

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang akar kuning yang diperoleh dari hutan di Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang akar kuning yang sudah dikeringkan kemudian diserbuk dan dibuat ekstrak etanol batang akar kuning.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah memuat identifikasi dari semua sampel yaitu ekstrak etanol batang akar kuning.

Variabel utama kedua adalah aktivitas sitotoksik ekstrak etanol batang akar kuning terhadap sel kanker hati *HepG2*.

Variabel utama ketiga dalam penelitian adalah selektivitas ekstrak etanol batang akar kuning terhadap sel kanker hati *HepG2*.

2. Klasifikasi operasional variabel utama

Variabel yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah yang direncanakan untuk diteliti yang berpengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak batang akar kuning yang diujikan pada sel kanker hati *HepG2*.

Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu aktivitas sitotoksik terhadap sel *HepG2* dengan menghitung jumlah sel yang mati.

Variabel terkendali yaitu 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 instrument laboratorium, konsentrasi sampel uji, dan keadaan sel *HepG2*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, batang akar kuning adalah bagian batang dari tanaman akar kuning yang diperoleh dari hutan di Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah.

Kedua, ekstrak etanol batang akar kuning adalah hasil maserasi batang akar kuning 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. Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik yang poten apabila nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.

Keempat, sel kanker hati *HepG2* adalah *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang mengandung PBS 10% dan penisillin-streptomisin 1%.

Kelima, indeks selektivitas adalah suatu uji untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah batang akar kuning (*Arcangelisia flava* Merr.) yang diserbuk kering dan untuk ekstraksi menggunakan etanol 70%.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker hati *HepG2*, sel Vero, media stok: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), M199, Cisplatin, Natrium bikarbonat dan HEPES (Sigma); media kultur sel: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), media M199, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin 1% v/v (Gibco), Fungizon (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Trypsin 0,5%, MTT 5mg/ml dalam PBS; media pencuci sel: larutan PBS pH 7,2; Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

2. Alat

Alat penyari terdiri atas bejana maserasi, kain flannel, ayakan no. 40, batang pengaduk, blender, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, alat *Sterling Bidwell*, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator, dan alat-alat gelas. Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, sentrifuga (B. 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), tabung konikal steril (Nunc), 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.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman akar kuning

Tahap pertama penelitian adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal yang dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang akan dibuktikan di Laboratorium Biologi, Universitas Sebelas Maret.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Tanaman akar kuning diperoleh dari hutan di Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah. Bagian yang akan digunakan adalah batang akar kuning. Batang dibersihkan dan dicuci dengan air bersih.

Batang akar kuning yang sudah dibersihkan, kemudian dirajang dan dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatis yang dapat menurunkan mutu, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk.

Batang akar kuning yang sudah kering, digiling dan diblender, kemudian diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis (Kemenkes RI 2013).

3. Penetapan susut pengeringan terhadap serbuk

Penetapan susut pengeringan batang akar kuning dilakukan dengan cara serbuk dari batang akar kuning ditimbang 2 gram. Kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'Haus MB23 pada suhu 105°C, kemudian dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Menurut Depkes RI (2008), susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

4. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi serbuk batang akar kuning menggunakan prosedur pembuatan ekstrak berdasarkan Kemenkes RI (2013). Serbuk batang akar kuning yang sudah jadi ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan dalam wadah gelap ditambah dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml. Selama 6 jam pertama wadah sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah 18 jam, maserat disaring menggunakan kertas saring dan ampas kemudian direndam dengan volume etanol 2500 ml selama 24 jam berikutnya. Maserat disaring, ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai

dihasilkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan pemeriksaan organoleptis dan perhitungan rendemen dari ekstrak kental tersebut. Skema pembuatan ekstrak etanol batang akar kuning dapat dilihat pada Gambar 5.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air ekstrak batang akar kuning

Penetapan kadar air ekstrak batang akar kuning dilakukan menggunakan alat destilasi *Sterling Bidwell*. Prinsip penentuan kadar air dengan destilasi adalah menguapkan air dengan pembawa cairan kimia yang mempunyai titik didih lebih tinggi daripada air dan tidak dapat campur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah daripada air (Sudarmadji, 1989). Metode ini dilakukan dengan cara menimbang ekstrak batang akar kuning sebanyak 20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylen lebih kurang 200 ml sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *Sterling Bidwell* dan labu dipanaskan dengan hati-hati menggunakan api kecil, setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat *Sterling Bidwell*. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes RI 2013).

