

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman keladi tikus yang diperoleh dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, yang diambil pada bulan November 2018.

Sampel yang digunakan adalah tanaman keladi tikus, yang digunakan adalah keseluruhan bagian tanaman baik batang, daun, dan umbinya. Tanaman yang digunakan adalah tanaman segar, bersih dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama penelitian ini yang pertama adalah ekstrak etanol tanaman Keladi tikus dan Doxorubicin

Variabel utama kedua adalah aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol tanaman keladi tikus terhadap *Doxorubicin*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Pengklasifikasian variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu digolongkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dosis ekstrak etanol tanaman keladi tikus, dan doxorubicin yang akan diujikan pada sel kanker hepar HepG2.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media, kondisi inkubator, lama perlakuan, keadaan sel HepG2, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi, konsentrasi larutan uji, sterilisasi alat yang ingin digunakan, kondisi laboratorium, ruangan / (LAF), dan kondisi peneliti itu sendiri.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai IC_{50} pada beberapa pemberian seri konsentrasi ekstrak etanol tanaman keladi tikus dan Doxorubicin terhadap sel kanker hepar HepG2.

3. Definisi operasional variabel utama.

Pertama, tanaman Keladi tikus yang digunakan adalah seluruh bagian tanaman, baik batang, daun dan umbi nya, tanaman ini diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol dari tanaman keladi tikus, ekstrak ini dihasilkan dari proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96% .

Ketiga, kontrol positif menggunakan obat Doxorubicin dari PT Dankos A Kalbe Company.

Keempat, aktivitas sitotoksik yang melihat kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari seluruh populasi, berdasarkan nilai IC_{50} dengan nilai parameter nilai IC_{50} senyawa poten adalah $\leq 100 \mu\text{g/ml}$.

Kelima, sel kanker yang digunakan adalah sel kanker hepar HepG2 yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta, dimana kultur sel menggunakan media penambah DMEM yang mengandung FBS (*Fethal Bovine Serum*) 10%, Penisillin – Streptomycin (penstrep) 2 % dan antifungi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak tanaman keladi tikus, antara lain : botol / bejana untuk maserasi, kain flanel, kassa steril, ayakan no 40 ,batang pengaduk, mesin penyerbukan, blender, *rotary Evaporator*, *moisture balance*, *Sterling bidwell*, timbangan elektronik, oven.

Alat yang digunakan untuk uji Sitotoksik antara lain: Laminar Air Flow (LAF), mikropipet, tangki Nitrogen cair, Mikroskop Inferted, inkubator, Spektrofotometer *Elisa*, *haemocytometer*, mikroplate 96 sumuran, *tissue culture flassk*, mesin Vortex, magnetic stirer, kamera handphone.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering dari tanaman keladi tikus dan pengestraksi menggunakan etanol 96%.

Bahan yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker hepar HepG2, sel vero, media kultur DMEM , FBS, Penisillin – Streptomycin (penstrep) 2 % , Tripsin, SDS 10% , dan Doxorubicin sebagai kontrol positifnya.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman Keladi Tikus

Determinasi tanaman keladi tikus dilakukan di Laboratorium MIPA Universitas Sebelas Maret, determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa benar tanaman tersebut adalah sama dengan melihat buku petunjuk, proses determinasi tanaman yaitu dengan cara mencocokkan ciri- ciri morfologi tanaman keladi tikus pada kunci-kunci determinasi yang terdapat dalam pustaka.

2. *Ethical Clearance*

Ethical Clearance dilakukan guna memenuhi persyaratan etik penelitian. Komisi Bioetika telah merekomendasikan penelitian dengan judul Uji Aktivitas Sitotoksik kombinasi ekstrak tanaman keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*). dan Doxorubicin terhadap kultur sel kanker hepar HepG2 supaya dapat dilaksanakan sesuai dengan mempertimbangkan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki dan panduan yang tertuang dalam Pedoman Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK). *Ethical clearance* dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

3. Pembuatan Serbuk Tanaman dan Ekstrak Tanaman Keladi Tikus

3.1 Pembuatan serbuk tanaman keladi tikus. Tanaman keladi tikus diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Tanaman keladi tikus yang telah dipanen selanjutnya disortasi basah, dipilih tanaman yang segar bebas dari hama dan jamur selanjutnya dicuci dengan air yang mengalir hingga bersih kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dan didalam oven dengan suhu maksimum 40⁰C. Simplisia kering kemudian diserbuk dengan mesin penyerbuk, dan diayak dengan ayakan nomer mesh 40. Serbuk Simplisia yang di

dapat disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat, pemeriksaan organoleptis perlu dilakukan sebelum digunakan untuk penelitian.

