

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi






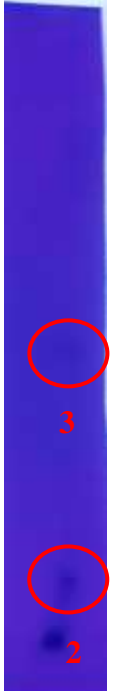
Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran sampel yang digunakan. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang berasal dari Bantul, Yogyakarta. Determinasi dilakukan di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Hasil yang diperoleh bahwa benar sampel yang diujikan adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan termasuk suku Malvaceae (Lampiran 1).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk simplisia bunga rosella sebanyak 1 kg di maserasi menggunakan etanol 70% perbandingan 1:10 selama 5 hari lalu dilanjutkan remaserasi selama 2 hari. Ekstrak etanol didapatkan sebanyak 7 L, kemudian di fraksinasi dengan n-heksan perbandingan 1:1. Sebanyak 6,5 L Fraksi etanol bunga rosella (FEBR) dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Sebanyak 366,96 gram fraksi etanol kental dengan rendemen sebesar 5,64%.

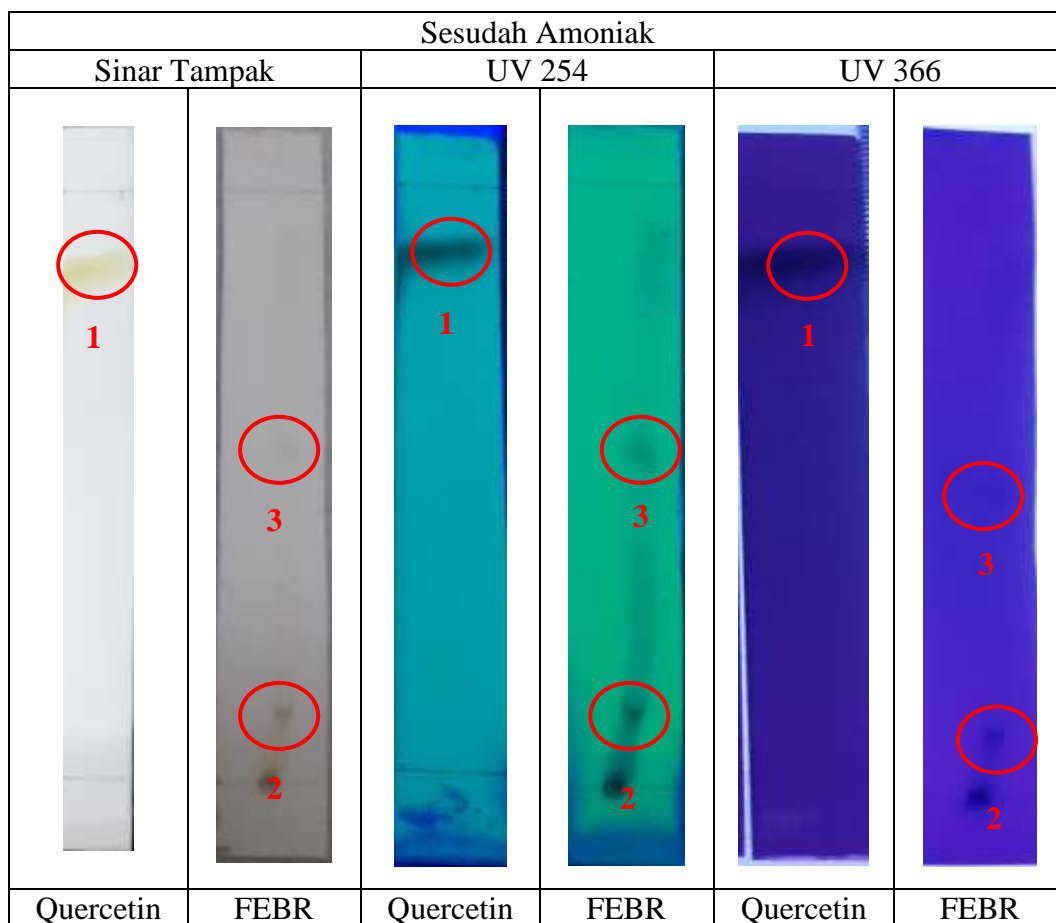
3. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan stok FEBR dibuat dengan konsentrasi 12,5 mg/ml dilarutkan dengan pelarut etanol. Ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam dan fase gerak BAW 4:1:5. dilakukan optimasi dengan berbagai fase gerak. Fase gerak tersebutlah yang mendapatkan hasil pemisahan paling baik.

Sebelum Amoniak					
Sinar Tampak		UV 254		UV 366	
					
Quercetin	FEBR	Quercetin	FEBR	Quercetin	FEBR

Gambar 8. Profil kromatogram sebelum diuapi amoniak

Untuk mendeteksi lebih lanjut kandungan flavonoid dalam FEBR dilakukan uji warna dengan diuapkan amoniak. Plat kromatogram quercetin dan FEBR diuapi amoniak selama beberapa saat sampai terjadi perubahan warna. Perubahan warna yang muncul dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Profil kromatogram setelah diuapi amoniak

Tabel 3. Hasil uji KLT FEBR

No bercak	Nilai Rf	Warna bercak					
		Sinar tampak		UV 254		UV 366	
		Sebelum diuapi	Sesudah diuapi	Sebelum diuapi	Sesudah diuapi	Sebelum diuapi	Sesudah diuapi
1	0,875	Kuning pucat	Kuning pekat	Coklat	Coklat pekat	Ungu pekat	Ungu sangat pekat
2	0,125	Kuning pucat	Kuning pekat	Coklat	Coklat pekat	Ungu berpendar tipis	Ungu sangat berpendar
3	0,5375	Kuning sangat pucat	Kuning pucat	Coklat	Coklat	Ungu berpendar tipis	Ungu berpendar

Berdasarkan data tersebut spot yang didiuga memiliki spot flavonoid adalah spot ke 2 dan 3 karena berubah warna menjadi lebih pekat pada setiap sinar yang diujikan.

