didih sesuai dengan prinsip kerja rotary evaporator. Selain itu senyawa yang dipisahkan dari pelarut etanol tidak rusak (Muiz *et al.*, 2021). Proses penguapan pelarut ini dilakukan hingga tidak ada lagi tetesan pelarut dalam labu penampung pelarut dan konsistensi ekstrak mulai mengental. Hasil ekstrak dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa hingga didapatkan pasta ekstrak. Kemudian ekstrak ditimbang untuk mengetahui rendemen.



Gambar 5.2 Ekstrak kental daun *Cosmos caudatus*

Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (DepKes RI, 2017). Nilai rendemen menunjukkan banyaknya

kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak. Semakin besar nilai rendemen menunjukkan nilai kestrak yang dihasilkan semakin banyak (Rosa *et al.*, 2023). Setelah dilakukan penimbangan, didapatkan berat ekstrak kental daun *Cosmos caudatus* yaitu 8,6281 gram. Rendemen ekstrak ditentukan menggunakan rumus (Silsia *et al.*, 2021):

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot kering ekstrak}}{\text{bobot kering serbuk}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{8,6281 \text{ gram}}{85 \text{ gram}} \times 100\% = 10,150\%$$

Setelah dilakukan perhitungan, didapatkan rendemen ekstrak daun *Cosmos caudatus* sebesar 10,150%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa rendemen dari ekstrak daun *Cosmos caudatus* baik dan memenuhi syarat batas minimal rendemen ekstrak kental yang baik yaitu nilainya tidak kurang dari 10% (DepKes RI, 2017). Nilai tersebut menunjukkan keefektifan prosedur ekstraksi pada daun *Cosmos caudatus*. Faktor-faktor yang mempengaruhi rendemen ekstrak antara lain jenis pelarut, konsentrasi pelarut, lama ekstraksi, dan jenis bahan yang diekstraksi (Silsia *et al.*, 2021).

5.5 Metabolite profiling menggunakan UPLC-MS/MS

Metabolite profiling ekstrak etanol 96% daun *Cosmos caudatus* pada penelitian ini dilakukan menggunakan instrument UPLC-QToF-MS/MS. UPLC-MS/MS merupakan pengembangan dari teknik analisis LC-MS untuk menganalisis suatu senyawa. UPLC yang dikombinasikan dengan MS menjadi instrument untuk mengidentifikasi dan mengukur senyawa yang terkandung dalam bahan (Mutiah *et al.*, 2019), kemudian *double MS* dapat menghasilkan pengukuran massa

monoisotop yang lebih akurat, spektra dengan resolusi tinggi untuk mengkonfirmasi target senyawa yang sudah terdeteksi maupun senyawa yang belum terdeteksi, dengan proses yang lebih cepat tanpa menurunkan resolusi massa (Ma'arif *et al.*, 2019). Keunggulan analisis menggunakan UPLC jika dibandingkan dengan HPLC bisa dilihat dari beberapa parameter, yaitu *runtime*, LOD dan LOQ, serta bentuk *peak*. Waktu analisis (*runtime*) yang dibutuhkan oleh system UPLC lebih singkat dibandingkan dengan system HPLC. Hal ini menyebabkan eluen dan jumlah sampel yang digunakan menjadi lebih sedikit sehingga dapat meningkatkan efisiensi system, bahan, serta biaya yang diperlukan. Parameter LOD dan LOQ pada sistem UPLC menunjukkan metode ini lebih sensitif yang dibuktikan dengan hasil kromatogram yang lebih sempit, tajam, dan tinggi jika dibandingkan dengan kromatogram HPLC yang menghasilkan kromatogram lebih lebar dan pendek (Annisa *et al.*, 2020).

Metabolite profiling pada sampel ekstrak daun *Cosmos caudatus* diawali dengan preparasi sampel sebelum dianalisa dengan UPLC-MS/MS. Preparasi sampel dilakukan dengan metode Ekstraksi Fase Padat (SPE) sebelum sampel diinjeksikan ke dalam instrument UPLC-QToF-MS/MS. Solid Phase Extraction (SPE) merupakan metode untuk pemurnian, pemisahan, dan pemekatan analit dari matriks larutan sampel menggunakan lapisan penyerap melalui aliran. Ekstraksi fase padat merupakan cara efektif untuk menyiapkan sampel dengan menghilangkan sebagian besar matriks dari sampel. Ditimbang 10 mg ekstrak daun *Cosmos caudatus*, kemudian dilarutkan dengan 10 ml pelarut dan dimasukkan ke dalam cartridge yang telah disiapkan sehingga senyawa organik akan tertahan pada penjerap dan fase air akan keluar dari *cartridge*. Langkah selanjutnya sampel yang

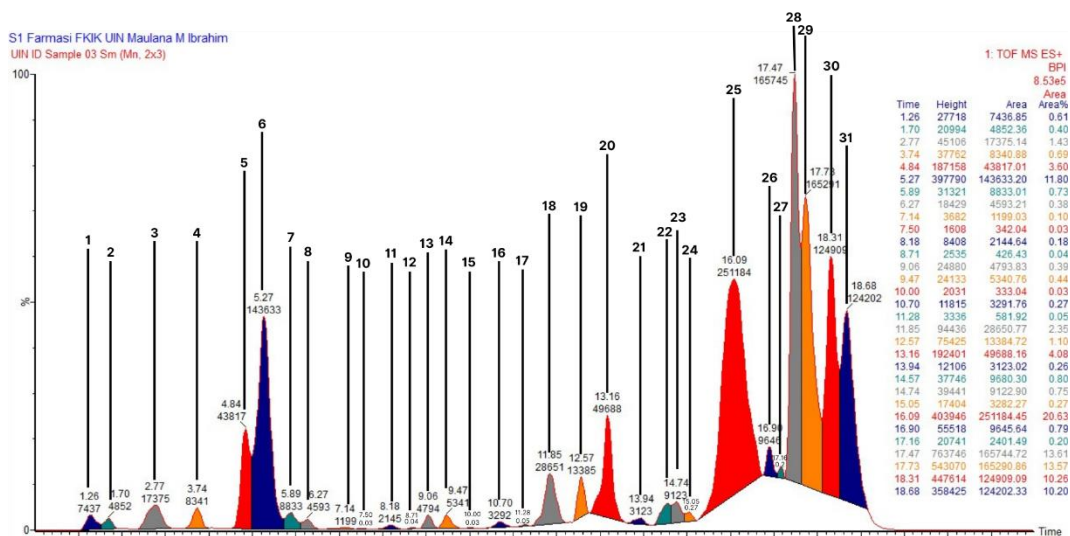
tertinggal pada penjerap dielusi dengan methanol sebanyak 10 ml dan ditampung filtratnya (Muldianah *et al.*, 2022). Filtrat dari methanol inilah yang akan diinjeksikan ke dalam instrument UPLC-QToF- MS/MS. Ekstrak yang telah dipreparasi dengan methanol diinjeksikan ke dalam instrument UPLC-QToF- MS/MS sebanyak 5 μ l menggunakan *microsyringe*. Proses pemisahan komponen metabolit dimulai saat sampel memasuki kolom dan mulai dideteksi setelah melewati detektor. UPLC-MS yang digunakan pada penelitian ini menggunakan detektor MS dengan sumber ion ESI [+] dan analisator MS berupa Q-ToF, menghasilkan suatu Analisa yang selektif, sensitive, cepat, dan beresolusi tinggi (Hakim *et al.*, 2018). Fase diam/kolom yang digunakan berupa C18 atau oktadesil silika. Oktadesil silika atau C18 merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Ravelliani *et al.*, 2022). Sedangkan fase gerak/eluen yang digunakan berupa kombinasi eluen A (air : asam format 99,9 : 0,1 [v/v]) dan eluen B (asetonitril : asam format 99,9 : 0,1 [v/v]) dengan metode elusi gradien, yang artinya perbandingan kedua eluen tersebut berubah-ubah tiap satuan waktu. Campuran air:asam format (99,9 :0,1) dengan asetonitril dan asam format merupakan campuran eluen yang dapat memudahkan proses pemisahan di dalam kolom dengan optimal dalam waktu < 15 menit (Hakim *et al.*, 2018). Metode elusi gradien dipilih karena kepolaran dari fase gerak yang digunakan dapat disesuaikan selama proses pemisahan berlangsung, sehingga dapat meningkatkan efektifitas pemisahan. Selain itu, proses pemisahan sistem gradien lebih signifikan sehingga menghasilkan puncak kromatogram yang tidak lebar dibandingkan pada sistem isokratik, serta waktu yang dibutuhkan lebih sedikit (Nafisa *et al.*, 2023).

Setelah dipisahkan dalam kolom, sampel kemudian dianalisis oleh detektor MS sehingga hasil dapat dibaca dengan mudah. Sampel cair akan diubah menjadi tetesan-tetesan kemudian melewati needle yang telah diberi muatan ESI (+) sehingga dihasilkan ion yang akan terbaca oleh detektor MS. Hasil analisis ini kemudian akan dipisahkan lagi oleh analisator Q-ToF. Hasil pemisahan akan muncul sebagai kromatogram. Kromatogram senyawa yang memiliki sifat polar yang lebih kuat akan muncul lebih awal karena lebih cepat terbawa oleh fase gerak. Sementara senyawa yang kepolarannya lebih rendah akan tertahan lebih lama pada fase diam dan muncul kemudian pada kromatogram (Hakim *et al.*, 2018).

Hasil pendeteksian kromatografi gas memberikan hasil berupa peak yang disebut kromatogram. Peak yang dihasilkan ditentukan dari waktu retensi dan luas area sampel. Waktu retensi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor yang didasarkan dari waktu sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak pada grafik dari senyawa (Kartika, 2022). Komposisi komponen direpresentasikan sebagai presentase relatif dari total luas puncak, dihitung dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut (Alshiekheid *et al.*, 2022):

$$Presentase\ relatif\ luas\ puncak = \frac{\text{luas puncak}}{\text{Total luas puncak}} \times 100\%$$

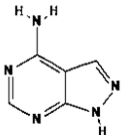
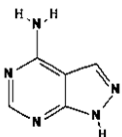
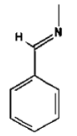
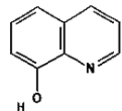
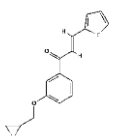
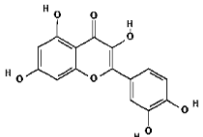
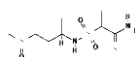
Berikut hasil luaran pemisahan dan identifikasi yang dilakukan melalui UPLC-QToF-MS/MS berupa kromatogram dari setiap senyawa yang terdeteksi.

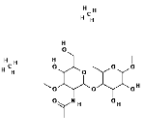
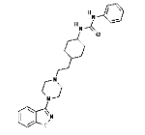
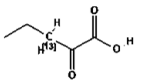
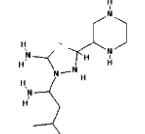
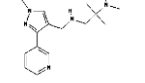
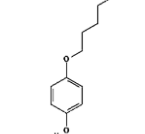
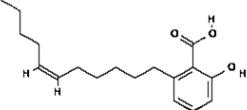
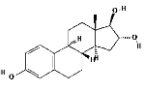


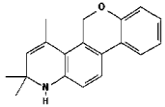
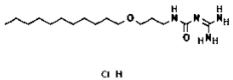
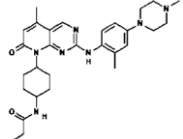
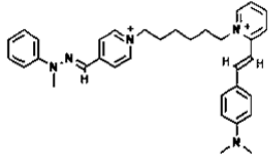
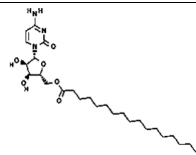
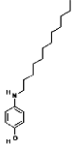
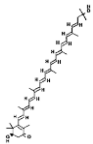
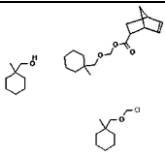
Gambar 5.3 Kromatogram sampel daun *Cosmos caudatus*

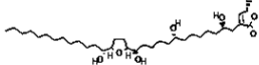
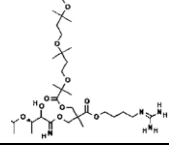
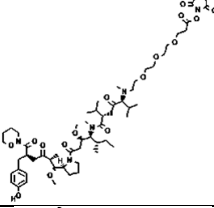
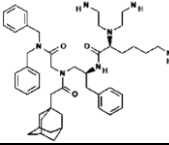
Data dari kromatogram diolah menggunakan software Masslynx Versi 4.1 untuk mengetahui spektrum dari setiap puncak kromatogram sehingga dapat memprediksi rumus molekul dari setiap senyawa yang ada dalam sampel. Setiap puncak pada kromatogram mewakili satu jenis senyawa. Rumus molekul dari spektrum dipilih berdasarkan selisih nilai antara *measured mass* dan *calculated mass* $\leq 0,0005$ (Mutiah *et al.*, 2023). Prediksi rumus molekul yang telah dipilih kemudian dicari dengan bantuan database *Pubchem*. Rumus molekul yang ditulis pada *website* ini harus dikurangi 1 atom H karena pada proses pemisahan terjadi penambahan 1 atom H yang berasal dari penembakan ion ESI (+). Hasil interpretasi analisis kandungan senyawa menggunakan UPLC-QToF-MS/MS pada ekstrak daun *Cosmos caudatus* dapat dilihat dalam tabel berikut:

Tabel 5.1 Interpretasi hasil pemprofilan metabolit sekunder dalam daun *Cosmos caudatus*

No.	RT	%Area	Measured Mass	Calculated Mass	Rumus Senyawa	Nama Senyawa	Golongan Senyawa	Struktur Senyawa
1	1.26	0.61	136.0625	136.0623	C ₅ H ₅ N ₅	1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine	heterosiklik	
2	1.7	0.4	136.0627	136.0623	C ₅ H ₅ N ₅	adenin	purin	
3	2.77	1.43	120.0816	120.0813	C ₈ H ₉ N	Methanamine, N-(phenylmethylene)-	imina	
4	3.74	0.69	146.0611	146.0606	C ₉ H ₇ NO	Oxyquinoline	heterosiklik aromatik.	
5	4.84	3.6	303.0511	303.0513	C ₁₆ H ₁₄ O ₂ S ₂	CID: 162643273	heterosiklik	
6	5.27	11.8	303.0508	303.0505	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin	flavonoid	
7	5.89	0.73	287.0556	287.0558	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₃ S ₃	CID: 116250238	thioamide	

8	6.27	0.38	428.2491	428.2496	C ₁₈ H ₃₇ NO ₁₀	CID: 157986972	glikosida amida	
9	7.14	0.1	464.2485	464.2484	C ₂₆ H ₃₃ N ₅ OS	CID: 86341996	Heterosiklik nitrogen	
10	7.5	0.03	466.2651	466.2652	C ₂₁ H ₃₉ NO ₁₀	2-oxo(313C)pentanoic acid	asam karboksilat	
11	8.18	0.18	275.2011	275.2018	C ₁₁ H ₂₆ N ₆ S	CID: 171423867	Heterosiklik nitrogen	
12	8.71	0.04	324.1955	324.1955	C ₁₆ H ₂₆ N ₅ Cl	CID: 47610537	amina	
13	9.06	0.39	181.123	181.1229	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	4-(Pentyloxy)phenol	fenol	
14	9.47	0.44	291.1965	291.196	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	CID: 155568001	asam karboksilat	
15	10	0.03	289.1802	289.1804	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	Estriol	steroid	

16	10.7	0.27	278.155	278.1545	C ₁₉ H ₁₉ NO	CID: 23433683	heterosiklik	
17	11.28	0.05	351.252	351.2527	C ₁₆ H ₃₅ N ₄ O ₂ Cl	CID: 21414680	turunan urea	
18	11.85	2.35	518.3246	518.3243	C ₂₉ H ₃₉ N ₇ O ₂	CID: 164624240	heterosiklik	
19	12.57	1.1	520.3436	520.344	C ₃₄ H ₄₁ N ₅	CID: 58981448	heterosiklik	
20	13.16	4.08	496.339	496.3387	C ₂₆ H ₄₅ N ₃ O ₆	CID: 22879529	glikosida	
21	13.94	0.26	278.2485	278.2484	C ₁₈ H ₃₁ NO	4-(Dodecylamino)Phenol	fenol	
22	14.57	0.8	583.415	583.4151	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	Deinoxanthin	karotenoid	
23	14.74	0.75	583.4133	583.4129	C ₃₄ H ₅₉ O ₅ Cl	CID: 157552081	alkohol	

24	15.05	0.27	597.473	597.473	C35H64O7	Annonacin	acetogenin	
25	16.09	20.63	663.4539	663.4544	C32H62N4O10	CID: 142588235	amida ester	
26	16.9	0.79	856.5248	856.5243	C37H73N7O15	unknown	unknown	unknown
27	17.16	0.2	1116.6698	1116.6696	C58H93N5O16	CID: 146691570	peptida	
28	17.47	13.61	954.6132	954.6127	C47H83N7O13	CID: 58954507	asam karboksilat	
29	17.73	13.57	778.538	778.5384	C47H67N7O3	CID: 138658209	amida	
30	18.31	10.26	792.5624	792.5626	C45H77NO10	unknown	unknown	unknown
31	18.68	10.2	780.5537	780.554	C47H69N7O3	unknown	unknown	unknown

Berdasarkan profil metabolit pada tabel 5.1, dapat diketahui bahwa pada ekstrak etanol 96% terdapat 28 senyawa yang berhasil terdeteksi profilnya dan 3 senyawa yang belum mempunyai nama dan struktur. Senyawa yang belum diketahui nama dan strukturnya kemungkinan dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti senyawa tersebut merupakan senyawa baru yang belum ada penemuan terkait senyawa tersebut, dipengaruhi oleh adanya pengotor pada sampel, dan merupakan senyawa baru yang belum diisolasi (Hanifah *et al.*, 2023). Daun *Cosmos caudatus* ditemukan mengandung flavonoid, heterosiklik, purin, imina, thioamide, glikosida, asam karboksilat, amina, fenol, steroid, turunan urea, glikosida, karotenoid, alkohol, asetogenin, peptide, dan amida, namun tidak ditemukan terpenoid. Penelitian sebelumnya oleh Senjaya *et al.* pada tahun 2024 juga mendukung temuan ini, karena mereka menemukan bahwa daun *Cosmos caudatus* mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, fenol, saponin, alkaloid, tanin, dan alkaloid. Selain itu, komponen bioaktif berbeda ditemukan dalam studi GC-MS yang dilakukan oleh Lee dan Vairappan pada tahun 2011, kandungan senyawa pada daun segar *Cosmos caudatus*, yaitu α -Cadinene, (E)-Ocimene, 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, α -Copaene, β -Elemene, caryophyllene, α -Humulene, γ - Muurolene, bergamotene, β -Selinene, bicyclogermacrene, α -Farnesene, dan δ -Cadinene.

Senyawa mayor pada ekstrak etanol 96% daun *Cosmos caudatus* dilihat berdasarkan kadarnya dimana keberadaanya lebih mendominasi dibandingkan senyawa lainnya. Keberadaan senyawa mayor dapat dengan mudah diidentifikasi dengan meninjau kromatogram yang muncul lebih tinggi dan nilai persen area lebih besar dibandingkan dengan senyawa lainnya. Luas area puncak kromatogram

menunjukkan konsentrasi relatif suatu senyawa terhadap sampel (Melati, 2021). Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa senyawa mayor yang terkandung dalam ekstrak daun *Cosmos caudatus* meliputi 4-(diaminomethylideneamino)butyl 2-[[[(3s)-2hydroxy-3-propan-2-yloxybutanimidoyl]oxymethyl]-3-[2-[3-(3methoxy-3-methylbutoxy)-3-methylbutoxy]-2-methylpropanoyl]oxy-2- methylpropanoate (CID 142588235) dengan persen area terbesar yaitu 20.63%, 18-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(5S)-5-carboxy-5-[[3-[3-(1H-imidazol-5yl)propanoylamino]-3- methyl-2-oxobutyl]amino]pentyl]amino]-2- oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-18-oxooctadecanoic acid (CID: 58954507) dengan persen area sebesar 13.61%, dan (2S)-N-[(2S)-1-[[2-(1-adamantyl)acetyl]-[2-(dibenzylamino)-2-oxoethyl]amino]-3-phenylpropan-2-yl]-6-amino -2-[bis(2-aminoethyl)amino]hexanamide (CID: 138658209) dengan persen area sebesar 13.57%.

