

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang yang didapat dari tanaman temu putih.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol rimpang temu putih yang diperoleh dengan metode penyarian maserasi. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah hasil uji sitotoksik ekstrak etanol rimpang temu putih terhadap nilai IC_{50} pada sel kanker T47D dan sel Vero. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah sel kanker T47D dan sel Vero yang dalam kondisi percobaannya. Variabel utama yang keempat dalam penelitian ini adalah jumlah protein 53 pada kultur sel T47D.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol rimpang temu putih yang diujikan pada sel kanker payudara (T47D) dan sel normal vero.

Variabel tergantung merupakan variabel yang sengaja diteliti dari variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktifitas sitotoksik ekstrak etanol rimpang temu putih terhadap sel kanker payudara (T47D) dan jumlah protein 53 pada kultur sel T47D.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap mempunyai pengaruh selain variabel bebas yaitu kondisi pengukuran dalam pipet, kondisi laboratorium yang digunakan dan sel kanker yang digunakan.

3. Definisi Operasional variabel utama

Pertama, rimpang temu putih adalah tanaman temu putih yang didapat dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol rimpang temu putih adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk temu putih sebanyak yang diekstraksi menggunakan etanol sebanyak 7,5 berat serbuknya.

Ketiga, kultur sel T47D adalah sel kanker payudara T47D yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Keempat, kultur sel Vero adalah sel normal yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Kelima, menghitung sel yang sudah dikembangbiakkan kemudian dihitung menggunakan bilik hitung dengan menggunakan mikroskop

Keenam, adakah aktivitas sitotoksik yang diperoleh dari nilai IC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan ketoksikan setelah pemberian ekstrak etanol rimpang temu putih yang diinkubasi selama semalam setelah distop aktivitasnya menggunakan SDS (Sodium Dodesil Sulfat) dengan metode MTT assay.

Ketujuh, MTT Assay yaitu metode uji sitotoksik yang hasil akhir dengan penambahan *sds* dapat menghasilkan kristal formazan.

Kedelapan, nilai indeks selektivitas adalah perbandingan nilai IC_{50} ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sel vero terhadap sel kanker payudara T47D.

Kesembilan, adalah pengaruh jumlah protein 53 terhadap kultur sel T47D.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk maserasi seperangkat alat gelas, timbangan, mesin penggiling simplisia, *evaporator*, kertas saring, botol penampung. Alat yang digunakan untuk penetapan kadar air menggunakan *sterling – bidwell*. Alat yang digunakan untuk perlakuan sel kanker *autoklaf*, *laminar air flow*, *elisa reader*, *well plate 96*, mikroskop monokuler, Sentrifus, kaca objek hitung sel, inkubator, pipet *ependrof*, timbangan analitik, *homositometer*. *ELISA plate reader*.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah rimpang temu putih yang diperoleh dari balai besar penelitian dan pengembangn tanaman obat dan obat tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Bahan kimia yang digunakan adalah Etanol, *Pbs* (media stok), *Tripsin*, (dapar fosfat), *Sds* (sodium dodesil sulfat), Media (dmem), *Fungizon* 10%, *penistrep* 0,5%, media stok 87,5%, Sampel Sel t47d Sel vero, *tripsin* 0,1%, Aqua Destilata

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Dalam penelitian ini tahap yang pertama kali dilakukan yaitu determinasi tanaman temu putih, dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran sampel temu putih, dengan cara mencocokkan ciri – ciri, morfologi yang terdapat dalam tanaman temu putih sehingga dapat menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari bahan dengan tanaman lain. Determinasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah .

2. Persiapan bahan

Rimpang temu putih yang masih segar dicuci bersih dengan air mengalir selanjutnya dikeringkan dengan oven 60°C. Tanaman ini diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional

(B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 60, selanjutnya dilakukan perhitungan presentase bobot kering terhadap bobot basah.

3. Penetapan kadar air serbuk rimpang temu putih

Penetapan kadar air serbuk rimpang temu putih dilakukan dengan menggunakan alat *sterling-bidwell*. Serbuk rimpang temu putih ditimbang sebanyak 10 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen sampai serbuk terendam, memasang alat *sterling-bidwell* selanjutnya dipanaskan. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, selanjutnya diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala yang ada dialat tersebut kemudian dihitung % air dari berat contoh (Sudarmaji *et al.* 1997)

4. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*)

Serbuk simplisia yang telah kering selanjutnya dilakukan penyarian yaitu dengan metode remaserasi dengan 2 kali penyarian menggunakan 10 bagian pelarut, rmdam selama semalam sesekali digojok. Maserat ditampung kemudian pelarut diuapkan dengan menggunakan alat *Rotary Evaporator* sehingga diperoleh ekstrak etanol kental, kemudian rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat (Depkes RI 2010).

