



Analisis *Multi Linear Regression* (MLR) pada *Fingerprint* Kromatografi Andrografolid untuk Memprediksi Efek Anti Kanker

I Gede Bagus Indra Marangyana¹, Putu Yudha Ugrasena², Ni Luh Gde Mona Monika¹

¹Program Studi D3 Farmasi, Akademi Kesehatan Bintang Persada

²Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bali Wisnu Dharma

ABSTRAK

Andrographis paniculata (Burm. F.) Nees (AP) dikenal karena rasanya yang pahit dan sudah umum digunakan sebagai obat tradisional. Studi fitokimia AP menunjukkan bahwa andrografolid adalah senyawa bioaktif utama. Berdasarkan penelitian, andrografolid memiliki efek sebagai antikanker dengan berbagai mekanisme. WHO telah memperkenalkan teknik kromatografi sidik jari (*Fingerprint*) yang dapat digunakan untuk penilaian keamanan dan kualitas obat herbal. Tujuan dari penelitian ini adalah memprediksi efek antikanker AP menggunakan analisis *Brine Shrimp Lethality Test* dan MLR dengan beberapa prediktor seperti AUC dari kromatogram sidik jari, ketinggian geografis, dan IC₅₀. Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium menggunakan AP dari daerah

berbeda yaitu Tawangmangu (Twg), Bandung (Bdg), Denpasar (Dps). Hasil BSLT menunjukkan bahwa AP dari Twg memiliki nilai toksisitas lebih tinggi dari Bdg dan Dps dengan LC₅₀ 5,08 mg/L. AUC kromatogram AP dan ketinggian geografis menunjukkan korelasi yang kuat terhadap potensi efek sitotoksik antikanker berdasarkan LC₅₀ dengan nilai R² 0,984 dan dengan nilai p < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis MLR dapat digunakan untuk memprediksi respon farmakologi AP sitotoksik (LC₅₀) terhadap beberapa prediktor seperti AUC, LC₅₀, dan ketinggian geografis.

Kata Kunci : *Andrographis Paniculata*, *Fingerprint*, *Multi Linear Regression*

ABSTRACT

Andrographis paniculata (Burm. F.) Nees (AP) is known because its bitter taste and has been commonly used as a traditional medicine. The AP phytochemical study shows that andrographolide is the main bioactive compound. Based on research andrographolide has effect as anticancer with various mechanism. WHO has introduced a fingerprint chromatography technique that can be used for the assessment safety and quality of herbal medicines. The purpose of this research is predict the effect anticancer of AP using BSLT and MLR analysis with several predictor such as AUC from fingerprint chromatogram, geographic height, and IC₅₀. The research design was laboratory experimental used AP from differences region

Tawangmangu, Bandung, Denpasar. The results Brine Shrimp Test show that AP from Twg has more toxicity than AP from Bdg and Dps with LC₅₀ 5,08 mg/L. The AUC of the AP chromatogram and geographic height showed a strong correlation to potential anticancer cytotoxic effects based on the LC₅₀ with R² 0.984 and with a p-value < 0.05. This shows that the multi linear regression analysis method can be used to predict a pharmacological response of cytotoxic AP (LC₅₀) to several predictors such as the AUC of fingerprint, IC₅₀, and altitude.

Keywords : *Andrographis Paniculata*, *Fingerprint*, *Multi Linear Regression*

Penulis Korespondensi :

I Gede Bagus Indra Marangyana
Program Studi D3 Farmasi, Akademi Kesehatan
Bintang Persada
E-mail : bagusindramrgyn@gmail.com

Informasi Artikel

Submitted : 5 April 2022
Accepted : 6 Juni 2022
Published : 30 Juni 2022

PENDAHULUAN

Andrographis paniculata (Burm. F.) Nees (AP) sudah umum digunakan sebagai obat tradisional (Tan et al., 2016). AP dikenal sebagai sambiloto di Indonesia. Tanaman ini tumbuh di daerah tropis seperti Asia Selatan dan Tenggara termasuk India, Sri Lanka, Pakistan dan Indonesia (Pandey et al., 2019). Kajian fitokimia AP menunjukkan bahwa andrografolid merupakan senyawa bioaktif utama yang termasuk dalam golongan diterpen lakton dan juga ditemukan golongan senyawa aktif lainnya seperti terpenoid, glikosida, flavonoid (Zou et al., 2016; Warditiani et al., 2017). Beberapa aktivitas farmakologi andrografolid yang telah dilaporkan adalah antimikroba, antiprotozoa, antiinflamasi, antioksidan, imunostimulan, sitotoksik, antimalaria, antidiabetik dan kanker pada manusia (Dai et al., 2019; Garima Pandey, 2018; Mishra et al., 2016; Mittal et al., 2016). WHO merilis pada tahun 2016 bahwa kanker merupakan penyebab kematian keenam di dunia dengan 1,7 juta kematian. Indonesia pada tahun 2019 terdapat 348.809 kasus kanker dengan angka kematian yang besar yaitu 207.210 jiwa (Bray et al., 2018).

