

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. *Molecular Docking*

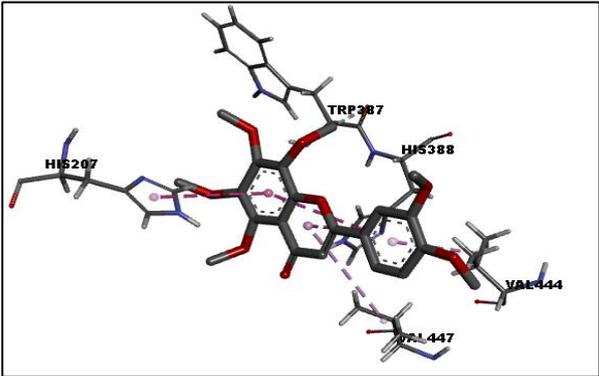
Uji *molecular docking* sebagai uji pendahuluan penemuan obat baru menggunakan media komputasi. Dalam penelitian ini senyawa uji nobiletin dan 5-FU (pembanding) diamati interaksinya dengan reseptor target menggunakan aplikasi *Autodock Vina*. Reseptor target diperoleh dari *Protein Data Bank* dengan masing-masing kode antara lain: 5IKQ (COX-2), 5XV7 (VEGF), dan 3PP0 (HER-2). Preparasi reseptor target dan senyawa uji dilakukan menggunakan *Marvin Sketch* dan *Open Babel*. Interpretasi dilakukan berdasarkan nilai RMSD dan *score docking* yang menunjukkan nilai terbaik antara ligand/senyawa uji dan reseptor target.

Tabel 3. Hasil *Molecular Docking*

No	Senyawa Uji	Protein Target	Nilai RMSD (<2,00 Å)	Score Docking (kcal/mol)	Konformasi Asam Amino
1	Nobiletin	COX-2	1,038	-7,5	Konformasi 4
		VEGF	1,122	-7,6	Konformasi 6
		HER-2	1,461	-6,3	Konformasi 2
2	5-FU	COX-2	1,927	-5,2	Konformasi 6
		VEGF	1,534	-4,7	Konformasi 3
		HER-2	1,593	-5,6	Konformasi 2

Diantara 9 konformasi yang dihasilkan oleh setiap senyawa uji dengan reseptornya, dipilih konformasi terbaik dengan nilai RMSD $<2,00 \text{ \AA}$. *Score docking* terbaik dihasilkan oleh nobiletin terhadap reseptor target dimana interaksinya menunjukkan energi afinitas rendah. Senyawa nobiletin dengan reseptor target terbaik pada VEGF dipilih konformasi 6 dengan nilai RMSD $1,122 \text{ \AA}$ dan *score docking* $-7,6 \text{ kcal/mol}$, dengan reseptor target HER-2 dipilih konformasi 2 dengan nilai RMSD $1,461 \text{ \AA}$ dan *score docking* $-6,3 \text{ kcal/mol}$, sedangkan pada reseptor target COX-2 dipilih konformasi 4 dengan nilai RMSD $1,038 \text{ \AA}$ dan *score docking* $-7,5 \text{ kcal/mol}$. Skor *docking* pada senyawa pembanding (5-FU) terhadap COX-2, VEGF, dan HER-2 masing-masing $-5,2 \text{ kcal/mol}$, $-4,7 \text{ kcal/mol}$, dan $-5,6 \text{ kcal/mol}$ lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa nobiletin.

Tabel 4. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dan Reseptor Target

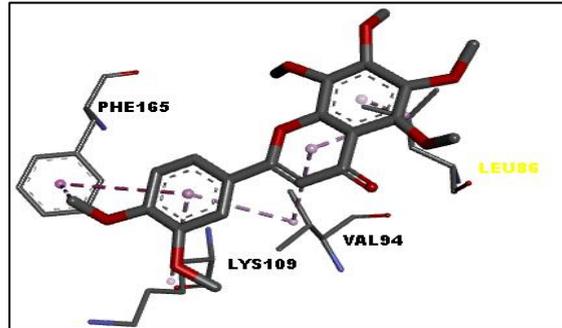
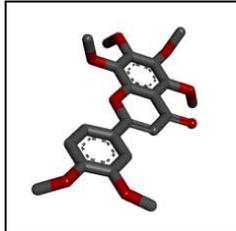
No	Senyawa Uji	Protein Target
		COX-2
		Residu asam amino: Valin (VAL 447, VAL 444), Triptopan (TRP 387), Histidin (HIS 207, HIS 388)
1.	<p>Nobiletin</p> 	

VEGF

Residu asam amino: Fenilalanin (PHE 165), Valin (VAL 94), Lysin (LYS 109), Leusin (LEU 86)

Nobiletin

2.

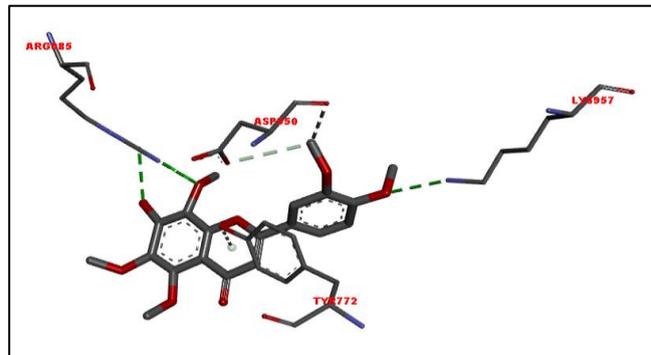
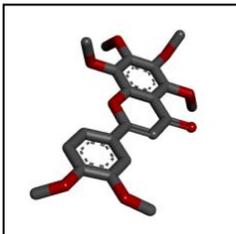


HER-2

Residu asam amino: Tiroksin (TYR 772), Lysin (LYS 957), Arginin (ARG 985), Asam Aspartat (ASP 950)

Nobiletin

3.

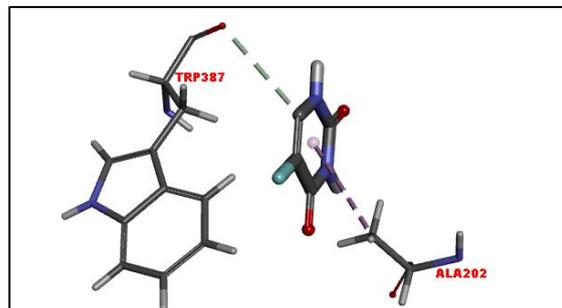
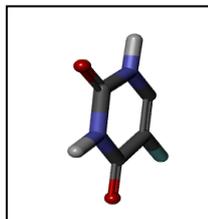