5. Uji Residu etanol

Ekstrak kental yang didapatkan dilakukan *esterifikasi* dengan cara ekstrak dilakukan penambahan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil positif bebas etanol jika tidak ada bau ester yang khas dari etanol.

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*)

6.1 Flavonoid. Metode yang digunakan metode uji sianidin dengan cara sebanyak 5ml filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol, jingga sampai merah untuk flavon, merah tua flavanol, merah tua sampai merah keunguan untuk flavanon (Franswort 1966)

6.2 Saponin. Sebanyak 0,5 g serbuk tambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat kuat selama 10 detik, terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1- 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang (Depkes RI 1980)

6.3 Kurkumin. Dalam ekstrak etanol *curcuma zedoaria* dilakukan dengan menotolkan baku *curcumin* dengan ekstrak etanol *curcuma zedoaria* pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak campuran *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan 2 : 2 sehingga didapat nilai *r_f*, bercak dan warna dari standar Kurkumin. Kurkumin berfloresensi biru pada panjang gelombang 366.

6.4 Minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri dalam ekstrak etanol *curcuma zedoaria* dilakukan dengan menotolkan baku timol dengan silika gel GF254 dengan fase gerak toluen – etil asetat (93:7), penampakan noda UV 254 nm, UV 366 nm, pereaksi anisaldehyd asam sulfat (dipanaskan 100 °C selama 5 – 10 menit, bila dengan pereaksi memberikan noda berwarna biru, Violet, merah, atau coklat beberapa senyawa berfluorosensi di bawah sinar UV 366 nm.

7. Serilisasi 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 70% dan keringkan dengan tisu, nyalakan lampu spiritus. Jika isi spiritus habis, diisi kembali terlebih dahulu, terakhir dimasukkan alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam LAF.

8. Sterilisasi Alat

Peralatan yang digunakan harus dalam keadaan 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 diberi tanda dan dimasukkan kedalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121 °C.

9. Prosedur Kerja

9.1 Pembuatan media kultur DMEM. Menyiapkan media padat yang akan digunakan, menyiapkan 950 ml akuabides steril dalam gelas beker 1000 ml

dalam LAF, media bubuk dituang ke dalam akuabides steril ke dalam gelas beker, diaduk hingga rata, pembungkus media bubuk dibiilasi dengan akuabides, cairannya dituang ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan 2,2 g NaHCO_3 untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata, akuabides steril ditambahkan hingga volume 1000 ml, diaduk dengan magnetik *stirer* hingga semua media padat dan NaHCO_3 dapat larut, melakukan cek pH (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N, melakukan filtrasi media dengan sterilisasi filter 0,2 mikron, media ditampung ke dalam botol Duran 1000 ml, media ditandai dan disimpan dikulkas dengan suhu 4 °C.

9.2 Menumbuhkan sel dari tangki nitrogen cair (*Cell Thawing*). Sel apabila tidak digunakan dalam penelitian disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk waktu penyimpanan yang lama, atau disimpan dalam suhu -80 °C untuk disimpan selama 2-3 bulan. Sel ditumbuhkan kembali dalam medium saat akan digunakan dalam uji *in vitro*. Dalam proses penumbuhan sel perlu diperhatikan beberapa faktor agar sel dapat tumbuh dengan baik pada mediumnya, sehingga hasil analisis yang diperoleh menjadi valid.

Prosedur kerjanya menyiapkan aliquot media kultur yang sesuai untuk sel, yaitu 3 ml media kultur dalam *conical tube* baru. Sel dimasukkan dish untuk subkultur dan beri penandaan terlebih dahulu meliputi nama sel, tanggal CCRC, kemudian mengambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel dari tangki nitrogen cair (atau dari freezer -80°C berlabel “CCRC”), suspensi dicairkan sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga tepat mencair, diambil suspensi sel dengan mikropipet 1000 μl , dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media kultur yang telah disiapkan, tutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* pada 600 g selama 5 menit, kembali ke dalam LAF. menyemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70 %, membuka *conical tube*, kemudian supernatan media kultur dituang ke dalam pembuangan, kemudian ditambahkan 4 ml media kultur baru, meresuspensi kembali sel hingga homogen, sel ditransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 dish, media kultur ditambahkan masing-

masing 5 ml ke dalam dish, homogenkan. kondisi sel diamati dengan mikroskop, terakhir sel disimpan ke dalam inkubator CO₂.

