

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman

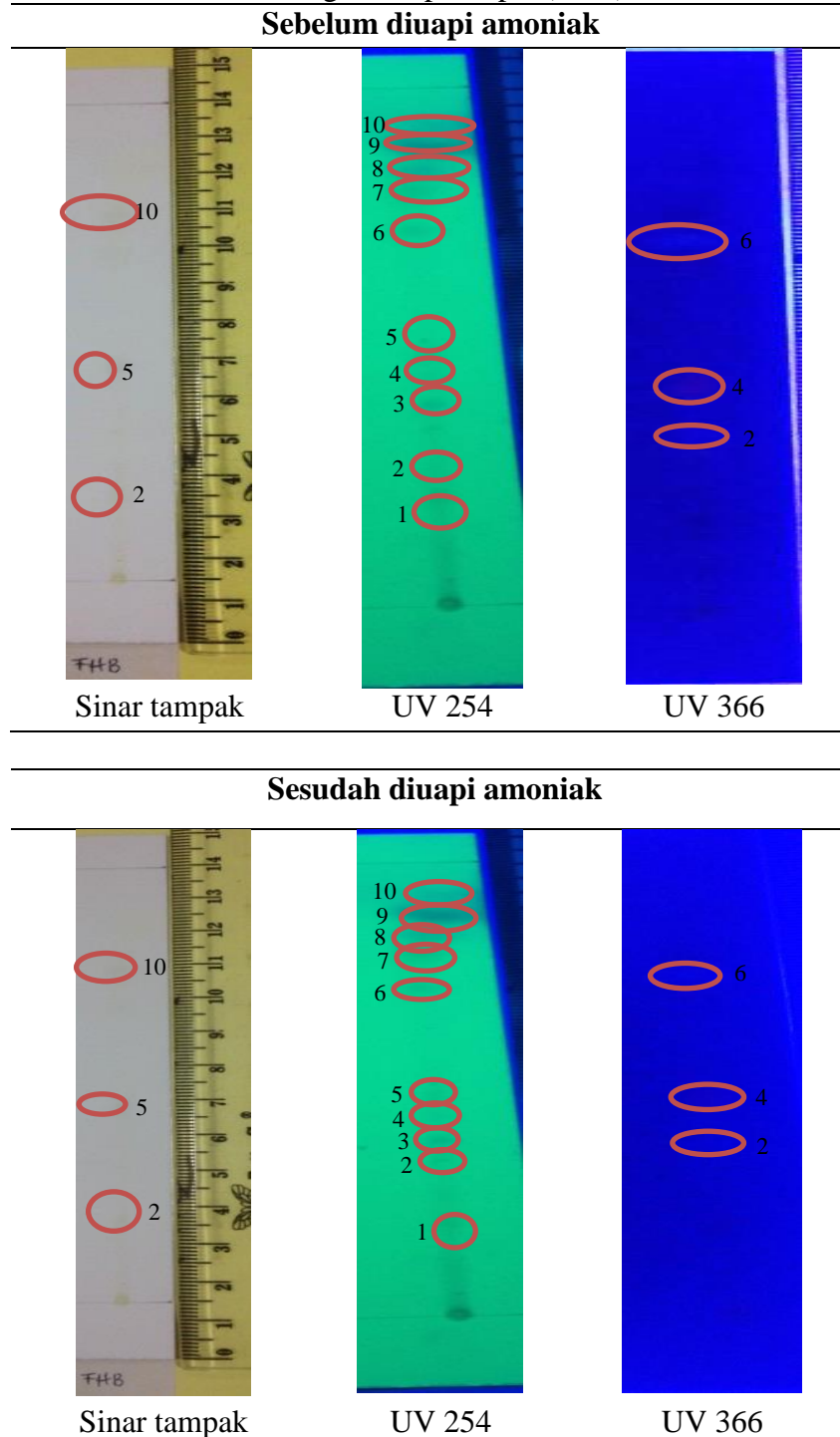
Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel yang diuji. Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Bantul, Yogyakarta. Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang diujikan merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dan termasuk ke dalam suku Asteraceae (Lampiran 1).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) sebanyak 1.2 kg serbuk kering diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 selama 5 hari kemudian diremaserasi dengan perbandingan yang sama selama 2 hari. Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan sehingga didapatkan ekstrak cair sebanyak 8.82 L dan kemudian difraksinasi dengan metode partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Dari 1.1 L ekstrak etanol dan 1.1 L n-heksan menghasilkan 1 L Fraksi N-heksan Bandotan (FNB) yang kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* dan didapatkan sebanyak 1.5 gram FNB dengan menghasilkan rendemen 1.03 % (Lampiran 2).

3. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Untuk mengetahui senyawa yang terdapat dalam sampel FNB dilakukan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi tersebut. Identifikasi dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji ini dilakukan dengan menotolkan sampel FNB pada plat silika gel GF254 yang merupakan fase diamnya sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform. Larutan stok dibuat dengan kadar 25 mg/ml yang dilarutkan dalam n-heksan. Plat dimasukkan ke dalam bejana yang berisi fase gerak yang telah jenuh hingga terjadi elusi dan kemudian plat diuapi dengan uap amoniak. Sebelumnya telah dilakukan beberapa percobaan KLT dengan berbagai jenis fase gerak untuk mendapatkan plot dengan hasil pemisahan terbaik (tanpa *tailing*). Berdasarkan hasil percobaan tersebut, kloroform menunjukkan pemisahan terbaik bila dibandingkan dengan fase gerak yang lain.

Tabel 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) FNB

Pada pengamatan kromatogram memperlihatkan adanya warna yang samar pada pengamatan secara visibel sebelum dan setelah diuapi

amoniak pada sampel FNB sedangkan pada pengamatan di bawah sinar UV 254 dan UV 366 nm menunjukkan 10 bercak pada sampel FNB dan menunjukkan adanya fluoresensi kuning dan merah (Tabel 6), nilai Rf dan warna bercak pada pengamatan KLT dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 2. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) FNB

Nomor Bercak	Nilai Rf	Warna Bercak			
		Sinar Tampak		UV 254	UV 366
		Tanpa Uap NH ₃	Dengan Uap NH ₃	Dengan/tanpa Uap NH ₃	Dengan/tanpa Uap NH ₃
1	0.2	Kuning tua	Kuning	Kuning	-
2	0.28	-	-	Kuning	Kuning
3	0.32	-	-	Ungu tua	-
4	0.33	-	-	Ungu muda	Merah
5	0.48	Hijau	Hijau	Ungu muda	-
6	0.68	-	-	Kuning	Kuning
7	0.76	-	-	Kuning	-
8	0.8	-	-	Ungu muda	-
9	0.84	-	-	Ungu tua	-
10	0.88	Kuning	Kuning	Kuning	-

Fraksi n-heksan bandotan mengandung alkaloid pada bercak nomor 1, 2, 8, 9 dan 10 serta mengandung steroid pada bercak nomor 6 dengan warna bercak yaitu kuning pada pengamatan UV 366 nm.

4. *Docking Molekuler*

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan secara *in silico* dengan molekuler *docking* menggunakan aplikasi Autodock Vina dan aplikasi pendukung lainnya seperti DS *Visualizer* untuk menampilkan struktur dan interaksi ligan protein serta *Open Babel* untuk mengkonversi tipe file. Nilai RMSD dan skor *docking* dari setiap ligand ditunjukkan oleh tabel 8.

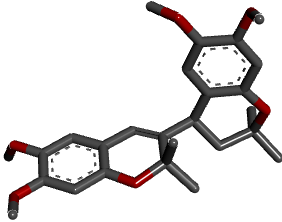
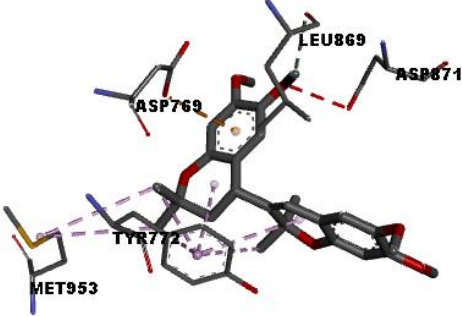
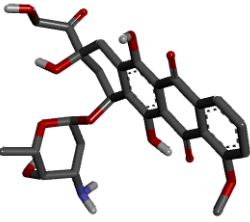
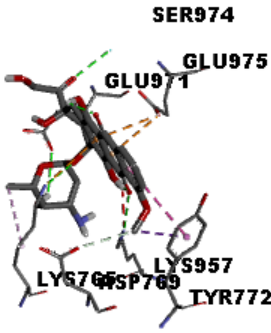
Tabel 3. Skor Docking Ageratokromen terhadap Protein Target HER-2

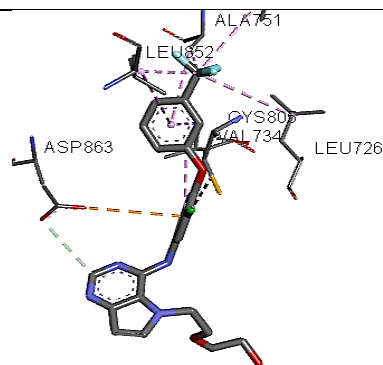
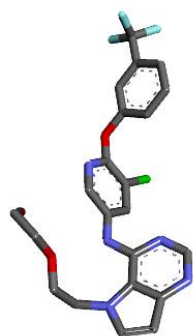
No.	Nama Senyawa	Nilai RMSD ($<2.00 \text{ \AA}$)	Skor	
			<i>Docking</i> (kcal/mol)	Konformasi
1.	Ageratokromen	1.818 \AA	-6.2	Konformasi ke-8
2.	<i>Native Ligand</i>	1.795 \AA	-6.8	Konformasi ke-5
3.	<i>Native Ligand</i>	1.896 \AA	-6.6	Konformasi ke-2
4.	Doxorubicin	1.572 \AA	-6.9	Konformasi ke-2