Andrografolid dilaporkan berpotensi sebagai agen kemopreventif dengan menekan pertumbuhan sel kanker dengan menghambat NF- κ B, PI3K/AKT dan jalur kinase lainnya serta dengan menginduksi

apoptosis (Mishra et al., 2016). Khan et al (2018) berdasarkan penelitiannya, andrografolid menurunkan viabilitas sel HT-2 dan menginduksi apoptosis pada sel HT-29 sehingga memiliki efek antiproliferatif dan induksi apoptosis terhadap sel HT-29 untuk kanker usus besar. Paul et al (2019) menunjukkan bahwa sel melanoma tikus B16 yang diberikan AP menunjukkan tingkat transkripsi dan translasi yang lebih rendah dari ekspresi VEGF dan HIF-1 α . Mekanisme penurunan regulasi HIF 1 α mungkin melalui perubahan ekspresi faktor transkripsi yang terlibat dalam kaskade pensinyalan hipoksia sehingga andrografolid berpotensi sebagai agen antikanker. Uji toksisitas kultur sel kanker menunjukkan bahwa ekstrak AP bersifat toksik terhadap sel HeLa & MCF-7 (Nivedheetha & Sivasubramaniyan, 2017). Berkaitan dengan aktivitas sebagai senyawa antoksidan dilaporkan bahwa AP menunjukkan penghambatan radikal bebas dari uji DPPH, ABTS, dan FRAP (Therasa et al., 2020). Peran antioksidan andrografolid untuk menetralkan kelebihan radikal bebas, untuk melindungi sel terhadap efek toksiknya, dan berkontribusi pada pencegahan penyakit salah satunya kanker. Peningkatan senyawa radikal bebas menyebabkan stres oksidatif memicu perkembangan penyakit akut dan kronis mulai dari infeksi, diabetes, kanker, dan

penyakit kardiovaskular (Das & Srivastav, 2014).

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah mengakui penggunaan Pengobatan Tradisional Cina (TCM) dari 170 Negara Anggota sebagai perawatan kesehatan primer dan jumlah negara yang sebenarnya menggunakan TCM kemungkinan besar akan lebih tinggi (Welz et al., 2018; WHO, 2019). Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah menetapkan pedoman yang tepat untuk mengevaluasi keamanan, kemanjuran dan kualitas obat-obatan herbal (WHO, 2019). Pentingnya metode kualitatif dan kuantitatif untuk mengkarakterisasi sampel, kuantifikasi biomarker dan pendekatan aktivitas farmakologi dengan tujuan memastikan keselamatan pasien. Sangatlah penting untuk menggunakan obat tradisional yang telah diidentifikasi dan dievaluasi kualitasnya (Kumari & Kotecha, 2016). Saat ini dibutuhkan metode standarisasi sebagai kontrol kualitas salah satunya teknik analisis multivariat. Penerapan kemometri pada data sidik jari dapat mengekstraksi informasi dan pengetahuan yang tercakup dari sistem kimia dengan pemodelan matematis, yang merupakan arah potensial untuk penilaian kualitas obat herbal (Huang et al., 2016; Li et al., 2020a). Kombinasi profil kimia bahan herbal dan analisis multivariate memberikan terobosan alat kontrol kualitas untuk mengkarakterisasi sampel,

kuantifikasi biomarker dan / atau penanda kimiawi dan profil sidik jari (Indrayanto, 2018).

Lokasi geografis (ketinggian) tanaman obat juga berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas metabolit sekunder (Li et al., 2020b). WHO telah memperkenalkan teknik kromatografi sidik jari yang dapat digunakan untuk penilaian obat herbal (WHO, 2019). Kombinasi kromatografi sidik jari dan pendekatan kemometrik memungkinkan evaluasi yang cepat sampel herbal yang memiliki potensi farmakologis (Tistaert et al., 2012). Salah satunya adalah metode analisis statistik multikomponen yaitu *multi linear regression* (MLR) yang dapat digunakan dalam analisis kromatografi sidik jari obat herbal karena dapat dibuat untuk menggambarkan hubungan antara puncak penanda kromatogram dengan potensi farmakologis tanaman herbal obat (Nothnagel, 2012). Aktivitas antikanker ekstrak AP ditentukan berdasarkan penapisan aktivitas dengan metode BSLT dengan mencari konsentrasi mortalitas (LC_{50}) ekstrak menggunakan metode grafik % (persen) mortalitas terhadap larva *Artemia Salina Leach*. Penelitian Mayilsamy and Geetharamanan (2016) menunjukkan bahwa metode BSLT dapat digunakan untuk skrining antikanker AP dan memberikan nilai $LC_{50} < 100$ ppm (sitotoksik) pada ekstrak AP. Analisis MLR diharapkan dapat memprediksi potensi respon farmakologi andrografolid

(LC₅₀) berdasarkan sidik jari AP (nilai AUC), ketinggian geografis (Ketinggian) pertumbuhan AP dan nilai IC₅₀.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik dengan melihat potensi antikanker ekstrak AP melalui AUC senyawa andrografolid, ketinggian geografis, dan IC₅₀ dengan analisis MLR. AP yang digunakan dari ketinggian geografis yang berbeda yaitu dari Tawangmangu (Twg) Jawa Tengah, Bandung (Bdg) Jawa Barat, dan Denpasar Barat (Dps) Bali. Potensi antikanker dengan melihat aktivitas berdasarkan LC₅₀ menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji IC₅₀ dilakukan terhadap aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak AP.

