

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi pada penelitian ini adalah biji buah pinang yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili keseluruhan populasi dalam penelitian (Notoatmojo 2002). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji buah pinang dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, dipilih buah pinang yang sudah tua (matang) dengan kulit yang segar dan berwarna orange kemerahan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol biji buah pinang.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik ekstrak etanol biji buah pinang terhadap sel hati HepG2.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah indeks selektivitas ekstrak etanol biji buah pinang terhadap sel vero.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama terdiri dari variabel bebas, variabel terkendari, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah agar dapat dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak biji buah pinang yang diujikan pada sel kanker hati HepG2.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel HepG2 dengan menghitung jumlah sel yang mati.

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu, tekanan inkubator, lama inkubasi, kondisi laboratorium seperti kebersihan dari ruangan dan instrumen laboratorium, konsentrasi sampel uji, keadaan sel vero, keadaan sel HepG2, kerapatan sel HepG2 dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji buah pinang adalah bagian buah dari tanaman pinang yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol biji buah pinang adalah hasil maserasi biji buah pinang dengan menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Ketiga, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa dalam membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang dinyatakan dengan nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.

Keempat, sel kanker hati HepG2 yang digunakan adalah *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan dalam media pembunuh DMEM yang mengandung PBS 10% dan Penisillin Streptomisin 2%.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat yang digunakan untuk membuat simplisia yaitu bejana maserasi, kain flanel, ayakan no 40, batang pengaduk, blender, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator, dan alat gelas.

Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (Braun Biotech Internasional), autoklaf, inkubator 37°C aliran CO₂ 5% model

6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), *ependrof*, tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), mikropate 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 μl dan 200-1000 μl (Pipetman), mesin vortex, mikroskop inverted (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering biji buah pinang (*Areca catechu* L.) dan ekstraksi menggunakan etanol 70%. Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker hati *cell line*; HepG2; media stok: DMEM (Gibco); media kultur sel: media DMEM (Gibco), NaHCO_3 , *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin (Penstep) 2% v/v (Gibco), *Fungizone* (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5mg/mL dalam PBS; media pencuci sel: larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,2; *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi buah pinang

Tahap pertama penelitian adalah menetapkan kebenaran melalui deterninasi tanaman pinang yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan pembuatan serbuk

Biji buah pinang diperoleh dari (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar. Biji buah pinang yang digunakan buah pinang yang sudah tua dengan kulit yang segar dan berwarna orange kemerahan.

Biji buah pinang yang sudah dibersihkan, lalu dikeringkan menggunakan oven suhu 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencengah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu,

menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk. Biji buah pinang kering, digiling dan diblender, diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis (Depkes RI 1985).

3. Pemeriksaan organoleptis serbuk biji buah pinang

Pemeriksaan organoleptis pada biji buah pinang meliputi pemeriksaan bentuk serbuk, warna, bau dan rasa. Pemeriksaan ini dilakukan untuk memastikan serbuk biji buah pinang (Kemenkes RI 2010).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan serbuk biji buah pinang dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Pengujian ini dilakukan dengan cara serbuk dari biji buah pinang ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'haus MB23 pada suhu 105°C selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia <10% (Kemenkes RI 2010).

5. Pembuatan ekstrak etanol biji buah pinang

Masukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Serbuk simplisia biji buah pinang ditimbang sebanyak 250 mg lalu dimasukkan dalam botol gelap, ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 2500 ml. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan 18 jam. Filtrat dipisahkan dengan ampas dengan cara difiltrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua filtrat dikumpulkan, dipekatkan dengan rotary evaporator serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Kemenkes RI 2010).

