

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu: Deteminasi sampel, ekstraksi sampel dengan pelarut etanol kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*, setelah itu di fraksi dengan etanol dan diuji secara kualitatif menggunakan KLT, uji antioksidan dengan metode DPPH, uji sitotoksik dengan metode MTT yang dilihat dari nilai IC_{50} dan *in silico* menggunakan senyawa rutin dengan protein HER-2.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian Terpadu Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, sedangkan uji sitotoksik terhadap sel MCF-7 dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni hingga Agustus 2013.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Operasional

1. Variabel penelitian

a. Uji Antioksidan

- 1) Variabel Bebas : Seri konsentrasi fraksi etanol buah *M citrifolia* L.
- 2) Variabel Tergantung : Daya antioksidan (IC_{50}) terhadap DPPH.

3) Variabel Terkendali : Konsentrasi DPPH, OT (*Operating Time*), λ_{\max} .

b. Uji Sitotoksik

1) Variabel Bebas : Seri konsentrasi fraksi etanol buah *M.citrifolia* L.

2) Variabel Tergantung : Konsentrasi hambat (IC_{50}) terhadap sel kanker payudara MCF-7.

3) Variabel Terkendali : Suhu dan waktu inkubasi.

2. Definisi Operasional

a. IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*)

Nilai IC_{50} pada uji antioksidan menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat daya antioksidannya. Nilai IC_{50} pada uji sitotoksik menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Zou *et al*, 2004).

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Tabel 1. Alat-Alat Penelitian

| No | Nama Alat | Sumber/Merek dan Tipe |
|----|----------------------------|-----------------------|
| 1 | Seperangkat Komputer | ASUS |
| 2 | Alat-alat Gelas | Pyrex® |
| 3 | Lampu UV 254 nm dan 366 nm | |
| 4 | Timbangan Analitik | Sartorius® |
| 5 | Oven | Memmert® |
| 6 | spektrofotometer UV-Vis | Shimadzu® |
| 7 | Aluminium foil | Brand® |

| No | Nama Alat | Sumber/Merek dan Tipe |
|----|---------------------------------|-----------------------|
| 8 | Eppendorf | Brand® |
| 9 | Vorteks | Labinco® L46 |
| 10 | Autoklaf | Hirayama® |
| 11 | Inkubator CO ₂ | Heraceus® |
| 12 | <i>Laminar Air Flow Hood</i> | Labconco® |
| 13 | <i>tissue culture flask</i> | Nunc® |
| 14 | Tabung konikal 15 ml steril | Falcon® |
| 15 | <i>Centrifuge</i> | Sorvall® |
| 16 | Haemositometer | Nebauer® |
| 17 | <i>Cell counter, yellow tip</i> | Brand® |
| 18 | <i>Blue tip</i> | Brand® |
| 19 | Mikropipet | Gilson® |
| 20 | Mikroskop inverted | Zeiss® |
| 21 | <i>96-well plate</i> | Nunc® |
| 22 | <i>Shaker</i> | Gemmy® |
| 23 | ELISA reader | Bio-Rad® |

2. Bahan Penelitian

a. Bahan utama

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) didapat dari daerah

Kotagede, Yogyakarta.

b. Bahan uji

Tabel 2. Bahan-Bahan Penelitian

| No | Nama Bahan | Sumber/Merek dan Tipe |
|----|--|---|
| 1 | Etanol 70% | General Labora® / <i>Grade</i> teknis |
| 2 | Kloroform | Bratachem® / <i>Grade</i> teknis |
| 3 | Eter | Bratachem® / <i>Grade</i> teknis |
| 4 | Toluen | Bratachem® / <i>Grade</i> teknis |
| 5 | Aquadest | General Labora® / <i>Grade</i> teknis |
| 6 | Etanol 96% | General Labora® / <i>Grade</i> teknis |
| 7 | 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) | Universitas Ahmad Dahlan |
| 8 | Sel kanker payudara jenis MCF-7 | Koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM |
| 9 | <i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI)</i> yang mengandung: | |

| No | Nama Bahan | Sumber/Merek dan Tipe |
|----|--|----------------------------------|
| | a. Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) | Gibco® / Grade pro analisis |
| | b. Penisillin-streptomisin 1% (v/v) | Gibco® / Grade pro analisis |
| 10 | Larutan pencuci <i>Phosphat Buffer Saline</i> (PBS) | Calbiochem® / Grade pro analisis |
| 11 | Dimetil sulfoksida (DMSO) | Calbiochem® / Grade pro analisis |
| 12 | MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] 5 mg/ml dalam media kultur | Calbiochem® / Grade pro analisis |
| 13 | Reagen <i>stopper</i> sodium dodesil sulfat (SDS) dalam HCl 0,1% | Merck® / Grade pro analisis |
| 14 | Tripsin-EDTA | Calbiochem® / Grade pro analisis |
| 15 | Metanol | Bratachem® / Grade pro analisis |

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta.

