

BAB 2

TINJAUAN TEORITIS

2.1 Kajian Pustaka

2.1.1 Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Belimbing wuluh atau yang populer dikenal dengan nama “belimbing sayur” atau “belimbing asam” ini kabarnya berasal dari Kepulauan Maluku, Indonesia dan daratan Malaya (Hapsari, 2022). Belimbing wuluh dikenal dengan banyak nama di berbagai daerah, misalnya belimbing asem, calincing (Sunda), limeng (Aceh), balimbingan (Batak), malimbi (Nias), calene (Bugis), bhalimbing bulu (Madura) (Karo-karo et al., 2024). Secara empirik, belimbing wuluh umumnya mudah dijumpai di pekarangan, oleh masyarakat umum sering dimanfaatkan sebagai sayur, obat tradisional dan beberapa menggunakannya sebagai hiasan karena memiliki bunga yang indah (Silalahi, 2021). Hal tersebut menjadikan belimbing wuluh sebagai salah satu jenis tanaman yang banyak diperjual-belikan di berbagai nurseri (Silalahi & Sihotang, 2019)

Tanaman belimbing wuluh memiliki habitus berupa pohon dengan tinggi berkisar 3–10 meter serta batang bercabang banyak seperti yang tertera pada gambar 2.1 dan gambar 2.2 (A). Daunnya tersusun majemuk dengan tipe imparipinnatus dan tersusun berseling pada ranting (gambar 2.2B). Rangkaian daun memiliki panjang 30–60 cm, sedangkan anak daun berbentuk lanset hingga lonjong dengan ujung meruncing dan pangkal tumpul (Setyawan et al., 2021). Bunga belimbing wuluh berkelamin ganda, bersimetri banyak, dengan kelopak berwarna merah kekuningan hingga ungu (gambar 2.2C). Buahnya berbentuk silindris, berukuran hingga 10 cm panjangnya dan 5 cm lebarnya, berwarna hijau muda ketika masih muda, kemudian berubah menjadi kuning dengan tekstur lunak ketika matang (gambar 2.2D) (Silalahi & Mustaqim, 2020).

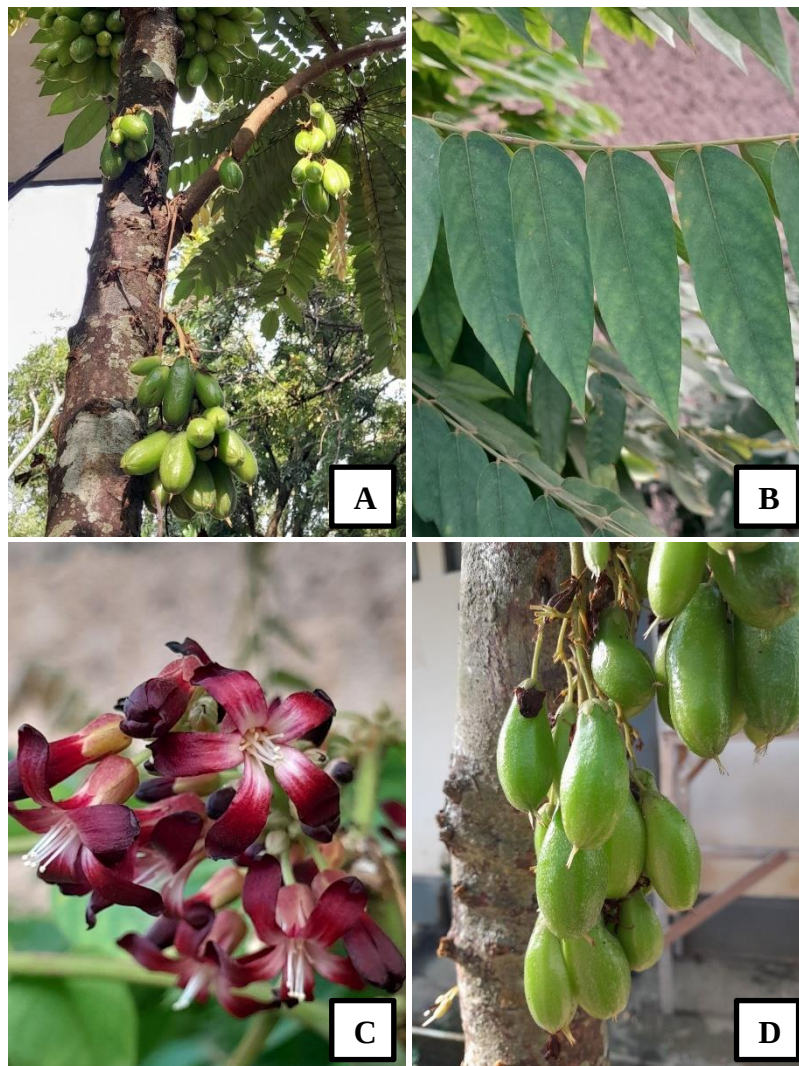
Adapun klasifikasi belimbing wuluh menurut (*Global Biodiversity Information Facility/GBIF*, 2023) adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Division : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida

Order : Oxalidales
Famili : Oxalidaceae
Genus : *Averrhoa*
Species : *Averrhoa bilimbi* L.



Gambar 2. 1 Pohon Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)



Gambar 2. 2 Morfologi Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.): A) Batang; B) Daun; C) Bunga; D) Buah
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

2.1.1.1 Senyawa Metabolit Sekunder Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Dalam penelitian ini, bagian tanaman yang digunakan adalah daun karena daun merupakan organ utama fotosintesis sekaligus lokasi penting biosintesis berbagai metabolit sekunder yang berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap cekaman lingkungan, sinar ultra violet, maupun patogen (Nabillah & Chatri, 2024). Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa daun memiliki keragaman senyawa metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan organ

tanaman lainnya seperti batang dan akar (Pardede et al., 2025). Daun belimbing wuluh sendiri diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tanin, sulfur, asam format, peroksidase, kalsium oksalat dan kalium sitrat yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif. Selain itu, daun belimbing wuluh juga telah banyak diteliti memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antioksidan, hingga antibakteri, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai bahan obat alami (Ismail et al., 2025; Mustiqawati & Supardi, 2022).

Senyawa metabolit sekunder adalah salah satu aspek penting yang menjadikan tumbuhan dapat berpotensi sebagai obat. Senyawa ini memang bukan bagian dari proses metabolisme primer tumbuhan, tetapi berperan penting dalam mekanisme pertahanan diri, interaksi dengan lingkungan, maupun adaptasi fisiologis (Jan et al., 2021). *Averrhoa bilimbi* L. atau yang dikenal sebagai belimbing wuluh/belimbing sayur juga diketahui mengandung berbagai senyawa metabolit primer dan sekunder yang berpotensi besar sebagai bahan obat alami. Salah satu hasil penelitian menyebutkan bahwa 70% ekstrak etanol dari daun belimbing wuluh mengandung beberapa jenis senyawa kimia yang meliputi alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida (Hasanah & Novian, 2020).

Berbagai senyawa bioaktif pada daun belimbing wuluh juga telah banyak diteliti aktivitas farmakologisnya. Penelitian lain oleh (Yanti & Vera, 2019) melalui uji fitokimia mengungkapkan bahwa ekstrak kasar metanol daun belimbing wuluh mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, polifenol, terpenoid maupun steroid, pada fraksi n-heksana mengandung flavonoid dan steroid, dan fraksi etil asetat mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol dan steroid. Flavonoid sendiri dikenal sebagai antioksidan kuat yang berperan sebagai penangkap radikal bebas, pengkelat logam, dan penghambat oksidasi lemak (Setyawan et al., 2021). Aktivitas tersebut berhubungan dengan struktur flavonoid yang memiliki gugus hidroksil pada karbon ketiga, ikatan rangkap antara karbon kedua dan ketiga, gugus karbonil pada posisi karbon keempat, serta gugus polihidroksil pada cincin aromatik A dan B (Hasim et al., 2019). Mekanisme flavonoid sebagai antikanker dilakukan melalui penghambatan proliferasi tumor atau kanker dengan cara

menginhibisi aktivitas protein kinase dan reseptor tirosin kinase, sehingga dapat menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke inti sel yang berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Selain itu, flavonoid juga berfungsi dalam mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Rahimah et al., 2019).

Penelitian lain yang dilakukan oleh (Santi & Candra, 2023) menunjukkan keberadaan senyawa alkaloid dalam ekstrak daun belimbing wuluh melalui skrining fitokimia. Uji fitokimia alkaloid dilakukan dengan melarutkan 100 g ekstrak etanol dalam 50 ml etanol 90%, kemudian diuapkan 2 ml larutan uji hingga diperoleh residu dan ditambahkan 5 ml HCl 2N. Larutan tersebut dibagi ke dalam tiga tabung reaksi, masing-masing ditetesi pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner, yang menghasilkan endapan kuning, jingga, serta cokelat muda hingga kuning, sehingga mengonfirmasi adanya alkaloid. Alkaloid dan turunannya memiliki berbagai aktivitas farmakologis, di antaranya sebagai antikanker melalui penargetan replikasi DNA atau sintesis protein dalam mekanisme kerja sel tumor yang menyebabkan terjadinya apoptosis sel neoplastik (Adelya et al., 2022).