4. Uji Antioksidan

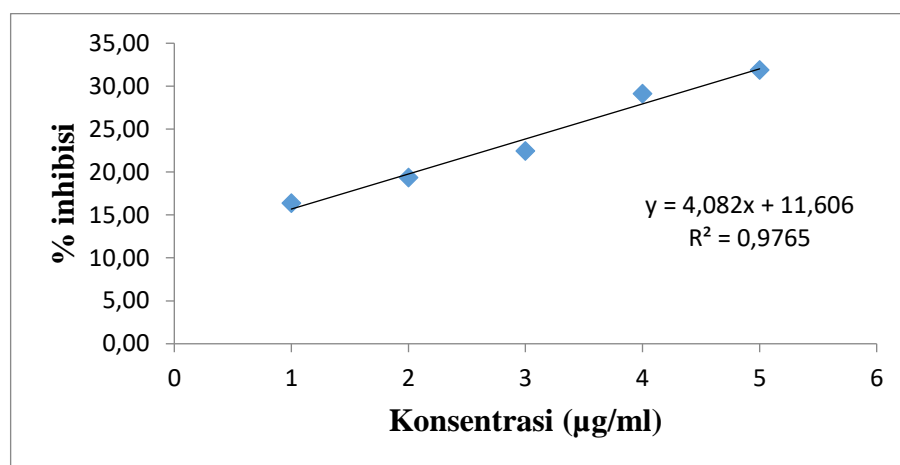
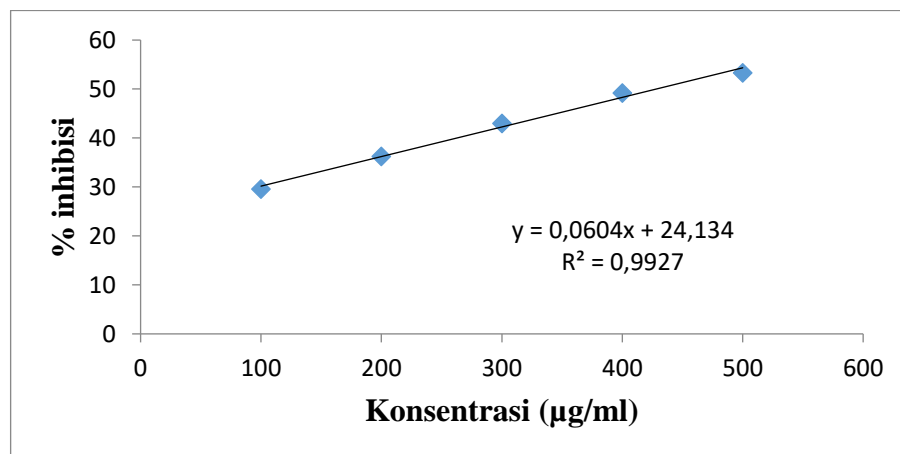
FEBR direaksikan dengan DPPH untuk mengetahui kekuatan antioksidan dari sampel dengan pembanding quercetin. Hasil absorbansi dari sampel dan pembanding berupa nilai IC_{50} . IC_{50} ialah *Inhibitory Concentration* yang berarti pada konsentrasi tertentu senyawa dapat menghambat oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa maka senyawa tersebut sangat memiliki potensi untuk menghambat proses oksidasi sebesar 50% dengan konsentrasi yang kecil. Uji antioksidan dilakukan dengan berbagai kadar seri konsentrasi yaitu konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 $\mu\text{g/ml}$ untuk pembanding quercetin dan 100, 200, 300, 400 dan 500 $\mu\text{g/ml}$. Pembacaan pada spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 514 nm dan dengan masing-masing 3 kali replikasi pada setiap seri konsentrasi. Data absorbansi kemudian dibuat persamaan regresi linier untuk mengetahui nilai IC_{50} . Data absorbansi hasil uji dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Rata-rata absorbansi pembanding quercetin

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi Rata-rata	Absorbansi blanko	% inhibisi	SD
1	0,7998	0,9564	16,37	0,007
2	0,7712	0,9564	19,36	0,017
3	0,7414	0,9564	22,48	0,027
4	0,6776	0,9564	29,15	0,018
5	0,6514	0,9564	31,89	0,032

Tabel 5. Rata-rata Absorbansi sampel FEBR

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi rata-rata	Absorbansi blanko	% inhibisi	SD
100	0,6734	0,9564	29,59	0,005
200	0,6098	0,9564	36,24	0,002
300	0,5457	0,9564	42,94	0,008
400	0,4858	0,9564	49,21	0,003
500	0,4465	0,9564	53,31	0,005

**Gambar 10.** Grafik Inhibisi Quercetin terhadap DPPH**Gambar 11.** Grafik Inhibisi FEBR terhadap DPPH

Setelah didapatkan persamaan regresi linier dari seluruh data absorbansi maka nilai sumbu y dari persamaan regresi linier diganti dengan 50 untuk menentukan nilai IC_{50} dari FEBR dan quercetin.

Tabel 6. Nilai IC₅₀ FEBR dan quercetin

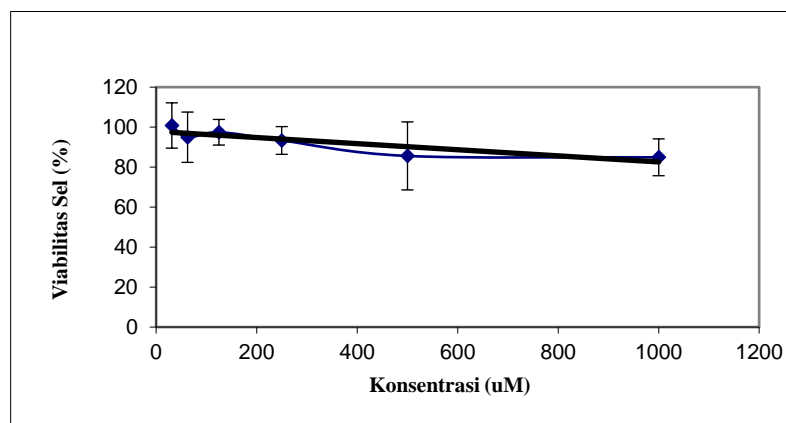
Senyawa Uji	Persamaan regresi linier	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)	Keterangan
Quercetin	$y = 4,082x + 11,606$ $R^2 = 0,9765$	9,40	Sangat kuat
FEBR	$y = 0,0604x + 24,134$ $R^2 = 0,9927$	428,24	Lemah

5. Uji Sitotoksik MTT Assay

Efek sitotoksik dari FEBR pada sel kanker kolon WiDr metode MTT Assay akan dibandingkan dengan obat kanker konvensional yakni *doxorubicin* dengan berbagai konsentrasi. Hasil yang akan diperoleh berupa nilai IC₅₀ dari regresi linier. Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui kemampuan FEBR dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan sel kanker WiDr.