Setiap senyawa uji akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda-beda sehingga dipilih konformasi dengan nilai RMSD $<2 \text{ \AA}$. Senyawa Ageratokromen dipilih konformasi yang ke-8 dengan nilai RMSD 1.818 \AA dan skor *docking* -6.2 kcal/mol. Ligan asli (*Native Ligand*) memiliki nilai RMSD 1.795 \AA dan 1.896 \AA dan memiliki nilai skor *docking* -6.8 dan -6.6 kcal/mol masing-masing pada konformasi ke-5 dan ke-2, lebih rendah dari senyawa Ageratokromen. Doxorubicin memiliki nilai RMSD 1.572 \AA dengan skor *docking* -6.9 kcal/mol pada konformasi ke-2, lebih rendah dari senyawa Ageratokromen dan lebih rendah dari ligan asli sehingga kestabilan interaksi senyawa Ageratokromen tidak lebih baik dari Doxorubicin dan ligan asli terhadap protein HER-2.

Senyawa uji yang telah di-*docking* dengan Autodock Vina dapat diamati interaksinya secara visual menggunakan aplikasi DS *Visualizer*. Senyawa yang ditambahkan pada protein HER-2 akan berinteraksi dengan residu asam aminonya dan memungkinkan terjadinya ikatan antara senyawa uji dan protein, hal ini dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 4. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dan Protein HER-2

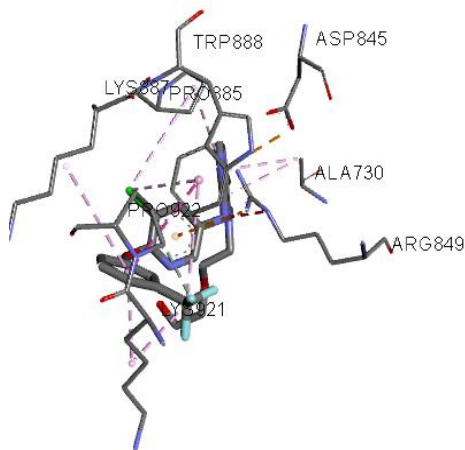
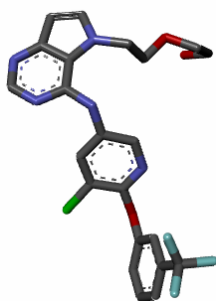
No.	Senyawa Uji	Potensi Ikatan Asam Amino
1.	Ageratokromen	Asparagin (ASP871, ASP769), Leusin (LEU869), Tirosin (TYR772), dan Metionin (MET953). Visualisasi ikatan antara Ageratokromen dan HER-2.
		
2.	Doxorubicin	Serin (SER974), Asam Glutamat (GLU975, GLU971), Lisin (LYS957, LYS765), Asparagin (ASP769) dan Tirosin (TYR772). Visualisasi ikatan antara Doxorubicin dan HER-2
		
3.	<i>Native Ligand</i>	Asparagin (ASP863), Leusin (LEU726, LEU852), Valin (VAL734), Sistein (CYS805) dan Alanin (ALA751). <i>Visualisasi Native Ligand.</i>



4. *Native Ligand*

Triptofan (TRP888), Asparagin (ASP845), Lysin (LYS887, LYS921), Prolin (PRO885), Alanin (ALA730), Arginin (ARG849) dan Prolin (PRO922).

Visualisasi *Native Ligand*.

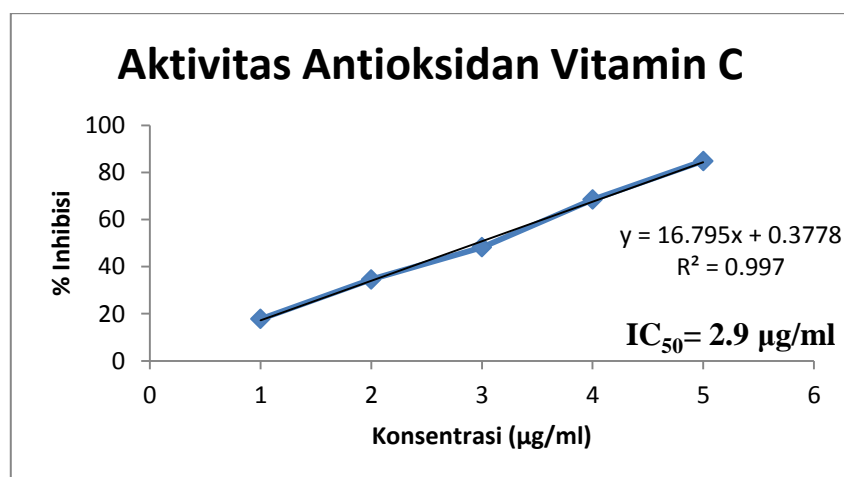
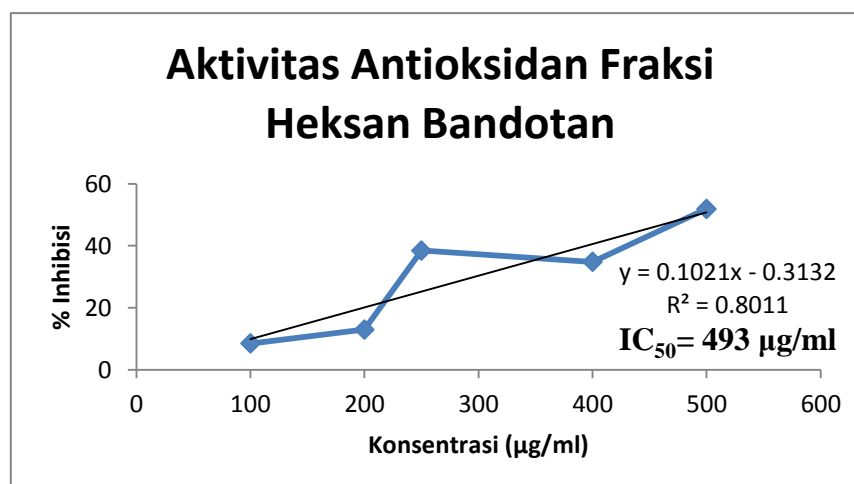


5. Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Daya antioksidan pada fraksi n-heksan bandotan dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Vitamin C dipilih sebagai pembanding dalam uji ini. Berikut adalah hasil uji penangkapan radikal bebas DPPH oleh Vitamin C dan fraksi n-heksan bandotan:

Tabel 5. Uji Aktivitas Antioksidan FNB

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata % inhibisi
Vitamin C	1	17.80744
	2	34.53074
	3	48.19579
	4	68.47087
	5	84.81392
Fraksi FNB	100	8.42674
	200	12.94001
	250	38.48574
	400	34.77876
	500	51.8879

**Gambar 1.** Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C terhadap DPPH**Gambar 2.** Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Bandotan terhadap DPPH

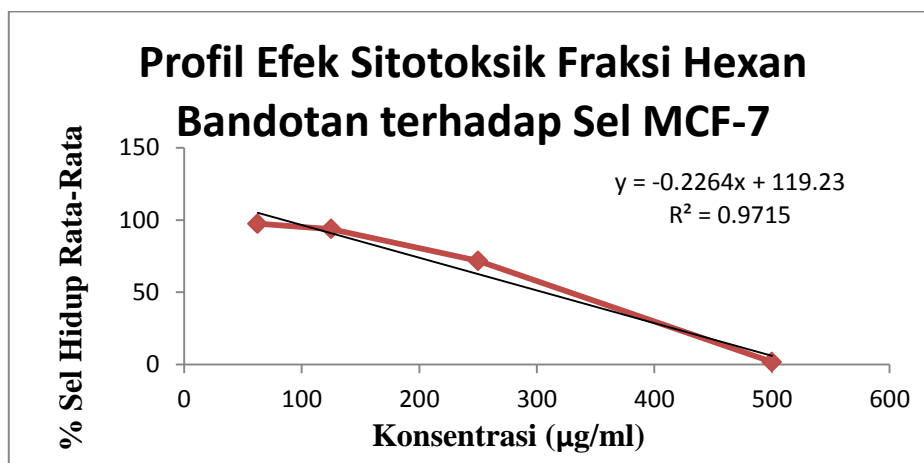
Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan yang dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus % inhibisi (Lampiran 4). Konsentrasi Vitamin C dan fraksi n-heksan bandotan yang dihubungkan dengan nilai % inhibisi akan menghasilkan suatu persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier Vitamin C dan fraksi n-heksan yang didapat berturut-turut adalah $y=16.795x + 0.3778$ dengan $R^2=0.997$ dan $y=0.1021x - 0.3132$ dengan $R^2=0.8011$. Persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (sumbu x) dengan cara memasukkan nilai 50 kedalam sumbu y pada persamaan regresi linier yang diperoleh. Hasil perhitungan menunjukkan nilai IC_{50} Vitamin C sebesar 2.9 $\mu\text{g/ml}$ untuk nilai IC_{50} fraksi n-heksan bandotan yaitu 493 $\mu\text{g/ml}$.

6. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik pada penelitian ini merupakan pengujian lanjutan untuk mengetahui aktivitas kemopreventif dari FNB dengan menggunakan sel MCF-7. Penelitian ini menggunakan metode *MTT assay*, hasil uji sitotoksik akan menghasilkan nilai IC_{50} .