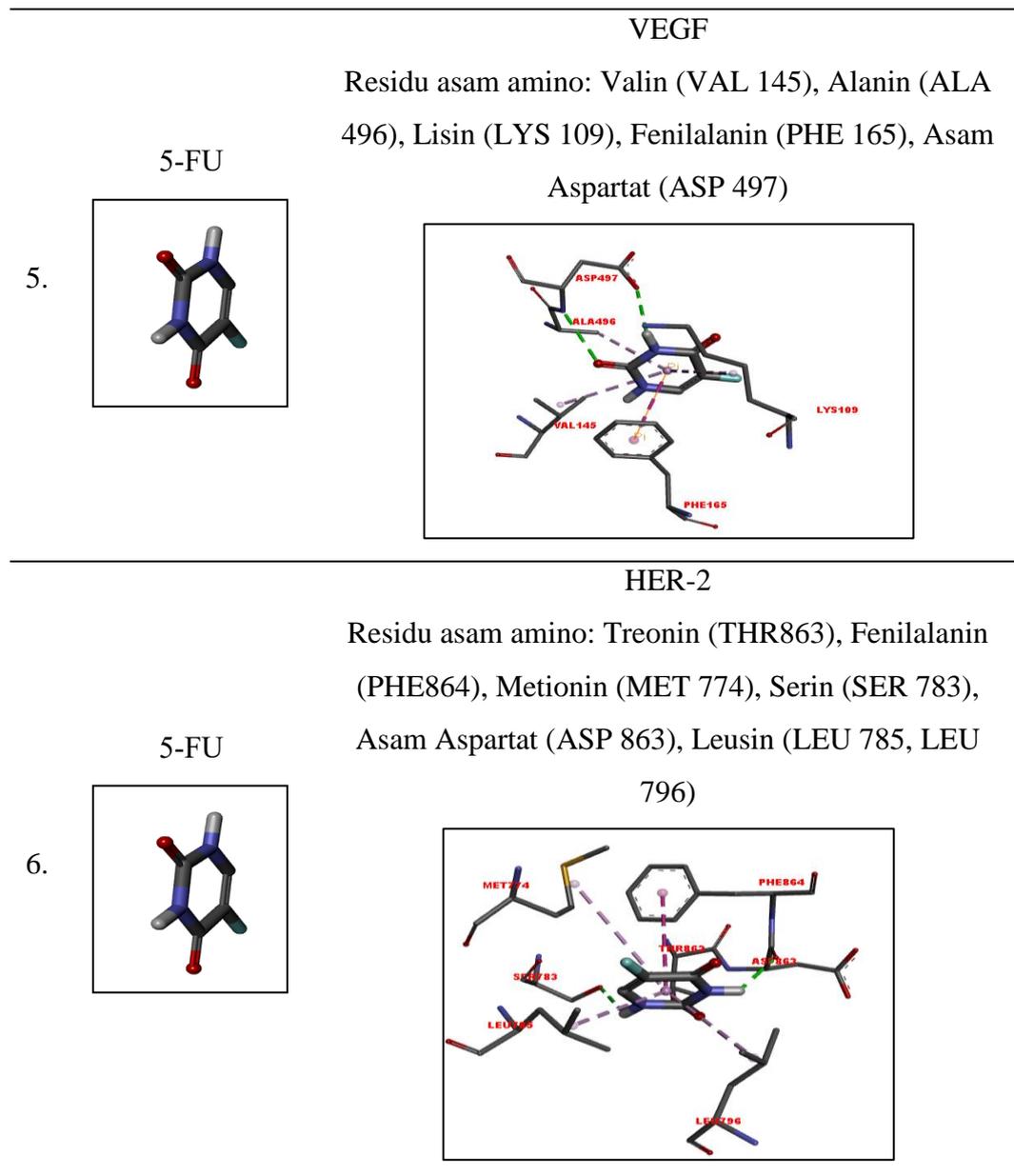
COX-2

Residu asam amino: Alanin (ALA 202), Triptopan (TRP 387)

5-FU

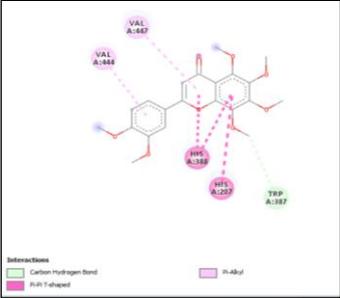
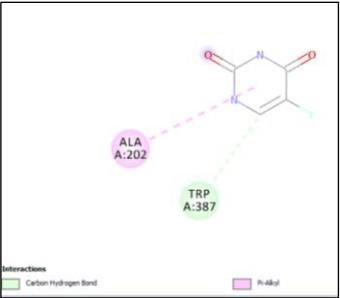
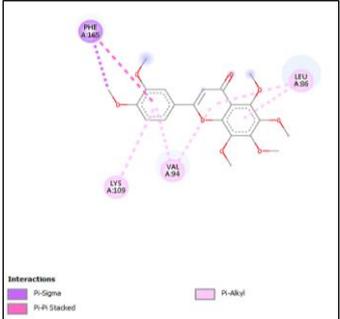
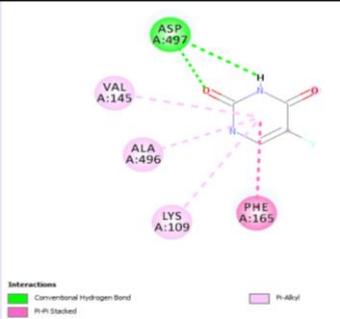
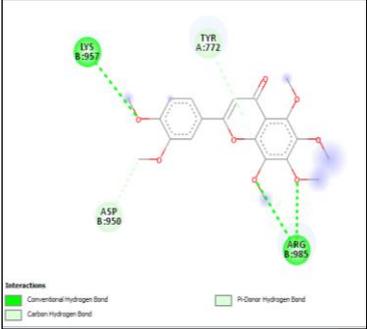
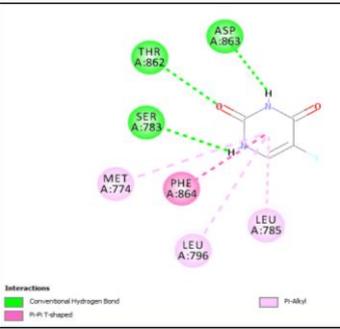
4.





Visualisasi interaksi antara senyawa uji dengan reseptor target yang telah dilakukan penambatan diamati menggunakan *DS Visualizer*. Terdapat potensi ikatan asam amino dengan reseptor target sehingga menunjukkan interaksi ikatan dan kekuatan molekul yang terbentuk.

Tabel 5. Jenis Ikatan antara Senyawa Uji dan Reseptor Target

No	Reseptor Target	Senyawa Uji	
		Nobiletin	5-FU
1.	COX-2	1 ikatan hidrogen 4 ikatan pi	1 ikatan hidrogen 1 ikatan pi-alkil
			
2.	VEGF	4 ikatan pi	1 ikatan hidrogen 4 ikatan pi
			
3.	HER-2	4 ikatan hidrogen	3 ikatan hidrogen 4 ikatan pi
			

2. Determinasi Tanaman

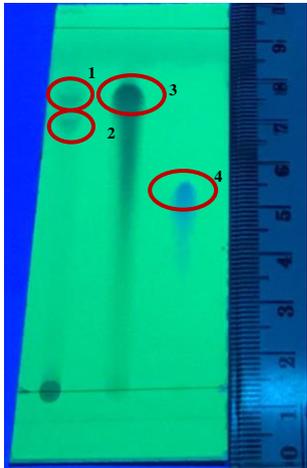
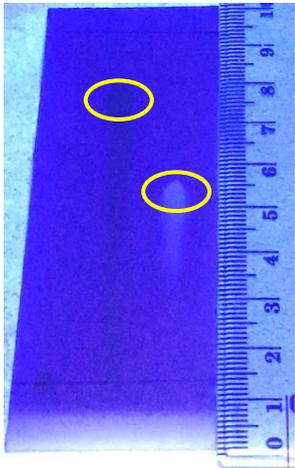
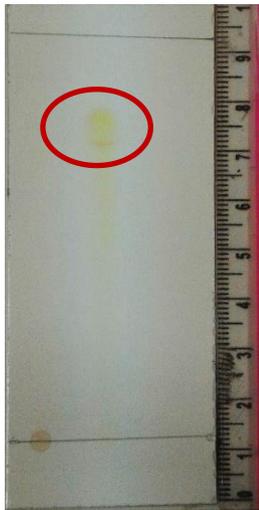
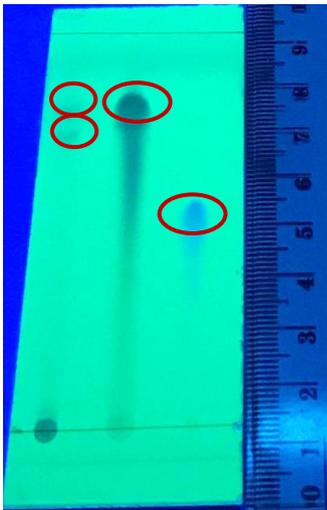
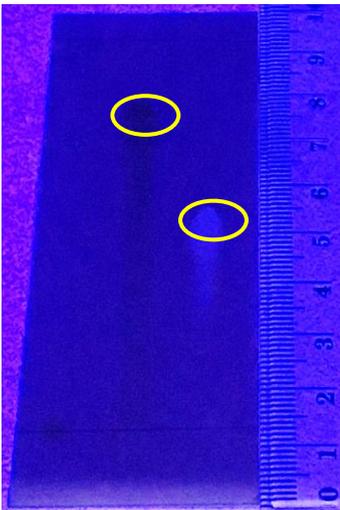
Herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) pada penelitian ini berasal dari daerah Tamantirto, Kasihan, Bantul, DIY. Untuk menunjukkan bahwa sampel tanaman yang diperoleh merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.), maka dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Farmakognosi, Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hasil menunjukkan bahwa sampel merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dan termasuk ke dalam suku Compositae (Lampiran 1.)

3. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk kering halus herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) sebanyak 1 kg direndam (proses maserasi) selama 5 hari kemudian dilanjutkan remaserasi selama 2 hari menggunakan etanol 70% masing-masing 10 L. Diperoleh ekstrak etanol hasil penggabungan maserasi dan remaserasi sejumlah 9 L. Ekstrak etanol kemudian difraksinasi menggunakan pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1 untuk memperoleh Fraksi Kloroform Herba Bandotan (FKB). Dari 5 L ekstrak etanol dan 5 L kloroform menghasilkan 8,1 L FKB cair yang kemudian 6 L bagiannya dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* untuk optimalisasi pemisahan FKB dengan etanol yang mungkin masih terlarut setelah proses fraksinasi. FKB kental yang diperoleh sebanyak 17,4 gram. Maka diperoleh nilai rendemen 4,22% (Lampiran 2.)

4. Kromatografi Lapis Tipis

Tabel 6. Profil Kromatografi Lapis Tipis

Perlakuan sebelum diuapkan amoniak		
Sinar Tampak	Sinar UV 254nm	Sinar UV 366nm
		
Perlakuan setelah diuapkan amoniak		
Sinar Tampak	Sinar UV 254nm	Sinar UV366nm
		

Identifikasi senyawa flavonoid yang terkandung pada FKB dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan prinsip pemisahan

berdasarkan kepolaran. Sampel FKB yang telah dilarutkan dengan akuades dibandingkan dengan senyawa pembanding golongan flavonoid yaitu rutin dan golongan alkaloid yaitu quinin. Digunakan fase diam berupa plat silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak campuran kloroform:metanol dengan perbandingan 7:2. Pemilihan kombinasi fase gerak terbaik (tanpa *tailing* yang berarti) didasarkan pada percobaan yang telah dilakukan sebelumnya. Hasil dari identifikasi membentuk bercak pada plat oleh komponen senyawa yang terelusi bersama fase gerak.

Pada masing-masing bercak yang terbentuk, diperoleh nilai Rf dari jarak elusi sampel dibandingkan dengan jarak elusi fase gerak.

Tabel 7. Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid

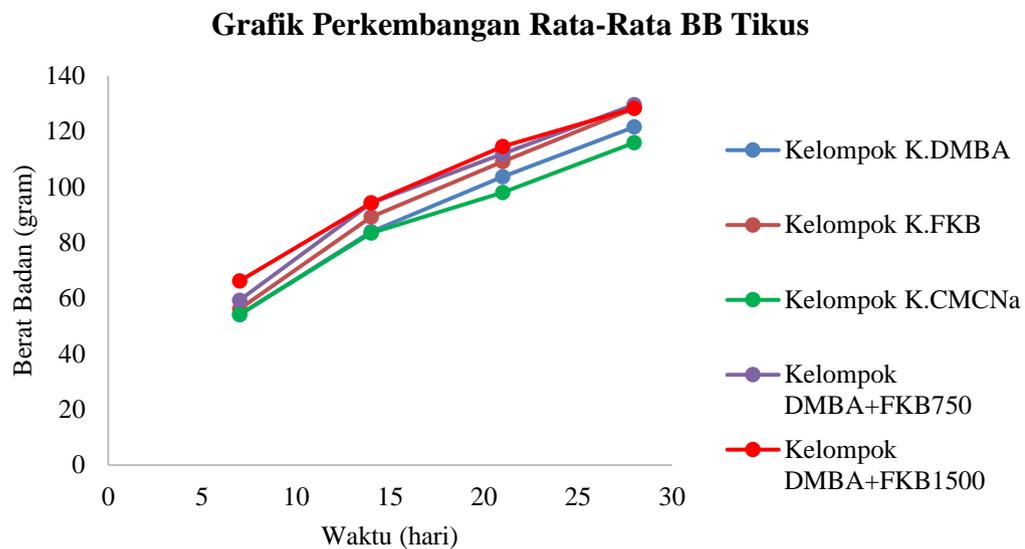
No Bercak	Nilai Rf	Pengamatan sebelum diuapkan amoniak			Pengamatan setelah diuapkan amoniak			Hasil
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	
1	0,75	-	Ungu muda	-	-	Ungu muda	-	+
2	0,812	-	Ungu muda	-	-	Ungu muda	-	+
3	0,837	Kuning	Ungu tua	Ungu tua	Kuning tua	Ungu tua	Ungu tua	+
4	0,537	-	Ungu muda	Putih terang	-	Ungu muda	Putih terang	-

Bercak nomor 3 merupakan senyawa pembanding berupa rutin yang merupakan golongan flavonoid dengan nilai Rf 0,837, sedangkan pada bercak nomor 4 merupakan senyawa pembanding alkaloid menunjukkan nilai Rf 0,537. Pada sampel uji, terbentuk 2 bercak yaitu bercak nomor 1 dan 2 dengan nilai Rf 0,75 dan 0,812. Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan sinar tampak, hanya senyawa pembanding rutin yang tampak bercak kuning. Menggunakan sinar UV 254 nm, sampel uji warna bercak berpendar ungu muda dan pada pengamatan menggunakan sinar UV 366 nm, warna bercak tidak tampak.

5. Uji In Vivo

Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur *Sprague dawley* yang berumur 40 hari. Selama 7 hari, dilakukan adaptasi hewan uji dan dinyatakan hewan uji siap digunakan sebagai subjek penelitian. Pada uji in vivo, perlu dilakukan pengamatan secara makroskopis baik pada volume maupun jumlah nodul yang terbentuk. Akan tetapi penelitian ini hingga hari ke-35 nodul belum terbentuk.

