

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian eksperimental laboratorik adalah penelitian yang dilakukan di laboratorium untuk mengetahui efek yang ditimbulkan dari perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti. Dilakukan untuk menguji hipotesis yang bersifat *sufficient condition* yaitu apakah variabel bebas merupakan kondisi yang cukup memadai untuk menimbulkan akibat pada variabel terkait.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada selama 7 bulan dari bulan Juni 2014 s/d Januari 2015.

C. Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah semua keadaan dan perlakuan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Variabel yang digunakan pada penelitian ini ada 3 yaitu variabel bebas, tergantung dan terkendali.

1. Uji KLT

- a. Variabel Bebas : Ekstrak etil asetat

- b. Variabel Tergantung : Nilai R_f
- c. Variabel Terkendali : Pembanding, fase gerak, fase diam

2. Uji Sitotoksik Tunggal

- a. Variabel Bebas : Dosis ekstrak etil asetat, Dox
- b. Variabel Tergantung : Nilai IC_{50} terhadap sel MCF-7
- c. Variabel Terkendali : Sel kanker payudara, media biakan, waktu inkubasi, suhu inkubasi.

3. Uji Sitotoksik Kombinasi

- a. Variabel Bebas : Dosis ekstrak etil asetat-Dox
- b. Variabel Tergantung : Nilai CI terhadap sel MCF-7
- c. Variabel Terkendali : Sel kanker payudara, media biakan, waktu inkubasi, suhu inkubasi.

4. Uji Apoptosis

- a. Variabel Bebas : Dosis ekstrak etil asetat-Dox
- b. Variabel Tergantung : Fluoresensi sel MCF-7
- c. Variabel Terkendali : Sel kanker payudara, media biakan, waktu inkubasi, suhu inkubasi.

5. *Molecular Docking*

- a. Variabel Bebas : Struktur skopoletin dan umbeliferon
- b. Variabel Tergantung : Skor *docking*
- c. Variabel Terkendali : Perangkat sistem *molecular docking*

D. Definisi Operasional

1. Uji KLT

Uji KLT adalah uji kualitatif untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kumarin yang terkandung dalam buah mengkudu yang akan menghasilkan nilai *Rf*. *Rf* adalah perbandingan jarak yang ditempuh komponen dengan jarak tempuh pelarut.

2. Uji Sitotoksik Tunggal dan Kombinasi

Uji sitotoksik adalah uji secara *in vitro* pada sel MCF-7 untuk mendeteksi toksisitas pemberian dosis ekstrak etil asetat buah mengkudu tunggal dan kombinasi Dox dengan perbandingan beberapa dosis. Metode yang digunakan *MTT assay* dinyatakan dengan nilai IC_{50} pada ekstrak tunggal dan CI pada uji kombinasi ekstrak-Dox.

3. Uji Apoptosis

Uji apoptosis adalah uji secara *in vitro* pada sel MCF-7 untuk mendeteksi adanya kematian sel akibat dosis ekstrak-Dox. Metode yang digunakan *double staining* dinyatakan dengan warna merah pada sel apabila sel mengalami kematian.

4. *Molecular Docking*

Molecular docking adalah uji secara *in silico* untuk menemukan konformasi energi ikatan ligan skopoletin dan umbeliferon di situs aktif protein yang sesuai, dimana akan dihasilkan skor *docking* ligan-protein.

E. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

a. Ekstraksi dan Maserasi

Blender (Philips[®]), alat-alat gelas (Pyrex[®]), kertas saring (Whatman[®]), *Rotary evaporator* (IKA[®] RV10).

b. KLT

Silika GF₂₅₄ (Merck[®]), bejana, pipa kapiler, sinar UV 254 dan UV 366 nm.

c. Uji Sitotoksik dan Uji Kombinasi

Alat-alat gelas (pyrex[®]), flakon, timbangan analitik (Sartorius[®]), vorteks, autoklaf (Hirayama[®]), inkubator CO₂ (Heraceus[®]), *Laminar Air Flow Hood* (Labconco[®]), *tissue culture flask* (Nunc[®]), tabung konikal 15 ml steril (Falcon[®]), sentrifus (Sorvall[®]), haemositometer (Nebauer[®]), *cell counter* (Brand[®]), *yellow tip* (Brand[®]), *blue tip* (Brand[®]), mikropipet (Gilson[®]), mikroskop inverted (Zeiss[®]), *96-well plate* (Nunc[®]), *shaker* (Gemmy[®]), *ELISA reader* (Bio-Rad[®]), *24-well plate* (Nunc[®]).

