

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua objek yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong yang diperoleh dari petani di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Jadi sampel merupakan bagian dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian dalam keadaan segar dan tidak busuk.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah ekstrak etanol 70% daun binahong.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik ekstrak etanol 70% daun binahong terhadap sel kanker payudara T47D.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara T47D.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang dapat diklasifikasi ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung variabel terkontrol, dan variabel kendali.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel utama yang diubah – ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan – perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun binahong.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel kanker payudara dan sel Vero dengan menghitung sel yang mati.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi sehingga perlu dinetralkan atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dengan penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk bahan, peralatan, suhu, tekanan inkubator, lama waktu inkubasi serta jumlah sel setiap sumuran, dan media yang digunakan dalam penelitian ini.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun binahong adalah bagian daun muda maupun tua dari tanaman binahong yang didapat dari petani di Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun binahong adalah daun binahong yang dikeringkan, diserbuk, dan diayak menggunakan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun binahong adalah hasil ekstraksi daun binahong dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang diukur berdasarkan parameter IC<sub>50</sub>.

Kelima, nilai IC<sub>50</sub> adalah nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Keenam, nilai indeks selektivitas > 3,00 adalah nilai yang menunjukkan senyawa memberikan toksitas selektif terhadap sel kanker.

Ketujuh, sel kanker payudara T47D adalah *cell line* T47D koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang ditumbuhkan dalam media penumbuh.

Kedelapan, sel Vero adalah *cell line* yang berasal dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang ditumbuhkan dalam media penumbuh.

Kesembilan, MTT *assay* adalah metode uji sitotoksik untuk menentukan jumlah sel kanker payudara yang hidup pada masing – masing konsentrasi.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah serbuk kering daun binahong, etanol 70%, aquadest, NaOH, HCL encer, Amonia pekat, Etil Asetat, Dragendorf, Mayer, Wgner, Serbuk Mg, Asam Sulfat pekat, dan Sitroborat. Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker payudara T47D dan sel Vero (Koleksi Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta), MTT (Sigma), amfoterisin 0,5% (Fungizon), FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, dan penisilin–streptomisin 1%. HEPES (*N-2-hydroxyethyl piperazin-N-2ethanesulfonic acid*) (Sigma), Dimetil sulfoksida (DMSO), tripsin 0,5%.

Pelarut sampel RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) untuk sel kanker payudara T47D), Pelarut M199 (untuk sel Vero), larutan *stopper*: SDS (*Sodium dodesil sulfat*) 10% dalam HCL 0,1 N, larutan pencuci: PBS (*Phospat Buffer Saline*) pH 7,2, dan lainnya yang dibutuhkan dalam pengujian aktivitas sitotoksik secara *in vitro*.

### 2. Alat

Alat pembuatan sampel yang digunakan meliputi oven, bejana maserasi, corong pisah, cawan porselen, alat penggiling, ayakan no 40, pisau, flanel, kertas saring, corong *buchner*, *moisture balance*, corong pisah, evaporator, neraca analitik, lampu UV, *sterling-bidwel*, tabung reaksi, dan batang pengaduk.

Alat uji sitotoksik adalah sebagai berikut: *centrifuge*, *vortex*, autoklaf, filter 0,2 m, mikropipet, tangki nitrogen cair, lemari pendingin, pipet tetes, inkubator, CO<sub>2</sub> 5%, *laminar air flow*, *microplate* 96 sumuran, pipet eppendorf, *neubauer haemocytometer*, tabung konikel steril, *tissue culture flask*, mikroskop *inverted*, neraca analitik, tabung eppendorf, dan spektrokolorimeter pada alat ELISA reader.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman binahong

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman binahong dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi. Hal ini dilakukan

dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

## **2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan sampel daun binahong**

Pengumpulan tanaman binahong yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong yang diperoleh dari petani di Tawangmangu. Daun binahong yang diambil adalah daun muda maupun tua yang masih segar dan tidak busuk.

Daun binahong dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada binahong. Daun binahong dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50° C. Daun binahong yang telah kering dibuat serbuk menggunakan alat penggiling dan diayak dengan ayakan no 40. Tujuan pembuatan serbuk adalah untuk memperkecil ukuran partikel. Serbuk yang dihasilkan dilakukan uji organoleptis.

