

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman






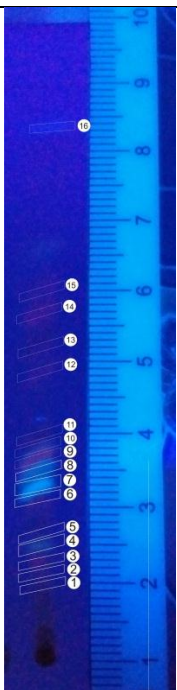
Herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Bantul, Yogyakarta. Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tanaman di determinasi untuk memastikan kebenaran sampel. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang diujikan merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dan termasuk ke dalam suku Asteraceae (Lampiran 9).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi digabungkan sehingga didapatkan ekstrak cair sebanyak 8,82 L. Ekstrak yang dihasilkan dari proses maserasi kemudian difraksinasi kembali menggunakan pelarut kloroform. Dari 800 ml ekstrak etanol dan 800 ml kloroform menghasilkan 1.234 ml Fraksi Kloroform Bandotan (FKB). Sebanyak 1 L fraksi kloroform dan 1 L ekstrak masing-masing dievaporasi dengan *rotary evaporator* dan didapatkan sebanyak 3,275 gram fraksi kloroform dan 22,213 gram ekstrak etanol kental. Fraksi kloroform dan ekstrak etanol herba bandotan menghasilkan rendemen masing-masing 3,7 %, dan 16,33 %.

3. Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF254 sedangkan fase geraknya adalah kloroform. Dibuat larutan stok sampel kadar 25 mg/ml yang dilarutkan dalam kloroform. Selain fase gerak kloroform, sebelumnya telah dilakukan beberapa percobaan kromatografi lapis tipis dengan berbagai jenis fase gerak untuk mendapatkan plot dengan hasil pemisahan terbaik (tanpa *tailing*). Berdasarkan hasil percobaan tersebut, kloroform menunjukkan pemisahan terbaik bila dibandingkan dengan fase gerak yang lain.

Sebelum diuapi amoniak			Setelah diuapi amoniak		
					
Sinar tampak	UV 254	UV 366	Sinar tampak	UV254	UV 366

Gambar 7. Profil Kromatografi Lapis Tipis FKB

Deteksi menggunakan UV 254 dan UV 366 nm menghasilkan 16 bercak pada sampel FKB. Tabel 5 menunjukkan nilai Rf dan warna plot pada pengamatan KLT.

Tabel 5. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis FKB

Nomor bercak	Nilai Rf	Warna bercak				Ket.
		Sinar tampak		UV 254	UV 366	
		Tanpa uap NH ₃	Dengan uap NH ₃	Dengan/tan pa uap NH ₃	Dengan/tanpa uap NH ₃	
1	0,125	-	-	-	Merah	-
2	0,137	-	-	-	Merah	-
3	0,156	-	-	-	Merah	-
4	0,181	-	Kuning muda	-	Kuning	+
5	0,200	-	-	Ungu tua	-	-
6	0,260	Ungu muda	Ungu muda	Hijau muda	Merah	-
7	0,287	-	-	Ungu muda	Biru muda	+
8	0,312	-	-	Ungu tua	Ungu tua	+
9	0,337	Hijau tua	Hijau tua	Ungu tua	Merah	-
10	0,350	-	-	Ungu muda	Ungu muda	+
11	0,375	-	-	Kuning	Merah	-
12	0,487	Kuning	Kuning	Kuning	Merah	-
13	0,531	Kuning	Kuning	Kuning	Merah	-
14	0,587	Kuning	Kuning	-	Merah	-
15	0,637	Kuning	Kuning	-	Merah	-
16	0,925	Hijau	Hijau	Kuning	Biru muda	-

Frakasi Kloroform Bandotan mengandung flavonoid pada bercak nomor 4,7,8, dan 10 dengan bercak berwarna kuning, biru, ungu tua dan ungu muda pada UV 366.

4. Molecular Docking

Kegiatan *molecular docking* dilakukan dengan aplikasi Autodock Vina dan beberapa aplikasi pendukung misalnya *Open Babel* untuk mengkonversi tipe file dan *DS Visualizer* untuk menampakkan struktur dan interaksi ligan protein secara molekuler. Nilai RMSD dan *score docking* terbaik dari setiap ligan terhadap protein Bcl-x1 ditunjukkan oleh tabel 6.


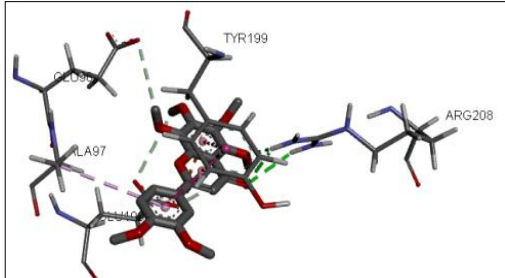
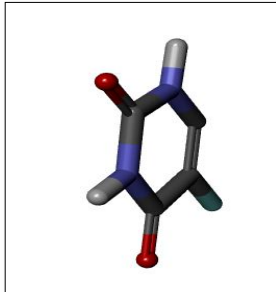
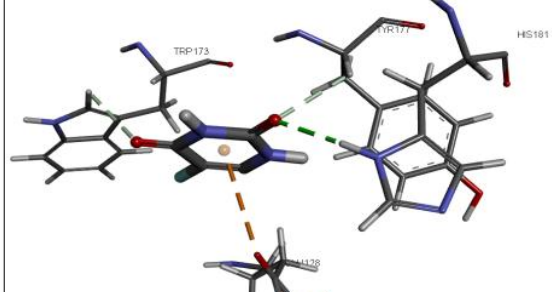
Tabel 6. Hasil *Molecular Docking* pada Protein Bcl-x1

No	Senyawa Uji	Konformasi	Nilai RMSD	<i>Score Docking</i> (kcal/mol)
1.	Nobiletin	2	1,128	-8,0
2.	5-FU	2	1,508	-4,7
3.	<i>Native Ligand</i> 4FC	5	1,761	-6,9
4.	<i>Native Ligand</i> TN1	2	1,002	-6,2

Setiap senyawa uji akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda sehingga dipilih konformasi dengan nilai RMSD $< 2\text{\AA}$. Senyawa Nobiletin dipilih konformasi yang ke-2 dengan nilai RMSD 1,128 Å dan *score docking* -8,0 kcal/mol. Ligan asli (*Native ligand*) 4FC dan TN1 memiliki *score docking* masing-masing -6,9 dan -6,2 kcal/mol, lebih tinggi dari senyawa Nobiletin. Senyawa 5-FU memiliki *score docking* -4,7 kcal/mol, lebih tinggi dari Nobiletin maupun ligan asli sehingga kestabilan interaksi Nobiletin lebih baik dari 5-FU dan ligan asli terhadap protein Bcl-x1.

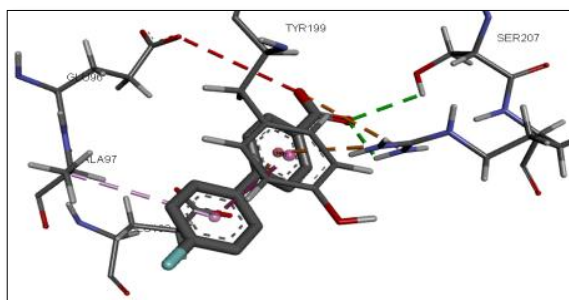
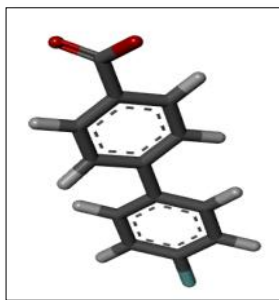
Ligan (senyawa uji) yang telah di-*docking* dengan Autodock Vina dapat diamati interaksinya secara visual menggunakan aplikasi DS Visualizer. Senyawa yang ditambahkan pada Protein Bcl-xl akan berinteraksi dengan residu asam aminonya dan kemungkinan terjadi ikatan antara protein dan senyawa uji.