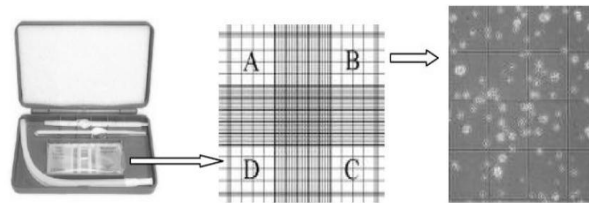
9.3 Penggantian media. Aliquot *PBS* dan MK didalam *conical tube*. dihisap dan dibuang media lama secara perlahan dengan mikropipet atau pipet Pasteur. *PBS* dituang 3 ml ke dalam *dish*, dish digoyang-goyangkan ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel. *PBS* dibuang dengan mikropipet atau pipet Pasteur, Tuang 5-7 ml media kultur ke dalam *dish* yang berisi sel. Jumlah sel dihomogenkan dan amati kondisi dan secara kualitatif pada mikroskop *inverted*. Terakhir sel diinkubasi semalam dan diganti media kultur jika sudah berwarna merah pucat.

9.4 Panen sel. Kultur sel yang telah membentuk monolayer konfluen 80% mulai dapat digunakan untuk pengujian atau disubkultur. Proses pengambilan sel yang telah konfluen disebut panen sel. Poin utama dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel itu sendiri. Prosedur pemanenan sel, sel diambil dari inkubator CO₂, sel diamati kondisi. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen, media dibuang dengan menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steril. Sel diuci diulang 2 kali dengan *PBS* (volume *PBS* adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal). Sel ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Sel ditambahkan media ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin. Sel diamati keadaan sel di mikroskop. Sel diresuspensi kembali jika masih ada yang menggerombol. Sel ditransfer yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru.

9.5 Perhitungan sel. Prosedur perhitungan sel meakukan panen sel sesuai protokol panen sel, meresuspensi sel di conical tube dari hasil panen sel, mengambil 10 μ l panen sel dan dipipet ke hemasitometer. menghitung sel di bawah mikroskop *inverted* atau dengan *counter*. Untuk sel yang akan ditanam (untuk perlakuan) melakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan kedalam *conical* yang lain dan ditambahkan media kultur sesuai dengan konsentrasi yang

dikehendaki. Sisa suspensi sel pada *conical tube* dilakukan *cryopreservation*, atau dilakukan sub kultur.

9.6 Cara perhitungan.



Gambar 4. Bilik hitung sel

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Hitung sel pada 4 kamar hemositometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Hitung jumlah sel per mL dengan rumus dibawah.

$$\text{Jumlah sel terhitung} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Menghitung jumlah total sel yang diperlukan. Misal untuk menanam sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang diperlukan adalah $5 \times 10^3 / \text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran}$ (dibuat lebih) = 5×10^5 Hitung volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus seperti di bawah ini:

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

Mengambil volume panen sel transfer ke *conical tube* baru kemudian tambahkan media kultur sampai total volume yang diperlukan. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100 μl media kultur berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel = $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$.

9.7 Sub kultur. Sel yang telah konfluen memerlukan tempat kosong untuk dapat tumbuh kembali. Proses pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat tumbuh yang masih kosong disebut sebagai subkultur sel. Prosedur sub kultur ini penting agar sel yang akan digunakan untuk pengujian dapat tumbuh dengan maksimal pada medianya. Lakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel, Resuspensi suspensi sel didalam *conical tube*. mengambil 300 μl panen sel dan

dimasukkan ke dalam *conical* yang lain. menambahkan 5-7 ml MK dan resuspensi kembali, sel dituang ke dalam dish baru yang telah disiapkan. Penanaman secara homogen dan amati kondisi sel, sel dinkubasi semalam dan diganti MK jika medium sudah berwarna merah pucat.