Penelitian yang dilakukan oleh (Hasim et al., 2019) mengukur aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun belimbing wuluh menggunakan metode DPPH, yang prinsip kerjanya adalah mereduksi radikal bebas oleh senyawa antioksidan. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 50,36 ppm, sedangkan fraksi eter sebesar 44,01 ppm. Aktivitas ini menegaskan bahwa daun belimbing wuluh berpotensi sebagai sumber antioksidan alami yang mampu menangkal radikal bebas. Hal ini penting karena radikal bebas yang terbentuk secara alami dalam metabolisme, jika berlebihan dan tidak terkendali, dapat memicu kerusakan oksidatif pada sel serta meningkatkan risiko penyakit seperti arteriosklerosis, gagal jantung, ataupun kanker (Rahimah et al., 2019). Berikut ini beberapa hasil penelitian yang mengungkap kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (tabel 2.1).

Tabel 2. 1 Senyawa Metabolit Sekunder Daun Belimbing Wuluh dari Beberapa Referensi Utama

No.	Penulis dan Tahun Publikasi	Ringkasan Hasil Penelitian
1.	(Nair et al., 2016)	Hasil skrining fitokimia menggunakan metode aluminium klorida dan pembanding rutin pada panjang gelombang 367 nm melalui UV spectrophotometer dari daun dan buah <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, dan fenol dalam daun belimbing wuluh. Kandungan flavonoid total pada ekstrak etanolik daun sebesar $47 \pm 1,2$ µg/g.
2.	(Ahmed et al., 2018)	Uji LC-QTOF-MS/MS dari ekstrak daun <i>Averrhoa bilimbi</i> L. mengidentifikasi keberadaan senyawa Afzelechin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, Cucumerin A, dan senyawa metabolit sekunder lain dengan aktivitas antioksidan yang kuat dan divalidasi dengan menggunakan pendekatan <i>molecular docking</i> .
3.	(A. K. Sari et al., 2019)	Hasil uji kualitatif ekstrak etanol 96% daun <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan hasil positif flavonoid ditandai dengan perubahan warna hijau kehitaman (FeCl_3) dan kuning kecoklatan (Pb-asetat). Uji kuantitatif pada panjang gelombang maksimum 412 nm menunjukkan kadar flavonoid total sebesar 42,865 mg/L.
4.	(Hasim et al., 2019)	Ekstrak etanol 70% daun <i>Averrhoa bilimbi</i> L. mengandung saponin, tanin, steroid, flavonoid, dan alkaloid. Total fenolik tercatat 9,03 µg GAE/mg dan total flavonoid 97,28 µg QE/mg. Uji

		DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat.
5.	(Ryan et al., 2019)	Hasil pengujian kromatografi lapis tipis dan skrining fitokimia daun <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan bahwa ekstrak dari konsentrasi etanol 70% memiliki kandungan total flavonoid (TFC) sebesar 64.81 mg RTE/g ekstrak dan total fenolik (TPC) sebesar 119.47 mg GAE/g ekstrak. Hasil skrining fitokimia dari ekstrak menunjukkan keberadaan beberapa kelas senyawa utama, yaitu flavonoid, fenolik, alkaloid, saponin, dan steroid, pada semua konsentrasi larutan etanol yang diuji (50%, 70%, dan 96%).
6.	(Yanti & Vera, 2019)	Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun belimbing wuluh menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, saponin, polifenol, dan terpenoid/steroid. Setiap fraksi pelarut (n-heksana, etil asetat, dan metanol) memperlihatkan distribusi senyawa berbeda, mengindikasikan keanekaragaman metabolit sekunder dalam daun belimbing wuluh.
7.	(Pramiastuti et al., 2020)	Hasil skrining fitokimia ekstrak daun belimbing wuluh (meliputi uji flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan uji kromatografi lapis tipis/KLT) menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin.
8.	(Wong et al., 2020)	Hasil uji <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Orbitrap Mass Spectrometry</i> (UHPLC-ESI-

		Orbitrap MS) dari ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.) menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, triterpenoid, asam lemak, serta senyawa fenolik yang berperan dalam aktivitas antioksidan.
9.	(Arifin & Jumal, 2021)	Hasil uji fitokimia serta aktivitas antioksidan menggunakan DPPH dan FRAP dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh mengandung TPC (<i>Total Phenolic Content</i>) (126,4 mg/g GAE) dan TFC (<i>Total Flavonoid Content</i>) (32,80 mg/g QE), serta aktivitas antioksidan kuat (IC_{50} DPPH 0,0019 dan FRAP 41,81 mg/g GAE). Korelasi positif ($r=1$) antara kandungan fenol-flavonoid dan kapasitas antioksidan menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh kaya akan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan fenolik.
10.	(Hamzah et al., 2021)	Hasil uji GC-MS fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun <i>Averrhoa bilimbi</i> L. mengidentifikasi keberadaan squalene, phytol, delta tocopherol, hexadecanoic acid, dan beberapa senyawa metabolit sekunder lain yang berpotensi berperan dalam aktivitas antioksidan maupun antikanker.
11.	(Iwansyah et al., 2021)	Hasil uji sifat fisikokimia dan analisis menggunakan metode DPPH serta FTIR dari daun <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan bahwa kandungan fenol total sebesar 53,55 mg GAE/g, flavonoid 29,71 mg QE/g, dan aktivitas antioksidan tertinggi (82,82 mg GAE/g). Analisis FTIR menegaskan adanya gugus fenolik yang berperan dalam

		aktivitas antioksidan dan antibakteri.
12.	(Prabhu et al., 2021)	Hasil uji <i>preliminary phytochemical screening</i> daun <i>Averrhoa bilimbi</i> yang diekstraksi dengan etanol menunjukkan keberadaan flavonoid, sterol, triterpenoid, asam lemak, dan karbohidrat.
13.	(Atiyah et al., 2022)	Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun <i>Averrhoa bilimbi</i> L. menunjukkan keberadaan alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, glikosida, karbohidrat, dan tanin.
14.	(Garg et al., 2022)	Hasil uji fitokimia pada daun <i>Averrhoa bilimbi</i> L. melalui dua metode (<i>ultrasound-assisted extraction</i> (UAE) dan maserasi) menunjukkan bahwa daun <i>A. bilimbi</i> mengandung berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid, tanin, glikosida jantung, dan karbohidrat, sementara hasil isolasi lanjutan dari ekstrak metanol dan etil asetat berhasil mengidentifikasi senyawa spesifik seperti squalene, phytol, serta berbagai turunan asam sinamat dan loliolide.
15.	(Fatmawati et al., 2023)	Dari uji fitokimia (uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji triterpenoid, uji steroid, dan uji tanin) pada ekstrak etanol daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.) diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol dari daun belimbing wuluh positif teridentifikasi senyawa flavonoid, saponin, steroid, dan tanin/polifenol.
16.	(Fernandes et al., 2023)	Hasil uji fitokimia menggunakan metode Harborne dari ekstrak etanolik daun <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan adanya senyawa fitosterol

		dan flavonoid dalam ekstrak, yang berkontribusi terhadap penurunan signifikan kadar enzim hati (ALT, AST, ALP) dan total bilirubin dibandingkan kelompok kontrol.
17.	(Hublikar et al., 2023)	Hasil karakterisasi menggunakan UV-visible, FT-IR spectroscopies, XRD, dan analisis SEM dari ekstrak daun <i>Averrhoa bilimbi</i> menunjukkan peran sebagai agen pereduksi dan penstabil nanopartikel berkat kandungan metabolit sekundernya seperti fenolik, triterpenoid, alkaloid, steroid, karbohidrat, dan tanin.
18.	(Siregar et al., 2023)	Uji skrining fitokimia daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.) mendapatkan hasil bahwa dalam daun belimbing wuluh positif mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid pada masing-masing hasil pengeringan.
19.	(Fauzi et al., 2024)	Hasil uji GC-MS dan uji bioaktivitas (in vitro browning adiposit) fraksionasi hexane daun belimbing wuluh mendapatkan hasil bahwa senyawa squalene dilaporkan secara eksplisit teridentifikasi dalam komponen fraksi hexane dan diuji sebagai senyawa aktif.
20.	(Serli et al., 2024)	Hasil uji fitokimia dan kromatografi lapis tipis (KLT) dari ekstrak metanol daun belimbing wuluh menunjukkan kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin, dengan flavonoid dan alkaloid sebagai komponen dominan yang berpotensi mendukung aktivitas antioksidan dan sitotoksik.
21.	(Alfiraza et al., 2025)	Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.) menggunakan

		metode <i>Ultrasonic-Assisted Extraction</i> (UAE) yang diikuti dengan analisis <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry</i> (UHPLC-HRMS) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh positif mengandung berbagai golongan metabolit sekunder, seperti Fluorescein Methyl ester dan beberapa senyawa lain yang termasuk asam amino, terpenoid, fenolik, alkaloid, lipid, serta beberapa turunan asam lemak.
22.	(Jasmine et al., 2025)	Hasil skrining fitokimia simplisia maupun ekstrak etanol daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.) menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin, serta triterpenoid/steroid.
23.	(Nadhifah & Mulia, 2025)	Hasil uji fitokimia kualitatif dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (meliputi uji fenol, flavonoid, alkaloid, saponin, dan steroid) menunjukkan hasil positif pada senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, steroid, namun negatif pada saponin untuk ekstrak daun belimbing wuluh.

