

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* menggunakan fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan secara *in silico* menggunakan senyawa sianidin 3-O-glukosida dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan menggunakan protein HER2 dan EGFR.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Kultur Jaringan, dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, serta Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2018 – Mei 2019.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Analisis dengan metode KLT

Variabel bebas : Fraksi n-heksan kelopak bunga rosella
(*Hibiscus sabdariffa* L.).

Variabel terkendali : Waktu eluen mencapai batas plat.

Variabel tergantung : Nilai R_f pada plat KLT.

b. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Variabel bebas : Konsentrasi fraksi n-heksan kelopak
bunga rosella.

Variabel terkendali : Suhu dan waktu inkubasi.

Variabel tergantung : Aktivitas antioksidan fraksi n-heksan
kelopak bunga rosella.

c. Uji Sitotoksik secara *In Vitro* dengan MTT assay

Variabel bebas : Konsentrasi fraksi n-heksan kelopak
bunga rosella.

Variabel terkendali : Suhu dan waktu inkubasi.

Variabel tergantung : Aktivitas sitotoksik n-heksan kelopak
bunga rosella.

d. *In Silico Molecular Docking*

Variabel bebas : Bentuk konformasi optimal sianidin 3-O-
glukosida

Variabel terkendali : Seperangkat alat komputer, struktur
protein HER2 dan EGFR.

Variabel tergantung : *Docking score*.

e. Uji Siklus Sel dengan Flowsitometri

Variabel bebas : Konsentrasi fraksi n-heksan kelopak
bunga rosella

Variabel terkendali : Suhu dan waktu inkubasi.

Variabel tergantung : Fase siklus sel yang terhambat

2. Definisi Operasional

a. Harga *Retardation Factor* (Rf)

Harga Rf adalah jarak yang ditempuh oleh suatu senyawa dari titik atau *spot* awal yang dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dari titik awal.

b. *Docking Score*

Hasil akhir *molecular docking* atau disebut *docking score* menunjukkan energi total dari ikatan protein dengan ligan. Semakin kecil *docking score*, menunjukkan semakin baik atau semakin poten suatu senyawa atau ligan karena ikatannya lebih stabil.

c. Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ pada uji antioksidan, menunjukkan konsentrasi suatu sampel ($\mu\text{g/mL}$) yang dapat memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50%. Semakin kecil IC₅₀ maka semakin kuat kemampuan antioksidannya. Nilai IC₅₀ pada uji sitotoksik adalah nilai konsentrasi yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50%, dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat komputer (ASUS[®]), alat-alat gelas (Pyrex[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), oven (Memmert[®]), aluminium foil (Diamond[®]),

spektrofotometer UV-Vis (SHIMADZU[®]), lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, autoklaf (Allamerican[®]), *Laminar Air Flow* (LabTech[®]), blender (Phillips[®]), vorteks (Labinco L46[®]), *rotary evaporator* (IKA[®]), corong pisah (HERMA[®]), *waterbath* (Mettler[®]), mikropipet (Gilson[®]), incubator CO₂ (Heraceus[®]), *cell counter* (Brand), *Tissue Culture Flask* (Nunc[®]), 96-well plate (Nunc[®]), *chamber* (GG[®]), *centrifuge* (Sorvall[®]), *ELISA reader* (TECAN[®]), mikroskop inverted (Zeiss[®]), *blue tip* (Brand), tabung klonikal 15 mL steril (IWAKI[®]), *shaker* (Genmy[®]), *yellow tip* (Brand), pH meter, cawan porselin (Pyrex[®]), pipa kapiler (Pyrex[®]), haemositometer (Nebauer[®]), viskometer (Brookfield), kuvet (Kuvet *disposable*), dan silika gel GF₂₅₄.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Utama

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang diperoleh dari daerah Kaliurang.

b. Bahan Penunjang

Bahan-bahan yang menunjang dalam penelitian ini antara lain etanol 70% (General Labora[®]/*grade* pro analisis), n-Heksan (General Labora[®]/*grade* teknis), aquadest (General Labora[®]/*grade* teknis), asam asetat (General Labora[®]/*grade* teknis), n-Butanol (General Labora[®]/*grade* teknis), sel kanker payudara T47D (Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM), DPPH (Chemistry Mix[®]/*grade* teknis), methanol (General Labora[®]/*grade* teknis), sukrosa