## **3. Penetapan susut pengeringan**

Penetapan susut pengeringan daun binahong dilakukan dengan cara serbuk dari daun binahong ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* pada suhu 105°C, dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat di mana kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **4. Pembuatan ekstrak daun binahong**

Pembuatan ekstrak daun binahong berdasarkan prosedur pada Kemenkes RI (2013). Sebanyak 800 gram serbuk daun binahong dimaserasi menggunakan etanol 70 % sebanyak 8 L. Disimpan pada suhu kamar selama 18 jam ke dalam bejana yang terlindungi dari cahaya matahari. Filtrat dipisahkan dari ampasnya, proses penyarian diulangi sekurang – kurangnya satu kali dengan jumlah pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak 4 L. Seluruh ekstrak yang didapat ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, pengeringan dilanjutkan dengan oven pada suhu 50° C sehingga didapatkan ekstrak kental.

## 5. Penetapan kadar air pada ekstrak

Pengujian ini menggunakan metode *Sterling Bidwell*. Sebanyak 6 gram ekstrak etanol daun binahong dimasukkan ke dalam labu didih. Ditambahkan 200 mL toluena ke dalam labu didih melalui bagian atas alat refluks. Proses destilasi dilakukan selama 3 jam atau hingga air yang dihasilkan pada tabung penampung tidak bertambah lagi. Setelah proses destilasi, jumlah air yang dihasilkan dapat diketahui dengan menentukan volume air pada tabung penampung. Kadar air dihitung berdasarkan volume air yang dihasilkan dikalikan massa jenis air lalu dibagi dengan berat sampel yang dianalisis (Depkes 2000).

## 6. Identifikasi kandungan kimia sampel daun binahong dengan metode tabung

**6.1 Flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium, 10 tetes HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

**6.2 Steroid dan triterpenoid.** 0,5 gram ekstrak ditambahkan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial sebanyak 10 tetes dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Larutan menjadi positif pada triterpenoid jika larutan berubah menjadi warna merah atau ungu, dan larutan positif pada steroid jika larutan berubah menjadi warna biru atau hijau (Surbakti 2018).

**6.3 Alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform secukupnya dan 10 mL amonia lalu ditambahkan 10 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dipindahkan dalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 mL. Ketiga larutan diuji dengan pereaksi Mayer, dragendorf dan wagner. Larutan positif pada pereaksi mayer ditunjukkan dengan adanya endapan putih, larutan positif pada pereaksi dragendorf dengan berubahnya larutan menjadi warna merah jingga, dan larutan positif pada pereaksi wagner dengan berubahnya warna larutan menjadi warna coklat (Surbakti 2018).

**6.4 Tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas, kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida, keberadaan tanin dalam sampel ditandai dengan timbulnya warna hijau kehitaman (Surbakti 2018).

**6.5 Saponin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL *aquadestilata* kemudian dikocok kuat selama kurang lebih 1 menit. Selanjutnya didiamkan dan diamati buih atau busa yang terbentuk. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil (Surbakti 2018).

## 7. Sterilisasi

**7.1. Sterilisasi LAF.** Sterilisasi LAF dilakukan dengan caramenyalaikan ultraviolet (UV) selama 15 menit sebelum digunakan kemudian pintu LAF ditutup. Selanjutnya lampu UV dimatikan dan pintu LAF dibuka. Lampu LAF dihidupkan kemudian permukaan LAF disterilkan dengan etanol 70%.

**7.2. Sterilisasi alat.** Alat-alat gelas yang akan digunakan harus dalam keadaan steril, dapat dicuci dengan deterjen atau antiseptik, dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadest selama 1 jam, dikeringkan dalam oven 24 jam. Setelah kering, alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

## 8. Pembuatan media biakan dan penumbuh sel

Media yang digunakan untuk biakan dan pertumbuhan antara lain adalah serbuk RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dan M199. Pembuatan media tersebut masing – masing sebanyak 1 L dengan cara dimasukkan ke dalam aquabidestilata kira – kira 800 mL, ditambah natrium bikarbonat 2 gram dan HEPES 2 gram, ditambah aquabidestilata sampai 1 L. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik sekitar 10 menit hingga homogen, lalu didapar dengan HCl 1 N hingga pH 7,2 – 7,4.

Media penumbuh sel dibuat dengan cara mencampurkan FBS sebanyak 10 mL, penisilin streptomisin 2 mL, amfoterisin (Fungizon) 0,5 mL kemudian diencerkan menggunakan media biakan masing – masing (RPMI dan M199) sampai 100 mL. selanjutnya larutan disaring dengan filter *polietilen sulfon* 0,2 µm

secara aseptis. Disimpan dalam lemari es dengan menggunakan botol steril tertutup (Nurani 2012).