Tabel 7. Visualisasi Interaksi Senyawa Uji dan Protein Bcl-xl

No.	Senyawa Uji	Potensi Ikatan Asam Amino
1	Nobiletin	Tiroksin (TYR199), Serin (SER207), LIsin (LYS), Arginin (ARG208), Asam Glutamat (GLU100 & 96), Alanin (ALA97), Glisin (GLY142), Fenilalanin (PHE195 & 101), Valin (VAL145) Visualisasi ikatan antara nobiletin dan Bcl-xl
		
2	5-FU	Tiroksin (TYR127 & 124), Triptofan (TRP173), Asam Glutamat (GLU128), Histidin (HIS181), Treonin (THR176), Fenilalanin (PHE127) Visualisasi ikatan antara 5-FU dan Bcl-xl
		
3	Native Ligand 4FC	Tiroksin (TYR199), Glisin (GLY142), Valin (VAL145), Asam Glutamat (GLU100),

Fenilalanin (PHE101 & 195), Lisin (LYS209), Arginin (ARG208), Serin (SER207), Alanin (ALA97)

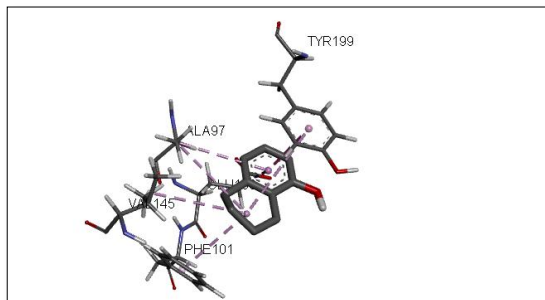
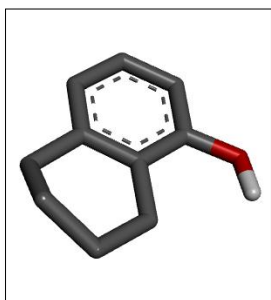
Visualisasi ikatan antara Native Ligand 4FC dan Bcl-xl



4 Native Ligand TH1

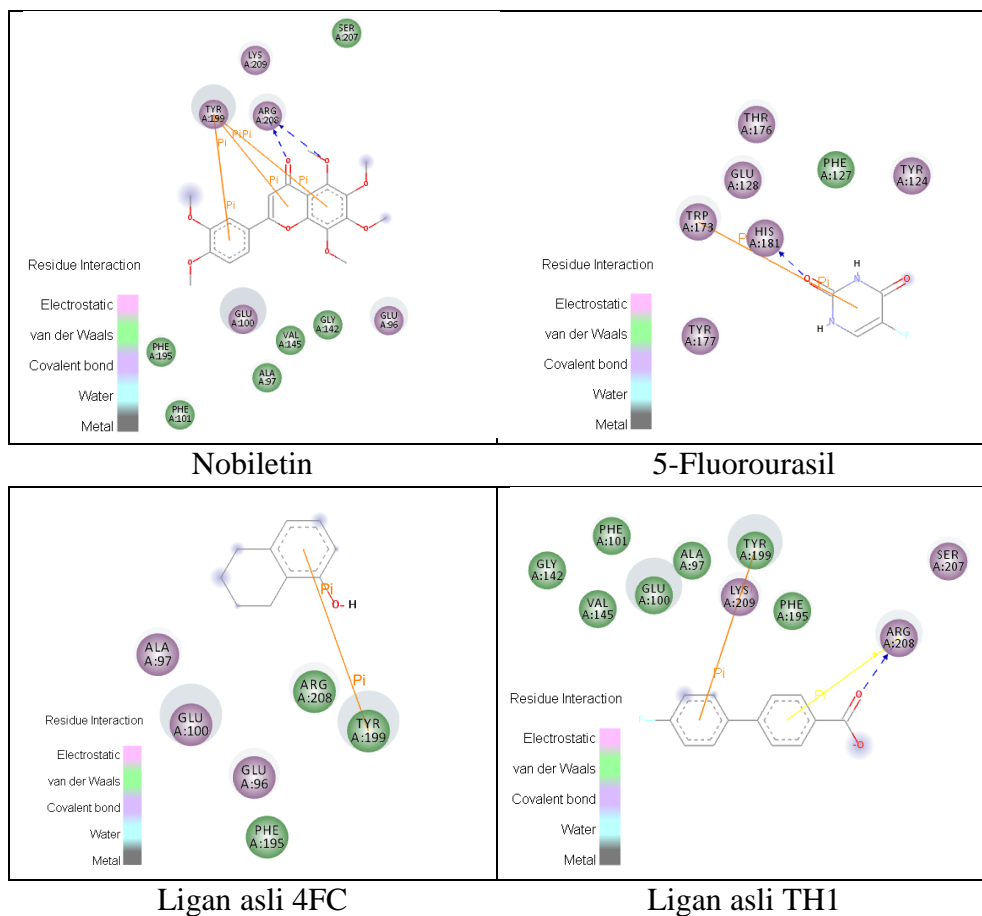
Fenilalanin (PHE195), Tiroksin (TYR199), Arginin (ARG208), Asam Glutamat (GLU96 & 100), Alanin (ALA97)

Visualisasi ikatan antara Native Ligand TH1 dan Bcl-xl



Senyawa uji berikatan dengan protein Bcl-xl pada *binding site* tertentu sehingga berpotensi untuk berikatan dengan asam amino disekitar *binding site*-nya. Berdasarkan visualisasi interaksi, dapat diamati bahwa senyawa nobiletin memiliki binding site yang berdekatan dengan ligan asli 4FC. Hal ini juga ditunjukkan dengan banyaknya kesamaan jenis asam amino yang berikatan dengan nobiletin dan 4FC.

Nobiletin berikatan dengan lebih banyak asam amino, yaitu 11 asam amino, sedangkan 5-FU, 4FC, dan TN1 berikatan dengan masing-masing 7, 10 dan 6 asam amino. Jenis interaksi yang terbentuk antara senyawa uji dan residu asam amino protein Bcl-xl dapat diamati pada gambar 4.



Gambar 8. Visualisasi 2D interaksi asam amino Protein Bcl-xl

Jenis ikatan yang mungkin terbentuk antara asam amino dan senyawa uji yaitu ikatan kovalen dan *Van Der Waals* seperti yang ditunjukkan oleh gambar 8.