6. Uji bebas alkohol

Uji bebas alkohol ekstrak etanol biji pinang dengan cara ekstrak ditambahkan asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, bila tidak bau ester berarti ekstrak sudah tidak terdapat alkohol (Depkes RI 1993).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol biji buah pinang secara kualitatif dengan metode tabung

7.1 Identifikasi flavonoid. 0,5 gram serbuk dan 2 ml ekstrak ditambahkan air panas secukupnya, disaring dan filtrat yang diperoleh diambil 3 ml, ditambah serbuk magnesium, 2 ml larutan alkohol:asam asetat (1:1) dan pelarut amil alkohol. Dikocok kuat-kuat, dibiarkan memisah. Positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI 1995).

7.2 Identifikasi alkaloid. Larutan sampel 3 ml ditambah dengan sedikit larutan HCl 2N dengan dipanaskan, kemudian ditambahkan larutan Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan endapan reagen dragendroff terbentuk endapan warna coklat sampai hitam (Tiwatari *et al.* 2011).

7.3 Identifikasi tanin. Sampel 5 ml ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 10% warna berubah menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Robinson 1995).

8. Uji sitotoksik

8.1 Sterilisasi LAF. Sterilisasi LAF dilakukan dengan menyalakan lampu ultraviolet (UV) selama 15 menit sebelum digunakan kemudian pintu LAF ditutup. Selanjutnya, UV dimatikan, pintu LAF dibuka, dihidupkan lampu LAF dan permukaan LAF disterilkan dengan etanol (Freshney 2010).

8.2 Sterilisasi alat. Alat yang digunakan harus steril, dapat dicuci dengan detergen atau antiseptik lalu dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadestilata dalam 1 jam kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Setelah kering, alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121°C (Freshney 2010).

8.3 Pembuatan media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) dan media penumbuh sel HePG2. 10,4 gram/L serbuk media DMEM dilarutkan dengan *aquadestilata* kurang lebih 800 ml dalam *beaker glass* 1 L didalam LAF, aduk hingga rata. Tambahkan 2,2 gram NaHCO_3 (Natrium bikarbonat) dan 2 gram *hepes*. Larutan tersebut diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut. Diberikan larutan dapar (1 N NaOH atau 1 N HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambahkan lagi *aquadestilata* hingga volume larutan menjadi 1L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon $0,22\ \mu\text{m}$

ke dalam botol steril (dilakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label. Pembuatan media DMEM penumbuh (media kultur DMEM) dibuat dari 87,5 ml media DMEM ditambahkan 10 ml FBS 10%, Penstrep 2% (Penisilin-Streptomisin) sebanyak 2 ml dan 0,5 ml *fungizone* 0,5% (Freshney 2010).

8.4 Pembuatan media M-199. Pembuatan media M-199 untuk menumbuhkan sel vero, dilakukan dengan cara 9,5 gram media M-199 untuk 1 L dilarutkan dengan akuades kurang lebih 800 ml dalam *beaker glass* 1 L. Ditambahkan 2,2 gram NaHCO₃ dan 2 gram *hepes*. Semua bahan tersebut diaduk dengan stirer sampai semua bahan larut. Larutan diatur pHnya sampai 7,2-7,4 dengan menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Ditambahkan lagi *aquadestilata* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,2 µm ke dalam botol tertutup yang steril. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C dan diberi label. Untuk membuat media tumbuhnya dengan cara 86 ml M-199 *stock* ditambah 10 ml FBS, 2 ml antibiotika penisilin streptomisin dan 1 ml (Freshney 2010).

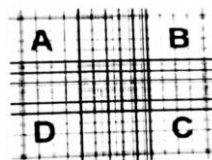
8.5 Pembuatan larutan uji. Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak uji (ekstrak biji buah pinang) selanjutnya dilarutkan dengan 100 µl DMSO, lalu disentrifus sampai homogen dan disimpan dalam ependrof. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar sampel untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Tiap jenis larutan stok kemudian dipipet 10 µl kemudian ditambah 90 µl media kultur sehingga konsentrasi akhir 100.000 µg/ml, selanjutnya dibuat dalam variasi konsentrasi untuk sampel ekstrak uji. Ekstrak biji buah pinang kemudian dibuat dalam seri konsentrasi (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81) µg/mL menggunakan stok yang diencerkan dengan kultur. Doksorubisin dibuat dalam seri konsentrasi (2; 1; 0,5; 0,25; 0,13; 0,06; 0,03) µg/mL.

