

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

##### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi merupakan sebuah metode yang digunakan untuk memastikan kebenaran sampel yang diuji sehingga kekeliruan dalam pengumpulan bahan baku dapat dihindari. Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Laboratorium Terpadu Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L*) didapatkan dari daerah Potorono, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel merupakan herba bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dan termasuk suku Asteraceae atau Compositaceae (Lampiran 1).

##### 2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen terlarut dari komponen tidak larut suatu campuran menggunakan pelarut tertentu. Sebanyak 1 kg serbuk simplisia herba bandotan (*Ageratum conyzoides L*) kering diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi selama 5 hari dengan perbandingan 1:10. Kemudian dilakukan remaserasi yaitu penambahan pelarut terhadap hasil penyaringan maserat pertama selama 2 hari. Hasil maserat dan remaserasi digabungkan sehingga didapatkan ekstrak cair sebanyak 18 L dan dilanjutkan fraksinasi menggunakan kloroform. Sebanyak 5 L ekstrak cair difraksinasi dengan metode partisi cair-

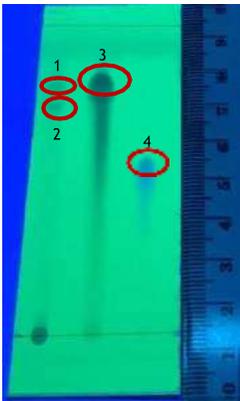
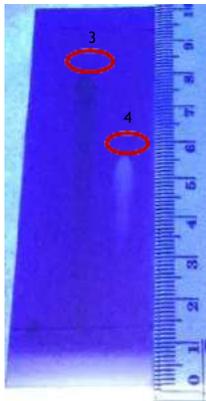
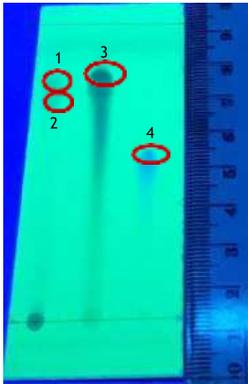
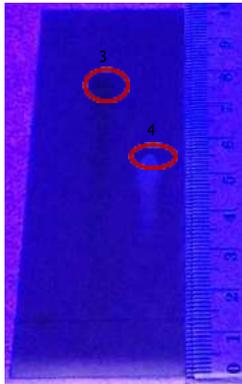
cair dengan perbandingan 1:1 dan menghasilkan 8,1 L Fraksi Kloroform Herba Bandotan (FKHB). Selanjutnya FKHB dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan didapatkan hasil FKB pekat sebanyak 2 L dan sisa pemisahan etanol. FKB kental didapatkan melalui proses pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 50° C dengan kecepatan putaran 90 rpm hingga menghasilkan ekstrak kental 17,4 gram dengan nilai rendemen 4,22 % (Lampiran 2).

### 3. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Identifikasi senyawa dalam sampel FKHB dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Tujuannya adalah untuk mengetahui kandungan flavonoid yang disinyalir memiliki potensi digunakan sebagai agen kemopreventif kanker. Fase diam yang digunakan berupa silica gel F<sub>254</sub>. Fase gerak merupakan campuran methanol dan kloroform dengan perbandingan 7:2 dengan menggunakan sampel pembanding yaitu rutin dan quinin.

Uji KLT dilakukan dengan cara menotolkan sampel fraksi kloroform herba bandotan pada plat silica gel yang telah dijenuhkan. Plat kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga terelusi sempurna. Setelah terelusi plat dikeluarkan dari *chamber* dan dilakukan pengamatan dibawah sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm. Pereaksi warna dilakukan menggunakan uap amoniak.

**Tabel 4.** Profil Kromatografi Lapis Tipis FKHB

| Perlakuan sebelum diuapi dengan NH <sub>3</sub>                                     |  |   |
|---|--|---|
| Visible   | Sinar UV 254 nm  | Sinar UV 366 nm   |
|    |    |    |
| Perlakuan setelah diuapi dengan NH <sub>3</sub>                                     |  |   |
| Visible   | Sinar UV 254 nm  | Sinar UV366 nm  |
|  |  |  |

Penotolan pertama (sampel FKHB) meninggalkan 2 bercak dengan nilai Rf masing-masing 0,75 dan 0,81 . Penotolan kedua berupa senyawa pembanding rutin (glikosida flavonoid) meninggalkan 1 bercak dengan nilai Rf 0,83.

**Tabel 5.** Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid

|      |      | Warna bercak              |                            |                           |                            |                           |                            |
|------|------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|      |      | Visible                   |                            | UV 254 nm                 |                            | UV 366 nm                 |                            |
| Spot | Rf   | Tanpa uap NH <sub>3</sub> | Dengan uap NH <sub>3</sub> | Tanpa uap NH <sub>3</sub> | Dengan uap NH <sub>3</sub> | Tanpa uap NH <sub>3</sub> | Dengan uap NH <sub>3</sub> |
| 1    | 0,75 | -                         | -                          | Ungu muda                 | Ungu muda                  | -                         | -                          |
| 2    | 0,81 | -                         | -                          | Ungu muda                 | Ungu muda                  | -                         | -                          |
| 3    | 0,83 | Kuning                    | Kuning tua                 | Ungu tua                  | Ungu tua                   | Ungu tua                  | Ungu tua                   |
| 4    | 0,53 | -                         | -                          | Ungu muda                 | Ungu muda                  | Putih                     | Putih                      |

Bercak keempat dilakukan penotolan senyawa pembanding quinin (alkaloid) yang meninggalkan 1 bercak dengan nilai Rf 0,53. Pengamatan warna bercak menggunakan sinar tampak menunjukkan warna kuning untuk senyawa pembanding rutin. Pengamatan sampel FKB dibawah sinar UV 254 nm menghasilkan warna ungu muda sedangkan dibawah UV 366 tidak menunjukkan warna bercak.

#### 4. Docking Molekuler

Uji pendahuluan dilakukan menggunakan uji *in silico* yaitu uji komputasi yang bertujuan untuk mengetahui energi ikatan antar reseptor dan ligan. Aplikasi yang digunakan pada uji ini diantaranya *Autodock Vina*. *Autodock Vina* merupakan sebuah aplikasi untuk molekul *docking* yang diperoleh secara gratis dengan mengunjungi laman <http://vina.scripps.edu/download.html>. *DS Visualizer* digunakan untuk preparasi protein target dan menampilkan struktur serta interaksi

antar ligan dan protein kemudian aplikasi *Open Babel* digunakan untuk mengkonversi file. Struktur target protein diambil dari protein data Bank (PDB) dengan mengklik [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) dengan PDB ID 5XV7 untuk VEGF, 5IKQ untuk protein COX-2 dan 1MV0 untuk c-Myc.

**Tabel 6.** Nilai Skor Docking

| Senyawa        | Protein | RMSD   | Skor  | Konformasi |
|----------------|---------|--------|-------|------------|
| Nobiletin      | VEGF    | 1.122  | -7.6  | 6          |
| Native Ligand  | VEGF    | 1.1935 | -10.7 | 2          |
| 5 Fluorouracil | VEGF    | 1.534  | -4.7  | 3          |
| Nobiletin      | COX-2   | 1.038  | -7.5  | 3          |
| Native Ligand  | COX-2   | 1.578  | -7.4  | 4          |
| 5 Fluorouracil | COX-2   | 1.927  | -5.2  | 6          |
| Nobiletin      | c-Myc   | 1.395  | -4.9  | 5          |

Interpretasi dilakukan dengan menggunakan skor docking. Skor docking adalah nilai yang digunakan untuk mengetahui kekuatan ligan dan reseptor dalam membentuk ikatan. Nilai yang relatif kecil menunjukkan bahwa ikatan protein dan ligan semakin kompleks, lebih stabil dan dapat dikatakan bahwa ligan semakin kuat. Setiap senyawa akan menghasilkan 9 konformasi dengan nilai RMSD yang berbeda sehingga konformasi dengan nilai  $RMSD < 2\text{\AA}$  dapat dipilih. RMSD merupakan nilai deviasi antara konformasi ligan dan

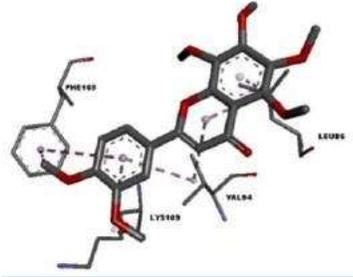
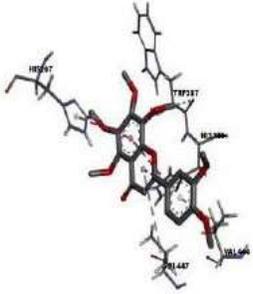
perbandingannya, yaitu, jika deviasi terlalu besar, semakin besar kesalahan prediksi ligan dan interaksi protein (Korb, et al., 2006).