3.2 Pemeriksaan Organoleptis Serbuk Tanaman Keladi Tikus.

Pemeriksaan organoleptis pada serbuk tanaman keladi tikus meliputi pemeriksaan warna, bau, dan rasa, adapun tujuan pemeriksaan ini adalah untuk memberikan kepastian terhadap tanaman tersebut adalah benar-benar tanaman keladi tikus.

4. Penetapan Susut Pengerinan

Penetapan susut pengeringan serbuk tanaman keladi tikus dapat dilakukan menggunakan *Moisture Balance*. Penetapan susut pengeringan dilakukan pada serbuk dengan cara menimbang serbuk tanaman keladi tikus sebanyak 2 gram, kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan alat *Moisture Balance* pada suhu 105°C selama 30 menit, kemudian petri didiamkan selama 15 menit sampai mencapai suhu kamar, petri ditimbang dan diulangi sampai mencapai bobot konstan, serbuk tanaman keladi tikus hasil pengeringan kemudian dihitung susut pengeringannya. Susut pengeringan yang memenuhi standard dimana kadar senyawa yang hilang akibat penguapan serbuk simplisia <10 % (Sumardi *et al*, 2001). Adapun tujuan dari susut pengeringan memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. (Depkes, 2000).

5. Penetapan Kadar Air

Analisa kadar air serbuk tanaman keladi tikus menggunakan metode *Sterling-Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara: 1. Bahan dimasukkan secukupnya dalam labu ukur 500 ml sehingga menghasilkan $\pm 2-4$ ml air dan menambahkan ± 200 ml toluen, kemudian memasang labu distilasi dan pendingin balik 2. Labu distilasi dipanaskan perlahan-lahan sampai toluen mendidih dan diatur sampai kecepatan penyulingan ± 2 tetes per detik sampai air dalam bahan tersuling dipercepat sampai 4 tetes per detik. 3. Destilasi dilanjutkan sampai semua air menguap ± 1 jam dan membaca volume air serta menghitung kadar air dari berat contoh semula (Sumardi *et al*, 2001).

6. Pembuatan Ekstrak Etanolik Tanaman Keladi Tikus

Ekstrak etanol tanaman keladi tikus dibuat menggunakan metode maserasi. Serbuk tanaman keladi tikus ditimbang dan dimasukkan dalam wadah,

lalu ditambahkan cairan penyari etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Langkah awal, 75% cairan penyari digunakan untuk maserasi selama tiga hari, kemudian 25% dari cairan penyari digunakan untuk remaserasi selama dua hari. Wadah maserasi ditutup dan sesekali diaduk selama proses ekstraksi. Wadah dikondisikan terlindung dari cahaya agar tidak terjadi dekomposisi dengan senyawa. Campuran yang diperoleh diserkai sehingga diperoleh maserat 1, selanjutnya dilakukan remaserasi pada ampas dan proses dilakukan sama seperti tahap maserasi. Hasil maserat 1 dan 2 diempuk semalam dan filtrate dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak etanolik keladi tikus}}{\text{berat serbuk simplisia keladi tikus}} \times 100 \%$$

7. Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak tanaman keladi tikus

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam tanaman keladi tikus. Identifikasi senyawa flavanoid, alkaloid, triterpenoid, tanin dan saponin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

7.1 Identifikasi flavanoid. Sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak, dilarutkan dalam methanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson, 1995).

7.2 Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan metode *Magner, Wagner dan Dragendorff*. Sampel sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadest kemudian panaskan \pm 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian, tiap filtrat ditambah pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk endapan putih, terbentuk warna coklat kemerahan, terbentuk jingga (Sukardi *et al*, 2011).

7.3 Identifikasi tanin. Ekstrak ditambahkan dengan 1 ml larutan FeCl₃ 10%. Identifikasi tanin menunjukkan hasil positif dengan terbentuk warna biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Robinson, 1995).

