

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan keaslian dan kebenaran simplisia yang akan diuji. Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Merapi, Kaliurang, Yogyakarta. Hasil dari determinasi yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada menunjukkan simplisia yang digunakan dalam penelitian ini asli dan benar merupakan tanaman bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Lampiran 1).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

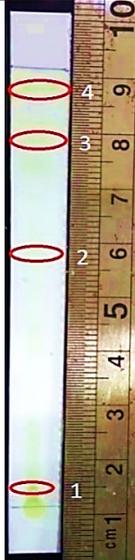
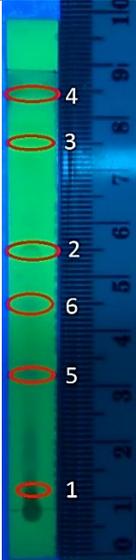
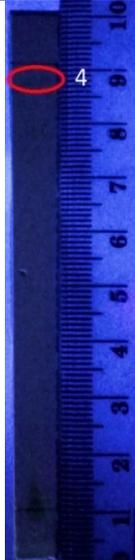
Serbuk kering simplisia bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diekstraksi menggunakan metode maserasi. Sebanyak 1 kg serbuk simplisia direndam dalam pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 5 hari, kemudian dilakukan remaserasi dengan perbandingan yang sama selama 2 hari. Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan dan diperoleh ekstrak cair sebanyak 7 L selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Fraksi n-heksan rosella (FNR) yang diperoleh sebanyak 6,3 L kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator*. Kemudian didapatkan fraksi

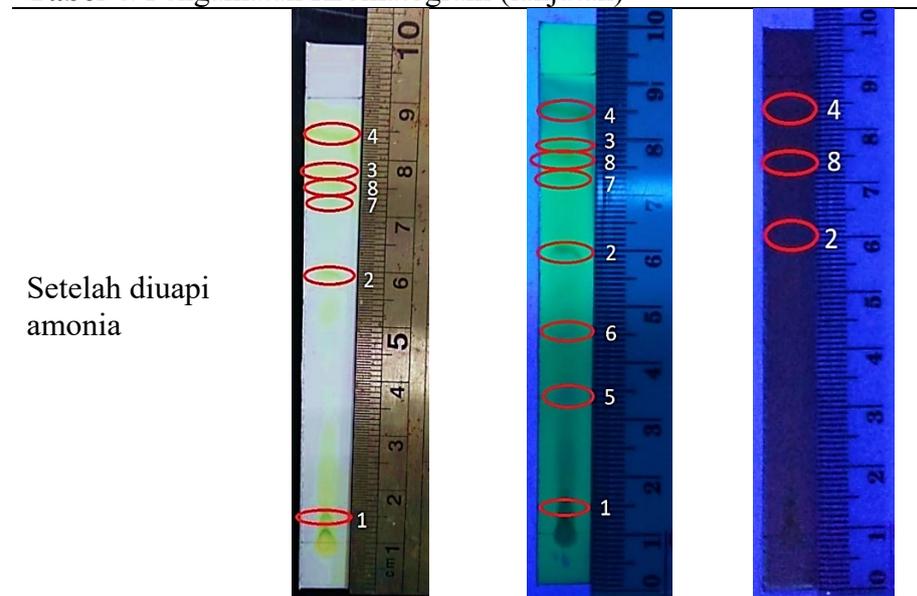
kental rosella sebanyak 3,875 gram dengan % rendemen 0,3% (Lampiran 2).

3. Identifikasi Senyawa Metode KLT

Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel GF₂₅₄, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform. Sebelumnya telah dilakukan beberapa kali percobaan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak dan rasio perbandingan yang berbeda, antara lain asam asetat 15%, etil asetat : kloroform : methanol (1:8:1), B:A:W (4:1:3), dan kloroform : etanol (8:1). Dari beberapa percobaan tersebut, hasil pemisahan terbaik ditunjukkan dengan menggunakan fase gerak kloroform. Pengamatan kromatogram pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm menunjukkan adanya bercak warna yang dapat diamati pada tabel 4.

Tabel 4. Pengamatan Kromatogram

	Sinar Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
Sebelum diuapi amonia			

Tabel 4. Pengamatan Kromatogram (lanjutan)**Tabel 5.** Hasil Uji KLT FNR

No Bercak	Nilai Rf	Warna Bercak					
		Sinar tampak		UV 254 nm		UV 366 nm	
		Tanpa Uap Amonia	Dengan Uap Amonia	Tanpa Uap Amonia	Dengan Uap Amonia	Tanpa Uap Amonia	Dengan Uap Amonia
1	0,06	Hijau	Hijau	Ungu	Ungu	-	-
2	0,62	Hijau	Hijau	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	-	Ungu
3	0,85	Kuning	Kuning	Kuning	Kuning	-	-
4	0,92	Hijau	Hijau	Hijau	Hijau	Ungu	Ungu
5	0,31	-	-	Ungu	Ungu	-	-
6	0,43	-	-	Ungu	Ungu	-	-
7	0,78	-	Kuning	-	Kuning	-	-
8	0,82	-	Kuning	-	Kuning	-	Ungu

Berdasarkan hasil uji identifikasi kromatogram, FNR diduga mengandung senyawa flavonoid pada bercak no 2, 4, dan 8. Hal ini berdasarkan pada warna bercak yang muncul menunjukkan warna kuning kehijauan pada sinar tampak dan UV 254 nm, serta menunjukkan warna ungu pada pengamatan dengan UV 366 nm. Menurut Intisar (1996), flavonoid pada bercak no 2 dan 4 ditandai dengan pendaran berwarna hijau kecoklatan pada UV 254 nm

menunjukkan terdapatnya kandungan flavonoid glikosida. Sedangkan pada bercak no 8 dengan pendaran ungu setelah diuapi amonia pada UV 366 nm menunjukkan adanya kandungan isoflavon. Berdasarkan penelitian sebelumnya, hasil uji identifikasi juga diduga mengandung senyawa quersetin, yang ditunjukkan pada bercak no 3 dengan nilai Rf 0,85.