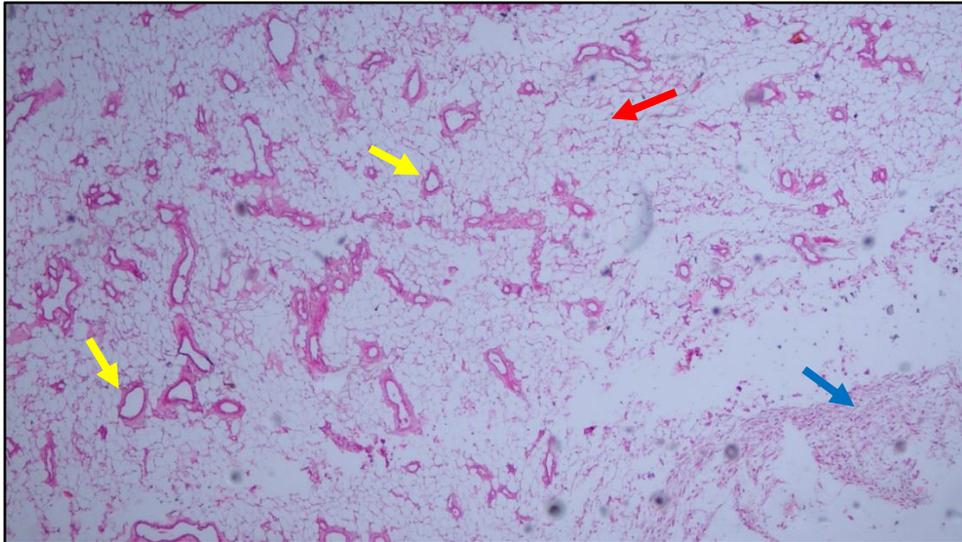
Untuk mengetahui perkembangan tikus dapat diukur melalui penimbangan berat badan yang dilakukan secara berkala pada hari ke-7, ke-14, ke-21, dan ke-28 setelah adaptasi hewan uji (Grafik 1). Perkembangan berat badan tikus tidak mengalami penurunan akibat perlakuan yang berbeda-beda pada setiap kelompoknya.



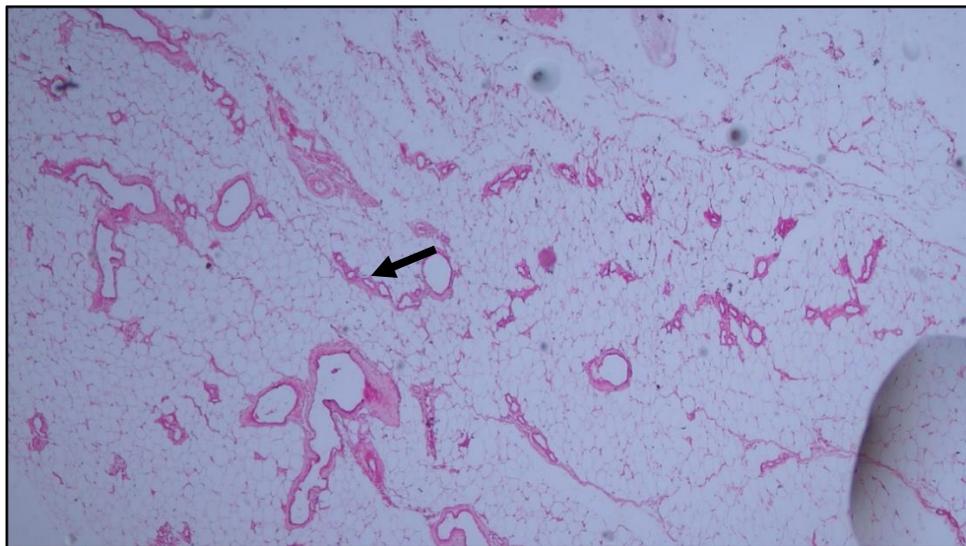
Grafik 1. Perkembangan Berat Badan Tikus selama Uji In Vivo

6. Pengecatan Hematoksilin-Eosin

Meskipun data secara makroskopis tidak menunjukkan insidensi tumor pada kelenjar mammae, akan tetapi secara mikroskopis dengan pewarnaan preparat histologi menggunakan Hematoksilin dan Eosin menunjukkan adanya perubahan histologi pada masing-masing kelompok perlakuan. Secara deskriptif, histologi kelenjar mammae normal terdiri dari duktus, jaringan lemak, adenomer, serta fibroblast yang tampak pada kelompok K.CMCNa berdasarkan pengamatan mikroskop cahaya dengan perbesaran 12x (Gambar 2 dan Gambar 3). Pada histologi tikus betina dengan usia 40 hari, duktus dan jaringan lemak lebih dominan dibandingkan jumlah adenomer dan fibroblas pada kelenjar mammae.



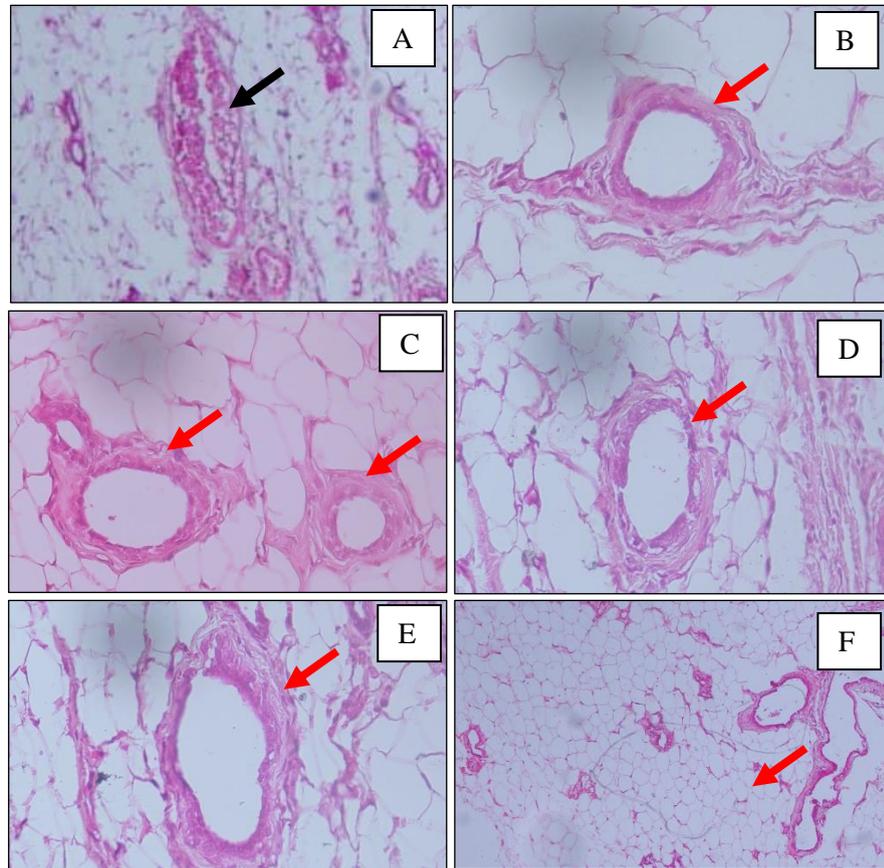
Gambar 2. Gambaran histologi jaringan lemak (→), duktus (→), dan fibroblast (→) kelenjar payudara normal pada tikus betina galur *Sprague dawley* dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin pada pengamatan mikroskop perbesaran 12x.



Gambar 3. Gambaran histologi adenomer (→) pada kelenjar payudara tikus *Sprague dawley* dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin pada pengamatan mikroskop perbesaran 12x.

Perubahan histologi pada masing-masing kelompok perlakuan ditunjukkan berdasarkan komponen-komponen diatas, baik pada duktus

maupun pada jaringan lemaknya.