5.6 Prediksi Fisikokimia Senyawa

Setelah dilakukan senyawa metabolit *Cosmos caudatus* perlu dilakukan prediksi fisikokimia senyawa untuk menentukan apakah senyawa kimia dengan aktivitas biologi atau farmakologi tertentu memiliki sifat yang akan membuatnya menjadi obat aktif jika diberikan secara oral pada manusia (Mujtahid *et al.*, 2024). Prediksi sifat fisikokimia dilakukan berdasarkan pada aspek Hukum Lima Lipinski melalui web pkCSM *online tool* dengan memasukkan kode SMILE masing-masing senyawa (Krihariyani *et al.*, 2020). Adapun hasil yang didapatkan sebagai berikut:

Tabel 5.2 Hasil prediksi fisikokimia senyawa daun *Cosmos caudatus*

Nama Senyawa	Parameter Hukum Lima Lipinski						Memenuhi /Tidak
	MW (g/mol)	Log P	HBA	HBD	Torsion	PSA Å ²	
CID 75420	135.13	-0.0649	4	2	0	56.290	Memenuhi
Adenin	135.13	-0.0649	4	2	0	56.321	Memenuhi
CID 73954	119.167	1.7353	1	0	1	55.057	Memenuhi
Oxyquinoline	145.161	1.9404	2	1	0	64.127	Memenuhi
CID 162643273	302.41	4.1384	4	0	6	126.021	Memenuhi
Quercetin	302.238	1.988	7	5	1	122.108	Memenuhi
CID 116250238	286.444	-0.2625	4	2	7	104.677	Memenuhi
CID 15798697	427.491	-1.6454	10	5	6	171.399	Memenuhi
CID 29353	180.247	2.9612	2	1	5	79.164	Memenuhi
CID 155568001	290.403	4.9397	2	2	10	126.871	Memenuhi
CID 23433683	277.36	3.70	1	1	0	21.26	Memenuhi
CID 164624240	517.67	4.33	5	2	7	95.39	Memenuhi
CID 22879529	495.65	4.42	7	3	19	136.90	Memenuhi
CID 86341996	463.64	3.84	3	2	8	88.74	Memenuhi
CID 171423867	274.43	0.06	6	5	4	116.67	Memenuhi
CID 16043298	277.44	4.19	1	2	12	32.26	Memenuhi
CID 47610537	323.86	1.06	4	1	6	45.98	Memenuhi
Estriol	288.38	2.65	3	3	0	60.69	Memenuhi
CID 21414680	350.93	2.58	3	3	16	102.73	Memenuhi

Keterangan:

MW : Molecular weight

Log P : Koefisien partisi

HBA : Hydrogen Bond Acceptors

HBD : Hydrogen Bond Donors

Torsion: Ikatan hidrogen yang berotasi

PSA : Polar Surface Area

Hasil prediksi fisikokimia senyawa *Cosmos caudatus* didapatkan sebanyak 19 yang memenuhi hukum lima Lipinski dari 28 senyawa hasil *Metabolite profiling* daun *Cosmos caudatus*. Adapun senyawa-senyawa tersebut meliputi *1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine* (CID 75420), *Adenin* (CID190), *Methanamine,N(phenylmethylene)-* (CID 73954), *Oxyquinoline* (CID 1923), *(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one* (CID 162643273), *Quercetin* (CID 5280343), *2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide* (CID 116250238), *N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-*

2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide; methane (CID: 15798697), 4-(Pentyloxy)phenol (CID 29353), 2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid (CID 155568001), 2,2,4-trimethyl-2,5-dihydro-1H-chromeno[3,4-f]quinoline (CID 23433683), N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propenamide (CID: 164624240), [(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate (CID: 22879529), trans-1-(4-(2-(4-(Benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea (CID: 86341996), 3-(1-Amino-3-methylbutyl)-5-piperazin-2-yl-1,3,4-thiadiazolidin-2-amine (CID 171423867), 4-(Dodecylamino)Phenol (CID 16043298), 2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-ylpyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride (CID: 47610537), Estriol (CID 5756), dan 1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypentyl)urea;hydrochloride (CID 21414680).

Berdasarkan hasil pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang memenuhi parameter hukum lima Lipinski mudah untuk diabsorpsi dan memiliki permeabilitas yang baik. Berat molekul senyawa berhubungan kemampuan senyawa tersebut menembus membrane biologis, senyawa yang memiliki berat molekul <500 g/mol dapat berdifusi melewati membrane sel secara difusi pasif, berat molekul senyawa >500 g/mol menyebabkan senyawa tersebut akan sulit menembus membrane sel. Nilai Log P (logaritma koefisien partisi oktanol-air) menunjukkan lipofilitas suatu senyawa, yaitu kecenderungannya untuk terdistribusi dalam fase lipofilik (oktanol) atau fase hidrofilik (air). Semakin besar nilai Log P, maka senyawa tersebut semakin bersifat hidrofobik dan molekul yang terlalu

hidrofobik cenderung mempunyai tingkat toksisitas tinggi karena akan tertahan lebih lama pada lipid bilayer dan terdistribusi luas dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan enzim target menjadi berkurang. $\text{Log } P \leq 5$ yang berarti bahwa senyawa bersifat hidrofilik dan dapat melewati lipid bilayer. Ikatan hidrogen HBD dan HBA menggambarkan solubilitas senyawa untuk melewati membrane sel secara difusi pasif, semakin tinggi kapasitas ikatan, maka semakin tinggi energi yang diperlukan dalam proses absorbsi. $\text{HBA} \leq 10$ dan $\text{HBD} \leq 5$ menunjukkan senyawa tersebut tidak memerlukan energi yang besar dalam proses absorpsi. Torsion menunjukkan jumlah ikatan antar atom yang dapat berotasi yang berhubungan dengan kemampuan molekul senyawa tersebut melewati membran sel dan berinteraksi dengan target biologis, molekul senyawa yang memiliki nilai torsion tinggi akan menyebabkan senyawa tersebut sulit untuk mencapai target biologis. Polar Surface Area (PSA) menunjukkan kemampuan senyawa untuk masuk ke dalam sel. $\text{Torsion} < 10$ dan $\text{PSA} < 140 \text{ \AA}$ menunjukkan senyawa tersebut mudah dalam transportasi menuju membrane sel (Mujtahid *et al.*, 2024; Pramudiyawati *et al.*, 2024; Putra *et al.*, 2020; Wilapangga *et al.*, 2024).

5.7 Uji Toksisitas Senyawa

Setelah dilakukan prediksi sifat fisikokimia senyawa, senyawa yang memenuhi hukum lima Lipinski selanjutnya dilakukan prediksi toksisitas berdasarkan nilai LD_{50} . Prediksi toksisitas bertujuan untuk mengetahui toksisitas serta risiko-risiko yang dapat muncul dari suatu senyawa dan bisa memberikan dampak pada manusia (Dewi *et al.*, 2023). LD_{50} adalah sebuah dosis yang diperlukan untuk membunuh 50% dari populasi hewan yang diuji, dimana semakin rendah nilai LD_{50} maka semakin beracun sebuah senyawa tersebut (Habibullah *et*

al., 2021). Prediksi toksisitas senyawa pada penelitian ini dilakukan melalui web Protox II Online dengan memasukkan kode SMILES dari masing-masing senyawa dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.3 Hasil prediksi toksisitas senyawa daun *Cosmos caudatus*

No	Nama Senyawa	LD ₅₀ (mg/kg)	Kelas Toksitas	Memenuhi / Tidak
1	CID 75420	900	4	Memenuhi
2	adenin	570	4	Memenuhi
3	CID 73954	3080	5	Memenuhi
4	Oxyquinoline	280	3	Memenuhi
5	CID 162643273	2652	5	Memenuhi
6	Quercetin	159	3	Memenuhi
7	CID 116250238	2816	5	Memenuhi
8	CID 15798697	4000	5	Memenuhi
9	4-(Pentyloxy)phenol	2200	5	Memenuhi
10	CID 155568001	1190	4	Memenuhi
11	CID 23433683	1450	4	Memenuhi
12	CID 164624240	353	4	Memenuhi
13	CID 22879529	826	4	Memenuhi
14	CID 86341996	1530	4	Memenuhi
15	CID 171423867	600	4	Memenuhi
16	4-(Dodecylamino)Phenol	2410	5	Memenuhi
17	CID 47610537	150	3	Memenuhi
18	Estriol	2000	4	Memenuhi
19	CID 21414680	400	4	Memenuhi

Keterangan:

LD50 : *Lethal Dose*

Berdasarkan tabel hasil prediksi toksisitas senyawa di atas, didapatkan hasil bahwa senyawa *Methanamine, N-(phenylmethylene)-* (CID 73954), *(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one* (CID 162643273), *2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide* (CID 116250238), *N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide; methane* (CID: 15798697), *4-(Pentyloxy)phenol* (CID 29353), dan *4-(Dodecylamino)Phenol* (CID 16043298) masuk ke dalam kelas toksisitas V ($2000 < LD_{50} \leq 5000$ mg/kg) yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki efek toksisitas akut yang rendah (Faqiha *et al.*, 2022). Sementara senyawa *1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine* (CID 75420), *adenin* (CID190), *2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid* (CID 155568001), *2,2,4-trimethyl-2,5-dihydro-1H-chromeno[3,4-f]quinoline* (CID 23433683), *N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propenamide* (CID: 164624240), *[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate* (CID: 22879529), *trans-1-(4-(2-(4-(Benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea* (CID: 86341996), *3-(1-Amino-3-methylbutyl)-5-piperazin-2-yl-1,3,4-thiadiazolidin-2-amine* (CID 171423867), *estriol* (CID 5756), dan *1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypropyl)urea;hydrochloride* (CID 21414680) masuk ke dalam kelas toksisitas IV ($300 < LD_{50} \leq 2000$ mg/kg) yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki efek toksisitas yang relatif rendah (Faqiha *et al.*, 2022). Sedangkan senyawa *Oxyquinoline* (CID 1923), *Quercetin* (CID 5280343), dan *2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-ylpyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride* (CID: 47610537) masuk ke dalam

kelas toksisitas III ($50 < LD_{50} \leq 300$ mg/kg) yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak dijamin keamanan penggunaannya pada konsentrasi tinggi (Prahayati dan Rusdi, 2023). Senyawa pada kelas toksisitas III yang mungkin memiliki resiko toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan senyawa pada kelas toksisitas IV dan V. Kelas toksisitas III umumnya dianggap sebagai Tingkat toksisitas yang sedang. Namun, kemanan suatu obat tidak hanya tergantung pada Tingkat toksisitasnya, tetapi juga pada dosisnya, cara penggunaan, dan sejumlah faktor lainnya (Nursanti O, 2019).

5.8 Prediksi Aktivitas Biologis Kenikir (*Cosmos caudatus*) melalui PASS Online

PASS digunakan untuk memprediksi sifat farmakologis, mekanisme kerja, efek toksik dan efek samping, interaksi dengan enzim metabolisme obat dan transporter, dan pengaruh terhadap gen (Rudik *et al.*, 2019). Prediksi aktivitas biologis *Cosmos caudatus* melalui *database PASS Online* dengan cara memasukkan kode SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) dari masing-masing senyawa. Prediksi aktivitas biologis dipilih berdasarkan nilai P_a (*Probability activity*) atau skor probabilitas $> 0,7$ dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.4 Hasil prediksi aktivitas biologi tanaman *Cosmos caudatus* sebagai antikanker melalui *PASS online*

No	Senyawa	P_a	Prediksi Potensi Biologis
1	CID 75420	0,727	Antineoplastic
2	adenin	0,704	Antineoplastic
3	CID 73954	0,870	Antineoplastic (breast cancer)
		0,821	Antineoplastic

4	CID 162643273	0,807	Antineoplastic
5	Quercetin	0,887	Apoptosis agonist
		0,797	Antineoplastic
		0,757	Anticarcinogenic
		0,717	Chemopreventive
6	CID 116250238	0,718	Chemoprotective
7	CID: 15798697	0,815	Antineoplastic
8	CID: 22879529	0,837	Anticarcinogenic
		0,720	Antineoplastic
9	Estriol	0,704	Antineoplastic

Keterangan:

Pa: *Probability activity*

Berdasarkan hasil prediksi pada tabel 5.4 terdapat 9 senyawa teridentifikasi memiliki aktivitas biologis yang berhubungan dengan antikanker, diantaranya ialah *1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine* (CID 75420), *adenin* (CID190), *Methanamine*, *N-(phenylmethylene)-* (CID 73954), *(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one* (CID 162643273), *Quercetin* (CID 5280343), *2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide* (CID 116250238), *N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide; methane* (CID: 15798697), *[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate* (CID: 22879529), dan *Estriol* (CID 5756). Hasil nilai Pa $\geq 0,7$ menunjukkan bahwa senyawa tersebut sangat aktif dan kemungkinan besar memiliki aktivitas biologis. Aktivitas biologis yang dimaksud dalam penelitian ini adalah *antineoplastic*, *chemopreventive*, *apoptosis*, dan *anticarcinogenic*.

Antineoplastik merupakan aktivitas membunuh sel-sel kanker dengan mengganggu fungsi dan reproduksi seluler (Kolin *et al.*, 2016). Chemopreventive dan chemoprotective merupakan kemampuan suatu zat untuk mencegah, menghambat, mengurangi, atau mengembalikan perubahan dan perkembangan sel normal menjadi sel ganas (kanker) (Isnaeni *et al.*, 2024). Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram yang berperan penting dalam menjaga homeostasis jaringan. Apoptosis merupakan mekanisme penting untuk menghilangkan sel-sel yang rusak atau kanker. (Ismail *et al.*, 2019). Anticarcinogenic adalah zat atau senyawa yang dapat mencegah atau memperlambat perkembangan kanker (Brglez *et al.*, 2016).

5.9 Network pharmacology

5.9.1 Hasil Pengumpulan Gen Target melalui *GeneCards*

Pada tahapan seleksi senyawa metabolit sekunder dengan prediksi fisikokimia, toksisitas, dan PASS Online, didapatkan 9 senyawa yang memiliki profil fisikokimia yang baik, toksisitas rendah, dan aktivitas biologi terkait kanker kolon. Tahapan selanjutnya yaitu dilakukan pengumpulan gen target senyawa *Cosmos caudatus* dengan cara memasukkan nama senyawa pada database *GeneCards* (<https://www.GeneCards.org/>). Hasil yang didapatkan yaitu tersisa 4 senyawa yang memiliki gen target diantaranya yaitu *Quercetin* (CID 5280343), *Adenin*, *1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine* (CID 75420), dan *Estriol* (CID 5756), dengan jumlah gen target berikut ini:

Tabel 5.5 Hasil pengumpulan gen target senyawa melalui *GeneCards* dengan *relevance score* ≥ 7

No	Senyawa	Jumlah Gen Target	Rentang Gifts	Rentang Relevance ≥ 7
1	Quercetin	44	19-66	7,05-13,63
2	Adenin	42	7-65	7,03-44,59
3	1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine	1	63	9,81
4	Estriol	19	41-63	7,13-18,37

Berdasarkan tabel 5.5 hasil pengumpulan gen target dari masing-masing senyawa melalui *GeneCards*, diperoleh 106 gen target dari 4 senyawa. Gen target dipilih berdasarkan *relevance score* ≥ 7 (Mutiah *et al.*, 2023), dimana *relevance score* digunakan untuk menilai relevansi gen terhadap penyakit atau proses biologis tertentu (Yang *et al.*, 2023). *Relevance score* yang tinggi menunjukkan bahwa gen tersebut berkaitan erat dengan penyakit. Sementara *GeneCards Inferred Functionally Score* (Gifts) merupakan skor *GeneCards* yang memprediksi tingkat fungsionalitas gen, dengan skor yang lebih tinggi menunjukkan informasi yang lebih banyak diberi anotasi secara fungsional (Sun *et al.*, 2024).

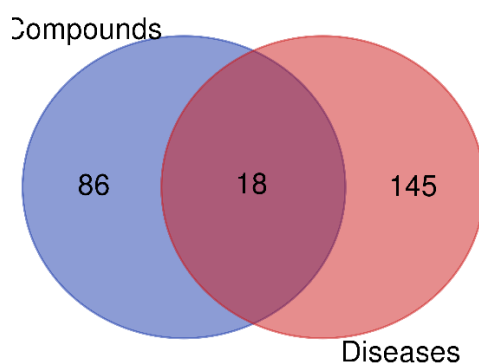
5.9.2 Hasil Pengumpulan Gen Target Kanker Kolon melalui DisGeNet

Pengumpulan gen target yang berhubungan dengan kanker kolon dilakukan melalui database *DisGeNet* dengan memasukkan kata kunci “*Colon Cancer*”. Didapatkan hasil gen target terkait kanker kolon sebanyak 270 gen target dengan berbagai tipe disease dari kanker kolon meliputi *Colon cancer stage IV* (CUI: C0278484), *Stage II Colon Cancer AJCC v7* (CUI: C3146257), *Stage III Colon Cancer AJCC v7* (CUI: C3146254), *cancer colon staged* (CUI: C0280252), *Carcinoma of Colon* (CUI: C0699790), *Colonic Neoplasm* (CUI: C0009375),

Malignant neoplasm of colon (CUI: C0007102), *Colonic adenocarcinoma* (CUI: C0338106), dan *Colitis Associated Colorectal Cancer* (CUI: C5392092). Gen tersebut merupakan gen yang diduga menjadi target terapi pada kanker kolon.

5.9.3 Hasil Prediksi dan Visualisasi Gen Target *Cosmos caudatus* pada Kanker Kolon

Dari hasil pengumpulan gen target senyawa melalui *GeneCards* dan gen target penyakit melalui *DisGeNet*, kemudian dilakukan analisis hubungan antara gen target tersebut menggunakan diagram venn (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) dengan memasukkan seluruh gen target masing-masing senyawa dan disease dari kanker kolon. Hasil dapat dilihat pada gambar 5.4 dan data interseksi gen target dapat dilihat pada tabel 5.6.



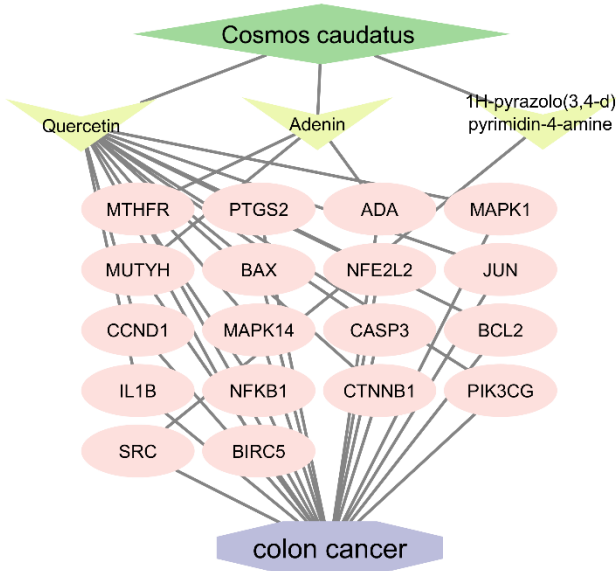
Gambar 5.4 Diagram venn 106 gen target dari daun *Cosmos caudatus* terhadap 270 gen target dengan berbagai tipe disease dari kanker kolon.

Dari hasil analisis diagram venn yang membandingkan gen target senyawa dengan gen target penyakit, didapatkan hasil bahwa dari 106 gen target senyawa dan terhubung dengan 270 gen target penyakit terdapat 18 gen target potensial yang tumpang tindih. Hal ini membuktikan adanya hubungan antara gen target senyawa dengan gen target penyakit.

Tabel 5.6 Gen target *Cosmos caudatus* yang beririsan dengan kanker kolon

Gen	target	<i>BCL2 MAPK14 JUN BAX MAPK1 MUTYH ADA MTHFR</i>
<i>Cosmos caudatus</i>		<i>PTGS2 BIRC5 PIK3CG CTNNB1 NFKB1 SRC IL1B</i>
pada kanker kolon		<i>CCND1 CASP3 NFE2L2</i>

Visualisasi *Network pharmacology* interaksi antara senyawa, komponen aktif, dan gen target pada kanker kolon dilakukan menggunakan software *Cytoscape v3.9.1* (Milliana *et al.*, 2023). Visualisasi antara gen target *Cosmos caudatus* dan gen target kanker kolon menggambarkan interaksi antara senyawa alami dalam tanaman obat dan target molekuler yang terkait dengan kanker (Mutiah *et al.*, 2024). Dari 106 gen target senyawa, 18 diantaranya spesifik dan berhubungan dengan kanker kolon dan diperoleh jejaring target hasil visualisasi *Cytoscape v3.9.1* sebagai berikut:



Gambar 5.5 Visualisasi *Network pharmacology* melalui cytoscape v3.10.3. Keterangan: tanaman (diamond hijau), senyawa metabolit sekunder *Cosmos caudatus* (V kuning), gen target (ellips merah muda), dan penyakit (octagon ungu).

Dalam *Network pharmacology*, topologi network menggambarkan hubungan antara senyawa (*nodes*) dan hubungan satu sama lain (*edges*) yang mengendalikan aktivitas gen target (Fitrianingsih *et al.*, 2024). Berdasarkan hasil pada gambar 5.5 dapat diketahui senyawa memiliki 23 *nodes* yang dihubungkan dengan 39 *edges* garis interaksi. *Nodes* tersebut meliputi 1 senyawa *Cosmos caudatus*, 3 senyawa metabolit sekunder yaitu *Quercetin*, *Adenin*, dan *1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine*, serta 18 gen target pada jalur kanker kolon yaitu colon cancer.

Tabel 5.7 Hasil pembacaan visualisasi *network pharmacology* melalui Cytoscape dari *Cosmos caudatus* pada kanker kolon

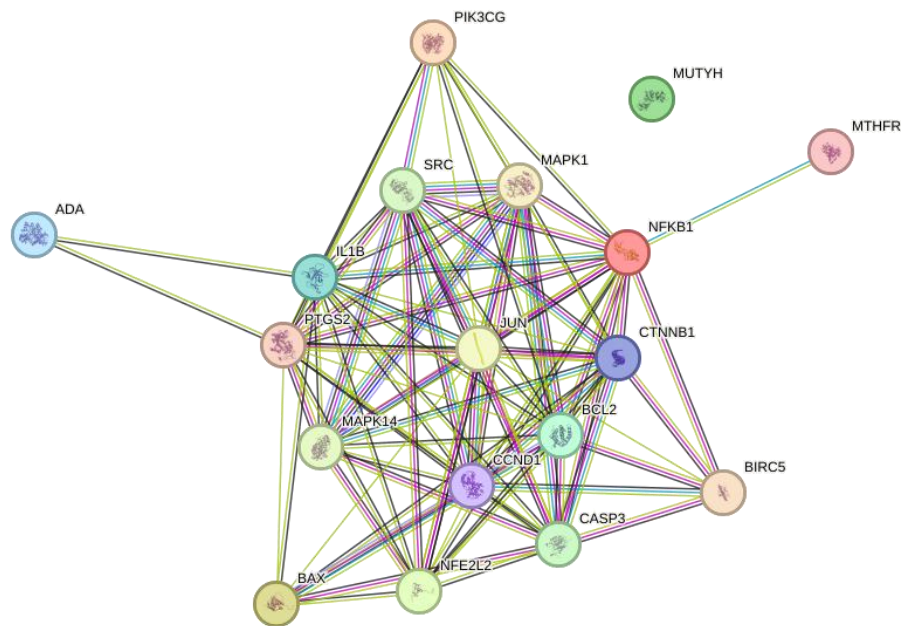
Compounds	Gene Symbol	Description	Gifts	Relevance Score
Quercetin	<i>BCL2</i>	BCL2 Apoptosis Regulator	63	9.574394
Quercetin	<i>MAPK14</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	63	8.813528
Quercetin	<i>JUN</i>	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	62	11.81278
Quercetin	<i>BAX</i>	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	64	8.91824
Quercetin	<i>MAPK1</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	65	11.27885
Quercetin	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	62	8.040488
Quercetin	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	58	8.480895

Quercetin	<i>PIK3CG</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Gamma	62	8.162027
Quercetin	<i>CTNNB1</i>	Catenin Beta 1	66	7.47555
Quercetin	<i>NFKB1</i>	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	66	9.931003
Quercetin	<i>IL1B</i>	Interleukin 1 Beta	60	7.184033
Quercetin	<i>CASP3</i>	Caspase 3	62	11.94818
Quercetin	<i>CCND1</i>	Cyclin D1	66	7.706276
Quercetin	<i>NFE2L2</i>	NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2	63	9.612125
Adenin	<i>MUTYH</i>	MutY DNA Glycosylase	57	16.85261
Adenin	<i>ADA</i>	Adenosine Deaminase	63	14.11428
Adenin	<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate Reductase	61	7.036544
1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine	<i>SRC</i>	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase	63	9.810925

Gen target, komponen biokatif senyawa daun *Cosmos caudatus* dan disease dari kanker kolon direpresentasikan sebagai *node* dan interaksi antara dua protein tersebut sebagai *edge*. Semakin banyak *edge* yang terhubung pada suatu senyawa daun *Cosmos caudatus*, semakin besar kemungkinan senyawa tersebut memiliki pengaruh yang penting dalam pengobatan kanker kolon (Faroby *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil visualisasi melalui *cytoscape* (gambar 5.5) dan analisis hasil *cytoscape* pada tabel 5.7, didapatkan hasil 3 senyawa yang memiliki potensi sebagai

gen target potensial untuk kanker kolon. Senyawa-senyawa tersebut meliputi *Quercetin* dengan 14 gen target, *adenin* dengan 3 gen target, dan *1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine* dengan 1 gen target. Terdapat 1 senyawa penting yang memiliki aktivitas terhadap kanker kolon yaitu quercetin karena memiliki gen target yang berhubungan dengan kanker kolon terbanyak yaitu 14 gen target.