Berdasarkan berbagai sumber literatur yang tercantum pada tabel 1 di atas dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh terbukti mengandung sejumlah senyawa metabolit sekunder seperti Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O-alpha-L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester. Ekstrak yang paling banyak diteliti antara lain pelarut metanol, etanol, dan etil asetat dengan berbagai metode pengujian. Beberapa pengujian yang dilakukan di antaranya *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry* (UHPLC-HRMS), *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS), *Liquid Chromatography–*

Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (LC-QTOF-MS/MS), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan skrining fitokimia.

Berdasarkan kajian literatur yang dilakukan, terdapat lima senyawa metabolit sekunder utama yang berhasil diidentifikasi dari daun belimbing wuluh dan dipilih sebagai senyawa uji dalam penelitian ini. Pertama, squalene, merupakan senyawa triterpenoid yang memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker melalui mekanisme apoptosis dan penghentian siklus sel pada fase G1 yang melibatkan pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma dan aktivasi caspase-3 (Bidooki et al., 2024). Dalam penelitian lain, squalene terbukti berpotensi sebagai imunomodulator antitumor dengan cara menghambat jalur *NF- κ B signaling pathway*, sehingga menurunkan infiltrasi sel-sel imunosupresif seperti *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSCs) dan *Tumor-Associated Macrophages* (TAMs) ke dalam lingkungan mikro tumor, sehingga meningkatkan proporsi sel CD8⁺ T yang bersifat antitumor dan menekan pertumbuhan sel kanker (Pan et al., 2024).

Kedua, δ -Tocopherol, merupakan salah satu bentuk vitamin E yang secara ilmiah berpotensi menghambat perkembangan kanker payudara melalui mekanisme peningkatan ekspresi PPAR γ yang kemudian menurunkan ekspresi ER- α , dan induksi Nrf2 yang berperan mengurangi stres oksidatif, serta penghambatan proliferasi sel disertai induksi apoptosis (Smolarek & Suh, 2011). Ketiga, Cucumerin A, merupakan senyawa flavon-C-glikosida yang berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker (termasuk kanker payudara) melalui aktivitas sitotoksik yang berkaitan dengan penghambatan enzim topoisomerase II α dan cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), sebagaimana ditunjukkan oleh senyawa flavon-C-glikosida lain pada sel MCF-7 (Abdelrahim et al., 2023). Keempat, Afzelechin 3-O- α -L-rhamnopyranoside, merupakan golongan senyawa flavan-3-ol yang berpotensi menghambat perkembangan kanker payudara melalui aktivitas antiproliferatif dan induksi apoptosis pada sel kanker yang berkaitan dengan keberadaan gugus hidroksil pada cincin fenolik (Braicu et al., 2011). Kelima, dalam penelitian mengungkap bahwa turunan Fluorescein berpotensi sebagai agen antikanker melalui mekanisme *photodynamic therapy* (PDT) dengan

menghasilkan *singlet oxygen* ($^1\text{O}_2$) yang menyebabkan kerusakan lisosom sel tumor (Liu et al., 2019).

Meskipun kelima senyawa tersebut telah diidentifikasi dari daun belimbing wuluh dan memiliki potensi aktivitas antikanker secara umum, hingga saat ini belum terdapat penelitian yang secara khusus mengkaji interaksi molekuler kelima senyawa tersebut terhadap reseptor estrogen alfa (ER- α) sebagai target utama kanker payudara melalui pendekatan *molecular docking*. Kesenjangan inilah yang menjadi landasan dilakukannya penelitian ini.

2.1.2 Kanker Payudara

Kanker merupakan golongan penyakit yang kemunculannya ditandai dengan pertumbuhan serta penyebaran sel-sel abnormal yang tidak terkendali (Adelya et al., 2022). Kanker payudara atau yang disebut juga dengan “*Carcinoma Mammæ*” adalah sebuah tumor (benjolan abnormal) ganas yang tumbuh dalam jaringan payudara. Tumor ini dapat tumbuh dalam kelenjar susu, saluran kelenjar, serta jaringan penunjang payudara (seperti jaringan lemak ataupun jaringan ikat payudara). Penyebaran tumor ini dapat cukup meluas hingga ke bagian lain di seluruh tubuh. Penyebaran tersebut dikenal sebagai metastase (Ketut & Kartika, 2022).

Di Indonesia, kanker payudara menempati peringkat pertama dengan jumlah kasus terbanyak sekaligus menjadi salah satu penyebab kematian tertinggi akibat kanker (Kemenkes RI, 2022). Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* (Globocan) tahun 2022, tercatat sebanyak 66.271 kasus kanker payudara di Indonesia dengan angka kematian mencapai 22.598 jiwa, menjadikannya jenis kanker dengan prevalensi tertinggi dan tingkat mortalitas tertinggi ketiga di tanah air (International Agency for Research on Cancer, 2022). Angka kejadian kanker payudara tertinggi terdapat pada rentang usia 40-49 tahun, karena pada rentang usia ini terjadi penurunan kadar hormon estrogen pada wanita (Nurrohmah et al., 2022). Beberapa faktor yang diketahui paling berperan penting dalam kejadian kanker payudara di antaranya adalah faktor genetik, lingkungan, dan gaya hidup (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

2.1.2.1 Patofisiologi kanker payudara

Patofisiologi kanker payudara merupakan proses *multistage*, dimana setiap tahap berkaitan dengan satu atau lebih mutasi tertentu di gen regulator mayor atau minor. Sel mioepitel dan sel sekretorik lumen merupakan dua jenis sel utama yang umumnya terdapat pada kanker payudara orang dewasa. Secara klinis dan histopatologis, terdapat berbagai tahapan morfologis menuju keganasan (tabel 2). Pada tahap awal terjadi hiperplasia duktal, yang ditandai proliferasi sel epitel poliklonal yang persebarannya tidak merata, pola kromatin dan bentuk nukleus yang tumpang tindih serta lumen duktus yang tidak teratur. Kondisi ini biasanya menjadi tanda awal terjadinya keganasan. Sel-sel tersebut memiliki sitoplasma yang relatif sedikit dengan batas sel yang tidak jelas, meskipun secara sitologis masih tergolong jinak. Secara klinis, perkembangan kanker payudara ditandai dengan perubahan dari hiperplasia menuju hiperplasia atipik (klonal), yang memiliki ciri sitoplasma dan inti sel lebih jelas dan tidak tumpang tindih, serta lumen duktus yang lebih teratur (Sjamsuhidajat & Jong, 2017).

Setelah tahap hiperplasia atipik, proses berlanjut menjadi karsinoma in situ, baik tipe duktal maupun lobular. Karsinoma in situ terjadi proliferasi sel yang menyerupai keganasan, tetapi belum menginvasi stroma ataupun menembus membran basal. Karsinoma in situ lobuler umumnya menyebar ke seluruh jaringan payudara (bahkan bilateral), dan sering kali tidak dapat teraba atau terdeteksi secara klinis. Sementara itu, karsinoma in situ duktal memperlihatkan variasi morfologi yang beragam karena merupakan lesi segmental pada duktus yang dapat diklasifikasikan lebih lanjut. Setelah sel tumor menembus membran basal dan menginvasi stroma, tumor berkembang secara invasif serta dapat menyebar melalui aliran darah (hematogen) maupun sistem getah bening (limfogen), sehingga dapat menyebabkan metastasis ke organ lain (Sjamsuhidajat & Jong, 2017). Berikut ini merupakan klasifikasi hispatologis kanker payudara (tabel 2.2).

