

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian ekperimental laboratoris yang terdiri dari pengujian senyawa melalui beberapa tahapan yaitu seperti proses ekstraksi dan fraksinasi untuk pembuatan sampel uji, uji kualitatif kandungan senyawa dengan metode KLT, penelitian dengan uji *in vitro* fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan metode MTT assay terhadap sel WiDr lalu dilanjutkan uji *flowcytometri*, uji antioksidan metode DPPH dan uji *in silico* antara senyawa antosianin dengan protein IKK dan VEGF menggunakan *molecular docking*.

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

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta serta Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret pada bulan Juli 2018 sampai Mei 2019.

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

#### 1. Variabel Penelitian

##### a. Uji KLT

- 1) Variabel bebas : Fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

- 2) Variabel kontrol : Fase diam dan fase gerak
  - 3) Variabel tergantung : Nilai Rf dan warna bercak pada fase diam
- b. Uji Sitotoksik MTT *assay*
- 1) Variabel bebas : Konsentrasi fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)
  - 2) Variabel kontrol : Sel WiDr, suhu dan waktu inkubasi
  - 3) Variabel tergantung : IC<sub>50</sub> (konsentrasi hambat) pada sel WiDr
- c. Uji *Flowcytometri*
- 1) Variabel bebas : Konsentrasi fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)
  - 2) Variabel kontrol : Sel WiDr, suhu dan waktu inkubasi
  - 3) Variabel tergantung : IC<sub>50</sub> (konsentrasi hambat) pada sel WiDr
- d. Uji Antioksidan
- 1) Variabel bebas : Konsentrasi fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)
  - 2) Variabel kontrol : Konsentrasi DPPH, *Operating Time* (OT),  $\lambda_{\max}$
  - 3) Variabel tergantung : Daya antioksidan pada sel WiDr
- e. Uji *In Silico* dengan *Molecular Docking*
- 1) Variabel bebas : Bentuk konformasi optimasi antosianin

2) Variabel kontrol : Struktur protein IKK dan VEGF, software dan hardware komputer

3) Variabel tergantung : *Docking score*

## 2. Definisi Operasional

### a. Nilai Rf

Nilai Rf merupakan nilai perbandingan relatif antar sampel dengan cara menghitung jarak senyawa dari spot awal dibagi dengan jarak pelarut dari spot awal.

### b. Nilai IC<sub>50</sub>

Pada uji antioksidan nilai IC<sub>50</sub> digunakan untuk mengetahui konsentrasi senyawa ( $\mu\text{g/ml}$ ) yang dapat menghambat oksidasi sebesar 50%. Lalu pada uji sitotoksik nilai IC<sub>50</sub> berfungsi untuk mengetahui kematian sel akibat dari aktivitas senyawa yang diberikan sebesar 50%.

### c. Nilai *docking*

Nilai *docking* diinterpretasikan dengan semakin rendah nilai *docking*, maka akan semakin rendah pula energi afinitasnya sehingga ikatan ligan dan protein lebih tinggi serta lebih stabil.

## D. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah seperangkat komputer (LENOVO), alat-alat gelas (Pyrex), timbangan analitik (Sartorius), oven (*Memmert*), aluminium foil (Brand), lampu UV 254 dan 366 nm, corong pisah

(HERMA), *chamber* (GG), *rotary evaporator* (IKA), mikropipet (Gilson), silika gel GF<sub>254</sub>, autoklaf (Hirayama), *Laminar Air Flow* (LAF) (Labconco), 96-well plate (Nunc), incubator CO<sub>2</sub> (Heraceus), ELISA reader (Bio-Rad), *Tissue Culture Flask* (Nunc), tabung klonikal 15 ml steril (Falcon), *centrifuge* (Sorvall), mikroskop inverted (Zeiss), haemositometer (Nebauer), *shaker* (Gemmy), *blue tip* (Brand), vortex (Labinco L46), blender (Philips), *waterbath* (Memmert), *cell counter* (Brand), *yellow tip* (Brand), pipa kapiler (Pyrex), pH meter, viskometer Brookfield dan kuvet (kuvet *disposable*).

## 2. Bahan Penelitian

### a. Bahan Utama

Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang diperoleh dari Wonosari.