Tabel 7. Viabilitas sel WiDr dengan perlakuan FEBR

Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Stander deviasi
1000	0,303	84,91	9,21
500	0,305	85,59	17,00
250	0,329	93,33	6,94
125	0,342	97,45	6,40
62,5	0,334	94,97	12,59
31,25	0,352	100,83	11,32
Rata-rata Absorbansi	Kontrol sel Media	0,349 0,044	
Persamaan	$y = - 0,0153x + 97,854$ $R^2 = 0,7798$ IC₅₀ = 3.127 µg/ml		

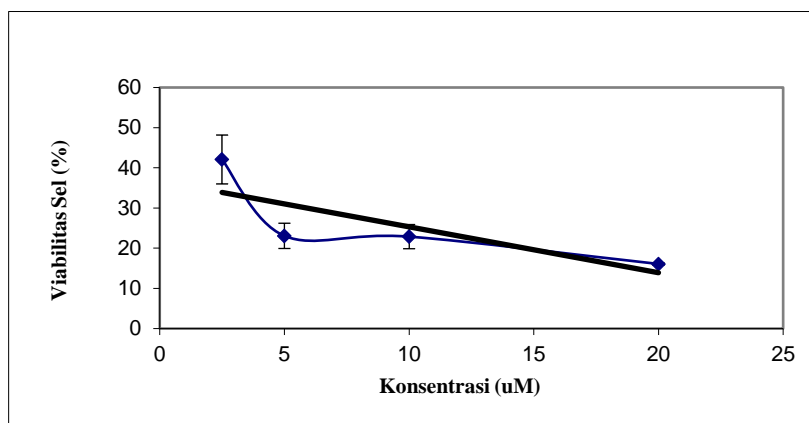


Gambar 12. Kurva efek sitotoksik FEBR terhadap sel WiDr

Berdasarkan hasil uji sitotoksik FEBR didapatkan nilai IC_{50} sebesar 3.217 $\mu\text{g/ml}$. Pada konsentrasi tertinggi yakni sebesar 1000 $\mu\text{g/ml}$ mampu membunuh 15,09 % sel WiDr (100 – 84,91%), sedangkan pada konsentrasi terendah 31,25 $\mu\text{g/ml}$ terlihat terjadi penambahan jumlah sel. Linieritas menunjukkan bahwa penurunan viabilitas sel berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi FEBR yang diberikan pada sel WiDr terlihat pada persamaan $y = - 0,0153x + 97,854$.

Tabel 8. Viabilitas sel WiDr dengan perlakuan *doxorubicin*

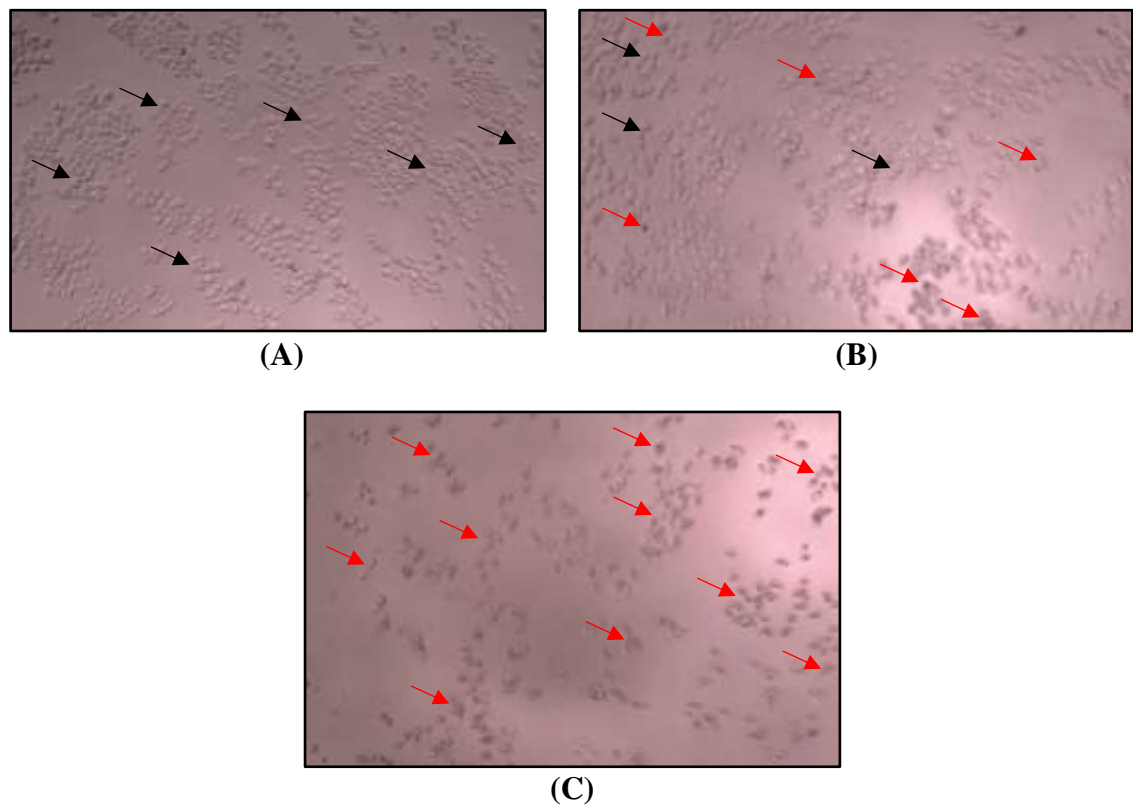
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Standar deviasi
20	0,093	16,09	0,33
10	0,114	22,89	3,01
5	0,114	23,08	3,14
2,5	0,172	42,09	6,09
Rata-rata Absorbansi	Kontrol sel Media	0,349 0,044	
Persamaan	$y = - 1,1416x + 36,738$ $R^2 = 0,6239$ $IC_{50} = 11 \mu\text{g/ml}$		



Gambar 13. Kurva efek sitotoksik *doxorubicin* terhadap sel WiDr

Hasil sitotoksik *doxorubicin* terhadap sel WiDr memberikan nilai IC₅₀ sebesar 11 $\mu\text{g/ml}$. Nilai aktivitas sitotoksik *doxorubicin* lebih kecil dibandingkan FEBR karena pada konsentrasi terkecil sebesar 2,5 $\mu\text{g/ml}$ sudah mampu membunuh lebih dari 50% jumlah sel WiDr.

Pada uji sitotoksik dilakukan pengamatan untuk mengetahui gambaran sel dan perubahan morfologi yang terjadi pada sel WiDr dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Berdasarkan pengamatan tersebut terjadi perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk yang awalnya cenderung bulat sempurna menjadi bulat tidak beraturan dan mengkerut.