4. Uji Antioksidan Metode DPPH

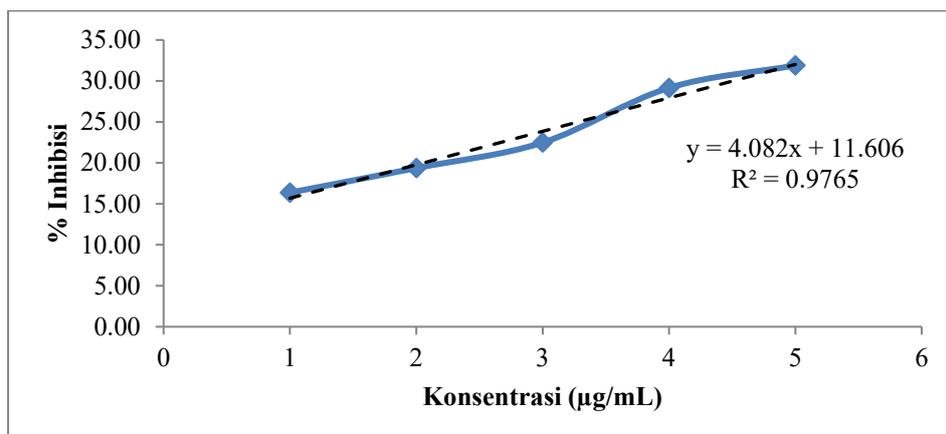
Kemampuan antioksidan dari FNR dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Quersetin digunakan sebagai pembanding dalam menentukan aktivitas antioksidan dari FNR. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang menunjukkan adanya kandungan senyawa quersetin dalam bunga rosella. Data hasil uji antioksidan DPPH dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Data Persentase Inhibisi Pembanding Quersetin

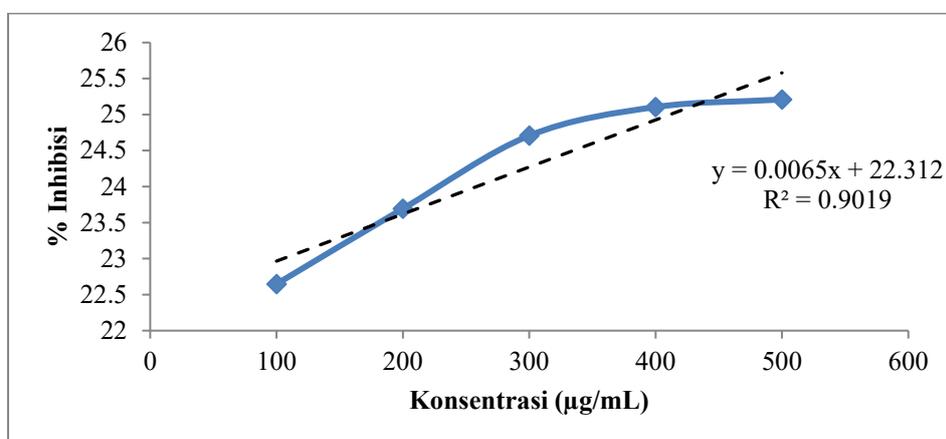
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi Rata-rata	Standar Deviasi	Absorbansi Blanko	% Inhibisi
1	0,7998	0,0071	0,9564	16,37
2	0,7712	0,0171	0,9564	19,36
3	0,7414	0,0274	0,9564	22,48
4	0,6776	0,0180	0,9564	29,15
5	0,6514	0,0321	0,9564	31,89

Tabel 7. Data Persentase Inhibisi Sampel FNR

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi Rata-rata	Standar Deviasi	Absorbansi Blanko	% Inhibisi
100	0,7398	0,0067	0,9564	22,64
200	0,7298	0,0051	0,9564	23,69
300	0,7201	0,0112	0,9564	24,70
400	0,7163	0,0057	0,9564	25,10
500	0,7153	0,0052	0,9564	25,20



Gambar 8. Grafik Inhibisi Quersetin



Gambar 9. Grafik Inhibisi Fraksi n-Heksan Bunga Rosella

Tabel 8. Nilai IC_{50}

Senyawa Uji	Persamaan Regresi Linier	Nilai IC_{50} (µg/mL)	Keterangan
Quersetin	$y = 4,082x + 11,606$ $R^2 = 0,9765$	9,4	Sangat kuat
Fraksi n-heksan bunga rosella	$y = 0,0065x + 22,312$ $R^2 = 0,9019$	4259	Lemah

5. Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

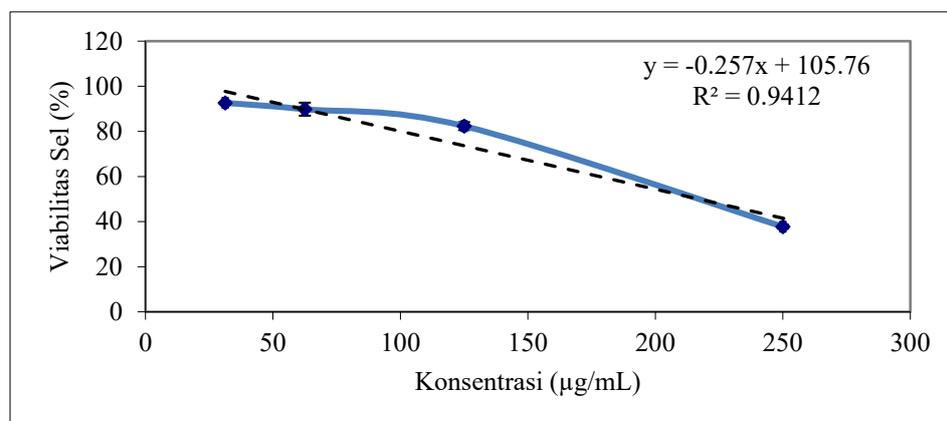
Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT assay untuk mengetahui aktivitas sitotoksik FNR terhadap sel kanker payudara T47D. Pada uji ini digunakan pembanding doksorubisin sebagai agen antikanker.

