

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yakon yang segar. Sampel diambil pada bulan Juli 2019.

Populasi adalah seluruh obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yakon yang tumbuh di daerah Mejayan, Kabupaten Madiun, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun yakon, aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan ekspresi protein p53 dan Bcl-2. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah IC_{50} ekstrak daun yakon.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terdahulu dapat dibagi ke dalam berbagai macam variabel diantaranya variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini ekstrak daun yakon yang diujikan pada sel T47D dalam berbagai konsentrasi. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu aktivitas sitotoksik dan ekspresi protein p53 dan Bcl-2. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kondisi penelitian seperti suhu, lama inkubasi, tekanan inkubator, kondisi laboratorium dan jumlah sel di tiap susunan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun yakon adalah daun yang dipanen dari tanaman yakon dalam kondisi segar di Mejayan, Kabupaten Madiun, Jawa Timur pada bulan Juli 2019.

Kedua, ekstrak etanol daun yakon adalah hasil soxhletasi daun yakon dengan pelarut etanol yang kemudian dipekatkan dengan evaporator dan diayak dengan ayakan no.40,

Ketiga, fraksi ekstrak etanol daun yakon adalah hasil ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air.

Keempat, sel kanker payudara T47D adalah sel kanker payudara T47D yang dikoleksi dari laboratorium parasitologi fakultas kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Kelima, sel vero berasal dari koleksi laboratorium parasitologi fakultas kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Keenam, uji sitotoksik adalah uji antikanker dengan metode *MTT assay* yang kemudian digunakan untuk menghitung IC_{50} .

Ketujuh, uji imunositokimia adalah uji ekspresi protein p53 dan Bcl-2..

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat penyari terdiri dari oven, blender, ayakan no.40, corong, timbangan analitik, evaporator alat-alat gelas, alat soxhletasi.

Alat untuk uji sitotoksik MTT dan imunositokimia adalah tangki nitrogen cair, *sentrifuge*, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B, Braun Biotech International), *ELISA reader* (SLT 240 ATC), autoklaf, *Laminar Air Flow class II* (Labconco), *Nebauer Haemocytometer*, mikroskop inverted (Axiovert-25), tabung konikal steril, mikroplate 96 sumuran, mesin *vortex*, *tissue cultur flask* (Nunc), lampu ultra violet, neraca elektrik, mikropipet 20-200 μ L dan 200-2000 μ L (pipetman), inkubator 37° C, *magnetic stirrer* dan camera digital.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun yakon segar yang diekstraksi dengan metode soxhletasi dan dilakukan fraksinasi dengan metode cair-cair.

2.2 Bahan untuk uji sitotoksik dan imunositokimia. Sel line T47D, sel Vero, gen p53 dan Bcl-12, media RPMI 1640 (Gibco), natrium bikarbonat, mesin *vortex*, *tissue cultur flask* (Nunc), HEPES (Sigma), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), DMSO (Dimetil Sulfoksida), Fungtion 0,5% MTT 5 mg/ml, Tripsin 0,5% MTT 5mg/ml, medium M199, larutan PBS, dalam PBS, Natrium Dodesil

Sulfat 10% dalam HCl 0,1 N sebagai stopper media pencuci sel, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman yakon

Tanaman ini merupakan tanaman dari keluarga bunga matahari. Yakon memiliki ciri yaitu bunganya berwarna kuning berbentuk seperti bunga matahari. Daun yakon berwarna hijau tua dengan struktur permukaan daun yang agak kasar dan berbulu, dan mempunyai umbi yang berwarna coklat dengan daging berwarna putih kekuningan. Identifikasi tanaman dilakukan di laboratorium Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun yakon segar diambil dari daerah Mejayan, Kabupaten Madiun pada bulan Juli 2019. Daun yakon yang sudah tua dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor, dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai kering.

3. Pembuatan serbuk

Serbuk daun yakon diperoleh dengan cara daun yang sudah tua dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40° C hingga kering. Daun yakon yang telah kering kemudian dibuat dihaluskan menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan no 40.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun yakon

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun yakon dilakukan dengan alat *Moisture balance*, yaitu dengan cara menimbang serbuk dan ekstrak sebanyak ± 2 gram. Kemudian *Moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda dan bunyi.