### b. Bahan

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah etanol 70% (General Labora/*grade* pro analisis), *hexane* (General Labora/*grade* teknis), n-Butanol (General Labora/*grade* teknis), asam asetat (General Labora/*grade* teknis), aquadest (General Labora/*grade* teknis), semprot amoniak, *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10 % v/v (*Gibco*), penisilin-streptomisin 1% v/v (*Gibco*), PBS larutan pencuci Phosphat Buffer Salin, Fungizone 0,5%, MTT 5mg/ml dalam media kultur, Reagen stopper Sodium Dodesil Sulfat (SDS) dalam HCL 10% (Merck), sel WiDr (Lab Kultur Sel FKIK UMY), Dimetil Sulfoksida (DMSO), metanol (General Labora/*grade* teknis), DPPH (Chemistry Mix/*grade* teknis), vitamin C, sukrosa (General Labora/*grade* teknis), gliserin (General Labora/*grade* teknis), natrium

benzoat (General Labora/*grade* teknis), asam sitrat (General Labora/*grade* teknis) dan struktur IKK dan VEGF (PDB *file*).

## E. Cara Kerja

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### 2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) didapatkan dari Wonosari, Yogyakarta. Sebelum dilakukan penyerbukan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan sekitar 3-5 hari. Setelah didapatkan simplisia berbentuk serbuk dilakukan penyarian metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% perbandingan 1:10. Serbuk simplisia tersebut kemudian disimpan dalam suhu ruang dan terhindar dari cahaya matahari langsung selama 5 hari sembari diaduk agar didapat penyarian yang baik. Maserat yang diperoleh selama 5 hari tersebut kemudian diremaserasi kembali untuk penyarian senyawa yang optimal selama 2 hari. Maserat pertama dan kedua diukur ekstrak yang dihasilkan.

Selanjutnya dilakukan fraksinasi metode cair-cair dengan n-hexane menggunakan corong pisah perbandingan 1:1. Bagian yang terlarut dalam fraksi etanol dipisahkan kemudian fraksi etanol tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 100 rpm yang dilanjutkan dengan *waterbath* untuk pengentalan fraksi. Hasil dari pengentalan tersebut ditimbang untuk mengetahui jumlah rendemennya.

### 3. Identifikasi Senyawa Kimia Metode KLT

Uji KLT dilakukan dengan cara menotolkan 25 mg fraksi etanol kental yang sudah dilarutkan dengan 1 ml etanol diatas plat KLT menggunakan pipa kapiler. Plat yang berjarak elusi 8 cm tersebut dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah berisi fase gerak yang sudah dijenuhkan terlebih dahulu dan ditutup rapat. Fase gerak yang digunakan yakni n-Butanol : Asam Asetat : Air (BAA) perbandingan 7:2:1 kemudian fase diam yang digunakan ialah silika gel GF<sub>254</sub>. Setelah proses elusi selesai, dikeringkan selama 10 menit dalam suhu 60°C dioven yang selanjutnya akan diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan dihitung nilai R<sub>f</sub> yang didapat dari pengamatan tersebut serta warna noda dari penyemprotan amoniak. Seluruh rangkaian tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid yang terdapat pada bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yakni senyawa antosianin.

### 4. Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

#### a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dicuci dengan sabun lalu dikeringkan. Proses sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan tekanan 15 lbs pada suhu 121°C. Setelah proses tersebut selesai dilanjutkan dengan pengeringan di dalam oven. Uji sitotoksik dilakukan secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow Hood*) yang sebelumnya disterilkan selama 30 menit dengan sinar UV lalu disemprot etanol 70% kemudian dilap.

#### b. Pembuatan Media Kultur

Media yang akan dibuat biasa disebut dengan media komplit. Media komplit tersebut dibuat dengan cara mencampurkan *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) sebanyak 100 ml yang sudah disterilisasi secara aseptis di dalam LAF dengan *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Fungizone 0,5% dan penislin-streptomisin 1%.

#### c. Preparasi Sel

Sel yang inaktif diambil di dalam ampul dari tanki nitrogen cair dan pada suhu 37°C segera untuk dicirikan kemudian disemprot etanol 70%. Ampul tersebut dibuka lalu dipindahkan ke tabung konikal steril yang sudah berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatannya dibuang, pellet ditambahkan 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, disuspensi kembali hingga homogen, kemudian pada tissue culture flask kecil sel ditumbuhkan, diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> dalam inkubator. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan kembali hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk dilakukan penelitian.

