

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris yang terdiri atas pengujian kandungan senyawa dengan metode KLT, penelitian secara *in vitro* fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) tunggal maupun kombinasi dengan 5-Fluorourasil menggunakan metode MTT *assay* terhadap sel HeLa, dan secara *in silico* dengan *molecular docking*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan bulan Juni 2016 – Februari 2017.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variable Penelitian

a. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- 1) Variable bebas : Fraksi kloroform herba badotan (*Ageratum conyzoides* L.)
- 2) Variable kontrol : Fase diam dan fase gerak

3) Variable tergantung : Nilai Rf dan warna bercak pada pelat silika

b. Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

1) Variable bebas : Konsentrasi fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.), 5-Fluorourasil dan kombinasi keduanya

2) Variable kontrol : Sel HeLa, suhu, waktu inkubasi dan media sel

3) Variable tergantung : % sel hidup

c. Uji *In Silico* dengan *Molecular Docking*

1) Variable bebas : Bentuk konformasi optimasi nobiletin

2) Variable kontrol : Struktur protein Bcl-xL, *software* dan *hardware* komputer

3) Variable tergantung : *Docking score*

2. Definisi Operasional

a. Nilai Rf

Nilai Rf adalah derajat retensi suatu komponen dalam fase diamnya. Nilai Rf diperoleh dari perbandingan jarak elusi bercak dalam sampel dengan jarak elusi total pada proses kromatografi.

b. % Sel Hidup

% Sel hidup adalah banyaknya sel yang masih hidup yaitu sel yang masih melakukan metabolisme Uji sitotoksik berfungsi untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu senyawa terhadap sel yang diujikan dengan menghitung banyaknya sel yang tetap hidup setelah

diberi perlakuan dengan sampel (Mosmann, 1987). Sel hidup akan mengabsorpsi MTT sehingga direduksi oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase pada proses respirasi di mitokondria membentuk formazan yang berwarna ungu dan larut dalam SDS 10%. Absorbansi intensitas warna ungu dikonversi menjadi % sel hidup. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji, semakin rendah % sel hidup. Dibuat regresi antara % sel hidup dan konsentrasi sampel sehingga didapatkan persamaan regresi linier untuk menentukan nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC_{50}) (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai IC_{50} menggambarkan konsentrasi dimana 50% sel dapat dihambat aktivitasnya. Tingginya nilai IC_{50} menunjukkan rendahnya aktivitas sitotoksik sampel yang diujikan. Pada uji kombinasi ditentukan nilai *Combination Index* (CI) untuk mengetahui efektivitas kombinasi.

c. *Score docking*

Score docking adalah nilai yang menunjukkan energi afinitas ikatan antara protein dan ligan. Semakin rendah *score docking*, maka energi afinitasnya semakin rendah sehingga kestabilan ikatan protein dan ligan lebih tinggi.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Tabel 1. Alat Penelitian

No	Nama Alat	Sumber/Merk dan Tipe
1	Blender	Philips [®]
2	Alat-alat gelas	Pyrex [®]
3	Timbangan analitik	Sartorius [®]
4	Aluminium foil	Brand [®]
5	Seperangkat komputer	LENOVO
6	Lampu UV 254 dan 366	
7	Oven	Memmert [®]
8	Laminar Air Flow (LAF)	Labconco [®]
9	ELISA Reader	Bio-Rad [®]
10	Incubator CO ₂	Heraceus [®]
11	<i>Tissue Culture Flask</i>	Nunc [®]
12	Tabung Konikal 15 ml steril	Falcon [®]
13	Haemositometer	Nebauer [®]
14	<i>Cell counter, yellow tip, blue tip</i>	Brand [®]
15	<i>Centrifuge</i>	Sorvall [®]
16	Mikropipet	Gilson [®]
17	Mikroskop inverted	Zeiss [®]
18	<i>96-well plate</i>	Nunc [®]
19	<i>Rotary evaporator</i>	IKA [®] RV10

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Utama

Herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang dikumpulkan dari

Bantul, Yogyakarta.