8.6 Pengaktifan sel HepG2. Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Didalam LAF, sel HepG₂ dimasukkan dalam tabung sentrifuge lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media pembunuh DMEM

dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati dibawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup terlihat bulat, jernih, dan bersinar. *Flask* dimasukkan dalam inkubatr beraliran CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen jumlahnya cukup untuk penelitian (Freshney 2010).

8.7 Pengaktifan sel vero. Persiapkan alat dan kondisikan bahan pada suhu ruangan, diambil 10 ml PBS 1x Room Temperature (RT) pada tabung konikel, diambil ampul dari *freezer* -85°C (sel vero) atau tangki nitrogen dan dicairkan pada suhu 37°C, diambil suspensi sel dalam ampul, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam PBS 1x RT yang telah disiapkan. Sentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit, dibuang supernatan dan ditambahkan media M199 dan resuspensi hingga homogen, dipindahkan ke dalam wadah *flask* atau *petridish culture* dan ditambahkan media penumbuh M199 sebanyak 5 ml (Freshney 2010).

8.8 Panen dan perhitungan sel. Media dalam *tissue culture flask* dibuang, dicuci dengan PBS (phospat buffer saline) 2 kali. Kemudian ditambah 1 ml tripsin. Inkubasi selama 3-5 menit, diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh 2 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Terakhir ditambahkan media ad 10 ml dan disentrifugasi kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml media dan diresuspensikan. Diambil 10 µl dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.



Gambar 3. Hemositometer

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (A, B, C, D) setiap kamar terdiri 16 kotak. Dihitung sel yang gelap (mati) dan sel di batas luar di sebelah kiri dan atas tidak ikut dihitung. Sel di batas kanan dan bawah ikut dihitung. Dihitung jumlah sel per mL, rumus (Nugroho *et al.* 2012) :

$$\Sigma \text{sel/mL} = \frac{\Sigma \text{sel A} + \Sigma \text{sel B} + \Sigma \text{sel C} + \Sigma \text{sel D}}{4} \times 10^4$$

Panen sel dihitung volume yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus:

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{jumlah sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/mL}}$$

Volume panen sel diambil, ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan.

Jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 50×10^4 sel/100 μ l. Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% (37°C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai siap untuk diberi perlakuan ekstrak etanol biji buah pinang.

8.9 Treatment sel (pemberian ekstrak dan MTT). Sumuran-sumuran berisi suspensi sel ditambahkan 100 μ l larutan uji yaitu ekstrak etanol biji buah pinang yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81) μ g/ml tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media pembunuh DMEM untuk sel HepG₂ dan media pembunuh M199 untuk sel vero. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media penumbuh DMEM (sel HepG₂) dan M199 (sel vero). Setelah itu sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 24 jam. Akhir inkubasi medium masing-masing sumuran dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180°C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Dicuci dengan PBS sampai tidak berwarna. Kemudian ditambahkan 100 μ l MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali 4 jam pada inkubator CO₂ 5% suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan ditambahkan 100 μ l SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* lalu dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasi semalaman pada suhu kamar, lalu sel dikocok dengan *shaker* selama 10 menit. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm (Freshney 2010).

9. Uji indeks selektivitas

Sel vero ditanam pada microplate dengan konsentrasi 50×10^4 sel/100 μ l dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan ekstrak pada konsentrasi (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81) μ g/ml tiap sumuran dengan *cosolvent* DMSO dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 μ l media kultur M199 dan 10 μ l MTT 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (SDS 10% dalam HCl 0,01 N), *plate* dibungkus agar tidak tembus cahaya dan dibiarkan selama satu malam. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm (Freshney 2010).