(General Labora[®]/*grade* teknis), natrium benzoat (General Labora[®]/*grade* teknis), gliserin (General Labora[®]/*grade* teknis), asam sitrat (General Labora[®]/*grade* teknis), Dimetil Sulfoksida (DMSO), Reagen stopper Sodium Dodesil Sulfat dalam HCl 10% (Merck[®]), MTT 5mg/mL dalam media kultur, larutan PBS (Phosphat Buffer Salin), Fungizone 0,5%, penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco[®]), semprot amoniak, larutan RPMI berisi FBS 10% v/v (Gibco[®]), serta struktur protein HER2 dan EGFR (PDB *file* NCBI).

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Determinasi Tanaman, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

a. Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk

Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang sudah dipanen kemudian dibersihkan, diambil kelopaknya, lalu dipotong tipis. Kelopak bunga rosella yang sudah dipotong-potong ditutupi kain hitam dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama 5-10 hari, kemudian dihaluskan menjadi serbuk simplisia.

b. Pembuatan ekstrak etanolik kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Serbuk simplisia disari atau diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi, dengan perbandingan 1:10 (1 kg serbuk:10

liter etanol 70%). Serbuk simplisia direndam dalam etanol 70% selama 5 hari dan setiap hari dilakukan pengadukan agar proses penyarian sempurna. Setelah 5 hari, maserat yang diperoleh disaring kemudian diremaserasi selama 2 hari untuk mengoptimalkan hasil ekstrak.

c. Pembuatan fraksi n-heksan

Hasil remaserasi berupa ekstrak kemudian difraksinasi partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya fraksi n-heksan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C untuk memekatkan ekstrak. Setelah fraksi n-heksan dipekatkan, kemudian dikentalkan dengan *waterbath*.

3. Uji Kandungan Senyawa dengan KLT

Identifikasi senyawa flavonoid yaitu antosianin menggunakan KLT dilakukan dengan menotolkan sampel uji yaitu fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan pipa kapiler pada plat silika gel GF₂₅₄, kemudian dielusi dengan fase gerak dalam bejana yang tertutup rapat. Fase gerak yang digunakan yaitu *n*-Butanol: Asam asetat: Air (BAA) dengan perbandingan 7:2:1. Plat silika yang sudah dielusi dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60° C selama 10 menit, selanjutnya plat diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian dilihat jarak *spot* yang tertera dan dihitung nilai R_f.

4. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan Baku DPPH 0,4 mM

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol sampai 25 mL. Kemudian diambil larutan DPPH sebanyak 10 mL dan ditambahkan metanol hingga 100 mL, dan dihomogenkan dengan *vortex*.

b. Pembuatan Larutan Induk Sampel dan Standar

Sampel fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) ditimbang sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan metanol sampai 20 mL, kemudian diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/mL. Sebanyak 5 mg quersetin analitik dilarutkan dalam 100 mL metanol dan didapatkan kadar 50 µg/mL.

c. Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi Sampel dan Standar

Larutan induk sampel kemudian diambil untuk membuat seri kadar dengan cara melarutkan sejumlah sampel dengan pelarut metanol. Seri kadar fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dibuat sebanyak lima seri kadar yaitu 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL. Larutan induk standar yaitu quersetin juga dibuat seri kadarnya yaitu 1 µg/mL; 2 µg/mL; 3 µg/mL; 4 µg/mL dan 5 µg/mL.

d. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dilarutkan dalam 5 mL metanol.

e. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan yaitu larutan sampel sebanyak 3 mL dari masing-masing konsentrasi.

f. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 1000 μ L dimasukkan ke dalam tabung ulir 10 mL yang berisikan metanol 1000 μ L. Kemudian larutan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* dan *spectra* panjang gelombang. Larutan tersebut selanjutnya dibaca pada rentang 200-800 nm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari *spectra* panjang gelombang.

g. Penentuan *Operating Time* Sampel

Setelah larutan 1000 μ L DPPH dan 1000 μ L metanol homogen, selanjutnya nilai absorbansi dari larutan tersebut dibaca pada panjang gelombang 517 nm setiap 5 menit sekali selama 90 menit. Waktu stabil ditentukan oleh absorbansi larutan sampel.