5. Penetapan kadar air ekstrak daun yakon

Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan cara destilasi toluena. Toluena dijenuhkan dengan air terlebih dahulu sebelum digunakan, setelah itu dikocok dan didiamkan, akan terbentuk lapisan air dan toluena yang memisah, buang lapisan

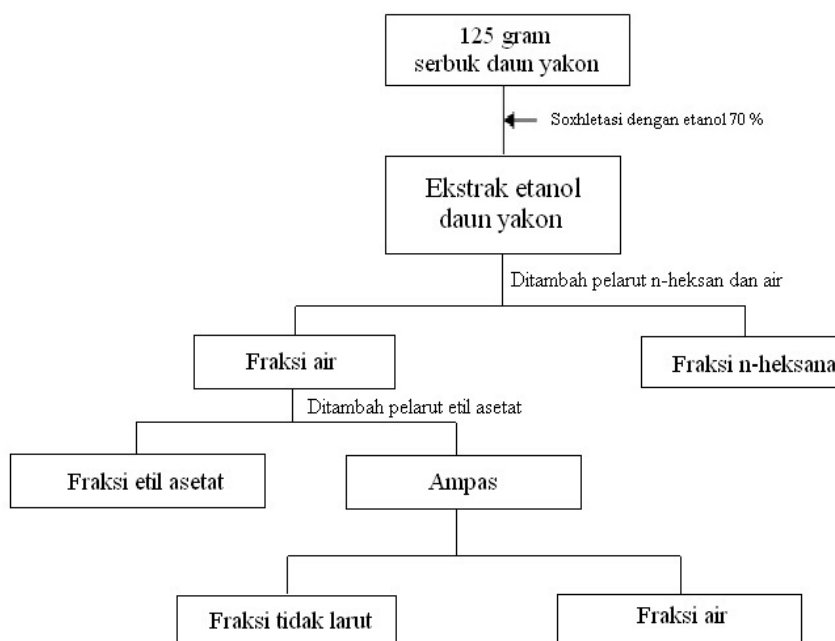
air. Masukkan 10 g ekstrak yang ditimbang dengan seksama kedalam labu alas bulat dan tambahkan toluena yang telah dijenuhkan. Panaskan labu dengan hati-hati selama 100 menit, toluena mulai mendidih, atur penyulingan 2 tetes/detik, selanjutnya 4 tetes/detik. Biarkan semua toluena mendidih, dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Selanjutnya, biarkan tabung menerima dingin sampai suhu kamar. Terbentuk lapisan air dan toluena secara sempurna, baca volume air dan hitung kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak semula, ulangi sampai tiga kali (Depkes, 2000).

6. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi ekstrak etanol daun yakon

Menimbang serbuk daun yakon 125 gram, kemudian dimasukkan ke dalam sebuah kantung yang terbuat dari kertas saring dibuat bentuk silinder dandiikat ujung-ujungnya dengan tali. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat Soxhlet dan ditambah dengan etanol kurang lebih 250 ml dilakukan sebanyak 1,5 kali sirkulasi sampai filtrat yang tersirkulasi jernih. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah banyaknya sirkulasi, kemudian dilakukan pemekatan menggunakan evaporator. Ekstrak yang didapat kemudian di fraksinasi.

Pembuatan fraksi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak etanol daun yakon dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol-air (4:1) dan difraksinasi dengan n-heksana dalam corong pisah, digojok sambil sesekali tutup dibuka dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan etanol-air dan lapisan n-heksana). Ditambahkan air sebanyak 10 mL kemudian digojok kembali dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan, lapisan etanol-air berada di bagian bawah sedangkan lapisan n-heksana berada di bagian atas. Lapisan atas (n-heksana) dikeluarkan terlebih dahulu dan lapisan etanol-air difraksinasi kembali dengan n-heksana. Fraksinasi dengan n-heksana dilakukan sebanyak 10 kali, terbentuk perubahan warna dari hijau pekat sampai terlihat warna hijau memudar menjadi kuning. Fraksi n heksana ditampung, fraksi air kemudian difraksinasi dengan etil asetat dan diperoleh fraksi etanol-air dan fraksi etil asetat. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan perubahan warna dari kuning hingga kuning bening. Ampas hasil dari fraksinasi dengan pelarut etil asetat ditampung dan difraksinasi kembali sehingga diperoleh fraksi tidak larut dan fraksi air. Hasil

fraksinasi yaitu fraksi heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air masing-masing diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan dikeringkan di atas penangas air pada suhu 60°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Ilhami *et al.*, 2013).