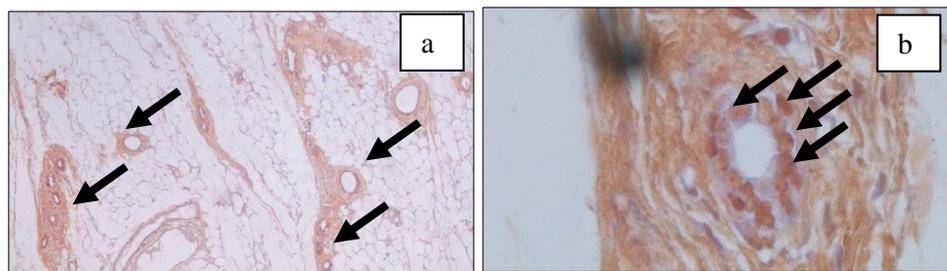
Gambar 4. Gambaran histopatologi tikus K.DMBA (A), K.FKB (B), K.CMCNa (C), DMBA+FKB750 (D), DMBA+FKB1500 (E) pada pengamatan mikroskop perbesaran 120x serta jaringan lemak normal (F) pada pengamatan mikroskop perbesaran 30x. → normal dan → rusak

Histologi jaringan normal ditunjukkan pada kelompok K.FKB, K.CMCNa, DMBA+FKB750, dan DMBA+FKB1500 dengan duktus intralobulernya dikelilingi oleh satu lapis sel epitel kuboid. Sedangkan pada kelompok K.DMBA sebagai kelompok kontrol kanker, menunjukkan terbentuknya sel epitel yang memiliki jumlah lebih dari satu lapis. Selain itu pada jaringan lemak normal (F) menunjukkan bentuk yang masih beraturan

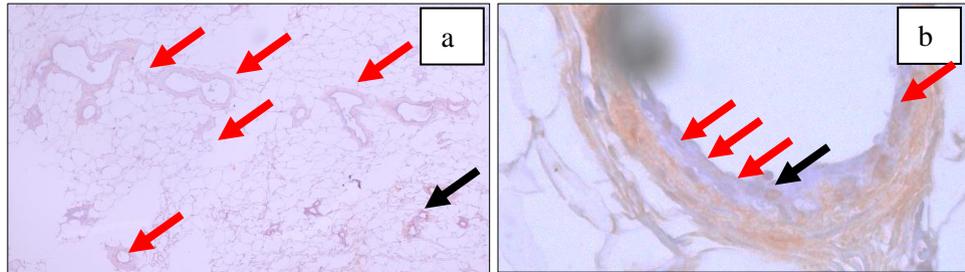
atau simetris sikloheksana, sedangkan pada kelompok yang lain sudah tampak adanya perubahan bentuk menjadi tidak beraturan atau asimetris.

7. Uji Imunohistokimia

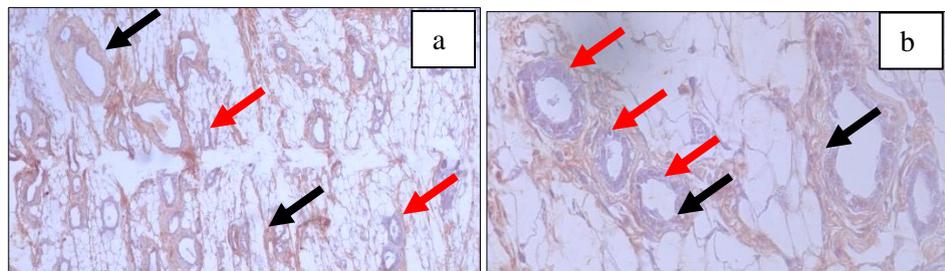
Pengecatan preparat histologi kelenjar mammae dengan imunohistokimia, tampak perubahan histologi jaringan berwarna coklat pada sel yang imunoreaktif spesifik terhadap antibodi VEGF tersebut. Pada histologi kelompok tikus terinduksi DMBA (Gambar 5.a dan 5.b) menunjukkan bahwa sel memiliki imunoreaksi yang cukup kuat terhadap antibodi VEGF, sedangkan pada kelompok pemberian FKB (K.FKB) (Gambar 6.a dan 6.b) sel memiliki imunoreaksi yang rendah ditunjukkan dengan warna coklat yang sedikit dan lebih dominan ungu terhadap antibodi VEGF. Pada kelompok dengan pemberian DMBA dan FKB dosis 1500 mg/kg BB (Gambar 8.a dan 8.b), menunjukkan imunoreaksi yang lebih kuat dibandingkan dengan pada kelompok induksi DMBA dan FKB dosis 750 mg/kg BB (Gambar 7.a dan 7.b).



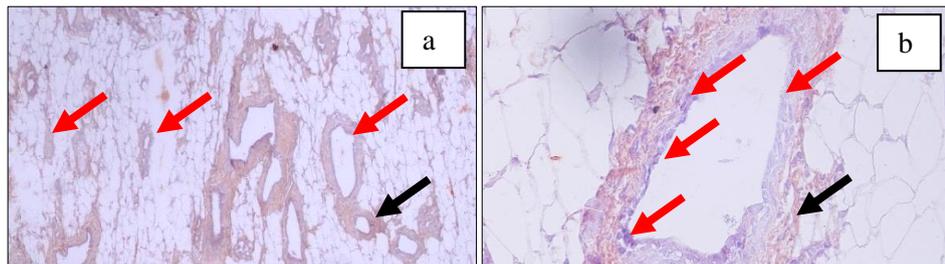
Gambar 5. Gambaran histopatologi kelenjar payudara tikus SD terinduksi DMBA pada pengecatan Imunohistokimia dengan antibodi VEGF pengamatan mikroskop perbesaran 12x (a) dan 300x (b) → imunoreaktif



Gambar 6. Gambaran histopatologi kelenjar payudara tikus SD kelompok induksi FKB 1500 mg/kg BB pada pengecatan Imunohistokimia dengan antibodi VEGF pengamatan mikroskop perbesaran 12x (a) dan 300x (b) → tidak imunoreaktif dan → imunoreaktif



Gambar 7. Gambaran histopatologi kelenjar mammae tikus SD terinduksi DMBA dan pemberian FKB 750 mg/kg BB pada pengecatan Imunohistokimia dengan antibodi VEGF pengamatan mikroskop perbesaran 12x (a) dan 120x (b) → tidak imunoreaktif dan → imunoreaktif



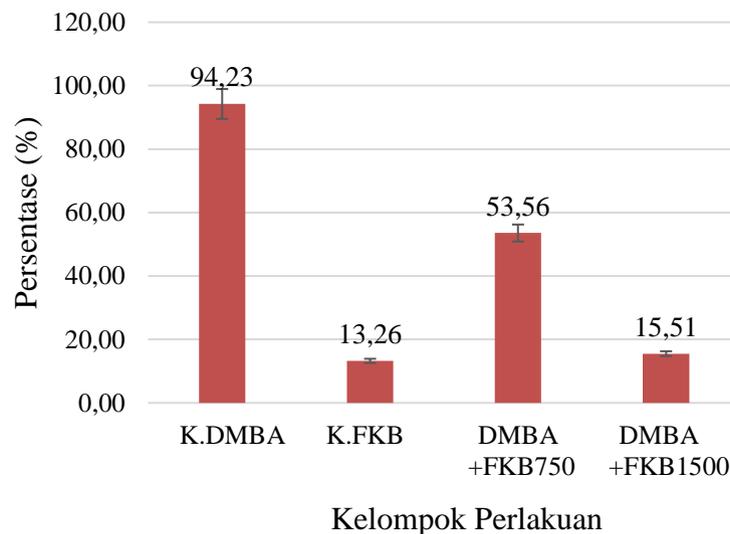
Gambar 8. Gambaran histopatologi kelenjar mammae tikus SD terinduksi DMBA dan pemberian FKB 1500 mg/kg BB pada pengecatan Imunohistokimia dengan antibodi VEGF pengamatan mikroskop perbesaran 12x (a) dan 120x (b) → tidak imunoreaktif dan → imunoreaktif

Tabel 8. Jumlah Sel Positif Imunoreaksi Terhadap Antibodi VEGF Pada Histologi Kelenjar Mammae

Kelompok perlakuan	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	Negatif
K.DMBA	146	6	68	1	37	5
K.FKB	13	38	22	133	12	115
DMBA+FKB750	50	37	68	81	76	56
DMBA+FKB1500	5	74	17	40	8	69

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sel positif dan negatif pada pengamatan histopatologi kelenjar mammae menggunakan mikroskop perbesaran 120x, tampak adanya ekspresi VEGF kuat pada kelompok K.DMBA dengan jumlah sel positif yang tinggi. Sedangkan pada kelompok K.FKB, jumlah sel positif relatif lebih rendah. Pada kelompok DMBA+FKB750 dan DMBA+FKB1500 menunjukkan adanya variasi jumlah sel positif.