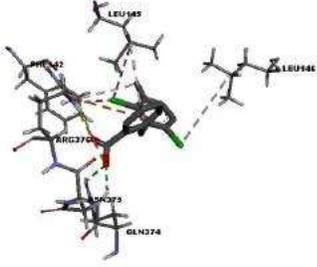
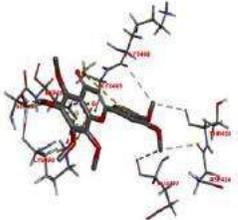
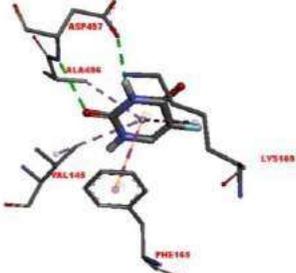
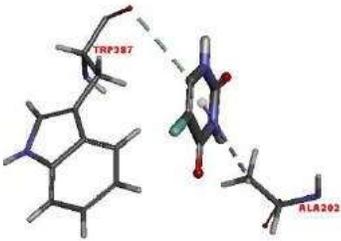
Senyawa nobiletin dan VEGF pada konformasi ke-6 memiliki nilai skor docking  $-7,6$  kcal/mol dengan nilai RMSD  $1,122 \text{ \AA}$ , ligan asli dan VEGF memiliki nilai RMSD  $1.1935$  dengan skor docking  $-10.7$  kcal/mol pada konformasi ke-2. Skor docking nobiletin terhadap senyawa obat pembanding 5-Fu menunjukkan hasil lebih rendah yaitu  $-4.7$  kcal/mol pada konformasi ke-3 dengan nilai RMSD sebesar  $1.534$ . Sedangkan untuk senyawa nobiletin terhadap protein COX-2 menunjukkan skor docking  $-7.5$  kcal/mol pada konformasi ke-3 dengan nilai RMSD  $1.038$ , dilanjutkan senyawa nobiletin terhadap protein c-Myc menunjukkan RMSD  $1.395$  dengan skor  $-4.9$  kcal/mol. Ligan asli terhadap COX-2 menunjukkan skor docking  $-7.4$  kcal/mol pada konformasi ke-4 dengan nilai RMSD  $1.578$ . 5-Fu sendiri hanya menunjukkan skor docking  $-5.2$  kcal/mol pada konformasi ke-6 dengan nilai RMSD  $1.927$ . Oleh karena itu, senyawa nobiletin memiliki skor docking paling rendah sehingga kestabilan ikatannya lebih baik.

Selanjutnya senyawa uji dapat diamati visualisasinya menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Pada prinsipnya, senyawa uji akan berinteraksi dengan residu asam amino protein VEGF dan COX-2 yang kemudian akan terjadi ikatan protein melalui sistem *lock and key*. Visualisasi interaksi senyawa uji terhadap protein VEGF dan COX-2 dapat dilihat pada table dibawah ini.

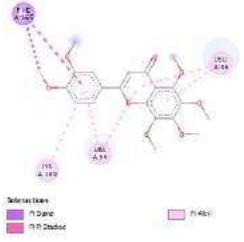
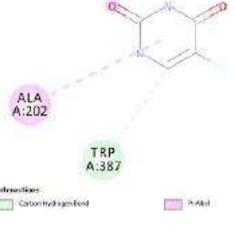
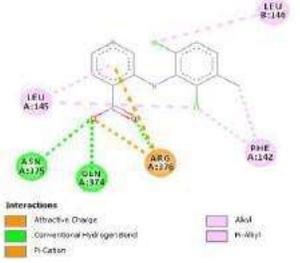
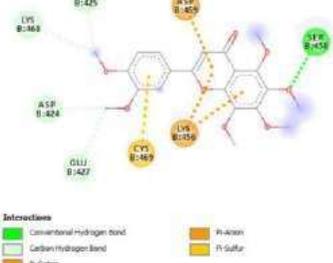
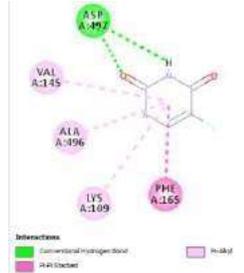
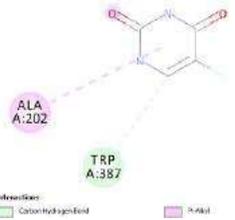
Senyawa uji berupa nobiletin dan 5-Fluorourasil akan berikatan dengan protein target pada *binding site* tertentu sehingga akan terjadi ikatan asam amino pada sekitar *binding site* tersebut. Dari hasil visualisasi tersebut, nobiletin berikatan dengan lebih banyak asam amino, yaitu 4 asam amino pada protein VEGF, 5 asam amino pada protein COX-2 dan 6 asam amino pada *native ligand* serta mengikat 8 asam amino sekaligus terhadap protein c-Myc. Berbeda halnya dengan 5-Fluorouracil sebagai pembanding, senyawa tersebut hanya mampu berikatan dengan 5 asam amino pada protein VEGF dan mengikat 2 asam amino pada protein COX-2.

**Tabel 7.** Visualisasi Protein Target

| Visualisasi 3D  | Asam Amino  |
|---|---|
|  | <p><i>Nobiletin ke VEGF</i></p> <p>Phenyl (PHE165), Lysin (LYS109),<br/>Valin (Val94), Leucyn (LEU86)</p>                     |
|  | <p><i>Nobiletin ke COX2</i></p> <p>Histidin (HIS297, HIS388), Alanin<br/>(AL447), Valin (VAL444), Tryptophan<br/>(TRP387)</p> |

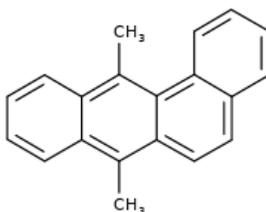
|   |   |
|---|---|
|    | <p><i>Nobiletin ke Native Ligand</i></p> <p>Phenil (PHE142), Leucyn (LEU145, LEU146), Arginin (ARG376), Glycin (GLN374), Asparagine (ASN375).</p>           |
|    | <p><i>Nobiletin ke c-Myc</i></p> <p>Serin (SER458), Asparagine (ASP424), Cystein (CYS469), Lysin (LYS456,LYS468). Glutamic (GLU427), Threonine (THR425)</p> |
|   | <p><i>5-FU ke VEGF</i></p> <p>Asparagine (ASP497), Alanin (ALA496), Lysin (LYS109), Valin (VAL145), Phenyl (PHE165).</p>                                    |
|  | <p><i>5-FU ke COX-2</i></p> <p>Tryptophan (TRP387), Alanin (ALA202).</p>  |

**Tabel 8.** Visualisasi 2D interaksi asam amino dengan protein target

| Visualisasi 2D interaksi asam amino   |  |
|---|--|
| <p><i>Nobiletin ke VEGF</i></p>            | <p><i>Nobiletin ke COX-2</i></p>  |
| <p><i>Nobiletin ke Native Ligand</i></p>  | <p><i>Nobiletin ke c-Myc</i></p>  |
| <p><i>5-FU ke VEGF</i></p>               | <p><i>5-FU ke COX-2</i></p>     |

## 5. Uji karsinogenesis

Uji karsinogenesis dilakukan sebagai upaya induksi kanker hepar terhadap tikus betina galur *Sprague dawley*. Sejumlah 20 ekor tikus berumur 40 hari diadaptasikan dalam kandang selama 7 hari hingga dikatakan layak untuk digunakan sebagai objek uji penelitian. Induksi kanker dilakukan dengan pemberian DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB selama 5 minggu. Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan melihat jumlah serta ukuran nodul yang terbentuk pada hepar tikus. Akan tetapi hingga pemberian minggu kelima, tidak ditemukan adanya tanda-tanda pertumbuhan nodul sehingga mulai dikorbankan pada minggu keenam.