e. Uji Apoptosis

Mikropipet (Gilson[®]), alat-alat gelas (pyrex[®]), tabung konikal 15 ml steril (Falcon[®]), *cover slip* (Nunc[®]), vorteks, *24-well plate* (Nunc[®]), *yellow tip* (Brand[®]), *blue tip* (Brand[®]).

d. *Molecular Docking*

Perangkat keras berupa PC (intel^{inside} Core i3). Sistem Operasi Linux versi 10.10, PLANTS (*Protein Ligand ANT-System*) 1.2. *MarvinSketch* 5.6.2 dari YASARA versi 6, MMV (*Molegro Molecular Viewer*).

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Ekstraksi dan Maserasi

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) didapat dari pohon di sekitar LPPT Unit III Universitas Gadjah Mada, Bulak Sumur, Sleman. Penyari yang digunakan untuk ekstraksi yaitu etil asetat (Bratachem[®]).

b. Bahan Uji KLT

Heksan:etil asetat (93:7) (Bratachem[®]), KOH etanolik, kumarin p.a (Merck[®]), ekstrak etil asetat buah mengkudu.

c. Uji Sitotoksik dan Uji Kombinasi

Sel kanker payudara MCF-7 diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM ditumbuhkan pada media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco[®]), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco[®]). Larutan pencuci *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Pelarut yang digunakan adalah dimetil sulfoksida (DMSO) untuk preparasi larutan uji dengan dosis tidak lebih dari 0,5%. Reagen MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] 5 mg/ml dalam media kultur. Reagen *stopper* sodium dodesil sulfat (SDS) dalam HCl 0,1%. Tripsin-EDTA untuk membantu melepas

sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*. Untuk uji kombinasi digunakan *doxorubicin* diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.

d. Uji Apoptosis

Sel kanker payudara MCF-7 diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, Larutan pencuci *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Reagen etidium bromida-akridin oranye sebagai pereaksi warna.

e. *Molecular Docking*

Protein diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) di *download* dari situs: <http://www.rcsb.org/pdb>.

F. Cara Kerja

1. Penyiapan Simplisia Uji

Buah mengkudu dipilih yang sudah berwarna kuning dan masih keras. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Buah mengkudu yang telah dicuci kemudian dipotong tipis dan dikeringkan pada udara terbuka namun terlindung dari sinar matahari langsung dengan penutupan kain hitam. Simplisia yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan blender.

2. Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia dimasukkan kedalam bejana kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Perbandingan pelarut yang digunakan adalah 1 : 5. Pada maserasi

dilakukan pengadukan setiap hari selama 5 hari. Setelah 5 hari residu disaring dan dipisahkan dari filtrat. Setelah dipisahkan, dilakukan remaserasi selama 2 hari. Setelah 2 hari, residu disaring dan filtrat yang didapat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C, maka diperoleh ekstrak etil asetat buah mengkudu. Penguapan selanjutnya dilakukan menggunakan penangas air agar didapatkan ekstrak kental.

3. Uji KLT

Kandungan senyawa pada ekstrak etil asetat buah mengkudu diidentifikasi menggunakan KLT. Fase diam yang digunakan adalah silika GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah heksan:etil asetat (93:7).

4. Uji *In Vitro*

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian di sterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilkan dengan sinar UV selama 30 menit dan disemprot etanol 70%.

b. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan DMEM dibuat dengan melarutkan DMEM dalam aquades, ditambah 2,0 gram NaHCO₃ dan 2,0 gram Hepes. Larutan selanjutnya *distirer* sampai homogen kemudian *dibuffer* dengan HCl encer 1 N hingga pH 7,2-7,4 polietilensulfon steril 0,2 µm secara

aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan DMEM steril dengan FBS 10% dan penisilin streptomisin 1% secara aseptis didalam LAF.

