

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan, Alat dan Kultur Sel

4.1.1. Bahan Tanaman

Pada penelitian ini digunakan biji sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang didapat dari Kecamatan Kepohbaru, Kabupaten Bojonegoro. Biji sirsak tersebut diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian pelarut diuapkan dengan *rotavapour*.

4.1.2. Bahan Kimia dan Bahan Lain

Etanol 96% sebagai pelarut pengekstraksi, Media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) Gibco, *Fetal Bovine Serum* (FBS) Sigma, Penisilin – sterptomisin Sigma, Amfoterizin B Sigma, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), tripsin-EDTA Sigma (tripsin 0,25%), Tripan Blue Sigma, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) difenil tetrazolium bromida (MTT) Sigma, *Sodium Duodecyl Sulfate* (SDS) dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) Invitrogen.

4.1.3. Kultur Sel Kanker

Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah sel kanker payudara (T47D), sel kanker kolon (WiDr), sel kanker serviks (HeLa), dan sel kanker nasofaring (Raji) yang didapat dari laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.4. Alat

Horizontal *LAF* (*Laminar Air Flow*) Mascotte Model LH-S, *Direct Reading Micro Balance* SIMADZU Type LM-20, inkubator CO₂ New Brunswick Type Galaxy 170R (37°C, 95% kelembaban udara dan 5% CO₂), sentrifugator Hermle Type Z 206 A, hemasitometer Assistent, mikroskop *inverted* Olympus Type CKX41, 96-well plate Corning dan ELISA *reader* Robonik.

4.2. Rancangan Penelitian

4.2.1. Pembuatan Simplisia Biji Sirsak

Biji sirsak dicuci bersih terlebih dahulu. Lalu ditiriskan, kemudian ditumbuk hingga menjadi serbuk halus. Serbuk halus biji sirsak kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat terbuka dengan suhu ruang hingga benar-benar kering.

4.2.2. Pembuatan Ekstrak Biji Sirsak

Ditimbang 250 g serbuk simplisia biji sirsak dimasukkan ke dalam maserator. Tambahkan 500 ml pelarut (etanol 96%). Rendam selama 6 jam pertama sambil diaduk-aduk perlahan. Lalu diamkan hingga 18 jam. Pisahkan maserat dengan filtrasi. Ulangi proses penyarian diatas sebanyak 3 kali dengan jumlah dan jenis pelarut yang sama hingga pelarut jernih. Kumpulkan semua maserat, uapkan pelarut dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah (rotavapor) hingga didapatkan ekstrak kental.

4.2.3. Pengujian Skrining fitokimia

4.2.3.1. Golongan Alkaloid

1. Reaksi Pengendapan

Ekstrak yang setara dengan 20 gram bahan ditambahkan 10 ml HCl 2N kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 – 3 menit. Setelah dingin ditambahkan NaCl untuk mengendapkan protein yang dapat memberikan reaksi positif palsu, lalu filtrat disaring, kemudian ditambahkan HCl 2N sampai 10 ml. Filtrat digunakan untuk petunjuk adanya alkaloid dengan penambahan pereaksi pengendapan. Pereaksi yang digunakan antara lain Meyer dan Wagner. Ekstrak mengandung alkaloid bila timbul endapan setelah ditambah dengan pereaksi tersebut. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

2. Kromatografi Lapis Tipis

Filtrat ditambah NH_4OH 28% sampai alkalis, diekstraksi dengan 10 ml CHCl_3 , Fase CHCl_3 ditambah dengan NaSO_4 eksikatus, disaring, kemudian diuapkan sampai 1 ml. Ekstrak ditotolkan.

Fase Diam : Kiesel Gel GF 254

Fase gerak : aseton : air : ammonia (40 : 7 : 3)

Penampak noda : pereaksi Dragendorff

Positif bila terjadi noda merah jingga. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

4.2.3.2. Golongan Glikosida Saponin

1. Uji Buih

Uji buih saponin

Ekstrak setara 2 gram bahan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat - kuat dengan air suling 10 ml. Buih yang timbul diukur. Positif bila terjadi buih setinggi 3 cm di atas permukaan cairan, stabil selama 30 menit. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