#### d. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan koloni sel dicuci dengan ditambah larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan apabila diperlukan di suspensikan kembali secara perlahan, buang larutan

tersebut kemudian ditambahkan 1 ml larutan tripsin 2,5% pada sel, agar merata ditambahkan 3 ml larutan PBS, selama 5 menit didiamkan agar tripsin bekerja dengan maksimal. Sel dipindahkan ke dalam tabung konikal yang steril lalu ditambahkan PBS hingga volume 10 mL dan disentrifugasi selama 3 menit pada 300 rpm. Sel dicuci sebanyak 2 kali dengan media yang sama lalu dihitung jumlah sel menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah dengan jumlah media kultur kemudian diperoleh konsentrasi sel sebesar  $10^4$  sel/100  $\mu$ g/ml dan siap digunakan untuk penelitian.

e. Pembuatan Larutan Uji

Fraksi etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dibuat stok dengan kadar  $10^5$   $\mu$ g/ml dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi tidak lebih dari 2%. Lalu dari larutan stok tersebut akan dibuat seri konsentrasi yang akan diujikan.

f. Uji sitotoksik dengan metode MTT Assay

Sel dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/100  $\mu$ l MK didistribusikan ke pada 96 *well plate* yang masing-masing diisi dengan 100  $\mu$ L dan 3 sumuran yang kosong untuk diisikan dengan kontrol media. Setelah itu diinkubasi agar sel dapat beradaptasi dan menempel pada dasar sumur selama 24 jam. Hari berikutnya, media tersebut diambil, dicuci dengan PBS dan ditiriskan. Untuk kelompok perlakuan Selanjutnya ditambahkan 50  $\mu$ L media kultur dengan kandungan RPMI 0,2%



(kontrol) atau fraksi etanol bunga rosella dari setiap seri konsentrasi lalu direplikasi 3 kali kemudian ditamabh 50  $\mu$ l MK, untuk kontrol sel diberi tambahan 100  $\mu$ l MK ke dalam sumuran yang telah berisi sel dan direplikasi setelah itu direplikasi selama 24 jam. Diakhir inkubasi, dibuat 50 mg serbuk MTT dilarutkan dalam 10 ml PBS, larutan ini untuk membuat media kultur dengan konsentrasi 5 mg/ml MTT. Pembuatan reagen MTT dengan cara mengambil 1 ml stok MTT 5 mg/ml lalu diencerkan 10 ml MK dan di dapat konsentrasi 0,5 mg/ml.

Selanjutnya media dibuang kembali dan dicuci dengan PBS dan ditambahkan 100  $\mu$ l MTT 0,5 mg/ml ke masing-masing sumur kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam, lalu akan terbentuk kristal formazan berwarna ungu yang menggambarkan sel yang masih hidup bereaksi dengan MTT dan dilihat dibawah mikroskop *inverted* bentuk kristal yang terbentuk. Setelah 4 jam, media dengan MTT dibuang lalu dicuci kemudian diberikan larutan stopper SDS 10% dalam HCl 0,1 N agar kristal formazan larut. Selama 10 menit *plate* digoyangkan diatas *shaker* selanjutnya dibaca pada ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## 5. Uji *Flowcytometri*

### a. Preparasi Sampel

Siapkan 1 konikel, media diambil dari sumuran dengan mikropipet 1 ml, masukkan ke konikel. Isikan 500  $\mu$ l PBS ke dalam sumuran,ambil PBS dan masukkan ke dalam konikel. Tambahkan 200  $\mu$ l

trypsin-EDTA 0,25%, inkubasi selama 3 menit ditambahkan 1 ml MK, resuspensi sampai sel lepas satu per satu. Setelah itu masukkan sel ke konikel. Sentrifus konikel dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit, buang MK/PBS, kemudian teteskan 500  $\mu$ l alkohol 70%, 1 tetes/ detik kedalam konikel yang digoyang perlahan. Simpan konikel pada suhu 37°C selama 30 menit. Sentrifus kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. Buang alkohol dan tambahkan PBS kemudian sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit lalu dicuci dengan PBS. Konikel dibungkus dengan aluminium foil. Tambahkan reagen *flowcytometry* dan diamkan selama 30 menit. Masukkan suspensi sel ke dalam *flowcyto-tube* Jika diperlukan di filter (kain nylon/kain kaca) menggunakan mikropipet 1 ml.

b. Perlakuan Uji *Flowcytometri*

Ambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub> lalu amati kondisi sel. Hitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan MK. Masukkan sel ke dalam 6 sumuran, inkubasi sel semalaman kemudian buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Buang media sel lalu cuci dengan PBS. Buang PBS dan sel siap beri perlakuan setelahnya inkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> semalaman.