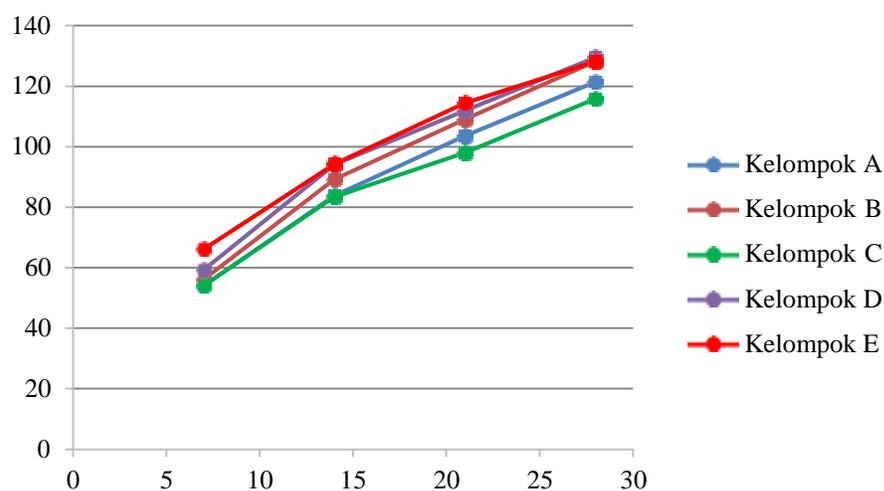


**Gambar 7.** Struktur DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene)

DMBA merupakan hidrokarbon polycyclic aromatik (PAHs) yang digunakan untuk menguji obat antikanker dalam percobaan laboratorium. Sebagai karsinogen yang kuat, DMBA dipengaruhi oleh strain mutasi genetik kerentanan, serta dosis agen karsinogen. DMBA bekerja dengan menginduksi mutasi genetic dan membuat *DNA adducts*. Senyawa flavonoid melindungi

genom dari karsinogen kimia. Kemampuan kemopreventif senyawa flavonoid ditandai dengan terhambatnya peradangan, pemulungan berbagai radikal bebas, adhesi, menekan proliferasi sel, siklus sel penangkapan, dan apoptosis (Huang et al., 2009).

Selama proses induksi karsinogenesis, berat badan tikus diukur melalui penimbangan berat badan secara berkala setiap minggunya. Penimbangan ini berfungsi untuk penyesuaian dosis pemberian agen DMBA, ekstrak FKHB maupun larutan CMC-Na. Perkembangan profil berat badan tikus disajikan pada grafik 1. Beberapa kondisi yang mempengaruhi kondisi psikologis serta fisiologis hewan uji selama pemejanaan antara lain suhu, kelembaban, aliran udara, kebersihan kandang serta faktor pencahayaan.

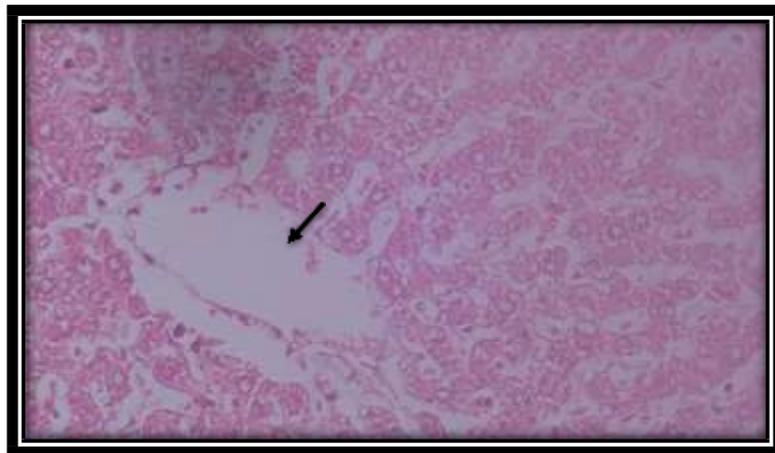


**Grafik 1.** Perkembangan Profil Berat Badan Tikus

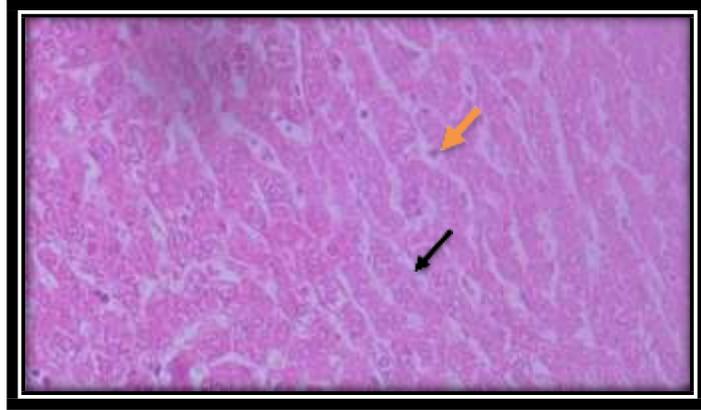
Berdasarkan profil perubahan berat badan tikus, kelima kelompok hewan uji tidak mengalami penurunan berat badan. Perkembangan berat badan tikus tidak mengalami penurunan akibat perlakuan yang berbeda-beda pada setiap kelompoknya. Sehingga dapat dikatakan bahwa seluruh hewan uji dalam keadaan stabil selama uji karsinogenesis.

#### 6. Pengamatan histologi dengan metode *Haematoxylin-Eosin*

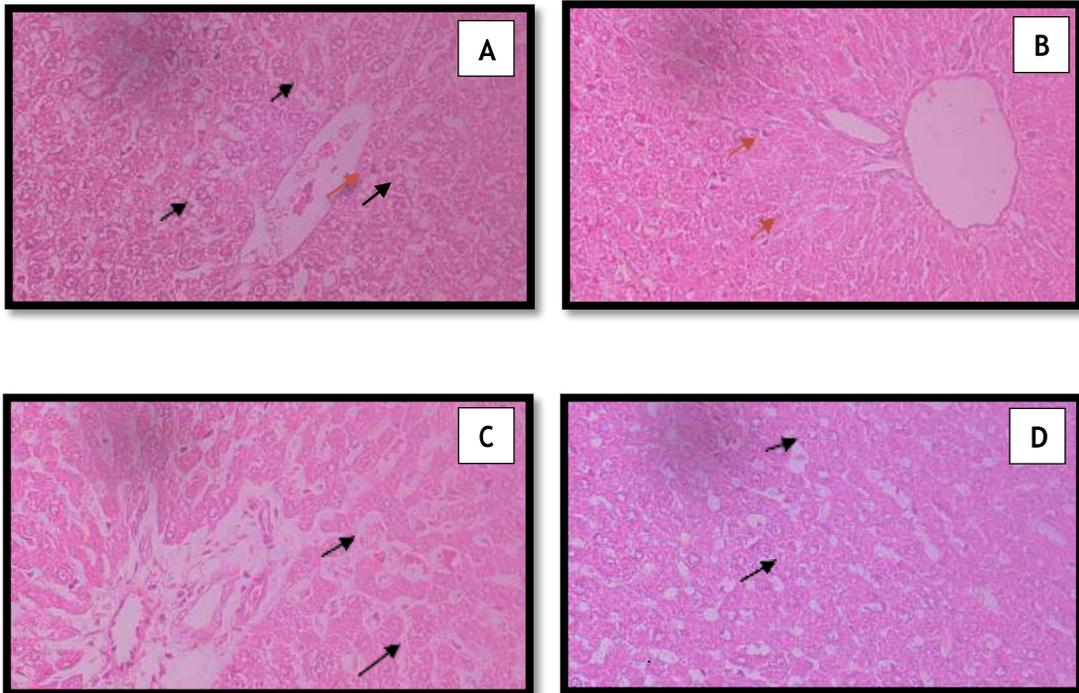
Pengamatan Histopatologi dilakukan secara mikroskopis dengan perangkat lunak *Toupview*® untuk mengamati pengaruh dari pemberian ekstrak fraksi kloroform herba bandotan terhadap tikus galur *Sprague dawley* tikus terinduksi DMBA. Metode pewarnaan *haematoxylin* dan *eosin* secara luas digunakan dalam pewarnaan histologi. Pengamatan dilakukan dengan deskripsi kualitatif untuk mengetahui informasi tentang kerusakan dan perbaikan sel.

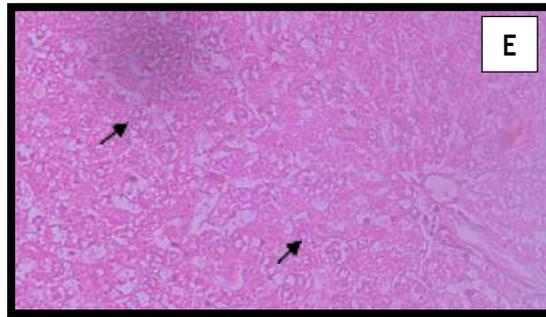


**Gambar 8.** Gambaran hepatosit sel fungsional hepar tikus galur *Sprague dawley* dengan pengecatan HE perbesaran 40x, Vena Sentralis (→)



**Gambar 9.** Gambaran histologi jaringan hepar tikus galur *Sprague dawley* dengan pengecatan HE perbesaran 40x, sinusoid (→) lebih besar dibanding kapiler dan bentuk tidak beraturan, sel endotelium (→)





**Gambar 10.** Hasil pengamatan uji HE sel normal (→), rusak (→)

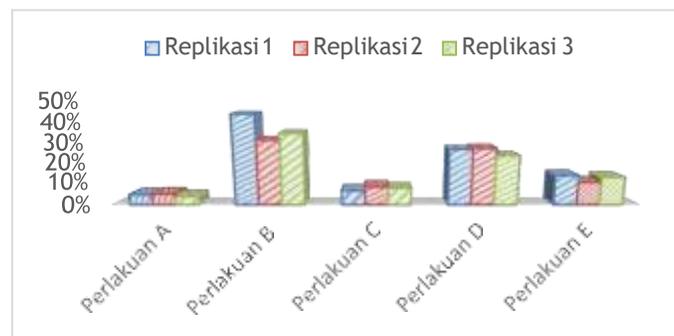
(a) Kontrol pelarut CMC-na 0,5% (b) Induksi DMBA 20 mg/kgBB (c) Kontrol ekstrak 1500 mg/kgBB (d) Ekstrak dosis 750 mg/kgBB terhadap tikus SD terinduksi DMBA (e) Ekstrak dosis 1500 mg/kgBB terhadap tikus SD terinduksi DMBA.