9.8 Preparasi sampel. Sampel yang akan diujikan ke dalam kultur sel harus memenuhi persyaratan utama yaitu larut dalam media kultur dan kelarutannya tersebut dibantu oleh *cosolvent* seperti DMSO. Dalam membuat seri konsentrasi sampel untuk pengujian perlu diperhatikan kelipatan konsentrasi agar hasil regresi yang diperoleh yang baik yang sesuai dengan standar ditimbang sampel kurang lebih 5 mg dengan saksama di dalam eppendorf, uji kelarutan sampel dalam DMSO, ditambahkan 50 μ l DMSO dan kemudian dilarutkan dengan bantuan vortex. Jika belum larut, ditambahkan 50 μ l DMSO lagi dan larutkan kembali dengan bantuan vortex, membuat stok baru sampel dalam DMSO setiap kali akan digunakan untuk perlakuan (*recentur paratus*). membuat seri kadar sampel dengan pengenceran stok dalam DMSO menggunakan media kultur. Jika terjadi endapan pada pengenceran pertama, jangan dilanjutkan dan pikirkan dahulu solusinya agar sampel dapat larut, kemudian diulangi lagi pembuatan seri kadar dari stok DMSO.

9.9 Uji sitotoksik.

9.8.1 Penanaman sel. Mengambil sel dari inkubator CO₂, sel.diamati kondisinya jika sudah sesuai melakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel, perhitungan sel dilakukan sesuai protokol perhitungan Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik dengan metode MTT adalah 5×10^4 sel/sumuran. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l. Setiap kali mengisi 12 sumuran, diresuspensi kembali sel agar tetap homogen. Disisakan 3 sumuran kosong jangan diisi sel, untuk kontrol media. Keadaan sel diamati di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan dokumentasikan. Sel dinkubasi didalam inkubator selama minimal 4 jam (agar sel *attach* kembali setelah panen). Jika sel belum attach, maksimal waktu inkubasi adalah 24 jam, perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal, selalu diamati kondisi sel sebelum perlakuan.

9.8.2 Perlakuan Sampel pada Sel. Sel dicek terlebih dahulu, jika sudah siap membuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan, plate dari inkubator CO₂ diangambil untuk di bawa ke LAF, media sel dibuang (balikkan plate 180°) diatas tempat buangan dengan jarak 10 cm, kemudian plate ditekan secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. PBS dimasukkan 100 µl ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang dengan cara membalik plate kemudian ditiriskan sisa cairan dengan tisu. Sampel dimasukkan dengan konsentrasi yang telah ditentukan kedalam sumuran (triplo). Sampel dimulai dari konsentrasi paling rendah sesuai peta perlakuan, diinkubasi dalam inkubator CO₂. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam (waktu inkubasi total 24-48 jam).

9.8.3 MTT dan stopper. Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan, reagen MTT disiapkan untuk perlakuan 0,5 mg/ml dengan cara ambil 1 mL stok MTT dalam PBS 5mg/mL, reagen MTT diencerkan dengan MK ad 10 mL untuk 1 buah 96 *well plate* Stok MTT dibuat dengan cara menimbang 50 mg serbuk MTT, melarutkan dalam *PBS* ad 10 ml. Simpan dalam freezer tertutup aluminium foil, menggunakan sarung tangan saat melakukan reagen MTT karena bersifat karsinogen, media sel dibuang, *plate* dicuci *PBS*, reagen MTT ditambahkan 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel), *plate* diinkubasi sampai terbentuk formazan, sel diinkubasi selama 2-4 jam didalam inkubator CO₂, kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*, jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* 100 µL SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Tidak menggunakan LAF, *plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi ditempat gelap pada temperatur kamar selama semalam, *plate* yang telah dibungkus jangan diletakkan diinkubator.

9.8.4 Elisa Reader. Mengidupkan *ELISA reader*, ditunggu proses *progressing* hingga selesai, pembungkus *plate* dibuka dan *plate* ditutup. Dan dimasukkan ke dalam *ELISA reader* dibaca absorbansi masing-masing sumuran

dengan ELISA *reader* dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm, tekan tombol *start*), dimatikan kembali ELISA *reader*. Disimpan dan tempel kertas hasil ELISA pada log book. Setiap kali pembacaan di ELISA *reader*, dicatat dibuku catatan pemakaian ELISA READER, dibuat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi. Prosentase sel hidup dihitung dan dianalisis harga IC_{50} dengan Excell (Regresi linear dari log konsentrasi) atau SPSS (Probit/Logit).

