

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Disain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan pada kultur sel *Burkitt's lymphoma* yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens*.

#### **B. Subjek Penelitian**

Sel kanker uji dalam penelitian ini menggunakan sel *Burkitt's lymphoma* (kultur sel raji yang telah terpapar *Eipstein-Barr virus*) yang dibiakkan dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) yang diberi *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%.

Bahan uji dalam penelitian ini adalah fraksi heksan tanaman *M. pendens* dengan konsentrasi (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 )  $\mu\text{g/mL}$  dan kontrol sel *Burkitt's lymphoma*.

#### **C. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### 1. Tempat penelitian

- a. Pembuatan ekstrak tanaman *M. pendens* menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% dan fraksinasi menggunakan metode corong pisah untuk mendapatkan fraksi heksan dilakukan

di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

- b. Pembiakkan sel *Burkitt's lymphoma* serta pengujian sitotoksitas dengan metode MTT Assay dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Ilmu Keperawatan, Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari 2019.

#### **D. Identifikasi Variabel Penelitian**

##### **A. Identifikasi Variabel**

- a. Variabel Pengaruh

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens*.

- b. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah persentase kematian sel *Burkitt's lymphoma*.

- c. Variabel Terkendali

- 1) Konsentrasi dari fraksi heksan tanaman sarang semut
- 2) Jumlah sel raji yang digunakan
- 3) Waktu pengamatan
- 4) Kondisi inkubasi
- 5) Temperatur ruangan
- 6) Media pertumbuhan sel

## E. Definisi Operasional

1. Uji sitotoksik adalah uji pendahuluan untuk mendeteksi suatu bahan bersifat toksik secara biologis.
2. Fraksi heksan tanaman *M. pendens* adalah hasil fraksinasi *M. pendens* menggunakan corong pisah yang sebelumnya telah diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan bahan pelarut berupa etanol 96%.
3. Tanaman *M. pendens* adalah tanaman yang diperoleh dari perkebunan di Jayapura, Papua.
4. Konsentrasi fraksi heksan adalah banyaknya fraksi hasil ekstraksi *M. pendens* yang akan dimasukkan ke dalam biakan sel *Burkitt's lymphoma* yaitu (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 dan 15.625) µg/mL.
5. Jenis biakan sel kanker yang digunakan adalah sel *Burkitt's lymphoma* yang berasal dari kultur sel raji yang telah terpapar virus *Eipstein-Barr* yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada

## F. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

- a. Almari pengering
- b. *Blender* (Philips, Indonesia)
- c. *Blue tip* (Eppendorf AG, Germany)
- d. *Yellow tip* (Eppendorf AG, Germany)
- e. *Centrifuge* (Sakura Seiki Co.,Ltd, Japan)

- f. Corong gelas (Pirex, Iwaki, Japan)
- g. Corong pisah
- h. Filter (Millex, Corrightwohill, Co. Cork, Ireland)
- i. *Flasks*
- j. Lampu Spiritus
- k. Korek Api
- l. *Freezer* (Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)
- m. Gelas ukur (Duran, Germany)
- n. Gelas *vacuum evaporator* (Jencons, Leighton Buzzard, England)
- o. Inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Mettmert, Germany)
- p. *Laminary airflow cabinet* (Labconco Co., Kansas City, Missouri)
- q. *Magnetic stirrer* (Barnstead thermolyne, USA)
- r. Mikroskop *Inverted* (Leitz, Germany)
- s. ELISA *reader*
- t. Mikroskop *fluorescence* (Carl Zeiss, Germany)
- u. Neraca *digital* (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)
- v. Objek gelas (Sail Brand, China)
- w. Mikropipet 200, 1000 µl (Socorex, Acura, Swiss)
- x. *Hemacytometer* (Marien Feld, Japan)
- y. Tabung *Eppendorf* (Pirex, Underlic, Japan)
- z. Rak *Eppendorf*

- aa. Spuit (BD, Singapore)
- bb. *Suction pump*
- cc. *Spektrofotometer*
- dd. Tabung *Centrifuge* (Iwaki, Japan)
- ee. Tabung *Conical* 15 mL (BD, USA)
- ff. Tabung *Conical* 50 mL (BD, USA)
- gg. Tabung *Erlenmeyer* (Pirex, Iwaki, Japan)
- hh. *Vacuum evaporator rotary* (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)
- ii. *Vortex* (Barnstead thermolyne, USA)
- jj. *Water bath* (Mettler, Germany)
- kk. *Plate* 96 sumuran

## 2. Bahan

- a. Biakan sel *Burkitt's lymphoma* yang disimpan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM
- b. Fraksi heksan tanaman *M pendens*
- c. Etanol 96%
- d. Penisilin-streptomisin 2%
- e. Fungizon 0,5%
- f. *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%
- g. *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640)

- h. Alkohol 70%
- i. MTT 5mg/mL (50mg MTT dan 10 mL PBS)
- j. SDS 10% dalam 0,01 N HCl
- k. *Tissue*
- l. Alumunium foil

### **G. Tahap Penelitian**

1. Penyusunan proposal dan perizinan

Proposal penelitian mulai disusun sejak bulan Maret 2018.