E. Analisis Data

1. Uji sitotoksisitas

Dari hasil uji sitotoksik yang berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{(\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak etanol biji buah pinang) *versus* persen sel hidup menggunakan *Microsoft Excel* 2010, hingga akan didapatkan persamaan:

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

x = konsentrasi sampel uji

y = probit % viabilitas sel

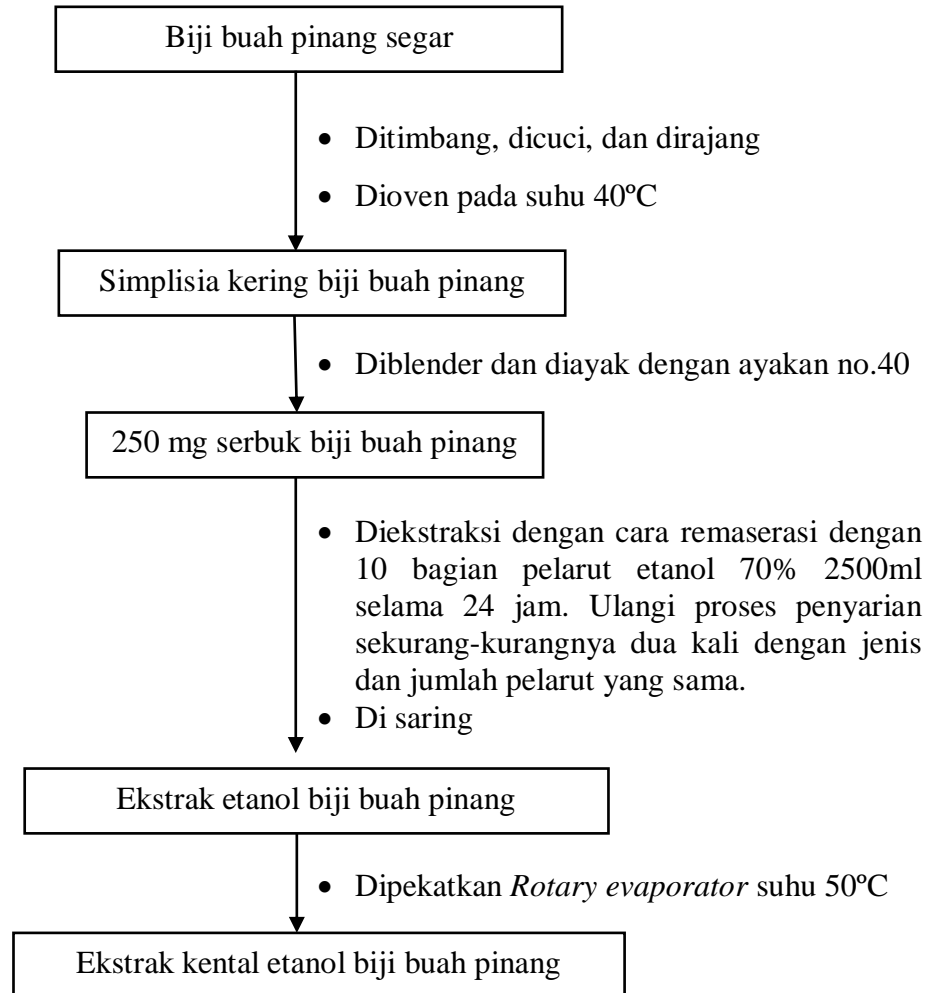
Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC₅₀