Tabel 8. Residu protein Bcl-xl yang berinteraksi dengan senyawa uji

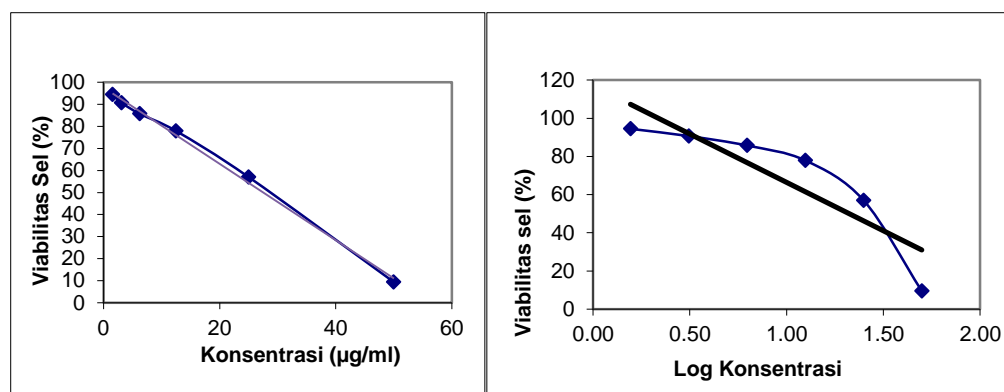
No	Senyawa Uji	<i>Score Docking</i> (kcal/mol)	Jenis Residu			
			Ionik	Polar	Aromatik	Hidrofobik
1.	Nobiletin	-8,0	Arg208	Ser207	Tyr199	Ala97
			Glu96		Phe195	Gly142
			Glu100	Phe101	Val145	
			Lys209			
2.	5-FU	-4,7	His181	Thr176	Trp173	-
			Glu128		Phe127	
				Try124		
				Tyr177		
3.	<i>Native Ligand</i> 4FC	-6,9	Glu100		Tyr199	Ala97
			Glu96		Phe195	
			Arg208			
4.	<i>Native Ligand</i> TN1	-6,2	Arg208	Ser207	Tyr199	Ala97
			Lys209		Phe195	Gly142
			Glu100	Phe101	Val145	

5. Uji Sitotoksik MTT Assay

Penelusuran aktivitas ko-kemoterapi FKB dan 5-FU dibagi menjadi 2 tahap, yaitu tahap uji sitotoksik tunggal dan tahap uji kombinasi terhadap sel kanker serviks HeLa dengan metode *MTT Assay*. Hasil uji sitotoksik tunggal akan menghasilkan nilai IC_{50} , sedangkan hasil uji kombinasi untuk menentukan rasio *Combination Index* (CI) pada beberapa kombinasi konsentrasi FKB dan 5-FU.

Tabel 9. Viabilitas sel HeLa dengan perlakuan FKB

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi
1,5625	0,873	94,45	10,91
3,125	0,841	90,66	8,04
6,25	0,799	85,70	3,95
12,5	0,732	77,89	3,76
25	0,554	56,99	3,36
50	0,148	9,41	0,53
Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel	0,912	
	Media	0,067	
Persamaan	$y = -1.732x + 97.602$ $R^2 = 0,9967$ $IC_{50} = 27,48 \mu\text{g/ml}$		

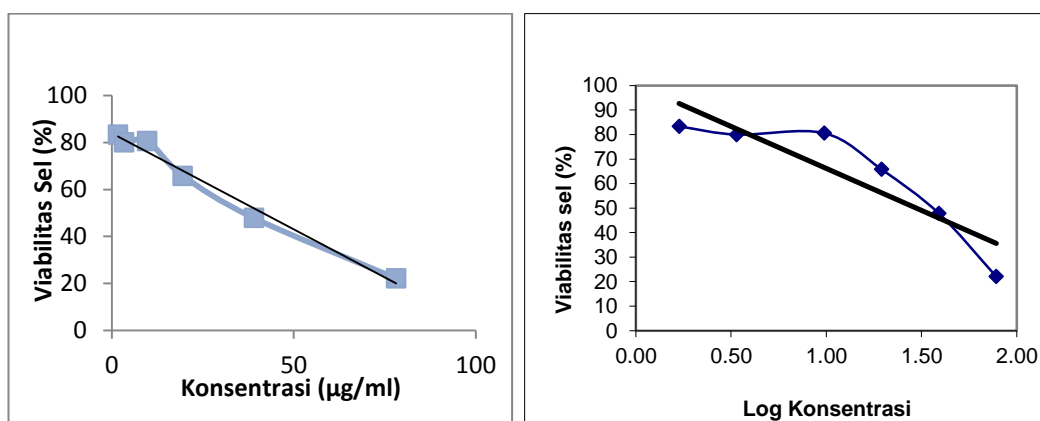
**Gambar 9.** Kurva efek sitotoksik FKB tunggal terhadap sel HeLa

Berdasarkan hasil uji sitotoksik tunggal FKB, konsentrasi terendah yaitu 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ sudah mampu membunuh 5,36% sel HeLa (100 - 94,45%), sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 50 $\mu\text{g/ml}$ sudah mampu membunuh 90,59% sel HeLa (100 - 9,41%). Adapun nilai IC_{50} fraksi kloroform adalah 27,48 $\mu\text{g/ml}$ yang terletak antara kadar 25 $\mu\text{g/ml}$ dan 50 $\mu\text{g/ml}$. Linieritas yang tinggi yang menunjukkan penurunan viabilitas sel

berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi mengikuti persamaan $y = -1.732x + 97.602$.

Tabel 10. Persen hidup sel HeLa dengan perlakuan 5-FU

Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi Sampel	Viabilitas sel (%)	Standar Deviasi
1.69	0.778	83.32	7.19
3.38	0.750	80.00	7.57
9.76	0.755	80.59	2.38
19.53	0.629	65.78	10.35
39.06	0.475	47.82	2.01
78.125	0.256	22.08	1.32
Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel	0,921	
	Media	0,067	
Persamaan	$y = -0.8183x + 83.932$ $R^2 = 0.983$ $IC_{50} = 41,46 \mu\text{g/ml}$		

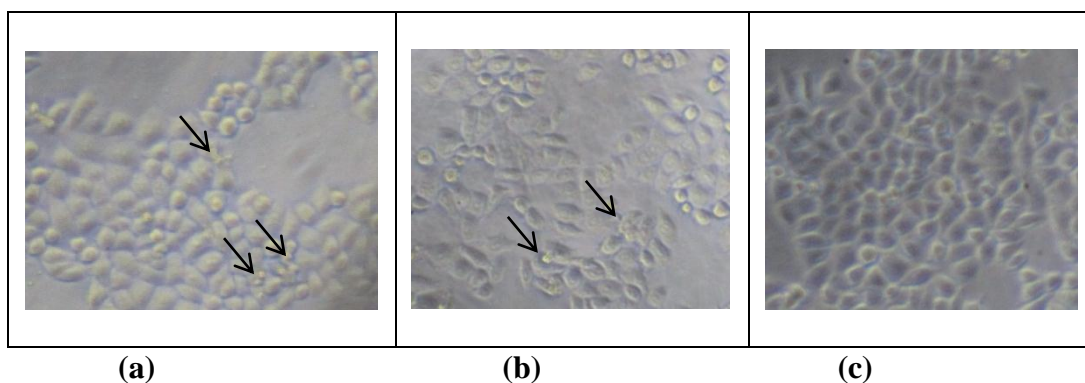


Gambar 10. Kurva efek sitotoksik 5-FU tunggal terhadap sel HeLa

Hasil sitotoksik terhadap 5-Fluorourasil *Ageratum conyzoides* memberikan nilai IC_{50} sebesar 41,46 µg/ml yang terletak antara kadar 39,06 µg/ml dan 78,125 µg/ml. Nilai IC_{50} 5-FU lebih besar dari nilai IC_{50} FKB