9.10 Uji indeks selektivitas. Uji pada penelitian ini digunakan sebagai indikasi selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel normal, yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal (Furqon 2014). Nilai indeks selektivitas diperoleh dengan menggunakan metode MTT dari rasio IC_{50} sel Vero dibandingkan dengan IC_{50} sel kanker yang diuji. Apabila nilai indeks selektivitas lebih tinggi dari 3 menunjukkan bahwa obat atau ekstrak memiliki selektivitas yang tinggi (Prayong *et al* 2008).

9.11 Imunositokimia.

9.11.1 Pemanenan sel. Mengambil sel dari inkubator CO₂, kondisi sel diamati, melakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel, menyiapkan *24 well plate* dan *cover slip*. Coverslip dimasukkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati. Suspensi sel ditransfer 200 μ l diatas coverslip secara merata dan perlahan, kemudian didiamkan selama 3-30 menit dalam inkubator agar sel menempel pada coverslip, media kultur ditambahkan sebanyak 800 μ l ke dalam sumuran secara perlahan, sel diamati keadaan di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, media sel ganti dan inkubasikan kembali.

9.11.2 Perlakuan Imunositokimia Sampel pada Sel. Setelah sel normal kembali, membuat satu konsentrasi sampel, yaitu pada IC_{50} untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l. mengambil *24 well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂. Semua MK (media kultur) dibuang dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan. Diisikan PBS (Phospat Buffered Saline) masing-masing 500 μ L ke dalam sumuran untuk mencuci sel. PBS dibuang dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan. Sampel dimasukkan sebanyak 1000 μ L ke dalam sumuran kemudian ditambahkan 1000 μ L media kultur untuk kontrol sel (2

kontrol sel). Diinkubasi di dalam inkubator CO₂ (Lama inkubasi sel tergantung dari protein yang akan diamati) amati kondisi sel sebelum difiksasi, disiapkan metanol dingin dan PBS. Sel diinkubasi dihentikan (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF) dibuang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan. PBS diisi 500 µl ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel, PBS dibuang dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan. mengambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati. Diletakkan di dalam sumuran *6-well plate* bekas atau dish bekas yang bersih,

Beri label pada masing-masing sumuran perlakuan, diteteskan 300 µl metanol dingin, diinkubasi 10 menit didalam *freezer*, dibuang metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik. Jika pengecatan akan dilanjutkan pada hari berikutnya, simpan *cover slip* didalam *freezer* ditambahkan 500 µl PBS pada *cover slip*, didiamkan selama 5 menit. Mengambil dan PBS dibuang dengan mikropipet 1000 µl. Melakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2 kali. Proses ini dilakukan untuk mencuci sel dari sisa metanol. Ditambahkan 500 µl akuades, didiamkan selama 5 menit. Akuades dibuang, melakukan pencucian dengan akuades 2 kali. Proses ini dilakukan untuk mencuci sel. Ditetesi larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*). Diinkubasi selama 10 menit.

Larutan dibuang, proses ini dilakukan untuk mencegah pengecatan yang tidak spesifik. Ditetesi antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, lama inkubasi antibodi primer tergantung pada antibodi yang digunakan. Jika diinkubasi overnight, sampel disimpan dalam keadaan lembab dan disimpan dalam suhu 20°C, ditambahkan 500 µl PBS. Diinkubasi selama 5 menit. PBS dibuang. Ditetesi antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), diinkubasi selama 10 menit, ditambahkan 500 µl PBS. Diinkubasi selama 5 menit, PBS dibuang, ditambahkan 500 µl PBS, Inkubasi selama 5 menit, PBS dibuang, diteteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit, ditambahkan akuades 500 µl, kemudian buang kembali, diteteskan larutan MayeHaematoxylin, dinkubasi selama 3 menit, ditambahkan

akuades 500 μ l, kemudian buang kembali, *cover slip* diangkat dengan pinset secara hati-hati, kemudian dicelupkan dalam xylo. diletakkan *cover slip* di atas *object glass*, tetesi dengan lem (*mounting media*) dan ditutup *cover slip* dengan *cover slip* kotak, Amati ekspresi protein dengan mikroskop *inverted*.