Gambar 14. Perubahan morfologi sel WiDr (A) Sebelum diberi perlakuan (B) Setelah diberi perlakuan FEBR (C) Setelah diberi perlakuan *doxorubicin*; morfologi sel WiDr yang hidup ditunjukkan dengan panah hitam (↖) dan morfologi sel WiDr yang mati ditunjukkan dengan panah merah (↗)

6. *Molecular Docking*

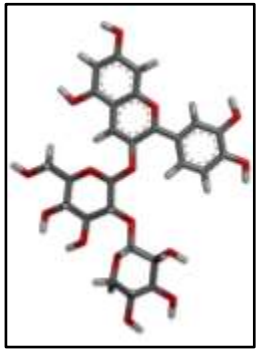
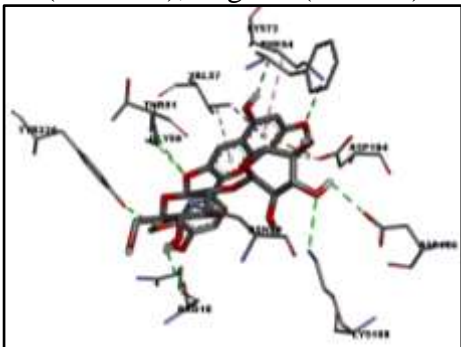
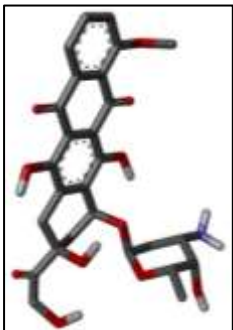
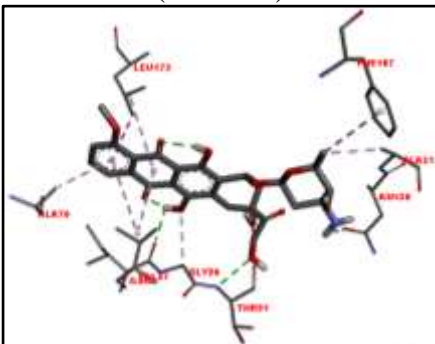
Pengujian ini merupakan uji *in silico* dengan metode *autodock vina* yang dibantu dengan beberapa aplikasi pendukung. Uji ini bertujuan untuk mengetahui interaksi antara senyawa yang diujikan dengan protein target. Protein IKK dan VEGF adalah protein yang menjadi target dalam penelitian ini. Hasil yang diperoleh ialah berupa *docking score*, nilai dari energi yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan protein target. Semakin kecil nilai dari *score docking* maka semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk berikatan atau berinteraksi.

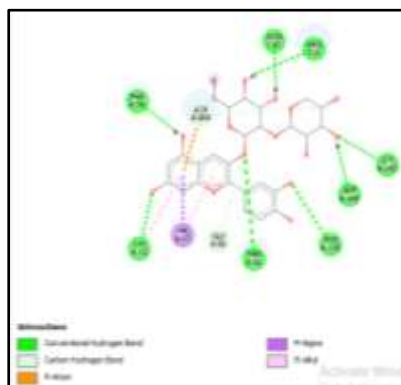
Nilai RMSD dan *score docking* terbaik dari interaksi senyawa uji dan protein target dapat dilihat pada tabel 9 dan tabel 11.

Tabel 9. Hasil pengujian senyawa uji terhadap protein IKK

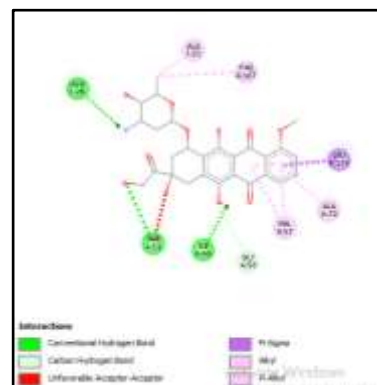
No	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	<i>Docking Score</i> (Kcal/mol)
1	Sianidin-3-sambubioside	5	1.475	- 9.6
2	<i>Doxorubicin</i>	2	1.541	- 8.7

Tabel 10. Visualisasi protein IKK

No	Senyawa Uji	Protein Ikatan Asam Amino
1	Sianidin-3-sambubioside 	Fenilalanin (PHE54), Lisin (LYS72 & 68), Aspartam (ASP184 & 166), Asparagine (ASN20), Valin (VAL57), Glisin (GLY50), Treonin (THR51), Tiroksin (TYR330), Arginin (ARG18) 
2	<i>Doxorubicin</i> 	Asparagine (ASN20), Alanin (ALA21 & 70), Fenilalanin (PHE187), Treonin (THR51), Isoleusin (ILE49), Glisin (GLY50), Valin (VAL57), Leusin (LEU173) 



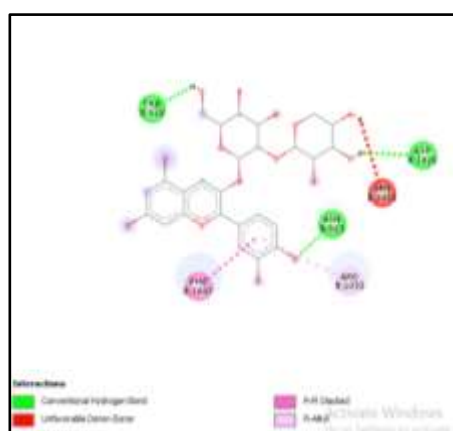
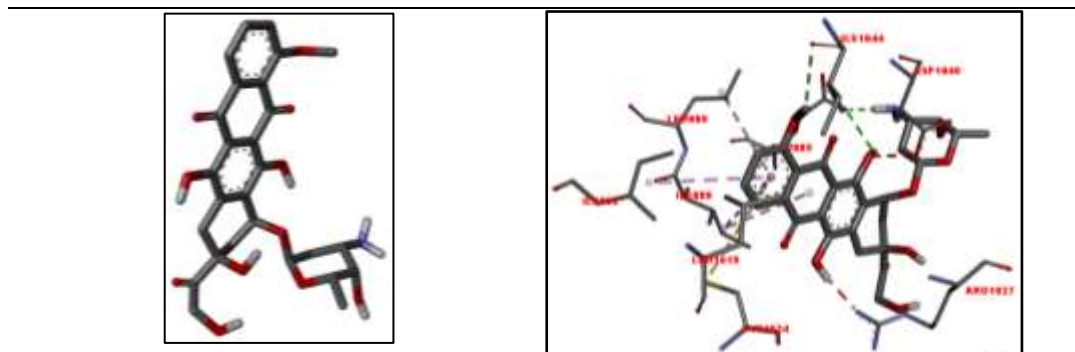
Sianidin-3-sambubioside