Bahan

AP dari tiga daerah berbeda berdasarkan ketinggian geografis Tawangmangu, Bandung, Denpasar. Etil asetat, n-heksana, 96% ethanol, 70% ethanol aquadest, ethanol -PA, Metanol-PA, Kloroform-PA, Larva *Artemia salina*, asam askorbat, tween 80, air laut, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TLC-Plate GF 254

Metode

1. Ekstraksi sampel

AP disortir dan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan pada suhu kamar kemudian dijadikan serbuk. 2 kg serbuk

AP (Twg, Bdg, Dps) dimaserasi dengan 10 L etanol 90% selama 2 hari. Selanjutnya dimaserasi ulang dengan 5 L etanol 90% selama 1 hari dan diulang kembali dengan 5 L etanol 90% selama 1 hari. Maserat yang diperoleh diuapkan hingga kental kemudian dicuci dengan N-heksana dengan perbandingan 1:20. Ekstrak yang diperoleh dicuci kembali dengan etil asetat dengan perbandingan 1:10. Kemudian ekstrak hasil pencucian etil asetat dicuci kembali dengan air panas sampai air menjadi jernih. Ekstrak diuapkan kembali hingga kental kemudian ditambahkan etanol secukupnya (Warditiani et al. 2020).

2. Uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan IC₅₀

Aktivitas antiradikal bebas AP (Twg, Bdg, Dps) terhadap DPPH ditentukan secara spektrofotometri. Larutan 0,1 mM DPPH dibuat dengan melarutkan 0,0039 mg DPPH dalam 100 ml etanol pa. Ekstrak (2,5ml) dengan konsentrasi yang bervariasi dan larutan DPPH (3,5ml) dicampur dalam tabung reaksi. Tabung reaksi diinkubasi di tempat gelap selama 20 menit pada suhu kamar. Asam askorbat digunakan sebagai standar referensi. Absorbansi dibaca pada 517 nm (Do et al., 2014).

3. KLT-Spektrofotodensitometri Sidik Jari *Andrographis Paniculata* (Burm. F.) Nees.

Ekstrak etanol AP ditimbang masing-masing 0,5 g dan dilarutkan 5 mL dengan etanol pa. diencerkan dua kali,

dipipet 0,5 mL kemudian ditambahkan hingga 5 mL dengan etanol pa. Larutan uji AP ditotolkan di plat KLT GF 254 dengan *TLC sampler 4* (ATS) otomatis. Larutan standar andrografolid juga ditotolkan pada plat yang sama. Elusi dilakukan dengan fase gerak kloroform pa: metanol pa (9: 1). Plat dipindai dengan densitometer *TLC Scanner 4* pada panjang gelombang 210 nm. Kemudian spektrum dipindai dan semua titik dipindai pada panjang gelombang maksimum 232 nm.

4. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Telur *Artemia salina* ditetaskan dalam wadah transparan berisi air laut. Sebuah bola lampu dengan daya 40-60 watt digunakan proses penetasan untuk mencegah suhu dalam 25° C -30° C. Oksigen disuplai dengan menggunakan aerator. Larva dengan rentang hidup 48 jam digunakan dalam uji toksisitas. Konsentrasi yang digunakan pada uji BSLT adalah 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L dan kontrol negatif. Larutan stok ekstrak dibuat dengan melarutkan 20 mg ekstrak dalam 2 ml etanol 96% untuk menghasilkan 10.000 ppm. Larutan stok kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan 3 kali. Tabung reaksi diangin-anginkan untuk mengeringkan