E. Analisa Hasil

1. Menghitung nilai IC₅₀

Pertama hasil pengujian sitotoksik ekstrak etanol temu putih (*curcuma zedoaria*) dapat dihitung dengan persen viabilitas sel. Pada percobaan diperoleh absorbansi 3 macam kontrol dan senyawa uji meliputi : Kontrol sel : berisi media kultur + sel, kontrol pelarut : berisi media kultur + sel + DMSO dengan konsentrasi terbesar pada seri konsentrasi) % DMSO terbesar dilihat dari konsentrasi DMSO dalam seri konsentrasi sampel yang paling pekat, kontrol media : berisi media kultur, senyawa uji berisi : media kultur + sel + senyawa uji. dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ presentase sel hidup} = \frac{\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut:

$$\% \text{ presentase sel hidup} = \frac{\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Kemudian dilanjutkan untuk menentukan regresi linier antara log konsentrasi sediaan uji versus persen sel hidup, hingga didapatkan persamaan $Y = a + bx$

Keterangan

X = log konsentrasi sediaan (μ g/ml)

Y = % sel hidup

IC₅₀ = anti log x

2. Indeks Selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini:

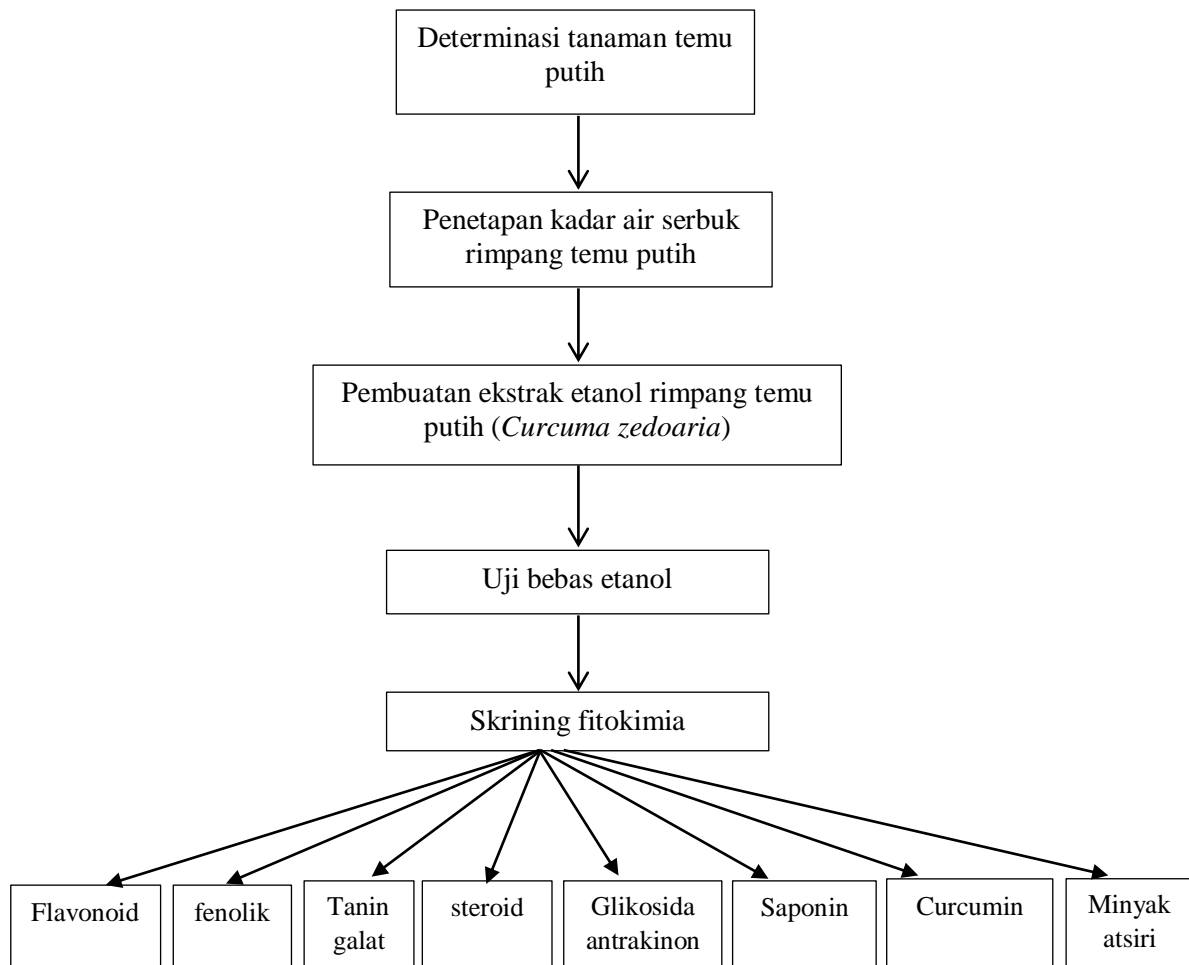
$$\text{Indeks Selektivitas} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Sel Vero}}{\text{IC}_{50} \text{ Sel Kanker}}$$