Pengamatan dilakukan dengan mengamati 100 sel dengan perbesaran 40x sehingga dapat dibedakan antara sel rusak dan sel normal. Berdasarkan sampel diatas dapat dilihat susunan sel hepatosit jaringan hepar. Secara umum jaringan hepar terdiri Capsula Glisson dan Lobulus Hepar. Lobulus terdiri dari sel hepatosit dan sinusoidal. Lobulus merupakan prisma berbentuk segi enam dan dibentuk oleh sel hepar disertai dengan sinusoid. Pusat lobulus adalah vena sentralis sementara sudut lobulous adalah trigonum kiernann. Biasanya, sel hepatosit berbentuk cuboid serta memiliki inti sel bulat sentral. Batas sel hepatosit adalah kanalikuli, berbatasan dengan ruang sinusoidal dan juga sel hepatosit lainnya.

Sampel A dan C tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Keduanya menerima kontrol pelarut dan kontrol ekstrak. Ekstrak bandotan memiliki aktivitas kemopreventif yang baik, sehingga terlihat perbaikan dalam struktur sel hepatosit dilihat dari bentuk sel, gambar sinusoid dan juga vena sentralis. Sampel B mendapatkan induksi DMBA 20 mg/kgBB terlihat perbedaan dalam hepatosit struktur sel. Sel hepatosit mengalami perubahan (inflamasi) yang dapat digambarkan oleh batas antara sel, struktur sitoplasma dan ketidakteraturan bentuk sel. Sinusoid tidak terlihat begitu jelas seperti dalam sampel lainnya. Sel hati memiliki hiperproliferasi yang mengarah ke karsinogenesis moderat. Perbaikan histologi dapat ditemukan pada sampel D dan E Perbedaan dosis kedua menunjukkan peningkatan dosis administrasi dari 750 mg/kgBB menjadi 1500 mg/kgBB. Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak menurunkan atau dapat memperbaiki histologi sel hepar sehingga ekstrak dapat dimanfaatkan sebagai agen kemopreventif. Kuantifikasi dilakukan dengan metode *scoring* yang dapat mewakili keadaan setiap kelompok untuk membandingkan kelompok perlakuan.

**Tabel 9.** Hasil pengamatan jumlah sel rusak dan sel normal pengamatan HE

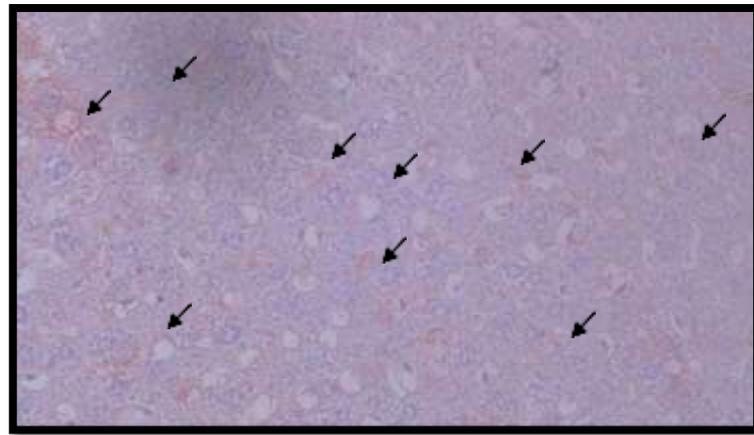
| Kelompok    | Sel Rusak      |                |                | Presentase Kerusakan sel |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|
|             | Replikasi 1    | Replikasi 2    | Replikasi 3    |                          |
| Perlakuan A | 3 dari 60 sel  | 3 dari 56 sel  | 2 dari 50 sel  | 6 %                      |
| Perlakuan B | 25 dari 68 sel | 21 dari 65 sel | 27 dari 76 sel | 46.1 %                   |
| Perlakuan C | 3 dari 43 sel  | 5 dari 55 sel  | 3 dari 36 sel  | 8.2 %                    |
| Perlakuan D | 18 dari 65 sel | 13 dari 46 sel | 17 dari 69 sel | 26 %                     |
| Perlakuan E | 10 dari 68 sel | 7 dari 62 sel  | 9 dari 65 sel  | 13.2 %                   |

**Grafik 2.** Perbandingan jumlah sel normal dan sel rusak pengamatan HE

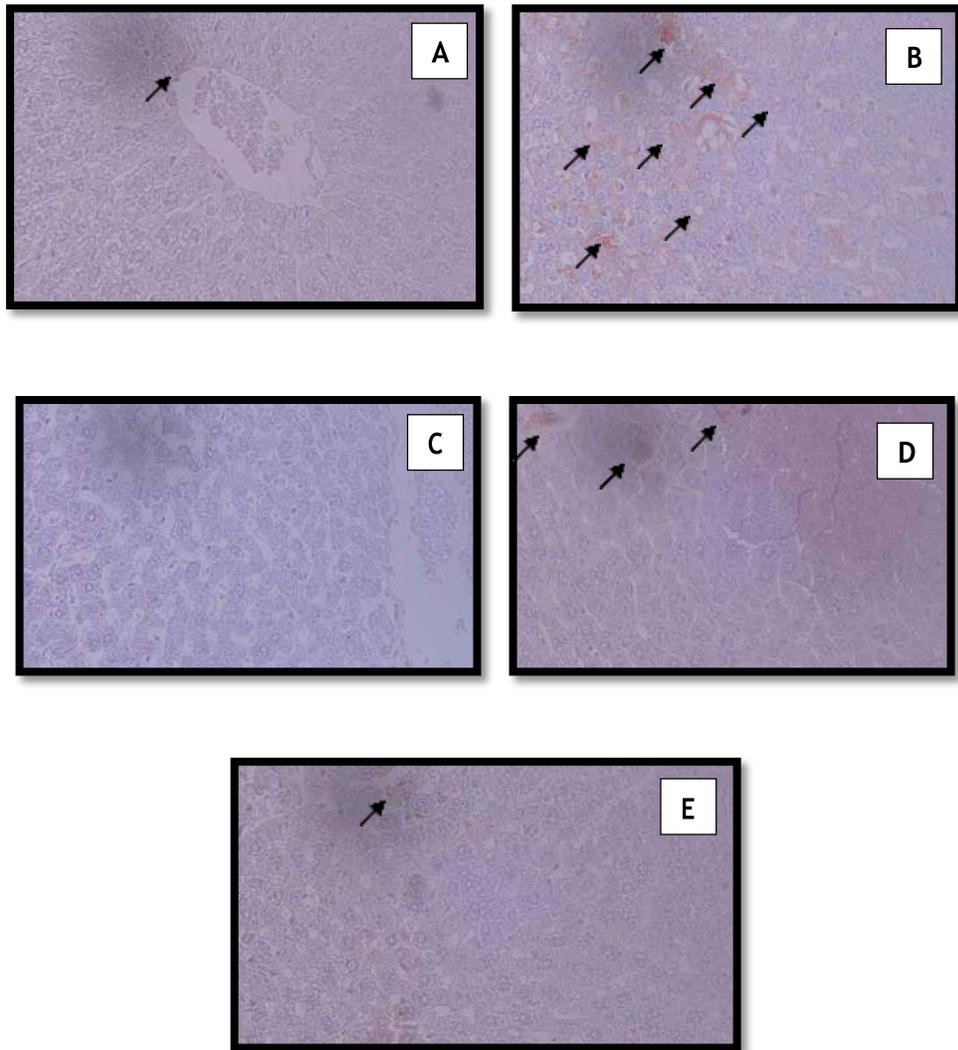
## 7. Pengamatan histologi dengan metode *Imunohistochemistry*

Pada pengamatan HE didasarkan pada sifat basofilik dan lipofilik, sehingga pada pengamatan HE akan mewarnai seluruh preparat histologi. Pada pengamatan IHC, antibodi hanya spesifik melekat pada VEGF sehingga hasil pengamatan akan terlihat lebih spesifik pada ekspresi protein tersebut

dengan kata lain imunohistokimia dapat digunakan sebagai sarana untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam sel. Induksi karsinogenesis (sampel b) pada histologi hepar dinilai kurang signifikan. Sifat imunoreaktif dapat dilihat dengan hasil pewarnaan berwarna coklat (menunjukkan adanya ekspresi VEGF. Berdasarkan pengamatan kualitatif preparat, semakin banyak spot berwarna coklat menunjukkan bahwa kondisi sel semakin rusak. Kerusakan sel dapat ditemukan pada sampel b, d dan e dimana ketiganya telah diinduksi menggunakan DMBA 20 mg/kgBB. Perbaikan jaringan hepar menunjukkan hasil lebih baik pada sampel e yaitu dengan pemberian ekstrak dosis 1500 mg/kgBB.