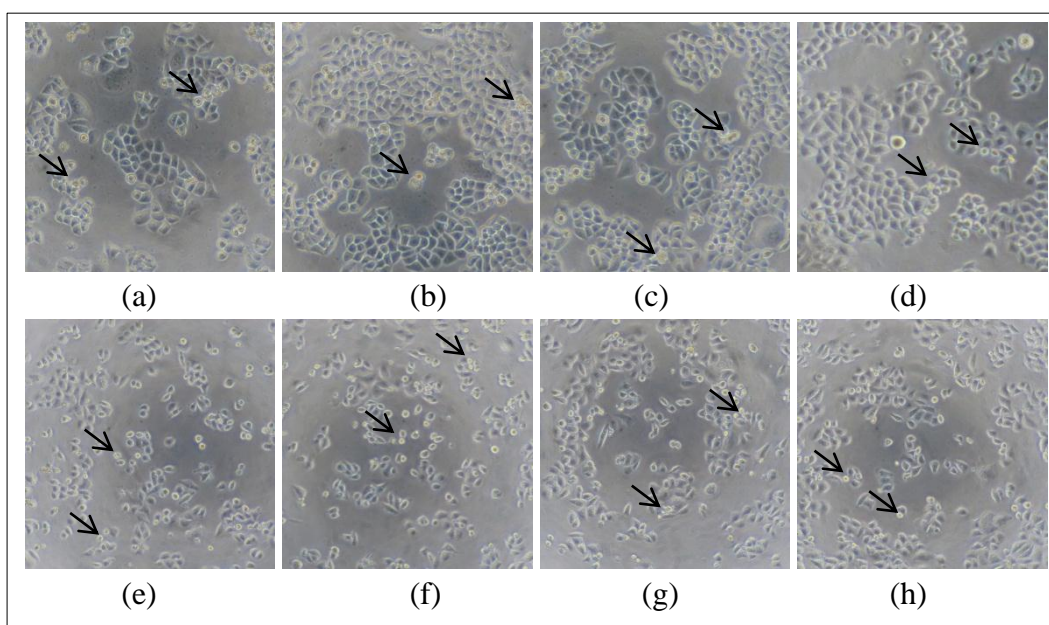
sehingga aktivitas sitotoksik FKB lebih besar karena pada dosis yang lebih rendah FKB sudah menghambat 50% viabilitas sel kanker serviks HeLa. Pada konsentrasi terendah yaitu 1,69 $\mu\text{g/ml}$, viabilitas sel kanker HeLa sebesar 83,32%, sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 78,125 $\mu\text{g/ml}$ viabilitas sel kanker serviks HeLa sebesar 22,08%.

Pada uji sitotoksik juga dilakukan pengamatan viabilitas sel dengan mikroskop *inverted* untuk mengetahui gambaran sel dan perubahan morfologinya setelah diberi perlakuan dengan sampel. Berdasarkan pengamatan terhadap sel, terjadi perubahan morfologi sel pada perlakuan dengan FKB maupun 5-FU. Perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk yang awalnya cenderung bulat dengan sedikit lonjong, berwarna abu-abu dan ada batas yang jelas antara inti sel dan cairan sel menjadi berbentuk bulat atau tidak beraturan, berwarna lebih terang dan inti selnya tidak terlihat.



Gambar 11. Gambaran morfologi sel HeLa di bawah mikroskop *inverted* (1) setelah diberi perlakuan (a) FKB 3,125 $\mu\text{g/ml}$ (b) 5-FU 1,69 $\mu\text{g/ml}$ dan (c) Kontrol sel; perbesaran 100x; tanda panah hitam (\rightarrow) menunjukkan perubahan morfologi sel setelah diberi perlakuan

Setelah dilakukan uji sitotoksik tunggal dan didapatkan nilai IC_{50} FKB dan 5-FU, uji sitotoksik dilanjutkan dengan uji kombinasi antara FKB dan 5-FU dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$ IC_{50} masing-masing sampel. Uji kombinasi silang dari masing-masing 4 kadar sampel sehingga akan di dapatkan 16 seri konsentrasi.



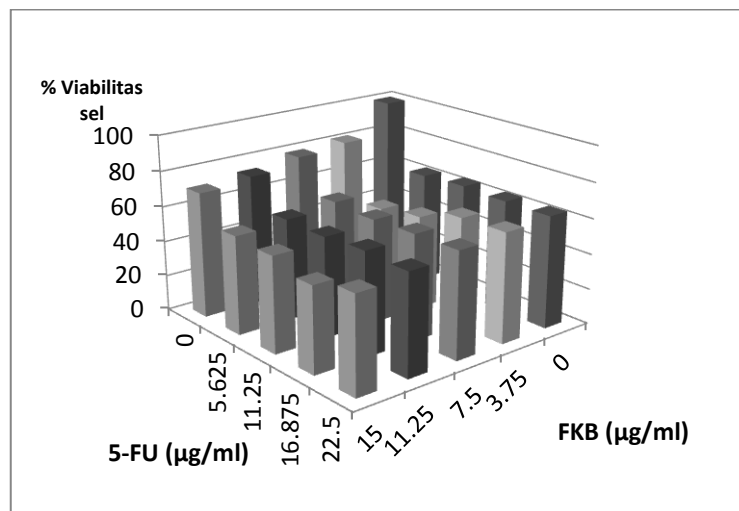
Gambar 12. Gambaran morfologi sel HeLa di bawah mikroskop *inverted* (2) setelah diberi perlakuan dengan sampel tunggal (a) FKB 3,75 $\mu\text{g/ml}$ (b) FKB 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (c) FKB 11,25 $\mu\text{g/ml}$ (d) FKB 15 $\mu\text{g/ml}$ (e) 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ (f) 5-FU 11,25 $\mu\text{g/ml}$ (g) 5-FU 16,875 $\mu\text{g/ml}$ (h) 5-FU 22,5 $\mu\text{g/ml}$; perbesaran 100x; panah hitam (\rightarrow) menunjukkan sel yang mengalami perubahan morfologi.

Berdasarkan hasil pengamatan sel, sel HeLa pada perlakuan FKB memiliki kerapatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 5-FU, fakta ini juga mendukung data viabilitas sel, dimana pada uji tunggal dengan 5-FU viabilitas sel antara 60-65% sel hidup, sedangkan FKB antara 70-85% sel hidup.

Tabel 11. Viabilitas sel HeLa pada perlakuan kombinasi FKB dan 5-FU

Senyawa		Viabilitas perlakuan 5-FU (%sel hidup)				
		0	5.625	11.25	16.875	22.5
Viabilitas perlakuan FKB (%sel hidup)	0	100	63.20	64.63	63.78	63.71
	3.75	81.79	49.92	53.45	61.37	62.15
	7.5	79.17	60.82	59.09	59.87	60.11
	11.25	73.97	57.76	56.85	58.41	57.12
	15	71.12	55.79	54.26	48.35	54.23

Viabilitas sel HeLa pada uji tunggal untuk 5-FU dari kadar terendah hingga yang tertinggi seluruhnya > 60% atau lebih besar daripada viabilitas sel pada perlakuan 5-FU tunggal, begitu pula viabilitas sel HeLa pada perlakuan FKB dengan viabilitas sel HeLa > 70% sehingga data ini sesuai dengan teori dimana pada pemberian 2 agen yang memiliki aktivitas sitotoksik sekaligus akan meningkatkan aktivitas sitotoksiknya dibandingkan perlakuan tunggal. Hasil kombinasi terbaik berdasarkan tingkat viabilitas sel HeLa adalah kombinasi FKB dan 5-FU pada kadar 15 µg/ml dan 16,875 µg/ml dengan 48,35% sel hidup dan kombinasi FKB dan 5-FU pada kadar 3,75 µg/ml dan 5,625 µg/ml. Data ini juga menunjukkan bahwa efektifitas suatu kombinasi tidak berbanding lurus dengan konsentrasi.