5.9.4 Analisis Interaksi Protein-Protein (PPI) melalui STRING



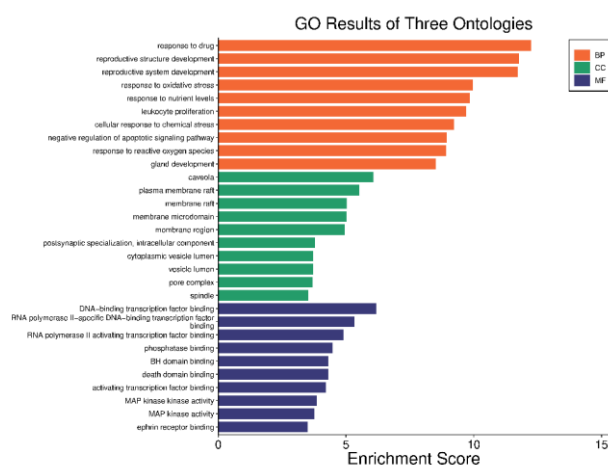
Gambar 5.6 Interaksi protein-protein senyawa dalam *Cosmos caudatus* terhadap kanker kolon

Analisis interaksi protein-protein senyawa terhadap gen target pada kanker kolon bertujuan untuk mengidentifikasi dan memahami interaksi protein yang terlibat dalam proses biologis penyakit kanker kolon. Interaksi protein-protein menunjukkan interaksi fisik atau fungsional antara dua atau lebih protein yang berperan penting dalam berbagai proses seluler (Mutiah *et al.*, 2023). Sebanyak 18 gen target dari hasil interseksi diagram venn. Hasil STRING 18 gen target diperoleh 18 *nodes* yang menunjukkan protein yang diproduksi oleh gen target dan 91 *edges* yang menunjukkan interaksi antara protein-protein tersebut. *Node* dan *edge*

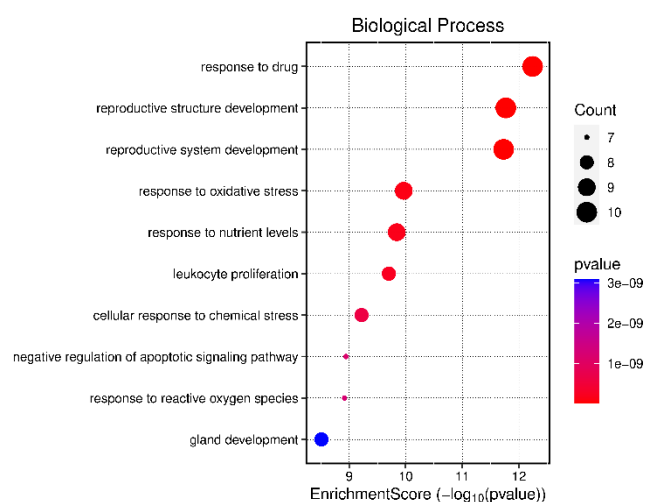
menunjukkan hubungan fisik atau fungsional antara protein-protein yang potensial dalam penyakit kanker kolon (Fitrianingsih *et al.*, 2024).

5.9.5 Analisis *Gene ontology*

Analisis lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan STRING dan SR PLOT untuk melihat *gene ontology* terkait *Cosmos caudatus* dan kanker kolon. Analisis *Gene ontology* bertujuan untuk mengungkap bahwa senyawa-senyawa yang terkandung dalam *Cosmos caudatus* memberikan pengaruh pada fungsi molekuler, komponen seluler, dan proses biologis. Fungsi molekuler (MF) merupakan aktivitas yang dilakukan oleh produk gen pada tingkat molekuler. Komponen seluler (CC) merupakan lokasi yang relatif terhadap struktur seluler, tempat terjadinya MF (Aleksander *et al.*, 2023). Proses biologi merupakan serangkaian peristiwa dan aktivitas yang terjadi dalam organisme hidup, yang melibatkan berbagai mekanisme fisiologis dan biokimia. dipilih maksimal sepuluh teratas dari proses biologi, fungsi molekuler, dan komponen seluler yang memiliki nilai *false discovery rate* $\leq 0,001$ (Mutiah *et al.*, 2024).



Gambar 5.7 Diagram batang enrichment proses biologis, komponen seluler, dan fungsi seluler



Gambar 5.8 Diagram gelembung enrichment dari 10 proses biologis dengan potensi terbesar

Tabel 5.8 Proses biologis gen target *Cosmos caudatus* dan kanker kolon

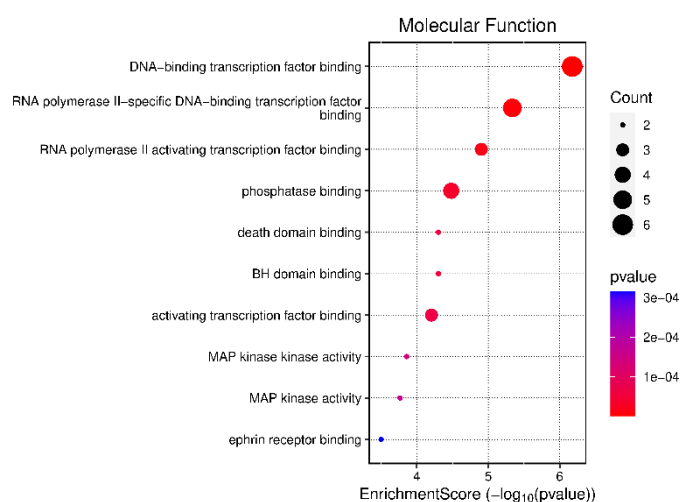
Go-term	Description	Count in network	p-value	False discovery rate (q-value)
GO:0042493	response to drug	10 of 397	5.73012E-13	3.63109E-10
GO:0048608	reproductive structure development	10 of 443	1.70464E-12	3.93677E-10
GO:0061458	reproductive system development	10 of 447	1.86375E-12	3.93677E-10
GO:0006979	response to oxidative stress	9 of 458	1.08481E-10	1.71856E-08
GO:0031667	response to nutrient levels	9 of 473	1.44396E-10	1.83002E-08
GO:0070661	leukocyte proliferation	8 of 313	1.98885E-10	2.10051E-08
GO:0062197	cellular response to chemical stress	8 of 360	6.02643E-10	5.45551E-08

GO:2001234	negative regulation of apoptotic signaling <i>pathway</i>	7 of 233	1.13536E-09	8.48475E-08
GO:0000302	response to reactive oxygen species	7 of 235	1.20506E-09	8.48475E-08
GO:0048732	gland development	8 of 443	3.09031E-09	1.91909E-07

Berdasarkan tabel 5.8 hasil *gene ontology* didapatkan sepuluh proses biologis teratas yang memiliki potensi tinggi, dimana response to drug memiliki signifikansi tertinggi dengan melibatkan 10 dari 397 gen dan memiliki nilai *false discovery rate* 3.63109E-10. *Respons to drug* (GO:0042493) merupakan segala proses yang mengakibatkan perubahan keadaan atau aktivitas sel (dalam hal gerakan, sekresi, produksi enzim, ekspresi gen, dan lain-lain) sebagai akibat dari rangsangan senyawa asing bagi organisme yang terpapar padanya (Carbon *et al.*, 2009). Pada kanker kolon, proses biologis respons terhadap obat melibatkan serangkaian peristiwa seluler dan molekuler yang kompleks, dengan tujuan untuk menghambat perkembangan tumor atau membunuh sel kanker. Proses biologis utama yang terkait dengan respons terhadap obat pada kanker kolon berupa transduksi sinyal yang memainkan peran penting dalam mengatur pertumbuhan, proliferasi, dan kelangsungan hidup sel. Obat-obatan dapat menargetkan jalur sinyal spesifik untuk menghambat pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanker dengan menginduksi apoptosis, menghentikan siklus sel, dan menginhibisi sinyal proliferasi (Delgado-Ramirez *et al.*, 2020)

Sementara *reproductive structure development* (GO:0048608) merupakan proses perkembangan reproduksi yang hasilnya berupa perkembangan struktur

somatic yang akan digunakan dalam proses terjadinya individu baru, dari pembentukannya hingga struktur yang matang. *reproductive system development* (GO:0061458) merupakan perkembangan system reproduksi dari masa pembentukan hingga menjadi struktur yang matang. *Response to oxidative stress* (GO:0006979) merupakan proses yang mengakibatkan perubahan keadaan atau aktivitas sel atau organisme sebagai akibat dari stress oksidatif. *Response to nutrient levels* (GO:0031667) merupakan proses yang mengakibatkan perubahan keadaan atau aktivitas sel atau organisme sebagai akibat adanya rangsangan yang mencerminkan keberadaan, ketiadaan, atau konsentrasi nutrisi. *Leukocyte proliferation* (GO:0070661) merupakan perluasan populasi leukosit melalui pembelahan sel. *Cellular response to chemical stress* (GO:0062197) merupakan proses yang mengakibatkan perubahan keadaan atau aktivitas sel sebagai akibat dari rangsangan kimia yang menunjukkan organisme tersebut sedang dalam keadaan stress. *Negative regulation of apoptotic signaling pathway* (GO:2001234) merupakan proses penghentian, pencegahan atau mengurangi frekuensi, laju atau tingkat jalur persinyalan apoptosis. *Response to reactive oxygen species* (GO:0000302) merupakan proses yang mengakibatkan perubahan keadaan atau aktivitas sel atau organisme sebagai akibat dari rangsangan spesies oksigen reaktif yang meliputi singlet oxygen, superoxide, dan oxygen free radicals. *Gland development* (GO:0048732) merupakan proses yang memiliki hasil perkembangan kelenjar dari waktu ke waktu, dari pembentukan hingga strukturnya matang, kelenjar merupakan organ yang terspesialisasi untuk melakukan sekresi (Carbon *et al.*, 2009).



Gambar 5.9 Diagram gelembung dari 10 fungsi molekuler dengan potensi terbesar

Tabel 5.9 Fungsi molekuler gen target *Cosmos caudatus* pada kanker kolon

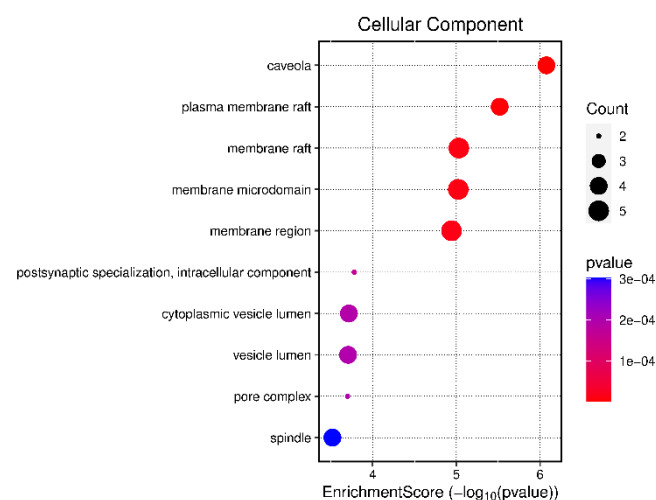
Go-term	Description	Count in network	p-value	False discovery rate (q-value)
GO:0140297	DNA-binding transcription factor binding (BP)	6 of 347	6.70606E-07	3.6001E-05
GO:0061629	RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding	5 of 267	4.60713E-06	0.000123665
GO:0001102	RNA polymerase II activating transcription factor binding	3 of 47	1.25043E-05	0.000223761
GO:0019902	phosphatase binding	4 of 194	3.29872E-05	0.000442723
GO:0051400	BH domain binding	2 of 11	4.97128E-05	0.000444799
GO:0070513	death domain binding	2 of 11	4.97128E-05	0.000444799

GO:0033613	activating transcription factor binding	3 of 80	6.20886E-05	0.000476168
GO:0004708	MAP kinase kinase activity	2 of 18	0.000137731	0.000924245
GO:0004707	MAP kinase activity	2 of 20	0.000170839	0.001019041
GO:0046875	ephrin receptor binding	2 of 27	0.000314322	0.001687413

Selain itu pada hasil *gene ontology* menunjukkan bahwa mempengaruhi fungsi molekuler, diambil 10 fungsi molekuler teratas dimana DNA-binding transcription factor binding (BP) memiliki signifikansi tertinggi dengan melibatkan 6 dari 347 gen dan memiliki nilai *false discovery rate* 3.6001E-05. *DNA-binding transcription factor binding* (BP) (GO:0140297) merupakan interaksi antara protein tertentu dengan faktor transkripsi yang terikat pada DNA (Carbon *et al.*, 2009). Faktor transkripsi adalah protein yang mengontrol ekspresi gen dengan menempel pada daerah spesifik DNA. Dalam kanker kolon, fungsi molekuler ini berperan mengatur gen yang memengaruhi proliferasi, apoptosis, migrasi, dan resistensi terhadap pengobatan (Carrasco *et al.*, 2020).

Sementara untuk *RNA polymerase II-specific DNA-binding* (GO:0061629) dan *RNA polymerase II activating transcription factor binding* (GO:0001102) merupakan salah satu faktor yang berinteraksi secara selektif dan non-kovalen dengan DNA sequence untuk memodulasi transkripsi. *Phosphatase binding* (GO:0019902) merupakan pengikat fosfat. BH domain binding (GO:0051400) merupakan pengikat pada domain protein homologi Bcl-2 (BH) terhadap fungsi protein-protein ini dalam kematian dan kelangsungan hidup sel. *Death domain*

binding (GO:0070513) merupakan pengikatan pada domain kematian suatu protein. *Death domain* (DD) adalah modul interaksi protein homotipe yang terdiri dari enam alpha-helices. Beberapa protein yang mengandung DD terlibat dalam regulasi apoptosis dan peradangan melalui aktivasi caspase dan NF-kappaB. *Activating transcription factor binding* (GO:0033613) merupakan protein yang berinteraksi dengan sequence DNA tertentu untuk memodulasi transkripsi. *MAP kinase kinase activity* (GO:0004708) merupakan katalisis fosforilasi bersama residu treonin (T) dan tirosin (Y) dalam motif T-X-Y dalam loop aktivasi substrat MAP kinase (MAPK). *Ephrin receptor binding* (GO:0046875) merupakan pengikat reseptor ephrin (Carbon *et al.*, 2009).



Gambar 5.10 Diagram gelembung dari 10 komponen seluler dengan potensi terbesar

Tabel 5.10 Komponen seluler gen target *Cosmos caudatus* dan kanker kolon

Go-term	Description	Count in network	<i>p-value</i>	<i>False discovery rate (q-value)</i>
GO:0005901	caveola	4 of 82	8.40E-07	4.86074E-05
GO:0044853	plasma membrane raft	4 of 113	3.03622E-06	8.78905E-05
GO:0045121	membrane raft	5 of 329	9.34884E-06	0.000132453
GO:0098857	membrane microdomain	5 of 330	9.48736E-06	0.000132453
GO:0098589	membrane region	5 of 343	1.14391E-05	0.000132453
GO:0099091	postsynaptic specialization, intracellular component	2 of 21	0.000166253	0.001287044
GO:0060205	cytoplasmic vesicle lumen	4 of 326	0.000192737	0.001287044
GO:0031983	vesicle lumen	4 of 328	0.000197305	0.001287044
GO:0046930	pore complex	2 of 23	0.000200077	0.001287044
GO:0005819	spindle	4 of 367	0.000302966	0.001754014

Terdapat komponen seluler yang diambil 10 teratas dengan *caveola* memiliki signifikansi tertinggi dengan melibatkan 4 dari 82 gen dan memiliki nilai *false discovery rate* 4.86074E-05. *Caveola* (GO:0005901) merupakan membrane yang membentuk cekungan yang berhubungan dengan bagian luar sel dan memanjang ke dalam sitoplasma dan membrane sel (Carbon *et al.*, 2009). *Caveola* terdiri dari protein utama seperti caveolin-1, serta lipid seperti kolesterol. Pada

kanker kolon, caveolae dan protein caveolin berperan dalam berbagai proses seluler yang dapat mendukung atau menghambat perkembangan kanker, seperti meregulasi sinyal seluler yaitu dengan bertindak sebagai tempat untuk banyak protein yang terlibat dalam jalur sinyal sel kanker (Wnt/ β -catenin, EGFR, dan PI3K/AKT). Protein caveolin-1 dapat mengatur aktivitas protein dalam jalur ini, yang berdampak pada proliferasi, dan kelangsungan hidup sel kanker (Low and Laiho, 2022).

Plasma membrane raft (GO:0044853) merupakan bagian dari membrane plasma. *Membrane raft* (GO:0045121) merupakan salah satu domain membrane kecil (10-200 nm), heterogeny, sangat dinamis, diperkaya sterol dan sphingolipid yang memisahkan proses seluler. *Membrane microdomain* (GO:0098857) merupakan daerah membrane dengan komposisi lipid yang berbeda dari daerah membran sekitarnya. *Membrane region* (GO:0098589) merupakan lapisan lipid ganda dengan semua protein dan protein kompleks yang melekat. *Postsynaptic specialization, intracellular component* (GO:0099091) merupakan jaringan protein yang berdekatan dengan membrane postsinaptik, komponen utamanya meliputi protein yang mengatur reseptor neurotransmitter secara spasial dan fungsional di membrane yang berdekatan, seperti enzim pemberi sinyal dan komponen sitoskeletal. *Cytoplasmic vesicle lumen* (GO:0060205) merupakan bagian yang dibungkus oleh vesikel sitoplasma. *Vesicle lumen* (GO:0031983) merupakan ruang yang dibungkus oleh membrane atau protein yang membentuk vesikel. *Pore complex* (GO:0046930) merupakan protein kompleks yang menyediakan bukaan tersendiri pada membrane yang memungkinkan lewatnya gas dan/atau cairan. *Spindle* (GO:0005819) merupakan rangkaian mikrotubulus dan molekul terkait

yang terbentuk di antara kutub-kutub berlawanan dari sel eukariotik selama mitosis atau meiosis dna berfungsi untuk menggerakkan kromosom duplikat terpisah (Carbon *et al.*, 2009).

5.9.6 Analisis Jalur Persinyalan Kanker Kolon

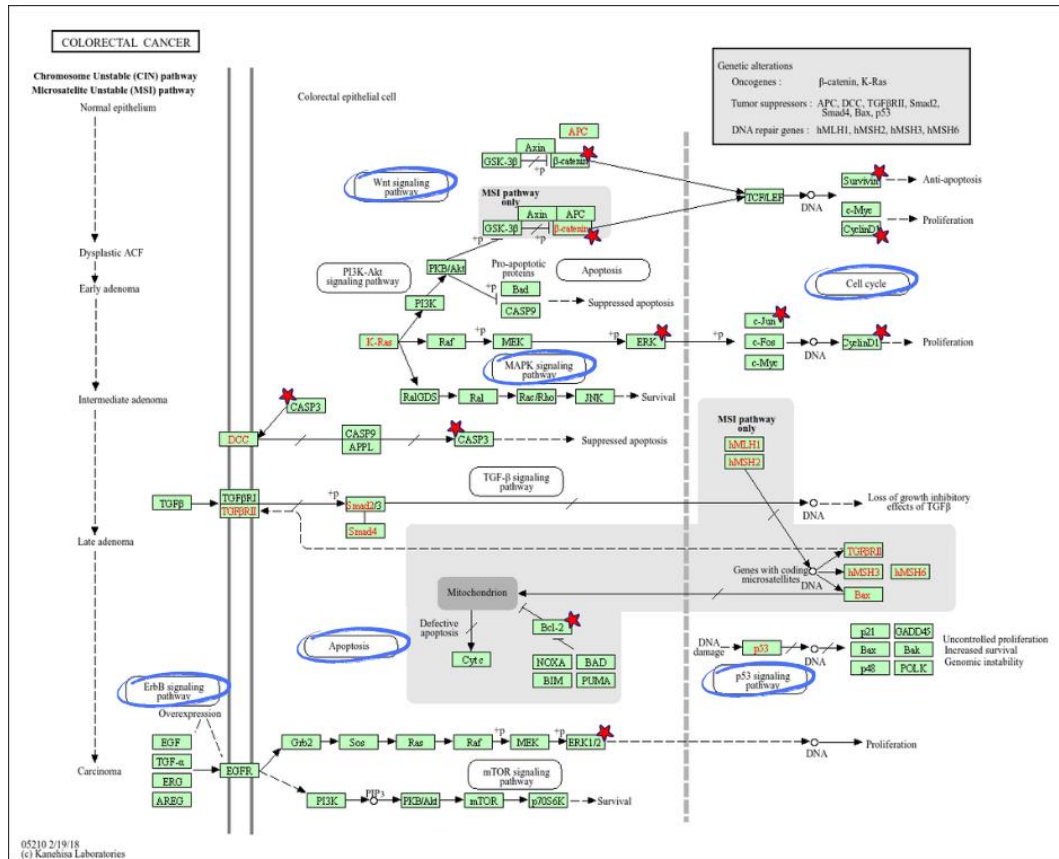
Jalur persinyalan merupakan serangkaian proses molekuler yang terjadi di dalam sel dan mengatur berbagai fungsi seluler, termasuk pertumbuhan, proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis (Mutiah *et al.*, 2023). Analisis jalur persinyalan kanker kolon dilakukan melalui *KEGG Pathway* untuk mengetahui jalur persinyalan yang dilalui gen target *Cosmos caudatus*. Berdasarkan hasil dari *KEGG Pathway* melalui STRING pada tabel 5.11 menjelaskan bahwa terdapat 9 jalur persinyalan dengan jalur paling potensial yang memiliki gen target paling banyak yaitu jalur colorectal cancer dengan 8 gen target yang terlibat, dapat dilihat pada tabel 5.11 dan gambar 5.11.