## 9. Pembuatan larutan uji

Sampel sebanyak 10 mg ditambahkan pelarut sampai 100  $\mu\text{L}$  DMSO kemudian ditambah media (RPMI untuk sel kanker payudara T47D dan M199 untuk sel Vero). Larutan stok dimasukkan ke dalam *eppendorf* steril ditutup dan disimpan di lemari pendingin. Selanjutnya larutan sampel dalam media dibuat seri konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; 500  $\mu\text{g/mL}$ ; 250  $\mu\text{g/mL}$ ; 125  $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 31,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 15,6  $\mu\text{g/mL}$  untuk ekstrak etanol daun binahong, dan seri konsentrasi 1,56  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,781  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,391  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,195  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,097  $\mu\text{g/mL}$  untuk doxorubisin. Masing-masing seri konsentrasi dimasukkan ke dalam *well* masing – masing 100  $\mu\text{L}$  dengan 3 kali replikasi (Nurani 2012).

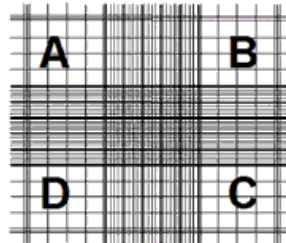
## 10. Preparasi sel

**10.1 Pengaktifan sel kanker payudara.** Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segar dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Sel kanker payudara dimasukkan ke dalam tabung sentrifungsi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambahkan media komplet RPMI sebanyak 5 ml. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam *tissue culture flask* dan diamati di bawah mikroskop. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

**10.2 Pengaktifan sel Vero.** Sel diambil dari tangki nitrogen cair dan dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Sel Vero dimasukkan ke dalam tabung sentrifungsi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambahkan media komplet M199 sebanyak 5 ml. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam *petridish kultur* dan diamati di bawah mikroskop. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

### 10.3 Pemanenan dan perhitungan sel kanker payudara dan sel vero.

Diambil 10  $\mu\text{L}$  dan dipipetkan *haemocytometer* lalu sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*. Skema bilik hitung dapat dilihat pada Gambar 4.



(Medlab.id)

Gambar 4. Skema bilik hitung.

*Haemocytometer* terdiri atas 4 titik hitung (A, B, C, dan D). Setiap kamar dihitung terdiri atas 16 kotak. Dihitung sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan bawah. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan dan atas tidak dihitung. Jumlah sel yang diperoleh dari keempat bidang diambil nilai rata-ratanya kemudian dikalikan dengan pengeceran sebesar 10 kali dan faktor koreksi dari *haemocytometer*. Dihitung jumlah sel per mL, dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\sum \text{sel A} + \sum \text{sel B} + \sum \text{sel C} + \sum \text{sel D}}{4} 10^4 \dots\dots\dots (1)$$

Dihitung volume pemanenan sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus:

$$\text{Volume pemanen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/mL}} \times 10^4 \dots\dots\dots (2)$$

Jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 1 x sel/100  $\mu\text{L}$ . sel didistribusikan ke dalam 100  $\mu\text{L}$ , kemudian diinkubasi dalam inkubator 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran.

### 11. Uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara dan sel vero

Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dengan 100  $\mu\text{L}$  DMSO sebagai larutan stok. Selanjutnya dari larutan stok dibuat tujuh seri konsentrasi untuk dimasukkan kedalam masing – masing *plate* yang berisi sel kanker payudara dan sel Vero. Sampel masuk kedalam *plate* dengan lima serial konsentrasi (1000  $\mu\text{g/mL}$ ; 500  $\mu\text{g/mL}$ ; 250  $\mu\text{g/mL}$ ; 125  $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 31,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 15,6  $\mu\text{g/mL}$ ) dan untuk kontrol positif menggunakan doxorubisin dengan lima serial konsentrasi



(1,56 µg/mL; 0,781 µg/mL; 0,391 µg/mL; 0,195 µg/mL; 0,097 µg/mL), kontrol negatif menggunakan kontrol sel dengan penambahan media penumbuh RPMI untuk sel kanker payudara T47D dan media penumbuh M199 untuk sel Vero. Selanjutnya *plate* diinkubasi CO<sub>2</sub> 5% suhu 37° C selama 24 jam. Media dibuang, ditambahkan 100 µL reagen MTT ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu (formazan). Setelah diinkubasi selama 4 jam, ditambahkan 100 µL SDS 10% untuk menghentikan reaksi antara sel hidup. Pada akhir inkubasi serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## 12. Uji indeks selektivitas