7.4 Identifikasi Steroid dan Terpenoid. Pengujian dilakukan dengan menggunakan larutan uji sampel sebanyak 2 ml, diuapkan dalam cawan porselen. Residu dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan melalui dinding tabung, terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Robinson, 1995).

7.5 Identifikasi Fenolik. Pengujian dilakukan dengan cara sampel dilarutkan dengan aquadest secukupnya lalu ditambahkan dengan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1% , hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau, biru atau ungu (Harbone, 1987).

8. Uji Antikanker dengan Metode MTT.

Ekstrak dari tanaman keladi tikus diuji aktivitas antikanker secara *in vitro* menggunakan sel HepG2 dengan metode MTT, pengujian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak dalam menghambat atau membunuh sel kanker hati HepG2, dengan variasi yang digunakan yaitu (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 $\mu\text{g/ml}$, 15,63 $\mu\text{g/ml}$). Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang didasarkan pada perubahan warna dari kuning menjadi biru keunguan (CCRC. 2009). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang hidup akan berwarna ungu akibat terbentuknya kristal formazone. Hasil dari metode MTT berupa absorbansi yang digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai ini digunakan untuk mengukur aktivitas penghambatan sel secara *in vitro*. Tahapan pengujian antikanker meliputi penyiapan, perhitungan dan panen sel, pembuatan dan peletakan larutan uji pada plate, serta pemberian larutan MTT

9. Pembuatan Reagen

9.1 Pembuatan Media (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Medium kultur yang digunakan untuk sel kanker hepar HepG2, satu botol medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) yang mengandung L- glutamin dan 20 mM HEPES dilarutkan dengan 1 liter aquadest steril dan ditambahkan dengan 2

g/L NaHCO_3 . Medium ini bisa tahan selama 2 bulan bila disimpan didalam freezer.

9.2 Pembuatan PBS (*Phospat Buffer Saline*). Dinatrium hydrogen fosfat (Na_2HPO_4) ditambahkan kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) ditambahkan natrium klorida (NaCl) dan ditambahkan kalium klorida (KCl) dilarutkan dalam aquadest steril, pH distabilkan pada 7,2 dan disterilkan dengan autoklaf.

9.3 Tripsin. Ditimbang sebanyak 25 gram tripsin ditambahkan NaCl , aduk hingga larut hingga satu jam pada suhu ruang, larutan ini disimpan pada suhu -20°C , dan sebelum digunakan dilarutkan dengan PBS terlebih dahulu.

10. Pembuatan Sampel Uji.

Ekstrak etanol tanaman keladi tikus sebanyak 10 mg dilarutkan dalam $100\mu\text{L}$ dimetil sulfoksi (DMSO) dalam ependrof kemudian disimpan sebagai larutan stok, kemudian dibuat larutan dengan perbandingan seri konsentrasi, ($1000\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$, $250\mu\text{g/ml}$, $125\mu\text{g/ml}$, $62,5\mu\text{g/ml}$, $31,25\mu\text{g/ml}$, $15,63\mu\text{g/ml}$). Sedangkan seri konsentrasi Doxorubicin ($2\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $0,5\mu\text{g/ml}$, $0,25\mu\text{g/ml}$, $0,125\mu\text{g/ml}$, $0,625\mu\text{g/ml}$, $0,03125\mu\text{g/ml}$) untuk uji sitotoksik tunggal. Dan untuk uji kombinasi Doxorubicin dengan ekstrak etanolik tanaman keladi tikus menggunakan konsentrasi perbandingan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari uji sitotoksik masing-masing senyawa tersebut sebagai agen tunggal. Seri konsentrasi diperoleh berdasarkan penelitian sebelumnya (CCRC, 2009).