Tabel 5.11. KEGG Pathway gen target *Cosmos caudatus* dan kanker kolon

ID	Pathway	Number of Genes	Genes	p-value	q-value
hsa05210	Colorectal cancer	8 of 87	<i>BCL2/JUN/BAX/MAPK1/BI RC5/CTNNB1/CASP3/CCN D1</i>	2.5468E-12	3.01595E-11
hsa04668	TNF signaling pathway	7 of 119	<i>MAPK14/JUN/MAPK1/PTG S2/NFKB 1/IL1B/CASP3</i>	1.87962E-09	6.84882E-09
hsa04210	Apoptosis	7 of 136	<i>BCL2/JUN/BAX/MAPK1/BI RC5/NFKB1/CASP3</i>	4.80628E-09	1.51777E-08
hsa04215	Apoptosis - multiple species	4 of 32	<i>BCL2/BAX/BIRC5/CASP3</i>	4.16522E-07	5.80294E-07

hsa04370	VEGF signaling pathway	4 of 60	<i>MAPK14/MAPK1/PTGS2/SRC</i>	5.45097 E-06	5.1640 8E-06
hsa04115	p53 signaling pathway	4 of 75	<i>BCL2/BAX/CASP3/CCND1</i>	1.33302 E-05	1.1693 2E-05
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	4 of 80	<i>BCL2/BAX/MAPK1/SRC</i>	1.72358 E-05	1.4120 9E-05
hsa04010	MAPK signaling pathway	6 of 300	<i>MAPK14/JUN/MAPK1/NF KB1/IL1B/CASP3</i>	1.90337 E-05	1.5026 6E-05
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	4 of 105	<i>BCL2/PTGS2/NFKB1/IL1B</i>	5.04636 E-05	3.6217 9E-05

Berdasarkan hasil identifikasi, diambil jalur persinyalan yaitu Colorectal cancer (hsa05210) dengan nilai count in network 8 of 87 sehingga jalur ini memiliki keterkaitan dengan gen target senyawa daun kenikir dengan jumlah interaksi protein paling banyak dibandingkan jalur yang lain dan berhubungan dengan penyakit kanker kolon.



Gambar 5.11 Jalur persinyalan colorectal cancer pada *KEGG Pathway*

Pada jalur persinyalan colorectal cancer terdapat 8 gen target dari *Cosmos caudatus* yang terkait yaitu *BCL2*, *JUN*, *BAX*, *MAPK1*, *BIRC5*, *CTNNB1*, *CASP3*, dan *CCND1*. Gen target tersebut terdapat pada beberapa jalur colorectal cancer meliputi Wnt signaling pathway (hsa05210), MAPK signaling pathway (hsa04010), ErbB signaling pathway (hsa04012), apoptosis (hsa04210) dan p53 signaling pathway (hsa04115).

Wnt signaling pathway (hsa05210) merupakan jalur sinyal penting yang terlibat dalam berbagai proses seluler. *Wnt* memengaruhi berbagai proses biologis, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, organogenesis, regenerasi jaringan, dan tumorigenesis. Jalur Wnt secara garis besar dapat dibagi menjadi jalur kanonik (β -

catenin-dependent activity) dan jalur non-kanonik (*β-catenin-independent activity*). Jalur kanonik sebagian besar dikaitkan dengan kanker colorectal (CRC). Sinyal Wnt yang abnormal merupakan ciri khas sebagian besar keganasan yang berhubungan dengan kolon dan secara umum dianggap sebagai jalur onkogenik (Caspi *et al.*, 2021). Oleh karena itu aktivasi ini diketahui sebagai pemicu sebagian besar kanker kolon (Mutiah *et al.*, 2024). Penelitian ini menemukan bahwa *Cosmos caudatus* bekerja pada jalur Wnt/β-catenin (hsa04310) dengan gen target *CTNNB1*, *BIRC5*, dan *CCND1*.

Gen *CTNNB1* merupakan gen yang mengkode protein β-catenin, yang merupakan komponen penting dalam *Wnt signaling pathway*. Mutasi gen *CTNNB1* dapat menyebabkan protein β-catenin menjadi stabil secara permanen. Dalam kondisi normal, β-catenin akan didegradasi jika tidak ada sinyal Wnt. Namun, dengan mutasi gen *CTNNB1*, β-catenin terus menumpuk di dalam sel. Penumpukan β-catenin menyebabkan aktivasi terus-menerus dari gen-gen target dalam jalur Wnt yang berperan dalam mendorong pertumbuhan sel, menghambat kematian sel, dan merangsang pembentukan pembuluh darah untuk memasok oksigen dan nutrisi pada tumor. Aktivasi yang terus-menerus dari gen target ini menyebabkan sel-sel terus membelah dan berkembang biak tanpa kendali, membentuk tumor (Soylemez *et al.*, 2021).

Gen *BIRC5*, juga dikenal sebagai survivin, merupakan protein penghambat apoptosis (IAP) yang berperan dalam proliferasi sel, kelangsungan hidup sel, dan pembelahan sel. Protein ini diekspresikan oleh sinyal Wnt. Ketika sinyal Wnt diaktifkan akan menyebabkan satbilisasi dan translokasi β-catenin, yang kemudian

bertindak sebagai faktor transkripsi untuk meningkatkan ekspresi gen *BIRC5* (Sawa *et al.*, 2016).

Gen *CCND1* mengkode protein Cyclin 1, yang merupakan protein penting dalam regulasi siklus sel. Protein ini berperan dalam transisi sel dari fase G1 ke fase S pada siklus sel, yang merupakan tahap penting dalam proses proliferasi sel. Ketika sinyal Wnt diaktifkan akan menyebabkan stabilisasi dan translokasi β -catenin, dimana *CCND1* menjadi salah satu gen targetnya sehingga menyebabkan peningkatan ekspresi dari gen ini. Peningkatan ekspresi Cyclin D1 mendorong transisi sel dari fase G1 ke fase S, sehingga meningkatkan proliferasi sel yang tidak terkendali. Cyclin D1 juga dapat menghambat apoptosis sehingga sel kanker dapat bertahan hidup dan berkembang (Fiegen *et al.*, 2016).

MAPK signaling pathway (Mitogen-Activated Protein Kinase) (hsa04010) merupakan jalur sinyal penting yang terlibat dalam berbagai proses seluler, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel (Zhou *et al.*, 2019). Aktivasi abnormal jalur MAPK berperan penting dalam patogenesis kanker kolon (Soleimani *et al.*, 2019). Penelitian ini menemukan bahwa *Cosmos caudatus* bekerja pada jalur MAPK signaling pathway dengan gen target *MAPK1* atau *ERK2*, *JUN*, dan *CCND1*.

RAS merupakan protein yang berperan penting sebagai sakelar molekuler dalam *MAPK signaling pathway*. Protein ini bertindak sebagai perantara antara reseptor pada permukaan sel dan kaskade fosforilasi yang mengarah pada aktivasi MAPK dengan mengkodekan guanosine triphosphate-binding proteins (GTP). Konformasi RAS-GTP memiliki afinitas tinggi untuk mengikat dan mengaktifkan

serine-threonine kinase RAF. Setelah diaktifkan, RAF memfosforilasi MEK1 dan MEK2. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) difosforilasi dan diaktifkan melalui mediator RAS-RAF-MEK. ERK yang teraktivasi memfosforilasi beberapa efektor sitoplasma atau mentranslokasi ke dalam nucleus yang mengatur ekspresi berbagai agen transkripsi seperti c-Fos, c-Jun, dan ELK1 (Soleimani *et al.*, 2019).

Proto-onkoprotein c-Jun merupakan komponen faktor transkripsi AP-1 (*Activator Protein-1*). Fosforilasi *JUN* meningkatkan aktivitas transkripsi AP-1, sehingga dapat menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkendali (Wan *et al.*, 2020). Sementara Fosforilasi faktor transkripsi seperti ELK-1 kemudian berikatan dengan elemen responsive serum (SRE) pada promotor gen *CCND1*, sehingga meningkatkan transkripsi gen *CCND1*. Gen *CCND1* mengkode protein cyclin D1, sebuah protein yang berperan penting dalam regulasi siklus sel. Cyclin D1 bekerja sama dengan kinase-dependent cyclin (CDK) untuk mendorong transisi sel dari fase G1 ke fase S pada siklus sel, yang merupakan tahap penting dalam proses proliferasi sel (Liu *et al.*, 2023).

ErbB signaling pathway (hsa04012) merupakan jaringan kompleks reseptor tirosin kinase (RTK) yang berperan penting dalam berbagai proses seluler, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel. Aktivasi abnormal jalur ini berkaitan dengan perkembangan dan progresi kanker kolorektal. Keempat protein ErbB atau EGFR merupakan anggota subkelas I dari superfamily RTK meliputi EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, dan ErbB4/HER4. Reseptor-reseptor ini diaktifkan setelah berikatan dengan faktor pertumbuhan seperti EGF (*Epidermal Growth Factor*). Setelah diaktifkan, reseptor-reseptor tersebut

berdimerisasi dan saling memfosforilasi. Fosforilasi ini memicu serangkaian reaksi fosforilasi yang melibatkan berbagai protein kinase, termasuk MEK dan akhirnya mengaktifkan ERK. ERK dapat mengaktifkan faktor transkripsi seperti c-Myc dan c-Fos yang mendorong ekspresi gen-gen yang terlibat dalam proliferasi sel (Wang *et al.*, 2022).

P53 (hsa04115) merupakan supresor tumor penting yang mengatur berbagai respons seluler untuk melindungi dari perkembangan kanker. Protein p53 berfungsi sebagai faktor transkripsi, mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam perbaikan kerusakan DNA dan apoptosis. Dalam kanker kolorektal, jalur p53 terganggu akibat mutasi pada gen TP53 atau perubahan pada protein pengatur p53. Mutasi pada gen p53 ini menyebabkan hilangnya fungsi p53 sehingga sel yang rusak dapat terus berproliferasi. Penelitian ini menemukan bahwa *Cosmos caudatus* bekerja pada jalur p53 signaling *pathway* dengan gen target *BAX* (Liebl and Hofmann, 2021).

BAX adalah gen yang mengkode protein pro-apoptotik yang berperan penting dalam jalur apoptosis. Peningkatan ekspresi gen *BAX* terjadi melalui pengaktifan p53 yang kemudian berikatan dengan elemen responsive p53 (p53 response element) pada promotor gen *BAX* (Farooqi *et al.*, 2018). Dalam colorectal cancer dimana terjadi mutasi pada gen p53, senyawa pada *Cosmos caudatus* dengan gen target *BAX* dapat mengaktifkan atau meningkatkan ekspresi BAX (Liebl and Hofmann, 2021).

Apoptosis (hsa04210) adalah proses kematian sel terprogram yang berperan penting dalam menjaga homeostasis jaringan. Apoptosis merupakan mekanisme penting untuk menghilangkan sel-sel yang rusak atau kanker. Namun pada kanker

kolorektal proses apoptosis terganggu, memungkinkan sel-sel kanker untuk bertahan hidup dan berproliferasi (Ismail *et al.*, 2019). Penelitian ini menemukan bahwa *Cosmos caudatus* bekerja pada jalur apoptosis dengan gen target *BCL-2*. Bcl-2 adalah protein yang berperan penting dalam mengatur apoptosis. Protein ini memiliki peran dalam menjaga keseimbangan antara hidup dan mati pada sel. Dalam kondisi normal Bcl-2 berfungsi sebagai protein anti-apoptosis yang artinya Bcl-2 mencegah sel mengalami apoptosis. Pada kanker kolorektal ditemukan peningkatan ekspresi Bcl-2. Peningkatan ekspresi Bcl-2 ini dapat berpengaruh menghambat apoptosis sel kanker sehingga sel kanker dapat bertahan hidup lebih lama (Scherr *et al.*, 2016).

5.10 Integrasi Penelitian dengan Kajian Al-Qur'an

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Cosmos caudatus* memiliki aktivitas antikanker yang bisa dikembangkan menjadi alternatif pengobatan kanker. Hal ini mengindikasikan bahwa semua makhluk hidup ciptaan Allah SWT termasuk tumbuhan, memiliki khasiat dan kegunaannya masing-masing. Hal tersebut merupakan tanda bahwa Allah SWT menciptakan manusia sekaligus dengan kebutuhan hidupnya yakni tumbuh-tumbuhan yang bisa dimanfaatkan seperti buah-buahan dan sayur-sayuran untuk kesenangan hidup, sebagai obat, bahan pakan, dan lain-lain. Firman Allah dalam Al-Qur'an Surah 'Abasa ayat 24-32 sebagai berikut:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ۚ ٢٤ أَنَّا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ٢٥ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ٢٦ فَأَنبَتْنَا فِيهَا

حَبًّا ٢٧ وَعَيْنًا وَقَضْبًا ٢٨ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ٢٩ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ٣٠ وَفَكَهْطًا وَآبًا ٣١ مَّتَعًا لَّكُمْ

وَلَا نَعْمِيْكُمْ ٣٢

Artinya: “Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya Kami telah mencurahkan air (dari langit) dengan berlimpah. Kemudian, Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya. Lalu, Kami tumbuhkan padanya biji-bijian, anggur, sayur-sayuran, zaitun, pohon kurma, kebun-kebun (yang) rindang, buah-buahan, dan rerumputan. (Semua itu disediakan) untuk kesenanganmu dan hewan-hewan ternakmu.” (‘Abasa: 24-32).

Menurut tafsir al-misbah, dalam firman Allah SWT di atas mengandung makna bahwa mengajak manusia untuk berfikir luas ke depan dimana Allah SWT menumbuhkan tumbuhan dengan kemampuan dapat berkembang biak sendiri menggunakan bagian dari tubuhnya sehingga tumbuhan dapat tumbuh dengan baik dan bermanfaat (Shihab, 2002). Manusia dituntut untuk memiliki pola pikir yang cerdas secara luas terhadap tumbuhan dimana tumbuhan tidak akan diciptakan oleh Allah SWT tanpa memiliki manfaat di muka bumi ini, sehingga manusia harus menggali khasiat yang terkandung di dalam tumbuh-tumbuhan tersebut. Seseorang yang memiliki pengetahuan akan memiliki hati yang terang dan berusaha untuk memanfaatkan segala anugerah yang Allah berikan. Hal tersebut sesuai dengan firman Allah dalam surat Al-Ankabut ayat 43, yang berbunyi:

وَتِلْكَ الْأَمْثَالُ نَضْرِبُهَا لِلنَّاسِ ۚ وَمَا يَعْقِلُهَا إِلَّا الْعَالِمُونَ ٤٣

Artinya: “Dan perumpamaan-perumpamaan itu Kami buat untuk manusia. Namun, tidak ada yang memahaminya, kecuali orang-orang yang berilmu.” (QS. Al-Ankabut.29:43).

Berdasarkan tafsir Al-Misbah oleh M. Quraish Shihab (2002), makna dari surah Al-Ankabut ayat 43 yaitu “perumpamaan-perumpamaan dalam Al-Qur’an mempunyai makna-makna yang dalam, bukan terbatas pada pengertian kata-katanya. Masing-masing orang sesuai kemampuan ilmiahnya dapat menimba dari perumpamaan itu pemahaman yang boleh jadi berbeda, bahkan lebih dalam dari orang lain”.

Ayat tersebut menjelaskan bahwa agar manusia senantiasa untuk berfikir dan memahami serta memanfaatkan ilmu pengetahuan dan teknologi. Dalam penelitian ini memanfaatkan ilmu dan teknologi mulai dari ekstraksi menggunakan bantuan ultrasonik kemudian dianalisis menggunakan instrument UPLC-MS/MS, dan diprediksi secara komputasi yaitu dengan studi *network pharmacology* yang merupakan salah satu cara untuk memprediksi aktivitas tumbuhan. *Network pharmacology* memanfaatkan perangkat lunak dan beberapa basis data informasi yang kemudian akan divisualisasikan untuk mendapatkan gambaran secara kompleks hubungan obat dengan gen target dan berbagai mekanisme yang akan terjadi di dalam tubuh (Zhuang *et al.*, 2018).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Diperoleh 31 senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) meliputi 3 senyawa yang tidak terdeteksi dan 28 senyawa terdeteksi yaitu CID 75420, CID 190, CID 1923, CID 5280343, CID 5756, CID 16061289, CID 354398, CID 73954, CID 162643273, CID 116250238, CID 15798697, CID 86341996, CID 157463357, CID 171423867, CID 47610537, CID 29353, CID 155568001, CID 23433683, CID 21414680, CID 164624240, CID 58981448, CID 22879529, CID 16043298, CID 157552081, CID 142588235, CID 146691570, CID 58954507, dan CID: 138658209.
2. Senyawa mayor yang terdapat pada ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) berupa senyawa 4-(diaminomethylideneamino)butyl 2-[[[(3S)-2-hydroxy-3-propan-2-yloxybutanimidoyl]oxymethyl] -3-[2-[3-(3-methoxy-3-methylbutoxy)-3-methylbutoxy]-2-methylpropanoyl]oxy-2-methylpropanoate (CID: 142588235) dengan persen area terbesar yaitu 20.63%.
3. Senyawa metabolit dari ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang memiliki aktivitas antikanker kolon berdasarkan nilai probability dan memenuhi hukum lima Lipinski dengan nilai LD50 yang aman sebanyak 9 senyawa, diantaranya ialah 1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine, adenin, Methanamine, N-(phenylmethylene)-, (E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one, Quercetin, 2-(4-Methylsulfinylbutan-2-

ylsulfamoyl)propanethioamide, N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3yl]acetamide; methane, [(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl) -3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate, dan Estriol.

4. Berdasarkan hasil *Network pharmacology* terdapat 18 gen target potensial dari 3 komponen senyawa metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*), yaitu *BCL2*, *MAPK14*, *JUN*, *BAX*, *MAPK1*, *MUTYH*, *ADA*, *MTHFR*, *PTGS2*, *BIRC5*, *PIK3CG*, *CTNNB1*, *NFKB1*, *SRC*, *IL1B*, *CCND1*, *CASP3*, dan *NFE2L2*.
5. Jalur persinyalan dari senyawa metabolit ekstrak etanol 96% daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang berhubungan dengan kanker kolon adalah *Wnt signaling pathway*, *MAPK signaling pathway*, *ErbB signaling pathway*, *apoptosis* dan *p53 signaling pathway*.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa saran untuk penelitian berikutnya yaitu perlu dilakukan penelitian farmakologis dan molekuler lebih lanjut guna mengkonfirmasi hasil penelitian yang telah dilakukan dan perlu dilakukan penelitian uji *in vivo* dan *in vitro* untuk mengevaluasi potensi senyawa metabolit yang terkandung dalam tanaman *Cosmos caudatus* sebagai obat alternatif pada kanker kolon.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, S. S., Putra, P. P., Antasionasti, I., Rundengan, G., Suoth, E. J., Abdullah, R. P. I., dan Abdullah, F., 2022, Analisis Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksikologi Pada Pericarpium Pala (*Myristica fragrans*) Secara Artificial Intelligence, *Chemistry Progress*, 14:81-92.
- Adawiyah, R., Setiawan, A., dan Nita, S., 2017, Pengaruh Fraksi Aktif Dari Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos Caudatus* Kunth) Terhadap Uji Sitotoksik, Apoptosis Dan Antiproliferasi Kanker Payudara Sel T47d Secara In Vitro, *Biomedical J. of Indonesia: Jurnal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. 3:138-144.
- Ahda, M., Jaswir, I., Khatib, A., Ahmed, Q. U., and Mohamad, S. N. A. S., 2023, A review on *Cosmos caudatus* as A Potential Medicinal Plant Based on Pharmacognosy, Phytochemistry, and Pharmacological Activities, *International Journal of Food Properties*, 26:344–358.
- Ahmad, W. N. W., Shaari, K., Khatib, A., Hamid, A. A., dan Hamid, M., 2018, Chemical Profile, Total Phenolic Content, DPPH Free Radical Scavenging and α -Glucosidase Inhibitory Activities of *Cosmos Caudatus* Kunth Leaves, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*, 4:1367–1381.
- Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., and Zarowiecki, M., 2023, The Gene Ontology Knowledgebase in 2023, *Genetics*, 224:1-14.
- Al-Harazi, O., El Allali, A., and Colak, D., 2019, Biomolecular Databases and Subnetwork Identification Approaches of Interest to Big Data Community: an Expert Review, *Omics: a journal of integrative biology*, 23:138-151.
- Alshiekheid, M. A., Dwiningsih, Y., Sabour, A. A., and Alkahtani, J., 2022, Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Zingiber cassumunar Roxb. against Agricultural and Foodborne Pathogens, *Preprints*.
- Amperawati, S., Hastuti, P., Pranoto, Y., and Santoso, U., 2019, Efektifitas Frekuensi Ekstraksi Serta Pengaruh Suhu dan Cahaya Terhadap Antosianin dan Daya Antioksidan Ekstrak Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 8:38-45.
- Anand, A., Sharma, N., and Khurana, N., 2017, Prediction of Activity Spectra of Substances Assisted Prediction of Biological Activity Spectra of Potential Anti-Alzheimer's Phytoconstituents, *Asian J Pharm Clin Res*, 10:13-21.
- Anggraito, Y.U., Susanti, R., Iswari, R.S., Yuniastuti, A., Lisdiana, W.H., Habibah, N.A. and Bintari, S.H., 2018, Metabolit Sekunder Dari Tanaman: Aplikasi Dan

Produksi, *Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang (UNNES), Semarang.*

Annissa, S., Musfiroh, I., & Indriati, L., 2020, Perbandingan Metode Analisis Instrumen HPLC dan UHPLC, *Article Review Farmaka*, 17:189-196.