2. Indeks selektivitas

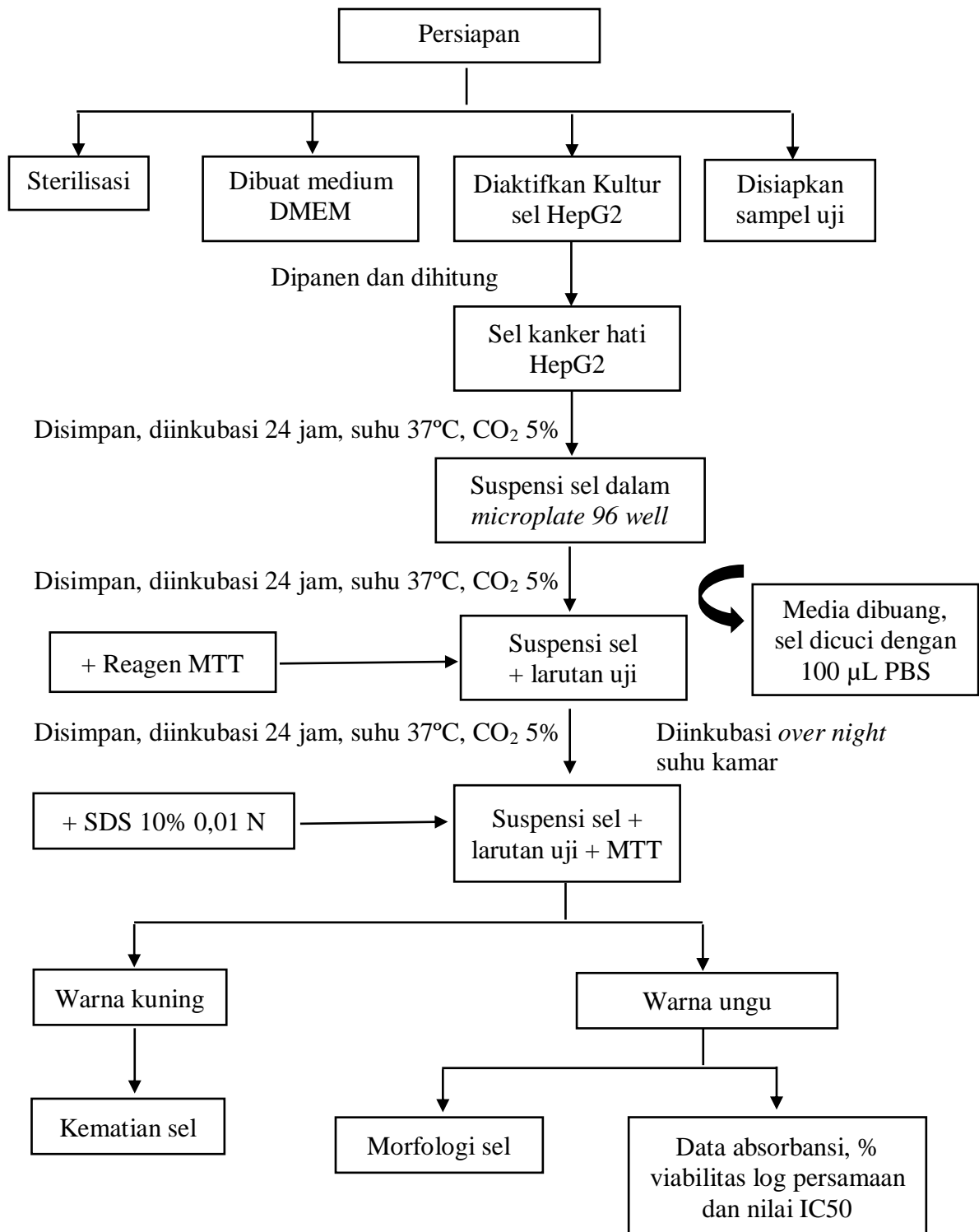
Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini:

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel vero}}{IC_{50} \text{ sel kanker}}$$

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 4 (ditinjau dari hal.28). Skema pembuatan ekstrak biji buah pinang (*Arecha catechu* L.)



Gambar 5 (ditinjau dari hal.29). Skema uji sitotoksik biji buah pinang (*Arecha catechu L.*)