3. Metode Imunositokimia

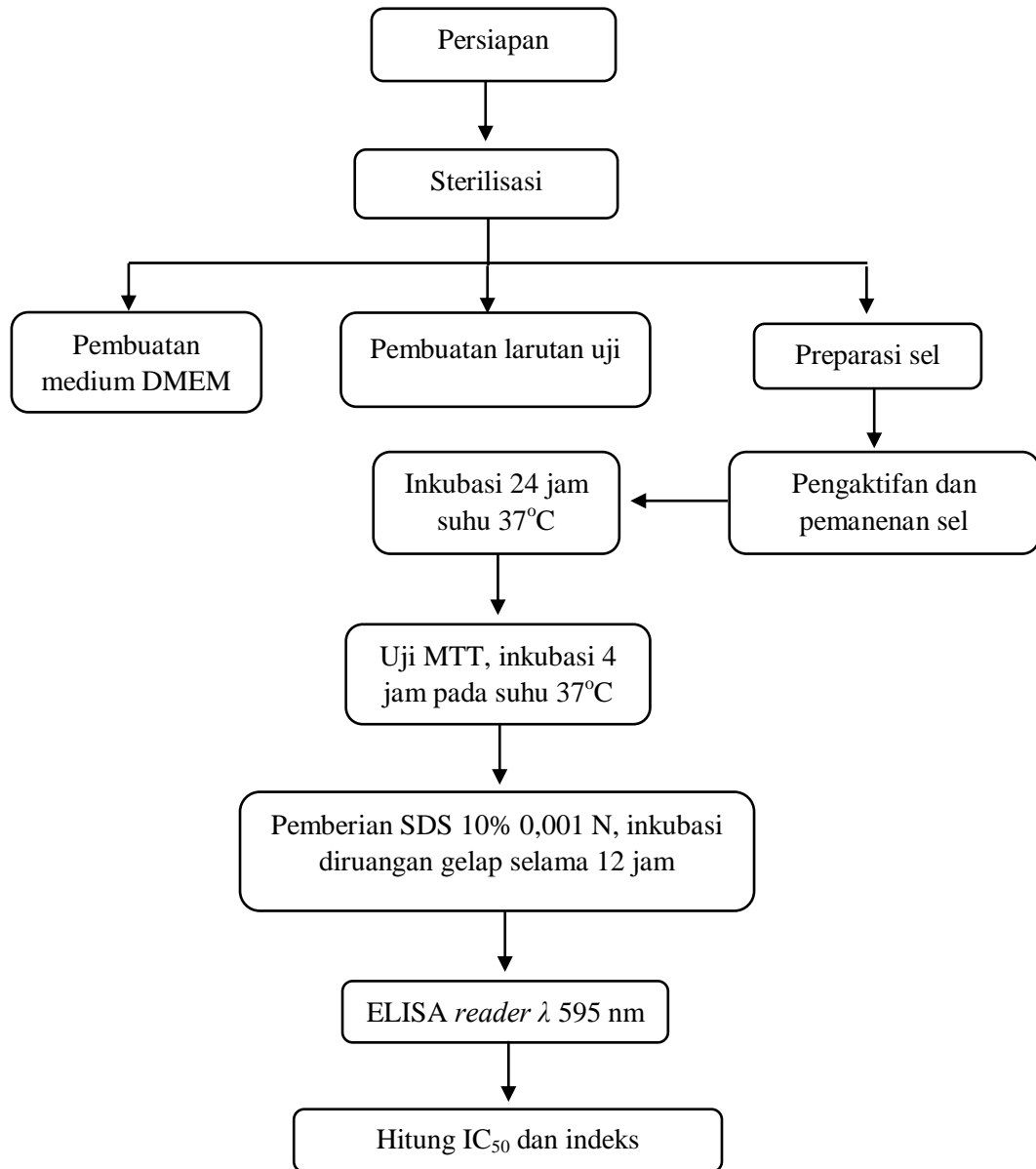
Kedua ekspresi gen dengan metode imunositokimia Pengamatan ekspresi protein p53 dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang

mengekspresikan p53 akan memberikan warna coklat di inti sel sedangkan yang tidak mengekspresikan p53 berwarna biru atau ungu. Persentase sel yang terekspresi dihitung menggunakan rumus :