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak dan fraksinasi daun yakon

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak berdasarkan pereaksi warna.

7.1 Flavonoid. Panaskan selama 1 menit Dua miligram ekstrak daun Yacon yang ditambah 5 ml aquadest, disaring dan diambil filtratnya. Tambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Kocok kuat campuran tersebut, biarkan sampai memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Depkes RI, 1980).

7.2 Saponin. Tambahkan 0,5 gram ekstrak pada sepuluh mililiter air panas dalam tabung reaksi yang telah didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 – 10 cm. Pada penambahan HCl 2N buih tidak hilang (Depkes RI, 1977).

7.3 Alkaloid. Tambahkan sedikit larutan HCl 2N pada 0,5 gram ekstrak, panaskan kemudian ditambahkan larutan Mayer, hasil positif ditunjukkan dengan endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI, 1977).

7.4 Triterpen. Ekstrak kental sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan penguap. Kloroform 0,5 mL untuk melarutkan residu, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid. Sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya sterol (Ciulei, 1984).

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun yakon secara KLT

Sebelum diidentifikasi dengan menggunakan KLT, sampel dilarutkan menggunakan pelarut, kemudian sampel yang telah dilarutkan ditotolkan pada plat silica gel GF254, dilakukan elusi sampai tanda batas. Deteksi bercak menggunakan UV 254nm, UV 366 nm dan pereaksi semprot. Identifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak daun yakon dilakukan dengan menggunakan KLT. Identifikasi dilakukan dengan penampak bercak diantaranya alkaloid dengan menggunakan reagen dragendrof, hasil positif berupa bercak coklat jingga berlatar belakang kuning. Golongan fenolik menggunakan pereaksi semprot FeCl_3 , hasil positif berupa bercak warna hijau kehitaman. Golongan flavonoid menggunakan pereaksi semprot sitoborat, hasil positif bercak kuning kehijauan. Golongan triterpen menggunakan pereaksi semprot Lieberman-Burchard, hasil positif bercak hijau-biru (Marliana 2007; Harbone 1987).

9. Uji aktivitas ekstrak dan fraksi daun yakon

9.1 Sterilisasi LAF. Nyalakan ultra violet (UV) selama 15 menit sebelum digunakan dan tutup pintu LAF. Kemudian lampu UV dimatikan dan pintu LAF dibuka, kemudian hidupkan lampu LAF dan sterilkan permukaan LAF dengan etanol 70%.

9.2 Sterilisasi alat. Untuk mensterilkan alat dapat dilakukan dengan mencuci alat menggunakan detergen atau antiseptik, kemudian dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadestilata selama satu jam kemudian dikeringkan, dan masukkan dalam autoklaf 15 menit pada suhu 121⁰C.

9.3 Pembuatan medium kultur. Pembuatan medium kultur dengan melarutkan masing-masing 10,4 gram bubuk RPMI dan M199 ke dalam 800 ml aquadestilata, tambahkan h 4-(2-hydroxyethyl) piperazineethanesulfonic acid (HEPES) dan NaHCO₃. Kemudian tambahkan aquadestilata sampai volume 1 L. Campuran sampai homogen dengan cara diaduk kemudian ukur pH pada 7,2-7,4 dengan penambahan 1M NaOH atau 1M HCl. Hasil yang diperoleh disterilisasi kembali dengan cara disaring menggunakan saringan membran 0,2µm, kemudian ditambahkan fungsi 0,5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan streptomisin 2% (Gusmita, 2010).