Selanjutnya, peneliti mengajukan etik penelitian (*ethical clearance*).

2. Persiapan penelitian

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat yang diperlukan dalam penelitian

3. Identifikasi tanaman

Tanaman *M. pendens* yang telah dikumpulkan diambil beberapa sampel untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

4. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi heksan tanaman *M. pendens*

- a. Pembuatan ekstrak

Tanaman *M. pendens* dipilih dan diambil sebanyak 1000 gram kemudian dicuci dengan air mengalir dan dipotong menjadi

beberapa bagian. Setelah itu, potongan tanaman *M. pendens* dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Kemudian, setelah kering tanaman dijadikan serbuk menggunakan mesin penyerbuk hingga halus. Sebelum dilakukan proses maserasi, tanaman *M. pendens* yang sudah berbentuk serbuk ini akan dilakukan proses penyaringan lemak terlebih dahulu dengan cara direndam dalam *petroleum eter* agar tidak mengganggu proses ekstraksi.

Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi kemudian disaring sebanyak 3 kali menggunakan corong *bruncher* sehingga didapat filtrat I. Filtrat I kemudian diuapkan dengan *waterbath*, sedangkan ampasnya kembali dimaserasi menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam. Setelah itu, filtrat disaring lagi sehingga didapatkan filtrat II dan ampasnya dimaserasi lagi untuk mendapatkan filtrat III. Untuk memperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%, filtrat I, filtrat II dan filtrat III dicampur kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60-70°C.

b. Proses fraksinasi dengan metode corong pisah

Prosedur untuk mendapatkan fraksi yang diinginkan diawali dengan tahap ekstraksi dengan metode maserasi pada tanaman *M. pendens* dengan pelarut etanol 96%. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol diperoleh fraksi sesuai tingkat kepolarannya, dimulai dari fraksi

heksan sebagai fraksi non polar dilanjutkan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi butanol sebagai fraksi semi polar dan fraksi air sebagai fraksi polar. Untuk memperoleh fraksi heksan, ekstrak etanol ditambah sedikit pelarut etanol 96% kemudian diaduk hingga larut, ditambah dengan akuades dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut heksan, kemudian dikocok dan didiamkan sehingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan fraksi heksan dan lapisan residu fraksi heksan yang akan digunakan untuk membuat fraksi n-heksan.

#### 5. Preparasi sel *Burkitt's lymphoma*

Sel *Burkitt's lymphoma* dibiakkan dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) dan diberi *Fetal Bovine Serum* (FBS 10%), kemudian inkubasi selama 24 jam. Sel *Burkitt's lymphoma* dibiakkan dalam larutan RPMI-1640, FBS 10%, antibiotik penisillin-streptomisin 2% dan fungizon 0,5%. Sel di inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO<sub>2</sub> 5%..

#### 6. Uji MTT Assay

Prinsip metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam suatu sel MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) direduksi menjadi garam formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan *reagen stopper*. Fungsi *reagen stopper* yakni melisis membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan



tersebut. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi).

Prosedur MTT Assay (CCRC, 2013) meliputi :

- a) mengambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub>
- b) memanen sel sesuai dengan protokol panen
- c) menghitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan MK sesuai kebutuhan mengikuti protokol perhitungan sel
- d) mentransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl
- e) menyisahkan 3 sumuran kosong untuk kontrol media
- f) mengamati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel
- g) melakukan proses inkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam agar sel *attach* kembali setelah panen
- h) memberi perlakuan pada sel dengan sampel setelah sel kembali dalam keadaan normal
- i) membuat konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol pelarut) sesuai dengan protokol preparasi sampel
- j) mengambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>
- k) membuang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 15cm, kemudian menekan *plate* secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan
- l) memasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian membuang PBS dengan cara membalikkan *plate*, dilanjutkan dengan meniriskan sisa cairan dengan tisu
- m) memasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran
- n) melakukan proses inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam 24 jam

belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam (total waktu 24-48 jam)

- o) menyiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara ambil 1 mL stok MTT dalam PBS (50mg/10 mL), selanjutnya mengencerkan reagen dengan MK 10 mL
- p) membuang media sel, mencuci PBS 1x dan menambahkan reagen MTT 100  $\mu$ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel) kemudian proses inkubasi selama 2-4 jam.
- q) memeriksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, menambahkan *stopper* 100 $\mu$ l SDS 10% dan 0,01N HCl
- r) membungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan menginkubasikan di tempat gelap pada temperature kamar selama 1 malam
- s) menghidupkan ELISA *reader*
- t) membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. memasukkan ke dalam ELISA *reader*.
- u) membaca absorbansi masing – masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan  $\lambda = 595\text{nm}$