Tabel 2. 2 Klasifikasi Hispatologis Kanker Payudara

Patologi prainvasif	Hiperplasia atipik
Patologi karsinoma in situ	<i>Lobular carcinoma in situ</i> (LCIS)
	LCIS pleomorfik
	<i>Ductal carcinoma in situ</i> (DCIS)

	Penyakit Paget puting	
Patologi karsinoma invasif	<i>Invasive ductal carcinoma</i>	
	<i>Invasive lobular carcinoma</i>	
	Bentuk khusus lain:	Karsinoma tubuler
		Karsinoma kribiformis
		Karsinoma meduler
		Karsinoma musinosus
		Karsinoma apokrin
		Karsinoma mikropapiler
		Karsinoma metaplastik
		<i>Mammary carcinoma with osteoclast-like giant cell</i>
		Karsinoma sekretorik
		Karsinoma neuroendokrin
		Karsinoma sistik adenoid
		Karsinoma inflamatorik
		Sarkoma floides
		Sarkoma
		Angiosarkoma

Sumber: (Sjamsuhidajat & Jong, 2017)

American Joint Committee on Cancer (AJCC) memberlakukan penentuan tingkat keganasan atau stadium kanker dengan mengamati 3 indikator TNM, yaitu T = tumor primer, N = node regional, M = metastasis jauh (Tabel 2.3 – Tabel 2.5). Klasifikasi stadium anatomi klinis kanker payudara dilakukan untuk menilai tingkat penyebaran penyakit berdasarkan ukuran dan invasi tumor primernya (Tis–T4), keterlibatan kelenjar getah bening regional (N0–N3), serta adanya metastasis jauh (M0–M1). Kombinasi ketiga parameter tersebut menghasilkan penentuan stadium anatomi keseluruhan (0–IV) yang berfungsi sebagai indikator prognosis klinis (Tabel 2.3 – Tabel 2.6). Pasien dengan kanker yang masih terbatas pada jaringan payudara memiliki prognosis yang baik dengan tingkat kelangsungan hidup lima tahun sekitar 98,9%, sedangkan pasien dengan kanker metastatik jauh memiliki prognosis buruk dengan tingkat kelangsungan hidup hanya sekitar 26,9% (Kalli et al., 2018).

Tabel 2. 3 Klasifikasi Tumor Primer (T)

T Kategori	T Kriteria
TX	Tumor primer tidak dapat dievaluasi
T0	Tidak ada tumor primer
Tis	Tumor primer in situ

T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm ≤ 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor dengan eksistensi langsung pada dinding dada dan/atau kulit

Sumber: (Ketut & Kartika, 2022)

Tabel 2. 4 Klasifikasi Kelenjar Getah Bening (KGB) Regional (N)

N Kategori	N Kriteria
NX	KGB regional tidak dapat dievaluasi (misal sudah diangkat)
N0	Tidak ada metastasis ke KGB regional
N1	KGB aksila level I, II ipsilateral yang masih dapat digerakkan
N2	KGB aksila level I, II ipsilateral yang terfiksir atau bergerombol; atau jika KGB mamaria interna yang terdeteksi secara klinis dan tidak terdapat metastasis KGB aksila secara klinis.
N3	KGB infraklavikula ipsilateral (level III) dengan/tanpa keterlibatan KGB aksila level I, II; atau KGB mamaria interna yang terdeteksi secara klinis dan terdapat metastasis KGB aksila secara klinis; atau KGB supraklavikula ipsilateral dengan/tanpa keterlibatan KGB aksila atau mamaria interna.

Sumber: (Sjamsuhidajat & Jong, 2017)

Tabel 2. 5 Klasifikasi Metastasis Jauh (M)

M Kategori	M Kriteria
M0	Tidak ada metastasis jauh
M1	Ada metastasis jauh

Sumber: (Ketut & Kartika, 2022)

Tabel 2. 6 Stadium Kanker Payudara

Stadium	TNM
Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II A	T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0, M0
Stadium II B	T2, N1, M0 T3, N0, M0

Stadium III A	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
Stadium III B	T4, N0, M0 T4, N1, M0 T4, N2, M0
Stadium III C	Any T, N3, M0
Stadium IV	Any T, Any N, M1

Sumber: (Ketut & Kartika, 2022)

Seperti sel payudara normal, beberapa sel kanker payudara juga memiliki reseptor hormon estrogen dan/atau progesteron atau tidak memiliki keduanya sama sekali. Kanker payudara yang memiliki reseptor estrogen disebut ER (+), sedangkan yang memiliki reseptor progesteron disebut PR (+), keduanya cenderung memiliki prognosis yang lebih baik dibanding tipe kanker payudara lainnya karena masih peka terhadap terapi hormonal (Sjamsuhidajat & Jong, 2017). Ekspresi reseptor kanker payudara sendiri dapat diklasifikasikan menjadi 4 jenis di antaranya yaitu, reseptor estrogen, reseptor progesteron, reseptor HER2 dan indeks Ki67 (Adelya et al., 2022). Dari sejumlah reseptor yang terekspresi pada kanker payudara tersebut, kanker payudara terbagi kedalam 4 sub tipe molekular (tabel 2.7).

Tabel 2. 7 Subtipe Molekular Kanker Payudara

Subtipe	Kecenderungan Tumor*	Prevalensi
Luminal A	ER (+) dan/atau PR (+), HER2 (-), Ki67 rendah	40%
Luminal B	ER (+) dan/atau PR (+), HER2 (+), Ki67 tinggi	20%
<i>Triple negative/basal-like</i>	ER (-), PR (-), HER2 (-)	15-20%
Tipe HER2	ER (-), PR (-), HER2 (+)	10-15%
*Gambaran umum untuk tiap subtipe. Namun, tidak semua tumor pada subtipe tersebut selalu memiliki sifat atau kecenderungan seperti yang disebutkan pada tabel.		

Sumber: (Sjamsuhidajat & Jong, 2017)

Gejala kanker payudara Pada tahap awal, kanker payudara umumnya memang bersifat asimtomatik atau tidak menimbulkan gejala yang jelas. Gejala

yang paling sering muncul adalah benjolan atau penebalan pada jaringan payudara. Pada tahap yang lebih lanjut, dapat muncul tanda-tanda seperti retraksi atau deviasi puting susu, nyeri atau keluarnya cairan berdarah dari puting, serta perubahan tekstur kulit berupa penebalan dan pori-pori menonjol menyerupai kulit jeruk. Kondisi yang lebih berat ditandai oleh ulserasi pada kulit payudara serta pembesaran dan pengerasan kelenjar getah bening aksila atau supraklavikula di area leher. Apabila kanker telah bermetastasis secara luas, dapat muncul gejala sistemik seperti penurunan nafsu makan, penurunan berat badan, nyeri bahu atau punggung bawah, gangguan pencernaan, pusing, gangguan penglihatan, dan sakit kepala (Rochmawa et al., 2021). Hingga saat ini, berdasarkan *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) 2022 terdapat beberapa jenis terapi kanker payudara yaitu pembedahan, kemoterapi, radioterapi, serta terapi hormonal (Benedictin et al., 2024).

2.1.2.2 Faktor risiko

Secara konseptual penyebab pasti dari kanker payudara memang masih belum diketahui (Nurrohmah et al., 2022). Meskipun demikian, kanker payudara adalah penyakit multifaktorial, dimana terdapat berbagai faktor yang berkontribusi terhadap kejadiannya. Adapun beberapa faktor yang diduga dapat meningkatkan risiko seseorang terkena kanker payudara antara lain, faktor usia, faktor reproduksi dan hormonal, serta gaya hidup dan lingkungan.

Peningkatan usia merupakan salah satu faktor risiko terkuat terhadap terjadinya kanker payudara. Meskipun kanker payudara dapat terjadi pada wanita muda, namun secara umum kanker payudara merupakan penyakit penuaan. Sebagian besar kasus kanker payudara terdiagnosis setelah masa menopause, dan sekitar 75% dari seluruh kasus terjadi pada perempuan berusia di atas 50 tahun (Iqmy et al., 2021). Adapun korelasi antara bertambahnya usia dan kejadian kanker payudara diyakini disebabkan oleh akumulasi progresif perubahan genetik dan epigenetik pada sel epitel payudara, yang akhirnya menyebabkan perubahan ekspresi gen (Rizka et al., 2022). Faktor genetik dan riwayat keluarga juga termasuk faktor risiko utama dalam timbulnya kanker payudara. Sekitar 10% kasus kanker payudara berhubungan dengan mutasi yang diwariskan, khususnya

mutasi pada gen proto-onkogen (HER2) serta supresor tumor (BRCA1 dan BRCA2) pada jaringan epitel payudara. Mutasi tersebut mengakibatkan sel mengalami pembelahan yang berkelanjutan tanpa kontrol, sehingga memicu pembentukan kanker (Hero, 2021; Ketut & Kartika, 2022).