11. Preparasi Sel HepG2

Tahapan dalam preparasi sel adalah untuk menghidupkan kembali sel yang telah inaktif menjadi konfluen dengan menambahkan media kultur DMEM. Sel dikatakan telah mencapai konfluen apabila sel tersebut telah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Mahardika, 2004). Media digunakan sebagai nutrisi dan sumber respirasi sel agar dapat bertahan hidup dan dapat memperbanyak diri. Sel dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan di penangas air pada suhu 37°C , ampul disemprot dengan etanol 70% kemudian ampul dibuka dan sel dipindahkan dalam *conical tube* steril yang berisi media kultur DMEM. Sentrifugasi suspensi sel dengan kecepatan 3000 rpm

selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pellet ditambah 10 ml medium penumbuh yang mengandung 10% FBS, kemudian disuspensikan perlahan hingga homogen, sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture dish*, diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Dilakukan penggantian medium setelah 24 jam, kemudian sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

12. Pemanenan dan Perhitungan Sel HepG2

Setelah jumlah sel konfluen kemudian media dibuang menggunakan pipet *Pasteur* steril dan dicuci sel sebanyak 2 kali menggunakan PBS (Phospat Buffer Saline) dengan volume yang sama dengan media awal. Sel yang mati akan mengapung dan ikut terbuang saat pencucian sel. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 450 µl tripsin 0,25 %-EDTA secara merata untuk melepas sel dari dinding petri, diinkubasi sel selama 3 menit lalu ditambahkan media sebanyak 5 ml untuk menginaktifkan tripsin sambil diresuspensi sel dengan pipet sampai sel tidak ada yang menggerombol. Sel dipastikan tidak ada yang menggerombol dengan diamati kondisi sel di bawah mikroskop. Sebanyak 10 µl suspensi sel dipipetkan ke dalam *hemositometer* dan dihitung jumlah sel dibawah mikroskop *inverted* menggunakan *counter*. *Hemositometer* terdiri dari 4 kamar hitung (A,B,C dan D), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak, Sel dihitung pada 4 kamar *hemositometer*, sel yang gelap dan (mati) dan sel yang berada dibatas luar disebelah kiri dan atas tidak dihitung. Sel dibatas kanan dan bawah dihitung , kemudian jumlah sel per mL dihitung dengan rumus (CCRC, 2009).

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

Dihitung volume pemanenan sel yang diperlukan (dalam ml) dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

Diambil volume pemanenan sel, ditransfer pada konikel baru lalu ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan.

Suspensi sel kemudian ditambahkan sejumlah media kultur DMEM dan ditransferkan ke dalam *conical tube* steril hingga diperoleh besar konsentrasi yang diperlukan selanjutnya didistribusikan sebanyak 1×10^4 sel di dalam sumuran masing-masing 100 μl suspensi sel pada *96-well plate* dan sisakan 6 sumuran yang tidak diisi sel. Sel diinkubasi CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam (CCRC, 2009).

13. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT assay seperti yang dikemukakan pertama kali oleh Mosman (1983). Pemberian perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah inkubasi sel. Setelah inkubasi sel media sel dibuang ke tempat buangan, ditambahkan 100 μl PBS pada tiap sumuran dan dibuang kembali ke tempat buangan. Selanjutnya ditambahkan larutan uji dalam berbagai seri konsentrasi, dimana konsentrasi dikerjakan sebanyak 7 replikasi. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah inkubasi media sel dalam plate dibuang dengan cara membalikkan plate 180° ke tempat buangan kemudian dicuci dengan 100 μl PBS untuk tiap sumuran. Selanjutnya ditambah 100 μl reagen MTT (0,5 mg/ml) pada tiap sumuran, dilanjutkan inkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk kristal formazan yang ditandai perubahan warna menjadi ungu pada sel yang hidup akibat dari reaksi MTT. Setelah 3-4 jam inkubasi kemudian ditambah masing-masing 100 μl pereaksi *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl untuk melarutkan kristal formazan dan menghentikan reaksi MTT. Sel dalam plate selesai dilakukan perlakuan selanjutnya disimpan pada suhu kamar selama semalam dengan kondisi terlindung dari cahaya langsung. Pembacaan absorbansi dalam Spektrofotometer Elisa pada panjang gelombang 595 nM. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan persentase viabilitas sel dan dihitung nilai IC_{50} yang diperoleh.