2. Reaksi Warna

Ekstrak yang setara 10 gram bahan, diuapkan di atas penangas air sampai kering. Setelah dingin dikocok dengan 10 ml n-heksan. Kemudian didekantir dan filtrat dibuang. Diulang sampai n-heksan tidak berwarna. Residu ditambah 10 ml CHCl_3 , kemudian digojok selama 5 menit, didekantir dalam tabung reaksi yang berisi 100 mg NaSO_4 anhidrat, saring. Filtrat dibagi 3 (A, B, C). (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

Uji Liebermann-Burchard

A sebagai blanko, B ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat, kemudian dikocok pelan. Hasil positif bila terjadi perubahan warna hijau - biru untuk saponin steroid, merah - ungu untuk saponin triterpenoid dan kuning muda untuk saponin jenuh. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

Uji Salkowski

A sebagai blanko, C ditambah 1-2 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Hasil positif mengandung steroid tak jenuh bila terdapat cincin merah pada fase asam. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

3. Identifikasi Sapogenin

Ekstrak yang mengandung 10 gram bahan ditambah 5 ml HCl 2 N, dididihkan dan ditutup dengan corong berisi kapas basah selama 2 jam untuk menghidrolisis saponin. Setelah dingin, dinetralkan dengan ammonia, kemudian diekstraksi dengan 3 ml n-heksana sebanyak tiga kali, lalu diuapkan sampai tinggal 0,5 ml, ditotolkan pada pelat KLT.

Fase diam : Kiesel Gel GF 254

Fase Gerak : n-heksana – etil asetat (4 : 1)

Penampak noda : Anisaldehyda asam sulfat

Adanya sapogenin ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu (ungu)

4. Identifikasi Terpen / Steroid bebas secara KLT

Ekstrak yang mengandung 10 gram bahan ditambah dengan n-heksana, diaduk sampai larut, ditotolkan pada fase diam kemudian dieluasi dengan n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (4 : 1). Penampak noda menggunakan anisaldehyda asam sulfat. Langkah ini untuk identifikasi adanya steroid atau triterpenoid bebas. Positif bila terjadi noda warna merah-ungu setelah plat KLT dipanaskan di atas *hot plate*. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

4.2.3.3. Golongan Flavonoid

1. Reaksi Warna

Ekstrak yang setara dengan 10 gram bahan, dipanaskan di atas penangas air sampai kering. Diekstraksi berulang – ulang

dengan n-heksan sampai cairan tidak berwarna. Residu ditambah 2 ml etanol 80%, disaring, filtrate dibagi 4 (A, B, C, D).

Uji Bate – Smith & Metcalf

A sebagai blanko, B ditambah 0,5 ml HCl pekat, kemudian dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air. Positif bila terjadi warna merah terang atau ungu (leukoantosianin). (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

Uji Wilstater

A sebagai blanko, C ditambah 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong magnesium. Diamati warna yang terjadi, diencerkan dengan air suling kemudian ditambah 1 ml butanol. Diamati warna yang terjadi pada setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol dan merah tua menunjukkan adanya flavonon. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

2. Kromatografi Lapis Tipis

D ditotolkan pada fase diam.

Fase diam : Kiesel Gel GF 254

Fase gerak : butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5)

Penampak noda : pereaksi sitrat borat atau CeSO_4 atau uap ammonia

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan adanya noda kuning terang, coklat lemah, kuning hijau, merah jingga. Bila disemprot dengan CeSO_4 akan timbul warna oranye sampai coklat atau bila dialiri uap ammonia akan timbul warna kuning tidak permanen. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

4.2.3.4. Golongan Tanin dan Polifenol

Ekstrak yang setara dengan 10 gram bahan, diuapkan di atas penangas air sampai kering. Setelah dingin ditambah 20 ml air suling panas, dikocok sampai homogen kemudian ditambah 5 tetes NaCl 10 % untuk mengendapkan zat – zat lain, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian (A, B, C).

Uji Gelatin

Filtrat A sebagai blanko, B ditambah larutan gelatin 1%, lalu ditambah NaCl 10%. Jika terdapat endapan menunjukkan adanya tanin. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978).

Uji Ferri klorida

Filtrat C ditambah pereaksi ferri klorida. Diamati terjadinya perubahan warna. Bila timbul warna biru – hitam, hijau – biru, hijau – hitam menunjukkan adanya polifenol.