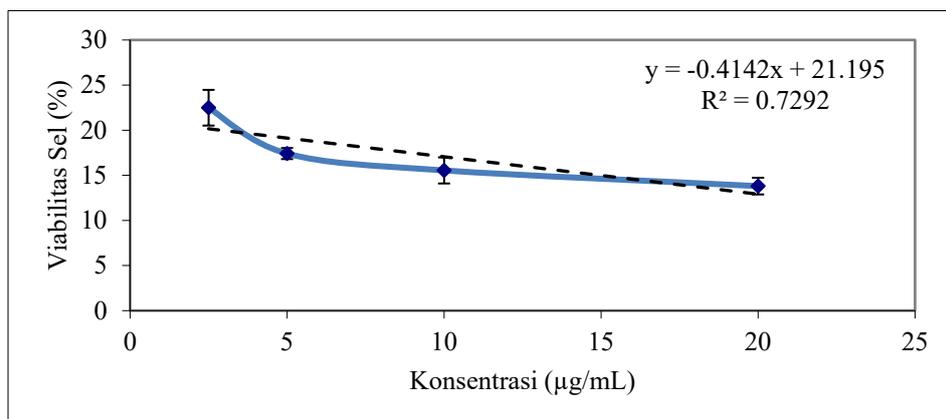
Tabel 9. Data Persentase Sel Hidup dengan Perlakuan FNR

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Standar Deviasi	% Sel Hidup
31,25	0,653	2,89	92,63
62,5	0,634	1,78	89,83
125	0,585	0,86	82,34
250	0,292	1,00	37,76
Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel Media	0,701	0,043
Persamaan	$y = -0,257x + 105,76$ $R^2 = 0,9412$ $IC_{50} = 213 \mu\text{g/mL}$		

Tabel 10. Data Persentase Sel Hidup dengan Perlakuan Dokсорubisin

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Standar Deviasi	% Sel Hidup
2,5	0,099	1,98	22,49
5	0,087	0,61	17,41
10	0,082	1,45	15,54
20	0,078	0,93	13,80
Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel Media	0,293	0,043
Persamaan	$y = -0,4142x + 21,195$ $R^2 = 0,7292$ $IC_{50} = 69 \mu\text{g/mL}$		

**Gambar 10.** Grafik Persentase Sel Hidup dengan Perlakuan FNR

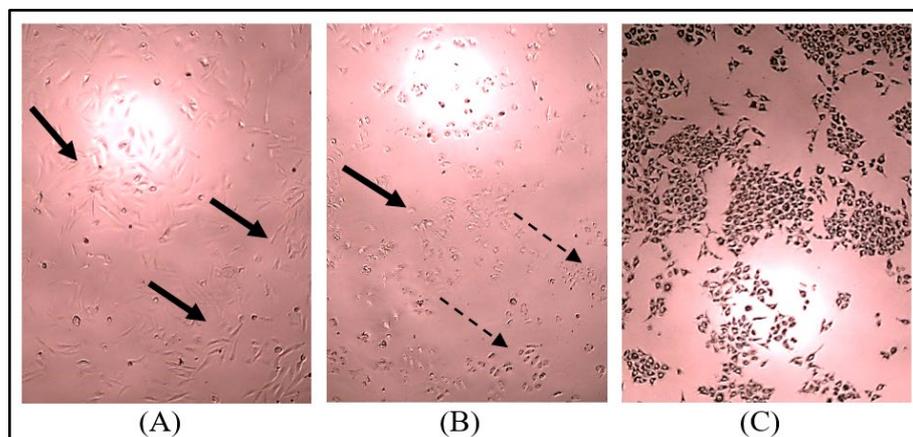


Gambar 11. Grafik Persentase Sel Hidup dengan Perlakuan Doksorubisin

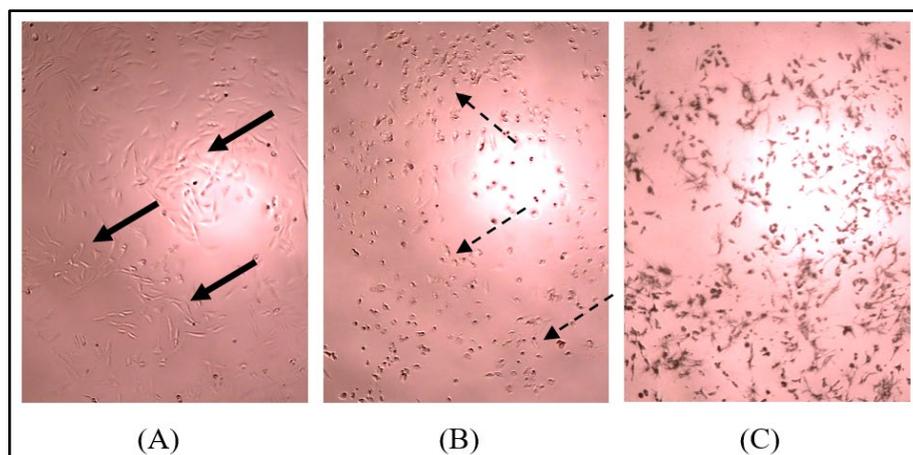
Berdasarkan hasil uji sitotoksik FNR pada konsentrasi terendah yaitu 31,25 µg/mL dapat membunuh 7,37% sel T47D dan konsentrasi tertinggi yaitu 250 µg/mL dapat membunuh 62,24% sel kanker T47D. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari FNR yaitu 213 µg/mL dengan persamaan regresi linear $y = -0,257x + 105,76$ dan $R^2 = 0,9412$. Sedangkan agen kemoterapi doksorubisin pada konsentrasi terendah yaitu 2,5 µg/mL mampu menghambat 77,51% sel kanker T47D, dan pada konsentrasi tertinggi yaitu 20 µg/mL mampu menghambat 86,20% sel kanker T47D. Nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 69 µg/mL dengan persamaan $y = -0,4142x + 21,195$ dan $R^2 = 0,7292$.