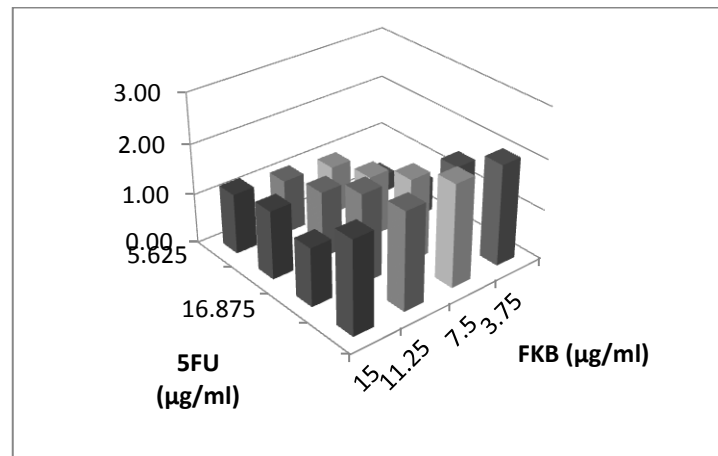


Gambar 13. Grafik viabilitas sel Hela FKB dan 5-FU tunggal dan kombinasi Pada kadar $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$ IC_{50}

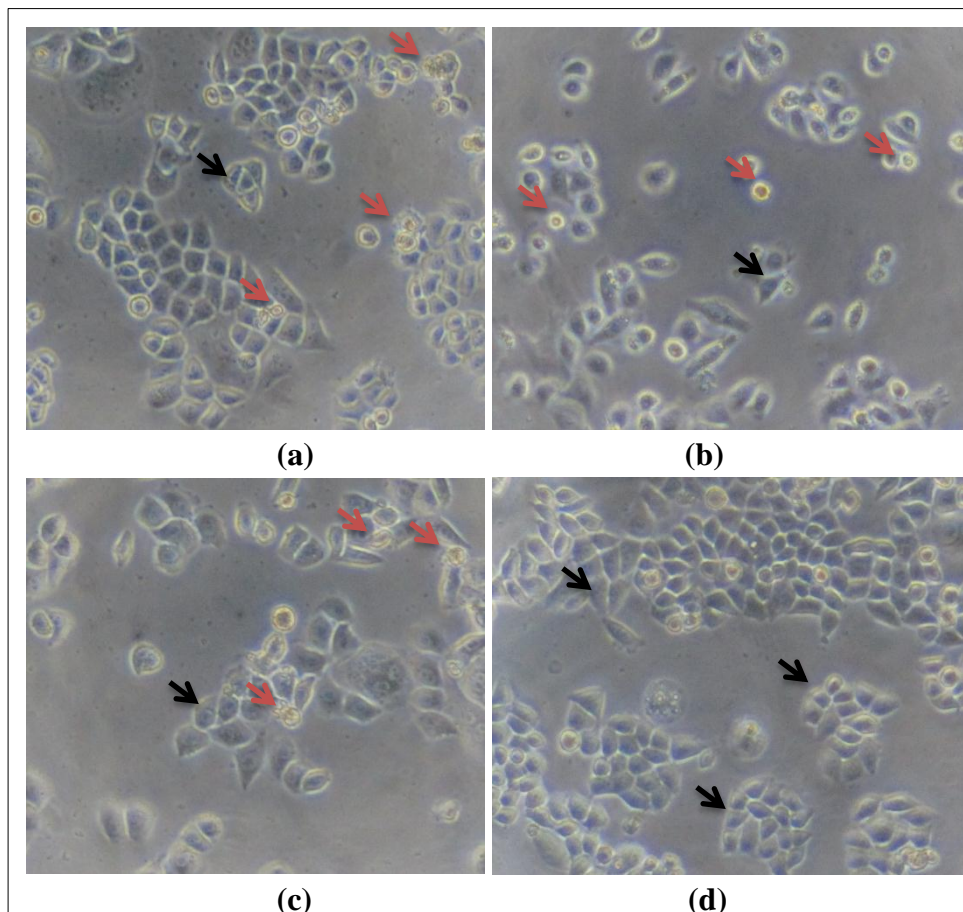
Tabel 12. Nilai *Combination Index* (CI) kombinasi FKB dan 5-FU

CI		5-FU			
		5.625	11.25	16.875	22.5
FKB	3.75	0.36	0.68	1.51	2.02
	7,5	0.97	1.23	1.66	2.05
	11.25	1.08	1.33	1.78	1.96
	15	1.20	1.37	1.17	1.86

Kombinasi FKB 3,75 $\mu\text{g/ml}$ dan 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ dan kombinasi 3,75 $\mu\text{g/ml}$ dan 5-FU 11,25 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan efek sinergis (0,3 – 0,7) dengan nilai CI masing-masing 0,36 dan 0,68. Kombinasi yang memberikan efek mendekati efek aditif (0,9 – 1,1) adalah FKB 7,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ dan kombinasi FKB 11,25 $\mu\text{g/ml}$ dan 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai CI masing-masing 0,97 dan 1,08. Adapun kombinasi pada kadar yang lain menghasilkan efek antagonis ringan hingga sedang (1,1 – 1,45) dan efek antagonis (1,45 – 3,3).

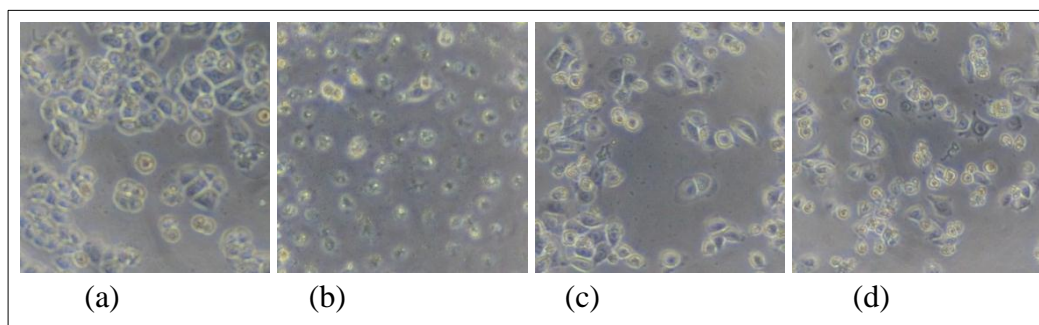


Gambar 14. Kurva perbandingan nilai CI kombinasi FKBP dan 5-FU



Gambar 15. Gambaran morfologi sel HeLa di bawah mikroskop *inverted* (3) pada perlakuan (a) FKBP 3,75 µg/ml, (b) 5-FU 5,625 µg/ml, (c) Kombinasi FKBP 3,75 µg/ml dan 5-FU 5,625 µg/ml, (d) Kontrol sel; panah merah (↗) menunjukkan sel yang mengalami perubahan morfologi; panah hitam (↘) menunjukkan sel yang tidak mengalami perubahan morfologi.

Kombinasi FKB 3,75 $\mu\text{g/ml}$ dan 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ memiliki kemampuan penghambatan kedua terbesar terhadap viabilitas sel HeLa dengan hanya 49,92% sel hidup dan kombinasi ini menghasilkan efek sinergis terbaik dengan IC 0,36. Berdasarkan pengamatan selnya di bawah mikroskop *inverted*, terlihat perubahan morfologi maupun kerapatan sel. Perlakuan tunggal FKB 3,75 $\mu\text{g/ml}$ memberikan gambaran morfologi sel menjadi bulat dan mengkerut dengan kerapatan yang lebih tinggi dibandingkan kombinasinya, sedangkan pada perlakuan tunggal 5-FU 5,625 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan kerapatan sel yang lebih rendah dari kombinasinya namun tidak terjadi pengkerutan sel, hanya saja ukuran sel menjadi lebih kecil dan mengapung. Adapun pada perlakuan kombinasi, kerapatan sel rendah dan beberapa sel mengalami pengkerutan maupun perubahan bentuk.



Gambar 16. Gambaran morfologi sel HeLa di bawah mikroskop *inverted* (4) pada perlakuan (a) FKB 30 $\mu\text{g/ml}$ (IC₅₀) (b) FKB 60 $\mu\text{g/ml}$ (2 IC₅₀), (c) 5-FU 45 $\mu\text{g/ml}$ (IC₅₀), (d) 5-FU 90 $\mu\text{g/ml}$ (2 IC₅₀); perbesaran 100x.