4.2.3.5. Golongan Antrakuinon

1. Reaksi warna

Uji Borntreger

Ekstrak yang setara dengan 10 gram bahan, diuapkan sampai kering. Setelah dingin, ditambahkan 10 ml air suling, kemudian disaring, filtrat diekstraksi dengan toluena 5 ml dalam corong pisah dua kali. Fase toluena diambil kemudian dibagi dua (A, B). A sebagai blanko, B ditambah 5 ml ammonia, kemudian dikocok. Positif bila terjadi warna merah pada lapisan alkali. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

Uji Modifikasi Borntreger

Ekstrak yang setara dengan 1 gram bahan, diuapkan di atas penangas air sampai kering. Setelah dingin ditambah 10 ml KOH 0,5 N dan 1 ml H₂O₂ encer, dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit kemudian disaring. Filtrat ditambah asam asetat glasial. Diekstraksi dengan toluena dua kali masing – masing 5 ml. Fase toluena diambil, dibagi dua (A, B). A sebagai blanko, B ditambah 2 – 5 ml larutan ammonia. Positif jika terjadi warna merah pada lapisan alkali. (Fong, 1990; Zaini dan Indrayanto 1978)

2. Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam : Kiesel Gel GF 254

Fase gerak : kloroform : etil asetat : asam asetat glasial
(75 : 24 : 1)

Penampak noda : larutan KOH 10% dalam metanol

Positif jika noda kuning, kuning - coklat, merah - ungu, hijau - ungu (Harbone, 1987)

4.2.4. Pengujian Sitotoksitas Secara *In Vitro*

4.2.4.1. Pembuatan Media Kultur Lengkap

Media Kultur Lengkap adalah media yang mengandung faktor pertumbuhan. Pembuatan media kultur lengkap dilakukan dengan cara mencairkan *Fetal Bovine Serum* (FBS), Penisilin-streptomisin, Amfoterizin B dan media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) pada suhu kamar sebelum digunakan. Ambil 10 ml FBS, 1 ml Penisilin-streptomisin dan 0,5 ml Amfoterizin B kemudian tuang ke dalam botol duran 100 ml. Tambahkan Media

RPMI ad 100 ml. Beri penandaan pada botol berupa nama media dan tanggal pembuatan media kultur lengkap.

4.2.4.2. Penumbuhan Sel

Sel apabila tidak digunakan dalam penelitian disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk waktu penyimpanan yang lama, atau disimpan dalam suhu -80°C untuk penyimpanan selama 2-3 bulan. Sel ditumbuhkan kembali dalam media saat akan digunakan dalam uji *in vitro*. Penumbuhan sel dilakukan dengan cara menyiapkan aliquot media kultur yang sesuai untuk sel, yaitu 3 ml media kultur dalam *conical tube* steril. Ampul (*cryo tube*) yang berisi suspensi sel diambil dari tangki nitrogen cair dan dicairkan pada suhu kamar hingga tepat mencair. Suspensi sel diambil dengan mikropipet 1 ml (blue tip), dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media kultur yang telah disiapkan. Menutup *Conical tube* dengan rapat, kemudian disentrifus pada 600 gram selama 5 menit. Pengerjaan kembali dilakukan di dalam LAF, *conical tube* dan tangan disemprot dengan alkohol 70%. *Conical tube* dibuka, lalu dituang supernatan media kultur ke dalam pembuangan. Media kultur baru ditambahkan sebanyak 4 ml, sel diresuspensi kembali hingga homogen. Suspensi sel kemudian di transfer ke dalam *flask*, ditambahkan lagi 5 ml media kultur baru. Kondisi sel diamati dengan mikroskop dan *flask* disimpan ke dalam inkubator CO_2 .

4.2.4.3. Penggantian Media Sel

Dalam pertumbuhannya, konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan produksi asam laktat dan berkurangnya nutrisi untuk

pertumbuhan sel. Guna mencapai kondisi sel yang pertumbuhannya optimum diperlukan penggantian media pertumbuhan.

Penggantian media pertumbuhan dilakukan dengan cara membuang media yang lama secara perlahan menggunakan mikropipet. Ditambahkan PBS sebanyak 3 ml ke dalam *flask*, lalu digoyang-goyangkan ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel. PBS dibuang dengan mikropipet. Media kultur sebanyak 5 ml di tuang ke dalam *flask* yang berisi sel, lalu dihomogenkan. Kondisi dan jumlah sel diamati secara kualitatif pada mikroskop *inverted*, diinkubasi semalam dan keadaan sel diamati keesokan harinya. Media kultur diganti bila sudah berwarna merah pucat.