9.4 Pencairan sel. Dikeluarkan dari inkubator tabung yang berisi sel, cairan sel dipipet seluruhnya, kemudian disentrifus dan ditambahkan 5 mL medium PRMI. Dengan kecepatan 1500 rpm tabung disentrifuse selama 5 menit, terbentuk supernatan dan pellet. Pellet yang diperoleh di suspense ke 6 mL RPMI. Suspense sel tersebut dipipet dan masukkan ke dalam labu kultur dan inkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam (Gusmita, 2010).

9.5 Pemanenan sel T47D dan sel Vero. Jumlah sel T47D dan sel Vero cukup untuk dipanen, lalu ditambahkan tripsin 1ml agar sel mudah lepas. Kemudian sel dimasukan ke dalam tabung *conical steril* tambahkan media RPMI dan M199 sampai volume 10ml. Disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Buang supernatan yang ada dalam tabung dan tambahkan 3ml media 1640 dan media M119 dan resuspensi.

9.6 Perhitungan sel T47D dan sel Vero. Ambil suspensi sel 10 µl kemudian teteskan ke *Haemocytometer* dan hitung dengan mikroskop inverted. *Haemocytometer* berisi empat bilik hitung dan satu bilik terdiri dari 16 kotak. Sel yang mati terlihat gelap, sel yang berada sebelah kanan dan di batas luar sebelah atas tidak ikut dihitung. Sel yang berada di batas kiri dan atas ikut dihitung.

Jumlah sel terhitung/mL dapat dihitung dengan rumus :

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

Ambil suspensi sel dan untuk memperoleh konsentrasi sel jumlah media yang harus ditambahkan dihitung sebesar 2×10^4 . Sel dimasukkan ke dalam mikropate sumuran 96 dengan konsentrasi 2×10^4 sel / sumuran 100 μl selanjutnya diinkubasi selama 24 jam agar beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi ekstrak etanol daun yakon.

9.7 Pembuatan larutan uji. Larutan stock ekstrak etanol dan fraksi ekstrak daun yakon dengan kadar 10 mg/100 μl dalam DMSO. Kemudian dari larutan stock tersebut dibuat seri konsentrasi dalam medium kultur dengan variasi dosis 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,25 $\mu\text{g/ml}$, 15,625 $\mu\text{g/ml}$, 7,81 $\mu\text{g/ml}$. Dari variasi konsentrasi selanjutnya dipipet 100 μl ke dalam tiap sumuran dengan 3 kali pengulangan untuk tiap variasi dosis.

9.8 Pengujian MTT. Metode ini didasarkan pada perubahan garam *tetrazolium* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromida) MMT menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif dalam sel hidup. Pengujian dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dan sel Vero. Ambil 100 μl larutan uji disuspensikan dengan 100 μl sel dalam medium RPMI untuk sel T47D dan medium M199 untuk sel Vero. Kemudian suspensi tersebut di masukan ke dalam *microplate* 96 dengan variasi konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 15,6 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$ dan inkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5%, buang medium kultur dan pada masing-masing sumuran ditambahkan 110 μl reagen MTT ke setiap sumuran. Sel yang aktif (hidup) dan akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu., untuk menghentikan reaksi diantara sel hidup sel diinkubasi kembali selama 4 jam di dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37^0 ditambahkan 100 μl SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dan diinkubasi pada suhu kamar selama 12 jam di tempat gelap sehingga mikropate dibungkus dengan kertas atau aluminium foil. Pada panjang gelombang 595 nm inkubasi serapan dibaca dengan ELISA reader (Junedi 2000).