6. Uji fitokimia

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol batang akar kuning diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing dan dilanjutkan dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk lebih menegaskan hasil yang didapat dari uji fitokimia.

6.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Identifikasi flavanoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak batang akar kuning dalam metanol panas dan menambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna jingga atau merah menunjukkan adanya flavanoid (Harborne 1987). Identifikasi dengan metode KLT dilakukan dengan sampel pada plat dengan ukuran 2 cm x 10 cm pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler lalu

dikeringkan dan dielusi dengan eluen *n*-butanol : asam asetat glasial : air dengan perbandingan (4:1:5) dan dideteksi di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm (Markham 1988). Adanya flavonoid ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning terang setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat terlihat perubahan intensitas warna pada UV 366 (Murwanto & Djoko 2012).

6.2 Identifikasi senyawa alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak batang akar kuning ditambah dengan 1 ml HCl 2 M dan 9 ml akuades lalu dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah dengan pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih-kuning pada uji Mayer menunjukkan hasil positif alkaloid, terbentuknya endapan coklat kehitaman pada uji Bouchardat menunjukkan hasil positif alkaloid, dan terbentuknya warna jingga pada uji Dragendorff menunjukkan hasil positif alkaloid (Harborne 1987). Identifikasi dengan metode KLT menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (16:1:2), noda diamati menggunakan sinar UV 254 nm kemudian deteksi bercak dengan menyemprot pereaksi Dragendorff. Bercak yang menandakan adanya alkaloid adalah bercak dengan warna jingga dan diukur harga Rfnya (Harborne 1987).

6.3 Identifikasi senyawa saponin. Sebanyak 0,3 gram ekstrak batang akar kuning dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dilarutkan dengan 10 ml akuades, kemudian dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil (Harborne 1987).

6.4 Identifikasi senyawa tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak batang akar kuning dalam 10 ml akuades kemudian disaring dan ditambahkan dengan 3 tetes FeCl 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Harborne 1987). Identifikasi dengan metode KLT dilakukan menggunakan fase gerak metanol : air (6:4). Noda yang terbentuk diperiksa dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm kemudian deteksi bercak dengan menyemprot pereaksi FeCl₃. Bercak yang menandakan adanya tanin adalah bercak mengalami perubahan menjadi warna hitam dan diukur harga Rfnya (Yuda *et al.* 2017).

7. Uji sitotoksisitas

7.1 Sterilisasi alat. Alat-alat gelas yang akan digunakan harus berada dalam keadaan yang steril. Alat dicuci dan dikeringkan di dalam oven. Alat-alat kering tersebut dibungkus dengan kertas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121°C (Triputra 2016).

7.2 Pembuatan media stok (DMEM) dan media penumbuh sel HepG2. Sebanyak 10,4 gram/L serbuk media DMEM dilarutkan dengan akuadestilata kurang lebih 800 ml dalam gelas Beaker 1 L, tambahkan 2,2 gram natrium bikarbonat dan 2 gram *hepes*. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai larut. Berikan larutan dapar (1 M NaOH atau 1 M HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambahkan lagi akuadestilata hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22 µm ke dalam botol steril (lakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label. Pembuatan media DMEM penumbuh dibuat dari 87,5 ml DMEM *stock* ditambah 10 ml FBS, 2 ml antibiotika penicillin-streptomisin dan 0,5 ml Fungizon (Triputra 2016).

7.3 Pembuatan media stok (M199) dan media penumbuh sel Vero. Sebanyak 9,5 gram media M199, 2,2 gram NaHCO₃, 2 gram *hepes* dimasukkan ke dalam gelas Beaker 1 L. ditambahkan 800 ml akuadestilata dan dihomogenkan menggunakan *stirrer* sampai larut. Ditambahkan larutan dapar (1 M NaOH atau 1 M HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambahkan lagi akuadestilata hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22 µm ke dalam botol steril (lakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label. Pembuatan media penumbuh M199 dengan cara, 86 ml M199 *stock* ditambah 10 ml FBS, 3 ml antibiotika penicillin-streptomisin dan 1 ml Fungizon (Triputra 2016).

