

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu: Determinasi sampel, ekstraksi sampel dengan pelarut etanol kemudian difraksi dengan n-heksan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* diuji secara kualitatif menggunakan KLT, uji antioksidan dengan metode DPPH, uji sitotoksik dengan metode MTT yang dilihat dari nilai  $IC_{50}$  dan uji secara *in silico* menggunakan senyawa Ageratokromen dengan protein HER-2.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Proses ekstraksi herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY dan uji sitotoksik terhadap sel MCF-7 dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2016 hingga Februari 2017.

#### **C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Operasional**

##### **1. Variabel Penelitian**

###### **a. Uji Antioksidan**

(1) Variabel Bebas :Konsentrasi fraksi n-heksan herba bandotan  
(*Ageratum conyzoides L.*)

(2) Variabel Tergantung : Daya Antioksidan (IC<sub>50</sub>) terhadap DPPH.

(3) Variabel Terkendali : Konsentrasi DPPH, OT (*Operating Time*),

$$\lambda_{\max}.$$

b. Uji Sitotoksik

(1) Variabel Bebas : Konsentrasi fraksi n-heksan herba bandotan  
(*Ageratum conyzoides L.*)

(2) Variabel Tergantung : Konsentrasi hambat (IC<sub>50</sub>) terhadap sel  
kanker payudara.

(3) Variabel Terkendali : Media biakan, Suhu dan waktu inkubasi.

## 2. Definisi Operasional

a. IC<sub>50</sub> (*Inhibitor Concentration*)

Nilai IC<sub>50</sub> pada uji antioksidan menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> berarti semakin kuat daya antioksidannya. Nilai IC<sub>50</sub> pada uji sitotoksik menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC<sub>50</sub> maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Zou, *et al.*, 2004).

## D. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

**Tabel 1.** Alat-Alat Penelitian

No	Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
1	Alat-alat Gelas	<i>Pyrex</i> ®
2	Timbangan Analitik	<i>Sartorius</i> ®
3	Alumunium foil	<i>Brand</i> ®
4	Tabung konikal 15 ml steril	<i>Falcon</i> ®
5	Mikropipet	<i>Gilson</i> ®
6	<i>Blue tip</i>	<i>Brand</i> ®
7	Eppendorf	<i>Brand</i> ®
8	Autoklaf	<i>Hirayama</i> ®
9	Vorteks	<i>Labinco</i> ® L46
10	<i>Shaker</i>	<i>Gemmy</i> ®
11	Inkubator CO <sub>2</sub>	<i>Heraceus</i> ®
12	Laminar Air Flow Hood	<i>Labconco</i> ®
13	Tissue culture flask	<i>Nunc</i> ®
14	Centrifuge	<i>Sorvall</i> ®
15	Haemositometer	<i>Nebauer</i> ®
16	Cell counter, yellow tip	<i>Brand</i> ®
17	Lampu UV 254 nm dan 366 nm	
18	Oven	<i>Memmert</i> ®
19	Spektrofotometer UV-Vis	<i>Shimadzu</i> ®
20	Mikroskop inverted	<i>Zeiss</i> ®
21	96-Well plate	<i>Nunc</i> ®
22	ELISA reader	<i>Bio-Rad</i> ®
23	Seperangkat Komputer	<i>Lenovo</i>

## 2. Bahan Penelitian

**Tabel 2.** Bahan-bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Sumber/Merek dan Tipe
1	Etanol 70%	Bratachem®/grade pro analisis
2	N-Heksan	General Labora®/grade teknis
3	2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH)	Chemistry Mix®/grade pro analisis
4	Metanol	Bratachem®/grade pro analisis
5	Kloroform	
6	Aquadest	General Labora®/grade teknis
7	Sel kanker payudara MCF-7	Koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM
8	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) yang mengandung:	
	a. Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v)	Gibco®/grade pro analisis
	b. Penisilin-streptomisin 1% (v/v)	Gibco®/grade pro analisis
9	Larutan pencuci Phospat Buffer Saline (PBS)	Calbiochem®/grade pro analisis
10	Dimetil sulfoksida (DMSO)	Calbiochem®/grade pro analisis
11	MTT 5 mg/ml dalam media kultur	Calbiochem®/grade pro analisis
12	Reagen stopper sodium dodesil sulfat (SDS) dalam HCL 0,1%	Merck®/grade pro analisis
13	Tripsin-EDTA	Calbiochem®/grade pro analisis
14	Silika Gel F <sub>254</sub>	Bratachem®/grade pro analisis

## **E. Cara Kerja**

### **1. Determinasi Tanaman**

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta.