6. Uji Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0.4 mM

DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg dan dilarutkan dalam metanol sampai 25 ml didalam labu takar. Sebanyak 10,0 ml larutan DPPH diambil dan ditambahkan metanol hingga

volume 100 ml. Dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 30 detik.

b. Persiapan Larutan Uji dari Fraksi Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

(1) Pembuatan Larutan Induk Sampel dan Standar

Sampel fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 20 ml. Didapatkan larutan induk sampel dengan kadar 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Vitamin C ditimbang sejumlah 5 mg lalu dilarutkan dalam metanol 100 ml dan diperoleh kadar 50  $\mu\text{g/ml}$ .

(2) Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi Sampel dan Standar

Seri kadar dibuat sebanyak lima larutan dari larutan induk dengan cara mengambil sejumlah sampel menggunakan pipet dan dilarutkan dengan metanol. Seri kadar untuk fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yakni 100  $\mu\text{g/ml}$ ; 200  $\mu\text{g/ml}$ ; 300  $\mu\text{g/ml}$ ; 400  $\mu\text{g/ml}$  dan 500  $\mu\text{g/ml}$  dan seri kadar untuk vitamin C adalah 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 2  $\mu\text{g/ml}$ ; 3  $\mu\text{g/ml}$ ; 4  $\mu\text{g/ml}$  dan 5  $\mu\text{g/ml}$ .

(3) Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sejumlah 5 ml pelarut metanol ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM.

#### (4) Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan merupakan larutan sampel masing-masing dengan konsentrasi sebanyak 3 ml.

#### c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH dan metanol diambil masing-masing 1000  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Setelah itu di *vortex* dan *spectra* panjang gelombang untuk menghomogenkan lalu dibaca absorbansinya pada kisaran 200-800 nm. Penentuan panjang gelombang dilihat dari nilai absorbansi tertinggi dari *spectra* panjang gelombang.

#### d. Penentuan *Operating Time Sample*

Larutan DPPH dan metanol diambil masing-masing 1000  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Setelah itu di *vortex* selama 30 detik untuk menghomogenkan. Absorbansi larutan tersebut kemudian dibaca dengan panjang gelombang 517 nm tiap 5 menit selama 45 menit, dan direplikasi 3 kali. Waktu yang stabil ditentukan dari absorbansi larutan sampel.

#### e. Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Disiapkan larutan seri kadar dan sampel yang sudah dibuat, lalu diambil larutan fraksi etanol dan vitamin C masing-

masing 5 ml untuk setiap kadar kemudian ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan dihomogenkan dengan *vortex*. Setelah itu didiamkan selma 30 menit di ruang tertutup. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH, lalu dihitung nilai  $IC_{50}$  dengan mengolah nilai absorbansi menjadi % antioksidan.

## 7. *Molecular Docking*

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

Autodock Vina merupakan aplikasi yang digunakan untuk proses molecular docking dan didapatkan secara gratis. Untuk memudahkan proses docking perlu beberapa aplikasi pendukung, diantaranya:

- 1) Autodock Vina diunduh di laman <http://vina.scripps.edu/download.html> berfungsi untuk proses *molecular docking*.
- 2) DS Visualizer diunduh di laman <http://accelrys.com/products/collaborative-science/bioviadiscovery-studio/visualization-download.php> berfungsi untuk mempersiapkan protein dan ligand uji serta untuk visualisasi hasil dari *docking*.
- 3) MGLTools diunduh di laman <http://mgtools.scripps.edu/downloads> berfungsi sebagai pengolah protein target dan ligan uji agar bisa di *docking* dengan aplikasi *Autodock Vina* atau *Autodock Tools*.

- 4) Python diunduh di laman <http://python.org/ftp.python/2.5.2/python-2.5.2.msi> berfungsi untuk menjalankan aplikasi yang menggunakan bahasa pemrograman python seperti MGLTools.
- 5) Open Babel diunduh di laman <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation> berfungsi untuk mengkonversi hasil *docking* dengan format PDBQT ke PDB.
- 6) YASARA diunduh di laman <http://www.yasara.org/viewdl.htm> berfungsi untuk mengukur nilai RMSD.

b. Pengambilan Struktur Protein

Struktur protein target *docking* diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) diakses melalui [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) dengan PDB ID untuk IKK dan VEGF adalah masing-masing 2GNG dan 2P2I.

c. Preparasi Protein Target dan Ligan Uji

Untuk preparasi protein aplikasi yang digunakan ialah YASARA dengan cara membuka file protein. Kemudian semua ligand, molekul air, hemoglobin dll yang terdapat pada protein tersebut dihapus. Ligand tersebut disimpan dengan nama file 2gng.pdb dan 2p21.pdb.