B. Pembahasan

Ekstrak etanol dan fraksi kloroform bandotan menghasilkan rendemen masing-masing 16,33% dan 3,7%. Ekstrak etanol menghasilkan rendemen yang lebih banyak, sedangkan fraksi kloroform menghasilkan rendemen yang sedikit. Walaupun memiliki kepolaran yang mirip, ekstrak etanol dan kloroform dapat terpisah dengan baik saat proses fraksinasi. Hasil ini sesuai dengan teori, yaitu *Ageratum conyzoides* mengandung lebih banyak senyawa polar daripada senyawa nonpolar (Okunade, 2002) sedangkan senyawa polar akan banyak terlarut dalam ekstrak etanol (*Polarity Index* : 4,3) dibandingkan pelarut kloroform dengan kepolaran yang lebih rendah (*Polarity Index* : 4,1) (Kellner, *et al.*, 2004).

Senyawa dengan kepolaran rendah akan cenderung untuk masuk ke fraksi kloroform (Markham, 1998). Adapun flavonoid dalam bandotan dengan kepolaran rendah terdiri dari senyawa dengan gugus polimetoksisflavon seperti nobiletin dan eupalestin serta senyawa isoflavon (Chauhan dan Rijhwani, 2015). Oleh karena itu, pemilihan kloroform sebagai pelarut sudah tepat karena diperkirakan mengandung senyawa flavonoid, termasuk nobiletin yang akan diujikan aktivitasnya secara *molecular docking*. Untuk mendapatkan kadar nobiletin maupun senyawa flavonoid yang lebih tinggi, maka penelitian selanjutnya dapat dilakukan fraksinasi dengan beberapa pelarut hingga proses isolasi senyawa.

Uji pendahuluan dengan KLT untuk mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid pada FKB. Hasil pemisahan kandungan senyawa FKB

menggunakan beberapa fase gerak (Mohammad, *et al.*, 2010) dengan kloroform sebagai fase gerak yang menghasilkan pemisahan yang terbaik tanpa *tailing*. Fase gerak yang dominan mengandung kloroform telah lama digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid seperti campuran kloroform : metanol : air (97 : 2 : 1) (Fitriani, 2011), kloroform : metanol (93 : 3 (v/v)) (Kulevanova, *et al.* 2001), kloroform metanol (10 : 1 (v/v)) (Sherma, 2000), dan metanol : kloroform (1 : 39) (Arishandi, 2011) menghasilkan bercak yang berfluoresensi kuning, biru keunguan, hijau kehitaman hingga merah. Penggunaan fase gerak kloroform juga mempertimbangkan jenis senyawa flavonoid yang diidentifikasi, yaitu nobiletin dan turunannya yang merupakan senyawa flavon yang termetoksilasi sehingga akan mudah larut dalam pelarut kloroform (Markham, 1998). Asumsinya, senyawa nobiletin dan turunannya akan lebih mudah di elusi oleh fase gerak kloroform sehingga dapat dideteksi dengan KLT.

Berdasarkan hasil KLT (lihat gambar 7 dan tabel 5), bercak nomor 4, 7, 8 dan 10 dengan Rf masing-masing 0,181; 0,287; 0,312; dan 0,350 diduga mengandung senyawa flavonoid. Bercak nomor 4 tidak terlihat pada sinar tampak maupun UV 254 sebelum diuapi amoniak sedangkan pada UV 366 berwarna kuning. Setelah diuapi amoniak pada sinar tampak terlihat bercak kuning redup yang mengindikasikan kandungan flavonoid (Marliana *et al.*, 2005) berupa flavonoid glikosida (Cetkovic *et al.*, 2003). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu *Ageratum conyzoides* L. mengandung

beberapa senyawa flavonoid glikosida yaitu quersetin 3-ramnopiranosida, kaemferol 3-ramnopiranosida, kaemferol-3,7-diglukopiranosida (Singh, 2012). Bercak nomor 7 yang berwarna ungu muda pada UV 254 dan berwarna biru pada UV 366, diduga merupakan flavonoid golongan flavon atau flavonon yang tidak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH glikosida atau isoflavon (lihat tabel 3). Adapun bercak nomor 8 dan 10 dengan warna ungu baik pada UV 254 maupun 366 diperkirakan sebagai flavon dan flavonol tersulih pada -3-O mempunyai 5-OH tanpa 4'-OH bebas dan isoflavon (Markham, 1998). Menurut Cetkovic, *et al.*, (2003), warna kuning dan ungu pada sinar UV menunjukkan kandungan quersetin dan flavonoid glikosida. Okunade (2000) menyatakan bahwa bandotan mengandung quersetin baik dalam bentuk tunggal maupun glikosidanya, sedangkan senyawa isoflavon pada bandotan terdapat dalam bentuk glikosida yaitu isoflavon-5-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 19)- α -L-ramnopiranosida (Singh, 2012). Uji pendahuluan dengan KLT hanya sebatas perkiraan jenis senyawa berdasarkan warna, dan kepolarannya sehingga untuk memastikan jenis dan kadar senyawa pada setiap bercak penelitian dapat dilanjutkan dengan metode kromatografi lain, yaitu HPLC atau KLT-densitometri.

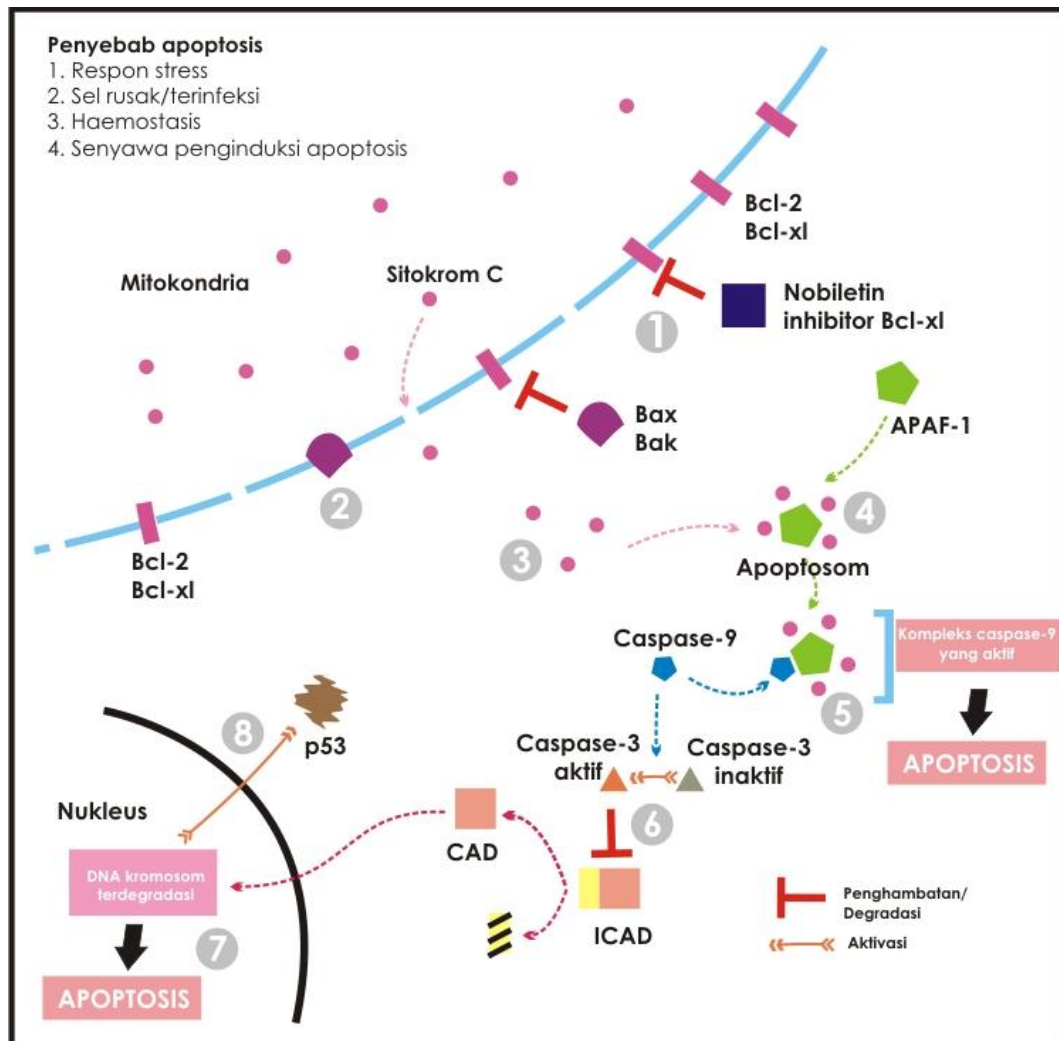
Salah satu mekanisme molekuler pada penghambatan perkembangan sel kanker adalah melalui proses apoptosis sel. Hasil validasi dengan *Autodock Vina* menunjukkan bahwa protokol *docking* nobiletin, 5-FU dan ligan asli TH1 pada konformasi 2 dan ligan asli 4FC pada konformasi 5 dapat diterima dengan nilai RMSD $<2\text{\AA}$. RMSD adalah nilai penyimpangan antara