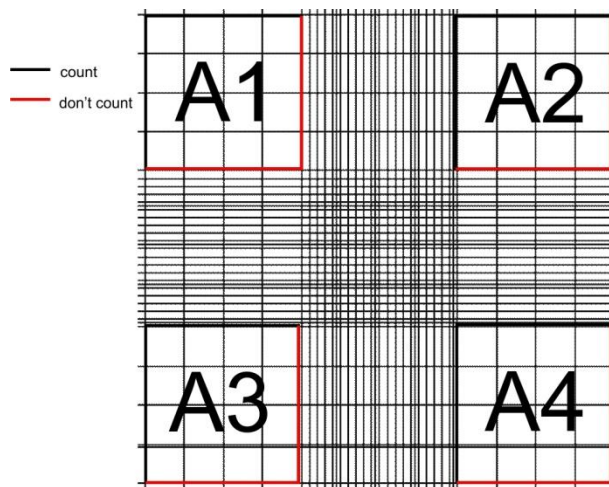
7.4 Pembuatan larutan uji. Sebanyak 5 mg ekstrak uji ditimbang selanjutnya dilarutkan dengan 100 µl DMSO dalam Ependrof, kemudian disimpan sebagai larutan stok untuk digunakan dalam pengujian. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF (Triputra 2016).

8. Preparasi sel

8.1 Pengaktifan sel *HepG2* dan Sel Vero. Persiapkan alat dan kondisikan bahan pada suhu ruangan, sel *HepG2* yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Di dalam LAF, sel *HepG2* dimasukkan dalam tabung sentrifuga kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media penumbuh DMEM dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih, dan bersinar. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

Persiapkan 10 ml PBS 1x suhu ruang dalam tabung konikel. Sel Vero yang inaktif dari *freezer* dicairkan pada suhu 37°C di *water bath*, lalu diambil suspensi sel dan dimasukkan tetes demi tetes ke dalam PBS 1x suhu ruang yang telah disiapkan. Sentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan media M199 dan diresuspensi hingga homogen. Dipindahkan ke dalam wadah *flask* atau *petridish culture* dan ditambahkan media penumbuh M199 sebanyak 5 ml (Triputra 2016).

8.2 Panen dan perhitungan sel. Media dalam *tissue culture flask* dibuang lalu dicuci dengan PBS (*phosphat buffer saline*) 2 kali. Kemudian ditambahkan 1 ml tripsin. Inkubasi selama 3-5 menit, kemudian diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop *inverted*. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Terakhir ditambahkan media sampai 10 ml dan disentrifugasi dengan 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 4. Hemositometer dilihat di bawah mikroskop *inverted*.

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (A, B, C, dan D), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Dihitung sel pada 4 kamar hemositometer, sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar di sebelah bawah dan sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas atas ikut dihitung dengan menggunakan rumus (Triputra 2016):

$$\Sigma \text{sel/ml} = \frac{\Sigma \text{sel 1} + \Sigma \text{sel 2} + \Sigma \text{sel 3} + \Sigma \text{sel 4}}{4} \times 10^4$$

Dihitung volume panen sel yang diperlukan (dalam ml) dengan rumus:

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$$

Diambil volume panen sel, ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan. Setelah itu jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 10×10^4 sel/100 μl . Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan ekstrak etanol batang akar kuning.

8.3 Pemberian ekstrak. Sumuran-sumuran yang berisi suspensi sel tersebut ditambahkan 100 μl larutan uji yaitu masing-masing ekstrak etanol

batang akar kuning yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (2000; 1000; 500; 250; 125) $\mu\text{g/ml}$ tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media penumbuh DMEM untuk sel *HepG2*. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan media penumbuh DMEM (sel *HepG2*), sebagai kontrol positif digunakan sel dengan penambahan cisplatin. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam.

8.4 Uji viabilitas sel dengan reagen MTT. Akhir inkubasi medium masing-masing sumuran yang telah diberi perlakuan tersebut 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 μl MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C . Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 μl SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm (Triputra 2016). Skema uji sitotoksitas dapat dilihat pada Gambar 6.