Faktor reproduksi dan hormonal juga berperan penting karena berhubungan dengan paparan hormon estrogen yang berfungsi dalam proliferasi sel-sel payudara. Beberapa kondisi reproduksi dan hormonal yang meningkatkan risiko antara lain usia menarke (menstruasi pertama) kurang dari 12 tahun, karena hal ini akan menyebabkan banyaknya jumlah siklus haid dan penutupan estrogen yang berulang sehingga memberikan efek rangsangan terhadap epitel mammae yang kemudian meningkatkan kemungkinan abnormalitas jaringan payudara. Faktor selanjutnya adalah kehamilan pertama ≥ 30 tahun, pada wanita dengan kondisi ini berisiko 5 kali lebih tinggi terkena kanker payudara dibandingkan dengan wanita yang melahirkan anak pertama < 30 tahun. Kehamilan pada usia yang lebih muda memiliki efek protektif terhadap risiko kanker payudara manusia melalui mekanisme perubahan dinamika hormon, *growth factor*, dan jalur pensinyalan epitel kelenjar payudara, sehingga mengurangi jumlah siklus menstruasi serta proporsi sel reseptor hormon positif dan menurunkan proliferasi sel progenitor, yang pada akhirnya dapat memodulasi risiko kanker melalui perubahan ekspresi gen pada jaringan payudara. Laktasi juga menjadi salah satu faktor yang dapat mengurangi risiko terjadinya kanker payudara. Ibu menyusui akan mengeluarkan hormon prolactin yang akan menekan paparan hormon estrogen dalam jumlah banyak dan dalam kurun waktu lama akan memicu timbulnya kanker payudara. Penggunaan kontrasepsi hormonal lebih dari lima tahun turut menjadi faktor risiko terjadinya kanker payudara dalam beberapa penelitian, hal ini disebabkan oleh jenis estrogen dan progestin sintetis yang terdapat dalam KB hormonal. Penggunaan KB Hormonal ini tidak dianjurkan lebih dari lima tahun dan wanita di atas 35 tahun harus sangat berhati-hati dalam pemakaiannya. Paparan estrogen akan meningkatkan faktor-faktor proliferasi sel dan bila tidak terkendali secara biologis akan berkembang menjadi kanker

mengikuti tahapan-tahapannya (Hero, 2021; Iqmy et al., 2021; Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

Pola hidup juga menjadi faktor yang tidak dapat dipisahkan dari berbagai penyakit. Gaya hidup sedentari atau kurang aktivitas fisik disertai konsumsi makanan tinggi lemak dapat menyebabkan obesitas, yang kemudian dapat memicu peningkatan risiko kanker payudara. Di dalam tubuh, estrogen disimpan dalam jaringan lemak (jaringan adiposa). Beberapa reseptor kanker payudara adalah estrogen positif (ER+), yang artinya estrogen dapat menstimulasi pertumbuhan sel-sel kanker payudara. Semakin banyak jaringan adiposa, maka makin banyak pula estrogen yang mengikat ER+ sel-sel kanker. Selain gaya hidup sedentari, kebiasaan mengonsumsi alkohol dan merokok turut meningkatkan risiko kanker payudara. Hasil penelitian dari *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) menunjukkan korelasi antara konsumsi alkohol dan hormon reseptor positif dan hormon reseptor negatif kanker payudara. Alkohol dapat meningkatkan kadar estrogen endogen sehingga mempengaruhi responsivitas terhadap hormon, sedangkan kandungan karsinogen dalam asap rokok dapat memicu proliferasi sel-sel payudara (Iqmy et al., 2021; Ketut & Kartika, 2022; Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

2.1.2.3 Estrogen α

Estrogen diketahui berperan sebagai stimulator pertumbuhan sel kanker payudara, sehingga penurunan kadar atau penghambatan aktivitasnya terbukti memberikan respons terapeutik yang signifikan pada pasien dengan kanker payudara tipe reseptor-positif. Kadar estrogen pada wanita premenopause cenderung tinggi, sementara pada wanita pascamenopause produksinya jauh lebih rendah namun tetap dapat mendorong proliferasi sel kanker. Penghambatan estrogen pada kondisi pascamenopause dapat dilakukan melalui dua mekanisme utama, yaitu pemblokiran reseptor estrogen secara langsung atau penghambatan proses konversi androgen menjadi estrogen di jaringan perifer. Pendekatan terapi hormonal menggunakan senyawa antiestrogen, khususnya tamoksifen telah lama menjadi pilihan utama dalam tata laksana kanker payudara. Akan tetapi, penggunaan tamoksifen dalam jangka panjang dikaitkan dengan sejumlah efek

samping serius, di antaranya peningkatan risiko kanker endometrium, trombosis, serta munculnya resistensi obat yang mengurangi efektivitas terapi (Tilakvijay et al., 2019). Kondisi ini menegaskan perlunya upaya berkelanjutan dalam pengembangan senyawa antiestrogen generasi baru yang lebih aman, efektif, dan mampu mengatasi keterbatasan terapi yang telah ada saat ini.

Estrogen adalah hormon seks pada wanita yang menjalankan sebagian besar fungsi fisiologisnya melalui dua subtype reseptor estrogen, yaitu estrogen alfa (ER- α) dan reseptor estrogen beta (ER- β) (Sharma et al., 2018). ER- α memainkan peran penting dalam perkembangan kanker payudara dengan bekerja sebagai *ligand-inducible transcription factor*, serta dapat digunakan untuk menentukan pertumbuhan, survival, dan diferensiasi sel kanker payudara (Mohtar et al., 2021). Pada manusia, ekspresi ER- α umumnya ditemukan pada kelenjar payudara, selain itu juga terdeteksi pada endometrium dan ovarium (Hua et al., 2018). Reseptor estrogen (ER) (gambar 2.3) adalah reseptor yang diaktifkan secara efisien melalui pengikatan dengan ligan 17 β -estradiol. Pada wanita, reseptor ini memiliki peran penting dalam mekanisme apoptosis, inflamasi, proliferasi, dan diferensiasi sel kanker payudara. Aktivitas hormon estrogen yang berlebihan dapat menyebabkan peningkatan ekspresi ER- α , yang kemudian berkontribusi terhadap pertumbuhan sel kanker payudara (Rafeeq, 2022).

Studi (Rajagopal et al., 2023) menunjukkan bahwa ER- α yang dikodekan oleh gen ESR1 berperan penting dalam proliferasi dan metastasis onkogenik dan sekitar 70% penderita kanker payudara menunjukkan ekspresi reseptor ini. Oleh karena itu ER- α dapat menjadi target utama dalam terapi endokrin. Dalam penelitian tersebut juga, ligan analog benzothiophene BT_ER_15f menunjukkan afinitas pengikatan terbaik terhadap ER- α dengan nilai Glide G-score -15,922 kcal/mol, lebih kuat dibandingkan tamoksifen (-13,56 kcal/mol), yang menandakan potensi besar dalam menghambat aktivitas proliferasi reseptor tersebut.

ER- α merupakan reseptor nuklir yang berfungsi sebagai faktor transkripsi dan terdiri dari beberapa domain fungsional utama, yaitu domain aktivasi fungsi-1 (AF-1) pada ujung N-terminal, domain pengikat/DNA *Binding Domain* (DBD),

dan domain pengikat ligan/*Ligand Binding Domain* (LBD) yang mengandung *activation function-2* (AF-2) pada ujung C-terminal. Bagian kunci dari LBD adalah heliks-12 (H12) yang berperan sebagai sakelar molekuler antara konformasi aktif dan inaktif reseptor (Khan et al., 2020). Ketika agonis seperti estradiol berikatan dengan LBD, H12 bergerak ke posisi aktif membentuk kantong hidrofobik (AF-2) yang dikenali oleh ko-aktivator transkripsi melalui motif LXXLL, sehingga mengaktifkan transkripsi gen target yang mendorong proliferasi sel kanker payudara. Sebaliknya, ketika antagonis berikatan dengan LBD, H12 terdorong ke posisi inaktif sehingga celah ko-aktivator tidak dapat terbentuk, transkripsi gen target terhambat, dan proliferasi sel kanker ditekan (Bafna et al., 2020).

Sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM), senyawa 4-hidroksitamoksifen (4-OHT)/tamoksifen dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan menggantikan posisi estrogen, sehingga menghambat fungsi estrogen pada sel-sel payudara. Dalam kondisi ini, koaktivator transkripsi tidak dapat berikatan dengan reseptor, yang pada akhirnya menghambat aktivasi gen-gen yang berperan dalam peningkatan proliferasi sel (Sharma et al., 2018). Kompleks kristal antara ER- α (PDB ID: 3ERT) dan 4-OHT telah digunakan dalam studi *in silico* untuk memvalidasi protokol penambatan molekul karena menghasilkan nilai RMSD yang rendah ($<2 \text{ \AA}$), menandakan posisi ikatan yang stabil dan representatif (Herlina et al., 2024). Salah satu studi menunjukkan bahwa residu aktif seperti Leu387, Arg394, Glu353, dan Thr347 berperan penting dalam interaksi antara ER- α dan ligan, baik pada tamoksifen maupun pada senyawa fitokimia baru yang berpotensi sebagai inhibitor kanker payudara (Rafeeq, 2022). Sementara itu, penelitian (Setiawan & Istyastono, 2015) juga memperkuat relevansi ER- α sebagai target terapeutik dengan menunjukkan bahwa ikatan efektif ligan terhadap residu-residu tersebut merupakan indikator utama aktivitas anti-kanker berbasis *in silico*.