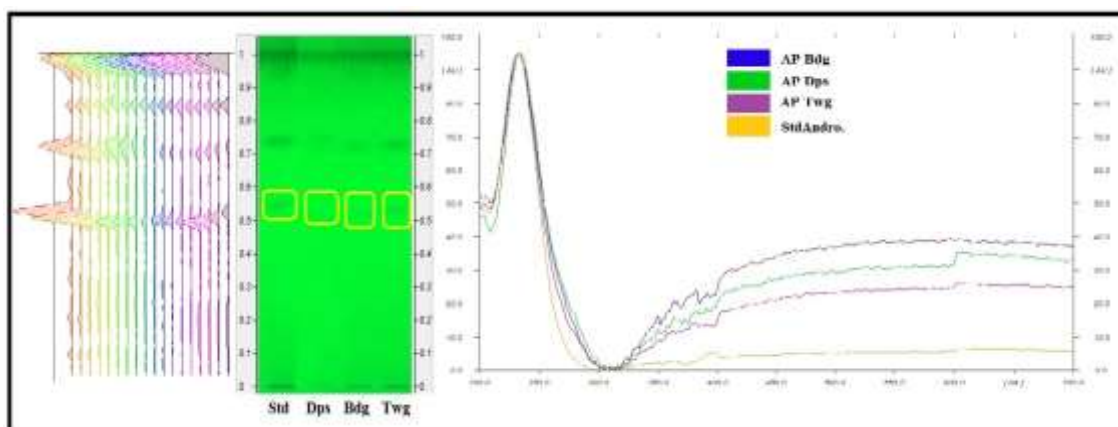
sampel di dalamnya. Tabung reaksi ditambahkan Twen 80 dan 5 ml air laut. Kontrol tidak berisika sampel didalamnya. Proses dilanjutkan dengan menambahkan sepuluh larva *Artemia salina* ke setiap tabung reaksi. Pengamatan dilakukan selama 24 jam. Uji toksisitas ditentukan berdasarkan jumlah larva yang mati (Marzuki et al., 2019).

5. Analisis *Multi Linear Regression* (MLR)

Nilai AUC senyawa andrografolid dari kromatogram AP, nilai IC₅₀, dan ketinggian geografis masing-masing AP digunakan sebagai prediktor dan variabel LC₅₀ sebagai respons dianalisis menggunakan metode analisis MLR dengan SPSS 20. Analisis dilakukan dengan melihat korelasi nilai AUC dan IC₅₀ terhadap respons LC₅₀ dan AUC serta ketinggian geografis AP terhadap LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil KLT ekstrak AP dari tiga daerah dengan ketinggian berbeda (berdasarkan koordinat *Google Earth*), yaitu Twg (1.115 mdpl), Bdg (795 mdpl), Dps (18 mdpl) menunjukkan angka andrografolid yang berbeda pada densitogram KLT. Senyawa andrografolid ditentukan dengan membandingkan spektrum antara standar andrografolid dan sampel AP. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Dari kiri ke kanan : KLT Sidik Jari AP dari tiga daerah yang berbeda; plat KLT di bawah sinar UV 254 nm (lingkaran kuning: andrografolid); spektrum andrografolid

Pada Gambar 1. Sidik jari AP menunjukkan pola yang identik dan pada $R_f = 0,54$ menunjukkan adanya puncak senyawa andrografolid. Seiring dengan

peningkatan konsentrasi penotolan, terjadi peningkatan AUC dari masing-masing AP. Nilai korelasi antara volume dan AUC ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Korelasi volume bercak dengan AUC puncak andrografolid

No.	Asal	Volume Totalan (μL)	AUC AND (AU)	Persamaan Regresi Linier	Reg. Coef
1	Twg	2	567,8	$y = 162,4x + 267,7$	0,995
		4	954,5		
		8	1554,6		
2	Bdg	2	469,5	$y = 78,41x + 304,4$	0,997
		4	605,8		
		8	935,9		
3	Dps	2	344,9	$y = 74,33x + 152,2$	0,938
		4	383,6		
		8	768,9		

Tabel 1 Menunjukkan persamaan regresi linier berkorelasi positif, ditunjukkan dengan peningkatan volume terhadap nilai puncak AUC andrografolid. Selanjutnya berdasarkan nilai $R_f = 0,54$ dan spektra identik, senyawa andrografolid terdapat dalam ekstrak AP dari tiga lokasi geografis pada puncak kromatogram dan berdasarkan nilai R_f . Metode ini dapat digunakan untuk menentukan senyawa *marker* dari AP dan sebagai kontrol kualitas untuk selanjutnya dikaitkan dengan respon farmakologis

(Sharma & Sharma, 2013; Warditiani et al., 2020; Wirasuta et al., 2017).

Ekstrak yang digunakan dalam uji BSLT adalah ekstrak dengan teknik pemurnian untuk mendapatkan kandungan andrografolid yang lebih banyak. Pemurnian dalam ekstraksi khususnya diperlukan untuk penemuan senyawa aktif dan penyaringan pengotor. Sebagian besar senyawa target ditemukan dalam matriks yang sangat kompleks (Li et al., 2014).

Tabel 2. AUC, IC₅₀, Tinggi Geografis, LC₅₀ dari Tiga Daerah AP Berbeda

No.	Asal	Volume totalan (μL)	AUC	IC ₅₀ (mg/L)	Ketinggian Geografis (Mdpl)	LC ₅₀ (mg/L)
1	Twg	2	567.8 AU	7074,6667	1115	5.08
		4	954.5 AU			
		8	1554.6 AU			
2	Dps	2	344.9 AU	1200,6655	18	10.67
		4	383.6 AU			
		8	768.9 AU			
3	Bdg	2	469.5 AU	1663,8800	795	6.01
		4	605.8 AU			
		8	935.9 AU			