9. Uji indeks selektivitas

Sel Vero ditanam pada *microplate* dengan konsentrasi 10×10^4 sel/100 μl dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan ekstrak pada konsentrasi (2000; 1000; 500; 250; 125) $\mu\text{g/ml}$ tiap sumuran dengan *cosolvent* DMSO dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 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. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO_2 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 (Triputra 2016).

E. Analisa Data

1. Uji sitotoksitas

Dari hasil uji sitotoksitas 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 batang akar kuning) *versus* persentase viabilitas sel menggunakan *Microsoft Excel 2010*, hingga akan didapatkan persamaan:

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

X : log konsentrasi sampel uji

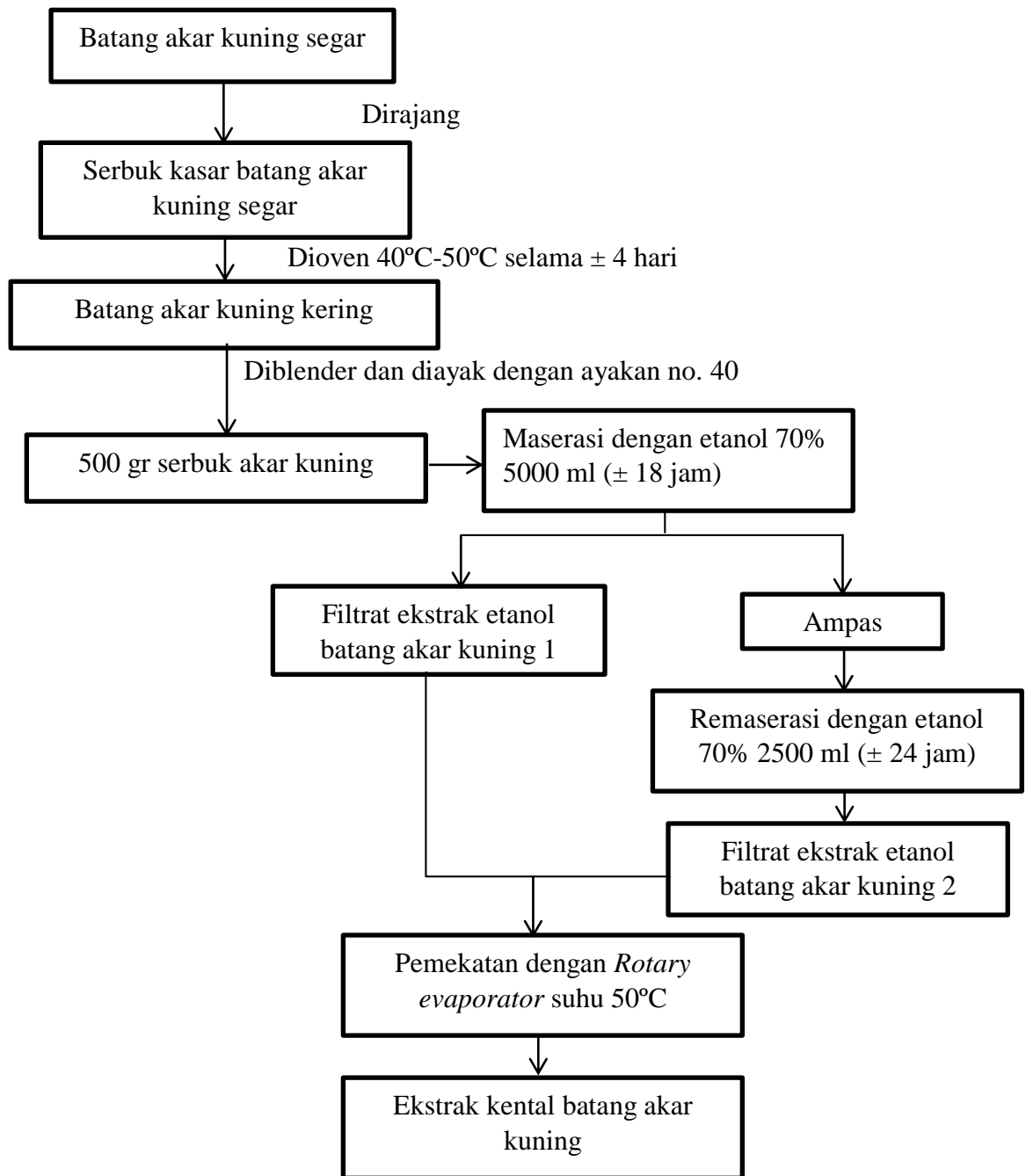
Y : persentase viabilitas sel

Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan IC_{50} .