Ariani, N., Musiam, S., Niah, R., dan Febrianti, D. R., 2022, Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan Spektrofotometri UV-Vis, *Jurnal Pharmascience*, 9:40-47.

Arif, F., Dan, B., dan Hidayat, F., 2021, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Umbi Bit (*Beta Vulgaris* L.) engdan Metode Bslt (Brine Shrimp Lethality Test), *Jurnal Health Sains*, 2:310–315.

Arifianti, L., Oktarina, R. D., dan Kusumawati, I., 2014, Pengaruh jenis pelarut pengekraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* Benth, *E-Journal Planta Husada*, 2:1-4.

Basharat, R., Kotra, V., Loong, L. Y., Mathews, A., Kanakal, M., Devi, C. B. P., and Alam, M. M., 2021, Ultra Performance Liquid Chromatography (Mini-Review), *Oriental Journal of Chemistry*, 37:847-857.

Brglez M, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., and Bren, U., 2016, Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects, *Molecules*, 21:901.

Bunawan, S. N., Bunawan, H., Baharum, N., Amin, N. M., and Noor, N. M., 2014, *Cosmos Caudatus* Kunth: A Traditional Medicinal Herb, *Global Journal of Pharmacology*, 8:420–426.

Burhan, A., Megawati, A., Melvan Tumiwa, R., Syahruni, M., Sekolah, T., Ilmu, F., dan Makassar, J., 2020, Profil Metabolit Akar Temelekar (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K.Heyne) dengan Metode Kemometrik, *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 5:19-23.

Carrasco S., Bulekova, K., Gregor, B., Labadorf, A., and Fuxman Bass, J. I., 2020, Prediction of genome-wide effects of single nucleotide variants on transcription factor binding. *Scientific Reports*, 10:17632.

Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, AmiGO Hub, Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*. 2009 Jan;25(2):288-289.

Caspi, M., Wittenstein, A., Kazelnik, M., Shor-Nareznoy, Y., and Rosin-Arbesfeld, R., 2021, Therapeutic Targeting of the Oncogenic Wnt Signaling Pathway for Treating Colorectal Cancer and Other Colonic Disorders, *Advanced drug delivery reviews*, 169:118-136.

- Chandran, U., Mehendale, N., Patil, S., Chaguturu, R., and Patwardhan, B., 2017, *Network Pharmacology, Innovative Approaches in Drug Discovery: Ethnopharmacology, Systems Biology and Holistic Targeting*, 127–164.
- Chawla, G., and Ranjan, C, 2016, Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A novel technique of liquid chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3:1.
- Cronin, KA., Lake A.J., Sherman, R.L., and Jemal, Ahmedin, 2018, Annual Report To The Nation on The Status of Cancer, Part I: National Cancer Statistics, *Cancer*, 124: 2785-2800.
- Dahary, D., Golan, Y., Mazor, Y., Zelig, O., Barshir, R., Twik, M., and Fishilevich, S., 2019, Genome Analysis and Knowledge-Driven Variant Interpretation with TGex, *BMC medical genomics*, 12:1-17.
- Dash, L., Sharma, N., Vyas, M., Kumar, R., Kumar, R., Mahajan, S., and Khurana, N., 2020, Prediction Of Anticancer Activity Of Potential Anticancer Compounds Using Pass Online Software, *Plant Arch*, 20:2808-2813.
- Debela, D. T., Muzazu, S. GY., Heraro, K.D., Ndalama, M.T., Mesele, B.W., Haile, D.C., Kitui, S.K., and Manyazewai, T., 2021, New Approaches and Procedures for Cancer Treatment: Current Perspectives, *SAGE Open Medicine*, 9:1–10.
- Delgado-Ramirez, Y., Colly, V., Gonzalez, G. V., and Leon-Cabrera, S., 2020, Signal Transducer and Activator of Transcription 6 as A Target in Colon Cancer Therapy, *Oncology letters*, 20:455-464.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2017, Farmakope Herbal Indonesia Jilid II, Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Dewi, T. J. D., Ariqoh, S. S., dan Wafi, A, 2023, Studi in Silico Senyawa Alkaloid dari Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Inhibitor Angiotensin Converting Enzyme (ACE), *Journal of Islamic Pharmacy*, 8:108-113.
- Dong, Y., Hao, L., Fang, K., Han, X., Zhang, J., and Han, C., 2021, A *Network Pharmacology* Perspective for Deciphering Potential Mechanisms of Action of *Solanum nigrum* L. in Bladder Cancer. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21:1-14.
- Douaiher, J., Ravipati, A., Grams, B., Chowdhury, S., Alatise, O., and Are, C., 2017, Colorectal Cancer-Global Burden, Trends, And Geographical Variations. *Journal of Surgical Oncology*, 115:619–630.
- Dwiyanti, W. A., Ibrahim, M. U., dan Trimulyono, G., 2014, Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* secara In Vitro The Effect of Kenikir Leaves (*Cosmos caudatus*) Extract on In Vitro Growth of *Bacillus cereus*, *LenteraBio*, 3:1–5.

- Faqiha, A. F., Indrawijaya, Y. Y. A., Suryadinata, A., Amiruddin, M., dan Mutiah, R. 2022, Potensi Senyawa Nitazoxanide Dan Arbidol Sebagai Antivirus SARS-CoV-2 Terhadap Reseptor NSP5 (7BQY dan2GZ7) dan ACE2 (3D0G dan 1R4L), *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 10:570-583.
- Faroby, M. H. Z., Fadhilah, H. N., & Sembiring, F. H, 2022, Identifikasi Interaksi Protein-Protein Meningitis Menggunakan ClusterONE dan Analisis Jaringan, *Journal of Advances in Information and Industrial Technology*, 4:17-28.
- Farooqi, A. A., De La Roche, M., Djamgoz, M. B., and Siddik, Z. H., 2019, Overview of the Oncogenic Signaling Pathways in Colorectal Cancer: Mechanistic insights, In *Seminars in cancer biology*, 58:65-79.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F., 2024, *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, (17 Maret 2024).
- Fiegen, A., Freytag, N. V., Dorn, S., Müller, O., and Eberth, S., 2016, The Wnt Pathway Target Gene CCND1 Changes Mitochondrial Localization and Decreases Mitochondrial Activity in Colorectal Cancer Cell Line SW480, *Journal of Biosciences and Medicines*, 4:132
- Fita, F. E., Listiangingsih, D., Hapsari, Y.A., Pradana, R.G., Indah, E., dan Arifin, I., 201,. Efek Sitotoksik Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) dan Doksorubisin Terhadap Sel Kanker Payudara T47d Secara In-Vitro dan In-Silico, *Jurnal Ilmu Farmasi Dan Farmasi Klinik*, 1:51–56.
- Fitmawati, Erwina J., 2017, Medicinal Plants from Bushes Become Medicine, UR Press, Pekanbaru.
- Fitrianingsih, A. A., Santosaningsih, D., Djajalaksana, S., Mutiah, R., Lusida, M. I., Karyono, S. S., and Prawiro, S. R., 2024, Network Pharmacology and in Silico Investigation on *Saussurea lappa* for Viral Respiratory Diseases, *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8:5889-5896.
- Gandomani, H. S., Aghajani, M., Mohammadian-Hafshejani, A., Tarazoj, A. A., Pouyesh, V., and Salehiniya, H., 2017, Colorectal Cancer in The World: Incidence, Mortality And Risk Factors. *Biomedical Research and Therapy*, 4:1656-1675.
- Habibullah, M., Krisdiantoro, N. M., dan Sarina, W., 2021, Keefektifan Bawang Putih (*Allium satifum*) dan Sereh (*Cymbopogon nardus*) dalam Membasmi Semut Hitam (*Dolichoderus thoracicus*, *SENKIM: Seminar Nasional Karya Ilmiah Multidisiplin*, 1:144-148.

- Hakim, A., Muti'ah, R., Aprinda, R., Suryadinata, A., dan Nasikhatul, F., 2018, Metabolite Profiling Bagian Akar, Batang, Daun, dan Biji *Helianthus annuus* L. Menggunakan UPLC-MS, *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2:64-81.
- Hakim, A., Indrawijaya, Y. Y. A., Mutiah, R., Ma'arif, B., Dewi, T. J. D., Fauziyah, B., Nastiti, G. P, Maulina, No., Walidah, Z., Firdausy, A. F., Inayatillah, F.R., Wijaya, D., Syarifudin, S., Muchlasi, L., Geni, W. S., Amiruddin, M., Purwaningsih, F. E., Rahmadani, Nabila and Guhir, A.M., 2021, Ensiklopedia Ilmu Farmasi: Mengenal Dunia Pendidikan Kefarmasian Mulai Dari Ilmu Dasar Hingga Terapan, UIN Maliki Press, Malang.
- Haliza, W. N., Wibowo, A. A., Oktaviyanti, I. K., Budiwinata, W., dan Rosida, L., 2023, Korelasi Jumlah Sel Goblet dengan Jumlah Sel Radang Limfosit pada Gambaran Histopatologi Kanker Kolorektal, *Homeostatis*, 6:535–544.
- Handayani, H., Sriherfyna, F. H., dan Yunianta, Y., 2016, Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan: Pelarut Dan Lama Ekstraksi), *Jurnal pangan dan agroindustri*, 4:262-272.
- Handoyo, D. L. Y., dan Pranoto, M. E., 2020, Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Terhadap Pembuatan Simplisia Daun Mimba (*Azadirachta indica*), *Jurnal Farmasi Tinctura*, 1:45-54.
- Handoyo, D., 2020, Pengaruh Lama Waktu Maserasi (Perendaman) Terhadap Kekentalan Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle*), *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2:34-41.
- Hanifah, N., Pujiati, P., Bhagawan, W. S., dan Primiani, C. N., 2023, Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Genitri (*Elaeocarpus ganitrus*) dari Magetan Menggunakan Metode UPLC-MS, *Prosiding Seminar Nasional Program Studi Farmasi UNIPMA (SNAPFARMA)*, 1:183-187.
- Hanwar, D., Suhendi, A., Trisharyanti, I., Santoso, B., dan Safitri, M., 2015, Analisis Profil Metabolit Sekunder Ekstrak Lempuyang Emprit dengan Kromatografi Gas-Spekstroskopi Massa, *University Research Colloquium*, 1:158-166.
- Hapsari, M. D., dan Setyawan, E. I., 2023, Potensi Antikanker Ekstrak Buah Jamblang (*Syzygium cumini* L.) sebagai Bahan Pangan Fungsional, *Prosiding Workshop Dan Seminar Nasional Farmasi*, 2:356–368.
- Hardjono, S., 2017, Prediksi Sifat Farmakokinetik, Toksisitas dan Aktivitas Sitotoksik Turunan N-Benzoil-N'-(4-fluorofenil) tiourea sebagai Calon Obat Antikanker melalui Pemodelan Molekul, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 14:246-255.
- Herlina, H., Amriani, A., Sari, I., and Apriani, E., 2021, Acute Toxicity Test of Kenikir Leaf (*Cosmos Caudatus* H.B.K) Ethanolic Extract on Wistar White Male Rats With Fixed Dose Procedure Method and its Effect on

- Histopathology of Pancreatic Cells, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 12:157–161.
- Holle, L. M., Clement, J. M., and Davis, L. E., 2020, Colorectal Cancer. Dalam J. T. Dipiro, G. C. Yee, L. Mi. Posey, S. T. Haimes, T. D. Nolin, and V. L. Ellingrod, *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach. Vol. Section 19*, Eleventh Edition, page. 6527–6603, McGraw Hill, United States.
- Indriyani, L. K. D., Wrsiati, L. P., dan Suhendra, L., 2021, Kandungan Senyawa Bioaktif Teh Herbal Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) pada Perlakuan Suhu Pengeringan dan Ukuran Partikel, *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 9:109–118.
- Ismail, N. I., Othman, I., Abas, F., H. Lajis, N., and Naidu, R., 2019, Mechanism of Apoptosis Induced by Curcumin in Colorectal Cancer, *International journal of molecular sciences*, 20:2454.
- Isnaeni, N. A., Sandra, F., & Hayuningtyas, R. A., 2024, Ekstrak Daun Tapak Dara sebagai Potensi Bahan Antikanker terhadap Sel Kanker Mulut, *Jurnal Kedokteran Gigi Terpadu*, 6:31-33.
- Javadi, N., Abas, F., Hamid, A. A., Simoh, S., Shaari, K., Ismail, I. S., and Khatib, A., 2014, GC-MS-based Metabolite Profiling of *Cosmos caudatus* Leaves Possessing Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity, *Journal of Food Science*, 79:C1130-C1136.
- Kanehisa, M., and Goto, S., 2000, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes And Genomes, *Nucleic acids research*, 28:27-30.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K., 2017, KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs, *Nucleic acids research*, 45:D353-D361.
- Kartika, A. A., 2022, Analisis Kadar Alkohol Pada Minuman Tuak Dan Arak Menggunakan Metode Berat Jenis Dan Kromatografi Gas-FID, *Acta Holistica Pharmacia*, 4:80-106.
- Keene, M. R., Heslop, I. M., Sabesan, S. S., dan Glass, B. D., 2019, Complementary and Alternative Medicine Use in Cancer: A Systematic Review, *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 35: 33–47.
- Kholifah, E., dan Endah, E., 2022, Analisis Profil Fisika Kimia dan Farmakokinetik Senyawa Pentagamavunon-1 Secara Komputasi, *Duta Pharma Journal*, 2:1-7.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., and Bolton, E. E., 2019, PubChem 2019 Update: Improved Access To Chemical Data, *Nucleic acids research*, 47:D1102-D1109.
- Kim, S., Gindulyte, A., Zhang, J., Thiessen, P. A., and Bolton, E. E., 2021, PubChem Periodic Table and Element Pages: Improving Access to Information on

- Chemical Elements From Authoritative Sources, *Chemistry Teacher International*, 3:57-65.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., and Bryant, S. H., 2016, PubChem Substance And Compound Databases, *Nucleic acids research*, 44:D1202-D1213.
- Kolin, M. Y. K., Warjiman, W., & Mahdalena, M., 2016, Kualitas Hidup Pasien Kanker Yang Menjalani Kemoterapi. *Jurnal Keperawatan Suaka Insan (JKSI)*, 1:1-12.
- Krihariyani, D., Sasongkowati, R., dan Haryanto, E., 2020, Studi in Silico Sifat Farmakokinetik, Toksisitas, Dan Aktivitas Imunomodulator Brazilein Kayu Secang Terhadap Enzim 3-chymotrypsin-like Cysteine Protease Coronavirus, *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*, 1:76-90.
- Kristina, C. V. M., Yusasrini, N. A., dan Yusa, N. M., 2022, Pengaruh Waktu Ekstraksi Dengan Menggunakan Metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Duwet (*Syzygium cumini*), *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 11:13-21.
- Lee, S. M., Choi, H. C., and Hyun, M. K., 2019, An Overview of Systematic Reviews: Complementary Therapies for Cancer Patients, *Integrative Cancer Therapies*, 18: 1–11.
- Lee, T. K., and Vairappan, C. S., 2011, Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxic Activities of Essential Oils And Ethanol Extracts Of Selected South East Asian Herbs, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5:5284–5290.
- Lee, W. Y., Lee, C. Y., Kim, Y. S., and Kim, C. E., 2019, The Methodological Trends of Traditional Herbal Medicine Employing *Network Pharmacology*, *Biomolecules*, 9:362.
- Legeay, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., and Jensen, L. J., 2020, Visualize Omics Data on Networks with Omics Visualizer, A Cytoscape App, *F1000Research*, 9:157.
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Góra, A., and Rudzki, S., 2022, Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer, *Cancer Control*, 29:1–15.
- Liebl, M. C., and Hofmann, T. G., 2021, The role of p53 signaling in colorectal cancer, *Cancers*, 13:2125.
- Li W, Yuan G, Pan Y, Wang C, Chen H., 2017, *Network Pharmacology* Studies on the Bioactive Compounds and Action Mechanisms of Natural Products for the Treatment of Diabetes Mellitus: A Review, *Front Pharmacol*, 8:1-10.
- Lin, Y., and Hu, Z., 2021, Bioinformatics Analysis of Candidate Genes Involved In Ethanol-Induced Microtia Pathogenesis Based on a Human Genome Database:

- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney FJ., 1997, Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability In Drug Discovery And Development Settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23:3-25.
- Liu, Z., Jin, C., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, J., and Zheng, L., 2023, Identification of BRAF, CCND1, and MYC mutations in a patient with multiple primary malignant tumors: a case report and review of the literature, *World Journal of Surgical Oncology*, 21:158.
- Loh, S., dan Hadira, O., 2011, Inhibitory Potential of Some Plants Against Key Enzymes Involved in Hyperglycemia & Hypertension 77 Mal, *Article in Malaysian Journal of Nutrition*, 17:77–86.
- Low, J. Y., and Laiho, M., 2022, Caveolae-associated Molecules, Tumor Stroma, and Cancer Drug Resistance: Current Findings and Future Perspectives, *Cancers*, 14:589.
- Lubis, I. A., dan Bestari, R., 2023, Evaluasi Aktivitas Sitotoksik Dan Indeks Selektivitas Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) Terhadap Model Sel Kanker Kolon Secara In Vitro, *Biology Education Science & Technology*, 6:675–681.
- Ma'arif, B., dan Mutiah, R., 2019, Profil Metabolit Berbagai Ekstrak Daun *Chrysophyllum cainito* L. Menggunakan UPLC-QTOF-MS/MS, *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 12:10-24.
- Mahadevan, V., 2020, Anatomy of The Caecum, Appendix and Colon, *Surgery (Oxford)*, 38:1-6.
- Maksum, A., dan Purbowati, I. S. M., 2017, Optimasi Ekstraksi Senyawa Fenolik Dari Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) Berbantu Gelombang Mikro. *Agrin*, 21:91-104
- Melati, P., 2021, Uji aktivitas antioksidan, sitotoksisitas dan GC-MS ekstrak metanol alga hijau *Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldmann dari pantai panjang Bengkulu. *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Sains dan Teknologi*, 1:10-24.
- Milliana, A., Listiyana, A., Mutiah, R., Annisa, R., Firdausi, A. F., Faradila, V. A., and Yueniwati, Y., 2023, The Potential of Eleutherine bulbosa in Inducing Apoptosis and Inhibiting Cell Cycle in Breast Cancer: A Network Pharmacology Approach and In Vitro Experiments, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 24:3783.
- Moshawih, S., Cheema, M. S., Ahmad, Z., Zakaria, Z. A., and Hakim, M. N., 2017, A Comprehensive Review on *Cosmos caudatus* (Ulam Raja): Pharmacology,

- Ethnopharmacology, and Phytochemistry, *International Research Journal of Education and Sciences (IRJES)*, 1:14–31.
- Muiz, H. A., Wulandari, S., and Primadiamanti, A., 2021, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) Terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Analis Farmasi*, 6:84-89.
- Mujtahid, I.F., Razak, R., and Najib, A., 2024, Studi in Silico Prediksi Sifat Fisikokimia dan Toksisitas Senyawa Tectoquinone Sebagai α -Glukosidase inhibitor, *Makassar Natural Product Journal (MNPJ)*, 215-221.
- Mukhriani, 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, 7:361-367.
- Muldianah, D., Sulastri, S., Fatharani, A., Nurdimayanthi, D. A., Rahmawati, D. S., and Fadhilah, H., 2022, Metode Analisis Paracetamol (Acetaminophen) dalam Darah, Plasma, dan Serum Manusia, *COMSERVA: Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*, 2:1-12.
- Murugesu, S., Perumal, V., Balan, T., Fatinathan, S., Selvarajoo, P. D., Rozali, M. A. B., and Aziz, N. I. A., 2020, A Review of *Cosmos caudatus* as A Promising Antidiabetic Plant, *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*, 16:333-343.
- Muti'ah, R., Listiyana, A., Nafisa, B. B., dan Suryadinata, A., 2020, Kajian Efek Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) sebagai Antikanker. *Journal of Islamic Pharmacy*, 5:14–26.
- Mutiah, R., Brilliana, M. S. D., Ahmad, A. R. A., Fauziyah, B., Janaloka, N. A., Suryadinata. A., 2024, Network Pharmacology and Component Analysis Integrated Study to Uncovers the Molecular Mechanisms of Lansium parasiticum Bark Extract in Colon Cancer Treatment. *Science and Technology Indonesia*, 9.
- Mutiah, R., Kristanti, R. A., Susanti, E., and Minggarwati, T. S., 2019, Compound Identification and Anticancer Activity of Ethyl Acetate Fraction from Bawang Sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) on HeLa Cervical Cancer Cell Line, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 10:1-9.
- Mutiah, R., Milliana, A., Rahmawati, E., Fitrianiingsih, A. A., and Yueniwati, Y., 2023, Network pharmacology, Apoptosis, and Cell Cycle Inhibition of Sesquiterpene Compounds from Qusthul Hindi Root Extract (*Saussurea lappa*) in Breast Cancer: An in silico and in vitro approach, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 15:132-141.
- Mutiah, R., Rachmawati, E., Fitrianiingsih, A. A., and Zahiro, S. R., 2023, Metabolite Profiling of Anticancer Compounds in Saussure Lappa Based on UPLC-QToFMS/MS, *Pharmacy Education*, 23:37-42.