Tabel 6. Persen Hidup sel MCF-7 dengan Perlakuan N-Heksan Bandotan

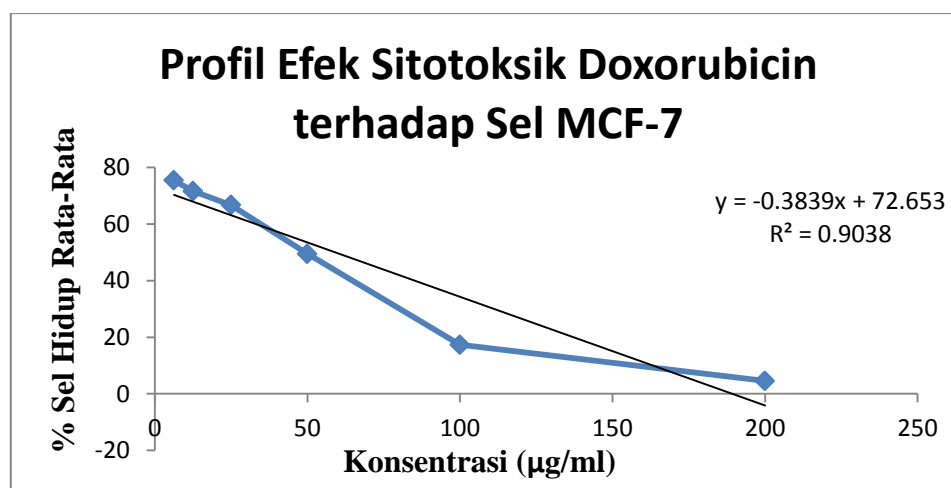
Rata-rata Absorbansi Kontrol Sel		Konsentrasi (µg/ml)	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi	Persamaan
		500	1.730987514	0.695087895	
0.0678	0.0918	250	71.76503973	4.247057193	$y = -0.2264x + 119.23$
		125	93.78547106	3.858416148	$R^2 = 0.9715$
		62.5	97.41770715	6.59564798	$IC_{50} = 306 \mu\text{g/ml}$



Gambar 3. Grafik Hasil Uji Sitotoksik Fraksi N-Heksan Bandotan terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Tabel 7. Persen Hidup sel MCF-7 dengan Perlakuan Doxorubicin

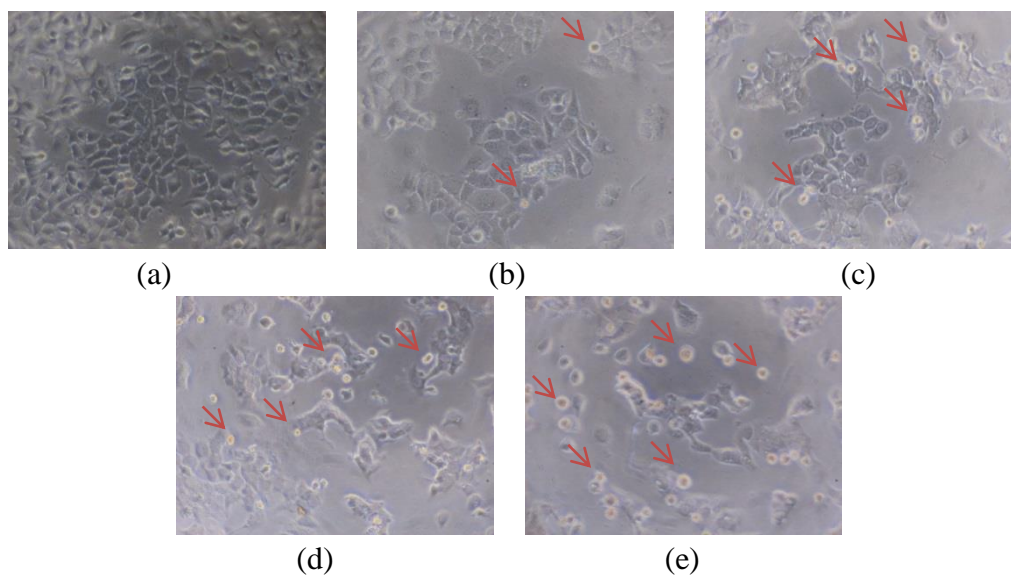
Rata-rata Absorbansi Kontrol Sel		Konsent rasi (µg/ml)	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi	Persamaan
0.0678	0.0918	200	4.531946508	0.210135745	
		100	17.31054978	1.917308752	
		50	49.40564636	1.736006158	$y = -0.403x + 108.12$
		25	66.64190193	3.132714509	$R^2 = 0.921$
		12.5	71.54531947	0.735475107	IC₅₀ = 59 µg/ml
		6.25	75.33432392	0.639102917	



Gambar 4. Grafik Hasil Uji Sitotoksik Doxorubicin terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Berdasarkan hasil uji sitotoksik FNB, konsentrasi terendah yaitu 62.5 µg/ml mampu membunuh 2.582 % sel MCF-7 (100-97.418%), sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 500 µg/ml mampu membunuh 98.269 % sel MCF-7 (100-1.731%). Adapun nilai IC₅₀ fraksi n-heksan adalah 306 µg/ml yang terletak antara kadar 250 µg/ml dan 500 µg/ml. Linieritas yang tinggi menunjukkan penurunan viabilitas sel berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi mengikuti persamaan $y = -0.2264x + 119.23$. Sedangkan, hasil sitotoksik pada doxorubicin memberikan hasil IC₅₀ sebesar 59 µg/ml yang terletak antara kadar 25 µg/ml dan 50 µg/ml. Nilai IC₅₀ Doxorubicin lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC₅₀ FNB sehingga aktivitas sitotoksik FNB lebih rendah dari pada Doxorubicin karena membutuhkan dosis yang besar untuk menghambat 50% viabilitas sel kanker payudara MCF-7. Pada konsentrasi terendah yaitu 6,25 µg/ml viabilitas sel kanker payudara MCF-7 sebesar 75,33%, sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 200 µg/ml viabilitas sel kanker payudara MCF-7 sebesar 4,53%.