### **2. Ekstraksi dan Fraksinasi**

Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dipanen kemudian dibersihkan, dipotong tipis dan ditutupi kain hitam lalu dikeringkan dengan sinar matahari selama 5 hari kemudian dibuat serbuk simplisia.

Serbuk simplisia yang disari dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 yaitu dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam etanol 70% selama 5 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari agar penyarian sempurna. Setelah 5 hari, maserat yang diperoleh disaring dan diremaserasi selama 3 hari untuk mengoptimalkan hasil ekstrak. Selanjutnya, hasil maserat difraksinasi partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan, sebanyak 95% dari ekstrak dengan perbandingan 1:1 (n-heksan : ekstrak). Fraksi n-heksan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C. setelah fraksi n-heksan dipekatkan kemudian dikentalkan dengan *waterbath*.

### **3. Identifikasi Senyawa dengan KLT**

Uji KLT dilakukan dengan cara menotolkan sampel larutan uji yaitu fraksi n-heksan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada plat dengan bantuan pipa kapiler kemudian dielusikan dengan fase gerak di dalam bejana yang tertutup rapat. Untuk identifikasi senyawa yang terkandung

dalam fraksi n-heksan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Fase gerak yang digunakan adalah kloroform dan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>.

#### 4. Uji Antioksidan dengan DPPH

##### a. Pembuatan Larutan DPPH 0.4 mM

Sejumlah 15,8 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol hingga 25 ml. Sebanyak 10.0 ml larutan DPPH diambil dan ditambahkan metanol hingga volume 100 ml.

##### b. Persiapan Larutan Uji Dari Fraksi N-Heksan Herba Bandotan

###### (1) Pembuatan Larutan Induk Sampel dan Standar

Sampel fraksi n-heksan bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dikeluarkan dari lemari pendingin dan didiamkan hingga suhu kamar. Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan metanol hingga 20 ml. Diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/ml. Vitamin C ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam metanol 100 ml dan didapatkan kadar 50 µg/ml.

###### (2) Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi Sampel dan Standar

Lima larutan seri kadar dibuat dari larutan induk dengan cara memipet sejumlah sampel dan dilarutkan dengan pelarut metanol. Seri kadar fraksi n-heksan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) 100 µg/ml; 200 µg/ml; 300 µg/ml; 400 µg/ml dan 500 µg/ml dan seri kadar Vitamin C adalah 1 µg/ml; 2 µg/ml; 3 µg/ml; 4 µg/ml dan 5 µg/ml.

(3) Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 5 ml metanol ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0.4 mM.

(4) Pembuatan Larutan Blanko

Sebagai blanko digunakan larutan sampel masing-masing konsentrasi sebanyak 3 ml.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 1000  $\mu$ l larutan DPPH dan 1000  $\mu$ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan *spectra* panjang gelombang larutan tersebut kemudian dibaca pada rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari *spectra* panjang gelombang.

d. Penentuan *Operating Time* Sampel

Sebanyak 1000  $\mu$ l larutan DPPH dan 1000  $\mu$ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Absorbansi larutan tersebut dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh selama 90 menit. Waktu stabil ditentukan dari absorbansi larutan sampel.

e. Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Herba Bandotan

Larutan seri kadar standar dan sampel yang telah dibuat sebelumnya disiapkan. Ambil 5 ml fraksi n-heksan dan Vitamin C untuk masing-masing kadar lalu tambahkan 1 ml DPPH 0.4 mM dan homogenkan dengan *vortex* kemudian diamkan selama 30 menit dalam

ruang tertutup. Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH, lalu dilakukan perhitungan nilai  $IC_{50}$  dengan mengolah data absorbansi sampel menjadi % antioksidan.

## 5. Uji Sitotoksik

### b. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu  $121^{\circ}C$  dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilkan dengan sinar UV selama 20 menit, disemprot etanol 70% dan dilap.