*Doxorubicin***Gambar 15.** Visualisasi 2D interaksi asam amino pada protein IKK**Tabel 11.** Hasil pengujian senyawa uji terhadap protein VEGF

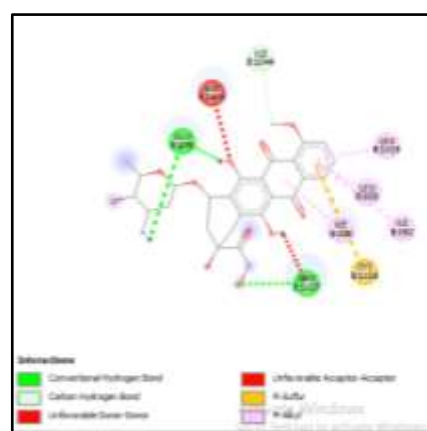
No	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	Docking Score (Kcal/mol)
1	Sianidin-3-sambubioside	3	1.505	- 6.7
2	<i>Doxorubicin</i>	2	1.585	- 7.3

Tabel 12. Visualisasi protein VEGF

No	Senyawa Uji	Protein Ikatan Asam Amino
1	Sianidin-3-sambubioside	Treonin (THR926), Fenilalanin (PHE1047), Arginin (ARG1032), Asparagin (ASN1033 & 923), Aspartam (ASP1028)
2	<i>Doxorubicin</i>	Asam Glutamat (GLU885), Aspartam (ASP1046), Isoleusin (ILE888 & 892), Leusin (LEU1019 & 889), Sistein (CYS1024), Arginin (ARG1027)

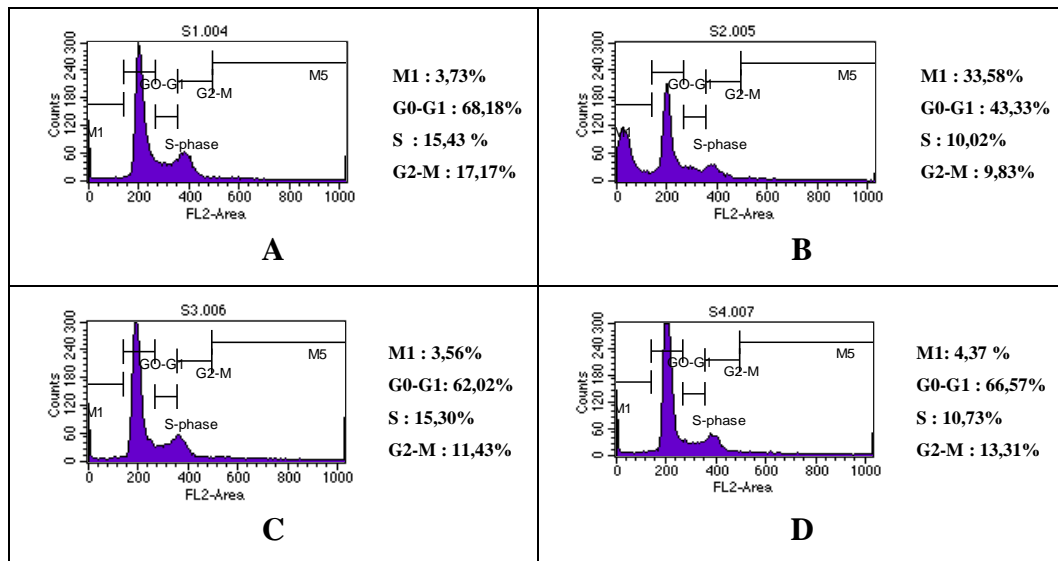


Sianidin-3-sambubioside

*Doxorubicin***Gambar 16.** Visualisasi interaksi asam amino pada protein VEGF

7. Flowcytometri

Flowcytometri merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui penghambatan siklus sel yang dihasilkan oleh senyawa uji. Pada penelitian ini perlakuan yang diberikan yakni $\frac{1}{2}$ dari hasil IC_{50} *doxorubicin*, $\frac{1}{2}$ IC_{50} FEBR dan IC_{50} FEBR. Hasil IC_{50} tersebut didapatkan dari uji sitotoksik. Profil siklus sel dari sel WiDr dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 17. Profil siklus sel WiDR (A) kontrol sel, (B) dengan perlakuan *doxorubicin*, (C) dengan perlakuan FEBR $\frac{1}{2}IC_{50}$, (D) perlakuan FEBR IC_{50}

Hasil yang diperoleh secara keseluruhan ialah baik perbandingan *doxorubicin* maupun FEBR dengan berbagai konsentrasi memiliki tren yang mirip dan lebih cenderung menghambat siklus sel pada M1 atau *early apoptosis*.

B. Pembahasan

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Metode maserasi dilakukan dengan perbandingan 1:10, rasio tersebut ialah rasio terbaik untuk mendapatkan kadar fenol, flavonoid dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) (Handayani *et al.*, 2016). Pelarut yang digunakan yakni pelarut etanol 70 % karena menurut Voight (1994) pelarut tersebut mampu menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dan bahan pengganggu yang masuk ke dalam cairan pengekstraksi minim. Metode ini dipilih karena merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana, murah serta tidak membutuhkan alat yang banyak, meskipun membutuhkan waktu yang

relatif lama. Proses maserasi ini memisahkan senyawa aktif berdasarkan tingkat kepolaran (*like dissolve like*) (Pratiwi, 2009).

Fraksi cair-cair dilakukan menggunakan pelarut n-heksan agar senyawa yang memiliki ciri khas yang sama dapat berpisah (Setiawan, 2017). Rendemen yang diperoleh ialah sebanyak 5,64 % untuk fraksi etanol dan 0,3 % untuk fraksi hexane. Hasil ini sesuai teori karena rosella mengandung cukup banyak antosianin seperti delphinidin-3-sambusioside dan sianidin-3-sambubioside (Wong *et al.*, 2002) yang merupakan salah satu senyawa flavonoid yang bersifat polar (Mardiah *dkk.*, 2010) sehingga fraksi kental etanol lebih banyak daripada fraksi kental n-heksan. Pemilihan pelarut menggunakan pelarut etanol sudah tepat karena etanol merupakan pelarut polar. Diharapkan senyawa antosianin terkandung dalam senyawa yang diujikan.

2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan metode yang digunakan untuk analisis senyawa secara kualitatif. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam FEBR. Fase diam yang digunakan ialah silika gel GF₂₅₄ karena menurut Watson (2009) silika gel paling sering digunakan untuk penjerap polar. Fase gerak BAW (n-butanol : asam asetat : *water*) dengan perbandingan 4:1:5 merupakan fase gerak yang menghasilkan pemisahan paling baik dan sering digunakan untuk mengidentifikasi flavonoid (Suhendi, 2011).