Pada uji sitotoksik juga dilakukan pengamatan viabilitas sel dengan mikroskop *inverted* untuk mengetahui gambaran sel dan perubahan morfologinya setelah diberi perlakuan dengan sampel. Berdasarkan pengamatan terhadap sel, terjadi perubahan morfologi sel pada perlakuan dengan FNB. Perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk yang awalnya cenderung panjang dan melekat pada dasar *plate*, sedangkan sel yang mati berbentuk bulat kecil dan mengapung.



Gambar 5. Gambaran morfologi sel MCF-7 di bawah mikroskop inverted setelah diberi perlakuan dengan sampel FNB (a) Kontrol sel (b) FNB 62.5 $\mu\text{g/ml}$ (c) 125 $\mu\text{g/ml}$ (d) 250 $\mu\text{g/ml}$ (e) 500 $\mu\text{g/ml}$; perbesaran 100x; panah merah (\rightarrow) menunjukkan perubahan morfologi.

Berdasarkan hasil pengamatan sel, sel MCF-7 pada perlakuan FNB terlihat perubahan morfologi maupun kerapatan sel. Pada konsentrasi 62.5 $\mu\text{g/ml}$ memberikan gambaran morfologi sel dengan kerapatan yang tinggi, sedangkan pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan kerapatan sel yang lebih rendah dan mengalami pengkerutan sel, mengapung dan ukuran sel menjadi lebih kecil.

B. Pembahasan

Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dalam keadaan basah yang didapatkan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil untuk mempercepat proses pengeringan (Sudewo, 2009). Proses pengeringan bertujuan untuk menghentikan proses enzimatik yang mungkin masih bisa terjadi, sehingga degradasi zat aktif dapat dikurangi. Herba bandotan yang sudah kering diekstraksi dengan etanol 70%, perbandingan serbuk dengan pelarut yang digunakan adalah 1:10. Menurut

Handayani *et al.*, (2016), perbandingan ini merupakan rasio terbaik untuk mendapatkan kadar fenol, flavonoid dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) paling besar.

Ekstrak kental etanolik herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang didapatkan adalah sebanyak 8.82 L. Ekstrak etanolik yang digunakan untuk fraksinasi cair-cair hanya sebanyak 1,1 L. Fraksinasi cair-cair dilakukan untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar dengan senyawa yang bersifat nonpolar. Ketika proses fraksinasi, fraksi etanolik herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) berada pada lapisan bawah, sedangkan fraksi n-heksan herba bandotan (FNB) berada pada lapisan atas karena pelarut etanol memiliki massa jenis yang lebih besar.

Ekstrak n-heksan bandotan menghasilkan rendemen 1,103 %. Hasil ini menunjukkan pada proses fraksinasi ekstrak etanol dan n-heksan dapat terpisah dengan baik karena memiliki kepolaran yang berbeda dan menghasilkan nilai rendemen yang kecil. Hasil ini sesuai dengan teori, *Ageratum conyzoides L* mengandung lebih banyak senyawa polar daripada senyawa nonpolar (Okunade, 2002) senyawa polar akan banyak terlarut dalam ekstrak etanol (*Polarity index* : 5.2) dibandingkan pelarut n-heksan dengan kepolaran yang lebih rendah (*Polarity index* : 0) (Torres, *et al.*, 2011).

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Gandjar dan Abdul Rohman, 2012). Fase gerak yang digunakan adalah kloroform yang menghasilkan pemisahan yang terbaik tanpa *tailing* setelah dilakukan uji dengan beberapa fase gerak dan fase diam yang digunakan adalah Silika Gel F₂₅₄. Fase gerak yang dominan mengandung

kloroform telah lama digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dengan metode KLT seperti campuran kloroform:methanol:air (97:2:1) (Fitriani, 2011), kloroform:methanol (93:3 v/v) (Kulevanova, *et al.*, 2001) menghasilkan bercak yang berfluoresensi kuning, hijau, ungu muda hingga merah.