Berdasarkan tabel 3 nilai LC₅₀ terbaik adalah AP dari daerah Twg dengan nilai 5,08 ppm. Dilanjutkan dengan Bdg dan Dps dengan nilai 6,01 dan 10,67 ppm. Nilai LC₅₀ merupakan konsentrasi senyawa atau ekstrak yang dapat membunuh larva *Artemia salina* hingga 50% dibandingkan dengan kontrol. Nilai LC₅₀ yang lebih rendah menunjukkan efek sitotoksik yang lebih tinggi (Bhatt et al., 2016). Tingkat toksisitas ekstrak dikategorikan sebagai berikut: LC₅₀ > 1000 mg/L (Tidak toksik), LC₅₀ 500-1000 mg/L (Toksik Rendah), LC₅₀ 100-500 mg/L (Toksik Sedang), LC₅₀ 0- 100 mg/L (Toksik tinggi). Tingkat toksisitas suatu ekstrak dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder yang mempengaruhi aktivitas farmakologi tanaman. Mayilsamy and Geetharamanan (2016) menunjukkan bahwa AP memiliki aktivitas toksisitas yang kuat dengan nilai LC₅₀ < 100 mg/L. Pemilihan metode ekstraksi termasuk pelarut mempengaruhi hasil metabolit sehingga mempengaruhi nilai LC₅₀. Penelitian

Daniel and Ibok (2019) menjelaskan bahwa perbedaan pelarut ekstrak memberikan perbedaan nilai LC₅₀ dengan ekstrak etanol dari AP yang memiliki aktivitas toksisitas tertinggi. Metode uji sitotoksitas BSLT menggunakan *Artemia salina* merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitas suatu sampel. Uji ini berguna untuk mengetahui berbagai aktivitas biologis pada tanaman seperti aktivitas sitotoksik, aktivitas fototoksik, pestisida, penghambatan enzim, dan regulasi ion (Thangapandi & Pushpanathan, 2014). Janakiraman and Johnson (2016) juga menyatakan bahwa uji BSLT dapat digunakan sebagai dasar pengujian toksisitas garis sel, aktivitas anti tumor dan anti kanker.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui nilai IC₅₀. Metode yang digunakan adalah DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan yang dapat menyumbangkan hidrogen dan dengan demikian DPPH berkurang.

Perubahan warna larutan (dari ungu tua menjadi kuning muda) diukur. Intensitas warna kuning tergantung pada jumlah dan sifat penangkap radikal yang ada dalam sampel dan senyawa standar.

Berdasarkan nilai IC_{50} , AP dari Dps memberikan nilai IC_{50} yang lebih baik daripada AP Twg dan AP Bdg. IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang dapat menangkap 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} yang kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. AP dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dengan meningkatkan mekanisme enzim antioksidan dan menghambat peroksidasi lipid. Senyawa flavonoid sering dikaitkan dengan aktivitas penangkap radikal bebas (Gani et al., 2018; Okhuarobo et al., 2014). Berdasarkan Agati et al (2012) hanya flavonoid dengan gugus ortodihidroksi pada cincin B memiliki hubungan yang signifikan dengan aktivitas ini. Penelitian Therasa et al (2020) menyebutkan ekstrak etanol daun *Andrographis Paniculata* memiliki nilai IC_{50} 205.58 mg/ml dan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak semakin tinggi aktivitas antioksidan. Disebutkan pula dengan

meningkatnya konsentrasi ekstrak tingkat kematian sel kultur HEP-2 semakin tinggi. Berdasarkan penelitian Shofa et al (2021) ekstrak etanol *Andrographis Paniculata* nilai IC_{50} 614.349 μ g/mL dan memiliki aktivitas antikanker yang kuat terhadap sel HepG2. Antioksidan dari AP memberikan ketahanan terhadap stres oksidatif dengan menangkap senyawa radikal bebas, menghambat peroksidasi lipid, dan dengan mekanisme lainnya (El Jemli et al., 2016).

Nilai AUC andrografolid dari ketiga wilayah yang berbeda, nilai IC_{50} , dan ketinggian geografis merupakan prediktor/variabel independen. Nilai LC_{50} menjadi respon farmakologis/variabel dependen. Terdapat dua model yang menggunakan kelompok prediktor yang berbeda. Model analisis diuji menggunakan nilai AUC dan ketinggian geografis sebagai prediktor nilai respon LC_{50} dan yang kedua adalah nilai AUC dengan IC_{50} sebagai prediktor LC_{50} . Hasil penelitian menunjukkan tidak ada multikolinieritas menggunakan AUC, ketinggian geografis, dan IC_{50} sebagai prediktor.