Sel Vero ditanam pada *microplate* dengan konsentrasi 1 x 10<sup>4</sup> sel / 100 µL dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium dibuang kemudian ditambahkan ekstrak pada konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) µg/mL tiap sumuran dengan *cosolvent* DMSO dan diinkubasi pada 37° C dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5 % selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 µL media kultur M199 dan 10 µL MTT 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 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 24 jam. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## E. Analisis Data

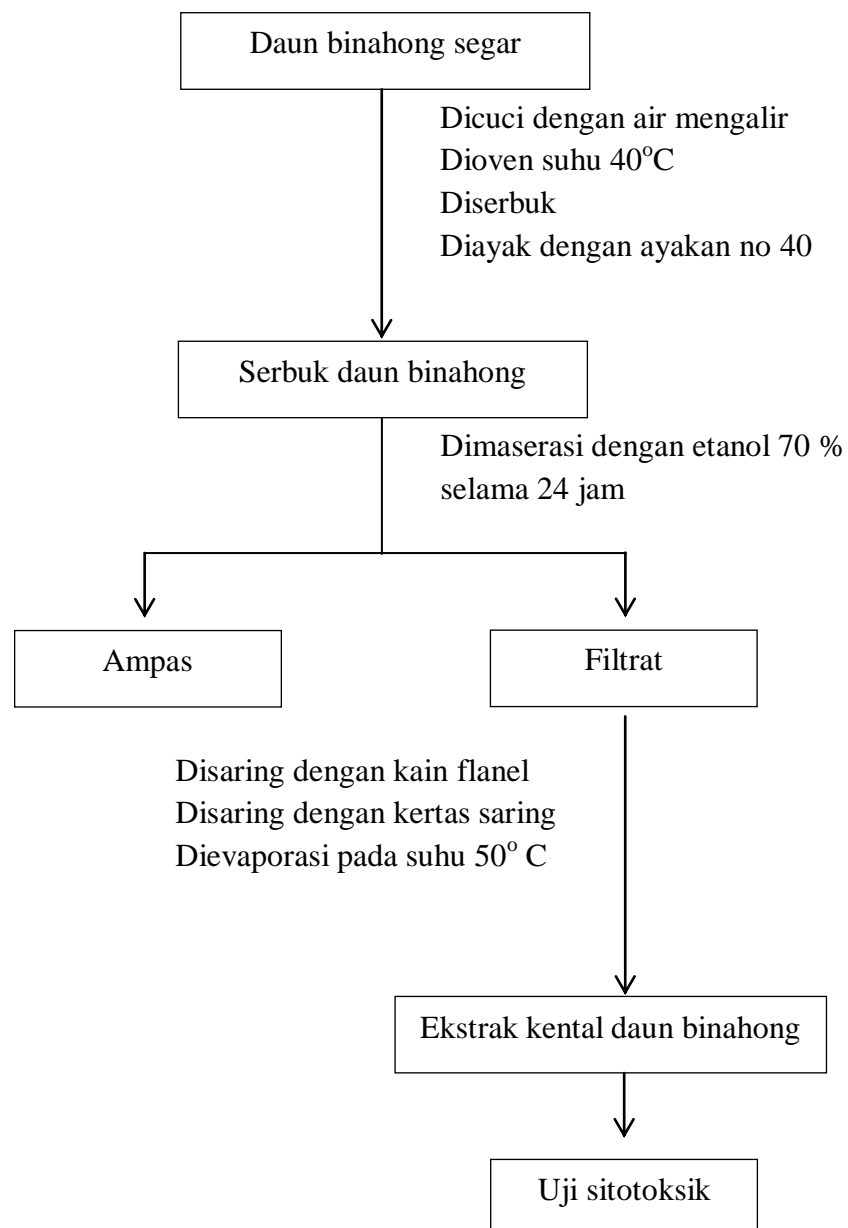
Hasil uji sitotoksik pada sel kanker payudara dan sel Vero didapatkan data absorbansi dicari hubungan regresi linier antara konsentrasi dengan % viabilitas menghasilkan persamaan dihitung dengan cara mensubstitusi nilai IC<sub>50</sub> pada Y sehingga diperoleh nilai x berupa nilai IC<sub>50</sub>, berikut ini adalah rumus perhitungan % viabilitas:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{(\text{abs sel perlakuan} - \text{abs kontrol media})}{(\text{abs kontrol sel} - \text{abs kontrol media})} \times 100 \% \dots\dots\dots(3)$$