Penotolan dilakukan dengan melarutkan 12,5 mg/ml FEBR dalam etanol lalu ditotolkan pada plat silika gel. Setelah proses elusidasi selesai, plat diamatai di sinar tampak dan UV 254 nm. Hasil yang didapatkan ialah spot pada pembanding quercetin bernilai Rf sebesar 0,875 sedangkan untuk spot 1 dan 2 pada FEBR masing-masing bernilai Rf 0,125 dan 0,537. Spot tersebut meredam pada UV 254 dan berpendar pada UV 366. Selanjutnya diuapkan amoniak terlihat plot menghasilkan spot yang lebih pekat dan berwarna kuning. Hal ini mengindikasikan adanya kandungan flavonoid (Trease, 1978) dalam FEBR. Warna lebih pekat diakibatkan oleh reaksi flavonoid dan uap amoniak yang membentuk struktur kinoid pada cincin B serta ikatan rangkap terkonjugasi menjadi lebih panjang (Robinson, 1995).

Terlihat terdapat *tailing* pada plat sampel, beberapa kemungkinan terjadinya *tailing* diantaranya jumlah penotolan sampel mengakibatkan interaksi dengan fase diam tidak sempurna, kejenuhan fase gerak kurang sehingga reaksi tidak maksimal, dan terdapat beberapa senyawa dalam sampel sehingga sulit dilakukan pemisahan (Sunyoto dan Agustina, 2013).

3. Uji Antioksidan

Kemampuan FEBR sebagai antioksidan dapat diketahui dengan melakukan uji antioksidan metode DPPH. Uji antioksidan bertujuan untuk mengetahui kekuatan senyawa dalam menghambat atau menangkap radikal bebas dari DPPH. DPPH ialah radikal bebas yang akan aktif jika dilarutkan pada alkohol seperti metanol. Kemampuan senyawa sebagai antioksidan dapat dilihat dari perubahan warna ungu pada DPPH ketika ditambahkan

sampel uji (Nurani, 2013). Perubahan warna tersebut diukur nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi. Hasil yang didapatkan berupa % inhibisi dari suatu persamaan regresi liner. Persamaan tersebut berupa hubungan antara nilai % inhibisi dengan konsentrasi dari quercetin dan FEBR. Perbandingan quercetin dipilih karena sering digunakan sebagai standar dalam uji antioksidan dan positif kontrol (Jahromi *et al.*, 2016).

Mekanisme aktivitas antioksidan suatu senyawa dengan menyumbangkan proton pada radikal bebas DPPH sehingga menjadi tidak reaktif dan lebih stabil. Semakin banyak yang dapat menyumbangkan proton maka semakin banyak radikal bebas yang dapat distabilkan. Perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning merupakan salah satu indikator bahwa DPPH sudah stabil (Muharni *et al.*, 2013).

Potensi senyawa dalam menstabilkan DPPH dilihat dengan pengukuran absorbansi pada spektrofotometer setelah direaksikan pada panjang gelombang maksimal. Semakin tinggi konsentrasi dari senyawa maka nilai absorbansi akan semakin kecil. Hal ini berarti bahwa aktivitas penstabilan radikal bebas semakin besar. Dalam penelitian ini didapatkan IC_{50} sebesar 428 $\mu\text{g/ml}$ untuk FEBR dan 9,4 $\mu\text{g/ml}$ untuk perbandingan quercetin. Nilai tersebut didapat dari persamaan regresi linier data masing-masing absorbansi. Nilai IC_{50} merupakan parameter untuk mengetahui kekuatan antioksidan sedangkan IC_{50} ialah konsentrasi suatu senyawa untuk menstabilkan 50% radikal bebas. Maka diartikan bahwa dengan konsentrasi sebesar 428 $\mu\text{g/ml}$ FEBR dapat menstabilkan 50% radikal bebas, begitupun dengan quercetin,

dibutuhkan konsentrasi lebih kecil daripada FEBR yakni 9,4 $\mu\text{g/ml}$ untuk menangkap 50% radikal bebas. Menurut Mardawati (2008) aktivitas antioksidan suatu senyawa dikategorikan lemah apabila berada pada rentang >150 $\mu\text{g/ml}$. Namun masih dapat berpotensi sebagai antioksidan pada rentang 200-1000 $\mu\text{g/ml}$ (Pranata, 2013).

4. Uji Sitotoksik

Setelah melakukan beberapa uji seperti KLT dan *screening* potensi senyawa secara *in silico* dengan metode *Autodock vina*, selanjutnya dilakukan uji *in vitro* yakni uji sitotoksik dengan metode MTT Assay terhadap sel kanker kolon WiDr. Dari metode tersebut akan didapatkan data sel yang hidup dalam persen (%) dan IC_{50} untuk uji FEBR sebagai sampel uji dan *doxorubicin* sebagai obat konvensional yang bertindak sebagai pembanding.

Hasil penelitian uji sitotoksik diperoleh bahwa FEBR tidak memiliki potensi yang baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr dengan IC_{50} sebesar 3.127 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini jauh lebih besar jika dibandingkan dengan obat kanker *doxorubicin* yang memiliki IC_{50} sebesar 11 $\mu\text{g/ml}$. Hasil tersebut diperoleh setelah sel WiDr diberi perlakuan dengan FEBR konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g/ml}$ serta *doxorubicin* konsentrasi 20, 10, 5, dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk melihat perubahan morfologi sel WiDr dari setiap konsentrasi perlakuan pada masing-masing sampel. Terlihat perubahan bentuk pada sel, sel normal memiliki bentuk yang bulat dan transparan. Perubahan yang terjadi ialah sel menjadi lebih kecil dari biasanya dan berwarna hitam. Apabila saat

pengamatan masih terdapat media maka akan terlihat sel yang sudah mati mengambang dan berwarna hitam.