E. Analisis Data

1. Analisis Uji sitotoksik

1.1 Uji sitotoksik. Data yang diperoleh berupa absorbansi atau *Optical Density* (OD) masing-masing sumuran selanjutnya dikonversi menjadi persentase

kehidupan sel (% Viabilitas sel). Persentase kehidupan sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Kemudian hasil perhitungan persentase kehidupan sel HepG2 dianalisis untuk menentukan regresi linier antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak etanol tanaman keladi tikus) dibandingkan persen sel hidup menggunakan program *Microsoft Excel* untuk mendapatkan persamaan :

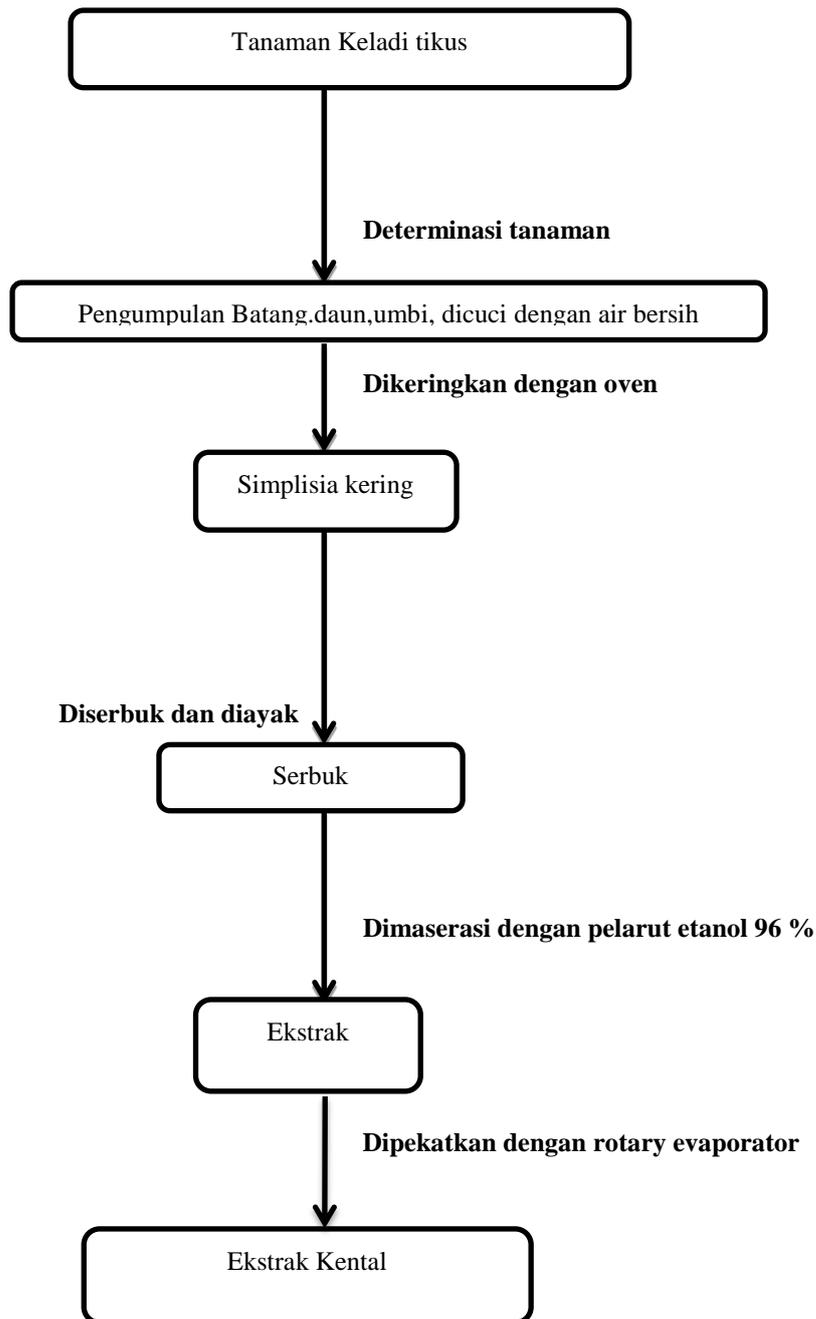
$$Y = a + bx$$

Keterangan : IC_{50} dihitung dengan mensubstitusi nilai 50 pada Y sehingga diperoleh nilai X dan nilai IC_{50} merupakan antilog X