b. Bahan Lainnya

Tabel 2. Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Sumber/Merk dan Tipe
1	Kloroform	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
2	Etanol 70%	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
3	Aquadest	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
4	Sel HeLa	Lab Parasitologi FK UGM
5	Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	
6	Etil Asetat	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
7	Lempeng KLT silica gel GF ₂₅₄	
8	Asam asetat	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
9	Asam format	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
10	Glacial	Bratachem [®] / <i>Grade</i> Teknis
11	Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v)	<i>Gibco</i> [®]
12	Penisilin-streptomisin 1% (v/v)	<i>Gibco</i> [®]
13	Larutan pencuci Phospat Buffer Salin (PBS)	
14	Tripsin-EDTA	Merck [®]
15	MTT 5 mg/mL dalam media kultur	
16	Reagen Stoper Sodium Dodesil Sulfat (SDS) dalam HCL 10%	Merck [®]
17	Struktur Bcl-XI	PDB <i>File</i>
18	Semprot amoniak	
19	Fungizone 0,5%	
20	Dimetil Sulfoksida (DMSO)	

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dilakukan di laboratorium Farmakognosi, bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

2. Pembuatan Senyawa Uji

a. Penyerbukan

Herba bandotan didapat dari daerah Bantul, Yogyakarta sebanyak 10 kg kemudian dicuci dan dikeringkan dengan sinar matahari selama 3-5 hari. Simplisia yang telah kering kemudian digiling halus.

b. Pembuatan Ekstrak Etanolik Herba Bandotan

Simplisia hasil pengeringan kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 antara simplisia dan pelarut. Simplisia yang telah ditambahkan pelarut disimpan ditempat yang terlindung dari matahari langsung selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, larutan ekstrak disaring sehingga didapatkan ekstrak cair dan ampas herba bandotan. Untuk mengoptimalkan kandungan senyawa dalam ekstrak maka ampas sisa dimaserasi kembali selama 2 hari. Hasil maserasi pertama dan kedua lalu diukur banyaknya maserat yang dihasilkan. Ekstrak yang akan digunakan untuk proses fraksinasi adalah ekstrak cair yang mengandung etanol sebagai pelarutnya sehingga tidak perlu dilakukan evaporasi.

c. Pembuatan Fraksi Kloroform Herba Bandotan

Setelah proses maserasi, ekstrak yang didapat kemudian difraksinasi dengan kloroform. Fraksinasi menggunakan metode fraksinasi cair-cair dengan kloroform dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 800 ml ekstrak etanol herba bandotan difraksinasi dengan 800 ml kloroform. Bagian yang terlarut dalam kloroform dipisahkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 100 rpm. Untuk mengurangi residu kloroform dalam fraksi maka pengentalan dilanjutkan dengan *waterbath*. Fraksi kloroform kemudian ditimbang untuk dihitung rendemennya.

3. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Uji KLT dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa golongan flavonoid pada fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya adalah campuran etil asetat, asam asetat glasial, asam format dan air dengan perbandingan 100: 11: 11: 27 dan kloroform.

Fraksi kental sebanyak 25 mg dilarutkan dengan kloroform 1 ml kemudian ditotolkan diatas plat KLT dengan jarak elusi 8 cm. Plat yang telah ditotolkan dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh. Setelah eluen mencapai batas plat, maka plat dikeluarkan dari bejana dan biarkan pelarut/fase geraknya mengering. Plat yang telah kering diamati keberadaan bercaknya dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254

dan 366 nm kemudian jarak elusi bercak diukur dan dihitung nilai Rf masing-masing bercak. Untuk mengetahui kandungan flavonoid secara KLT maka dihitung nilai Rf fraksi kloroform serta warna bercak yang dihasilkan sebelum maupun sesudah diuapkan dengan amoniak.

4. Uji Sitotoksik dengan MTT Assay

a. Sterilisasi Alat

Proses persiapan alat kerja dimulai dengan mencuci semua alat yang digunakan dengan sabun kemudian dikeringkan. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 lbs selama 20 menit. Setelah disterilisasi dengan autoklaf, peralatan kemudian dikeringkan di dalam oven. Pelaksanaan uji sitotoksik dilakukan secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) Hood yang sudah disterilkan selama 30 menit dengan sinar UV kemudian disemprot etanol 70% dan dilap.

b. Pembuatan Media Kultur

Larutan media dibuat dengan mencampurkan larutan 100 ml *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang telah steril dengan *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Fungizone 0,5% serta penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF. Media yang dibuat kemudian disebut Media Komplit (MK).

c. Preparasi Sel

Sel yang inaktif di dalam ampul diambil dari tanki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37⁰C, kemudian ampul disemprot

dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

d. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan penambahan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan jika perlu diresuspensikan perlahan, buang larutan tersebut, tambahkan 1 ml larutan tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambahkan 3 ml larutan PBS, didiamkan selama 5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambahkan PBS sampai volume 10 mL lalu disentrifugasi pada 300 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *cell counter* yang diamati di atas haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 10⁴ sel/100 µL dan siap digunakan untuk penelitian.