Gambar 2. 3 Struktur 3D Reseptor Estrogen α

(Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/3ERT>)

Senyawa-senyawa dari tumbuhan dalam sebuah penelitian diketahui menunjukkan potensi terbaik sebagai penghambat $ER\alpha$. Senyawa-senyawa tersebut berikatan kuat dengan residu kunci seperti GLU353, ARG394 melalui ikatan hidrogen dan hidrofobik (Husni et al., 2026). Selain itu, residu-residu kunci seperti ASP A:351, ALA A:350 dan LEU A:525, serta TRP A:383 juga diketahui berperan penting dalam menstabilkan kompleks $ER\alpha$ melalui interaksi hidrofobiknya, yang mendukung senyawa tersebut sebagai ligan potensial untuk inhibitor $ER\alpha$. Residu lain seperti ASP A:351 juga berperan sebagai salah satu residu kunci dalam mekanisme antagonis pada reseptor estrogen karena mampu berinteraksi kuat dengan gugus amina tersier pada rantai samping ligan, dan menghambat pergerakan heliks 12 (H12) untuk menutup *binding pocket*. Akibatnya, Reseptor terdorong menuju konformasi terbuka (antagonis), sehingga menghambat aktivitas transkripsi gen yang bergantung pada estrogen (Shtaiwi et al., 2019; Xue et al., 2022).

2.1.3 Pengujian *In Silico*

In silico adalah merupakan kegiatan penelitian eksperimen yang dilakukan menggunakan komputer dan perangkat lunak. Uji ini dapat digunakan untuk mengetahui bagaimana interaksi antara suatu senyawa dengan molekul target, contohnya reseptor (Setiawan & Istyastono, 2015). Kelebihan lainnya dari metode ini adalah mampu memprediksi interaksi senyawa dengan target reseptor secara

efisien, sehingga dapat mengurangi jumlah senyawa yang perlu disintesis dengan pengujian laboratorium, serta menekan biaya dan waktu yang dibutuhkan dalam proses penemuan obat (Nazarova & Katritch, 2022). Melalui metode ini peneliti dapat menganalisis berbagai senyawa yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat dengan menghitung sejumlah parameter. Berbagai parameter yang diukur nantinya akan membantu peneliti memprediksi apakah suatu senyawa dapat menjadi inhibitor suatu reseptor penyakit dan bagaimana tingkat keamanannya jika digunakan sebagai obat.

Molecular docking adalah suatu teknik dalam metode *in silico* yang sudah umum digunakan. Teknik *molecular docking* adalah salah satu metode CADD (*Computer Aided Drug Design*) yang telah banyak digunakan untuk memberikan gambaran interaksi suatu senyawa terhadap protein target dengan cara memprediksi konformasi dan energi ikatannya (Hasan et al., 2022). Dalam penelitiannya (Indratmoko et al., 2022) memaparkan beberapa aplikasi yang digunakan dalam *molecular docking* adalah pyrx-autodock vina untuk preparasi ligan, preparasi reseptor, validasi kemudian divisualisasikan dengan biovia discovery studio visualizer. Penelitian ini akan menggunakan metode *molecular docking* untuk dapat mensimulasikan bagaimana senyawa metabolit sekunder dari daun belimbing wuluh seperti Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O-alpha-L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester dapat berikatan dengan target protein ER- α . Energi ikatan yang terbentuk digunakan untuk melakukan analisis afinitas antara ligan dengan ER- α . Semakin kecil atau semakin negatif energi ikatan maka semakin stabil (kuat) pula ikatan yang dihasilkan (T. Z. A. D. Putri et al., 2024).

Validasi metode *docking* dilakukan sebelum uji utama dengan cara *redocking* ligand asli ke protein target. Hasil *docking* dinyatakan valid saat nilai RMSD $\leq 2 \text{ \AA}$ (I. W. Sari et al., 2020). Berdasarkan penelitian oleh (Herlina et al., 2024), proses *redocking* terhadap kompleks ER α -4-hydroxytamoxifen (PDB ID: 3ERT) menghasilkan nilai RMSD 1,11 Å. Nilai ini berada di bawah batas 2 Å yang digunakan sebagai kriteria validitas protokol *docking*, sehingga struktur 3ERT dianggap layak digunakan sebagai model reseptor yang valid pada

penelitian ini. Penelitian *in silico* dalam pengembangan obat telah banyak dilakukan misalnya oleh (Masand et al., 2024) yang melakukan analisis *molecular docking*, *molecular dynamics*, dan e-QSAR terhadap sejumlah inhibitor *Estrogen Receptor alpha* (ER α), didapatkan hasil bahwa atom karbon dan nitrogen hibridisasi sp² serta kombinasi donor/akseptor H-bond khusus dengan atom C, N, dan cincin sulfur sangat signifikan dalam pengikatan, sehingga bisa digunakan sebagai acuan desain kandidat obat baru. Kemudian, penelitian lain oleh (Rafeeq, 2022), dilakukan *molecular docking* terhadap 87.133 senyawa fitokimia dari basis data ZINC terhadap ER α , dan ditemukan bahwa senyawa ZINC69481841 dan ZINC95486083 memiliki nilai *binding energy* masing-masing -10,47 dan -11,88 kcal/mol, serta berinteraksi dengan residu kunci seperti Leu387, Arg394, Glu353, dan Thr347 yang mirip dengan ligan tamoxifen.

Penelitian-penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa metode *in silico* mampu memprediksi interaksi molekuler dengan cukup detail dan menemukan kandidat ligan dengan afinitas tinggi yang dapat digunakan untuk penelitian pengembangan obat. Dengan teknik ini, proses pengembangan kandidat obat dapat berlangsung dengan waktu yang relatif lebih cepat. Seiring dengan kemajuan teknologi dan kecerdasan buatan dalam bidang farmasi, prediksi aktivitas senyawa dengan metode komputasi diprediksi akan menjadi lebih akurat dan efisien di masa depan (Amin & Nabila, 2025).

2.1.3.1 Uji Fisikokimia

Prediksi sifat fisikokimia merupakan salah satu metode yang bertujuan untuk menilai karakteristik fisik dan kimia suatu senyawa serta memprediksi probabilitas suatu senyawa menjadi obat oral secara *in silico* yang berdasarkan pada aspek *Lipinski's Rule of Five*. Aturan tersebut menyatakan bahwa suatu senyawa dianggap memenuhi kriteria jika memiliki berat molekul ≤ 500 g/mol, jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , jumlah akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 , serta nilai logP atau koefisien partisi ≤ 5 (Naufa et al., 2022).

Senyawa uji tidak boleh memiliki berat molekul melebihi 500 g/mol karena molekul yang besar akan sulit menembus membran sel. Jumlah donor hidrogen harus ≤ 5 dan akseptor hidrogen ≤ 10 , karena ikatan hidrogen yang

berlebihan dapat mengurangi permeabilitas. Nilai logP atau koefisien partisi yaitu kemampuan senyawa larut dalam pelarut non polar, lipid, lemak, dan minyak. Semakin tinggi nilai logP, maka senyawa akan semakin bersifat hidrofobik. Senyawa yang terlalu hidrofobik memerlukan lebih banyak waktu di lapisan ganda lipid dan tersebar luas di seluruh tubuh, yang menurunkan selektivitas pengikatan ke target dan menyebabkan nilai toksisitas yang lebih tinggi. Namun, suatu senyawa juga akan sulit melewati lapisan lipid jika nilai logP semakin negatif (Hakiki et al., 2024). Jika salah satu parameter tidak terpenuhi, masih dapat ditoleransi dan masih memenuhi *drug-likeness*. Namun, jika senyawa tersebut melanggar parameter *Lipinski Rule of Five* >1, maka senyawa dianggap tidak cocok digunakan sebagai kandidat obat oral (Surya et al., 2024). Pengujian sifat fisikokimia ini dilakukan menggunakan situs SwissADME dengan cara memasukkan format SMILES dari senyawa yang diperoleh melalui PubChem.

2.1.3.2 Uji Farmakokinetik

Dalam proses penemuan kandidat obat baru tentunya tidak hanya melihat dari kekuatan ikatan ligan pada reseptor, tetapi juga dievaluasi dari segi farmakokinetik dan toksisitas dalam menentukan tingkat efektivitas dan keberhasilan terapeutiknya (Hakiki et al., 2024). Adapun evaluasi parameter farmakokinetik meliputi *absorption*, *distribution*, *metabolism*, *excretion*, dan *toxicity* (ADMET) (Thakur et al., 2025).