c. Preparasi sel

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

d. Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut, tambahkan 1 ml larutan tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambahkan 3 ml larutan PBS, diamkan selam 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah kedalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 *rpm* selama 3 menit. Sel dicuci dua kali

menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh dosis sel sebesar 5×10^3 sel/100 μ l dan siap untuk penelitian.

e. Pembuatan larutan uji

EEtM dan Dox dibuat stok dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri dosis dalam media kultur.

f. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT

Sel dengan kepadatan 10^4 sel per sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung DMSO 0,5% (kontrol) atau sampel baik dalam bentuk tunggal yaitu ekstrak atau dox saja maupun gabungan keduanya (kombinasi), inkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan stopper SDS dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal

formazan. Digoyangkan diatas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm.

g. Uji Apoptosis menggunakan metode *double staining*

Sel dalam 96 sumuran dicuci PBS kemudian ditambahkan 1000 μ L sampel atau media kultur yang mengandung DMSO 0,5% (kontrol), diinkubasi selama 10 jam. Selanjutnya media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. *Cover slip* dalam sumuran diambil dan diletakkan diatas obyek *glass*. Kemudian ditambah dengan pereaksi etidium bromida–akridin oranye dan sel yang mengalami apoptosis akan berwarna merah sedangkan sel hidup berwarna hijau dengan pengamatan mikroskop fluoresen.

5. *Molecular Docking*

a. Pengambilan Data

Konformasi protein dicari dari *protein data bank* (PDB) protein target dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand*.

b. Pemodelan Molekul

Optimasi struktur senyawa uji dilakukan menggunakan bantuan program *Marvin Skecth*. Struktur 3D skopoletin dan umbeliferon digambar lengkap dengan atom hidrogen, kemudian dilakukan optimasi konformasi.

c. Preparasi Protein Target

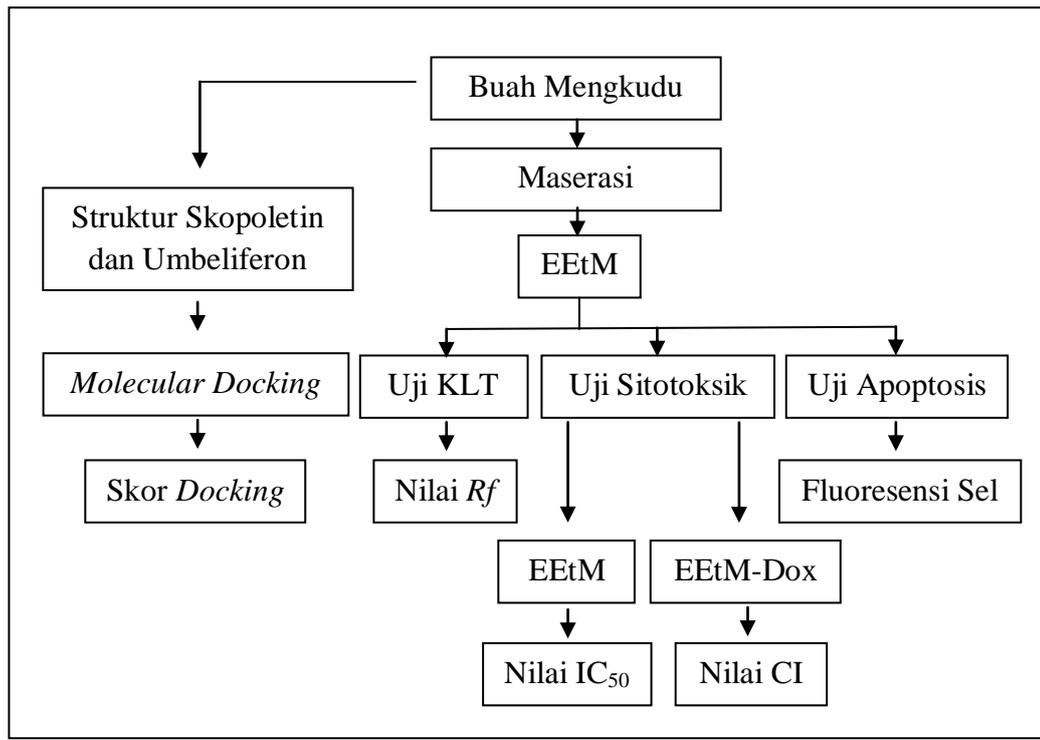
Protein target dipreparasi menggunakan *software* YASARA, yaitu berkas protein dalam format *pdb*, kemudian dihapus salah satu rantai

proteinnya untuk meminimalisasi wilayah *docking*. Selanjutnya NAG dan air dihapus sehingga hanya tersisa molekul asam amino dan tambahkan hidrogen. Hasilnya kemudian disimpan dalam bentuk mol2 yang akan digunakan sebagai protokol *docking* untuk penapisan virtual ER α dan Bcl-xl.