e. Pembuatan Larutan Uji

Fraksi kloroform herba bandotan dibuat stok dengan kadar 10^5 $\mu\text{g/ml}$ dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2%. Selanjutnya dari larutan stok 6 seri konsentrasi fraksi kloroform dimulai dari kadar 50 $\mu\text{g/ml}$ dalam media kultur dan 5-florourasil dimulai dari kadar 78,125 $\mu\text{g/ml}$ untuk uji sitotoksik tunggal.

f. Uji Sitotoksik Kombinasi Menggunakan MTT Assay

Sel dengan kepadatan 5×10^3 sel/100 μl MK didistribusikan ke dalam 96 *well plate* masing-masing 100 μl dan disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media lalu diinkubasi kembali selama 2 jam agar sel pulih dan kembali normal setelah panen sel. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi fraksi kloroform dan 5-florourasil dengan konsentrasi $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, $\frac{3}{8} \text{IC}_{50}$, $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$, dan $\frac{1}{8} \text{IC}_{50}$.

Well plate yang berisi sel diambil dari inkubator kemudian medianya dibuang dan sel dicuci dengan 100 μl PBS, lalu PBS dibuang dan cairan ditiriskan dengan tisu. Untuk kelompok perlakuan kombinasi, dimasukkan 50 μl setiap seri konsentrasi fraksi kloroform ke dalam sumuran dan direplikasi 3 kali kemudian masing-masing ditambahkan 50 μl seri konsentrasi 5-florourasil. Untuk kelompok tunggal, dimasukkan 50 μl setiap seri konsentrasi fraksi kloroform atau 5-florourasil ke dalam sumuran dan direplikasi 3 kali kemudian

masing-masing ditambahkan 50 μ l MK. Untuk kontrol sel ditambahkan 100 μ l MK ke dalam sumuran yang telah berisi sel dan direplikasi 9 kali. Untuk kontrol media ditambahkan 100 μ l MK ke dalam sumuran kosong dan direplikasi 3 kali. Semua perlakuan di inkubasi dalam inkubator CO₂.

Dibuat stok MTT 5 mg/ml dengan menimbang 50 mg serbuk MTT dan dilarutkan dalam 10 ml PBS. Reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dibuat dengan cara mengambil 1 ml stok MTT 5 mg/ml dan diencerkan dengan MK hingga 10 ml. Media sel dibuang dan dicuci kembali dengan PBS kemudian ditambahkan 100 μ l MTT 0,5 mg/ml ke setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator hingga terbentuk kristal formazan berwarna ungu dan diamati bentuk kristalnya dibawah mikroskop *inverted*. Jika formazan sudah jelas terbentuk, ditambahkan stopper SDS 10% dalam HCL 0,1 N. *Plate* yang telah diberi SDS dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar selama semalam. Keesokan harinya, absorbansi dapat dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm lalu dihitung % sel hidup dan CI (*Combination Index*) setiap perlakuan.

5. *Molecular Docking*

a. Pengunduhan Aplikasi *Autodock Vina* dan Aplikasi Pendukung

Autodock Vina adalah salah satu aplikasi yang digunakan untuk kegiatan *Molecular Docking* yang bisa didapatkan secara gratis.

Beberapa aplikasi pendukung diperlukan untuk melakukan kegiatan *Molecular Docking* dengan aplikasi *Autodock Vina*, diantaranya:

- 1) Autodock Vina digunakan untuk *molecular docking*, dapat diunduh di situs <http://vina.scripps.edu/download.html>
 - 2) DS Visualizer untuk preparas protein target maupun ligand uji dan dapat digunakan untuk visualisasi hasil *docking*, dapat diunduh di situs <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>
 - 3) MGLTools untuk mengolah protein target maupun ligan uji sehingga bisa di *docking* dengan aplikasi Autodock Vina. Selain MGLTool, kita dapat menggunakan AutodockTools dengan fungsi yang sama dapat diunduh di situs <http://mgtools.scripps.edu/downloads>
 - 4) Python digunakan untuk menjalankan aplikasi yang biasanya menggunakan bahasa pemrograman python misalnya MGLTools dapat diunduh di situs <http://python.org/ftp/python/2.5.2/python-2.5.2.msi>.
 - 5) Open Babel untuk mengkonversi hasil docking dari format PDBQT ke format PDB dapat diunduh di situs <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>.
- b. Pengambilan Struktur Protein