Menurut *National Cancer Institute* (2009) kriteria aktivitas sitotoksik kuat untuk suatu ekstrak yaitu nilai  $IC_{50} < 20\mu\text{g/mL}$ , sitotoksik moderat dengan nilai  $IC_{50} 21-200\mu\text{g/mL}$ , sitotoksik lemah dengan nilai  $IC_{50} 201-500\mu\text{g/mL}$  dan nilai  $IC_{50} \geq 501\mu\text{g/mL}$  disebut tidak mempunyai efek sitotoksik. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh, maka semakin besar aktivitas sitotoksik dari suatu senyawa

## 7. Analisis Data

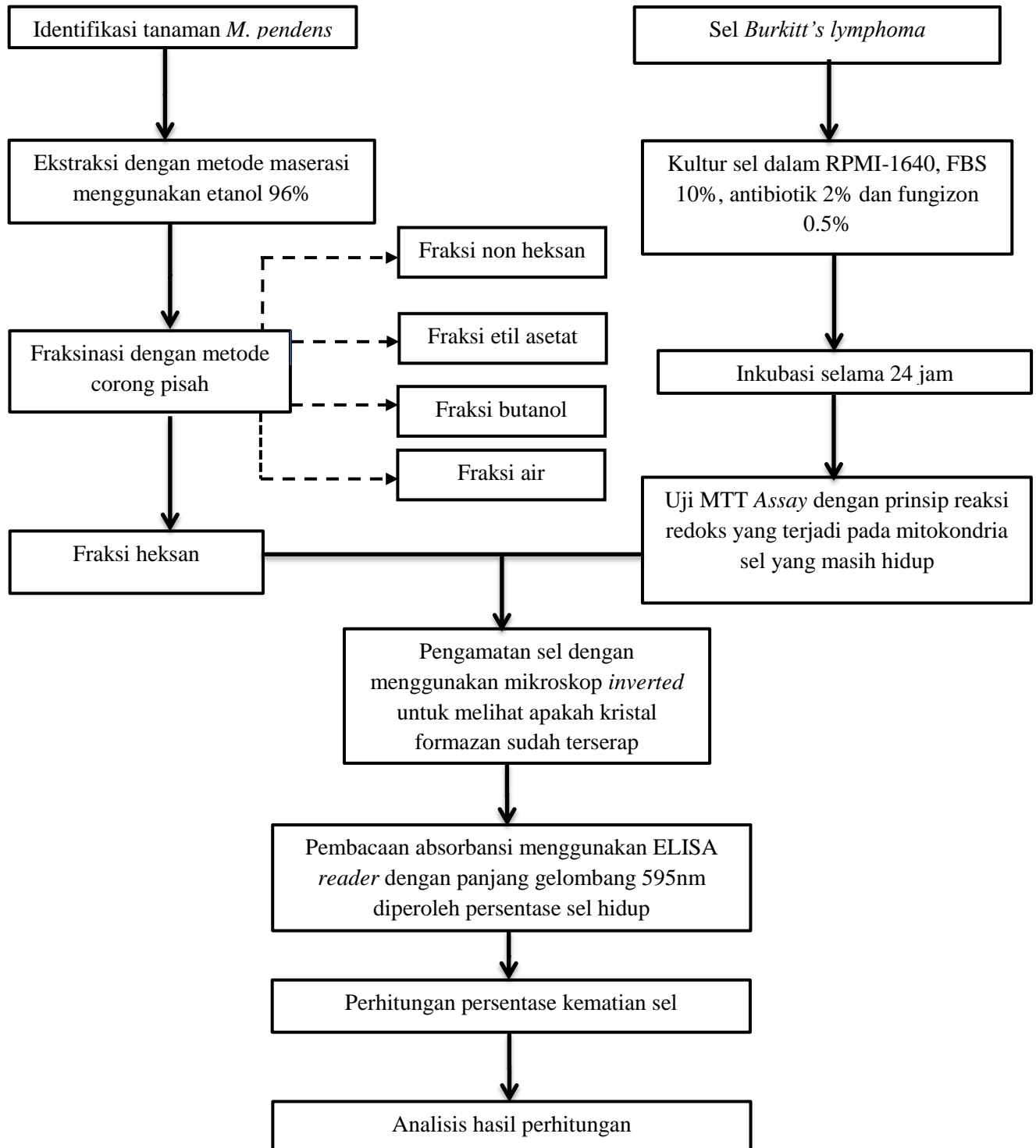
Penelitian yang telah selesai dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA *reader* dan hasilnya diperoleh nilai

absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka dapat dihitung persentase kematian sel dengan rumus berikut:

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

Setelah memperoleh persentase sel hidup, selanjutnya dilakukan pengurangan dari 100% terhadap % sel hidup sehingga diperoleh persentase kematian sel.

## H. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

## **I. Analisis Data**

Hasil absorbansi yang telah dibaca menggunakan ELISA *reader* merepresentasikan persentase sel hidup. Selanjutnya dihitung persentase kematian sel dari pengurangan nilai 100% terhadap persentase sel hidup.