### c. Pembuatan Larutan Media dan Media Kultur

Larutan DMEM dibuat dengan melarutkan DMEM dalam aquadest, ditambah 2,2 gram  $NaHCO_3$ . Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl encer 1 N hingga pH 7,2-7,4 diukur dengan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril  $0,2 \mu m$  secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan DMEM steril dengan FBS 10% dan penisilin streptomisin 1% secara aseptis didalam LAF.

### d. Preparasi Sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, dicairkan pada suhu  $37^{\circ}C$ , kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal



steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

e. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut, cuci sel diulang 2 kali dengan PBS, tambahkan 1 ml larutan tripsin 0.25% pada sel, diamkan selama 3 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur agar diperoleh konsentrasi sel sebesar  $5 \times 10^3$  sel/100  $\mu$ l dan siap untuk penelitian.

f. Pembuatan Larutan Uji

Fraksi n-heksan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dibuat stok dengan kadar  $10^5$   $\mu$ g/ml dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi tidak lebih dari 0.2%. Selanjutnya dari larutan stok

tersebut dibuat seri konsentrasi yang akan diujikan yaitu 62.5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml dalam media kultur.

g. Uji Sitotoksik dengan Metode MTT (Mossman, 1983)

Sel dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/100 µl MK didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran masing-masing 100 µl dan disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media lalu diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 50 µL media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau fraksi n-heksan bandotan setiap seri konsentrasi dan direplikasi sebanyak 3 kali lalu masing-masing ditambah 50 µl MK untuk kontrol sel ditambahkan 100 µl MK ke dalam sumuran yang telah berisi sel dan direplikasi lalu diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT dibuat dengan cara melarutkan 50 mg serbuk MTT dan dilarutkan dalam 10 ml PBS, reagen MTT untuk perlakuan dibuat dengan cara mengambil 1 ml stok MTT 5 mg/ml dan diencerkan dalam 10 ml MK sehingga didapat konsentrasi 0,5 mg/ml. Lalu media kembali dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 100 µl MTT 0,5 mg/ml kesetiap sumuran lalu diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C, sel yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS 10% dalam HCl 0,1 N untuk melarutkan kristal

formazan. Digoyangkan diatas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## 6. *Docking* Molekuler

### a. Pengunduhan Aplikasi *Autodock Vina* dan Aplikasi Pendukung

Aplikasi *Autodock Vina* merupakan aplikasi *Molecular Docking* yang bisa didapatkan secara gratis. Untuk melakukan kegiatan *Molecular Docking* menggunakan *Autodock Vina*, diperlukan beberapa aplikasi seperti berikut:

- 1) *Autodock Vina* digunakan untuk melakukan proses *Molecular Docking* dan dapat diunduh di situs <http://vina.scripps.edu/download.html>
- 2) *DS Visualizer* digunakan untuk preparasi reseptor target dan ligan yang akan diuji serta visualisasi hasil *Molecular Docking* dan dapat diunduh di situs <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>
- 3) *MGLTools* atau *AutodockTools* digunakan untuk mengolah reseptor target dan ligan uji, dapat diunduh di situs <http://mgltools.scripps.edu/downloads>
- 4) *Python* digunakan untuk menjalankan aplikasi yang menggunakan bahasa pemrograman seperti *MGLTools*, dapat diunduh di situs <http://www.python.org/ftp/python/2.5.2/python-2.5.2.msi>
- 5) *YASARA* digunakan untuk mengukur nilai RMSD dan dapat diunduh di situs <http://www.yasara.org/viewdl.htm>

6) *Open Babel* digunakan untuk mengkonversi hasil *docking* dari format PDBQT menjadi PDB sehingga dapat divisualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dan dapat diunduh di situs <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>

b. Pengunduhan Reseptor Protein

Reseptor HER-2 yang dibutuhkan untuk melakukan *Molecular Docking* dapat diunduh secara gratis pada *Protein Data Bank* (PDB) di situs [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) dengan PDB ID: 3PP0 dan data yang diperoleh berupa struktur, ligan asli (*Native ligand*), sisi aktif dan sekuen.

c. Preparasi Protein Target dan Ligan Uji

Reseptor target (3PP0) yang telah didapatkan dengan format PDB siap untuk dilakukan preparasi protein dengan menggunakan *DS Visualizer*. Buka dokumen yang telah diunduh dan pastikan reseptor tersebut bebas dari molekul air, hemoglobin dan sebagainya kemudian simpan reseptor yang sudah dipreparasi tersebut dengan nama 3PP0.pdb.