4.2.4.4. 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.

Tahap awal panen sel adalah mengeluarkan sel dari inkubator CO₂ dan memastikan sel telah 80% konfluen. Media dibuang dengan menggunakan mikropipet. Sel dicuci sebanyak dua kali dengan PBS (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal). Tripsin-EDTA (trypsin 0,25%) ditambahkan secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Keadaan sel diamati di mikroskop, diinkubasi kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Media sebanyak 3 ml ditambahkan untuk

menginaktifkan tripsin. Resuspensi sel dengan mikropipet. Kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* lalu disentrifuge. *Conical tube* dibuka lalu media dibuang menggunakan mikropipet. Media kultur baru ditambahkan ke dalam *conical tube* sebanyak 10 ml.

4.2.4.5. Perhitungan Sel

Perhitungan sel dapat dilakukan dengan hemositometer di bawah mikroskop. Mula-mula panen sel diambil 50 μl di transfer ke dalam eppendorf dan ditambahkan 50 μl tripan blue. Dari campuran tersebut diambil 10 μl sel dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam hemositometer. Sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*. Sisa sel pada *conical* dilakukan *cryopreservation*, atau dilakukan sub kultur. Untuk sel yang akan ditanam (untuk perlakuan) dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *conical* yang lain, ditambahkan media kultur sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki.

Berikut cara perhitungan sel,

- a. Sel dihitung pada 4 kamar hemositometer. Sel yang biru (mati) dan sel yang berada dibatas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung.
- b. Dilakukan perhitungan jumlah sel per mL dengan rumus berikut,

Jumlah sel terhitung / mL =

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

- c. Dihitung jumlah total sel yang digunakan, semisal untuk menanam sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang diperlukan adalah $5 \times 10^3 / \text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran (dilebihkan)} = 5 \times 10^5$

Volume panen sel yang diperlukan dihitung pula,

Volume panen sel yang ditransfer =

$$\frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung / mL}}$$

- d. Volume panen sel yang ditransfer diambil kemudian ditambahkan media kultur hingga total volume yang diperlukan. Volume yang diperlukan untuk menanam sel ialah tiap sumuran diisi 100 μl media kultur berisi sel, maka $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$.

4.2.4.6. Preparasi Sampel

Ditimbang sampel ekstrak sebanyak 10,0 mg di dalam eppendorf selanjutnya ditambahkan 50 μl DMSO dan coba larutkan dengan bantuan vortex. Jika belum larut, dapat ditambahkan 50 μl DMSO lagi dan larutkan kembali. Kemudian dibuat seri kadar sampel dengan pengenceran stok dalam DMSO menggunakan media kultur sebanyak 7 seri konsentrasi 250, 150, 100, 50, 10, 2, 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (ppm), dan setiap perlakuan dibuat triplo (tiga replikasi).

4.2.4.7. Tahapan Pengujian

Sel yang telah konfluen 80% dipanen. Ditransfer beberapa sel untuk dilakukan perhitungan jumlah sel yang dibutuhkan, dimana

tiap sumuran dibutuhkan 5×10^3 sel. Sel diinkubasi dalam incubator selama semalaman, keesokan harinya dilakukan dokumentasi. Apabila keadaan sel sudah normal kembali, ditambahkan seri kadar konsentrasi yang telah dibuat. Sel diinkubasi kembali dengan inkubator semalaman. Menjelang akhir inkubasi dilakukan dokumentasi. Kemudian ditambahkan reagen MTT ke dalam masing-masing sumuran sejumlah $100\mu\text{l}$ / sumuran. Diinkubasi dalam incubator selama 2-4 jam, diamati dengan mikroskop. Apabila sudah terbentuk kristal formazan, dilakukan dokumentasi dan ditambahkan SDS stopper dalam masing-masing sumuran sebanyak $100\mu\text{l}$. Plate dibungkus menggunakan aluminium foil, diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar selama semalam. Keesokan harinya diamati absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan λ 595 nm. Pada percobaan diperoleh absorbansi 3 macam kontrol dan senyawa uji meliputi :