Dalam penelitian ini, data struktur protein target diambil melalui *Potein Data Bank* (PDB) (www.rscb.org) dengan PDB ID untuk Bcl-

xl adalah 1YSG dengan tipe dokumen .pdb dan digunakan sebagai target *docking*. Data ini berupa struktur, sisi aktif, ligan asli (*native ligand*) dan sekuen.

c. Preparasi Protein Target dan Ligan Uji

Preparasi protein target (yaitu 1YSG) dapat dilakukan dengan menggunakan aplikasi DS Visualizer. Buka dokumen protein yang telah diunduh kemudian hapus semua ligan yang ada pada protein dan pastikan juga protein bebas dari molekul air, hemoglobin dan sebagainya. Ligan uji yang dipreparasi kemudian disimpan dengan nama dokumen 1ysg.pdb.

Preparasi ligan juga dapat dilakukan dengan aplikasi DS *visualizer*. Untuk ligan asli (*native ligand*) dapat diambil langsung dari protein target. Caranya dengan menghapus bagian protein dan sehingga hanya tersisa ligan asli dan disimpan dengan nama ligand.pdb. Untuk ligan selain ligan asli maka dipreparasi dengan cara mengunduh struktur ligan dengan tipe dokumen .sdf, dalam penelitian ini ligan yang digunakan adalah 5-FU dan nobiletin. Dokumen yang diperoleh kemudian diubah formatnya menjadi .pdb dengan aplikasi Open Babel. Protein, ligan asli dan ligan lainnya yang telah dipreparasi kemudian siap untuk diuji secara *in silico* dengan *Autodock Vina*.

d. Konversi File Protein dan Ligan dalam Bentuk PDBQT

Aplikasi *Autodock Vina* hanya bisa dijalankan dengan tipe dokumen .pdbqt sehingga protein dan ligan harus diubah terlebih

dahulu dari tipe .pdb menjadi tipe dokumen .pdbqt menggunakan aplikasi *Autodock Tools*. Pada aplikasi *Autodock Tools* ditambahkan hidrogen, lalu disimpan dengan nama dokumen 1ysg.pdbqt dan disimpan pada program aplikasi Vina di *drive* :C komputer. Untuk mengatur luas wilayah *docking* dapat digunakan submenu *Grid* dan pilih *Grid Box* kemudian atur luas wilayah *docking* yang diinginkan. Luas wilayah *docking* akan mempengaruhi nilai RMSD pada setiap konformasi, sehingga untuk mendapatkan nilai RMSD dibawah 2 Å dibutuhkan beberapa kali penyesuaian luas wilayah *docking*. Dokumen kemudian disimpan di berkas Vina dengan nama ligand.pdbqt.

e. *Molecular Docking dengan Autodock Vina*

Sebelum menjalankan fungsi *docking*, pastikan dokumen 1ysg.pdbqt dan ligand.pdbqt telah berada di berkas Vina. Kemudian buat dokumen baru dan beri nama conf.txt. Formulir pada dokumen conf.txt diisi dengan keterangan yang sesuai dengan proses *docking* yang dilakukan. Bagian *receptor* diisi dengan 1ysg.pdbqt, bagian *ligand* diisi dengan ligand.pdbqt, *center_x*, *y*, *z* dan *size_x*, *y*, *z* diisi dengan nilai yang sesuai dengan yang tertera pada *grid box*. Setelah selesai dokumen disimpan di berkas Vina.

Untuk menentukan nilai RMSD sehingga dapat dipilih konformasi yang akan divisualisasikan, maka dilakukan dengan mengisi *Command Prompt Windows*. Ketikkan kode pada *Command Prompt*