suatu konformasi ligand dengan pembandingnya, yaitu apabila penyimpangannya terlalu besar maka semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi ligan dan protein (Korb, *et al.*, 2006). Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa *score docking* Nobiletin (-0,8 kcal/mol) lebih negatif daripada pembandingnya 5-FU (-4,7 kcal/mol) maupun ligan asli Bcl-x1 (4FC dan TH1 masing-masing -6,9 dan -6,2 kcal/mol) membuktikan bahwa kestabilan ikatan flavonoid nobiletin dengan Bcl-x1 lebih baik daripada pembandingnya 5-FU maupun ligan asli 4FC dan TH1 (Sanders *et al.*, 2010). Hal ini dapat diartikan bahwa energi yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan Bcl-x1 lebih sedikit sehingga ikatan yang terbentuk lebih stabil dibandingkan dengan 5-FU atau ligan asli.

Jenis ikatan yang terbentuk antara asam amino dan senyawa uji antara lain adalah ikatan kovalen dan ikatan *Van Der Waals*, dimana ikatan kovalen lebih kuat daripada ikatan yang lainnya. Selain itu, ikatan kovalen adalah satu-satunya ikatan yang *irreversible* sehingga memberikan kontribusi terbesar dalam penurunan energi afinitas ikatan dibandingkan ikatan hidrogen dan *Van Der Waals* (Patrick, 2001). Ikatan kovalen cenderung terbentuk dari residu ionik (lihat tabel 5.), asam amino polar membentuk ikatan hidrogen, sedangkan asam amino aromatik dan hidrofobik biasanya membentuk ikatan *Van Der Waals*, sehingga ikatan dengan residu ionik memberikan kontribusi terbesar terhadap penurunan energi afinitas senyawa uji karena membentuk ikatan kovalen (Schneider, *et al.*, 2008).

Visualisasi hasil *docking* dengan DS Visualizer yang memperlihatkan bahwa senyawa nobiletin yang berikatan dengan 11 asam amino memiliki jumlah asam amino ionik terbanyak dengan 4 asam amino dan asam amino polar dengan 1 asam amino dan sisanya adalah asam amino hidrofobik, sedangkan Ligan asli 4FC berikatan dengan 10 asam amino dengan 2 asam amino ionik sehingga nobiletin memiliki ikatan yang lebih stabil dibandingkan 5-FU atau ligan asli 4FC dan TH1. Berdasarkan nilai energi afinitas dan visualisasi *docking*, maka senyawa nobiletin memiliki potensi ikatan yang lebih kuat dan stabil terhadap protein Bcl-xl.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, nobiletin terbukti memiliki aktivitas antitumor melalui mekanisme antiproliferasi, induksi apoptosis, deregulasi siklus sel (Yoshimizu, *et al.*, 2004), antiangiogenesis (Wang, *et al.*, 2014), antiinflamasi dan antikarsinogenik (Li, *et al.*, 2008) dan aktivitas farmakologi lainnya melalui uji *in vitro* maupun *in vivo* (Huang, *et al.*, 2016). Adapun dari hasil penelitian ini, Nobiletin berpotensi memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme apoptosis yang melibatkan protein Bcl-xl secara *in silico*.



Gambar 17. Mekanisme apoptosis melalui jalur intrinsik

Proses apoptosis sel terjadi akibat kerusakan DNA maupun komponen sel melalui aktivasi *caspase*. Aktivasi *caspase* melalui jalur intrinsik yang diperantarai oleh protein keluarga Bcl-2 sebagai regulator apoptosis dan kekuatan membran luar mitokondria (Chipuk, *et al.*, 2010). Keluarga protein Bcl-2 terdiri dari protein proapoptosis (Bax dan Bak) dan antiapoptosis (Bcl-x1, Bcl-2) (Aisha *et al.*, 2017). Proses apoptosis dapat dipicu oleh respon terhadap stress, kerusakan sel atau sel terinfeksi, haemostasis sel serta senyawa pemicu apoptosis seperti agen anti-kanker.

Apoptosis melalui jalur intrinsik dapat dijabarkan dalam beberapa proses:

1. Adanya faktor pemicu apoptosis menyebabkan penghambatan terhadap protein antiapoptosis seperti Bcl-x1 dan Bcl-2 baik secara langsung maupun melalui aktivasi protein Bax dan Bak
2. Aktivasi tersebut menyebabkan terbentuknya pori di membran mitokondria
3. Sitokrok C keluar dari mitokondria dan membentuk kompleks apoptosom dengan *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1* (APAF 1)
4. Apoptosom mengaktifkan protease yang disebut *caspase 9*
5. *Caspase 9* berikatan dengan apoptosom dan memicu terjadinya apoptosis
6. Selain itu, *caspase 9* juga mengaktifkan *caspase* yang lain, yaitu *caspase-3*, proses ini disebut *caspase-3 cascade* (Michels, *et al.*, 2013)
7. *Caspase-3* memecah ICAD menjadi CAD dan residunya terdegradasi
8. CAD masuk ke dalam nukleus dan mendegradasi DNA kromosom sehingga protein p53 diaktivasi dan terjadilah apoptosis.

Proses apoptosis melalui jalur intrinsik melibatkan banyak protein baik yang bersifat proapoptosis maupun antiapoptosis serta protein lainnya seperti APAF 1 dan p53. Oleh karena itu, untuk mengembangkan penelitian ini dapat dilakukan pengujian aktivitas induksi apoptosis oleh nobiletin melalui potein-protein tersebut sehingga diharapkan memberikan hasil yang sinergis dalam memicu apoptosis sel kanker.

Interaksi yang lemah antara 5-FU dengan Bcl-xl mengindikasikan bahwa 5-FU memiliki aktivitas antikanker yang rendah melalui mekanisme induksi apoptosis. 5-FU merupakan golongan obat antimetabolit yang aksinya menghambat proses biosintesis yang paling utama atau bergabung dengan makromolekul DNA dan RNA sehingga merusak fungsi normalnya (Longley, *et al.*, 2003). Senyawa 4FC sebagai ligan asli memiliki aktivitas yang serupa dengan nobiletin berdasarkan nilai *score docking*, kemiripan *binding site* serta residu protein yang terikat dengannya. Diperkirakan kedekatan aktivitas kedua senyawa uji ini disebabkan oleh kemiripan struktur senyawanya.