Grafik Persentase Ekspresi Sel



Grafik 2. Persentase Ekspresi Sel Terhadap Antibodi VEGF Pada Histopatologi Kelenjar Mammae

Persentase kerusakan pada kelompok DMBA menunjukkan bahwa 94,23% sel mengalami imunoreaksi dengan antibodi VEGF, sedangkan pada kelompok FKB sejumlah 13,26%. Pada kelompok uji DMBA dan FKB menunjukkan adanya perbedaan persentase sel positif dan negatif.

B. Pembahasan

1. *Molecular Docking*

Secara molekuler, reseptor yang menjadi target aksi obat harus memiliki kesesuaian yang spesifik diantara keduanya. Kespesifikan ini akan meminimalisir dan mengefektifkan penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* (Ferreira, 2015). Senyawa aktif nobiletin dari FKB diduga berpotensi menghambat aktivitas protein target VEGF berdasarkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan skor *docking*. Validasi metode *docking* ditunjukkan berdasarkan RMSD terbaik yaitu kurang dari 2 Å (Ruswanto, 2015). Semakin rendah nilainya, validitas RMSD juga semakin baik karena mendekati konformasi senyawa asal (Dany *et al.*, 2013). RMSD ini menunjukkan jarak yang terbentuk antar atom sejenis pada dua struktur yang mirip. Berdasarkan hasil validasi, nilai RMSD pada senyawa uji (nobiletin) lebih rendah dibandingkan dengan 5-FU. Hal ini juga berbanding lurus dengan skor *docking* yang diperoleh. Sehingga dapat dikatakan skor *docking* pada RMSD tersebut layak dan dapat direpresentasikan interaksi antara senyawa uji dengan protein targetnya setelah proses *docking*.

Skor *docking* atau yang juga disebut sebagai *binding affinity* terbaik

diperoleh berdasarkan ikatan antara senyawa uji dengan reseptor target yang memiliki skor *docking* lebih rendah/menjadi negatif kebawah dibandingkan dengan interaksi lainnya. Hal ini dikarenakan semakin rendah nilainya, maka semakin tinggi afinitas (kemampuan dalam berikatan) ikatannya antara senyawa uji dengan reseptor target (Ruswanto, 2015). Interaksi yang terbentuk antara nobiletin dengan reseptor target VEGF memiliki skor *docking* terbaik (-7,6 kcal/mol) dibandingkan terhadap reseptor target lainnya (COX-2 dan VEGF masing-masing -7,5 dan -6,3 kcal/mol). Selain itu, nobiletin juga memiliki skor *docking* yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa pembanding 5-FU terhadap reseptor target VEGF (-4,7 kcal/mol), COX-2 (-5,2 kcal/mol), maupun HER-2 (-5,6 kcal/mol).

Visualisasi secara 2D dan 3D pada interaksi ikatan, menunjukkan jenis ikatan antara asam amino pada reseptor target dengan senyawa uji. Jenis ikatan yang terbentuk antara lain adalah ikatan hidrogen dan ikatan pi (π). Tiga ikatan pi (π) yang terbentuk antara senyawa uji nobiletin dengan reseptor target VEGF memiliki kekuatan ikatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan interaksi senyawa uji dengan reseptor target lainnya. Ikatan pi (π) merupakan salah satu ikatan kovalen dimana terbentuk ikatan antara dua atom non logam yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan hidrogen (ikatan antar molekul dari atom hidrogen dengan atom O, N, atau F) maupun ikatan ion (Brown *et al.*, 2008). Sehingga berdasarkan nilai RMSD, skor *docking*, dan hasil visualisasi ikatan antara senyawa uji dengan

reseptor targetnya, nobiletin memiliki potensi ikatan (*binding affinity*) yang kuat terhadap reseptor target VEGF.

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Berdasarkan skrining fitokimia, pada herba bandotan terdapat beberapa senyawa yang memiliki konsentrasi dominan diantaranya adalah flavonoid, alkaloid, dan tanin (Melissa, 2017). Untuk memperoleh senyawa flavonoid yang diduga berpotensi sebagai anti-kanker, maka perlu dilakukan penyarian senyawa menggunakan metode ekstraksi. Metode ekstraksi yang dipilih yaitu maserasi karena metode ini merupakan metode yang paling sederhana pada prosedurnya. Selain memiliki nilai *safety*, etanol sebagai pelarut universal pada senyawa polar, semi-polar, maupun non-polar dipilih karena lebih efisien dalam menembus dinding sel tumbuhan pada metode ekstraksi maserasi (Tiwari, 2011). Prinsipnya yaitu pelarut yang digunakan dapat memecah dinding sel (Azwanida, 2015), sehingga terbentuk perbedaan konsentrasi antara di luar sel dengan di dalam sel dan terjadi perindahan sel dari tinggi ke rendah (Christinawati, 2007). Konsentrasi larutan di dalam sel lebih tinggi dibandingkan dengan di luar sel, maka senyawa aktif keluar sel dan terlarut bersama pelarut.

Fraksinasi digunakan kloroform yang merupakan pelarut non-polar untuk memperoleh senyawa aktif pada tanaman yang bersifat non-polar. Diperoleh hasil bahwa senyawa aktif lebih banyak terlarut pada pelarut etanol yang memiliki polaritas lebih tinggi (*polarity index*: 4,3)

dibandingkan pada fraksi kloroform (*polarity index*: 4,1) berdasarkan nilai rendemen FKB yang diperoleh yaitu 4,22% (Widyawati, 2014). Senyawa flavonoid yang terdapat pada FKB memiliki kepolaran yang rendah sehingga penggunaan kloroform sebagai pelarut sudah tepat meskipun rendemen (senyawa aktif yang dihasilkan) memiliki prosentase yang kecil. Diduga senyawa yang terkandung pada fraksi kloroform herba bandotan (FKB) merupakan senyawa flavonoid non-polar aglikon seperti dihydroflavonoid, isoflavone, dan flavon termetilasi (Hajnos, 2007)

3. Kromatografi Lapis Tipis

Flavonoid dengan polaritas yang rendah memiliki kelarutan yang lebih baik pada pelarut eter maupun kloroform (Markham, 1982). Sehingga pada elusi fase diam silica gel F₂₅₄ menggunakan fase gerak non-polar campuran kloroform dan methanol 7:2, terbentuk bercak/eluen pada senyawa uji dan pembanding. Prinsip yang digunakan pada metode ini adalah pemisahan secara adsorpsi berdasarkan kepolaran dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak (Ritna, 2016). Fase diam yang digunakan berupa silica gel yang memiliki nilai polaritas tinggi dengan adanya gugus hidroksil pada permukaannya (Anonim, 2011). Untuk memperoleh eluen yang baik, maka fase gerak digunakan pelarut yang memiliki polaritas lebih rendah. Eluen terbaik terbentuk pada penggunaan fase gerak campuran kloroform dan methanol yang memiliki nilai *polarity index* 4,1 dan 5,1 yang menghasilkan polaritas campuran yang bersifat kurang polar.