d. Simulasi dan Validasi *Docking*

File input ligan dan file protein target disimpan bersama dalam sebuah folder bersama PLANTS versi 1.2, kemudian ditentukan pose konfigurasi dan konfigurasi *docking* (*plantsconfig*) yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar dari PLANTS. Pendrivelinux dijalankan, file yang dibutuhkan disalin ke pendrivelinux untuk melihat koordinat pusat tempat ikatan x,y,z dan radiusnya. Simulasi program *docking* PLANTS dijalankan kemudian evaluasi dan interpretasi hasil simulasi. Selanjutnya mencari konformasi yang memberikan hasil dengan *score* terendah (dapat dikatakan yang terbaik) dimana konformasi yang memiliki nilai skoring terbaik dipilih sebagai tempat sampel diperkirakan berikatan. Kemudian *docking* ligan asli (3ERT dan 4FC), setelah itu dilakukan perhitungan RMSD (*Root Mean Square Deviance*) dengan menggunakan YASARA. RMSD dinyatakan valid apabila lebih rendah dari 2Å (Purnomo, 2011). Apabila nilainya kurang dari 2Å, maka dapat digunakan sebagai protokol *docking* untuk skrining virtual dalam usaha penemuan senyawa yang menghambat proliferasi ER α dan Bcl-xl.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema langkah kerja

H. Analisis Data

1. Analisis KLT

Hasil KLT dikeringkan dan dilihat dibawah sinar UV pada λ 254 nm dan 366 nm. Noda yang terbentuk kemudian dilingkari dan hitung nilai R_f .

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2. Analisis Uji Sitotoksik

a. Uji sitotoksik ekstrak tunggal

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup uji signifikansi untuk mengetahui

signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol media sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan dosis, dihitung nilai IC_{50} untuk mengetahui potensi sitotoksiknya. Suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara apabila memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ (Doyle dan Griffiths, 2000).

b. Uji sitotoksik kombinasi ekstrak-Dox

Uji sitotoksik kombinasi ditetapkan dengan menghitung Indeks Kombinasi (IK) atau *Combination Index* (CI) antara agen kemoterapi dengan ekstrak, menggunakan persamaan:

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$$

Dimana Dx adalah dosis dari satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek (dalam hal ini adalah IC_{50} terhadap pertumbuhan sel kanker payudara) dan (D)1 dan (D)2 adalah besarnya dosis kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama (Reynolds dan Maurer, 2005). Angka CI atau indeks kombinasi yang diperoleh diinterpretasikan sebagai berikut:

Tabel 1. Interpretasi nilai CI

Nilai CI	Intepretasi
< 0,1	Sinergis sangat kuat
0,1-0,3	Sinergis kuat
0,3-0,7	Sinergis
0,7-0,9	Sinergis ringan-sedang
0,9-1,1	Mendekati adiktif
1,1-1,45	Antagonis ringan-sedang
1,45-3,3	Antagonis
>3,3	Antagonis kuat-sangat kuat

3. Uji Apoptosis

Sel yang telah dicat etidium bromida dan akridin oranye segera diamati di bawah mikroskop fluoresen. Sel hidup akan tampak normal dan berfluoresensi hijau, sel yang apoptosis awal akan tampak kondensasi, berfluoresensi hijau, sel dengan apoptosis akhir akan tampak kondensasi, berfluoresensi merah dan sel yang nekrosis akan tampak normal, berfluoresensi merah (Wickenden, *et al.*, 2003).

4. *Molecular Docking*

Dilakukan analisis data nilai skor dan posisi. Molekul dengan nilai skoring terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik, setelah itu visualisasi interaksi dengan menggunakan program YASARA dan visual ikatan antar asam amino dengan MMV.