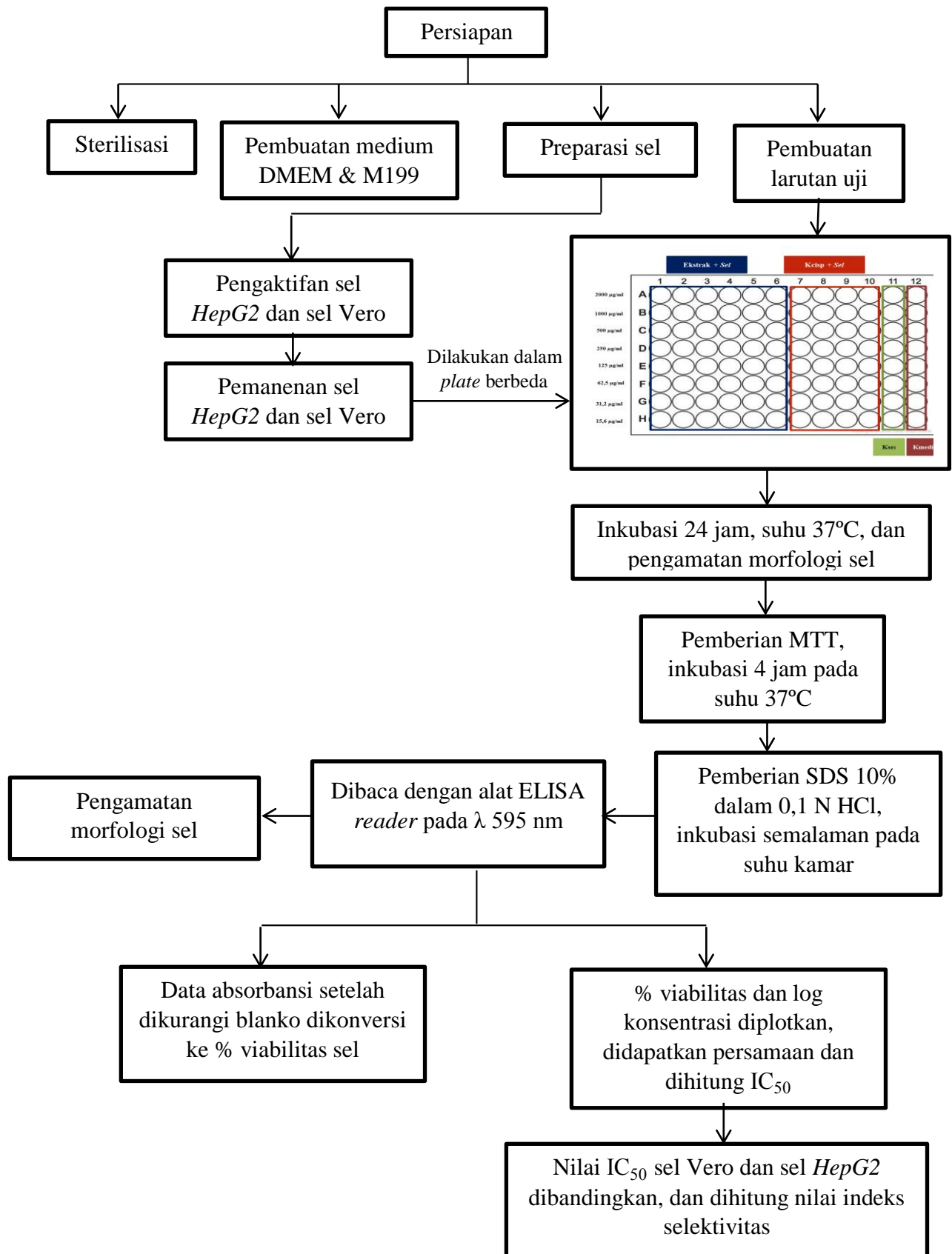
2. Indeks selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini :

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ Sel Vero}}{IC_{50} \text{ Sel HepG2}}$$



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak etanol batang akar kuning.



Gambar 6. Skema uji sitotoksitas dengan metode MTT assay.