Pada uji sitotoksik juga dilakukan pengamatan morfologi sel sebelum dan setelah diberikan perlakuan FNR dan doksorubisin. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop *inverted* dan menunjukkan perubahan morfologi sel setelah diberi perlakuan dengan FNR dan doksorubisin. Sel yang semula berbentuk panjang lonjong dengan

ujung lancip di kedua sisi, setelah perlakuan berubah menjadi tidak beraturan.



Gambar 12. Perubahan Morfologi Sel pada Perlakuan dengan FNR (A) Sebelum diberi Perlakuan (B) Sesaat Setelah diberi Perlakuan (C) Setelah diberi Perlakuan dan diinkubasi Serta Penambahan Reagen MTT. (—) Sel Hidup (----) Sel Mati



Gambar 13. Perubahan Morfologi Sel pada Perlakuan dengan Doksorubisin (A) Sebelum diberi Perlakuan (B) Sesaat Setelah diberi Perlakuan (C) Setelah diberi Perlakuan dan diinkubasi Serta Penambahan Reagen MTT. (—) Sel Hidup (----) Sel Mati

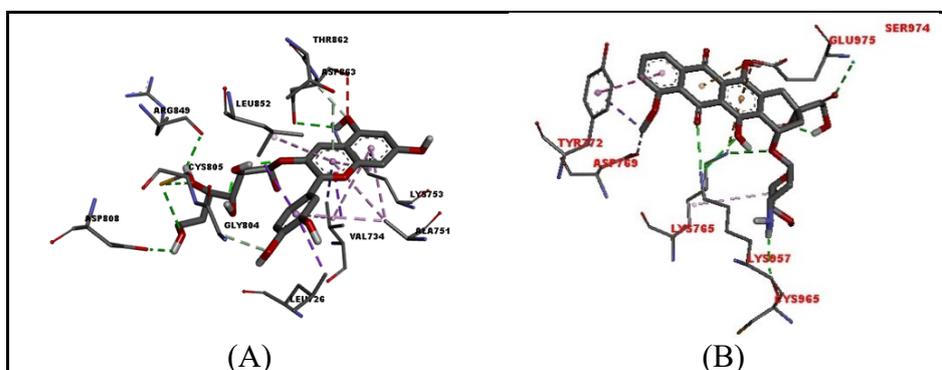
6. *Molecular Docking*

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Autodock Vina* dan *Open babel* kemudian divisualisasikan bentuk

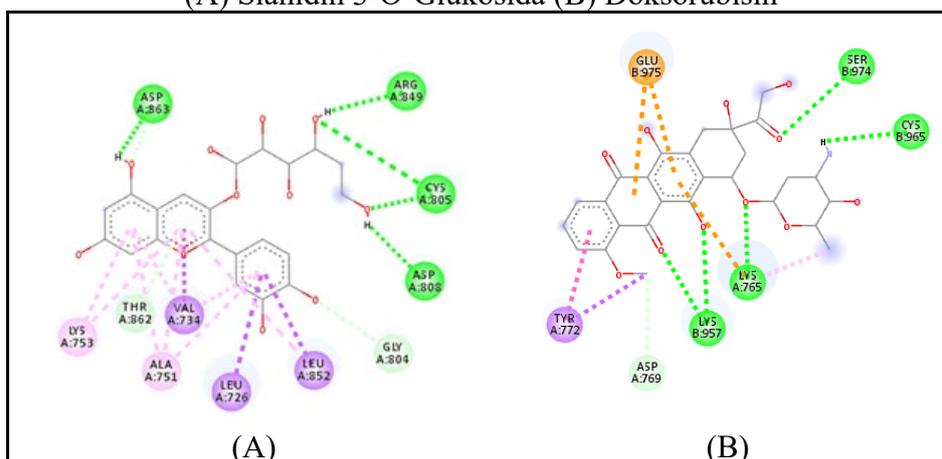
strukturnya secara 2 dimensi dan 3 dimensi dengan aplikasi *DS Visualizer*. Data hasil *molecular docking* dapat dilihat pada tabel.

Tabel 11. Hasil *Molecular Docking* Antara Ligan dan Protein HER2

Nama Senyawa	Nilai RMSD	<i>Docking Score</i>	Konformasi
<i>Native ligand-1</i>	1,484	-9,4	2
Sianidin 3-O-glukosida	1,132	-8,1	2
<i>Native ligand-2</i>	1,536	-7,0	2
Doksorubisin	1,619	-7,0	2