Sedangkan untuk preparasi ligand asli dapat menggunakan aplikasi DS Visualizer dengan cara menghapus bagian protein dari protein target dan menyisakan ligand asli. Kemudian disimpan dengan nama ligand.pdb. Untuk preparasi ligand selain ligand asli

dilakukan dengan cara mengunduh ligand dengan tipe file .sdf, dalam penelitian ini menggunakan ligan antosianin. File yang didapatkan diubah menjadi tipe file .pdb dengan aplikasi Open Babel. Setelah itu protein target, ligand asli dan ligand lainnya dapat di *docking* dengan *Autodock Vina*.

d. Konversi File Reseptor dan Ligan dalam Bentuk PDBQT

Aplikasi *Autodock Vina* dapat dijalankan hanya dengan tipe file .pdbqt maka file tipe .pdb yakni file reseptor dan ligand harus diubah terlebih dahulu dengan penambahan hidrogen menggunakan *MGLTools* atau *Autodock Tools*.

Pengaturan luas wilayah docking digunakan submenu Grid dan pilih Grid Box lalu atur luas wilayah sesuai dengan yang diinginkan. Luas wilayah mempengaruhi proses *docking* dan nilai *Root Mean Square Distances* (RMSD) pada tiap konformasi. Maka untuk mendapatkan nilai RMSD kurang dari 2 Å dilakukan beberapa kali penyesuaian wilayah *docking*. Selanjutnya file disimpan dengan nama ligan.pdbqt.

e. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina*

Pada saat akan melakukan *docking* dipastikan semua file yang dibutuhkan untuk *docking* berada pada folder yang sama. Selanjutnya buka dokumen baru beri nama conf.txt dan isi formulir sesuai dengan keterangan yang akan dilakukan untuk proses *docking*. Bagian reseptor diisi dengan 2gng.pdbqt dan 2p2i.pdbqt

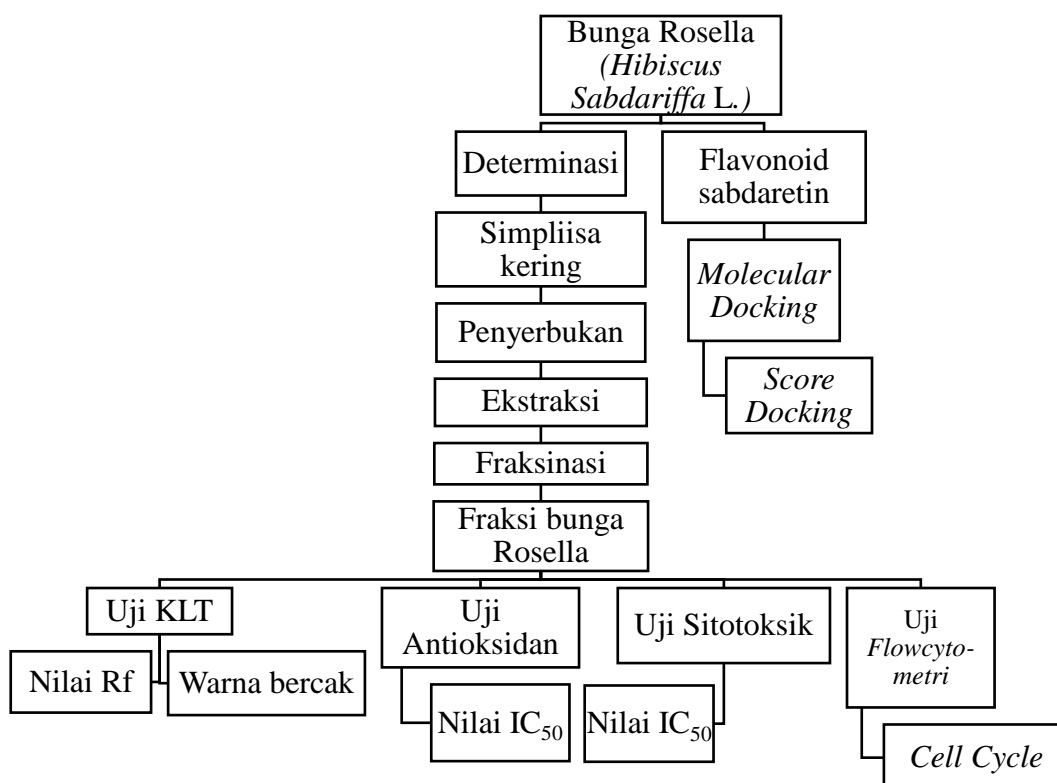
serta bagian ligand diisi dengan ligand.pdbqt. Untuk *center\_x*, *y*, *z* dan *size\_x*, *y*, *z* diisi sesuai dengan nilai yang terdapat pada grid box. Lalu disimpan pada folder yang sama. Penentuan nilai (RMSD) dilakukan dengan pengisian *Command Prompt Windows*. Ketikkan kode dan tunggu sampai proses selesai dan akan muncul beberapa konformasi yang masing-masing terdapat nilai afinitas RMSD. Konformasi yang dipilih adalah konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Untuk memudahkan proses analisis dan visualisasi maka file output.pdqt dipecah menjadi masing-masing konformasi. Hasil pemecahan tersebut akan muncul pada folder yang sama dengan protein target, ligand, dan hasil *docking*.