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengambil masing-masing 5 mL fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan larutan quersetin dari tiap-tiap kadar, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM dan dihomogenkan menggunakan *vortex*, lalu didiamkan selama *operating time* di ruang tertutup. Absorbansi sampel dibaca dengan panjang gelombang maksimum

DPPH, selanjutnya nilai absorbansi diolah menjadi persen antioksidan untuk melakukan perhitungan IC_{50} .

5. Uji Sitotoksik Metode MTT *assay*

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan sebelumnya dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun kemudian dikeringkan. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ dan tekanan 15 lbs selama 20 menit, selanjutnya dikeringkan dalam oven. *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang akan digunakan untuk melakukan uji sitotoksik disterilkan dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dibersihkan.

b. Pembuatan Larutan Media Kultur dan Media Kultur

Pembuatan media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) dilakukan dengan cara mencampur sebanyak 1 *sachet* RPMI, 2 gram Hepes, 2 gram $NaHCO_3$ di dalam tabung erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan aquades sampai 800 mL dan dihomogenkan dengan cara diaduk. Kemudian HCL encer 1 N digunakan untuk menyesuaikan pH sampai mencapai pH yang diinginkan yaitu 7,2 – 7,4 dan diukur menggunakan pH meter. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai 1 liter, dan dilakukan sterilisasi dengan *filter vacuum* di dalam LAF, dipasang filter polietilensulfon steril $0,2 \mu m$ pada botol duran 1 liter steril dan melakukan proses penyaringan dengan filter. Sebagian media yang akan diuji kemudian ditampung dalam botol duran 500 mL, dan diberi identitas pada botol media serta disimpan pada suhu $2-8^{\circ}C$.

Pembuatan media kultur lengkap atau media komplet (MK) dilakukan secara aseptis di dalam LAF dengan mencampur *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Penisilin-Streptomisin 2%, Fungizon (Amfoterisin B) 0,5% dan ditambahkan RPMI yang sudah dibuat sampai 100 mL.

c. Preparasi Sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair kemudian dicairkan pada suhu 37° C dan disemprotkan etanol 70% di dalam ampul. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, dan pellet ditambah 1 mL media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen. Sel kemudian ditumbuhkan dalam *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup banyak untuk penelitian.

d. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan koloni sel dicuci dengan menambahkan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan diresuspensi perlahan jika perlu, kemudian larutan dibuang. Sel dicuci dengan replikasi 2 kali dengan menggunakan PBS. Setelah larutan dibuang, selanjutnya ditambah 1 mL larutan tripsin 0,25% pada sel dan didiamkan selama 3 menit agar tripsin dapat bekerja dengan baik. Sel

selanjutnya dipindah dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 mL dan disentrifugasi selama 3 menit pada 3000 rpm. Sel dicuci 2 kali dengan media yang sama dan dihitung jumlah sel menggunakan hemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur agar diperoleh konsentrasi sel sebesar 5×10^3 sel/100 μ L dan siap untuk penelitian.

e. Pembuatan Larutan Uji

Fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dibuat stok dengan kadar 10^5 μ g/mL dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2 %. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat beberapa konsentrasi untuk kemudian diujikan.

f. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *assay* dengan cara, sel dengan kepadatan 5×10^3 sel/100 μ L MK didistribusikan ke dalam 96 *well plate* yang berisi 100 μ L dengan 3 sumuran kosong untuk diisikan media kontrol, dan diinkubasi selama 48 jam agar sel dapat beradaptasi dan menempel pada dasar sumur. Hari berikutnya sumuran diambil, dan media diambil kemudian dicuci menggunakan PBS. Selanjutnya ditambahkan 50 μ L media kultur yang hanya mengandung DMSO 0,2% (kontrol) atau sampel uji yaitu fraksi n-heksan kelopak bunga rosella dari setiap seri konsentrasi dan direplikasi sebanyak 3 kali dan ditambah 50 μ L MK. Sumuran yang telah berisi sel kontrol ditambahkan 100 μ L MK setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya membuat media

kultur MTT 5 mg/mL dengan melarutkan 50 mg serbuk MTT dalam 10 mL PBS kemudian membuat reagen MTT dengan mengencerkan stok MTT 5 mg/mL dalam 10 mL MK dan didapatkan konsentrasi 0,5 mg/mL.