Setelah dilakukan identifikasi senyawa dengan KLT kemudian *screening* aktivitas molekuler zat aktif FKB, maka penelitian dilanjutkan dengan uji *in vitro* melalui uji sitotoksik dengan metode MTT Assay terhadap sel kanker serviks HeLa. Data yang dihasilkan dari uji sitotoksik dalam penelitian ini adalah data viabilitas sel (% sel hidup) dan IC₅₀ untuk uji tunggal dan nilai CI untuk uji kombinasi.

Hasil penelitian uji sitotoksik tunggal menunjukkan bahwa FKB memiliki potensi yang tinggi dalam menghambat viabilitas sel kanker serviks HeLa dengan IC₅₀ 27,48 µg/ml, lebih rendah dari IC₅₀ obat kanker pembandingnya yaitu 5-FU dengan IC₅₀ 41,46 µg/ml. Walaupun begitu, keduanya sudah termasuk senyawa yang memiliki potensi tinggi sebagai agen kemopreventif dengan nilai IC₅₀ <100 µg/ml. Selain itu, FKB pada konsentrasi 50 µg/ml sudah mampu membunuh 90,59 % sel HeLa, jauh lebih poten dibandingkan 5-FU yang hanya mampu membunuh 77,29% sel HeLa

sehingga peningkatan kadar FKB maupun 5-FU berbanding terbalik dengan viabilitas sel HeLa.

Penelitian sebelumnya dengan waktu inkubasi 24 jam menunjukkan bahwa nilai IC_{50} 5-FU terhadap sel HeLa sebesar 1,97 $\mu\text{g/ml}$ (Mirunalini *et al.*, 2017) yang lebih rendah sehingga kemungkinan sel HeLa yang digunakan masih sensitif terhadap 5-FU sedangkan menurut penelitian Sukardiman *et al.*, (2014) nilai IC_{50} 5-FU adalah 71,50 $\mu\text{g/ml}$. Adapun pada penelitian ini dilakukan inkubasi selama 48 jam sehingga nilai IC_{50} 5-FU lebih rendah dari penelitian sebelumnya dengan 41,46 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} yang lebih tinggi dari penelitian Mirunalini *et al.*, menunjukkan sel HeLa mulai resisten terhadap obat kemoterapi kemungkinan karena ekspresi E6 yang berasal dari HPV mendegradasi protein p53 (Jemal *et al.*, 2010).

Pengamatan hasil uji tunggal viabilitas sel HeLa setelah diberi perlakuan dengan FKB dan 5-FU juga dilakukan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui perubahan morfologi sel HeLa sebelum dan setelah diberi perlakuan. Pengamatan sel yang di uji dengan FKB maupun 5-FU pada kadar yang terendah masing-masing (3,125 $\mu\text{g/ml}$ dan 1,69 $\mu\text{g/ml}$) menunjukkan terjadinya perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk dari sel yang cenderung bulat sedikit lonjong, berwarna abu-abu dan ada batas yang jelas antara inti sel dan cairan sel menjadi berbentuk bulat atau tidak beraturan (pengecilan ukuran sel), berwarna lebih terang dan inti selnya tidak terlihat. Perubahan morfologi sel diperkirakan terkait dengan mekanisme bahan yang diujikan. Pengujian aktivitas sitotoksik FKB juga dilakukan pada kadar IC_{50}

dan 2 kali IC_{50} yang diamati perubahan morfologinya menunjukkan bahwa pada kadar 2 kali IC_{50} terlihat hampir semua sel hancur menunjukkan terjadi aktivitas apoptosis atau nekrosis sel.

Fraksi Kloroform Bandotan (FKB) dengan kandungan kimia senyawa flavonoid nobiletin dan turunannya menginduksi apoptosis sel dengan meningkatkan ekspresi protein Bax dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker paru A549 (Luo *et al.*, 2008) atau sel kanker payudara MCF-7 yang dikombinasi dengan doxorubicin melalui peningkatan ekspresi protein p53 (Meiyanto *et al.*, 2011) sehingga setelah perlakuan bentuk sel menjadi rusak (tidak beraturan) yang menunjukkan sel sedang melakukan apoptosis. Selain nobiletin, senyawa flavonoid lainnya seperti kaempferol memiliki aktivitas antikanker yang tinggi pula melalui uji *in vitro* terhadap *Ageratum conyzoides* (Nataru *et al.*, 2014). Adapun 5-FU mempengaruhi DNA sel sehingga terjadi mutasi dan akhirnya sel akan nekrosis.

Berdasarkan hasil uji tunggal FKB dan 5-FU, maka dilakukan uji kombinasi antara FKB dan 5-FU agar memberikan efek antikanker yang sama bahkan lebih baik dengan dosis 5-FU kombinasi yang lebih rendah daripada 5-FU tunggal sehingga efek samping obat kemoterapi dapat diturunkan bersamaan dengan turunnya dosis. Uji kombinasi menggunakan kadar di bawah kadar IC_{50} yaitu $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$ IC_{50} FKB dan 5-FU dimana hasil uji sitotoksik menunjukkan viabilitas sel terbaik terletak pada kombinasi kadar 15 $\mu\text{g/ml}$ FKB ($\frac{1}{2}$ IC_{50}) dan 16,578 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU ($\frac{3}{8}$ IC_{50}) dengan 48,35% sel hidup dan kadar 3,75 $\mu\text{g/ml}$ FKB ($\frac{1}{8}$ IC_{50}) dan kadar 5,625

$\mu\text{g/ml}$ 5-FU ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dengan 49,92% sedangkan kombinasi kadar yang lain menghasilkan viabilitas sel $>50\%$. Hasil uji kombinasi menunjukkan bahwa kenaikan kadar kombinasi tidak berbanding lurus dengan jumlah sel hidup.

Parameter lain yang menunjukkan afektivitas kombinasi adalah nilai CI. Nilai CI terbaik yang memberikan efek sinergis apabila dikombinasi adalah kombinasi kadar $3,75 \mu\text{g/ml}$ FKB ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dan $5,625 \mu\text{g/ml}$ 5-FU ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dengan CI 0,36 dan kadar $3,75 \mu\text{g/ml}$ FKB ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dan $11,25 \mu\text{g/ml}$ 5-FU ($1/4 \text{ IC}_{50}$) dengan CI 0,68. Adapaun pada kadar $7,5 \mu\text{g/ml}$ FKB ($1/4 \text{ IC}_{50}$) dan $5,625 \mu\text{g/ml}$ 5-FU ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dengan CI 0,97 menghasilkan efek additif sedangkan kombinasi kadar yang lainnya memberikan efek antagonis. Berdasarkan hasil viabilitas sel maupun nilai CI kombinasi, maka kombinasi terbaik antara FKB dan 5-FU dengan waktu inkubasi 48 jam adalah pada kadar $3,75 \mu\text{g/ml}$ FKB ($1/8 \text{ IC}_{50}$) dan kadar $5,625 \mu\text{g/ml}$ 5-FU ($1/8 \text{ IC}_{50}$). Hasil ini didasarkan pada %sel hidup rendah, nilai CI dengan efek sinergis serta kombinasi dengan kadar masing-masing $1/8 \text{ IC}_{50}$ sehingga lebih sesuai untuk tujuan utama pemberian ko-kemoterapi. Belum diketahui mekanisme kombinasi FKB dan 5-FU sehingga perlu dilakukan uji lebih lanjut berdasarkan dugaan mekanisme yang mungkin terjadi seperti uji apoptosis, imunositokimia maupun analisis *western blot* untuk mengetahui ekspresi protein Bcl-x1, Bcl-2, Bax, p53 dan protein lain terkait mekanisme apoptosis sel.