Untuk preparasi ligan asli sebagai ligan uji dapat menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dengan cara membuka file 3PP0.pdb yang sudah disimpan kemudian hapus residu proteinnya dan sisakan bagian ligan lalu simpan dengan nama dokumen ligan.pdb. Untuk ligan selain ligan asli maka dipreparasi dengan cara mengunduh struktur ligan dengan tipe dokumen .sdf, dalam penelitian ini ligan yang digunakan adalah doxorubicin dan Ageratokromen. Dokumen yang diperoleh

kemudian diubah formatnya menjadi .pdb dengan aplikasi *Open Babel*. Protein, ligan asli dan ligan lainnya yang telah dipreparasi kemudian siap untuk diuji secara *In Silico* dengan *Autodock Vina*.

d. Konversi File Reseptor dan Ligan dalam Bentuk PDBQT

Aplikasi *Autodock Vina* hanya dapat dijalankan dengan tipe dokumen .pdbqt sehingga tipe dokumen reseptor dan ligan uji harus diubah terlebih dahulu dari .pdb menjadi .pdbqt menggunakan *MGLTools* atau *Autodock Tools*. Pada aplikasi *Autodock Tools* ditambahkan hidrogen, lalu disimpan dengan nama dokumen 3PP0.pdbqt dan disimpan pada program aplikasi Vina di *drive* :C komputer. Untuk mengatur luas wilayah *docking* dapat digunakan submenu *Grid* dan pilih *Grid Box* kemudian atur luas wilayah *docking* yang diinginkan. Luas wilayah *docking* akan mempengaruhi nilai RMSD pada setiap konformasi, sehingga untuk mendapatkan nilai RMSD dibawah 2 Å dibutuhkan beberapa kali penyesuaian luas wilayah *docking*. Dokumen kemudian disimpan di berkas Vina dengan nama ligan.pdbqt.

e. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina*

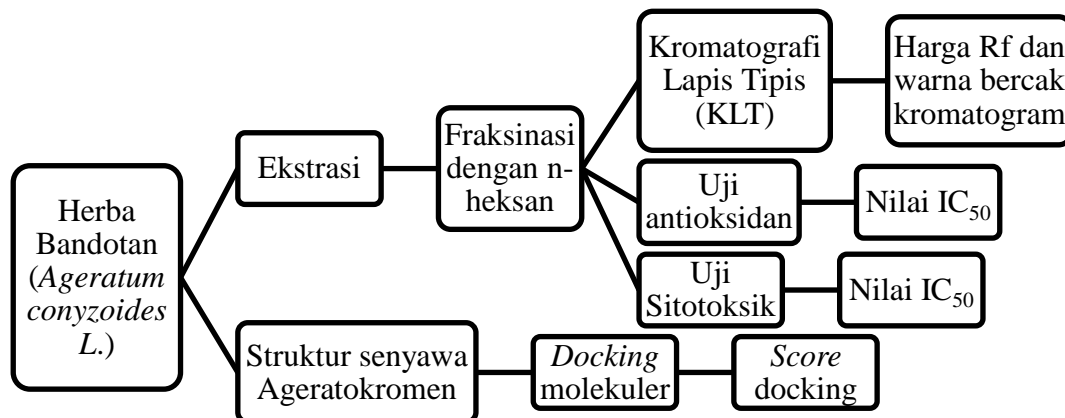
Sebelum menjalankan fungsi *docking*, pastikan dokumen 3PP0.pdbqt dan ligand.pdbqt telah berada di berkas Vina. Kemudian buat dokumen baru dan beri nama conf.txt. Formulir pada dokumen conf.txt diisi dengan keterangan yang sesuai dengan proses *docking* yang dilakukan. Bagian *receptor* diisi dengan 3PP0.pdbqt, bagian