Pada akhir inkubasi media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 50 μ L PBS. Selanjutnya pada masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L MTT 5mg/mL, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Sel yang hidup atau bertahan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah inkubasi selama 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambah larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal formazan. *Plate* digoyangkan di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

6. *Molecular Docking*

a. Pengunduhan Aplikasi *Molecular Docking*

Aplikasi yang digunakan pada penelitian ini adalah *Autodock Vina* dan dilengkapi dengan beberapa aplikasi pendukung, sebagai berikut:

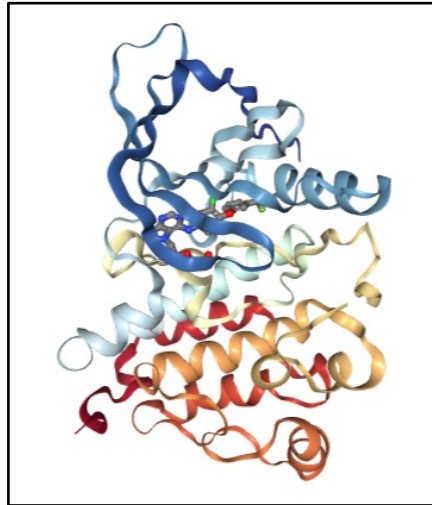
1. *Autodock Vina* yaitu aplikasi yang digunakan untuk melakukan proses *Molecular Docking*, diunduh di website <http://vina.scripps.edu/download.html>.
2. *DS Visualizer*, yang berfungsi untuk menyiapkan protein dan ligan yang akan diuji, serta untuk visualisasi hasil *Molecular*

Docking diunduh di <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biova-discovery-studio/visualization-download.php>.

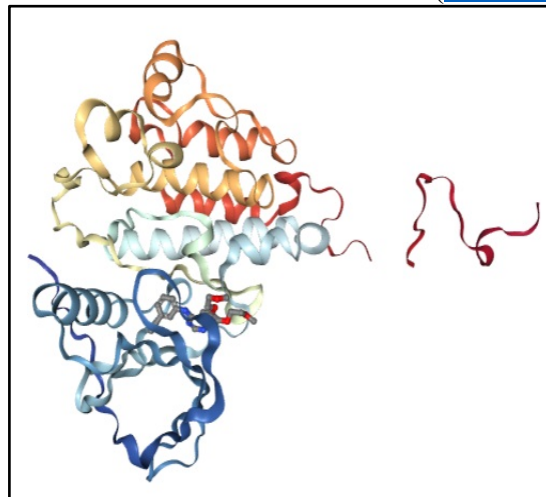
3. *MGLTools* atau *Autodock Tools* digunakan untuk mengolah protein dan ligan uji agar dapat dieksekusi oleh aplikasi *Autodock Vina* dan menyiapkan parameter-parameter *docking*, diunduh di <http://mgtools.scripps.edu/downloads>.
4. *Python* yaitu aplikasi yang digunakan untuk menjalankan aplikasi yang menggunakan bahasa pemrograman *Python* seperti *MGLTools*, diunduh di <http://python.org/ftp.python/2.5.2/python-2.5.2.msi>.
5. *YASARA* berfungsi untuk mengukur nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dan dapat juga digunakan untuk preparasi protein dan ligan yang akan diuji, yang diunduh di <http://www.yasara.org/viewdl.htm>.
6. *Open Babel* digunakan untuk mengkonversi hasil *docking* dari format PDBQT menjadi PDB, diunduh di <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>.