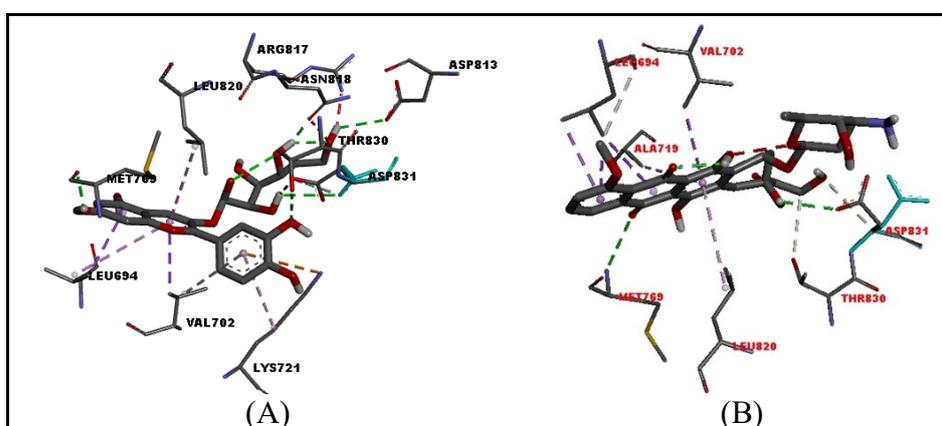
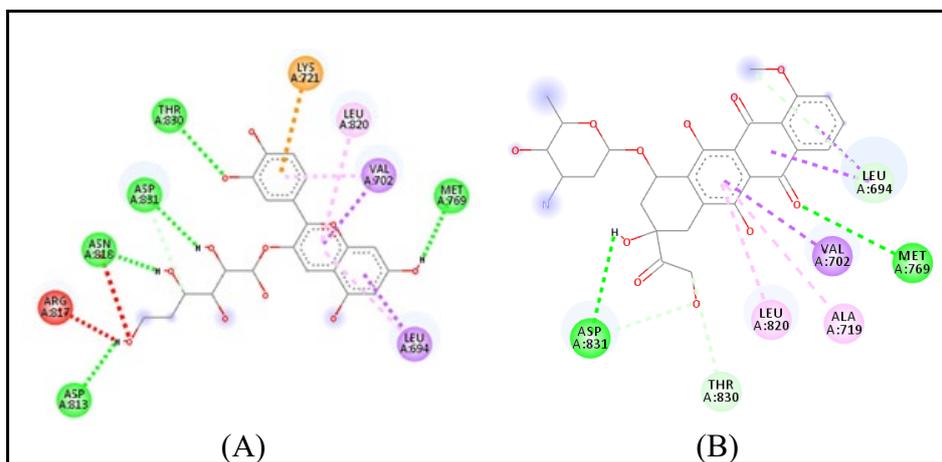
Gambar 14. Struktur 3D Hasil Optimasi Geometri pada Protein HER2
(A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Doksorubisin



Gambar 15. Interaksi 2 Dimensi Senyawa Uji pada Protein HER2 dalam *Pocket Atom* (A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Doksorubisin

Tabel 12. Hasil *Molecular Docking* Antara Ligan dan Protein EGFR

Nama Senyawa	Nilai RMSD	<i>Docking Score</i>	Konformasi
<i>Native ligand-1</i>	1,278	-7,2	2
Sianidin 3-O-glukosida	1,510	-8,2	5
<i>Native ligand-2</i>	1,545	-7,4	4
Doksorubisin	1,141	-10,0	2

**Gambar 16.** Struktur 3D Hasil Optimasi Geometri pada Protein EGFR (A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Dokxorubisin**Gambar 17.** Interaksi 2 Dimensi Senyawa Uji pada Protein EGFR dalam *Pocket Atom* (A) Sianidin 3-O-Glukosida (B) Dokxorubisin

Tabel 13. Hasil Intepretasi dan Jenis Ikatan Berbagai Ligan pada HER2

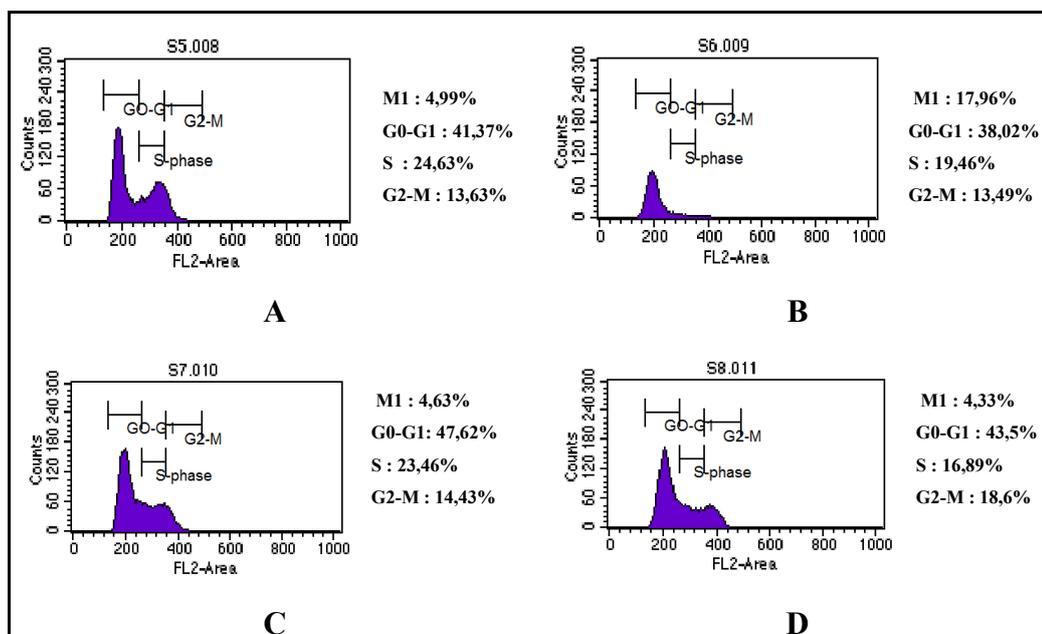
Senyawa	Jenis Ikatan	Residu Asam Amino yang Berikatan
Sianidin glukosida	3-O- 5 ikatan hidrogen	ASP 863, ARG 849, CYS 805, ASP 808
	2 ikatan hidrogen donor pi	GLY 804, THR 862
	3 ikatan pi-sigma	VAL 734, LEU 726, LEU 852
	8 ikatan pi-alkil	LYS 753, ALA 751, VAL 734, LEU 852
Doksorubisin	5 ikatan hidrogen	SER 974, CYS 965, LYS 765, LYS 957
	1 ikatan hidrogen karbon	ASP 769
	3 ikatan pi-kation-anion	GLU 975, LYS 765
	1 ikatan pi-sigma	TYR 772
	1 ikatan pi-pi T	TYR 772
	1 ikatan alkil	LYS 765