**Gambar 11.** Ekspresi protein VEGF pada pewarnaan IHC (→)



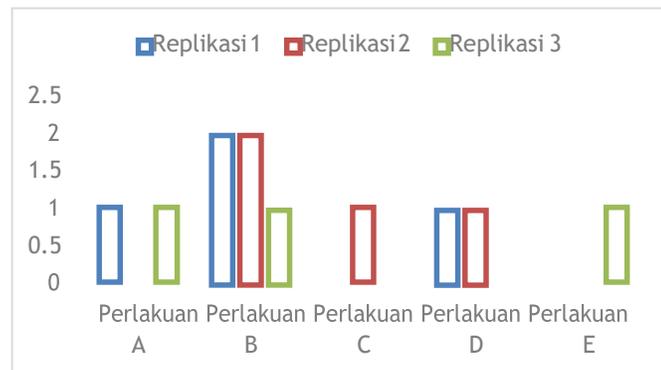
**Gambar 12.** (a) Pemberian kontrol pelarut CMC-na 0,5% (b) Induksi DMBA 20 mg/kgBB (c) Kontrol ekstrak dosis 1500 mg/kgBB (d) Ekstrak dosis 750 mg/kgBB terhadap tikus SD terinduksi DMBA (e) Ekstrak dosis 1500 mg/kgBB terhadap tikus SD terinduksi DMBA

**Tabel 10.** *Scoring* dan klasifikasi terhadap pengecatan IHC (Dobson, 2010)

| Pola pengecatan IHC                                       | Skor IHC | Klasifikasi |
|---|----------|-------------|
| Tidak ada pewarnaan membran hasil pengecatan IHC          | 0        | Negatif     |
| Pewarnaan membrane tidak lengkap (<10%) dan lemah         | 1+       | Negatif     |
| Pewarnaan membrane lengkap tapi tidak seragam (10% - 30%) | 2+       | Equivocal   |
| Pewarnaan intensitas membrane seragam dengan nilai >30%   | 3+       | Positif     |

**Tabel 11.** *Scoring* VEGF pada pewarnaan IHC

| Kelompok    | <i>Score</i> IHC |             |             |
|-------------|------------------|-------------|-------------|
|             | Replikasi 1      | Replikasi 2 | Replikasi 3 |
| Perlakuan A | 1+               | 0           | 1+          |
| Perlakuan B | 2+               | 2+          | 1+          |
| Perlakuan C | 0                | 1+          | 0           |
| Perlakuan D | 0                | 1+          | 1+          |
| Perlakuan E | 0                | 0           | 1+          |

**Tabel 12.** Hasil *scoring* VEGF pada pewarnaan IHC

## B. Pembahasan

### 1. Determinasi Tanaman

Herba bandotan termasuk tumbuhan famili Asteraceae yang merupakan kingdom Plantae. Famili Asteraceae mendominasi sistem vegetasi tumbuhan dan jumlahnya tersebar luas di berbagai penjuru dunia (Bish dan Purohit, 2010). Tanaman famili Asteraceae dilaporkan dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional karena mengandung komponen bioaktif. Beberapa contoh senyawa bioaktif yang dapat ditemukan antara lain saponin, flavonoid, seskuiterpen, alkaloid, tanin dan sterol (Wegiera *et al.*, 2012).

Preparasi ekstrak dimulai dengan sortasi herba bandotan dan pengrajanan untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dapat dilakukan dengan bantuan sinar matahari atau alat pengering. Hal tersebut memiliki tujuan untuk mengurangi kadar air serta menghentikan proses enzimatik, dengan demikian mutu dan ketahanan simpan simplisia akan lebih baik. Pada proses pengeringan

diharapkan kadar air mencapai angka  $< 10\%$ . Proses pengeringan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya, suhu pengeringan, waktu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara serta luas permukaan wadah (Prasetyo dan Entang, 2013).

## 2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 1 kg simplisia yang sudah dipreparasi kemudian dilakukan maserasi dan remaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Etanol merupakan salah satu pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi. Ekstraksi dapat dipengaruhi jenis pelarut, konsentrasi pelarut, suhu ekstraksi serta metode ekstraksi yang digunakan. Jenis pelarut pada proses ekstraksi dapat mempengaruhi nilai rendemen dikarenakan perbedaan kepolaran yang akan mempengaruhi banyaknya zat terlarut (Senja *et al.*, 2014).

Berdasarkan (Suhendra *et al.*, 2019) perbandingan konsentrasi pelarut etanol (40%: 50%: 60%; 70%; 80%; 90%) terhadap penyarian ekstrak rimpang ilalang secara maserasi dengan bantuan gelombang ultrasonik didapatkan hasil bahwa pelarut etanol menghasilkan nilai rendemen tertinggi 14,13% pada konsentrasi pelarut etanol 70% dengan total kandungan flavonoid 90,91 (mg QE/g ekstrak). Hal ini sesuai dengan prinsip dasar ekstraksi yaitu *like dissolve like* yang bermakna kelarutan suatu senyawa didasari oleh kesamaan polaritas pelarut dengan senyawa yang diekstrak (Harborne, 1973). Sehubungan dengan kandungan flavonoid pada tiap miligram ekstrak, pelarut etanol konsentrasi

tinggi tidak efektif karena berat molekul flavonoid yang rendah (Chew *et al.*, 2011).

Ekstraksi herba bandotan dilakukan dengan metode maserasi yaitu ekstraksi melalui pengadukan secara berkala pada suhu kamar. Metode ini dipilih karena lebih murah dan mudah dilakukan, tanpa perlu bantuan alat khusus maupun keahlian khusus. Maserasi mulai dengan melakukan perendaman simplisia selama 5 hari. Mekanisme ekstraksi dapat digambarkan dengan pemecahan dinding sel akibat perbedaan tekanan baik di dalam maupun di luar sel sehingga metabolit sekunder di dalam sitoplasma akan terlarut. Keefektifan metode maserasi juga dipengaruhi oleh lamanya perendaman dan pengocokan yang mempengaruhi kontak antara sampel dan pelarut (Koirewa, 2008).

Untuk mendapatkan kandungan senyawa flavonoid yang lebih optimal, dilakukan proses fraksinasi cair-cair menggunakan kloroform. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dan nonpolar. Pada saat proses fraksinasi berlangsung, didapatkan 2 fase didalam corong pisah yaitu fase atas (fraksi etanol 70%) dan fase bawah (fraksi kloroform) dikarenakan oleh perbedaan massa jenis kedua pelarut. Menurut (Komalasari, 2017), perbedaan nilai rendemen yang diperoleh pada fraksi etanol dan fraksi kloroform memiliki perbedaan yang bermakna yaitu sebesar 16,33 % dan 3,7%. Hal ini dibuktikan dengan teori bahwa herba bandotan memiliki lebih banyak senyawa polar, sehingga akan lebih banyak terlarut bersama pelarut etanol dengan *Polarity index* 4,3 (Okunade, 2012). Senyawa gugus polimetoksiflavon seperti isoflavon,

eupalestin dan nobiletin termasuk dalam flavonoid herba bandotan dengan kepolaran rendah (Chauhan dan Rijhwani, 2015).

### 3. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan sebuah metode pemisahan campuran senyawa berdasarkan perbedaan distribusi komponen diantara fase diam dan fase gerak. Kedua hal tersebut akan menyebabkan perbedaan migrasi akibat perbedaan afinitas yang ditentukan oleh sifat fisika kimia suatu senyawa. Menurut Wulandari (2011) metode pemisahan ditentukan oleh jenis fase diam yang digunakan. Metode pemisahan ini terbagi menjadi pemisahan berdasarkan polaritas, muatan ion, ukuran molekul dan bentukan spesifik.

Pada metode KLT, pemilihan eluen menjadi hal yang sangat krusial. Eluen memiliki peran untuk membawa komponen (ekstrak FKHB) yang akan dipisahkan melalui sorben fase diam sehingga dapat tercipta bercak noda dan selanjutnya dapat dihitung nilai Rf untuk setiap bercak. Pemilihan eluen (tabel 13) dapat didasarkan pada nilai K (kecepatan migrasi pelarut melewati lempeng silica gel) dan nilai log P (polaritas pelarut).