2. Pembuatan Senyawa Uji

Buah *M. citrifolia* L yang digunakan merupakan yang sudah layak untuk dikonsumsi, kemudian dibersihkan, dipotong tipis dan ditutupi kain hitam lalu dikeringkan dengan sinar matahari selama 5 hari kemudian di blender hingga halus menjadi serbuk simplisia.

Serbuk simplisia yang diperoleh disari dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10 yaitu dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam etanol 70% selama 5 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari agar penyarian sempurna. Setelah 5

hari, maserat yang diperoleh disaring dan diremaserasi selama 2 hari untuk mengoptimalkan hasil ekstrak. Selanjutnya, hasil maserat difraksinasi partisi cair-cair dengan pelarut etanol dan kloroform. Proses fraksinasi ini dilakukan sampai perubahan warna dan pemisahan terlihat jelas. Fraksi etanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C. Setelah fraksi etanol dipekatkan kemudian dikentalkan dengan *waterbath*.

3. Uji KLT

Uji KLT dilakukan dengan cara menotolkan sampel larutan uji yaitu fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. pada plat dengan bantuan pipa kapiler kemudian dielus dengan fase gerak di dalam bejana yang tertutup rapat. Untuk identifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. Fase gerak yang digunakan adalah Etil asetat : Asam asetat glasial : Asam format : Air (100:11:11:25) (Brasseur *and* Angenot, 1986) dan fase diam silica gel 60 F₂₅₄.

4. Uji Antioksidan dengan DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 19,72 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol p.a hingga 25 ml. Sebanyak 10,0 ml larutan DPPH diambil dan ditambahkan metanol p.a hingga volume 100 ml.

b. Persiapan Larutan Uji Dari Fraksi Etanol Buah *M.citrifolia* L.

(1) Pembuatan larutan induk

Sampel Buah *M.citrifolia* L. dikeluarkan dari *freezer* dan diamkan hingga suhu kamar. Sebanyak 10,0 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 ml. Diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/ml.

(2) Pembuatan larutan induk ekstrak

Lima larutan seri kadar dibuat dari larutan tersebut dengan cara memipet sejumlah sampel dan dilarutkan dengan pelarut metanol p.a. Seri kadar fraksi etanol Buah *M.citrifolia* L. 50; 100; 150; 200; 250; 300 dan 350 µg/ml.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 1000 µl larutan DPPH dan 1000 µl metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan spektra panjang gelombang larutan tersebut dibaca pada rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari spektra panjang gelombang.

d. Penentuan *Operating Time* Sampel

Sebanyak 1000 µl larutan DPPH dan 1000 µl metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Absorbansi larutan tersebut dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh selama 90 menit. Waktu stabil ditentukan dari absorbansi larutan sampel.

e. Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Buah *M. citrifolia* L.

Larutan seri kadar standar dan sampel yang telah dibuat sebelumnya disiapkan. Sebanyak 1000 μ l larutan DPPH dan 1000 μ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Larutan didiamkan selama *operating time* (OT) yang diperoleh. Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH, lalu dilakukan penghitungan nilai IC_{50} dengan mengolah data absorbansi sampel menjadi % antioksidan dengan menggunakan rumus.

5. Uji Sitotoksik

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan 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, disemprot etanol 70% dan dilap.

b. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan DMEM dibuat dengan melarutkan DMEM dalam aquadest, ditambah 2,0 gram $NaHCO_3$ dan 2,0 gram HEPES. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian di-buffer dengan HCl encer 1 N hingga pH 7,2-7,4 diukur dengan Ph meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril 0,2 μ m 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, 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, selanjutnya 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 25% 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 konsentrasi sel sebesar 5×10^3 sel/100 μ l dan siap untuk penelitian.

e. Pembuatan larutan uji

Fraksi etanol buah *M citrifolia* L dibuat stok dengan kadar 2×10^5 μ g/ml dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi yang akan diujikan yaitu 15,625; 31,25; 62,5; 250; 500 μ l/ml dalam media kultur.

f. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT (Mosman, 1983)

Sel dengan kepadatan 10^4 sel/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 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji diinkubasi 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, diinkubasi 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 panjang 595 nm gelombang.

6. *Docking Moleculer*

a. Pengambilan data protein

Dalam penelitian ini, data struktur protein target diambil melalui *Protein Data Bank* (PDB) dengan PDB ID : 3PP0 dan digunakan sebagai target *docking*.

b. Pemodelan molekul senyawa kemopreventif dari bahan alam

Data struktur semua sampel dari bahan alam digambar dengan menggunakan MarvinSketch v. 5.6 (disimpan dalam format file *ligand_2D.mrv*). Kemudian setiap senyawa di protonasi pada pH = 7.4, dilanjutkan mencari konformasi dengan menggunakan program yang sama untuk yang diperlihatkan dalam bentuk 3 dimensi kemudian berkas disimpan dalam bentuk *mol2*.