- a. Kontrol sel berisi media kultur + sel, tanpa bahan uji (sebagai kontrol positif)
- b. Kontrol media berisi media kultur, tanpa sel (sebagai kontrol negatif)
- c. 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)
- d. Senyawa uji berisi media kultur + sel + senyawa uji

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Seri konsentrasi 1-7 Sampel (ekstrak etanol biji sirsak)												
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H	Kontrol sel			Kontrol DMSO			Kontrol Media						

Tabel IV.1. Desain Plate

4.3. Analisis Data

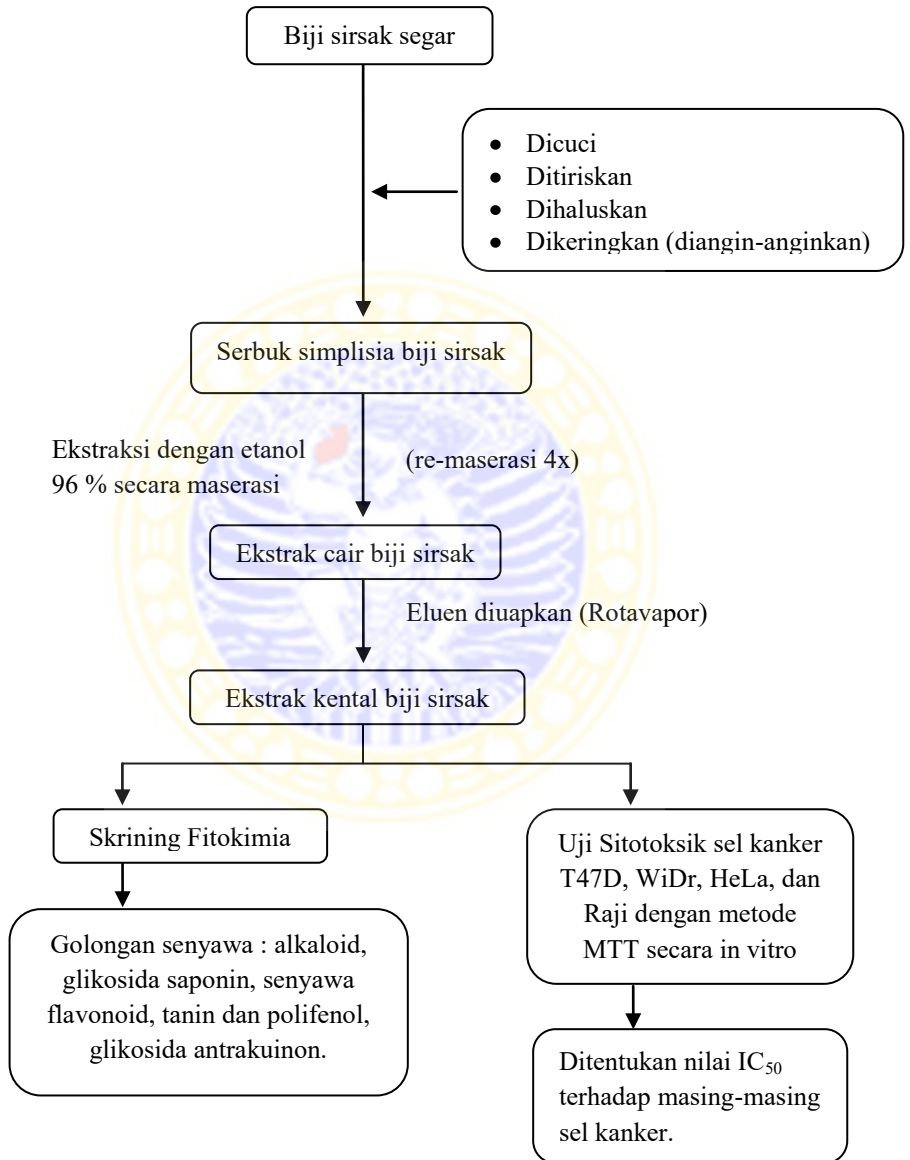
Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dilakukan penentuan persentase sel hidup menggunakan rumus :

Persentase sel hidup =

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

Selanjutnya, bersama dengan data seri kadar konsentrasi ditentukan nilai IC50 menggunakan analisis probit dengan program software SPSS

4.4. Kerangka Operasional



Gambar 4.1. Skema kerangka operasional