Tabel 3. Multikolinieritas prediktor AUC dan IC_{50}

No.	Predictor	Sig.	Colinierity tolerance	VIF value	Correlation Sig-1 tailed
1	AUC	0,668	0,646	1,549	0,45
2	IC_{50}	0,150	0,646	1,549	

Tabel 4. Multikolinieritas Prediktor AUC dan Ketinggian Geografis

No.	Predictor	Sig.	Colinierity tolerance	VIF value	Correlation Sig-1 tailed
	AUC	0,454	0,691	1,447	0,60
	Geo. Height	<0,05	0,691	1,447	

Tabel 3 dan 4 menunjukkan prediktor tidak multikolinearitas berdasarkan nilai VIF dan korelasinya. Jika nilai VIF > 10 maka dikatakan multikolinier dan tidak dapat dianalisis dengan regresi linier berganda. Nilai VIF antar prediktor < 10 dikatakan tidak

multikolinear. Demikian juga nilai korelasi antara prediktor AUC dengan IC₅₀ dan AUC dengan ketinggian geografis tidak lebih dari 0,8 sehingga tidak terdapat korelasi yang kuat antar prediktor (Aishah et al., 2019; Daoud, 2018).

Tabel 5. MLR untuk memprediksi LC₅₀

Model	Predictor	R Square	Std. Error	P-Value
1	AUC IC ₅₀	0,496	2,12520	0,128
2	AUC Ketinggian geografis	0,984	0,37336	P <0,05

Penilaian model regresi linier untuk memprediksi aktivitas antikanker dengan LC₅₀ menunjukkan bahwa prediktor AUC dan IC₅₀ memiliki korelasi sebesar 0,496 terhadap LC₅₀ dengan standar *error* 2.12520 dan p-value > 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa prediktor AUC dan IC₅₀ tidak dapat digunakan sebagai model dalam memprediksi respon antikanker sitotoksik dari nilai LC₅₀. Nilai IC₅₀ akan dikaitkan dengan kandungan flavonoid AP (Gani et al., 2018). Pada penelitian ini digunakan nilai AUC andrografolid sebagai senyawa penanda dan IC₅₀ dari ekstrak AP ketiga area yang dikategorikan aktivitas antioksidan lemah (IC₅₀ > 500) (lihat tabel 3). Pada model 2 menggunakan AUC andrografolid dari tiga wilayah berbeda dan ketinggian geografis menunjukkan korelasi yang tinggi terhadap aktivitas sitotoksik antikanker LC₅₀, R² 0,984 dengan standar *error* yang kecil 0,37336 dan nilai p <0,05, yang

menunjukkan pengaruh signifikan terhadap prediktor. Hubungan antara AUC andrografolid dan ketinggian geografis berkorelasi kuat untuk memprediksi aktivitas sitotoksik antikanker dari nilai LC₅₀ (lihat tabel 6). Berdasarkan Pandey et al (2019), perbedaan andrografolid yang dikumpulkan dari lokasi yang berbeda signifikan secara statistik. Hal tersebut menunjukkan bahwa andrografolid dan metabolit sekunder lainnya dapat dipengaruhi oleh lingkungan, faktor musim dan karakteristik tanah. Komposisi kimia tanaman bervariasi tidak hanya di bagian yang berbeda tetapi juga dengan faktor lain seperti daerah tumbuh, kondisi agroklimat, genetik (Pandey et al., 2019). Penelitian Royani et al (2014) menjelaskan bahwa variasi lokasi tumbuh termasuk ketinggian geografis AP menyebabkan perbedaan kandungan metabolit sekunder. Dalam penelitiannya

juga menunjukkan bahwa ketinggian geografis AP berpengaruh terhadap kadar andrographolide. Beberapa AP dengan lokasi pertumbuhan tinggi juga memberikan level andrografolid yang tinggi. Lingkungan kondisi seperti sinar matahari, curah hujan, ketinggian, suhu, tanah, kondisi penyimpanan serta panen yang berbeda prosedur, waktu dan metode pengumpulan, proses pembuatan seperti pemilihan, pengeringan, pemurnian, ekstraksi, dan variabilitas genetik dapat menciptakan variabilitas substansial dalam kualitas produk dan konsentrasi menanam bahan kimia di dalam produk yang berbeda (Kumari & Kotecha, 2016).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode KLT-Spektrofotodensitometri dan analisis MLR (*multi linear regression*) dapat digunakan sebagai kontrol kualitas metabolit sekunder andrografolid melalui kromatogram sidik jari dan spektrum. Metode analisis MLR dapat digunakan untuk memprediksi respon farmakologi sitotoksik AP (LC_{50}) terhadap beberapa prediktor seperti AUC kromatogram sidik jari, IC_{50} , dan ketinggian geografis. Peningkatan konsentrasi AP dari ketiga daerah berbeda pada KLT juga menunjukkan hubungan linier dengan nilai AUC pada kromatogram sidik jari dengan koefisien regresi $> 0,9$. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan bahwa AP dari Twg memiliki toksisitas