Tabel 14. Hasil Intepretasi dan Jenis Ikatan Berbagai Ligan pada EGFR

Senyawa	Jenis Ikatan	Residu Asam Amino yang Berikatan
Sianidin glukosida	3-O- 5 ikatan hidrogen	ASP 813, ASN 818, ASP 831, THR 830, MET 769
	1 ikatan hidrogen karbon	ASP 831
	1 ikatan <i>unfavorable acceptor-acceptor</i>	ASN 818
	1 ikatan <i>unfavorable donor-donor</i>	ARG 817
	1 ikatan pi-kation	LYS 721
	2 ikatan pi-sigma	VAL 702, LEU 694
	3 ikatan pi-alkil	LEU 820, LEU 694, VAL 702
Doksorubisin	2 ikatan hidrogen	ASP 831, MET 769
	3 ikatan hidrogen karbon	ASP 831, LEU 694, THR 830
	2 ikatan pi-alkil	LEU 820, ALA 719
	3 ikatan pi-sigma	LEU 694, VAL 702

7. Uji Siklus Sel dengan Flowsitometri

Uji penghambatan siklus sel dilakukan dengan metode flowsitometri, bertujuan untuk mengetahui fase daur sel yang terhambat pertumbuhannya setelah diberi perlakuan FNR dan doksorubisin. Hasil menunjukkan penghambatan siklus sel T47D yang diberi perlakuan FNR terjadi pada fase G2/M atau pada fase sintesis protein. Sedangkan penghambatan siklus sel T47D yang diberi perlakuan doksorubisin terjadi pada fase M1 atau pada fase mitosis.



Gambar 18. Profil Siklus Sel T47D Menggunakan Flowsitometri pada (A) Kontrol Sel, (B) dengan Perlakuan Doksorubisin, (C) dengan Perlakuan FNR $\frac{1}{2}$ IC₅₀, (D) Perlakuan FNR IC₅₀

B. Pembahasan

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk kering simplisia bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Cairan penyari akan menembus dinding sel

dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, kemudian zat aktif akan larut dalam cairan penyari (Arista, 2008). Sebanyak 1 kg serbuk simplisia direndam dalam pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 5 hari, kemudian dilakukan remaserasi dengan perbandingan yang sama selama 2 hari. Etanol 70% digunakan karena dapat melarutkan alkaloid basa, minyak atsiri, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakuinon, flavonoid, steroid dan klorofil (Arista, 2008). Remaserasi dilakukan karena pada proses ini diperoleh nilai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan metode maserasi saja. Hal ini karena pada proses remaserasi pelarut yang digunakan adalah pelarut baru sehingga pelarut belum mengalami kejenuhan dan masih dapat mengekstraksi dengan baik. Pelarut yang telah jenuh maka telah seimbang pelarut dengan zat terlarutnya, sehingga tidak dapat lagi melarutkan zat (Dianita, 2010). Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan dan diperoleh ekstrak cair sebanyak 7 L. Selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Fraksinasi atau ekstraksi dengan pelarut bertingkat dimaksudkan untuk mendapatkan atau memisahkan senyawa pada ekstrak berdasarkan perbedaan polaritasnya (Hartiwi, 2009). Fraksi n-heksan rosella (FNR) yang diperoleh sebanyak 6,3 L kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator*. Kemudian didapatkan fraksi kental rosella sebanyak 3,875 gram dengan persentase rendemen 0,3%

2. Identifikasi Senyawa Metode KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk analisa kualitatif kandungan senyawa yang terdapat dalam fraksi n-heksan rosella. Kromatografi ialah suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Gandjar dan Abdul, 2012). Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel GF₂₅₄, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform. Fase diam silika gel merupakan adsorben yang serba guna dan penyerap polar yang umum digunakan (Syahmani, 2017), sedangkan fase gerak kloroform telah banyak digunakan untuk identifikasi senyawa dengan metode KLT. Pada penelitian ini telah dilakukan beberapa kali percobaan dengan fase gerak dan rasio perbandingan yang berbeda, antara lain asam asetat 15%, etil asetat : kloroform : methanol (1:8:1), n-butanol : asam asetat: air (4:1:3) dan kloroform : etanol (8:1). Dari beberapa percobaan tersebut, hasil pemisahan terbaik ditunjukkan dengan menggunakan fase gerak kloroform. Fraksi n-heksan rosella diduga mengandung senyawa flavonoid pada bercak no 2, 4, dan 8 (tabel 4). Hal ini berdasarkan pada warna bercak yang muncul menunjukkan warna kuning kehijauan pada sinar tampak dan UV 254 nm, serta menunjukkan warna ungu pada pengamatan dengan UV 366 nm. Menurut Intisar (1996), bercak yang pada sinar tampak menunjukkan warna kuning redup dan menunjukkan pendaran berwarna hijau kecoklatan pada UV 254 nm menunjukkan terdapatnya kandungan

flavonoid glikosida. Hal ini muncul pada bercak no 2 dan 4. Sedangkan pada bercak no 8, pada sinar tampak tidak menunjukkan adanya bercak namun pendaran ungu muncul pada UV 366 nm menunjukkan adanya kandungan isoflavon. Penelitian Mahadevan pada tahun 2008 menunjukkan bahwa terdapat senyawa quersetin dalam bunga rosella. Penelitian yang dilakukan oleh Yusak (2017), pada fraksi n-heksan jeruk purut terdapat kandungan flavonoid yang dianalisa dengan HPLC, namun dalam kadar yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan butanol. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, FNR diduga mengandung senyawa flavonoid berdasarkan uji identifikasi senyawa secara kualitatif.

3. Uji Antioksidan Metode DPPH

Kemampuan antioksidan dari FNR dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Quersetin digunakan sebagai pembanding dalam menentukan aktivitas antioksidan dari FNR, karena dalam bunga rosella terdapat kandungan senyawa tersebut dan merupakan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Sugrani *et al.*, 2009). Nilai persentase inhibisi dari FNR dan quersetin selanjutnya dicari dengan memasukkan nilai absorbansi yang diperoleh kedalam rumus persentase inhibisi. Selanjutnya diperoleh persamaan regresi linear dari grafik hubungan antara persentase inhibisi dengan konsentrasi dari FNR maupun quersetin yang digunakan, kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} .