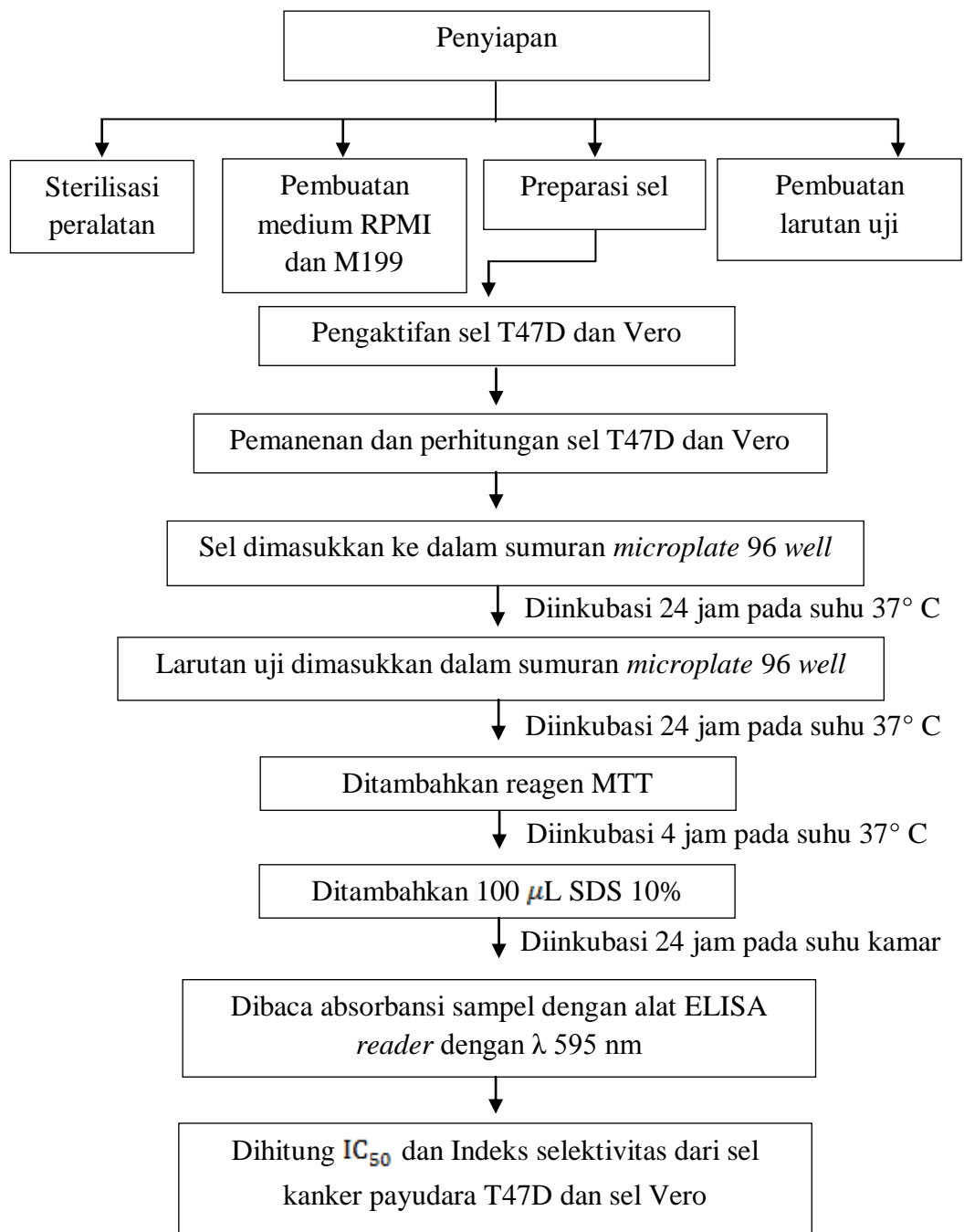
Indeks selektivitas diperoleh dari rasio  $IC_{50}$  sel Vero dengan sel kanker yang diuji. Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ Sel vero}}{IC_{50} \text{ Sel kanker}} \dots\dots\dots (4)$$

#### F. Skema Jalannya Penelitian



**Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak.**



Gambar 6. Skema uji sitotoksik.