- Mutiah, R., Rachmawati, E., Zahiro, S. R., and Milliana, A., 2024, Elucidating the Active Compound Profile and Mechanisms of Dendrophthoe Pentandra on Colorectal Cancer: LCMS/MS Identification and Network Pharmacology Analysis, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14:222-231.
- Mutiah, R., Yuliandari, A., Annisa, R., and Ma'arif, B., 2020, Metabolomic Analysis of *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. Leaves Via UPLC-QToF-MS Coupled with Multivariate Data Analysis Using PCA, Proceedings of the 2nd International Conference on Quran and Hadith Studies Information Technology and Media in Conjunction with the 1st International Conference on Islam, Science and Technology, ICONQUHAS & ICONIST; Bandung, October 2-4, 2018, Indonesia.
- Nafisa, S., Noor, S. U., Azkannufuus, A., and Noviani, Y., 2023, Cosmos caudatus Kunth. Leaf Extract Herbal Nanosuspension Formulations, Characterization, and Cytotoxicity Approach Against MCF-7 Breast Cancer Cells, *JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*, 21:286-294.
- Nafisa, S., Rohmah, S., Nihan, Y. A., Nurfadhila, L., dan Utami, M. R., 2023, Analisis Senyawa Obat Warfarin dalam Plasma Darah dengan Metode HPLC/KCKT, *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 479-494.
- Naresh, K., Bhawani, S., and Kumar, T. M., 2014, Ultra Performance Liquid Chromatography, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3:84-94.
- Naufa, F., Mutiah, R., Yen, Y., dan Indrawijaya, A., 2022, Studi in Silico Potensi Senyawa Katekin Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sebagai Antivirus SARS CoV-2 terhadap Spike Glycoprotein (6LZG) dan Main Protease (5R7Y), *J.Food Pharm.Sci*, 10:584-596.
- Naushad, M., Khan, M. R., and Alothman, Z. A., 2014, History and Introduction of UPLC/MS, *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Evaluation and Applications in Food Analysis*, 1-15.
- Noga, M., Michalska, A., and Jurowski, K., 2024, The Prediction of Acute Toxicity (LD50) for Organophosphorus-Based Chemical Warfare Agents (V-series) Using Toxicology In Silico Methods, *Archives of toxicology*, 98:267-275.
- Noor, F., Tahir ul Qamar, M., Ashfaq, U. A., Albutti, A., Alwashmi, A. S., and Aljasir, M. A., 2022, Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment, *Pharmaceuticals*, 15:1-33.
- Nurhayati, B., Gustira Rahayu, I., Feisal Rinaldi, S., Sofwan Zaini, W., Afifah, E., Arumwardana, S., and Widowati, W., 2018, The Antioxidant and Cytotoxic Effects of *Cosmos caudatus* Ethanolic Extract on Cervical Cancer, *The Indonesian Biomedical Journal*, 10:243-249.

- Nurmalasari, P., Andyhapsari, D., dan Marizka, S. P., 2020, Keanekaragaman Jenis Bunga di Bantul Sebagai Sumber Belajar Biologi Berbasis Potensi Lokal, *Jurnal Bioeducation*, 7:56–65.
- Nurmianti, L., dan Gusmarwani, S. R., 2020, Penentuan Lethal Dose 50%(LD50) Pestisida Nabati dari Campuran Buah Bintaro, Sereh, Bawang Putih, Lengkuas (Variabel Waktu Pemasakan dan Ratio Masing-Masing Bahan, *Jurnal Inovasi Proses*, 5:22-26.
- Nursanti, O., 2021, Validasi Penambatan Molekul Untuk Mendapatkan Ligan Aktif Pada Reseptor Cyclooxygenase 2, In *Prosiding Seminar Informasi Kesehatan Nasional*, 411-430.
- Ortiz, C. L. D., Completo, G. C., Nacario, R. C., and Nellas, R. B., 2019, Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GlfT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and in Silico ADMETox Studies, *Scientific reports*, 9:17096.
- Ozogul, B., Kisaoglu, A., Ozturk, G., Atamanalp, S. S., Yildırgan, M. İ., and Aydinli, B., 2014, Management of Perforated Colon Cancers, *European Journal of General Medicine*, 11:164-168.
- Pacal, I., Karaboga, D., Basturk, A., Akay, B., and Nalbantoglu, U., 2020, A Comprehensive Review of Deep Learning in Colon Cancer, *Computers in Biology and Medicine*, 12:1–33.
- Pahlani, E., Sukmayadi, A. E., dan Dewi, S., 2021, Literatur Review: Tumbuhan Dengan Aktivitas Antikanker Darah Pada Sel Leukemia, *Jurnal Kesehatan Aeromedika*, 7:1–14.
- Paramita, O., Kusumastuti, A., Hadasmo, M. A., and Sholeha, N. A., 2023, Pengaruh Blanching pada Pembuatan Simplisia Kulit Buah Naga Merah, *Bookchapter Alam Universitas Negeri Semarang*, 3.
- Perina, I., Satiruai, Soetaredjo, F. E., dan Hindarso, H., 2007, Ekstraksi Pektin Dari Berbagai Macam Kulit Jeruk, *WIDYA TEKNIK*. 6:1– 10.
- Perumal, V., Hamid, A. A., Ismail, A., Saari, K., Abas, F., Ismail, I. S., and Khatib, A., 2014, Effect of *Cosmos caudatus* Kunth leaves on the Lipid Profile of a Hyperlipidemia-Induced Animal Model, *Journal of Food Chemistry and Nutrition*, 2:43-51.
- Phong, H. X., Viet, N. T., Quyen, N. T. N., Van Thinh, P., Trung, N. M., and Ngan, T. T. K., 2022, Phytochemical Screening, Total Phenolic, Flavonoid Contents, And Antioxidant Activities of Four Spices Commonly Used in Vietnamese Traditional Medicine, *Materials Today: Proceedings*, 56: A1–A5.
- Piñero, J., Ramírez-Anguita, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., and Furlong, L. I., 2020, The DisGeNET Knowledge Platform For Disease Genomics: 2019 Update, *Nucleic acids research*, 48: D845-D855.

- Piñero, J., Saüch, J., Sanz, F., & Furlong, L. I., 2021, The DisGeNET Cytoscape App: Exploring and Visualizing Disease Genomics Data, *Computational and structural biotechnology journal*, 19:2960-2967.
- Pires, D. E., Blundell, T. L., and Ascher, D. B., 2015, pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures, *Journal of medicinal chemistry*, 58:4066-4072.
- Plessis, L., D., Škunca, N., and Dessimoz, C., 2011, The What, Where, How And Why of Gene Ontology—a Primer For Bioinformaticians, *Briefings in bioinformatics*, 12:723-735.
- Prahayati, S., & Rusdi, B., 2023, Uji In Silico Aktivitas Senyawa Kumarin Turunannya Terhadap Enzim Alfa Glukosidase Antidiabetes, *Jurnal Riset Farmasi*, 9-16.
- Pramod, S. K., and Navnath, K. A., 2017, A Brief Review On Ultra Performance Liquid Chromatography, *World J. of Pharm. Res*, 6:407-422.
- Pramudiyawati, A., Putri, D. E., Nurfadilah, N., dan Wilapangga, A., 2024, Skrining Studi in Silico Potensi Farmakokinetika dan Toksisitas Senyawa 6, 10, 14-trimetil-2-pentadekanon dari Ekstrak Daun Ekaliptus, *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 4.
- Purnobasuki, H., Rakhashiwi, G. A., Wahyuni, D. K., Putra, R. E., Raffiudin, R., and Soessilohadi, R. H., 2022, Morpho-anatomical Characterization and DNA Barcode of *Cosmos caudatus* Kunth., *Biodiversitas*, 23:4097–4108.
- Putra, P. P., Fauzana, A., and Lucida, H., 2020, In Silico Analysis of Physical-chemical Properties, Target Potential, and Toxicology of Pure Compounds From Natural Products, *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 7:107-117.
- Rafi, M., Hayati, F., Umar, A. H., Septaningsih, D. A., dan Rachmatiah, T., 2023, LC-HRMS-based Metabolomics to Evaluate the Phytochemical Profile and Antioxidant Capacity of *Cosmos caudatus* With Different Extraction Methods and Solvents, *Arabian Journal of Chemistr*, 16:1-9.
- Rafi, M., Septaningsih, D. A., and Heryanto, R., 2018, Metabolite Profiling of Java Turmeric (*Curcuma xanthoriza*) Essential Oil with Different Harvest Times. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 21:237–241.
- Ramadhan, F., Mukarramah, L., Oktavia, F., Yulian, R., Annisyah, N. H., and Asyiah, I. N., 2018, Flavonoids from Endophytic Bacteria of *Cosmos caudatus* Kunth. Leaf As Anticancer and Antimicrobial, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11:200–204.
- Rasdi, N. H. M., Samah, O. A., Sule, A., dan Ahmed, Q. U., 2010, Antimicrobial Studies of *Cosmos caudatus* Kunth. (Compositae), *Journal of Medicinal Plants Research*, 4:669–673.

- Ravelliani, A., Nisrina, H., Sari, L. K., Marisah, M., Riani, R., Agustin, A. E., dan Rivianto, F. A., 2022, Metode Validasi Golongan Obat Beta Blocker dalam Plasma Darah Manusia Menggunakan Metode HPLC, *COMSERVA: Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*, 2:13-19.
- Retnaningsih, D., Ferari, E., dan Winarti, R., 2022, Pengalaman Perawatan Kanker Kolon Stadium Akhir: Case Study, *Jurnal Surya Muda*, 4:37–49.
- Rianti, D. R., Yunita, E., Pratiwi, A. D., Nur'aini, N. S., dan Susilowati, A., 2019, Uji Stabilitas Gel Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.), *Jurnal Kefarmasian Akfarindo*, 31-35.
- Rodhiyah, R., Rahmatulloh, A., dan Firdaus, R. C., 2024, Perbandingan Analisis Parameter Moisture Content Flavour Powder Menggunakan Moisture Analyzer Dan Oven. *Distilat: Jurnal Teknologi Separasi*, 10:287-295.
- Rosa, D., Primiani, C. N., Bhagawan, W. S., dan Pujiati, P., 2023, Rendemen Ekstrak Etanol Daun Genitri (*Elaeocarpus ganitrus*) dari Magetan, In *Prosiding Seminar Nasional Program Studi Farmasi UNIPMA (SNAPFARMA)*, 1:146-153.
- Rudik, A. V., Dmitriev, A. V., Lagunin, A. A., Filimonov, D. A., and Poroikov, V. V., 2019, PASS-based Prediction of Metabolites Detection in Biological Systems, *SAR and QSAR in Environmental Research*, 30:751-758.
- Safitri, A., Putri, A. S., Octavianty, T. D., dan Sari, D. R. T., 2020, Metabolomic Profiles of *Curcuma longa* L and *Cosmos caudatus* Extracts and Their In-Silico Anti-cancer Activity, *Journal of Physics: Conference Series*, 1:1-10.
- Safran, M., Rosen, N., Twik, M., BarShir, R., Stein, T. I., Dahary, D., and Lancet, D., 2021, The Genecards Suite, *Practical guide to life science databases*, 1:27-56.
- Saleh, I., Trisnaningsih, U., Dwirayani, D., Syahadat, R. M., dan Atmaja, I. S. W., 2020, Analisis Preferensi Konsumen Terhadap Dua Spesies Kenikir; *Cosmos Caudatus* DAN *Cosmos Sulphureus*. *Mahatani*, 3:195–204.
- Salehan, N. M., Meon, S., dan Ismail, I. S., 2013, Antifungal Activity of *Cosmos caudatus* Extracts against Seven Economically Important Plant Pathogens. *International Journal of Agriculture & Biology Int. J. Agric. Biol*, 15:864–870.
- Saputra, A., Arfi, F., dan Yulian, M., 2020, Literature Review: Analisis Fitokimia dan Manfaat Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*), *Amina*, 2:114-119.
- Saurina, J., and Sentellas, S., 2017, Strategies for Metabolite Profiling Based On Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1044:103-111.
- Sawa, M., Masuda, M., & Yamada, T., 2016, Targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 20:419-429.

- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., and Przybyłowicz, K. E., 2021, A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*. 13:1–23.
- Scherr, A. L., Gdynia, G., Salou, M., Radhakrishnan, P., Duglova, K., Heller, A., and Koehler, B. C., 2016, Bcl-xL is an Oncogenic Driver in Colorectal Cancer, *Cell death & disease*, 7: e2342-e2342.
- Sembiring, P., 2021, Uji Efektivitas Antidiare Ekstrak Etanol Daun Gelugur (*Garcinia atroviridis* Griff ex. T Anderson) Terhadap Tikus Jantan Putih (*Rattus Norvegicus*) Dengan Loperamide Sebagai Pembanding, *Jurnal Penelitian Farmasi & Herbal*, 4:36-43.
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., and Ren, X., 2023, A Comprehensive Review of Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) for Bioactive Components: Principles, Advantages, Equipment, and Combined Technologies, *Ultrasonics Sonochemistry*, 101:1-24.
- Shihab, M. Q., 2002, Tafsir Al-Misbah (Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an). Jakarta: Lentera Hati.
- Shofia, V., Lukman, H., & Hasanah, R. M., 2024, Perbandingan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol dan Metanol Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) Secara Spektrofotometri UV-Vis, *Journal of Pharmaceutical Science (JOPHAS)*, 1:7-12.
- Sholihah, M. A., Ahmad, U., and Budiastra, I. W., 2017, Aplikasi Gelombang Ultrasonik Untuk Meningkatkan Rendemen Ekstraksi dan Efektivitas Antioksidan Kulit Manggis, *Jurnal keteknik pertanian*, 5:161-168.
- Silsia, D., Susanti, L., and Febreini, M., 2021, Rendemen dan Karakteristik Pektin Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus costaricensis*) dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi, *Jurnal Agroindustri*, 11:120-132.
- Sinaga, B., Sondak, E. S., & Ningsih, A. W., 2024, Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Daun Jambu Biji Merah (*Psidium guajava* L.). In *Prosiding Seminar Nasional Polkesta*, 1:111-120.
- Sirait, D. T. C., dan Astuti, W., 2019, Analisis Perbandingan Reduksi Dimensi Principal Component Analysis (PCA) dan Partial Least Square (PLS) untuk Deteksi Kanker Menggunakan Data Microarray, *E-Proceeding of Engineering*, 6:8570–8581.
- Soleimani, A., Rahmani, F., Saeedi, N., Ghaffarian, R., Khazaei, M., Ferns, G. A., and Hassanian, S. M., 2019, The Potential Role of Regulatory Micrnas of RAS/MAPK Signaling Pathway in The Pathogenesis of Colorectal Cancer, *Journal of cellular biochemistry*, 120:19245-19253.

- Söylemez, Z., Arikan, E. S., Solak, M., Arikan, Y., Tokyol, Ç., and Şeker, H., 2021, Investigation of The Expression Levels of CPEB4, APC, TRIP13, EIF2S3, EIF4A1, IFNg, PIK3CA and CTNNB1 Genes in Different Stage Colorectal Tumors, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 51:661-674.
- Steenis, V., CGGJ, 2008, *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*, Pradnya Paramita, Jakarta
- Suharyanto, S., and Hayati, T. N., 2021, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Buah Gambas (*Luffa acutangula* (L.) Roxb.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18:82-88.
- Sun, M., Han, Z., Luo, Z., Ge, L., Zhang, X., Feng, K., and Jiang, W., 2024, PTPN11 is a Potential Biomarker for Type 2 Diabetes Mellitus Complicated With Colorectal Cancer, *Scientific Reports*, 14:25155.
- Susanti, E., dan Istianasari, M., 2022, Profil LC-MS/MS dan Kadar Fenolik Total Ekstrak Bunga Telang dan Rosela Sebagai Kandidat Inhibitor NPC1L1 LC-MS/MS Profile and Total Phenolic Content of Telang Flower Extract and Roselle as NPC1L1 Inhibitor Candidate, *Electronic Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 8:164–169.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., and Von Mering, C., 2023, The STRING Database in 2023: Protein–Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest, *Nucleic acids research*, 51:638-646.
- Tessema, F. B., Gonfa, Y. H., Asfaw, T. B., Tadesse, M. G., and Bachheti, R. K., 2023, Antioxidant Activity of Flavonoids and Phenolic Acids From *Dodonaea Angustifolia* Flower: HPLC Profile and PASS Prediction, *Journal of Chemistry*, 2023:1-11.
- Thahara, C. A., Rizarullah, R., Atika, R. A., dan Wahab, A., 2022, Potensi Pendekatan in Silico Sebagai Penghambat Aktivitas Protein Protease Utama SARS-CoV-2 dari Tiga Senyawa Tanaman Obat Jahe Merah, *JUPI (Jurnal IPA & Pembelajaran IPA)*, 6:207-218.
- Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., and Wilson, I. D., 2012, Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Global Metabolite Profiling: A Review, *Analytica chimica acta*, 7:7-16.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., and Kaur, H., 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1:98-106.
- Triatmoko, B., Noor, A. S., dan Nuri, 2020, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Fraksi Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) terhadap *Salmonella typhi*, *E-Journal Pustaka Kesehatan*, 8:177–182.

- Uzbek, U. H., dan Shahidan, W. N. S., 2019, Tasty Herb That Heals: A Review of *Cosmos caudatus* (Ulam raja) and its Potential Uses in Dentistry, *World Journal of Dentistry*, 10:321–324.
- Villas-Bôas, S. G., Rasmussen, S., dan Lane, G. A., 2005, Metabolomics or Metabolite Profiles?, *Trends in Biotechnology*, 23:385–386.
- Wan, M. L., Wang, Y., Zeng, Z., Deng, B., Zhu, B. S., Cao, T., and Wu, Q., 2020, Colorectal Cancer (CRC) as a Multifactorial Disease and Its Causal Correlations with Multiple Signaling Pathways, *Bioscience reports*, 40: BSR20200265.
- Wang N, Cao Y, Si C, Shao P, Su G, Wang K, Bao J, Yang L., 2022, Emerging Role of ERBB2 in Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Signaling Pathways to Therapeutic Strategies, *Cancers (Basel)*, 14:5160.
- Wardaniati, I., and Gusmawarni, V., 2021, Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol propolis terhadap *Streptococcus mutans*, *Jurnal Farmasi Higea*, 13:115-123.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., and Luo, X., 2018, Advances in Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cash Crops—A Review, *Ultrasonics sonochemistry*, 48:538-549.
- Widyawati, A. T., dan Zulchi, T., 2019, Efforts to Develop the Potential of Minor Vegetables, *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 5:117–122.
- Wijaya, H., Jubaidah, S., dan Rukayyah, R., 2022, Perbandingan Metode Esktraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Batang Turi (*Sesbania Grandiflora* L.) dengan Menggunakan Metode Maserasi Dan Sokhletasi, *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 5:1-11.
- Wilapangga, A., Sutyono, B., Permadi, T., dan Noordam, E. R., 2024, Potensi Farmakokinetika dan Toksisitas Benzyl β -D-Glucoside dari *Piper crocatum*: Studi In Silico, *Journal Syifa Sciences and Clinical Research (JSSCR)*, 6(2).
- Yang, H., Cao, J., Li, J. M., Li, C., Zhou, W. W., and Luo, J. W., 2023, Exploration of the Molecular Mechanism of Tea Polyphenols Against Pulmonary Hypertension By Integrative Approach Of Network Pharmacology, Molecular Docking, and Experimental Verification. *Molecular Diversity*, 1-14.
- Yi, F., Li, L., Xu, L. J., Meng, H., Dong, Y. M., Liu, H. B., and Xiao, P. G., 2018, In Silico Approach In Reveal Traditional Medicine Plants Pharmacological Material Basis, *Chinese medicine*, 13:1-20.
- Yusoff, N. A. H., Rukayadi, Y., Abas, F., Khatib, A., dan Hassan, M., 2022, Application of *Cosmos caudatus* Kunth. (Ulam Raja) Extract as Antibacterial Agent in Beef and Shrimp Meats, and its Sensory Evaluation, *International Food Research Journal*, 29:918–928.

- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., and Wang, X., 2012, Modern Analytical Techniques In Metabolomics Analysis, *Analyst*, 137:293-300.
- Zhang, G. B., Li, Q. Y., Chen, Q. L., and Su, S. B., 2013, *Network Pharmacology: A New Approach For Chinese Herbal Medicine Research*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 1-9.
- Zhou, G., Yang, J., & Song, P., 2019, Correlation of ERK/MAPK Signaling Pathway with Proliferation and Apoptosis of Colon Cancer Cells, *Oncology Letters*, 17:2266-2270.
- Zhuang, Y., Qin, K., Yang, B., Liu, X., Cai, B., and Cai, H., 2018, Prediction of The Targets of The Main Components In Blood After Oral Administration of Xanthii Fructus: a Network Pharmacology Study, *RSC advances*, 8:8870-8877.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman Kenikir



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU

Jl. Lahor 87 Kota Batu
Jl. Raya 228 Kejayan Kabupaten Pasuruan
Jl. Kolonel Sugiono 457 – 459 Kota Malang
Email : materiamedicabatu@jatimprov.go.id



Nomor : 000.9.3/ 7688/ 102.20/ 2024
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Kenikir**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : FARIDATUL AFIFAH
NIM/NIP/NIK : 210703110050
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kenikir

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae / Compositae
Genus : Cosmos
Spesies : *Cosmos caudatus* Kunth
Nama Daerah : Kenikir, curing (Indonesia), ulam rija (Melayu), kenikir (Jawa Tengah).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a-41b-42b-43a-44b-45a-46a:Compositae-1b-12a-13b-15a:Cosmos-14:*C. caudatus*.