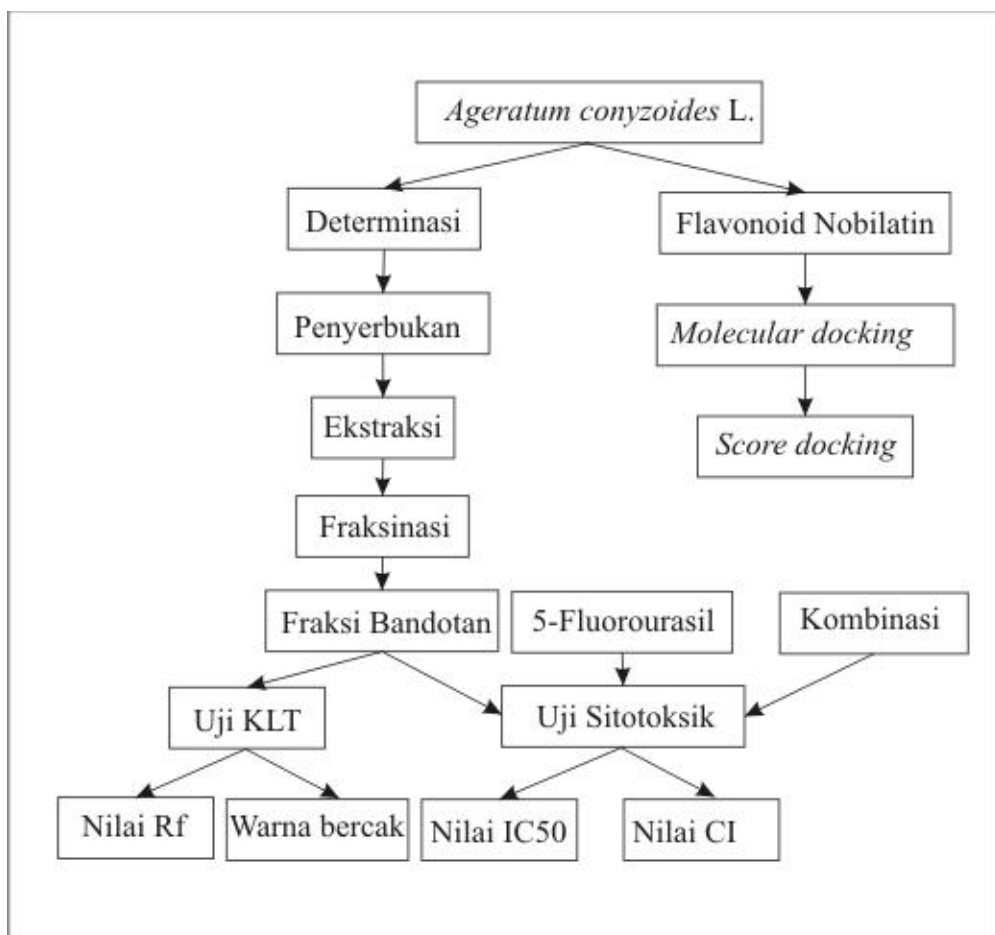
Windows dan tunggu hingga prosesnya selesai sehingga akan muncul nilai afinitas dan RMSD pada setiap konformasinya (ada 9 konformasi). Pilih konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Dokumen output.pdbqt dipecah menjadi masing-masing konformasi sehingga lebih mudah untuk dianalisis dan divisualisasikan. Hasil pemecahan akan muncul di berkas Vina.

f. Visualisasi Hasil *Docking*

Proses visualisasi hasil *docking* dapat dilakukan dengan aplikasi *DS Visualizer*. Hasil visualisasi kemudian dianalisis sehingga diketahui posisi dan gambaran ikatan protein dengan setiap ligan yang diujikan. Sebelum dilakukan visualisasi, dokumen dengan tipe .pdbqt diubah terlebih dahulu menjadi tipe .pdb dengan bantuan aplikasi *Open Babel*.

Visualisasi menggunakan *DS Visualizer* untuk melihat posisi ligan (*Define Ligan*) dan interaksinya (*Ligand Interaction*) secara 3 dimensi (3D) sehingga akan terlihat dengan jelas letak ikatan ligan dan protein serta gambaran ikatannya. Untuk memperjelas visualisasi, latar warna dapat diubah dan protein bisa dilabeli dengan asam amino.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 6. Skema langkah kerja

G. Analisis Data

1. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Analisis hasil identifikasi kandungan senyawa menggunakan metode KLT dilakukan dengan membandingkan nilai Rf hasil elusi dan warna bercak setelah diuapi amoniak antara sampel dengan pembanding. Pengamatan lempeng KLT dilakukan dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Interpretasi warna bercak dapat dilihat di tabel 3.