Pada hasil pengamatan KLT (tabel 6 dan 7) bercak nomor 1, 5 dan 10 pada pengamatan dibawah sinar tampak menunjukkan masing-masing warna kuning tua, hijau dan kuning. Pengamatan selanjutnya dilakukan dibawah sinar UV 254 yang menunjukkan warna kuning pada bercak nomor 1, 2, 6, 7 dan 10, warna ungu tua pada bercak nomor 3 dan 9, warna ungu muda pada bercak nomor 4, 5 dan 8. Pengamatan pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi kuning pada bercak nomor 2 dan 6 dan fluoresensi merah pada bercak nomor 4. Berdasarkan hasil tersebut bercak pada nomor 1, 2, 7, 8, 9 dan 10 dengan Rf masing-masing 0,2, 0,28, 0,8, 0,84, dan 0,88 diduga fraksi n-heksan Bandotan mengandung senyawa alkaloid hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (2008). Alkaloid adalah senyawa yang tersusun dari atom nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam dan memiliki aktivitas sebagai antikanker (Marliana, *et al.*, 2004). Bercak nomor 2, 3, 4, 5, 7, 8 dan 10 tidak terlihat pada sinar tampak. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa fraksi n-heksan Bandotan memiliki kandungan steroid yang dapat dilihat pada nilai Rf 0,68 dengan warna kromatogram ungu muda dibawah pengamatan sinar UV 254 nm. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya bahwa *Ageratum conyzoides L.* mengandung senyawa steroid (Hayati, *et al.*, 2013). Uji pendahuluan dengan KLT hanya sebatas

perkiraan jenis senyawa berdasarkan warna dan kepolarannya sehingga untuk memastikan jenis dan kadar senyawa pada setiap bercak dapat dilakukan penelitian lanjutan dengan metode kromatografi lain, yaitu KLT-densitometri dan HPLC.

Terdapat sekitar 20.000 reseptor HER-2 pada payudara normal dan pada permukaan sel kanker payudara reseptor HER-2 dapat berlipat ganda menjadi 1,5 juta reseptor (Nahta, *et al.*, 2006), ekspresi gen HER-2 yang meningkat menyebabkan peningkatan pula pada metastasis, proliferasi dan sel payudara akan terinduksi angiogenesis. Reseptor HER-2 mampu membentuk heterodimer yang merupakan kombinasi antara reseptor HER-2 dengan berbagai reseptor lainnya maka terbentuk kompleks reseptor heterodimer dan sinyal *Growth Factor* akan dikirimkan ke bagian intraseluler melewati membrane sel dari nukleus dan gen HER-2 akan teraktivasi (Brennan, *et al.*, 2000). Reseptor HER-2 dipreparasi dengan Ageratokromen. Hasil validasi dengan *Autodock Vina* menunjukkan bahwa protokol *docking* Ageratokromen, doxorubicin dan ligan asli dapat diterima dengan nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$. RMSD adalah nilai penyimpangan antara suatu konformasi ligan dengan pembandingnya, yaitu apabila penyimpangannya terlalu besar maka semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi ligand dan protein (Korb, *et al.*, 2006). Hasil molekuler *docking* menunjukkan bahwa *score docking* yang diperoleh yaitu Ageratokromen (-6.2 kcal/mol) lebih tinggi daripada pembandingnya doxorubicin (-6.9 kcal/mol) maupun ligan asli HER-2 dengan masing-masing -6.6 dan -6.8 kcal/mol membuktikan bahwa kestabilan ikatan ageratokromen dengan HER-2 tidak lebih baik daripada pembandingnya

doxorubicin maupun ligan asli (Sanders, *et al.*, 2010). Hal ini dapat dikatakan bahwa energi yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan HER-2 lebih besar sehingga ikatan yang terbentuk kurang stabil dibandingkan dengan doxorubicin atau ligan asli. Peran Protein HER-2 pada proses proliferasi sel menggunakan jalur *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase* (P13K), Jalur *Kinase/Signal Transduction Activator transcription* (Jak/Stat) dan *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), diketahui ageratokromen dapat menghambat P13 kinase. Pada proses proliferasi sel protein HER-2 melewati protein Raf terlibat dan melewati berbagai jalur sinyal terinduksi. Ageratokromen dapat merusak atau mendegradasi protein HER-2 dengan mekanisme yang masih belum diketahui, sehingga proliferasi sel dapat dihambat. Protein HER-2 dapat mengaktifkan protein Ras, Raf, MAPK, selanjutnya terjadi peningkatan proliferasi sel dengan mengaktifkan faktor transkripsi. Proses proliferasi tidak berlanjut ke nukleus dikarenakan terjadi penurunan aktivitas protein Ras, Raf dan MAPK yang disebabkan oleh kerusakan pada protein HER-2 oleh ageratokromen. Reseptor estrogen yang terdapat pada nukleus, sitoplasma dan membrane sel berjumlah sekitar 70% pada sel kanker payudara. Reseptor estrogen positif berperan penting dalam proliferasi sel pada kanker payudara (Chen, 2008).