2. Morfologi : *Habitus*: Perdu, tinggi 75-100 cm, bau khas. Batang: Tegak, segi empat, beralur membujur, bercabang banyak, muda berbulu, beruas, hijau keunguan. Daun: Majemuk, bersilang berhadapan, berbagi menyirip, ujung runcing, tepi rata, panjang 15-25 cm, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk bongkol, di ujung batang, tangkai panjang $\pm$ 25 cm, mahkota terdiri dari 8 daun mahkota, panjang $\pm$ 1 cm, merah, benang sari bentuk tabung, kepala sari coklat kehitaman, putik berambut, hijau kekuningan, merah. Buah: Keras, bentuk jarum, ujung berambut, masih muda hijau setelah tua coklat. Biji: Keras, kecil, bentuk jarum, panjang $\pm$ 1 cm, hitam. Akar: Tunggang, putih.

3. Nama Simplicia : Daun.

4. Penggunaan : Penelitian Tugas Akhir.

5. Daftar Pustaka

- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 13 November 2024

KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU



dr. RATNA YULIANTI, M.M.

Pembina Tk. I

NIP. 19710711 200012 2 002

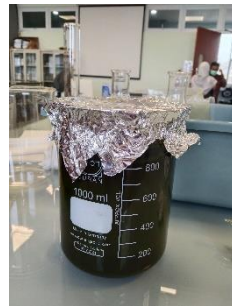
L.2.1 Preparasi Sampel

[illegible]

Penyerbukan Daun *Cosmos caudatus*

Serbuk Daun *Cosmos caudatus*

L.2.2 Ekstraksi



Persiapan ekstraksi UAE

Pemekatan ekstrak dengan instrumen *Rotary Evaporator*



Pengeringan ekstrak dalam oven

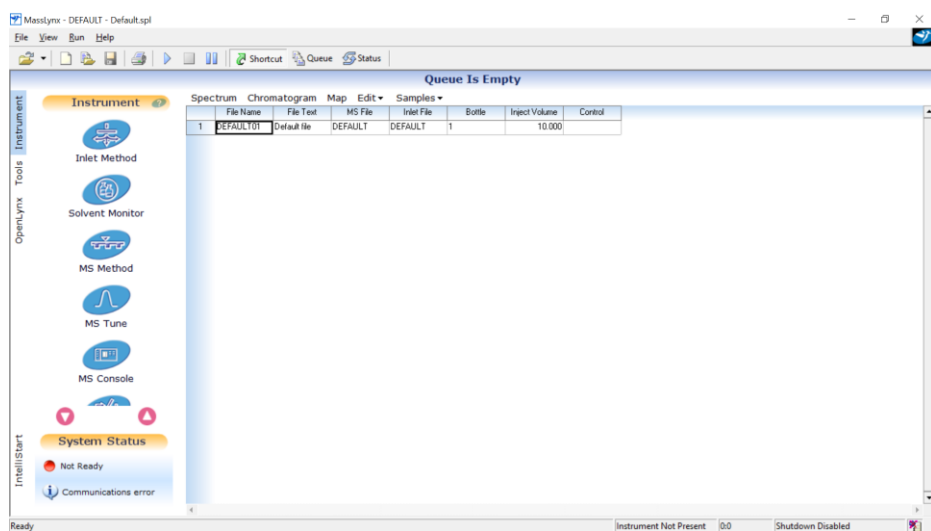
Penimbangan ekstrak kering

S1 Farmasi FKIK UN Maulana M Ibrahim
UJI ID Sample 03 Sm (Mn, 2x3)

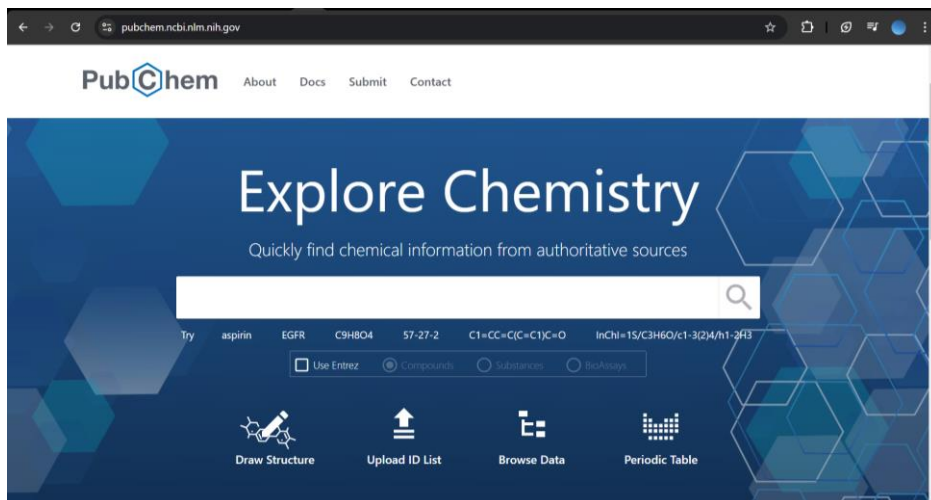
1: TOF MS ES+
BPI
8.53e5

Time	Height	Area	Area%
1.26	27716	7436.85	0.61
1.70	20994	4892.36	0.40
2.77	45106	17375.14	1.43
3.74	37792	9340.86	0.69
4.84	187158	43817.01	3.60
5.27	397790	143633.20	11.80
5.89	31521	8833.91	0.73
6.27	18429	4593.21	0.38
7.14	3582	1199.03	0.10
7.50	1608	342.04	0.03
8.18	8408	2144.64	0.18
8.71	2535	426.43	0.04
9.05	24880	4753.83	0.39
9.47	24133	5340.76	0.44
10.00	2031	333.04	0.03
10.70	11916	3291.76	0.27
11.28	3336	581.92	0.05
11.85	94436	28650.77	2.35
12.87	75425	13384.72	1.10
13.16	192401	49088.16	4.08
13.94	12106	3123.02	0.26
14.57	37746	9680.30	0.80
14.74	38441	9122.90	0.75
15.05	17404	3282.27	0.27
16.00	403946	251184.45	20.63
16.90	55518	9645.64	0.79
17.18	20741	2401.48	0.20
17.47	763746	165744.72	13.61
17.73	543070	165200.86	13.57
18.31	447614	124809.98	10.26
18.68	358425	124202.33	10.20

Kromatogram sampel hasil pemisahan UPLC-MS/MS



Software Masslynx V4.1



Database PubChem

L.2.4 Online Tools Prediksi Fisikokimia, Prediksi Toksisitas, dan Prediksi Bioaktivitas

The screenshot shows the pkCSM website (biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction). The page has a dark header with navigation links: Theory, Help, Contact, Acknowledgements, Related Resources, and a Login link. A news banner at the top mentions updates to pharmacokinetics and toxicity predictors. The main content area is titled "Pharmacokinetic properties" and includes a diagram of the prediction workflow. It features two input steps: Step 1, "Please provide a set of molecules (SMILES format)", with options to upload a file or provide a SMILES string (example: CCOC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)O); and Step 2, "Please choose the prediction mode", with a radio button selected for "Prediction of pharmacokinetic properties". A disclaimer box states that no molecule information will be retained.

Website Online Tools pkCSM

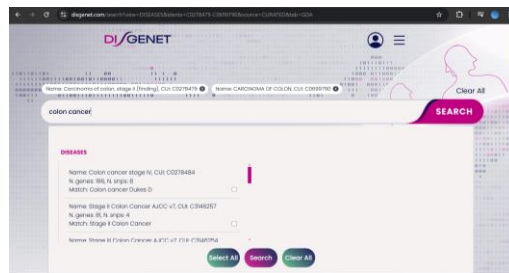
The screenshot shows the ProTox 3.0 website (tox.charite.de/protox3/index.php?site=compound_input). The header contains navigation icons for TOX PREDICTION, FAQ, MODEL INFO, STATISTICS, CONTACT, and LINKS/DOWNLOAD. The main section, "Tox-Prediction", includes a text input field for compound information and search buttons. Below the input fields, the "Selected molecule : Tamoxifen" is displayed with its chemical structure. The structure is a complex polycyclic aromatic hydrocarbon with a side chain.

Website Online Tools ProTox 3.0

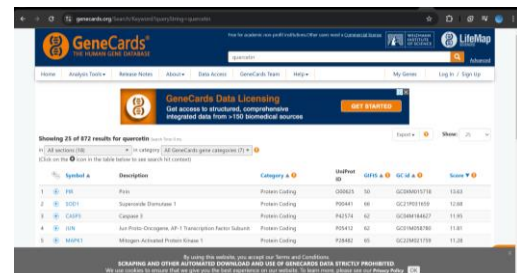
The screenshot shows the PASS Online website (way2drug.com/passonline/predict.php). The header features the "PASS online" logo and a user profile for Faridatul Afifah. Navigation links include Home, Definitions, Products, Services, FAQ, and Contacts. The main content area has three buttons: "Predict new compound", "View old results", and "View change profile". A red warning icon and text indicate that the page is for registered users only and that JavaScript must be enabled for the prediction tool to function.

Website Online Tools PASS Online

L2.5 Database GeneCards dan DisGeNet



Database DisGeNet

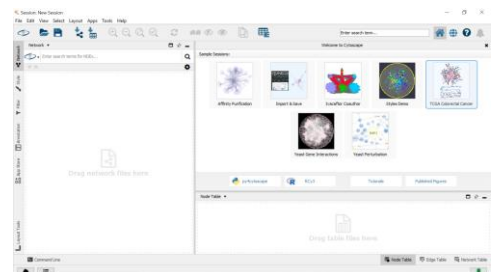


Database GeneCards

L2.X Visualisasi Gen Target *Cosmos caudatus* pada Kanker Kolon



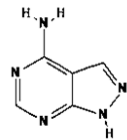
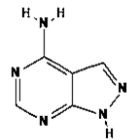
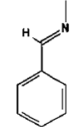
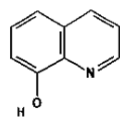
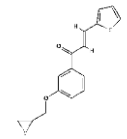
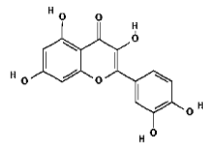
Website Online Tools Diagram Venn

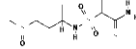
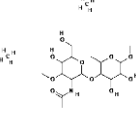
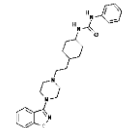
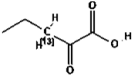
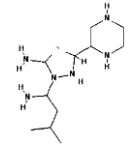
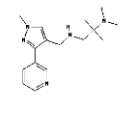
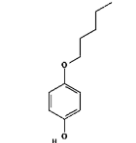


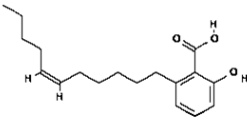
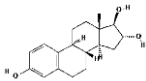
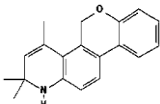
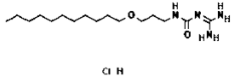
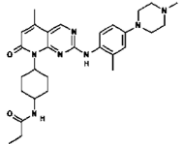
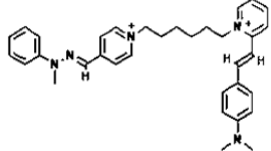
Cytoscape

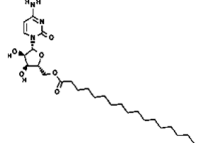
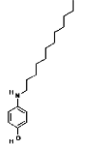
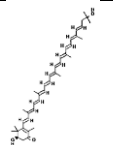
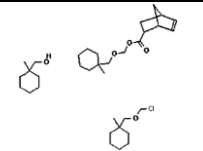
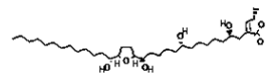
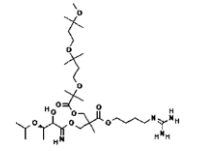
Lampiran 3 Tabel Hasil

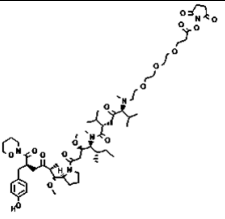
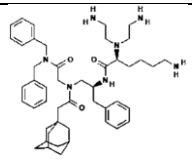
L.3.1 Tabel Interpretasi Hasil Pemrofilan Metabolit Sekunder dalam Daun *Cosmos caudatus*

No	RT	%Area	Measured Mass	Calculated Mass	Rumus Senyawa	Nama Senyawa	Golongan Senyawa	Struktur Senyawa
1	1.26	0.61	136.0625	136.0623	C ₅ H ₅ N ₅	1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine (CID 75420)	heterosiklik	
2	1.7	0.4	136.0627	136.0623	C ₅ H ₅ N ₅	Adenin (CID 190)	purin	
3	2.77	1.43	120.0816	120.0813	C ₈ H ₉ N	Methanamine, N-(phenylmethylene)- (CID 73954)	imina	
4	3.74	0.69	146.0611	146.0606	C ₉ H ₇ NO	Oxyquinoline (CID 1923)	heterosiklik aromatik.	
5	4.84	3.6	303.0511	303.0513	C ₁₆ H ₁₄ O ₂ S ₂	(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one (CID 162643273)	heterosiklik	
6	5.27	11.8	303.0508	303.0505	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin (CID 5280343)	flavonoid	

7	5.89	0.73	287.0556	287.0558	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₃ S ₃	2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide (CID 116250238)	thioamide	
8	6.27	0.38	428.2491	428.2496	C ₁₈ H ₃₇ NO ₁₀	N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide;methane (CID: 15798697)	glikosida amida	
9	7.14	0.1	464.2485	464.2484	C ₂₆ H ₃₃ N ₅ OS	trans-1-(4-(2-(4-(Benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea (CID: 86341996)	Heterosikli k nitrogen	
10	7.5	0.03	466.2651	466.2652	C ₂₁ H ₃₉ NO ₁₀	2-oxo(313C)pentanoic acid (CID 157463357)	asam karboksilat	
11	8.18	0.18	275.2011	275.2018	C ₁₁ H ₂₆ N ₆ S	3-(1-Amino-3-methylbutyl)-5-piperazin-2-yl-1,3,4-thiadiazolidin-2-amine (CID 171423867)	Heterosikli k nitrogen	
12	8.71	0.04	324.1955	324.1955	C ₁₆ H ₂₆ N ₅ Cl	2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-ylpyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride (CID: 47610537)	amina	
13	9.06	0.39	181.123	181.1229	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	4-(Pentyloxy)phenol (CID 29353)	fenol	

14	9.47	0.44	291.1965	291.196	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid (CID 155568001)	asam karboksilat	
15	10	0.03	289.1802	289.1804	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	Estriol (CID 5756)	steroid	
16	10.7	0.27	278.155	278.1545	C ₁₉ H ₁₉ NO	2,2,4-trimethyl-2,5-dihydro-1H-chromeno[3,4-f]quinoline (CID 23433683)	heterosiklik	
17	11.28	0.05	351.252	351.2527	C ₁₆ H ₃₅ N ₄ O ₂ Cl	1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypentyl)urea;hydrochloride (CID 21414680)	turunan urea	
18	11.85	2.35	518.3246	518.3243	C ₂₉ H ₃₉ N ₇ O ₂	N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propenamide (CID: 164624240)	heterosiklik	
19	12.57	1.1	520.3436	520.344	C ₃₄ H ₄₁ N ₅	N,N-dimethyl-4-[(E)-2-[1-[6-[4-[(E)-[methyl(phenyl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexyl]pyridin-1-ium-2-yl]ethenyl]aniline (CID: 58981448)	heterosiklik	

20	13.16	4.08	496.339	496.3387	C ₂₆ H ₄₅ N ₃ O ₆	[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate (CID: 22879529)	glikosida	
21	13.94	0.26	278.2485	278.2484	C ₁₈ H ₃₁ NO	4-(Dodecylamino)Phenol (CID 16043298)	fenol	
22	14.57	0.8	583.415	583.4151	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	Deinoxanthin (CID 16061289)	karotenoid	
23	14.74	0.75	583.4133	583.4129	C ₃₄ H ₅₉ O ₅ Cl	1-(Chloromethoxymethyl)-1-methylcyclohexane;(1-methylcyclohexyl)methanol;(1-methylcyclohexyl)methoxymethyl bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylate (CID: 157552081)	alkohol	
24	15.05	0.27	597.473	597.473	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Annonacin (CID 354398)	acetogenin	
25	16.09	20.63	663.4539	663.4544	C ₃₂ H ₆₂ N ₄ O ₁₀	4-(diaminomethylideneamino)butyl 2-[[[(3S)-2-hydroxy-3-propan-2-yloxybutanimidoyl]oxymethyl]-3-[2-[3-(3-methoxy-3-methylbutoxy)-3-methylbutoxy]-2-methylpropanoyl]oxy-2-methylpropanoate (CID: 142588235)	amida ester	

26	16.9	0.79	856.5248	856.5243	C37H73N7O1 5	unknown	unknown	unknown
27	17.16	0.2	1116.6698	1116.6696	C58H93N5O1 6	(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 3-[2-[2-[2- [[[(3S,6S)-6-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2- [(1R,2R,5R)-5-[(4- hydroxyphenyl)methyl]-1-methoxy-2- methyl-6-(oxazinan-2-yl)-3,6- dioxohexyl]pyrrolidin-1-yl]-3-methoxy-5- methyl-1-oxoheptan-4-yl]- methylcarbamoyl]-2,7-dimethyl-4- oxooctan-3-yl]- methylamino]ethoxy]ethoxy]ethoxy]prop anoate (CID: 146691570)	peptida	
28	17.47	13.61	954.6132	954.6127	C47H83N7O1 3	18-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(5S)-5-carboxy-5- [[3-[3-(1H-imidazol-5- yl)propanoylamino]-3-methyl-2- oxobutyl]amino]pentyl]amino]-2- oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-2- oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-18- oxooctadecanoic acid (CID 58954507)	asam karboksilat	
29	17.73	13.57	778.538	778.5384	C47H67N7O3	(2S)-N-[(2S)-1-[[2-(1-Adamantyl)acetyl]- [2-(dibenzylamino)-2-oxoethyl]amino]-3- phenylpropan-2-yl]-6-amino-2-[bis(2- aminoethyl)amino]hexanamide (CID: 138658209)	amida	
30	18.31	10.26	792.5624	792.5626	C45H77NO10	unknown	unknown	unknown
31	18.68	10.2	780.5537	780.554	C47H69N7O3	unknown	unknown	unknown

L.3.2 Tabel Hasil Prediksi Fisikokimia Senyawa Daun *Cosmos caudatus*

Nama Senyawa	Parameter Hukum Lima Lipinski						Memenuhi /Tidak
	MW (g/mol)	Log P	HBA	HBD	Torsion	PSA Å ²	
1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine	135.13	-0.0649	4	2	0	56.290	Memenuhi
Adenin	135.13	-0.0649	4	2	0	56.321	Memenuhi
Methanamine,N(phenylmethylene)-	119.167	1.7353	1	0	1	55.057	Memenuhi
Oxyquinoline	145.161	1.9404	2	1	0	64.127	Memenuhi
(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one	302.41	4.1384	4	0	6	126.021	Memenuhi
Quercetin	302.238	1.988	7	5	1	122.108	Memenuhi
2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide	286.444	-0.2625	4	2	7	104.677	Memenuhi
N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide;methane	427.491	-1.6454	10	5	6	171.399	Memenuhi
4-(Pentyloxy)phenol	180.247	2.9612	2	1	5	79.164	Memenuhi
2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid	290.403	4.9397	2	2	10	126.871	Memenuhi
2,2,4-trimethyl-2,5-dihydro-1H-chromeno[3,4-f]quinoline	277.36	3.70	1	1	0	21.26	Memenuhi
N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propanamide	517.67	4.33	5	2	7	95.39	Memenuhi

[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate	495.65	4.42	7	3	19	136.90	Memenuhi
1-(Chloromethoxymethyl)-1-methylcyclohexane;(1-methylcyclohexyl)methanol;(1-methylcyclohexyl)methoxymethyl bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylate	583.28	5.48	5	1	10	64.99	Tidak
4-(diaminomethylideneamino)butyl 2-[[[(3S)-2-hydroxy-3-propan-2-ylloxybutanimidoyl]oxymethyl]-3-[2-[3-(3-methoxy-3-methylbutoxy)-3-methylbutoxy]-2-methylpropanoyl]oxy-2-methylpropanoate	662.86	0.61	12	4	27	207.23	Tidak
18-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(5S)-5-carboxy-5-[[3-[3-(1H-imidazol-5-yl)propanoylamino]-3-methyl-2-oxobutyl]amino]pentyl]amino]-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-18-oxooctadecanoic acid (58954507)	954.20	-4.21	15	8	51	285.70	Tidak
(2S)-N-[(2S)-1-[[2-(1-	778.08	2.75	7	4	23	151.02	Tidak

adamantyl)acetyl]- [2- (dibenzylamino)-2- oxoethyl]amino]-3- phenylpropan-2- yl]-6-amino-2- [bis(2- aminoethyl)amino] hexanamide							
cyclohexanol;ethan e;(6E,8E,10E)-1- hydroxy-3,11- dimethyltrideca- 6,8,10-trien-2- one;(2S)-1-[2- [(2R)-2-hydroxy-3- methyloxan-2-yl]- 2- oxoacetyl]piperidin e-2-carboxylic acid;(E)-2- methylhept-2-enal	792.09	2.29	10	4	16	178.74	Tidak
(E)-4- (dimethylamino)- N-[1-[6-[N-[4-[[1- [(Z)- ethylideneamino]- 2H-pyridin-4- yl]oxy]-3- methylphenyl]-N'- [(E)-pent-1- enyl]carbamimidoy l]-2,5- dimethylpyridin-3- yl]oxybutan-2-yl]- N-(4- methylhexyl)but-2- enamide;prop-1- yne	780.10	4.50	7	1	23	94.89	Tidak
trans-1-(4-(2-(4- (Benzo[d]isothiazol -3-yl)piperazin-1- yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea	463.64	3.84	3	2	8	88.74	Memenuhi
3-(1-Amino-3- methylbutyl)-5- piperazin-2-yl- 1,3,4-	274.43	0.06	6	5	4	116.67	Memenuhi

thiadiazolidin-2-amine							
4-(Dodecylamino)Phenol	277.44	4.19	1	2	12	32.26	Memenuhi
2-oxo(313C)pentanoic acid	470.50	-2.16	11	3	13	187.36	Tidak
2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-yl)pyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride	323.86	1.06	4	1	6	45.98	Memenuhi
Estriol	288.38	2.65	3	3	0	60.69	Memenuhi
1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypentyl)urea;hydrochloride	350.93	2.58	3	3	16	102.73	Memenuhi
N,N-dimethyl-4-[(E)-2-[1-[6-[4-[(E)-[methyl(phenyl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexyl]pyridin-1-ium-2-yl]ethenyl]aniline	519.72	4.48	1	0	13	26.60	Tidak
Deinoxanthin	582.85	4.48	3	2	13	57.53	Tidak
Annonacin	596.88	3.46	7	4	26	116.45	Tidak
(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 3-[2-[2-[[[(3S,6S)-6-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R,5R)-5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-1-methoxy-2-methyl-6-(oxazinan-2-yl)-3,6-dioxohexyl]pyrrolidin-1-yl]-3-methoxy-5-methyl-	1116.38	-0.05	17	1	49	237.60	Tidak