**Tabel 13.** Nilai K dan Log P

| Pelarut   | K (mm <sup>2</sup> /s) | Log P |
|-----------|------------------------|-------|
| n-heptana | 11,4                   | 3,42  |
| n-heksana | 14,6                   | 3,0   |
| n-pentana | 13,9                   | 2,58  |

|                       |                                     |       |
|-----------------------|-------------------------------------|-------|
| Sikloheksan           | 6,7                                 | 2,5   |
| Toluene               | 11,0                                | 2,52  |
| Kloroform             | 11,6                                | 1,67  |
| Diklormetan           | 13,2                                | 1,01  |
| Diisopropil eter      | 13,2                                | 1,4   |
| Tert-butanol          | 1,1                                 | 0,6   |
| Dietil eter           | 15,3                                | 0,76  |
| Isobutanol            | 1,6                                 | 0,95  |
| Asetonitril           | 15,4                                | 0,17  |
| Isobutil metil keton  | 9,1                                 | 1,6   |
| 2-propanol            | 2,5                                 | 0,38  |
| Etil asetat           | 12,1                                | 0,29  |
| 1-propanol            | 2,9                                 | 0,55  |
| Etilmetil keton       | 13,9                                | 2,34  |
| Aseton                | 16,2                                | 0,2   |
| Etanol                | 4,2                                 | 0,07  |
| 1,4 dioksan           | 6,5                                 | -0,31 |
| Tetrahidrofuran       | 12,6                                | 0,4   |
| Metanol               | 7,1                                 | -0,27 |
| Piridin               | 8,0                                 | 0,7   |
| Sorben                | Lempeng KLT silica gel 60 F254      |       |
| Tipe chamber          | (Merck) Chamber N dengan penjenuhan |       |
| Temperatur kamar      | 22° C                               |       |
| Jarak migrasi pelarut | 100mm                               |       |

*Sumber:* Wulandari, 2011

Fase gerak yang digunakan adalah kloroform: methanol (7:2 v/v) dengan fase diam silika gel 60 F254. Kloroform dan metanol sudah banyak digunakan sebagai fase gerak seperti halnya oleh (Dewi *et al.*, 2018) yang menggunakan kloroform:methanol:air (65:25:4 v/v). Keduanya akan menghasilkan larutan bersifat non polar (lampiran 3-4). Pemilihan fase diam juga berhubungan dengan polaritas sampel, kelarutan, berat molekul, kemampuan mengion serta ukuran analit. Sebanyak 64% peneliti menggunakan sorben silika gel dan diikuti oleh selulosa 9% serta alumina 3%. Silika gel umumnya bervariasi sesuai ukuran pori (40, 60, 80, 100 Å) dan dinyatakan bahwa silika gel 60 telah direkomendasikan untuk berbagai pemisahan baik industri maupun penelitian. Alasan lain penggunaan silika gel adalah bersifat universal yaitu dapat digunakan untuk pemisahan semua jenis senyawa (tabel 14).

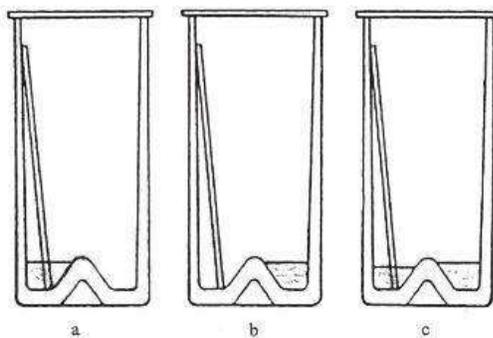
Menurut Kowalska (2003) pada pemisahan KLT senyawa fenolik dan flavonoid selain silika gel, fase diam selulosa dan poliamid dapat karena selektivitasnya Kedua fase diam tersebut sudah digunakan selama beberapa dekade, namun pada pemisahan secara KCKT silika gel terbukti memberikan hasil yang lebih baik pada kebanyakan penelitian. Pemilihan fase diam dan fase gerak diharapkan dapat menghasilkan noda terbaik (tanpa ekor dan simetris). Apabila noda yang dihasilkan belum baik, dapat dilakukan penambahan asam maupun basa untuk merubah nilai pH.

**Tabel 14.** Sorbent berdasarkan kemampuan pemisahan (Wulandari, 2011)

| Sorbent  | Senyawa yang dapat dipisahkan   |
|--|---|
| Silika gel                                       | <i>Semua kelas senyawa</i>  |
| Aluminium oksida                                 | Dasar senyawa (alkaloid, amina dan lain-lain), Steroid, terpen, hidrokarbon aromatic dan alifatik   |
| Selulosa   | Asam-asam amino dan turunannya, makanan pewarna (asam dan dasar), karbohidrat   |
| Kieselguhr                                       | Karbohidrat, aflatoksin, herbisida, tertrasiklin  |
| Poliamid   | Fenol, flavonoid, senyawa nitro   |
| Amino-terikat silica gel                         | Sangat baik untuk karbohidrat, nukleotida, nukleosida   |
| Diol-terikat silica gel                          | Cocok untuk steroid dan hormon  |
| Fase terbalik (RP 2, RP 8, RP 18) silica gel     | Meningkatkan pemisahan untuk banyak kelas senyawa seperti steroid, hormone, tetrasiklin, ftalat, antioksidan, lipid, barbiturate, capsaicin, aminofenol, asam lemak |
| Silika gel-Kiral                                 | Enantiomer asam amino, halogenasi, N-alkil dan metil-amino-asam, peptide sederhana, asam-hidroksikarboksilat (katekolamin)  |
| Silika gel diimpregnasi dengan perak nitrat      | Lipid termasuk variasi jenuh dan isomer <i>geometric</i>  |
| Silika gel diimpregnasi dengan Kafein            | Selektif untuk hidrokarbon poliaromatik   |
| Silika gel diimpregnasi dengan asam borat fosfat | Selektif untuk karbohidrat  |

*Sumber:* Wulandari, 2011

Wadah/ *chamber* digunakan untuk proses penjenuhan KLT. Wadah yang digunakan harus bersih, bebas pengotor serta kering. Beberapa proses yang terjadi di dalam *chamber* diantaranya kejenuhan uap pelarut serta daya adsorpsi uap pelarut oleh fase diam. *Chamber twin trough* (gambar 13) digunakan karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya dapat mengontrol kondisi pengembangan (proses penjenuhan) serta kelembaban.

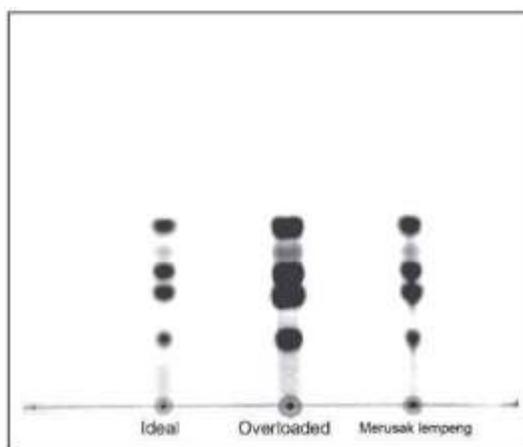


**Gambar 13.** *Chamber twin trough* (a) pengembangan dengan volume 20 ml (b) penjenuhan lempeng dengan uap eluen (c) penjenuhan lempeng dengan larutan pengkondisi (Wulandari, 2011)

Data KLT dapat diinterpretasikan melalui bercak noda, nilai  $R_f$  dan juga warna bercak. Untuk menghasilkan bercak yang baik (tanpa *tailing*) penotolan harus dilakukan secara hati-hati. Pada penelitian ini, penotolan dilakukan secara manual dengan volume penotolan paling sedikit 0,5  $\mu\text{l}$ . Pemisahan yang baik dapat dihasilkan dengan melakukan penotolan sampel sedikit mungkin

dan sesempit mungkin untuk menghindari *overloaded* (gambar 14). Penotolan secara manual umumnya menggunakan bantuan mikro kapiler (*microcaps*).

Pada tabel hasil KLT (tabel 15 dan 16) penotolan dilakukan sebanyak 3 kali. Penotolan pertama merupakan FKHB dengan bercak nomor 1 dan 2, penotolan kedua (senyawa pembanding rutin) menghasilkan bercak nomor 3 dan penotolan ketiga (senyawa pembanding quinine) menghasilkan bercak nomor 4. Pengamatan dibawah sinar tampak (*visible*) menunjukkan warna kuning pada bercak nomor 3. Menurut teori (YI Kostyukovskii *et al.*, 1984). pengamatan dibawah sinar tampak akan sulit dilakukan karena bercak yang dihasilkan tidak berwarna hingga berwarna kuning. Oleh karena itu diperlukan pengamatan dengan indikator fluoresensi dan juga penguapan atau penyemprotan dengan reagen tertentu.