lebih dari AP dari Bdg dan Dps dengan LC_{50} 5,08 mg/L ($LC_{50} < 100$). AUC kromatogram AP dan ketinggian geografis menunjukkan korelasi yang kuat terhadap potensi efek sitotoksik antikanker berdasarkan LC_{50} dengan nilai R^2 0,984 dan dengan nilai $p < 0,05$. Nilai AUC dan IC_{50} menunjukkan korelasi yang lemah terhadap potensi efek sitotoksik antikanker berdasarkan LC_{50} dengan R^2 0,496 dan $p > 0,05$.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriawan, I. R., Andrie, M., Susilowati, R., Pramono, S., & Nugroho, A. E. (2015). Homa-Ir Index Evaluation On Antidiabetes Mellitus Effect Of Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees Purified Extract And Andrographolide. *HOMA-IR INDEX EVALUATION ON ANTIDIABETES MELLITUS EFFECT OF Andrographis Paniculata (Burm. f.) Nees PURIFIED EXTRACT AND ANDROGRAPHOLIDE*, 19(1), 19–23. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.8086>
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Aishah, A. F. Q. A., Ummu J, K., Zainuriah, M. R., & Norhilda, A. K. (2019). Multiple linear regression model analysis in predicting fasting blood glucose level in healthy subjects. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 469(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/469/1/012050>
- Bhatt, D., Jethva, K., & Zaveri, M. (2016). Cytotoxicity screening of the commonly used indigenous medicinal plants using brine shrimp lethality bio-assay. *International Journal of*

Pharmaceutical Sciences Review and Research, 37(2), 147–150.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of *andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(0), S17–S29.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1501657>
- Daniel, I. E., & Ibok, E. N. (2019). Toxicological Evaluation of Different Extracts of *Andrographis paniculata*. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 2(4), 1–10.
- Daoud, J. I. (2018). Multicollinearity and Regression Analysis. *Journal of Physics: Conference Series*, 949(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/949/1/012009>
- Das, P., & Srivastav, A. K. (2014). Phytochemical Extraction and Characterization of the Leaves of *Andrographis Paniculata* for Its Anti-Bacterial, Anti-Oxidant, Anti-Pyretic and Anti-Diabetic Activity. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 03(08), 15176–15184.
<https://doi.org/10.15680/ijirset.2014.0308016>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2016). Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016, 6392656.
<https://doi.org/10.1155/2016/6392656>
- Gani, A. P., Pramono, S., Martono, S., & Widayarni, S. (2018). Radical Scavenging Activity Combination of *Sambiloto* (*Andrographis paniculata* Nees.) and *Patikan Kebo* (*Euphorbia hirta* L.) Ethanolic Extracts on 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). *Majalah Obat Tradisional*, 23(3), 79.
<https://doi.org/10.22146/mot.31600>
- Garima Pandey, C. R. (2018). Andrographolide: its pharmacology, natural bioavailability and current approaches to increase its content in *andrographispaniculata*. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 11(4), 355–360.
<https://doi.org/10.15406/ijcam.2018.11.00425>
- Huang, Y., Wu, Z., Su, R., Ruan, G., Du, F., & Li, G. (2016). Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1026, 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.050>
- Indrayanto, G. (2018). Recent development of quality control methods for herbal derived drug preparations. *Natural Product Communications*, 13(12), 1599–1606.
<https://doi.org/10.1177/1934578x1801301208>
- Janakiraman, N., & Johnson, M. (2016). Ethanol Extracts of Selected *Cyathea* Species Decreased Cell Viability and Inhibited Growth in MCF 7 Cell Line Cultures. *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3), 151–155.
<https://doi.org/10.1016/j.jams.2016.09.001>

04.004

- Khan, I., Khan, F., Farooqui, A., & Ansari, I. A. (2018). Andrographolide Exhibits Anticancer Potential Against Human Colon Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death via Augmentation of Intracellular Reactive Oxygen Species Level. *Nutrition and Cancer*, 70(5), 787–803.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1470649>
- Kumari, R., & Kotecha, M. (2016). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 7(2).
<https://doi.org/10.5897/ijbc11.163>
- Li, Y., Shen, Y., Yao, C., & Guo, D. (2020a). Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113215.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113215>
- Li, Y., Shen, Y., Yao, C. liang, & Guo, D. an. (2020b). Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113215.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113215>
- Li, Y., Wang, N., Zhang, M., Ito, Y., Zhang, H., Wang, Y., Guo, X., & Hu, P. (2014). Development of a method to extract and purify target compounds from medicinal plants in a single step: Online hyphenation of expanded bed adsorption chromatography and countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3373–3379.
<https://doi.org/10.1021/ac4035955>
- Marzuki, A., Rahman, L., & Mamada, S. S. (2019). Toxicity test of stem bark extract of banyuru (*Pterospermum celebicum* miq.) using BSLT (brine shrimp lethality test) and cream irritation test. *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(7).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/7/072018>
- Mayilsamy, M., & Geetharamanan, K. (2016). Cytotoxic activity of certain medicinal plants extracts against sea monkey: *Artemia salina*. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*, 19–25.
<https://doi.org/10.19071/jmhe.2016.v2.3083>
- Mishra, S. K., Tripathi, S., Shukla, A., Oh, S. H., & Kim, H. M. (2016). Andrographolide and analogues in cancer prevention. *Frontiers in Bioscience*, 7(2), 292–304.
<https://doi.org/10.2741/e732>
- Mittal, S. P. K., Khole, S., Jagadish, N., Ghosh, D., Gadgil, V., Sinkar, V., & Ghaskadbi, S. S. (2016). Andrographolide protects liver cells from H₂O₂ induced cell death by upregulation of Nrf-2/HO-1 mediated via adenosine A_{2a} receptor signalling. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1860, Issue 11). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.005>
- Nivedheedha, M., & Sivasubramaniyan, C. (2017). Cytotoxicity Studies On Various Extracts Of Andrographis Paniculata And Centella Asiatica Against Human Cancer Cell Lines. *IAJPR*, 7(04), 8354–8356.
- Nothnagel, C. (2012). *Multivariate data analysis using spectroscopic data of fluorocarbon alcohol mixtures*.
- Nugroho, A. E., Andrie, M., Warditiani, N. K., Siswanto, E., Pramono, S., & Lukitaningsih, E. (2012). Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees and andrographolide in high-fructose-fat-fed rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(3), 377–381.
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.96343>
- Okhuarobo, A., Ehizogie Falodun, J., Erharuyi, O., Imieje, V., Falodun, A., & Langer, P. (2014). Harnessing the medicinal properties of Andrographis paniculata for diseases and beyond: A review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pacific Journal*