Hasil perhitungan diperoleh nilai IC_{50} pada FNR dan quersetin berturut-turut 4259 $\mu\text{g/mL}$ dan 9,4 $\mu\text{g/mL}$. Artinya, FNR membutuhkan konsentrasi sebesar 4259 $\mu\text{g/mL}$ dan quersetin membutuhkan konsentrasi sebesar 9,4 $\mu\text{g/mL}$ untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan Reksi (2018) dari fraksi n-heksan umbi paku atai merah menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 884,12 ppm dan termasuk kategori antioksidan lemah. Nilai IC_{50} yang terlalu besar menunjukkan kemampuan antioksidan yang kecil atau lemah. Hal ini diduga karena senyawa flavonoid yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas pada fraksi n-heksan hanya terdapat dalam jumlah yang kecil, sehingga tidak terdapat cukup banyak flavonoid yang dapat menyumbangkan hidrogen dan elektron kepada DPPH. Adanya pengganggu seperti protein dan lemak dalam FNR diduga dapat mengganggu reaksi penangkapan radikal bebas DPPH (Budilaksono, *et al.*, 2014). Sehingga nilai IC_{50} dari FNR dapat dikategorikan sebagai antioksidan lemah ($>150 \mu\text{g/mL}$) menurut Mardawati *et al.* (2008).

4. Uji Sitotoksik Metode MTT assay

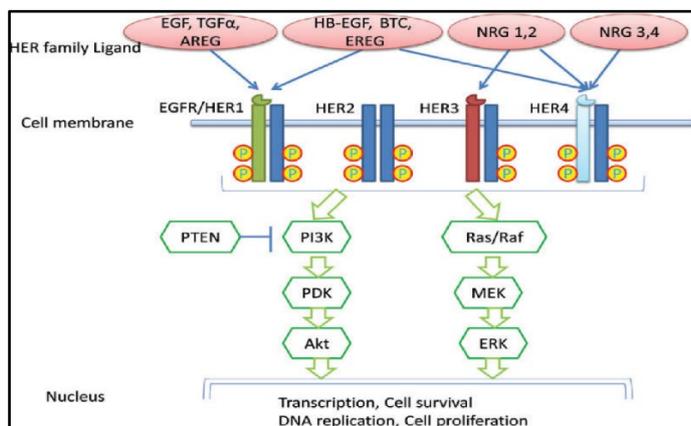
Uji ini bertujuan untuk mengetahui potensi FNR sebagai agen sitotoksik yang diujikan pada sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yang memiliki prinsip reduksi garam kuning tetrazolium menjadi kristal formazan. Garam

tetrazolium mengalami reaksi reduksi oleh enzim reduktase dari rantai respirasi mitokondria sel hidup, menjadi kristal formazan berwarna ungu (Doyle, 2000). Sel kanker kemudian diamati yaitu pada sel T47D normal tanpa perlakuan, yang diberi perlakuan dengan FNR dan yang diberi perlakuan dengan doksorubisin. Sel T47D setelah diberi perlakuan FNR maupun doksorubisin mengalami perubahan morfologi, dari yang semula berbentuk panjang, lonjong dan menyudut di bagian ujungnya, menjadi tidak beraturan dan kepadatannya menurun. Sel yang hidup memiliki karakteristik berwarna cerah dan memiliki kepadatan tinggi, sedangkan sel yang mati ditandai dengan warna yang lebih gelap, bentuk yang tidak beraturan dan kepadatannya rendah (Pratama, 2016). Sel yang telah diberi perlakuan kemudian ditambahkan *reagen stopper* untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan ELISA *reader*. Absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) yang diperoleh dari FNR dan doksorubisin berturut-turut ialah 213 $\mu\text{g/mL}$ dan 69 $\mu\text{g/mL}$. Maka, FNR membutuhkan konsentrasi sebesar 213 $\mu\text{g/mL}$ dan doksorubisin membutuhkan konsentrasi sebesar 69 $\mu\text{g/mL}$ untuk menghambat 50% sel kanker payudara T47D. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, doksorubisin memiliki aktivitas sitotoksik yang cukup tinggi, sedangkan FNR memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker payudara T47D menurut Abde-Hameed *et al.*

(2012). Penelitian yang dilakukan Rizki (2016) menunjukkan adanya perubahan morfologi sel kanker payudara T47D menjadi tidak beraturan dan berwarna gelap setelah diberi perlakuan fraksi n-heksan herba kemangi, serta menghasilkan nilai $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ sehingga termasuk dalam kategori sitotoksik lemah.

5. *Molecular Docking*

Uji *in silico* pada penelitian ini ialah dengan melakukan *molecular docking*. *Docking* dilakukan untuk mengetahui interaksi antarprotein, salah satunya interaksi antara ligan dengan reseptor. Pada penelitian ini dilakukan uji *molecular docking* untuk mengetahui interaksi antara ligan sianidin 3-O-glukosida dari bunga rosella dan obat kanker doksorubisin terhadap reseptor EGFR dan HER2. *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) merupakan reseptor transmembran glikoprotein yang ada pada permukaan hampir seluruh sel tubuh, dan berperan dalam pertumbuhan sel, diferensiasi, ekspresi gen dan perkembangan (Martina, 2017). Overekspresi dari EGFR seringkali menjadi indikasi berkembangnya sejumlah kanker. Pada NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*) terjadi overekspresi pada jenis EGFR-1, sedangkan pada kanker payudara terjadi overekspresi pada jenis EGFR-2/HER2 (Pratama, 2016).