*ligand* diisi dengan *ligand.pdbqt*, *center\_x*, *y*, *z* dan *size\_x*, *y*, *z* diisi dengan nilai yang sesuai dengan yang tertera pada *grid box*. Setelah selesai dokumen disimpan di berkas Vina. Untuk menentukan nilai RMSD sehingga dapat dipilih konformasi yang akan divisualisasikan, maka dilakukan dengan mengisi *Command Prompt Windows*. Ketikkan kode pada *Command Prompt Windows* dan tunggu hingga prosesnya selesai sehingga akan muncul nilai afinitas dan RMSD pada setiap konformasinya (ada 9 konformasi). Pilih konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Dokumen *output.pdbqt* dipecah menjadi masing-masing konformasi sehingga lebih mudah untuk dianalisis dan divisualisasikan. Hasil pemecahan akan muncul di berkas Vina.

f. Visualisasi Hasil *Docking*

Proses visualisasi hasil *docking* dapat dilakukan dengan aplikasi *DS Visualizer*. Hasil visualisasi kemudian dianalisis sehingga diketahui posisi dan gambaran ikatan protein dengan setiap ligan yang diujikan. Sebelum dilakukan visualisasi, dokumen dengan tipe *.pdbq* diubah terlebih dahulu menjadi tipe *.pdb* dengan bantuan aplikasi *Open Babel*. Visualisasi menggunakan *DS Visualizer* untuk melihat posisi ligan (*Define Ligan*) dan interaksinya (*Ligand Interaction*) secara 3 dimensi (3D) sehingga akan terlihat dengan jelas letak ikatan ligan dan protein serta gambaran ikatannya. Untuk memperjelas visualisasi, latar warna dapat diubah dan protein bisa dilabeli dengan asam amino.

## F. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

## G. Analisis dan Pengolahan Data

### 2. Analisis Identifikasi Senyawa dengan KLT

Frakasi n-heksan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang telah dielusi menggunakan kloroform kemudian diuapi amoniak untuk identifikasi senyawa pada bandotan. Perubahan warna pada spot dilihat pada sinar tampak (visibel),  $UV_{254}$  nm dan  $UV_{366}$  nm serta diukur nilai Rf pada plat.

### 3. Analisis Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH. Data yang didapat dari hasil pembacaan spektrofotometer UV berupa absorbansi masing-masing larutan uji dihitung nilai  $IC_{50}$  berdasarkan presentase inhibisi, DPPH dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang dihitung dari setiap konsentrasi selanjutnya digunakan untuk perhitungan  $IC_{50}$ . *Inhibitory Concentration*

50% ( $IC_{50}$ ) adalah nilai konsentrasi suatu bahan untuk menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Setelah didapatkan presentase inhibisi, kemudian ditentukan persamaan  $y=a+bx$  dengan perhitungan secara regresi linear dimana  $x$  adalah konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan  $y$  adalah presentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi didapat dari nilai  $x$  setelah menggantikan  $y=50$ .

**Tabel 3.** Tingkat Kekuatan Antioksidan dengan Metode DPPH (Mardawati, *et al.*, 2008).

Tingkat Kekuatan Antioksidan	Nilai $IC_{50}$
Lemah	>150 $\mu\text{g/ml}$
Sedang	101-150 $\mu\text{g/ml}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/ml}$
Sangat Kuat	<50 $\mu\text{g/ml}$

#### 4. Analisis Uji Sitotoksik

Analisis data pada uji sitotoksitas aplikasi tunggal, data yang didapat dari ELISA *reader* berupa hasil absorbansi. Data yang diperoleh dari hasil pembacaan ELISA *reader* ( $\lambda=595$  nm) berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonservasi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol media sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai  $IC_{50}$  untuk mengetahui potensi sitotoksiknya. Nilai  $IC_{50}$  adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter



sitotoksik. Nilai  $IC_{50}$  dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

**Tabel 4.** Klasifikasi Nilai  $IC_{50}$  sebagai Sitotoksik (Weerapreeyakul, *et al.*, 2012).

<b>Tingkat Kekuatan Sitotoksik</b>	<b>Nilai <math>IC_{50}</math></b>
Cukup Toksik	101-500 $\mu\text{g/ml}$
Toksik	10-100 $\mu\text{g/ml}$
Sangat Toksik	<10 $\mu\text{g/ml}$

## 5. Analisis *Docking* Molekuler

Dilakukan analisis data nilai skoring dan pose. Molekul dengan nilai skor terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik, setelah itu visualisasi interaksi dengan menggunakan program *Ds Visualizer*.