Tabel 3. Interpretasi warna bercak untuk analisis flavonoid dengan KLT (Markham, 1998)

No.	Warna bercak dengan di bawah UV		Kemungkinan Jenis Flavonoid
	Pada UV tanpa NH ₃	Pada UV dengan NH ₃	
1	Lembayung gelap (ungu tua)	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya 5-OH flavon atau flavonol (tersulih pada 3-O dan mempunyai 4'-OH) b. Kadang-kadang mengandung 5-OH flavonon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
		Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Biasanya flavon dan flavonol tersulih pada -3-O mempunyai 5-OH tanpa 4'-OH bebas b. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil, dan beberapa flavonon yang mengandung 5-OH d. Khalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
		Biru muda	Beberapa 5-OH flavonon
		Merah atau jingga	Khalkon yang mengandung 2'- dan/atau 4-OH
2	Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavonon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH glikosida b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH
		Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
		Fluoresensi mirip biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
3	Tak tampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH
4	Kuning redup dan kuning atau fluoresensi jingga.	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)
5	Fluoresensi kuning	Jingga atau merah	Auron yang mengandung 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
6	Hijau-kuning, hijau-biru, atau hijau	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tak mengandung 4'-OH bebas dan flavonon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas disertai atau tanpa 5-OH bebas
7	Merah jingga redup atau	Biru	Antosianidin 3-glikosida

	merah senduduk	
8	Merah jambu atau fluoresensi kuning	Biru Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosida

2. Analisis Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

Data yang diperoleh dari hasil pembacaan ELISA *reader* berupa nilai absorbansi dari beberapa seri kadar sampel yang digunakan untuk menghitung presentasi penghambatan pertumbuhan sel HeLa. Absorbansi sel hidup yang didapatkan kemudian di konversi mejadi % sel hidup.

Perhitungan dilakukan dengan rumus

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

Nilai % sel hidup dari setiap konsentrasi kemudian diplotkan ke dalam kurva dan dibuat persamaan regresi liniernya. Peramaan regresi linear tersebut berfungsi untuk menentukan nilai IC_{50} fraksi kloroform herba bandotan (FKB) dan 5-fluorourasil (5-FU) terhadap sel kanker serviks HeLa dimana ordinat y sebagai fungsi % sel hidup sedangkan ordinat x menunjukkan konsentrasi sampel.

Perlakuan kombinasi antara obat kemoterapi dengan bahan alam merupakan salah satu strategi terapi yang bertujuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan dan menurunkan efek samping yang ditimbulkan agen kemoterapi. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi hasil uji kombinasi antara agen kemoterapi dan bahan alam untuk memperoleh manfaat yang lebih optimal (CCRC, 2010). Parameter yang digunakan

untuk evaluasi uji kombinasi adalah CI yang menghasilkan nilai kuantitatif sehingga dapat menggambarkan efektivitas kombinasi. Nilai CI memberikan gambaran apakah suatu kombinasi memberikan efek sinergis, aditif atau malah antagonis.

Nilai IC_{50} FKB dan 5-FU digunakan untuk menentukan *Combination Index* (CI) pada $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$ IC_{50} pada uji kombinasi sehingga dapat diketahui pada kombinasi konsentrasi yang mana terjadi efek sinergisitas terbaik.

Combination Index (CI) dihitung dengan persamaan :

$$CI = (D)_1/(D)_X + (D)_2/(D)_X$$

D_X adalah konsentrasi senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar kombinasi

$(D)_1$, $(D)_2$ adalah konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama

Tabel 4. Interpretasi Nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	Efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	Efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	Efek sinergis
0,7 – 0,9	Efek sinergis ringan
0,9 – 1,1	Mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	Efek antagonis ringan – sedang
1,45 – 3,3	Efek antagonis
> 3,3	Efek antagonis kuat – sangat kuat

3. Analisis *Molecular Docking*

Protokol *docking* yang dapat diterima adalah konformasi dengan nilai *Root Mean Square Distances* (RMSD) $<2\text{\AA}$ (Purnomo, 2011). Setiap konformasi dengan nilai RMSD $<2\text{\AA}$ dipilih konformasi dengan nilai *Score docking* terendah. *Score docking* atau energi afinitas adalah parameter kestabilan interaksi ikatan antara senyawa uji (ligand) dan protein dimana kestabilan ikatan ditunjukkan dengan nilai *score docking* yang semakin rendah. Kestabilan interaksi ikatan sebanding dengan potensi senyawa dalam memberikan efek yang sama dengan ligan asli sehingga semakin stabil interaksi antara protein senyawa uji dan Bcl-x1, maka semakin besar potensi penghambatan senyawa uji terhadap aktivitas antiapoptosis sel.