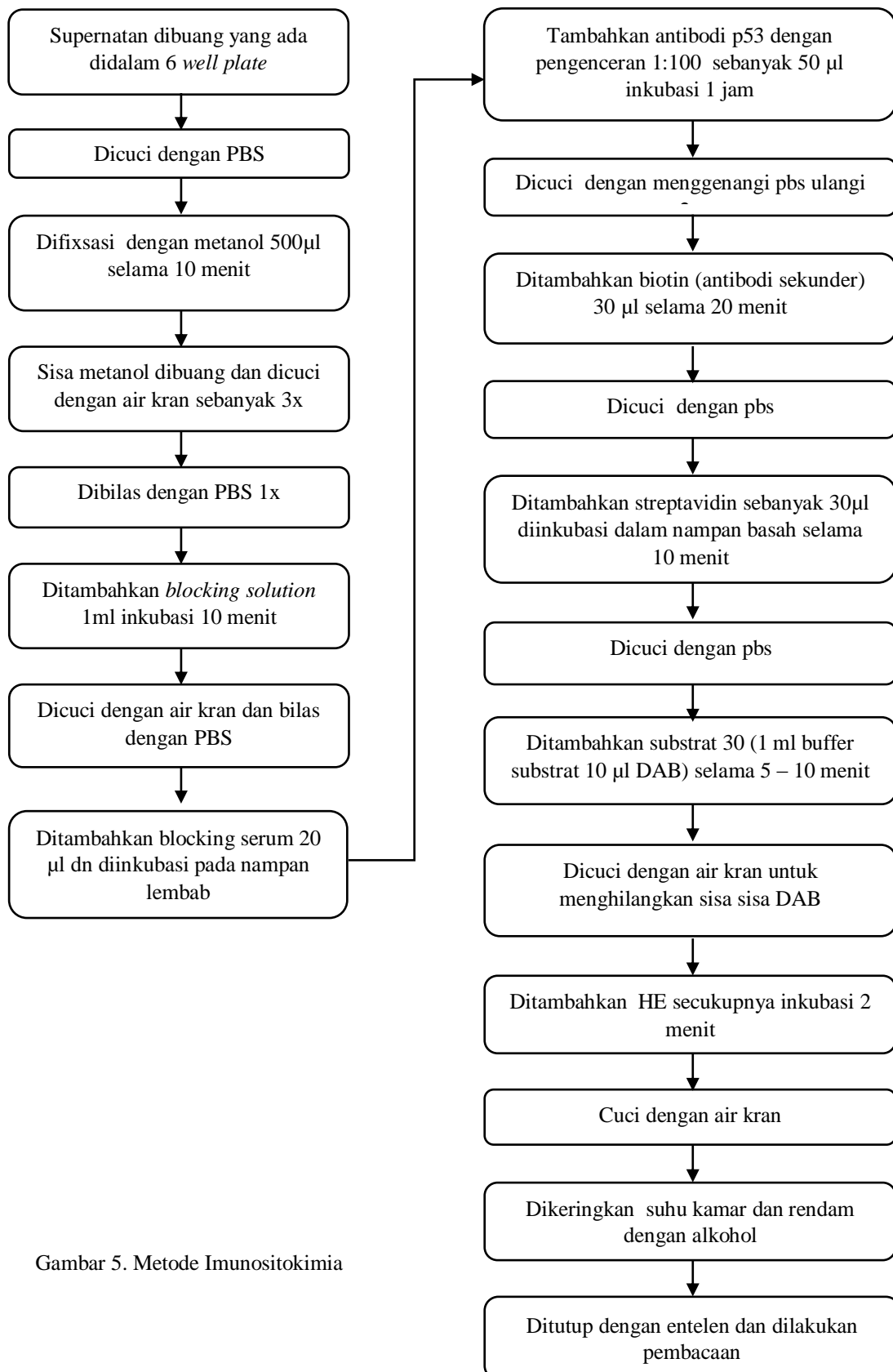
$$\text{Persentase ekspresi p53} = \frac{\text{Jumlah sel yang terekspresi}}{\text{jumlah sel seluruhnya}} \times 100\%$$



Gambar 5. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih



Gambar 6. Skema uji sitotoksik ekstrak etanol rimpang temu putih



Gambar 5. Metode Imunositokimia