**Gambar 14.** Penotolan terhadap visualisasi bercak KLT (Wulandari, 2011)

Pengamatan dibawah sinar UV 254 menunjukkan warna ungu muda pada bercak nomor 1, 2, 4 dan warna ungu tua pada bercak nomor 4. Pengamatan dengan sinar UV 366 menunjukkan fluoresensi ungu tua pada bercak nomor 3 dan putih pada bercak nomor 4.

Penguapan dengan uap ammonia dilakukan untuk meningkatkan kontras pemisahan bercak dengan lempeng KLT. Penguapan dilakukan cukup dengan meletakkan lempeng diatas wadah berisi ammonia pekat. Untuk hasil yang lebih baik, disarankan melakukan penguapan didalam *chamber twin trough* dengan meletakkan ammonia pekat pada salah satu sisi, dan meletakkan lempeng KLT pada sisi lainnya (Wulandari, 2011). Pengamatan setelah penguapan dengan  $\text{NH}_3$  menunjukkan perbedaan kontraktivitas dengan perubahan warna kuning menjadi kuning tua pada bercak nomor 3. Pada fluoresensi senyawa flavonoid dengan penguapan  $\text{NH}_3$  akan terjadi perubahan warna (Ulubelen, 1980). Berdasarkan penghitungan nilai  $R_f$ , spot 1 dan 2 masing masing 0,75 dan 0,83 diduga fraksi kloroform Herba Bandotan mengandung senyawa flavonoid dengan jenis aglikon nonpolar (Markham, 1982). Hal tersebut sesuai dengan kombinasi fase gerak dan fase diam yang digunakan serta kemampuan identifikasi jenis-jenis flavonoid dengan metode kromatografi lapis tipis (lampiran 5-6). Flavonoid aglikon merupakan flavonoid tanpa gula terikat yang mengandung 15 atom karbon. Flavonoid

aglikon dapat dibagi lagi menjadi sub kelas lain diantaranya flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavanon, leukoantosianin, auron, kalkon dan dihidroflavonol. Bercak berwarna ungu yang terlihat pada pengamatan visual KLT diperkirakan sebagai flavon dan flavonol tersulih pada -3-O mempunyai 5-OH tanpa 4"-OH bebas dan isoflavon. Salah satu senyawa teridentifikasi berupa flavon termetoksilasi yang didalamnya mengandung senyawa nobiletin dan turunannya (Markham, 1988).

Menurut Cetkovic, et al., (2003), warna kuning dan ungu pada sinar UV menunjukkan kandungan quersetin dan flavonoid glikosida. Glikosida flavonoid merupakan flavonoid yang sering dijumpai pada tumbuhan. Senyawa ini berikatan dengan gula. Rutin (senyawa pembanding) merupakan salah satu contoh glikosida flavonoid. Sehingga pada bercak nomor 3 pada pengamatan sinar tampak menghasilkan warna kuning yang menunjukkan bahwa bercak merupakan senyawa glikosida flavonoid (Trease, 1978). Sedangkan bercak nomor 4 merupakan quinine (senyawa alkaloid). Selanjutnya untuk proses kuantifikasi dapat dilanjutkan dengan uji KLT-densitometri dan KCKT.

### 3. Molecular Docking

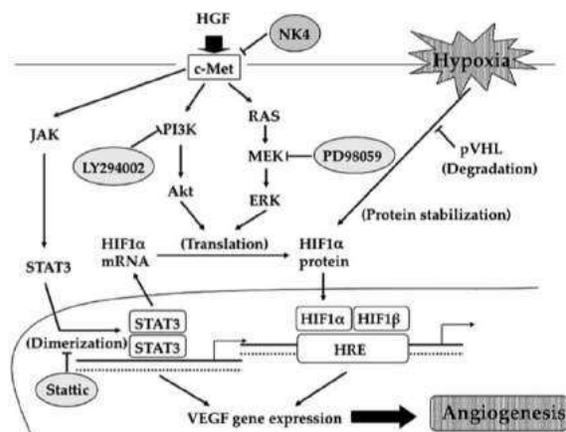
Patogenesis kanker hepar secara kompleks berhubungan dengan adanya aktivasi tumor supresor gen dan aktivasi onkoogen. Perkembangan kanker hepar dimulai dengan pembentukan pembuluh darah baru yang biasa disebut dengan angiogenesis. Angiogenesis digambarkan dengan proses suplai oksigen

serta nutrient lainnya kepada jaringan tumor, hal ini merupakan titik krusial dalam hepatokarsinogenesis, progresi serta metastasis kanker hepar (Semela, 2012). VEGF memegang peranan penting pada proses perkembangan pembuluh darah baru secara invasi dan metastasis (Xiang *et al.*, 2011). Prognosis VEGF dalam sel-sel endotel kanker hepar cenderung buruk (Zhang, 2012; Liu, 2011). Nobiletin merupakan polimetoksi flavonoid yang diisolasi dari alam dan memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan kanker. Aktivitas antikanker senyawa nobiletin pada kasus kanker ovarium melalui mekanisme antiangiogenesis dan antiapoptosis. Antiangiogenesis oleh senyawa nobiletin dikorelasikan dengan pengurangan level Akt, HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B dan VEGF pada kasus kanker ovarium (Chen *et al.*, 2015).

Hasil validasi dengan *Autodock Vina* menunjukkan bahwa protocol *docking* nobiletin, 5-Fluorourasil dan ligan asli dapat diterima. Validasi dinyatakan dapat diterima dengan persyaratan nilai RMSD <2 Å. RMSD merupakan nilai penyimpangan konformasi ligan dengan pembandingnya, yaitu semakin besar nilai RMSD maka semakin besar pula interaksi ligan dengan protein (Korb, *et al.*, 2006). Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa nobiletin (-7.6 kcal/mol dan -7,5 kcal/mol) lebih tinggi daripada pembanding yang digunakan (-4.7 kcal/mol dan -5.2 kcal/mol) terhadap protein VEGF dan COX-2. Sedangkan skor *docking* ligan asli terhadap VEGF (-10.7 kcal/mol) dan ligan asli terhadap COX-2 (-7.4 kcal/mol) menunjukkan bahwa ikatan keduanya lebih baik daripada pembandingnya. Pemaparan diatas bermakna

bahwa energy yang dibutuhkan untuk berinteraksi dengan VEGF dan COX-2 lebih besar sehingga menghasilkan ikatan yang kurang stabil.

Peran VEGF dalam angiogenesis distimulasi oleh hipoksia, onkogen (*ras*) dan inaktivasi tumor supresor gen (P53) dan oleh berbagai sitokin. Pada kondisi hipoksia, VEGF akan mengalami overekspresi yang dihubungkan dengan progresivitas tumor termasuk karsinoma kolorektal, karsinoma pancreas, kanker payudara, kanker paru, melanoma, karsinoma hepar serta kanker ovarium (Rosen, 2002). Angiogenesis dimulai dengan dilepaskannya enzim protease dari sel endotel teraktivasi (inisiasi), pembentukan pembuluh darah vascular serta migrasi dan proliferasi sel endotel untuk memenuhi kebutuhan jaringan (Plank, 2004).



**Gambar 15.** Pengaturan interaksi HGF terhadap jalur JAK/STAT3, PI3k/Akt dan MAPK (Matsumura, 2013)

*Hepatocyte growth factor* (HGF) berperan sebagai inductor angiogenesis pada tumor yang merupakan ligan alami c-Met protoonkogen sebagai produk

tirosin kinase. Sinyal c-Met akan mengaktivasi jalur phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ Akt, *mitogen – activated protein kinase* (MAPK) dan *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT 3). Jalur PI3K/ Akt dan MAPK mengatur ekspresi VEGF melalui translasi HIF -  $1\alpha$ . Sedangkan STAT3 berperan dalam aktivasi transkripsi secara langsung (Matsumura, 2013). Pada interpretasi data *molecular docking*, senyawa flavonoid (nobiletin) dapat berinteraksi baik dengan protein VEGF. Hal ini menandakan bahwa nobiletin dapat dikembangkan sebagai antiangiogenesis melalui penghambatan PI3 kinase sehingga proses translasi dapat dihambat (Chen, 2008). Nobiletin dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan modulasi aktivitas diferensiasi sel (Kunimasa, 2009; Saito, 2007) dan menghambat fosforilasi dari MEK (Miyata, et al., 2008).