Terbentuk dua bercak pada senyawa uji dengan nilai Rf masing-masing 0,75 dan 0,812 yang menunjukkan bahwa terdapat dua komponen senyawa flavonoid yang terlarut bersama fase gerak. Sedangkan bercak senyawa pembanding rutin (flavonoid golongan flavonol) membentuk bercak dengan nilai Rf 0,837. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji mengandung flavonoid dengan golongan yang berbeda dengan senyawa pembanding. Nilai Rf yang terbentuk lebih tinggi berbanding terbalik dengan polaritasnya (Anonim, 2011), sehingga diduga senyawa uji memiliki polaritas yang lebih tinggi dibandingkan dengan rutin.

Untuk memperkuat bercak yang terbentuk, maka dilakukan pewarnaan menggunakan semprot amoniak (NH_3) pada plat silica yang memiliki indikator fluoresensi sehingga tampak bercak berfluoresensi ungu muda pada pengamatan dengan sinar UV 254 nm. Fluoresensi atau peredaman yang terbentuk menunjukkan bahwa senyawa uji maupun senyawa pembanding rutin memiliki minimal dua ikatan rangkap terkonjugasi (Alen, 2017). Namun dalam hal ini tidak ada perubahan warna yang signifikan dibandingkan dengan sebelum dilakukan penyemprotan. Maka diduga senyawa flavonoid yang terkandung dalam FKB yaitu jenis isoflavone yang tidak mengandung 5-OH bebas (Markham, 1988). Kromatografi lapis tipis merupakan uji pendahuluan identifikasi senyawa berdasarkan visualisasi bercak dan warna yang terbentuk, sehingga hanya diketahui golongan senyawa yang terkandung. Oleh karena itu untuk mengetahui jenis senyawa

golongan yang terkandung, perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan metode yang lebih spesifik seperti HPLC.

4. Uji Karsinogenesis dengan DMBA dan Perlakuan FKB

Subjek uji digunakan 20 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* yang berusia 40 hari. Pemilihan subjek uji didasarkan pada kemiripan perkembangan karsinogenesis antara tikus dengan manusia (Liska, 2016), masa hidup yang relatif singkat, eksperimen atau perlakuan mudah, perbedaan genetiknya tidak banyak, serta kontrol lingkungan mudah dilakukan (Kikkawa, 2012). Dua puluh subjek uji dibagi dalam 5 kelompok masing-masing terdiri dari 4 tikus. Setelah dilakukan adaptasi selama 1 minggu, tikus kelompok K.DMBA, DMBA+FKB750, dan DMBA+FKB1500 diinduksi agen karsinogenik DMBA (7,12-dimetilbenz(a)ntrasen). Sedangkan pada kelompok K.FKB, tikus diberikan kontrol FKB dengan dosis 1500 mg/kg BB yang dilarutkan menggunakan larutan CMC Na. Larutan CMC Na juga digunakan sebagai control pelarut pada kelompok K.CMCNa. Pemberian FKB juga diberikan pada tikus kelompok DMBA+FKB750 dan DMBA+FKB1500 dengan dosis masing-masing 750 mg/kg BB dan 1500 mg/kgBB pada minggu keempat dan kelima.

DMBA merupakan salah satu dari golongan *polisiklik aromatic hydrocarbon* (PAH) yang berpotensi sebagai agen sitotoksik, mutagenic, immunosupresif, serta karsinogenik (Hartono *et al.*, 2013) meskipun bukan

marker spesifik. Mekanisme aksinya melibatkan enzim sitokrom P-450 dan epoksida hidrolase yang menginduksi terbentuknya *proximate carcinogen* untuk kemudian berkembang menjadi *ultimate carcinogen* (karsinogen akhir). Pembentukan kanker melibatkan mutasi sel DNA melalui pembentukan epoksid dihidrodiol yang membentuk kompleks senyawa (Pretysta, 2012) sehingga menyebabkan *mutase somatic* dari onkogen Harvey Ras-1 pada kodon 61 kanker payudara dan kanker kulit (Dandekar *et al.*, 1986). Pada awal pembentukannya terjadi proses angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru). Faktor yang menyebabkan terjadinya angiogenesis ini salah satunya adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Fitricia, 2012).

Pemberian FKB dimulai pada minggu keempat difungsikan sebagai agen kemopreventif atau sebelum sampai pada tahap karsinogenesis akhir. FKB akan menghambat proses karsinogenesis baik pada pertumbuhan sel, proliferasi sel, migrasi, invasi hingga apoptosis yang menyebabkan perubahan kelenjar mammae (Howlin, 2006) serta angiogenesis.

Secara deskriptif, aktivitas tikus dengan induksi DMBA lebih rendah dibandingkan pada tikus dengan perlakuan FKB. Namun secara makroskopis, belum nampak adanya insidensi tumor pada tikus baik pada area kelenjar mammae maupun bagian lainnya. Selain itu, berat badan tikus selama penelitian tidak menunjukkan adanya penurunan. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jumlah dosis yang

diberikan serta lama pemejanaan DMBA. Oleh karena itu perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut secara mikroskopis.

5. Pengecatan Hematoksillin-Eosin

Pengecatan menggunakan Hematoksillin-Eosin menunjukkan adanya perubahan pada histologi kelenjar mammae. Menggunakan indikator perubahan histologi jenis lapisan dan tebal duktus, pada kelompok K.DMBA dengan induksi DMBA terbentuk lapisan epitel berlapis. Sedangkan pada kelompok FKB dan pelarut histologi yang terbentuk berupa lapisan epitel selapis. Pada kelompok perlakuan DMBA dengan FKB menunjukkan adanya perubahan pada tebal lapisan epitel duktus. Hal ini menunjukkan adanya perbaikan histologi epitel duktus sebagaimana pada kelompok FKB dan pelarut.

Perbaikan yang terjadi pada sel epitel kelenjar mammae menunjukkan adanya efek FKB terhadap histologi tikus yang terinduksi DMBA. Dimana sel epitel ini merupakan salah satu tempat DMBA teraktivasi metabolit yang aktifnya yaitu DNA *adduct* (Fitricia, 2012). Interaksi yang terjadi ini merupakan tahap awal terjadinya karsinogenesis ditandai dengan terbentuknya kompleks DNA yang dapat merusak struktur dan fungsi DNA, protein, serta lipid.

Selain indikator diatas, warna dari histologi kelenjar mammae mengalami perubahan akibat pewarnaan oleh Hematoksilin dan Eosin, Pewarnaan Hematoksilin yang bersifat basa menyebabkan inti sel berwarna

biru sedangkan pada pewarnaan Eosin yang bersifat asam ditunjukkan pada dinding sel berwarna kemerahan atau coklat. Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok K.FKB, K.CMCNa, DMBA+FKB750, dan DMBA+FKB1500 tampak sel yang mengelilingi duktus membentuk bulat sempurna, sedangkan pada kelompok K.DMBA tidak beraturan. Sel yang terbentuk pada tepi duktus diakibatkan karena adanya reaksi zat pada saat proses pencucian preparat dimana molekul yang bersifat hidrofobik (duktus) tidak dapat bersatu dengan molekul bersifat hidrofilik (PBS).