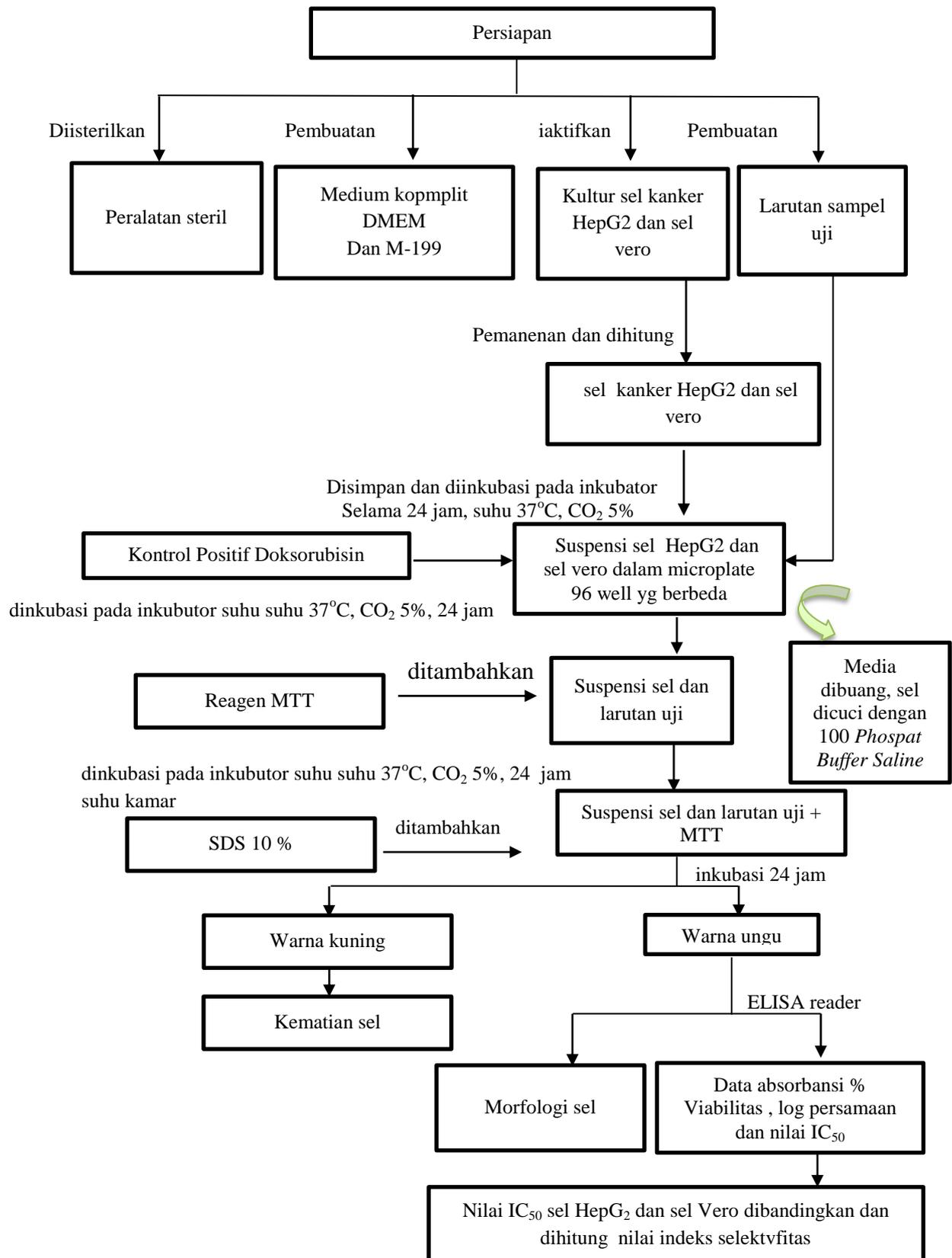
Sedangkan pada Doxorubicin sebagai kontrol positif nilai IC_{50} dapatkan dari persamaan : $Y = a + bx$

Keterangan : IC_{50} dihitung dengan mensubstitusi nilai 50 pada Y sehingga diperoleh nilai X dan nilai IC_{50} merupakan nilai X

Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebanyak 50% populasi sel dan menunjukkan ketoksikan suatu senyawa terhadap sel sehingga dapat diketahui potensi toksisitasnya. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Hasil dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi persentase sel yang mampu bertahan hidup.



Gambar 7. Skema uji sitotoksik ekstrak etanol tanaman keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*)



Gambar 8. Skema Uji sitotoksik Berdasarkan Prosedur yang Terdapat Dalam CCRC