Terdapat 2 jenis ikatan asam amino yang terbentuk pada penambatan senyawa nobiletin terhadap protein VEGF yaitu ikatan *phi sigma* dan ikatan *phi alkil*. Menurut Patrick (2001), ikatan kovalen bersifar *irreversible* sehingga berkontribusi besar dalam penurunan energy afinitas. Pada tabel pengamatan residu ionic (tabel 8) terjadi kecenderungan terbentuknya ikatan kovalen. Asam amino polar membentuk ikatan hidrogen, sedangkan asam amino hidrofobik dan aromatic akan membentuk ikatan *Van Der Waals* (Schneider, et al., 2008). Dalam ilmu kimia, ikatan sigma termasuk dalam ikatan kovalen terkuat. Nilai skor *docking* berlawanan dengan nilai energy afinitas, semakin negative skor *docking* maka afinitas semakin tinggi. Berdasarkan keterangan tersebut, maka

senyawa nobiletin memiliki potensi yang lebih baik terhadap protein VEGF akibat jenis ikatan yang terbentuk sangat kuat sehingga hanya memerlukan sedikit energy untuk mempertahankan keadaan stabil (skor *docking* semakin negative/ semakin kecil).

#### 4. Uji Karsinogenesis

Uji karsinogenesis kanker hepar memerlukan 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) untuk dijadikan hewan percobaan. Tikus memiliki peran penting diantaranya untuk penelitian biomedis serta studi kanker dan toksikologi (Sengupta, 2012). Morfologi tikus yaitu kepala kecil, memiliki ekor yang lebih panjang dibandingkan tubuhnya serta pertumbuhan cepat. Tikus putih dapat dikategorikan menjadi beberapa strain seperti tikus *Wistar* dan *Sprague dawley* (Ridwan, 2013). Pada penelitian ini digunakan tikus galur *Sprague dawley* yang merupakan varietas biakan tikus albino dan banyak dipakai untuk penelitian medis dan nutrisional (Hsu dan Lai, 2007). Ciri umum tikus ini yaitu bulu berwarna putih dengan mata merah menyala, daun telinga bundar dan pendek. Hewan uji yang digunakan harus dalam keadaan baik secara klinis, histologi maupun patologinya untuk menghindari keraguan serta mengurangi kesalahan dalam pembacaan data.

Hepar memiliki fungsi sebagai agen detoksifikasi. Mekanisme detoksifikasi racun dilakukan dengan pemecahan senyawa menjadi lain seperti urea, asam urat dan ammonia (Sudrati *et al.*, 2016). Oleh karenanya hepar sangat rentan terhadap paparan zat asing, terutama zat karsinogenik. Zat

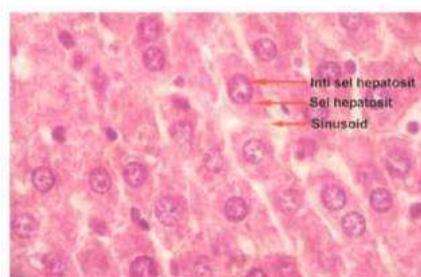
karsinogenik yang digunakan merupakan DMBA. Karsinogen DMBA bersifat toksik melalui stress oksidatif sehingga mampu menyebabkan kerusakan struktur sel yang mengarah ke nekrosis (Patri dan Padmini, 2009). Reagen DMBA telah banyak digunakan sebagai agen karsinogenik seperti halnya oleh (Adelina *et al.*, 2013) yang menggunakan DMBA sebagai inductor kanker hepar terhadap tikus galur *Sprague dawley*. Penelitian serupa oleh (Meiyanto, 2007) yang meneliti penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus terinduksi DMBA. DMBA merupakan karsinogen yang kuat terutama pada kasus induksi kanker kulit dan kanker kelenjar mammae.

Proses metabolisme DMBA dilakukan melalui aktivasi sitokrom p-450 yang dapat merusak DNA melalui terbentuknya epoksida trihidrodiol. Pembentukan DNA *adduct* dapat menentukan mutasi gen dan mengendalikan siklus sel sehingga dapat mendorong pertumbuhan sel kanker.

##### 5. Pewarnaan menggunakan *Haematoxylin Eosin*

Secara histologi hepar tersusun dari *hepatic triad* yang termasuk percabangan kecil arteri hepatica, vena portalis serta duktus/ saluran (Baratta et al. 2009). Hepatosit merupakan sel parenkim. Sel nonparenkim hepar meliputi sel kuppfer (makrofag pada sinusoid), leukosit dan endotel. Hepatosit memiliki ciri khusus yaitu memiliki nucleus besar bulat dalam bentuk tunggal maupun ganda. Analisis histopatologi jaringan hepar dapat dilihat melalui perubahan struktur sitoplasma serta dilatasi sinusoid (Koc et al. 2005). Pengamatan sel dibagi menjadi 2 kategori, yaitu sel normal (gambar 15) dan sel yang telah

mengalami kerusakan. Kerusakan pada jaringan hepar dapat mempengaruhi kadar protein yang ada kemudian hal ini akan mempengaruhi proses regenerasi sel. Kerusakan sel dapat digambarkan melalui proses degeratif dan nekrosis.



**Gambar 15.** Histologi sel hepar normal (Mulyono *et al.*, 2009)

Degenerasi hidropik merupakan proses pembengkakan sitoplasma akibat kerusakan membrane sel akibat hipoksia keracunan bahan kimia (McGavin dan Zachary, 2007; Underwood, 2002). Kerusakan berupa degenerasi hidropik lebih sering ditemukan dalam kebanyakan kasus. Nekrosis merupakan kerusakan sel dengan sifat *irreversible* karena adanya perubahan nucleus (inti sel). Kumar (2010) menyatakan bahwa perubahan struktur nucleus dapat berupa piknosis (inti mengerut), karioreksis (inti terfragmentasi) dan kariolisis (inti meluruh).

Berdasarkan data yang didapat, kelompok perlakuan A pemberian (pelarut CMC Na) dan C (ekstrak 1500 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata kerusakan 6% sel dan 8.2% yang menunjukkan nilai kerusakan rendah. Pemberian larutan CMC Na pada tikus mempengaruhi proses regenerasi sel (Putri *et al.*, 2019). Pemberian DMBA pada perlakuan B menunjukkan kerusakan 46.1% sel yang

menunjukkan tingkat kerusakan jaringan paling tinggi. Selanjutnya pada kelompok perlakuan D (DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB) dan E (DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB) menunjukkan rata-rata kerusakan 26% untuk perlakuan D dan 13.2% sel untuk kelompok perlakuan E. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada kedua kelompok perlakuan, pemberian dosis ekstrak FKHB 1500 mg/kgBB menunjukkan perbaikan sel yang lebih baik dibandingkan dengan dosis pemberian 750 mg/kgBB. Hal tersebut diperkuat oleh penelitian sebelumnya (Chen, 2015) yang membuktikan bahwa nobiletin memiliki aktivitas penghambatan perkembangan tumor dan angiogenesis melalui *Akt pathway*.

#### 6. Pewarnaan menggunakan *Imunohistochemistry*

Ekspresi protein VEGF dapat diketahui dengan pewarnaan *immunohistochemistry* melalui prinsip pengikatan antibody (Ab) dan antigen (Ag). Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi distribusi serta lokalisasi protein tertentu pada suatu jaringan tubuh. Teknik dapat memberikan gambaran kuantitatif mengenai intensitas warna yang terbentuk maupun gambaran kualitatif jaringan (Balqis, *et al.*, 2011).

Syarat-syarat yang harus dipenuhi pada metode pewarnaan IHC diantaranya bahan aktif yang digunakan dapat membentuk antibodi. Warna coklat merupakan interaksi antara antigen yang berikatan dengan antibodi. Uji IHC pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui ekspresi protein VEGF. Ekspresi protein pada jaringan hepar dikatakan rendah. Data yang diperoleh

pada pengamatan IHC melalui pengamatan secara semi kuantitatif pada setiap jaringan. Interpretasi data semi kuantitatif dilakukan dengan pengamatan visualisasi dan dilanjutkan dan skoring derajat histopatologi hepar.

Hasil pewarnaan positif akan menghasilkan bercak warna coklat. Pada perlakuan nomor 2 didapatkan hasil *scoring* 2+, 2+ dan 1+ menunjukkan ekspresi protein VEGF tertinggi. Hal ini sehubungan dengan perlakuan induksi DMBA yang dapat memicu DNA *adducts* sehingga terjadi over ekspresi protein VEGF didalamnya. Adapun ekspresi protein VEGF dalam perlakuan B memiliki nilai <30% (bersifat moderat). Pada perlakuan A dan D menunjukkan hasil 1+ dan 1+ dengan ekspresi protein sangat rendah terhadap jaringan hepar. Derajat histopatologi 1+ didapatkan pada perlakuan C (pemberian ekstrak) dan E (pemberian DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB). Dari kedua perlakuan D dan E, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak dengan dosis besar (1500 mg/kgBB) terbukti mampu memberikan derajat perbaikan terhadap tikus galur *Sprague dawley* terinduksi DMBA