Jenis ikatan yang terbentuk antara asam amino dan senyawa uji antara lain adalah ikatan kovalen dan ikatan *Van Der Waals*, dimana ikatan kovalen lebih kuat daripada ikatan yang lainnya. Selain itu, ikatan kovalen adalah satu-satunya ikatan yang *irreversible* sehingga memberikan kontribusi terbesar dalam penurunan energi afinitas ikatan dibandingkan ikatan hidrogen dan *Van Der*

Waals (Patrick, 2001). Ikatan kovalen cenderung terbentuk dari residu ionik (lihat tabel 9), asam amino polar membentuk ikatan hidrogen, sedangkan asam amino aromatik dan hidrofobik biasanya membentuk ikatan *Van Der Waals*, sehingga ikatan dengan residu ionik memberikan kontribusi terbesar terhadap penurunan energi afinitas senyawa uji karena membentuk ikatan kovalen (Schneider, *et al.*, 2008). Visualisasi hasil *docking* dengan DS Visualizer yang memperlihatkan bahwa senyawa Ageratokromen yang berikatan dengan 5 asam amino memiliki jumlah asam amino ionik terbanyak dengan 4 asam amino dan 1 asam amino hidrofobik, sedangkan Ligan asli berikatan dengan 8 asam amino dengan 2 asam amino ionik sehingga Ageratokromen memiliki ikatan yang kurang stabil dibandingkan doxorubicin atau ligan asli. Berdasarkan nilai energi afinitas dan visualisasi *docking*, maka senyawa Ageratokromen memiliki potensi ikatan yang lebih kuat dan stabil terhadap protein HER-2.

Daya antioksidan fraksi FNB dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan yang dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus % inhibisi (Lampiran 4). Suatu persamaan regresi linier didapat dari hubungan nilai % inhibisi dengan konsentrasi vitamin C dan fraksi FNB yang dihubungkan dan selanjutnya didapatkan nilai IC_{50} berupa sumbu x dengan cara memasukkan nilai 50 pada sumbu y kedalam persamaan regresi linier yang telah diperoleh.

Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai IC_{50} pada vitamin C sebesar 2,9 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai IC_{50} pada fraksi FNB adalah 493 $\mu\text{g/mL}$. Artinya, pada fraksi FNB membutuhkan konsentrasi sebesar 493 $\mu\text{g/mL}$ untuk menangkap radikal

DPPH sebanyak 50%, sedangkan vitamin C hanya membutuhkan konsentrasi sebesar 2,9 $\mu\text{g/mL}$ untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} yang terlalu besar atau daya antioksidan yang kecil diduga disebabkan karena senyawa flavonoid yang mengikat gugus samping yang dapat menghambat aktivitas antioksidan tidak terkandung pada fraksi n-heksan, sehingga flavonoid tidak dapat menyumbangkan hidrogen dan elektron kepada DPPH (Harborne, 1987; Budilaksono *et al.*, 2014).

Selain itu, gugus samping juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi (gugus $-\text{H}$ menjadi gugus $-\text{CH}_3$), sehingga sumber proton untuk menangkap DPPH berkurang (Mikamo, *et al.*, 2000; Pranata, 2013). Adanya pengganggu seperti protein dan lemak dalam fraksi FNB diduga juga dapat mengganggu reaksi penangkapan radikal bebas DPPH (Budilaksono, *et al.*, 2014). Walaupun, nilai IC_{50} dari ketiga fraksi masuk ke dalam katagori lemah jika dilihat dari tingkat aktivitas antioksidan menurut Ariyanto (2006) ($>150 \mu\text{g/mL}$), namun nilai IC_{50} 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan masih berpotensi sebagai antioksidan (Molyneux, 2004; Pranata, 2013).

Setelah dilakukan identifikasi senyawa dengan KLT kemudian *screening* aktivitas molekuler zat aktif FNB, maka penelitian dilanjutkan dengan uji *in vitro* melalui uji sitotoksik dengan metode MTT *Assay* terhadap sel kanker payudara MCF-7. Data yang dihasilkan dari uji sitotoksik dalam penelitian ini adalah data viabilitas sel (% sel hidup) dan IC_{50} . Hasil penelitian uji sitotoksik tunggal menunjukkan bahwa FNB memiliki potensi yang rendah dalam menghambat viabilitas sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} 306 $\mu\text{g/ml}$ lebih tinggi

dibandingkan dengan IC_{50} obat kanker pembandingnya yaitu doxorubicin dengan IC_{50} 145 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam FNB memiliki potensi yang cukup toksik sebagai agen kemopreventif dengan nilai $IC_{50} >100$ $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan keterkaitan dengan hasil *docking* molekuler bahwa senyawa yang terkandung dalam FNB memiliki potensi yang lemah sebagai agen kemopreventif dibandingkan dengan doxorubicin.

Pengamatan hasil uji tunggal viabilitas sel MCF-7 setelah diberi perlakuan dengan FNB dilakukan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui perubahan morfologi sel MCF-7 sebelum dan setelah diberi perlakuan. Pengamatan sel yang di uji dengan FNB pada kadar yang terendah 62.5 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan terjadinya perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk dari sel yang cenderung sedikit lonjong, berwarna abu-abu dan ada batas yang jelas antara inti sel dan cairan sel menjadi berbentuk bulat atau tidak beraturan (pengecilan ukuran sel), berwarna lebih terang dan inti selnya tidak terlihat. Perubahan morfologi sel diperkirakan terkait dengan mekanisme bahan yang diujikan. Senyawa Ageratokromen memiliki aktivitas antikanker yang tinggi pula melalui uji *in vitro* terhadap *Ageratum conyzoides* (Nataru, *et al.*, 2014).