- of *Tropical Disease*, 4(3), 213–222.
[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60509-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60509-0)
- Pandey, A., Gulati, S., Gupta, A., & Tripathi, Y. (2019). Variation in andrographolide content among different accessions of *Andrographis paniculata*. *The Pharma Innovation Journal*, 8(4), 140–144.
- Paul, T., Basu, S., Practice, N. S.-J. of C. R. and, & 2019, undefined. (2019). Anticancer effect of *Andrographis paniculata* by suppression of tumor altered hypoxia signaling cascade in mouse melanoma cells. *Ejcrp.Org*, 117–123.
<https://doi.org/10.4103/JCRP.JCRP>
- Royani, J. I., Hardianto, D., & Wahyuni, S. (2014). Analisa Kandungan Andrographolide Pada Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Dari 12 Lokasi di Pulau Jawa. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 1(1), 15.
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v1i1.547>
- Sharma, M., & Sharma, R. G. (2013). Identification, purification and quantification of Andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm. F.) nees by HPTLC at different stages of life cycle of crop. *Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 23–32.
- Shofa, A. F., Alam, T., & Nuralih. (2021). Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Polar, Semipolar, dan Non-Polar Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap Sel Kanker Hati (HepG2) Cytotoxic. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 12(1), 25–30.
- Tan, M. C. S., Oyong, G. G., Shen, C. C., & Ragasa, C. Y. (2016). Secondary metabolites from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) nees. *Der Pharmacia Lettre*, 8(13), 157–160.
- Thangapandi, V., & Pushpanathan, T. (2014). Comparison of the *Artemia salina* and *Artemia franciscana* bioassays for toxicity of Indian medicinal plants. *Journal of Coastal Life Medicine*, April.
<https://doi.org/10.12980/jclm.2.201414j29>
- Therasa, S. A., Sobiya, G., & Parimala, S. M. (2020). Leaves of *Andrographis paniculata* Is an Antioxidant and Anticancer Agent. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 13(8), 213–217.
<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i8.37014>
- Tistaert, C., Dejaegher, B., Chataigné, G., Rivière, C., Nguyen Hoai, N., Van, M. C., Quetin-Leclercq, J., & Vander Heyden, Y. (2012). Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification. *Analytica Chimica Acta*, 721, 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.058>
- Warditiani, N. K., Sari, P. M. N. A., Ramona, Y., & Wirasuta, M. A. G. (2020). Molecular pharmacology study of andrographolide extracted from *andrographis paniculata* on atherosclerosis preventive effect. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 201–206.
<https://doi.org/10.31838/srp.2020.9.33>
- Warditiani, N. K., Susanti, N. M. P., Arisanti, C. I. S., Putri, N. P. R. D., & Wirasuta, I. M. A. G. (2017). Antidyslipidemia and Antioxidant Activity of Andrographolide Compound From Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Herb. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(7), 59.
<https://doi.org/10.22159/ijpps.2017.v9i7.18109>
- Welz, A. N., Emberger-Klein, A., & Menrad, K. (2018). Why people use herbal medicine: Insights from a focus-group study in Germany. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12906-018-2160-6>
- WHO. (2019). WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019. In *World Health Organization*.
- Wirasuta, I. M. A. G., Srinadi, I. G. A. M.,

Dwidasmara, I. B. G., Ardiyanti, N. L. P. P., Trisnadewi, I. G. A. A., & Paramita, N. L. P. V. (2017). Authentication of Piper betle L. folium and quantification of their antifungal-activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.08.006>

Zou, W., Xiao, Z., Wen, X., Luo, J., Chen, S., Cheng, Z., Xiang, D., Hu, J., & He, J. (2016). The anti-inflammatory effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees on pelvic inflammatory disease in rats through down-regulation of the NF-KB pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1466-5>