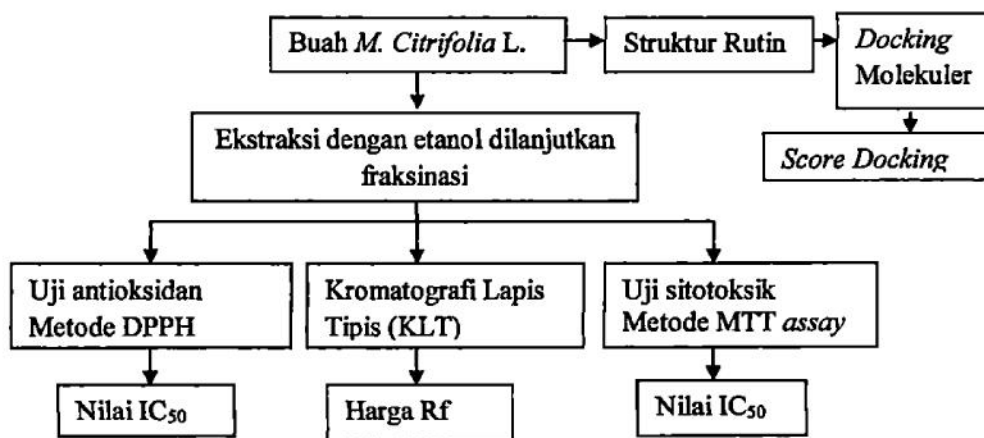
c. Preparasi Protein Target

Protein target dipreparasi dengan menggunakan YASARA, yaitu berkas protein dalam format *#.pdb*, kemudian dihapus salah satu rantai protein (rantai B) untuk meminimisasi wilayah *docking*, dilanjutkan dengan menghapus NAG dan air apabila diperlukan sehingga hanya tersisa molekul asam amino. Hidrogen ditambahkan, hasilnya disimpan dalam bentuk berkas *mol2* yang kemudian digunakan sebagai protokol *docking* untuk penapisan virtual senyawa HER-2.

d. Simulasi dan Validasi *Docking*

File input ligan dan *file* protein target disimpan dalam sebuah folder bersama PLANTS versi 1.2, kemudian ditentukan pose konfigurasi dan konfigurasi *docking* (*plantsconfig*) yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar dari PLANTS. Definisi konfigurasi diubah menjadi 5 Å dari koordinat lokasi SC558 terikat pada HER-2. Pose yang memiliki nilai skoring terbaik dipilih sebagai sebagai tempat sampel diperkirakan berikatan. Kemudian *docking* ligan asli (SC558), setelah itu dilakukan perhitungan *Root Mean Square Deviance* (RMSD) dengan menggunakan YASARA (RMSD dinyatakan valid apabila lebih rendah dari 2 Å).

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 4. Skema Langkah Kerja

G. Analisis dan Pengolahan Data

1. Analisis KLT

Fraksi etanol buah *M. citrifolia* L. yang telah dielusi menggunakan campuran dari etil asetat : asam asetat glasial : asam format : air (100:11:11:25) kemudian diuapi amoniak untuk deteksi flavonoid. Perubahan warna pada spot dilihat pada sinar tampak (*visible*), UV_{254 nm} dan UV_{366 nm} dan diukur nilai Rf pada plat.

2. Analisis Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH. Data yang didapat dari hasil pembacaan spektrofotometer UV berupa absorbansi (OD) masing-masing larutan uji dihitung nilai IC₅₀ berdasarkan presentase inhibisi, DPPH dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

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

Tabel 3. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (Mardawati *et al*, 2008).

| Intensitas | Nilai IC_{50} |
|-------------|--------------------------|
| Sangat kuat | < 50 $\mu\text{g/ml}$ |
| Kuat | 50-100 $\mu\text{g/ml}$ |
| Sedang | 101-150 $\mu\text{g/ml}$ |
| Lemah | > 150 $\mu\text{g/ml}$ |

3. Analisis Uji sitotoksik

Analisis data pada uji sitotoksitas aplikasi tunggal, dimana data yang didapat dari ELISA Reader berupa hasil absorbansi. Data yang diperoleh dari hasil pembacaan ELISA Reader ($\lambda=595$ nm) berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dihitung menggunakan rumus :

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

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai IC_{50} menggunakan analisis probit (SPSS 14.0) untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik. Klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu kategori sangat toksik jika nilai $IC_{50} < 10$ $\mu\text{g/ml}$, kategori toksik jika nilai IC_{50} 10-100 $\mu\text{g/ml}$, dan kategori cukup toksik jika nilai IC_{50} 100-500 $\mu\text{g/ml}$ (Weerapreeyakul *et al*, 2012).

4. Analisis *docking* molekuler

Dilakukan analisis data nilai *skoring* dan *pose*. Molekul dengan nilai *score* terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik, setelah itu visualisasi interaksi dengan menggunakan program YASARA.