1-oxoheptan-4-yl]-
methylcarbamoyle]-
2,7-dimethyl-4-
oxooctan-3-yl]-
methylamino]ethox
y]ethoxy]ethoxy]pr
opanoate

L.3.3 Tabel Hasil Prediksi Toksisitas Senyawa Daun *Cosmos caudatus*

No	Nama Senyawa	LD50 (mg/kg)	Kelas Toksisitas	Memenuhi / Tidak
1	1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine	900	4	Memenuhi
2	adenin	570	4	Memenuhi
3	Methanamine, N-(phenylmethylene)-	3080	5	Memenuhi
4	Oxyquinoline	280	3	Memenuhi
5	(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one	2652	5	Memenuhi
6	Quercetin	159	3	Memenuhi
7	2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide	2816	5	Memenuhi
8	N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide; methane	4000	5	Memenuhi
9	4-(Pentyloxy)phenol	2200	5	Memenuhi
10	2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid	1190	4	Memenuhi
11	N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propanamide	353	4	Memenuhi
12	[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate	826	4	Memenuhi
13	trans-1-(4-(2-(4-(Benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea	1530	4	Memenuhi

14	3-(1-Amino-3-methylbutyl)-5-piperazin-2-yl-1,3,4-thiadiazolidin-2-amine	600	4	Memenuhi
15	4-(Dodecylamino)Phenol	2410	5	Memenuhi
16	2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-ylpyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride	150	3	Memenuhi
17	Estriol	2000	4	Memenuhi
18	1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypentyl)urea;hydrochloride	400	4	Memenuhi

L.3.4 Tabel Prediksi aktivitas biologi tanaman *Cosmos caudatus* sebagai antikanker melalui *PASS Online*

No	Senyawa	Pa	Prediksi Potensi Biologis
1	1H-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-4-amine	0,727	Antineoplastic
2	adenin	0,704	Antineoplastic
3	Methanamine, N-(phenylmethylene)-	0,870 0,821	Antineoplastic (breast cancer)
4	Oxyquinolin	0,443 0,337 0,287 0,266	Antineoplastic Antineoplastic (breast cancer) Antineoplastic (colorectal cancer) Antineoplastic (colon cancer)
5	(E)-1-[3-(thiiran-2-ylmethoxy)phenyl]-3-thiophen-2-ylprop-2-en-1-one	0,807	Antineoplastic
6	Quercetin	0,887 0,797 0,757 0,717	Apoptosis agonist Antineoplastic Anticarcinogenic Chemopreventive
7	2-(4-Methylsulfinylbutan-2-ylsulfamoyl)propanethioamide	0,718	Chemoprotective
8	N-[2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-2-methyloxan-3-yl)oxy-5-hydroxy-6-	0,815	Antineoplastic

	(hydroxymethyl)-4-methoxyoxan-3-yl]acetamide;methane		
9	4-(Pentyloxy)phenol	0,377	Apoptosis agonist
10	2-hydroxy-6-[(Z)-undec-6-enyl]benzoic acid	0,338	Chemopreventive
11	N-[4-[5-methyl-2-[2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-8-yl]cyclohexyl]propanamide	0,535	Antineoplastic
12	[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl heptadecanoate	0,837 0,720	Anticarcinogenic Antineoplastic
13	trans-1-(4-(2-(4-(Benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)-3-phenylurea	-	-
14	3-(1-Amino-3-methylbutyl)-5-piperazin-2-yl-1,3,4-thiadiazolidin-2-amine	0,167 0,174	Antineoplastic Chemopreventive
15	4-(Dodecylamino)Phenol	0,268	Antineoplastic
16	2-N,2-N,2-trimethyl-1-N-[(1-methyl-3-pyridin-3-ylpyrazol-4-yl)methyl]propane-1,2-diamine;hydrochloride	0,411	Antineoplastic
17	Estriol	0,704	Antineoplastic
18	1-(Diaminomethylidene)-3-(3-undecoxypentyl)urea;hydrochloride	0,470	Antineoplastic

L.3.5 Tabel Daftar gen target senyawa *Cosmos caudatus* dari database *GeneCards*

A. Quercetin

No	Gene Symbol	Gifts	Relevance Score	No	Gene Symbol	Gifts	Relevance Score
1	PIR	50	13.63161087	23	PIK3CG	62	8.162027359
2	SOD1	66	12.68494034	24	CYP2A6	57	8.126267433
3	CASP3	62	11.94818115	25	GUSB	62	8.07450676
4	JUN	62	11.81277943	26	PTGS2	62	8.040488243
5	MAPK1	65	11.27885246	27	POLB	59	8.039110184
6	HSPA4	55	10.70914078	28	ANXA5	59	7.991092682
7	CYP1A1	59	10.12116718	29	CBR1	55	7.958477702
8	CAT	64	10.0722599	30	HSPA1A	59	7.919419289

9	NFKB1	66	9.931002617
10	OXA1L	50	9.847912788
11	NFE2L2	63	9.612125397
12	BCL2	63	9.574394226
13	MAPK8	62	9.530194283
14	ABCB1	64	9.007520676
15	BAX	64	8.918239594
16	MAPK14	63	8.813528061
17	XDH	60	8.791343689
18	TYR	61	8.543410301
19	BIRC5	58	8.480895042
20	NOS2	62	8.409674644
21	PARP1	63	8.38376236
22	LINC01672	19	8.165436745

31	CCND1	66	7.70627594
32	HIF1A	61	7.63229847
33	SP1	58	7.543210506
34	SIRT1	62	7.526864529
35	HSPA8	62	7.499624729
36	CTNNB1	66	7.475549698
37	ABCC2	61	7.382910252
38	AR	65	7.299987316
39	CYP3A4	61	7.284926414
40	CYCS	61	7.283372879
41	HSPB1	64	7.246095657
42	IL1B	60	7.184033394
43	HSP90AA1	64	7.183745384
44	HMOX1	65	7.052834034

B. Adenin

No	Gene Symbol	Gifts	Relevance Score
1	APRT	59	44.59012222
2	SLC25A4	61	23.26917267
3	FLAD1	52	21.01032257
4	SLC25A5	56	18.75383186
5	MUTYH	57	16.85260582
6	ADA	63	14.11428356
7	N6AMT1	43	13.785285
8	SLC25A6	53	13.14704227
9	XDH	60	12.78612137
10	LOC130059760	7	12.67956829
11	METTL4	42	11.87590885
12	PNP	62	10.84767246
13	CD38	59	10.36604309
14	ADK	63	10.23336697
15	TRMT61A	41	9.994449615
16	CYB5R3	57	9.954813004
17	ADCY10	55	9.94862175
18	TRMT61B	41	9.905222893
19	SLC25A31	46	9.699831963
20	HPRT1	61	9.42854023
21	GSR	62	9.17484951

No	Gene Symbol	Gifts	Relevance Score
22	LINC01672	19	8.880834579
23	POR	61	8.840109825
24	MTAP	62	8.775302887
25	METTL25B	38	8.723211288
26	CYBB	62	8.722302437
27	SLC43A3	45	8.635374069
28	ACYP2	50	8.363904953
29	GAPDH	63	8.15119648
30	MPG	52	8.032271385
31	EEF1AKMT1	43	7.8167243
32	AHCY	61	7.749072075
33	DIMT1	48	7.676121235
34	AR	65	7.675147533
35	METTL16	44	7.563487053
36	NQO1	60	7.485458374
37	NMNAT1	60	7.400120735
38	TFB1M	53	7.365900517
39	DUOX2	55	7.364719868
40	DUOX1	54	7.357014179
41	AK1	58	7.093976974
42	MTHFR	61	7.036543846

C. 1H-pyrazolo(3,4d)pyrimidin-4-amine

No	Gene Symbol	Gifts	Relevance Score
1	SRC	63	9.810925484

L.3.6 Daftar Gen Target Penyakit *Colon Cancer* dari *Database DisGeNet*

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease	No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	CEACAM5	0.2	cancer colon staged	1	BRAF	0.9	carcinoma of colon
2	CEACAM20	0.2	cancer colon staged	2	CTNNB1	0.85	carcinoma of colon
3	SMAD4	0.2	cancer colon staged	3	APC	0.85	carcinoma of colon
4	TRPV6	0.15	cancer colon staged	4	AKT1	0.85	carcinoma of colon
5	CDH1	0.15	cancer colon staged	5	TP53	0.85	carcinoma of colon
6	CHRNA3	0.1	cancer colon staged	6	PIK3CA	0.85	carcinoma of colon
7	RBP7	0.1	cancer colon staged	7	VEGFA	0.85	carcinoma of colon
8	ELAVL2	0.1	cancer colon staged	8	MLH1	0.85	carcinoma of colon
9	REM1	0.1	cancer colon staged	9	TYMS	0.8	carcinoma of colon
10	SH3KBP1	0.1	cancer colon staged	10	AXIN2	0.8	carcinoma of colon
11	MUC1	0.1	cancer colon staged	11	HPGD	0.8	carcinoma of colon
12	NHP2	0.1	cancer colon staged	12	CDH1	0.75	carcinoma of colon
13	NUDT21	0.1	cancer colon staged	13	PPARG	0.75	carcinoma of colon
14	DKC1	0.1	cancer colon staged	14	MSH2	0.75	carcinoma of colon
15	ERCC1	0.1	cancer colon staged	15	SMAD4	0.75	carcinoma of colon
16	PUF60	0.1	cancer colon staged	16	MSH6	0.75	carcinoma of colon
17	ITGA7	0.1	cancer colon staged	17	NRAS	0.75	carcinoma of colon
18	TACSTD2	0.1	cancer colon staged	18	KDR	0.75	carcinoma of colon
19	NFKB1	0.1	cancer colon staged	19	EPCAM	0.75	carcinoma of colon
20	BRAF	0.1	cancer colon staged	20	PMS2	0.75	carcinoma of colon
21	TIMP1	0.1	cancer colon staged	21	DCC	0.75	carcinoma of colon
22	SERPINB5	0.1	cancer colon staged	22	ATM	0.75	carcinoma of colon
23	MALAT1	0.1	cancer colon staged	23	CALR	0.75	carcinoma of colon
24	CDX2	0.1	cancer colon staged	24	BAX	0.7	carcinoma of colon

25	TPP1	0.1	cancer colon staged
26	COL1A2	0.1	cancer colon staged
27	GNB1	0.1	cancer colon staged
28	ANGPT2	0.1	cancer colon staged
29	IFNB1	0.1	cancer colon staged
30	MACC1	0.1	cancer colon staged

25	MUTYH	0.7	carcinoma of colon
26	BRCA1	0.7	carcinoma of colon
27	BRCA2	0.7	carcinoma of colon
28	FLT1	0.7	carcinoma of colon
29	DLC1	0.65	carcinoma of colon
30	PTPRJ	0.65	carcinoma of colon

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	KRAS	0.2	Carcinoma of colon,stage II
2	CDX2	0.2	Carcinoma of colon,stage II
3	CEACAM5	0.2	Carcinoma of colon,stage II
4	CEACAM20	0.2	Carcinoma of colon,stage II
5	PIK3CA	0.2	Carcinoma of colon,stage II
6	MIR21	0.2	Carcinoma of colon,stage II
7	VEGFA	0.2	Carcinoma of colon,stage II
8	MRC1	0.2	Carcinoma of colon,stage II
9	ERBB2	0.2	Carcinoma of colon,stage II
10	TYMS	0.2	Carcinoma of colon,stage II
11	WNT5A	0.2	Carcinoma of colon,stage II
12	BRAF	0.2	Carcinoma of colon,stage II

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	STAT3	0.35	Colitis Associated CRC
2	COL2A1	0.35	Colitis Associated CRC
3	IL22	0.25	Colitis Associated CRC
4	IL6	0.25	Colitis Associated CRC
5	TLR4	0.25	Colitis Associated CRC
6	NLRP3	0.25	Colitis Associated CRC
7	APC	0.25	Colitis Associated CRC
8	PIK3CG	0.25	Colitis Associated CRC
9	WNT6	0.25	Colitis Associated CRC
10	NFKB1	0.25	Colitis Associated CRC
11	TNF	0.25	Colitis Associated CRC
12	WNT1	0.25	Colitis Associated CRC

13	CD44	0.2	Carcinoma of colon,stage II
14	CDH17	0.1	Carcinoma of colon,stage II
15	CTNNB1	0.1	Carcinoma of colon,stage II
16	EGFR	0.1	Carcinoma of colon,stage II
17	DKK1	0.1	Carcinoma of colon,stage II
18	CD274	0.1	Carcinoma of colon,stage II
19	ITGB3	0.1	Carcinoma of colon,stage II
20	MIR200A	0.1	Carcinoma of colon,stage II
21	MMP11	0.1	Carcinoma of colon,stage II
22	ASPH	0.1	Carcinoma of colon,stage II
23	MUC2	0.1	Carcinoma of colon,stage II
24	WNT4	0.1	Carcinoma of colon,stage II
25	B2M	0.1	Carcinoma of colon,stage II
26	BCL2	0.1	Carcinoma of colon,stage II
27	STAT3	0.1	Carcinoma of colon,stage II
28	WNT3	0.1	Carcinoma of colon,stage II
29	AXIN2	0.1	Carcinoma of colon,stage II

13	CTNNB1	0.25	Colitis Associated CRC
14	WNT5A	0.25	Colitis Associated CRC
15	WNT2	0.25	Colitis Associated CRC
16	WNT3	0.25	Colitis Associated CRC
17	WNT7A	0.25	Colitis Associated CRC
18	WNT4	0.25	Colitis Associated CRC
19	WNT3A	0.25	Colitis Associated CRC
20	PIK3CA	0.25	Colitis Associated CRC
21	EGFR	0.25	Colitis Associated CRC
22	NFE2L2	0.25	Colitis Associated CRC
23	CARD9	0.25	Colitis Associated CRC
24	IL1B	0.25	Colitis Associated CRC
25	MTOR	0.25	Colitis Associated CRC
26	KRAS	0.25	Colitis Associated CRC
27	TNC	0.25	Colitis Associated CRC
28	PTGS2	0.25	Colitis Associated CRC
29	SPHK1	0.25	Colitis Associated CRC

30	PEBP1	0.1	Carcinoma of colon,stage II
----	-------	-----	-----------------------------

30	MMP9	0.25	Colitis Associated CRC
----	------	------	------------------------

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	KRAS	0.35	Colon cancer stage IV
2	VEGFA	0.25	Colon cancer stage IV
3	SMAD4	0.25	Colon cancer stage IV
4	PROM1	0.25	Colon cancer stage IV
5	VEGFC	0.25	Colon cancer stage IV
6	BRAF	0.2	Colon cancer stage IV
7	CEACAM5	0.2	Colon cancer stage IV
8	CEACAM20	0.2	Colon cancer stage IV
9	RABIF	0.2	Colon cancer stage IV
10	EGFR	0.2	Colon cancer stage IV
11	CD44	0.2	Colon cancer stage IV
12	TYMS	0.2	Colon cancer stage IV
13	REM1	0.2	Colon cancer stage IV
14	AKT1	0.2	Colon cancer stage IV
15	MTHFR	0.2	Colon cancer stage IV
16	TNFSF10	0.2	Colon cancer stage IV
17	CTNNB1	0.2	Colon cancer stage IV
18	ESR2	0.2	Colon cancer stage IV
19	MAPK1	0.2	Colon cancer stage IV
20	RYK	0.2	Colon cancer stage IV
21	TP53	0.2	Colon cancer stage IV
22	EGF	0.2	Colon cancer stage IV

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	APC	0.35	colonic neoplasm
2	TP53	0.35	colonic neoplasm
3	PTGS2	0.25	colonic neoplasm
4	VEGFA	0.25	colonic neoplasm
5	MLH1	0.25	colonic neoplasm
6	CTNNB1	0.25	colonic neoplasm
7	KRAS	0.25	colonic neoplasm
8	EGFR	0.25	colonic neoplasm
9	BRAF	0.25	colonic neoplasm
10	MYC	0.25	colonic neoplasm
11	NFKB1	0.25	colonic neoplasm
12	ATM	0.25	colonic neoplasm
13	MTOR	0.25	colonic neoplasm
14	TNF	0.25	colonic neoplasm
15	CCND1	0.25	colonic neoplasm
16	ERBB2	0.25	colonic neoplasm
17	BIRC5	0.25	colonic neoplasm
18	GAST	0.25	colonic neoplasm
19	JUN	0.25	colonic neoplasm
20	LEP	0.25	colonic neoplasm
21	LGR5	0.25	colonic neoplasm
22	IL1B	0.25	colonic neoplasm

23	EPHB1	0.2	Colon cancer stage IV
24	ERCC1	0.2	Colon cancer stage IV
25	TGFB2	0.2	Colon cancer stage IV
26	SCN5A	0.2	Colon cancer stage IV
27	MAPK3	0.2	Colon cancer stage IV
28	EPHB2	0.2	Colon cancer stage IV
29	CD274	0.15	Colon cancer stage IV
30	IL12RB2	0.15	Colon cancer stage IV

23	IFNG	0.25	colonic neoplasm
24	NOTCH1	0.25	colonic neoplasm
25	AXIN2	0.25	colonic neoplasm
26	BCL2	0.25	colonic neoplasm
27	MMP9	0.25	colonic neoplasm
28	MUTYH	0.25	colonic neoplasm
29	MKI67	0.25	colonic neoplasm
30	ICAM1	0.25	colonic neoplasm

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	MLH1	0.9	Malignant neoplasm of colon
2	APC	0.85	Malignant neoplasm of colon
3	BRAF	0.85	Malignant neoplasm of colon
4	PPARG	0.85	Malignant neoplasm of colon
5	MSH2	0.85	Malignant neoplasm of colon
6	AKT1	0.8	Malignant neoplasm of colon
7	PMS2	0.8	Malignant neoplasm of colon
8	BRCA1	0.8	Malignant neoplasm of colon
9	SRC	0.75	Malignant neoplasm of colon
10	CDH1	0.75	Malignant neoplasm of colon

No	Gene Symbol	GDA Score	Disease
1	CEACAM5	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
2	CEACAM20	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
3	KRAS	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
4	CDX2	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
5	PIK3CA	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
6	VEGFA	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
7	MIR21	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
8	MRC1	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
9	BRAF	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
10	ERBB2	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7

11	TGFB2	0.75	Malignant neoplasm of colon
12	MUTYH	0.75	Malignant neoplasm of colon
13	ATM	0.75	Malignant neoplasm of colon
14	CRIP1	0.75	Malignant neoplasm of colon
15	MAPK14	0.7	Malignant neoplasm of colon
16	CASP3	0.7	Malignant neoplasm of colon
17	IL10	0.7	Malignant neoplasm of colon
18	CYP24A1	0.65	Malignant neoplasm of colon
19	CHEK2	0.65	Malignant neoplasm of colon
20	CALR	0.65	Malignant neoplasm of colon
21	ACVR2A	0.65	Malignant neoplasm of colon
22	PTPRJ	0.65	Malignant neoplasm of colon
23	BIK	0.65	Malignant neoplasm of colon
24	CASP7	0.65	Malignant neoplasm of colon
25	ADA	0.65	Malignant neoplasm of colon
26	MRE11	0.65	Malignant neoplasm of colon
27	PRKAA1	0.65	Malignant neoplasm of colon

11	TYMS	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
12	CD44	0.2	Stage II Colon Cancer AJCC v7
13	CDH17	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
14	MLKL	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
15	GUCY2C	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
16	KCNQ1	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
17	LAG3	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
18	LGALS3	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
19	MMP11	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
20	ASPH	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
21	MUC2	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
22	WNT2	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
23	WNT3A	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
24	CEL	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
25	WASIR2	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
26	AGPAT1	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
27	ABCA1	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7

28	BRD4	0.6	Malignant neoplasm of colon
29	POLE	0.6	Malignant neoplasm of colon
30	ARID1A	0.6	Malignant neoplasm of colon

28	EGFR	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
29	APC	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7
30	IL1RN	0.1	Stage II Colon Cancer AJCC v7

No	<i>Gene Symbol</i>	<i>GDA Score</i>	<i>Disease</i>
1	KRAS	0.3	Stage III Colon Cancer AJCC v7
2	BRAF	0.3	Stage III Colon Cancer AJCC v7
3	CEACAM5	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
4	CEACAM20	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
5	TYMS	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
6	DPYD	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
7	PIK3CA	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
8	TP53	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
9	ERCC1	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
10	CDX2	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
11	REM1	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
12	RABIF	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
13	VEGFA	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7

No	<i>Gene Symbol</i>	<i>GDA Score</i>	<i>Disease</i>
16	CDO1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
17	PRAME	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
18	NUTM1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
19	MACC1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
20	IGF1R	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
21	INS	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
22	MRC1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
23	MUC2	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
24	IL23A	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
25	CEMIP	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
26	SPP1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
27	TIMP1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
28	TOP1	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7

14	MTHFR	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7
15	CEL	0.2	Stage III Colon Cancer AJCC v7

29	MACRO D2	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7
30	TNFRSF1 0C	0.1	Stage III Colon Cancer AJCC v7