f. Visualisasi Hasil *Docking*

Aplikasi yang digunakan ialah DS Visualizer. File dengan tipe .pdbq diubah terlebih dahulu menjadi tipe .pdb dengan aplikasi Open Babel. Hasil visualisasi ini berfungsi untuk mengetahui posisi dan gambaran ikatan protein dengan ligand yang diujikan secara 3 dimensi.



## F. Skema Langkah Kerja



**Gambar 7.** Skema langkah kerja

## G. Analisis Data

### 1. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Analisis pada metode KLT dilakukan dengan melihat dan membandingkan nilai Rf yang telah dielusui menggunakan campuran larutan BAA perbandingan 7:2:1 serta diuapi amoniak untuk mengetahui senyawa antosianin pada fraksi etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Plat KLT diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan sinar tampak.

### 2. Analisis Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

Data yang dianalisis merupakan data absorbansi dari ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi tersebut akan dikonversi ke dalam persen hidup, dengan bantuan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}}$$

Kemudian data yang diperoleh diplotkan ke dalam kurva untuk membuat regresi linier.

**Tabel 1.** Klasifikasi Nilai IC<sub>50</sub> sebagai Sitotoksik (Weerapreeyakul, *et al.*, 2012).

Tingkat Kekuatan Sitotoksik	Nilai IC <sub>50</sub>
Cukup Toksik	101-500 µg/ml
Toksik	10-100 µg/ml
Sangat Toksik	<10 µg/ml

Nilai IC<sub>50</sub> merupakan nilai yang dapat membunuh sel sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> juga dapat menggambarkan kemampuan sampel sebagai agen sitotoksik. Apabila nilai IC<sub>50</sub> >500 µg/ml maka dikatakan sampel tidak aktif sebagai antikanker (Machana *et al.*, 2011).

### 3. Uji *flowcytometri*

Data *flowcytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase daur sel sub G1 (apoptosis), S, G2/M, dan sel yang mengalami poliploidi. Penghambatan daur sel yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan antara efek perlakuan larutan uji dengan kontrol (CCRC, 2014).

### 4. Uji Antioksidan Metode DPPH

Suatu sampel dapat dipastikan memiliki potensi sebagai antioksidan jika memiliki hambatan terhadap serapan radikal DPPH. Data yang didapat merupakan hasil pembacaan absorbansi dari spektrofotometer UV, lalu berdasarkan presentase hambatannya dihitung nilai  $IC_{50}$ , dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

$IC_{50}$  atau *Inhibitory Concentration* merupakan nilai yang dapat menghambat DPPH sebesar 50%. Persentase hambatan yang telah dihitung digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$  dengan persamaan  $y = a+bx$ . Dihitung menggunakan regresi linear dengan x adalah konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan y merupakan presentase hambatan (%).  $IC_{50}$  yang menyatakan aktivitas antioksidan suatu senyawa merupakan konsentrasi yang diperoleh dari nilai x setelah diganti dengan  $y = 50$ .

**Tabel 2.** Tingkat Kekuatan Antioksidan Metode DPPH (Mardawati *et al.*, 2008)

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

## 5. Analisis *Molecular Docking*

Analisis dilakukan pada data *score docking* dan pose. *Score docking* yang baik dengan nilai RMSD < 2 Å atau dengan nilai terendah. Nilai tersebut

menunjukkan kestabilan interaksi ikatan antara senyawa uji dengan protein.

Semakin stabil ikatan maka semakin besar potensi senyawa uji untuk berefek.

Visualisasi dari interaksi tersebut digunakan aplikasi DS Visualizer.