Oleh karena itu, berdasarkan pengamatan mikroskop pada preparat histologi pengecatan Hematoksin-Eosin, terdapat perubahan histologi kelenjar mammae tikus dengan induksi DMBA dan FKB dapat menghambat kerusakan histologi kelenjar mammae.

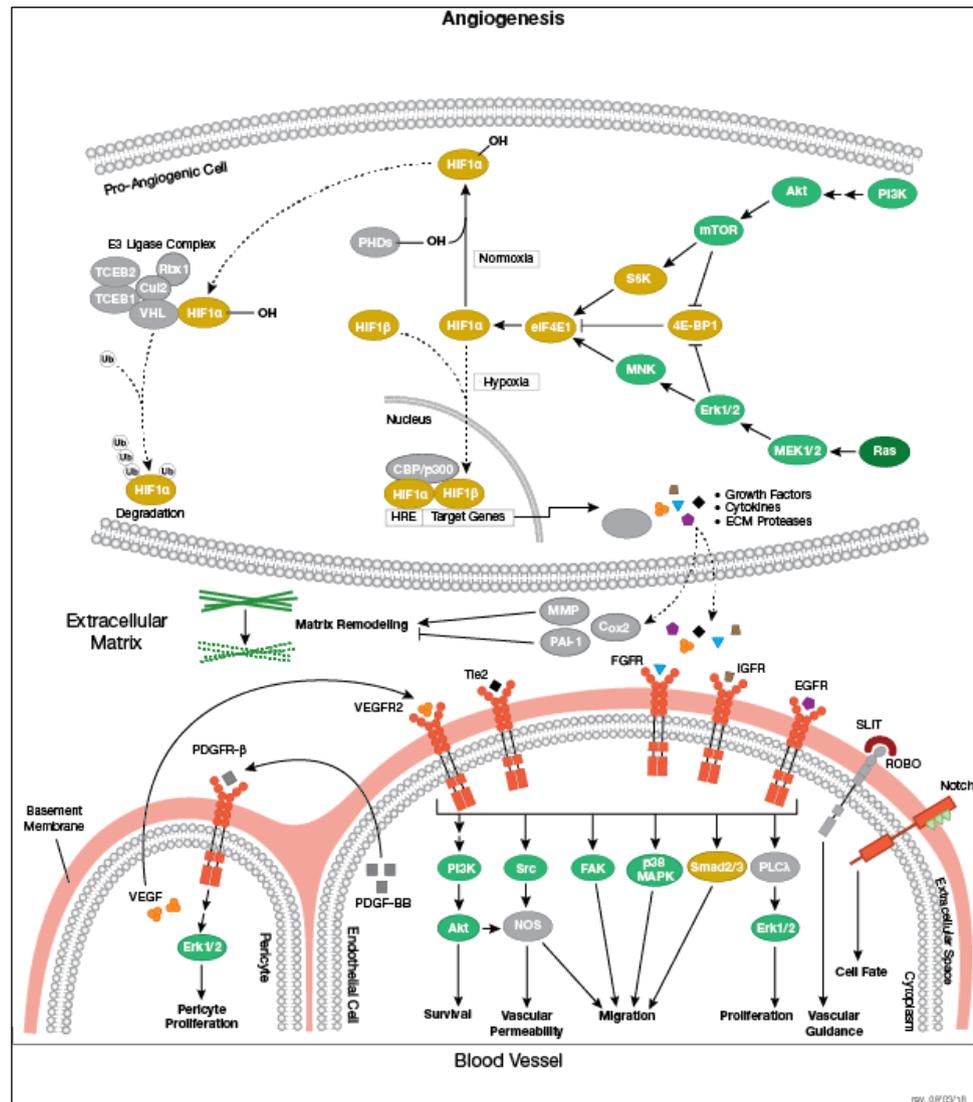
6. Uji Imunohistokimia

Pewarnaan preparat menggunakan imunohistokimia berfungsi untuk mengetahui ekspresi dari antibodi VEGF terhadap histologi kelenjar mammae tikus. Digunakan antibodi VEGF karena merupakan salah satu faktor terbesar yang menyebabkan terjadinya angiogenesis, selain secara *molecular docking* menunjukkan interaksi ikatan yang kuat.

Berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop, histologi kelenjar mammae pada seluruh kelompok menunjukkan imunoreaktif terhadap antibodi VEGF. Pada kelompok dengan induksi DMBA menunjukkan adanya imunoreaksi yang kuat, divisualisasikan dengan warna coklat yang

terbentuk lebih dominan. Visualisasi kekuatan warna yang terbentuk pada histopatologi kelenjar mammae, terdapat perbedaan yang berarti antara kelompok DMBA dengan kelompok FKB. Kelompok FKB tidak memiliki imunoreaksi yang kuat terhadap antibodi VEGF. Berdasarkan persentase yang diperoleh antara kelompok DMBA dengan FKB dapat dijadikan acuan batas atas dan bawah imunoreaktif terhadap antibodi VEGF yaitu pada range 94,23% sampai 13,26%.

Pada kelompok DMBA+FKB750 menunjukkan persentase kerusakan 53,56%, sedangkan pada kelompok DMBA+FKB1500 15,51%. Kelompok DMBA+FKB750 dengan perlakuan DMBA dan FKB dosis 750 mg/kgBB lebih imunoreaktif terhadap VEGF dibandingkan dengan kelompok DMBA+FKB1500 dengan perbedaan dosis FKB 1500 mg/kgBB. Imunoreaksi yang terjadi ini menunjukkan bahwa kelompok DMBA+FKB750 dan kelompok DMBA+FKB1500 memiliki potensi dalam menghambat kerja protein VEGF dalam proses angiogenesis ditunjukkan dengan ekspresi VEGF pada histologi yang lebih rendah serta berada pada batas atas dan bawah sel positif. Kelompok DMBA+FKB1500 memiliki potensi yang lebih baik dalam menghambat kerja protein VEGF ditunjukkan dengan ekspresi VEGF yang lebih rendah atau negatif dibandingkan dengan kelompok DMBA+FKB750. Selain itu, persentase kelompok DMBA+FKB1500 lebih baik dan mendekati persentase normal pada kelompok K.FKB perlakuan kontrol FKB.



Gambar 9. Mekanisme Angiogenesis oleh VEGF (Sumber: cellsignal.com)

Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru yang abnormal dipicu oleh reseptor VEGF yang teraktivasi akibat pasokan oksigen yang kurang pada jaringan sehingga mempengaruhi sirkulasi darah. Kemudian VEGF tersebut menyebar pada jaringan di sekitarnya dan berikatan dengan reseptor spesifik pada sel endotel yang berdekatan dengan pembuluh darah

tersebut. Setelah berikatan, sinyal-sinyal aktif dikirim dari permukaan sel nucleus kemudian memproduksi enzim-enzim. Enzim kemudian mencerna lubang-lubang pada membrane basalis yang menyelubungi pembuluh darah. Sel-sel endotel kemudian berproliferasi dan migrasi pada pembuluh darah yang telah rusak menuju ke jaringan yang telah mengalami tumor di awal. Enzim-enzim MMPs diproduksi bersamaan dengan perluasan pembuluh darah baru dan kemudian membentuk membrane basalis.

Sehingga pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa FKB memiliki peran secara molekuler melalui faktor angiogenik VEGF. Apabila protein VEGF dihambat kerjanya, maka proses angiogenesis juga akan menurun. Penghambatan angiogenesis ini pada tingkat seluler akan menghambat abnormalitas sel kanker sehingga tidak terjadi metastasis.

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka FKB dosis 1500 mg/kg BB mampu menghambat kerja VEGF sebagai faktor angiogenesis pada kelenjar mammae. Akan tetapi diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas FKB pada variasi dosis tertentu