Bunga rosella mengandung senyawa antosianin dan flavonoid (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2010) dengan kandungan utama berupa golongan antosianin ialah delphinidin-3-sambubioside dan cyanidin-3-sambubioside (Da Costa-Rocha et al., 2014). Antosianin memiliki beberapa efek yang baik untuk melindungi tubuh dari kanker diantaranya meningkatkan apoptosis dan anti-angiogenesis (Wang dan Stoner, 2008). Antosianin mampu meningkatkan kemampuan apoptosis sel melalui 2 jalur yakni jalur intrinsik dimodulasi dengan meningkatnya protein proapoptosis pada mitokondria lalu memicu pengeluaran sitokrom-c. Hal tersebut menyebabkan *caspase-dependent anti- and pro-apoptotic protein* untuk mempengaruhi sel melakukan apoptosis dan jalur ekstrinsik dengan memodulasi FAS dan FASL (Reddivari dkk, 2007 dan Chang dkk, 2005). Selain hal tersebut antosianin juga mampu menurunkan kemampuan sel kanker dalam melakukan angiogenesis (Huang dkk, 2006). Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang berperan penting dalam pertumbuhan kanker. Diketahui bahwa antosianin mampu menghambat H_2O_2 dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) yang diinduksi oleh ekspresi VEGF pada keratinosit epidermal dan mengurangi resptor dan ekspresi VEGF pada sel endotel (Baghci, 2004).

Hasil uji sitotoksik pada penelitian ini mendapatkan hasil yang berbeda dari hasil penelitian sebelumnya. Menurut Kartika dkk, 2015 sel

kanker WiDr telah mengalami resistensi terhadap salah satu obat kanker konvensional yakni 5-FU. Hal ini terjadi diduga karena ekspresi protein *thymidylate synthase* (TS) dan *Multidrug Resistance Protein 5* (MRP5) yang berlebih. Kedua protein ini merupakan target dari enzim dalam 5-FU untuk menghambat sintesis DNA pada sel. Berdasarkan hal ini diduga bahwa sel WiDr mengekspresikan kedua protein tersebut sehingga efek sitotoksik FEBR tidak berefek sebagaimana mestinya. Kandungan senyawa pada FEBR diduga berpengaruh pada hasil yang didapatkan. Menurut teori senyawa dalam bunga rosella berupa golongan antosianin seperti sianidin. Pada penelitian Koosha *et al* (2016) menguji beberapa senyawa golongan flavonoid dan antosianin terhadap berbagai macam *cell line* kanker kolon. Hasil yang diperoleh ialah sianidin memiliki efek yang tidak signifikan dalam membunuh atau menghambat sel kanker kolon. Berdasarkan hal tersebut diduga FEBR memiliki kandungan sianidin yang lebih tinggi sehingga tidak memiliki potensi yang baik.

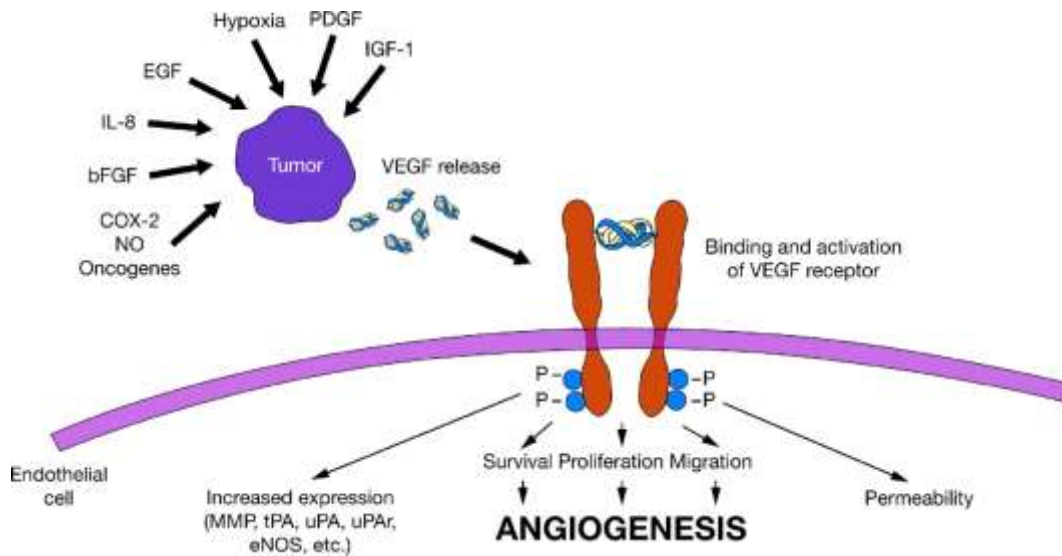
5. *Molecular Docking*

Hasil *molecular docking* metode aplikasi autodock vina memberikan hasil yang baik yakni memiliki satu konformasi dengan nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$, dimana nilai tersebut menyatakan penyimpangan atau kesalahan dari prediksi interaksi. Interaksi terhadap protein IKK menunjukkan bahwa *docking score* senyawa sianidin-3-sambubioside (-9,6 kcal/mol) lebih negatif dibandingkan dengan *doxorubicin* (-8,7 kcal/mol). Hal ini dapat diartikan bahwa senyawa sianidin-3-sambubioside membutuhkan energi yang kecil untuk berikatan

dengan protein IKK daripada *doxorubicin* sehingga ikatan yang terbentuk lebih stabil.

Sedangkan hasil *score docking* terhadap protein VEGF menunjukkan senyawa sianidin-3-sambubioside (-6,7 kcal/mol) memiliki energi yang lebih besar jika dibandingkan dengan *doxorubicin* (-7,3 kcal/mol). Hal ini diartikan bahwa dibutuhkan energi yang lebih besar untuk berikatan dengan protein VEGF dibandingkan dengan *doxorubicin*.