Dalam penelitian ini, prediksi sifat farmakokinetik dilakukan melalui website Swiss ADME dan lebih lanjut lagi menggunakan website pkCSM dengan cara menyalin SMILES dari senyawa uji yang diperoleh dari Pubchem. Masing-masing parameter akan dianalisis untuk menilai sifat farmakokinetiknya, pada website pkCSM terdapat 30 prediktor (7 absorpsi, 4 distribusi, 7 metabolisme, 2 ekskresi, 10 toksisitas) yang menampilkan sifat farmakokinetik senyawa yang akan diuji. Sementara SwissADME menampilkan 9 prediktor seperti *water solubility*, GI absorption, BBB permeant, substrat p-gp, inhibitor berbagai isoform CYP (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4), Log Kp (*skin permeation*), *clearance*, dan renal OCT2 *substrate*. Beberapa prediksi ini

kemudian digunakan untuk menentukan apakah senyawa tersebut layak sebagai obat oral atau tidak.

2.1.3.3 Uji Toksisitas

Analisis uji toksisitas digunakan untuk menganalisis serta memprediksi efek samping dan kemungkinan toksisitas yang ditimbulkan setelah mengonsumsi obat dengan kandungan senyawa yang diuji. Penilaian awal terhadap sifat toksisitas suatu senyawa sangat krusial dalam pengembangan obat untuk menentukan apakah senyawa tersebut berpotensi berbahaya atau tidak. Uji toksisitas dilakukan menggunakan webserver ProTox 3.0, yang memprediksi toksisitas oral senyawa berdasarkan struktur kimia. Prosedur penggunaan ProTox 3.0 relatif mudah, yaitu pengguna cukup memasukkan format SMILES senyawa yang diuji (diperoleh dari PubChem), dan dapat memilih model prediksi tertentu (Banerjee et al., 2018). Dalam penelitian ini, analisis difokuskan pada *organ toxicity* dan *toxicity endpoints*, dengan hasil prediksi berupa nilai *Lethal Dose/LD₅₀* (mg/kg).

Menurut (Amelia et al., 2024) LD₅₀ adalah dosis yang diperkirakan dapat menyebabkan kematian pada 50% atau setengah dari populasi yang diuji. Semakin kecil nilai LD₅₀ maka semakin tinggi tingkat toksisitas senyawa yang diuji, sedangkan nilai LD₅₀ yang besar mengindikasikan toksisitas yang lebih rendah. Klasifikasi toksisitas menggunakan skema GHS (*Globally Harmonized System*) atau sistem pelabelan kimia yang diselaraskan secara global. Nilai LD₅₀ ≤ 5 mg/kg dikategorikan fatal jika tertelan (Kelas 1). Nilai 5 < LD₅₀ ≤ 50 fatal jika tertelan (Kelas 2). Nilai 50 < LD₅₀ ≤ 300 beracun jika tertelan (Kelas 3). Nilai 300 < LD₅₀ ≤ 2000 berbahaya jika tertelan (Kelas 4). Nilai 2000 < LD₅₀ ≤ 5000 mungkin berbahaya jika tertelan (Kelas 5). Dan nilai LD₅₀ > 5000 mg/kg dianggap tidak beracun (Kelas 6) (Naufa et al., 2022).

2.1.4 Suplemen Bahan Ajar Biologi

Pendidikan memiliki peran krusial sebagai salah satu pilar utama dalam upaya peningkatan kualitas sumber daya manusia. Harapan setiap masyarakat dalam suatu bangsa terwujud melalui terselenggaranya pendidikan yang bermutu dan berdaya saing tinggi (P. L. Sari et al., 2025). Menurut Bab 2 Pasal 3 Undang-

Undang Negara Republik Indonesia No. 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional, pendidikan nasional berfungsi mengembangkan kemampuan dan membentuk watak serta peradaban bangsa yang bermartabat dalam rangka mencerdaskan kehidupan bangsa, bertujuan untuk berkembangnya potensi peserta didik agar menjadi manusia yang beriman dan bertakwa kepada Tuhan Yang Maha Esa, berakhlak mulia, sehat, berilmu, cakap, kreatif, mandiri, dan menjadi warga negara yang demokratis serta bertanggung jawab. Agar hasilnya optimal, proses pendidikan perlu dirancang secara menyeluruh dengan melibatkan berbagai komponen pendukung.

Secara nasional, pembelajaran dipahami sebagai proses interaksi yang melibatkan berbagai komponen utama, yaitu peserta didik, pendidik, dan sumber belajar atau bahan ajar dalam suatu lingkungan pendidikan (Hrp et al., 2022). Dengan demikian, proses pembelajaran dapat diartikan sebagai suatu sistem terpadu yang menghubungkan dan menginteraksikan setiap komponen tersebut untuk mencapai tujuan pembelajaran secara optimal sesuai dengan hasil yang diharapkan. Untuk mencapai tujuan pembelajaran yang diharapkan tentunya diperlukan metode dan media yang efektif. Media pembelajaran memiliki peran yang sangat penting dalam mendukung proses belajar mengajar, karena berfungsi menyajikan informasi secara lebih jelas, terperinci, dan menarik yang pada akhirnya berkontribusi dalam peningkatan hasil belajar siswa (Kaniawati et al., 2023).

Kata “media” berasal dari bahasa latin yaitu “*medist*” yang secara harfiah berarti “tengah” atau “pengantar”. Media pembelajaran adalah alat yang dapat digunakan oleh guru untuk menyampaikan informasi kepada peserta didik terkait dengan pembelajaran sehingga mudah dipahami (Wulandari et al., 2023). Media pembelajaran yang dapat menjadi sumber bahan ajar tambahan bagi peserta didik salah satunya adalah booklet. Booklet yaitu media berisi informasi penting yang disusun secara menarik, jelas, dan mudah dipahami untuk menumbuhkan rasa ingin tahu siswa. Desainnya dibuat efisien serta dilengkapi dengan berbagai gambar pendukung, menjadikan booklet mampu menyajikan informasi secara ringkas, menghindari kesalahan persepsi, dan memotivasi peserta didik agar lebih

fokus serta tidak mudah bosan dalam belajar (Sary & Isnawati, 2023). Selain itu, booklet umumnya disusun dengan penyajian materi yang lebih singkat daripada buku, berisi informasi penting, jelas, kontennya mudah dimengerti, serta bentuknya kecil dan ringan sehingga memudahkan peserta didik membawanya kemana-mana (Novianti & Syamsurizal, 2021).

Booklet dapat menjadi media penunjang untuk proses pembelajaran sekaligus menambah referensi selain buku paket, sehingga dapat digunakan sebagai suplemen bahan ajar dan meningkatkan efektivitas pembelajaran peserta didik. Suplemen bahan ajar adalah tambahan yang menjadi pendamping bahan ajar pokok, suplemen bahan ajar biasanya berisi pengembangan materi sehingga pemahaman terhadap materi tersebut lebih luas. Suplemen bahan ajar umumnya digunakan pendidik untuk membantu proses pembelajaran, agar membuat pelaksanaan pembelajaran lebih efektif dan peserta didik lebih memahami materi yang disampaikan (Yudistira et al., 2021). Dalam penelitian oleh (Yusuf et al., 2019) membuktikan bahwa penggunaan booklet sejarah “Perang Lasem” layak dan efektif digunakan dalam proses pembelajaran serta dapat meningkatkan hasil belajar peserta didik. Selanjutnya, penelitian (L. A. Sari, 2019) juga mendapatkan hasil bahwa *booklet* lebih efektif dibandingkan media *leaflet* dalam meningkatkan pengetahuan remaja tentang dampak kehamilan remaja di SMA Swasta Pertiwi Kota Jambi.

2.2 Hasil Penelitian yang Relevan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Ahmed et al., 2018), (Hamzah et al., 2021), dan (Alfiraza et al., 2025) menunjukkan bahwa ekstrak daun *Averrhoa bilimbi* L. mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, triterpenoid, dan alkaloid yang memiliki aktivitas biologis penting, termasuk potensi antikanker. Analisis fitokimia dan karakterisasi spektroskopi dalam penelitian tersebut mengidentifikasi keberadaan senyawa seperti Squalene, Cucumerin A, Afzelechin-3-O-rhamnopyranoside, serta beberapa turunan alkaloid seperti Elaeokanine C. Selain itu, penelitian oleh (Nair et al., 2016) melaporkan bahwa kandungan flavonoid pada ekstrak daun dan buah *Averrhoa bilimbi* L. mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7

dengan nilai IC_{50} masing-masing 668 $\mu\text{g/mL}$ dan 154,9 $\mu\text{g/mL}$ melalui mekanisme apoptosis atau kematian sel terprogram. Hal ini sejalan dengan penelitian (Abotaleb et al., 2019) bahwa senyawa flavonoid memiliki peran penting sebagai agen antikanker dan menunjukkan potensi besar sebagai senyawa sitotoksik yang mampu memicu terjadinya apoptosis pada sel kanker. Hasil uji in vitro yang dikutip dalam sebuah literatur juga mengonfirmasi efek antiproliferatif dari ekstrak etanol tanaman belimbing wuluh terhadap sel kanker payudara yang bergantung pada hormon (MDA-MB-231) melalui mekanisme penghambatan pertumbuhan sel MDA-MB-231 dengan induksi apoptosis pada fase Gap/Growth 1 (G_0/G_1) siklus sel serta aktivasi jalur apoptosis mitokondria yang bersifat p53-independen (Garg et al., 2022).