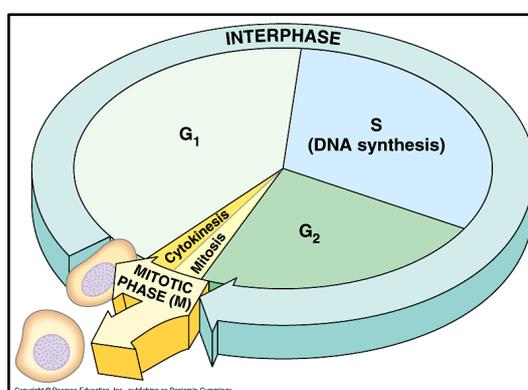


Gambar 19. *Signaling Pathway* Protein EGFR dan HER2 (Cole, 2013)

EGFR maupun HER2 mampu mengaktivasi tirosin kinase dan meneruskan sinyal melalui jalur PI3K/Akt dan jalur Ras/Raf/mitogen – protein kinase teraktivasi, yang mana kedua jalur sinyal tersebut berperan dalam proliferasi sel, angiogenesis, dan apoptosis sel kanker (Martina, 2017). Parameter pengamatan yang digunakan salah satunya adalah nilai RMSD, yang mana jika nilainya lebih kecil dari 2 Å, menunjukkan kemiripan posisi ligan hasil *docking* dengan posisi alaminya. Hasil yang diperoleh dari uji ini ialah nilai afinitas dari sianidin 3-O-glukosida dan doksorubisin terhadap EGFR dan HER2 yang dilihat dari besar nilai energi ikatan bebas atau *docking score*. Besar energi ikatan bebas adalah energi yang dibutuhkan oleh kompleks molekul untuk berikatan dan berperan dalam kestabilan ikatan kompleks ligan dengan reseptor. Semakin kecil nilai energi ikatan bebas, maka ikatan kompleks akan semakin stabil. Hal ini dikarenakan energi ikatan bebas yang kecil menyebabkan kompleks tidak membutuhkan energi yang besar untuk dapat melekat kembali apabila terpisah (Martina, 2017). Berdasarkan uji yang telah dilakukan,

seluruh reseptor memiliki nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$, yang menunjukkan posisi ligan hasil *docking* dengan posisi aslinya tidak terlalu berbeda. Nilai dari energi ikatan bebas dari ligan sianidin 3-O-glukosida dan doksorubisin pada setiap reseptor berdasarkan *docking score* menunjukkan nilai yang negatif, hal ini menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi antara ligan dengan reseptor tidak membutuhkan energi yang terlalu besar sehingga akan terjadi secara spontan. Doksorubisin menunjukkan afinitas paling tinggi pada reseptor EGFR dengan nilai *docking score* -10,0 kcal/mol, dan sianidin 3-O-glukosida menunjukkan afinitas paling tinggi pada reseptor HER2 dengan nilai *docking score* -8,1 kcal/mol. Berdasarkan hasil studi ini, dapat diketahui bahwa sianidin 3-O-glukosida dari bunga rosella dapat berikatan dengan reseptor HER2 dengan stabil dan lebih baik dibandingkan doksorubisin. Sedangkan pada reseptor EGFR, sianidin 3-O-glukosida dapat berikatan dengan stabil walaupun ikatannya tidak sebaik doksorubisin.

6. Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri



Gambar 20. Siklus Sel (Hardin & Bertoni, 2015)

Setiap sel memiliki daur atau siklus sel untuk membelah diri. Siklus sel secara garis besar terdiri dari 4 fase, yaitu fase G1, S, G2, dan fase M. Fase G1 merupakan fase dimana terjadi sintesis protein, sedangkan fase S merupakan fase terjadinya replikasi DNA, pada fase G2 terjadi sintesis protein dan preparasi untuk mitosis, dan fase M adalah mitosis atau terjadinya pembelahan sel. Setiap fase dalam daur sel memiliki jumlah kromosom yang berbeda-beda. Fase G1 memiliki $2n$ (diploid) kromosom, fase S merupakan fase replikasi untuk menuju fase G2 memiliki jumlah set kromosom antara $2n$ dan $4n$, fase G2 memiliki $4n$ (2 sel diploid) kromosom. Prinsip dari metode flowsitometri ialah mendeteksi setiap fase daur sel berdasarkan perbedaan jumlah kromosom pada tiap fasenya (Rollando, 2017). Sel kanker payudara T47D normal tanpa perlakuan, yang telah diberi perlakuan $\frac{1}{2}IC_{50}$ ($106,5 \mu\text{g/mL}$) dan IC_{50} ($213 \mu\text{g/mL}$) FNR serta yang diberi perlakuan IC_{50} ($69 \mu\text{g/mL}$) doksorubisin diamati profil siklus selnya menggunakan flowsitometer. Hasil pengamatan menunjukkan kontrol sel T47D mengalami distribusi sel di fase G1, S dan G2/M. Sel dengan perlakuan doksorubisin mengalami akumulasi sel pada fase M1, sedangkan FNR menyebabkan akumulasi sel pada fase G2/M jika dibandingkan dengan kontrol sel. Sel yang terakumulasi pada fase G2/M mengalami peningkatan dari yang semula pada sel normal 13,63%, menjadi 14,43% dan 18,64% pada sel dengan perlakuan berturut-turut $\frac{1}{2}IC_{50}$ dan IC_{50} . Peningkatan jumlah sel pada fase G2/M

menunjukkan adanya penghambatan siklus sel yang terjadi pada fase tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Shan Hu *et al.* pada tahun 2017, menunjukkan terjadinya penghambatan siklus sel kanker payudara T47D pada fase G2/M setelah diberi perlakuan ekstrak kurkumin dengan dosis 10 dan 30 μM , yang ditandai dengan meningkatnya akumulasi sel pada fase G2/M dari yang semula 16,38% menjadi 22,22% dan 26,28%. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, FNR dapat menghambat siklus sel dengan menghambat sintesis protein dan mencegah terjadinya proses mitosis atau pembelahan kromosom sehingga tidak mencapai fase sitokinesis dan terbentuknya sel baru.