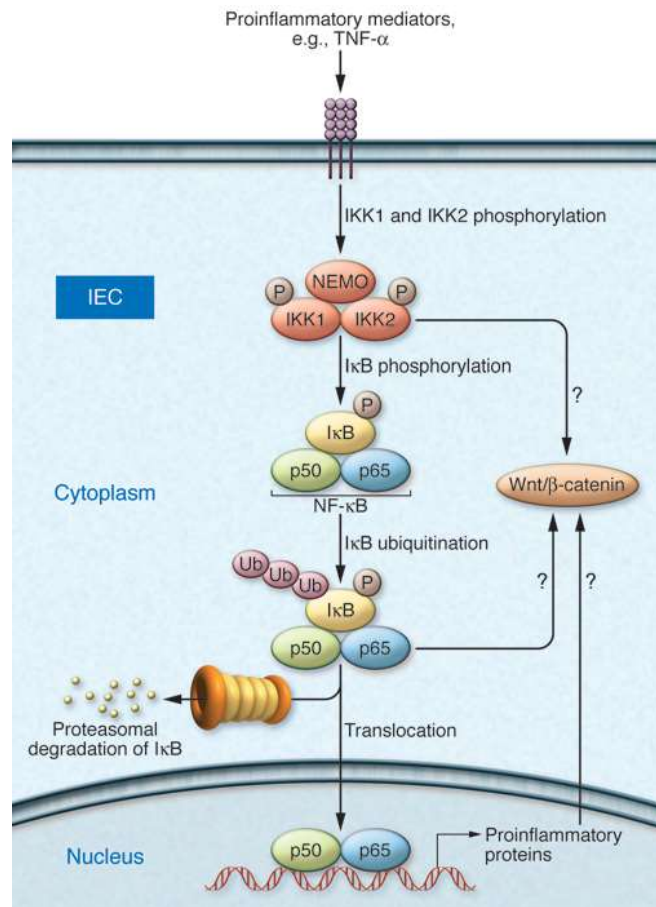
Angiogenesis adalah suatu proses pembuatan pembuluh darah baru disekitar sel tumor atau kanker. Proses ini di perantara oleh beberapa protein, salah satunya ialah VEGF. VEGF diproduksi oleh sel-sel perangsang pertumbuhan baru dalam bentuk sinyal kimia. Pemicu proses pemebentukan VEGF ialah ketika sel tidak mendapatkan cukup oksigen sehingga sel akan memproduksi *induced hipoksia factor* (HIF). HIF merangsang pelepasan VEGF yang selanjutnya akan mengikat reseptor VEGF pada sel endotel dan memicu *Tirosin Kinase Pathway* lalu menuju angiogenesis. VEGF akan terus diproduksi selama sel masih hidup, hal ini lah yang dapat menyebabkan sel bertahan hidup dengan baik.



Gambar 18. Mekanisme angiogenesis oleh VEGF (Sumber : American Association for Cancer Research, 2007)

Sel tumor atau kanker akan melepaskan beberapa protein yang memicu munculnya VEGF. Selanjutnya VEGF akan diterima oleh reseptor VEGF yang terdapat pada endotelial sel. hal tersebutlah yang menyebabkan terjadinya angiogenesis sehingga sel kanker mendapat suplai oksigen yang baik.

Nuclear factor-kB (NF-kB) adalah faktor transkripsi yang berperan dalam menginduksi gen untuk sitokin dan enzim yang berperan penting dalam sel dan berperan dalam respon inflamasi. Aktivasi jalur NF-kB bergantung pada induksi IKK. Aktifnya jalur ini akan melepaskan protein pro inflamasi.



Gambar 19. Mekanisme IKK dalam melepaskan protein proinflamasi
(Sumber : *J Clin Invest.* 2011)

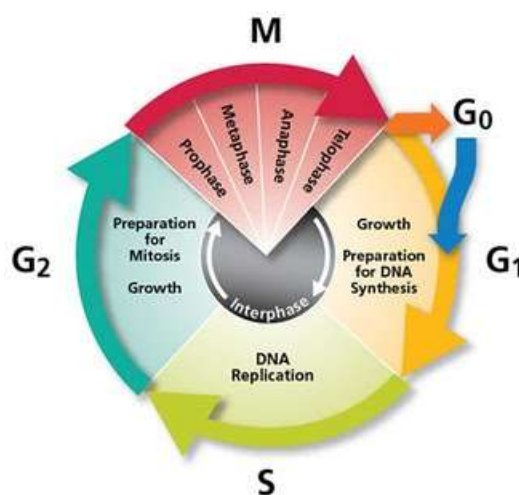
IKK memiliki beberapa subunit seperti IKK α dan IKK-beta dan subunit regulasi yaitu NEMO/IKKgamma. IKK akan aktif apabila terdapat protein mediator inflamasi, namun sebagai risiko dari aktifnya IKK adalah munculnya protein penghambat I κ B seperti *phosphorylated* dan *ubiquinated* lalu protein tersebut dirusak oleh proteasome sehingga gagal dalam menghambat aktifnya I κ B. Aktifnya I κ B melalui jalur ini akan menyebabkan ekspresi inflamasi yang berlebihan.

Kedua protein ini memiliki hubungan yang erat, jika protein inflamasi tidak dihambat maka kemungkinan besar protein mediator inflamasi akan

merangsang VEGF dan terjadilah angiogenesis. Sehingga sel kanker terus berproliferasi. Oleh karena itu, penghambatan dari kedua protein ini diduga mampu menghambat pertumbuhan sel kanker.

6. *Flowcytometri*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui penghambatan siklus sel dari suatu populasi sel dengan melihat peningkatan akumulasi perbandingan antara kontrol dan perlakuan. Teknik *flowcytometri* ini dapat mendeteksi setiap sel berdasarkan jumlah kromosom yang dihasilkan pada setiap fase (G1, S, dan G2/M). Prinsip kerja dari metode ini ialah melewati setiap sel pada seberkas cahaya yang nantinya setiap sel akan terwarnai dengan propium iodida. Pewarnaan tiap fase dilakukan dengan propium iodida karena mampu bereaksi dengan baik pada DNA sel.



Gambar 20. Siklus Sel

Siklus sel terbagi menjadi 2 yaitu interphase dan mitosis. Interphase sendiri terdiri dari beberapa siklus yaitu G₁ dimana sel sedang bersiap untuk menuju fase berikutnya yakni sintesis. Pada fase ini sel terus melakukan

metabolisme dan tumbuh namun tidak mereplikasi DNA. Terdapat fase G_0 atau fase diam yaitu fase ketika sel melakukan aktivitas metabolisme namun tidak berkembang biak. Fase selanjutnya adalah S, sintesis, pada fase inilah replikasi DNA terjadi atau sel menjadi ganda. Fase G_2 merupakan fase sel sudah tumbuh dewasa dan bersiap untuk melakukan pembelahan kembali. Fase mitosis, fase kompleks yang melibatkan seluruh komponen sel karena terjadi pembelahan sel.

Konsentrasi FEBR pada sel disesuaikan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari uji MTT Assay. Konsentrasi yang digunakan yakni $\frac{1}{2} IC_{50}$ doxorubicin, $\frac{1}{2} IC_{50}$ FEBR dan IC_{50} FEBR. Hasil analisis data yang dilakukan terlihat bahwa FEBR dengan IC_{50} memberikan peningkatan akumulasi sel pada M1 sama seperti *doxorubicin*. Pada kontrol terlihat M1 sebesar 3,73%, perlakuan *doxorubicin* pada M1 sebesar 33,58% dan pada perlakuan IC_{50} M1 sebesar 4,37%. Berdasarkan data tersebut, sel yang diberikan perlakuan dengan IC_{50} dan *doxorubicin* tidak melanjutkan pembelahan sel karena terjadi apoptosis terlihat dari peningkatan akumulasi sel pada fase M1 (Muti'ah *et al*, 2014).