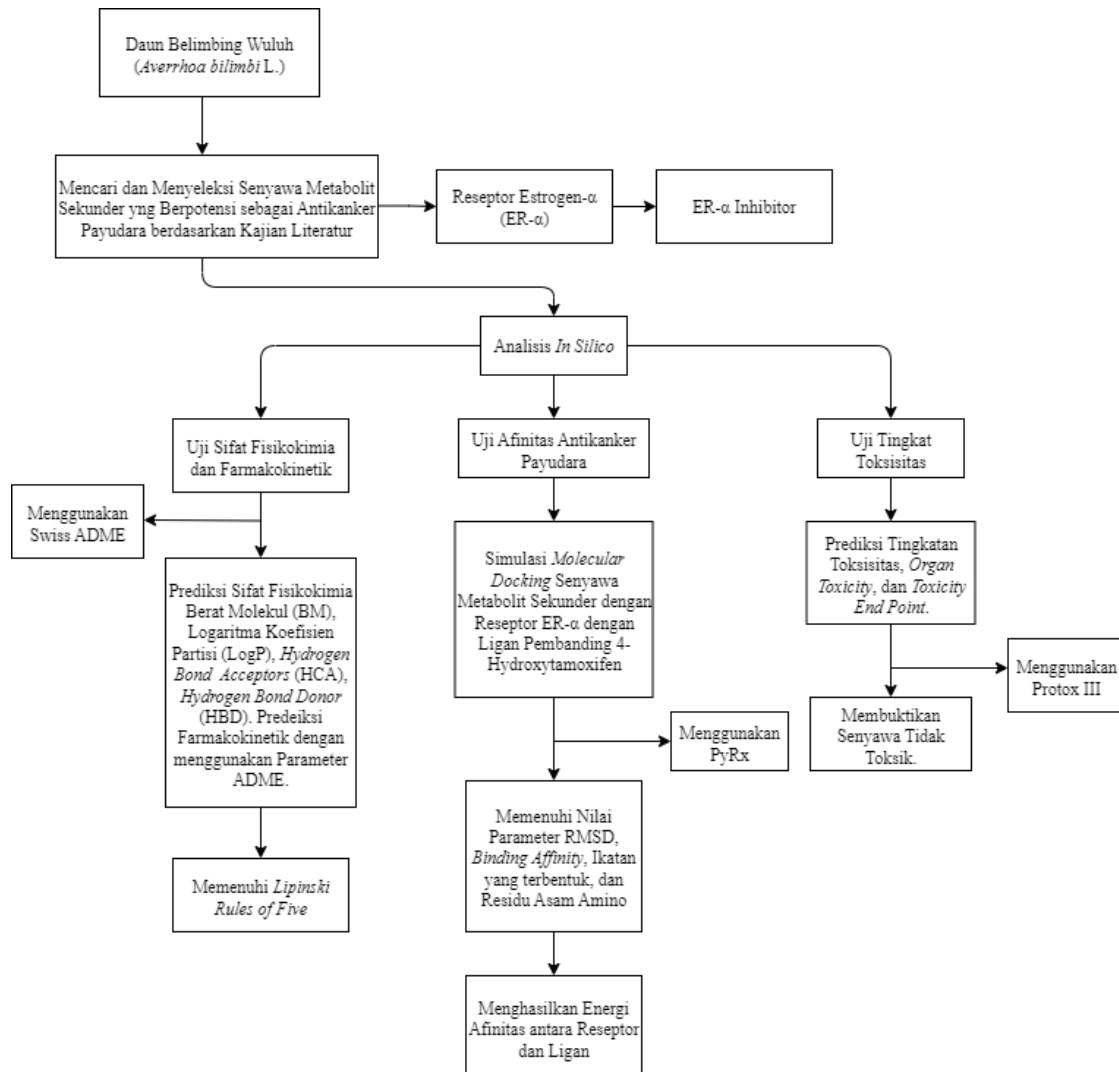
Studi *in silico* oleh (Ismail et al., 2025) melaporkan bahwa senyawa bioaktif dari daun *Averrhoa bilimbi* L. berpotensi sebagai inhibitor VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*), yang berperan dalam angiogenesis dan metastasis tumor dengan nilai energi bebas ikatan sebesar $-7,78$ kcal/mol serta berinteraksi dengan residu aktif ASP-A1046 yang menyerupai obat pembanding Sorafenib. Penelitian komputasi terbaru dari (Amin, Fauzan, et al., 2024) juga menunjukkan bahwa dari 43 senyawa metabolit sekunder daun *Averrhoa bilimbi* L., sejumlah senyawa seperti Phytosphingosine, Dehydrophytosphingosine, dan 2-Amino-1-hydroxyoctadec-4-en-3-one memiliki *binding affinity* yang cukup baik terhadap reseptor NUDT5 yang terkait kanker payudara melalui *molecular docking*. Interaksi yang diamati berupa ikatan hidrogen yang serupa dengan *native ligand*, misalnya pada residu Arg A:84, Arg A:51 Glu A:112 dan Glu A:116 yang serupa dengan ikatan hidrofobik pada *native ligand*.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan (Prabhu et al., 2021), ekstrak etanol daun *Averrhoa bilimbi* positif mengandung senyawa n-docosanoic acid, β -sitosterol, dan apigenin yang berhasil diisolasi menggunakan kromatografi kolom dan diidentifikasi melalui spektroskopi IR, NMR, dan MS. Senyawa-senyawa tersebut termasuk dalam golongan flavonoid, sterol, dan asam lemak yang diketahui memiliki aktivitas biologis, terutama sebagai hepatoprotektor, dengan

kemampuan menurunkan kadar enzim AST, ALT, dan ALP secara signifikan pada tikus yang diinduksi parasetamol. Hasil ini sejalan dengan penelitian (Nadhifah & Mulia, 2025), yang menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh mengandung fenol, flavonoid, alkaloid, dan steroid yang berperan dalam aktivitas farmakologis seperti antioksidan. Keberadaan senyawa-senyawa tersebut berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dan antiinflamasi sehingga memperkuat potensi daun *Averrhoa bilimbi* sebagai sumber bahan obat herbal yang memiliki efek farmakologis signifikan dan relevan untuk penelitian pengembangan obat alami.

2.3 Kerangka Konseptual

Daun belimbing wuluh adalah bagian dari tanaman belimbing wuluh yang sudah banyak digunakan sebagai obat herbal oleh masyarakat Indonesia. Hal ini dikarenakan daun belimbing wuluh memiliki senyawa metabolit sekunder yang dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Untuk dapat mengetahui apa saja kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam daun belimbing wuluh dilakukan analisis literatur secara mendalam dari berbagai artikel jurnal yang kredibel. Setelah mengetahui senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh maka akan dilakukan analisis secara *in silico* untuk mengetahui senyawa apa yang dapat menjadi inhibitor dari Estrogen- α (ER- α) sebagai salah satu reseptor pemicu kanker payudara dan menganalisis bagaimana interaksi dan kekuatan afinitas senyawa tersebut dengan reseptor ER- α sehingga dapat digunakan sebagai antikanker payudara. Kerangka konseptual dari penelitian ini secara jelas akan disampaikan pada gambar 2.4.



Gambar 2. 4 Kerangka Konseptual Penelitian

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

2.4 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan, maka pertanyaan penelitian dari penelitian ini adalah:

- Apakah senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki *binding affinity* yang kuat terhadap protein target estrogen α ($ER\alpha$) berdasarkan hasil analisis *molecular docking* secara *in silico*?

- b. Apakah senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memenuhi karakteristik fisikokimia dan farmakokinetik yang sesuai dengan kriteria obat oral berdasarkan hasil prediksi menggunakan SwissADME?
- c. Apakah senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki tingkat toksisitas yang aman berdasarkan hasil prediksi menggunakan ProTox 3.0?
- d. Apakah hasil analisis *in silico* senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat dijadikan dasar penyusunan suplemen bahan ajar biologi berbasis bioinformatika?