b. Pengunduhan Struktur Protein

Struktur protein yang dibutuhkan untuk melakukan *molecular docking* pada penelitian ini adalah HER-2 (PDB ID: 3PP0) dan EGFR (PDB ID: IM17) yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) melalui website www.rscb.org. Struktur protein yang diunduh adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Struktur 3D Protein HER2 (www.rscb.org)



Gambar 6. Struktur 3D Protein EGFR (www.rscb.org)

c. Preparasi Protein dan Ligan

Aplikasi yang digunakan untuk menyiapkan protein dan ligan pada penelitian ini adalah *DS Visualizer*. Protein yang sudah diunduh kemudian dibuka, lalu hapus semua ligan, molekul air, hemoglobin dan lain-lain yang ada pada protein tersebut. Selanjutnya protein disimpan dengan format PDB dengan nama berkas 3pp0.pdb dan Im17.pdb.

Preparasi ligan yang akan diuji juga menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, dengan cara berkas protein dibuka dan dihapus residu

proteinnya sehingga menyisakan ligan asli. Kemudian disimpan dengan nama berkas ligan.pdb. Cara lain yang dapat digunakan yaitu dengan mengunduh ligan dengan format berkas .sdf yang kemudian diubah menggunakan *Open Babel* menjadi format .pdb. Ligan yang digunakan yaitu sianidin 3-O-glukosida. Jika protein dan ligan sudah siap, selanjutnya dapat dieksekusi dengan *Autodock Vina*.

d. Konversi Format Berkas Protein dan Ligan

Format berkas yang dapat dieksekusi menggunakan aplikasi *Autodock Vina* hanya dengan format .pdbqt, sehingga format yang sebelumnya .pdb harus dikonversi dulu menjadi .pdbqt. Aplikasi yang digunakan untuk mengonversi yaitu *MGLTools* atau *Autodock Tools*, kemudian berkas protein diubah dengan menambahkan hidrogen. Selanjutnya berkas protein dan ligan diatur luas wilayah *docking* dengan menggunakan submenu *Grid Box*. Luas wilayah yang digunakan berperan dalam proses *docking* dan nilai RMSD pada setiap konformasi. Sehingga dilakukan beberapa kali penyesuaian luas wilayah untuk mendapatkan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Kemudian berkas protein disimpan dengan nama 3pp0.pdbqt dan Im17.pdbqt sedangkan berkas ligan disimpan dengan nama ligan.pdbqt.

e. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina*

Sebelum melakukan *molecular docking*, perlu dipastikan bahwa semua berkas yang akan digunakan berada pada folder yang sama. Pertama, membuat dokumen baru dan diberi nama conf.txt. Kemudian

mengisi formulir dengan keterangan yang akan dilakukan selama proses *docking*, yaitu dengan menuliskan protein 3pp0.pdbqt dan 1m17.pdbqt, ligan dituliskan dengan ligan.pdbqt, sedangkan *center_x,y,z* dan *size_x,y,z* dituliskan sesuai dengan nilai yang tertera pada grid box, selanjutnya disimpan pada folder yang sama. Nilai RMSD ditentukan dengan cara mengisi *Command Prompt Windows* dengan kode dan ditunggu hingga proses selesai yang kemudian akan muncul beberapa konformasi. Setiap konformasi menunjukkan nilai afinitas RMSD. Konformasi yang dipilih pada penelitian ini yaitu yang memiliki nilai RMSD kurang dari 2 Å. Kemudian berkas output.pdbqt dipecah menjadi beberapa berkas terpisah sesuai pada masing-masing konformasi, dan disimpan di folder yang sama untuk memudahkan visualisasi.

f. Visualisasi Hasil *Docking*

DS Visualizer digunakan untuk visualisasi hasil *docking*. Berkas dengan format .pdbqt sebelumnya diubah dengan menggunakan *Open Babel* sehingga menjadi .pdb. Visualisasi hasil *docking* bertujuan untuk mengetahui posisi dan gambaran ikatan antara protein dan ligan secara 3 dimensi.

7. Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri

a. Perlakuan

Sel T47D yang telah diinkubasi CO₂ diamati dan sel dipanen. Jumlah sel dihitung, sel yang dibutuhkan untuk 6 *well plate* ialah 5x10⁵ sel/sumuran. Kemudian membuat pengenceran sel dengan RPMI, dan

sel ditransfer ke dalam sumuran *6 well plate* masing-masing 1000 μL untuk perlakuan dan untuk kontrol sel. Selanjutnya sel diinkubasi selama semalam agar sel pulih kembali setelah panen.

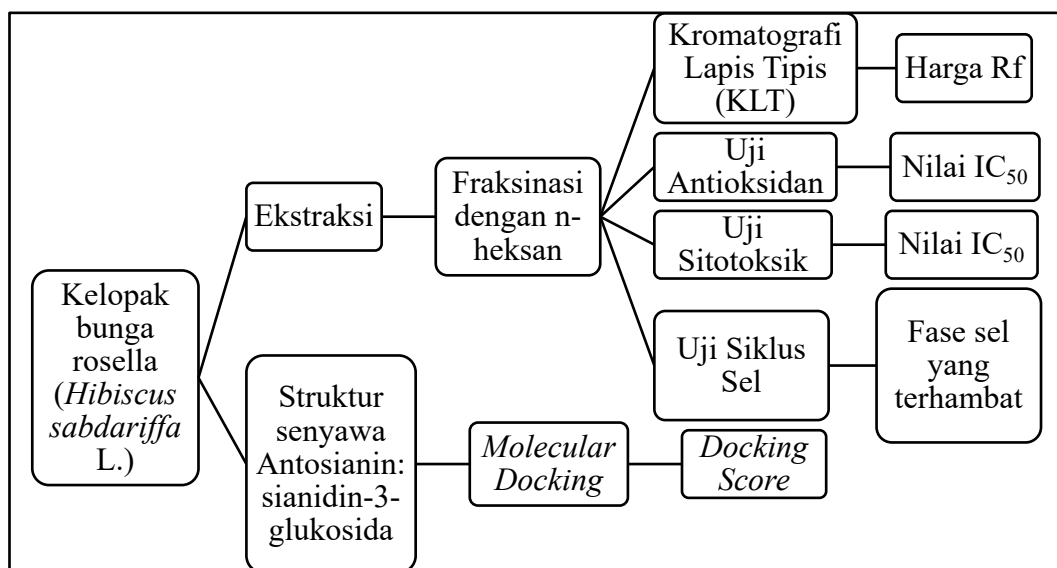
Setelah sel normal kembali, selanjutnya membuat konsentrasi fraksi n-heksan kelopak bunga rosella untuk perlakuan. Seri konsentrasi yang dibuat terdiri dari 2 konsentrasi yaitu $\frac{1}{2}$ IC_{50} dan IC_{50} dengan volume masing-masing 500 μL . Serta dibuat juga seri konsentrasi agen kemoterapi yaitu Doksorubisin dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} dan IC_{50} . *Plate* yang telah berisi sel diambil dari inkubator, kemudian media sel dibuang dengan menggunakan pipet *Pasteur* secara perlahan-lahan. Semua sumuran yang terisi sel dicuci dengan 500 μL PBS. Masukkan 1000 μL seri konsentrasi fraksi n-heksan kelopak bunga rosella dan Doksorubisin ke dalam sumuran (terpisah). Untuk kontrol sel, ditambahkan 1000 μL RPMI ke dalam sumuran. Kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO_2 24-48 jam.

b. Preparasi Sampel untuk Flowsitometri

Media dari sumuran diambil dengan mikropipet 1 mL, dan ditransfer ke konikel yang telah disiapkan. Isikan 500 μL PBS ke dalam sumuran dan ambil PBS dengan mikropipet dan transfer ke dalam konikel. Tambahkan 200 μL tripsin-EDTA 0,25% untuk melisiskan sel dari dasar sumuran inkubasi di inkubator selama 3 menit. Satu mL RPMI ditambahkan untuk menginaktivasi tripsin, dan resuspensi sampai sel lepas satu persatu. Setelah sel terlepas, ditransfer ke konikal. PBS 500