9.9 Uji Ekspresi protein p53 dan Bcl-2 dengan Metode Imunositokimia. Kultur sel sebanyak 5×10^4 sel/ sumuran ditransfer ke dalam 24-well plate yang telah diisi dengan *cover slip* kemudian sel diinkubasi semalam pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 5 %. Setelah sel pulih kembali, diberi perlakuan ekstrak dan fraksi dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci PBS kemudian ditambahkan metanol dingin dan diinkubasi di dalam freezer -4°C selama 10 menit. Sel yang telah difiksasi kemudian dicuci dengan aquades 2 kali kemudian diinkubasi dalam larutan hydrogen peroksidase selama 10 menit. Selanjutnya, sel ditetesi dengan *prediluted blocking serum* dan diinkubasi 10 menit. Kemudian ditetesi dengan Antibodi Monoklonal primer anti p53 (pengenceran 1:50), diinkubasi selama 10 menit, dan dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dalam biotin selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya sel ditetesi dengan antibodi sekunder (*biotinylated universal secondary antibody*) dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Kemudian preparat diinkubasi dalam *streptavidin-peroksidase* selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya, preparat dicuci kembali dengan PBS lalu diinkubasi dalam DAB selama 10 menit dan dicuci dengan aquades. Preparat kemudian direndam dalam larutan Mayer-Haematoxylin selama 3-4 menit untuk *counterstain* dan dicuci dengan aquades. *Cover slip* kemudian diangkat dandicelupkan ke dalam xylol, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol. Setelah kering, *cover slip* diletakkan di atas kaca obyek dan ditetesi dengan lem (*mounting media*). *Cover slip* ditutup dengan *slide* kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

E. Analisis Data

Hasil absorbansi adalah data yang diperoleh dari uji sitotoksik pada sel kanker payudara T47D dan sel Vero dengan metode MTT masing-masing sumuran, hasil dikonversikan dalam persen viabilitas sel dengan menggunakan rumus :

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

Dari hasil viabilitas sel, dapat perhitungan IC_{50} (*inhibitor Concentration* 50) dengan cara persamaan regresi linear yang menggambarkan antara persen (%) viabilitas sel T47D dan sel Vero dengan log konsentrasi sampel uji (Setyawan 2006). IC_{50} dapat dihitung dari persamaan $y = a + bx$, x adalah log konsentrasi senyawa dan y adalah persen viabilitas sel. Kurva hubungan antara log konsentrasi kadar senyawa versus % viabilitas, harga IC_{50} ditentukan dengan viabilitas sel diplotkan pada kurva sehingga diperoleh log kadar senyawa uji. IC_{50} dapat diperoleh dari antilog nilai x.

Metode imunositokimia digunakan untuk mengamati ekspresi p53 dan Bcl-2. Ekspresi p53 dan Bcl-2 dapat dilihat dengan warna coklat pada inti sel dan sitoplasma dengan bantuan mikroskop inverted. Hasil Pengamatan imunositokimia menggunakan antibodi monoklonal primer dikatakan positif adanya protein p53 dan Bcl-2 ditunjukkan adanya inti sel warna coklat/gelap, jika pada inti sel setelah fiksasi dengan hematoksin dihasilkan warna ungu, maka menunjukkan hasil negatif adanya protein p53 dan Bcl-2.

Dari data yang diperoleh dalam penelitian untuk tingkat ekspresi p53 dan Bcl-2 antara dosis pemberian ekstrak daun yakon, diuji dengan uji normalitas data menggunakan uji *Sapiro wilk* jika data yang diperoleh normal $P > 0,05$ dilakukan uji homogenitas dan jika data yang diperoleh tidak normal $P < 0,05$ dilanjutkan uji nonparametrik. Uji homogenitas untuk melihat apakah data yang diperoleh memiliki varian yang sama atau tidak, hasil ditunjukkan jika data yang diperoleh memiliki varian yang sama atau homogeny $P > 0,05$ dilanjutkan uji parametrik jika data $P > 0,05$ menggunakan uji *Anova* satu jalan. Apabila uji *Anova* satu jalan menunjukkan $P < 0,05$ maka ada perbedaan dan dapat dilanjutkan uji *Post Hoc Test*.

Hasil uji distribusi tidak normal $P < 0,05$ maka dilakukan uji nonparametrik dan jika hasil uji homogenitas tidak memiliki varian yang sama $P < 0,05$, dapat dilanjutkan uji *Kruskal Wallis*. $P < 0,05$ jika dari hasil *Kruskal Wallis* menunjukkan ada beda maka dilanjutkan uji *Mann Whitney*.