μL kembali ditambahkan untuk mengambil sisa sel, kemudian ditransfer ke dalam konikal. Konikal disentrifus dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. RPMI/PBS dibuang, *pellet* sel dicuci dengan 500 μL PBS dingin, disentrifus kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Buang PBS, dan teteskan 500 μL alkohol 70%, 1 tetes/detik ke dalam konikal yang digoyang perlahan, bertujuan untuk memfiksasi sel. Konikal kemudian disimpan pada suhu ruang 37°C selama 30 menit, dan disentrifus kembali selama 5 menit kecepatan 6000 rpm. Alkohol dibuang dan ditambahkan 500 μL PBS untuk menghilangkan alkohol kemudian sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya reagen flowsitometri ditambahkan, dan didiamkan selama 30 menit. Suspensi sel ditransfer ke dalam *flowcyto-tube*, kemudian dilakukan pembacaan dengan flowsitometer *FACS Calibur* untuk mengetahui profil siklus sel.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 7. Skema Langkah Kerja

G. Analisis Data

1. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Fraksi n-heksan kelopak bunga rosella yang telah diekstraksi menggunakan n-Butanol : Asam asetat : Air (BAA) dengan perbandingan 7:2:1 kemudian diuapikan amoniak untuk mendeteksi adanya senyawa antosianin pada fraksi n-heksan kelopak bunga rosella. Selanjutnya plat KLT diamati di bawah sinar tampak, UV₂₅₄ dan UV₃₆₆ nm untuk kemudian mengetahui lokasi dari setiap *spot* sehingga dapat melakukan perhitungan nilai R_f.

2. Analisis Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan dari sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase hambatan terhadap serapan DPPH yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol Negatif} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol Negatif}} \times 100\% \dots \dots \dots (\text{Formula 1})$$

Nilai persen inhibisi dari setiap konsentrasi yang telah dihitung kemudian digunakan untuk perhitungan *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) yang menunjukkan nilai konsentrasi suatu bahan untuk dapat menghambat sebesar 50% aktivitas DPPH. Setelah diperoleh persentase inhibisi, selanjutnya mencari nilai IC₅₀ dengan ditentukan persamaan $y = a + bx$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana x merupakan konsentrasi (µg/mL) dan y adalah persentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi didapat dari nilai x setelah menggantikan $y = 50$.

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

No	Intensitas	IC ₅₀
1	Sangat Kuat	<50 µg/mL
2	Kuat	50-100 µg/mL
3	Sedang	101-150 µg/mL
4	Lemah	151-200 µg/mL

3. Analisis Uji Sitotoksik Metode MTT *assay*

Analisis data menggunakan uji sitotoksik tunggal, data yang dianalisis merupakan nilai absorbansi yang didapatkan dari ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi dari setiap sumuran selanjutnya dikonversi dalam persen sel hidup yang dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Abs sel dengan perlakuan} - \text{abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol media sel} - \text{abs kontrol media}} \times 100\% \dots\dots \text{(Formula 2)}$$

Nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan regresi linear antara konsentrasi larutan uji dengan persen sel yang hidup. Nilai IC₅₀ yang digunakan sebagai parameter sitotoksik ini merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin toksik terhadap suatu sel.

Tabel 3. Klasifikasi Nilai IC₅₀ sebagai Sitotoksik (Weerapreeyakul, 2012)

No	Tingkat Kekuatan Sitotoksik	Nilai IC ₅₀
1	Cukup Toksik	101-500 µg/mL
2	Toksik	10-100 µg/mL
3	Sangat Toksik	< 10 µg/mL

4. Analisis *Molecular Docking*

Dari molekul yang diujikan kemudian dianalisis data nilai *pose* dan *docking score*. Kestabilan interaksi antara protein dengan senyawa uji mempengaruhi hasil suatu senyawa uji memberikan efek atau tidak. Semakin stabil ikatan interaksinya maka potensi senyawa uji untuk berefek juga semakin besar Suatu molekul dikatakan memiliki afinitas kestabilan yang baik jika memiliki *docking score* yang rendah yaitu nilai RMSD kurang dari 2 Å (Pratama, 2016).

5. Analisis Flowsitometri

Data flowsitometri dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase 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 yaitu fraksi n-heksan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan kontrol.