

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.1.1. Bahan Tanaman**

Bahan tanaman yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah biji dari tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) yang diperoleh dari Sampang, Madura.

##### **4.1.2. Bahan Kimia**

Media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Sigma), penisilin-streptomisin (Sigma), amfoterizin B (Sigma), *dimethyl sulfoxide* (DMSO), tripsin-EDTA (Sigma), *tripan blue* (Sigma), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) *difenil tetrazolium bromide* (MTT) (Sigma), *sodium duodecyl sulphate* (SDS), dan *Phosphate Blue Saline* (PBS) (Invitrogen).

##### **4.1.3. Sel Kanker**

Sel kanker yang dipergunakan adalah sel kanker payudara (T47D), sel kanker serviks (HeLa), sel kanker kolon (WiDr), sel kanker nasofaring (Raji) yang didapat dari Laboratorium Kultur Sel Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

##### **4.1.4. Alat-Alat**

Horizontal LAF (*Laminar Air Flow*) Mascotte Type LH-S, *Direct Reading Micro Balance* SIMADZU Type LM-20, inkubator CO<sub>2</sub> New Brunswick Type Galaxy 170R (37°C, 95% kelembaban udara dan 5% CO<sub>2</sub>),

hemasitometer Assistent, mikroskop *inverted* cahaya Olympus Type CKX41, 96-microwell plate Corning dan ELISA reader Robonik.

## **4.2. Rancangan Penelitian**

### **4.2.1. Pembuatan Simplisia**

Bahan tanaman yaitu biji dari tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40-50°C dan tidak terkena sinar matahari sampai benar-benar kering. Setelah kering biji srikaya dihaluskan dengan cara digiling.

### **4.2.2. Pembuatan Ekstrak**

Serbuk dari biji srikaya (*Annona squamosa* L.) diekstraksi dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan cara merendam 250 gram serbuk biji srikaya (*Annona squamosa* L.) di dalam 500 ml etanol 96% selama 24 jam untuk menarik keluar senyawa polar dan non polar dari serbuk biji srikaya (*Annona squamosa* L.). Setelah direndam selama 24 jam, rendaman tersebut disaring dengan bantuan corong Buchner lalu filtrat ditampung. Residu dimaserasi kembali berulang sebanyak tiga kali. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan menguapkan pelarutnya melalui bantuan alat vakum *rotary evaporation* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

### **4.2.3. Skrining Fitokimia**

Ekstrak etanol biji srikaya (*Annona squamosa* L.) yang sudah dipekatkan kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi golongan senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak (Fong *et al*, 1973)

#### 4.2.3.1. Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

##### Preparasi Sampel

Sebanyak 0,3 gram ekstrak ditambah 5 ml HCl 2N, dipanaskan diatas penangas air selama 2-3 menit sambil diaduk. Setelah dingin tambahkan 0,3 gram NaCl diaduk rata kemudian disaring. Filtrat ditambah 5 ml HCl 2N kemudian dibagi menjadi tiga bagian yang selanjutnya disebut sebagai larutan IA, larutan IB, dan larutan IC.

##### Reaksi Pengendapan

Larutan IA ditambah dengan pereaksi Mayer, larutan IB ditambah dengan pereaksi Wagner dan larutan IC dipakai sebagai blanko.

##### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Larutan IC ditambahkan  $\text{NH}_4\text{OH}$  28% sampai larutan menjadi basa, kemudian diekstraksi dengan 5 ml kloroform bebas air, lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan dalam methanol dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

- Fase diam : Kiesel gel GF 254
- Fase gerak : etil asetat - metanol - air (6 : 4 : 2)
- Penampak noda : pereaksi Dragendorf

Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak.

#### 4.2.3.2. Identifikasi Senyawa Glikosida Saponin, Triterpenoid, dan Steroid

##### Uji Buih

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 10 ml air suling dan dikocok dengan kuat selama kira-

kira 30 detik. Tes buih dinyatakan positif apabila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm diatas permukaan cairan.

#### **Uji Liebermann-Burchard**

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dilarutkan dalam 15 ml etanol, lalu dibagi menjadi tiga bagian masing-masing 5 ml yang dikemudian disebut larutan IIA, larutan IIB, larutan IIC. Larutan IIA digunakan sebagai blanko dan larutan IIB ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat lalu dikocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya saponin steroid, warna merah ungu menunjukkan adanya saponin triterpenoid dan warna kuning muda menunjukkan adanya saponin triterpenoid atau steroid jenuh.

#### **Uji Salkowski**

Larutan IIA digunakan sebagai blanko dan larutan IIC ditambahkan 1-2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin warna merah.

#### **Identifikasi Sapogenin Steroid/Triterpenoid secara KLT**

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 5 ml HCl 2N, didihkan dan tutup dengan corong berisi kapas basah selama dua jam untuk menghidrolis saponin. Setelah dingin, netralkan dengan ammonia, kemudian ekstraksi dengan 3 ml n-heksana sebanyak tiga kali, lalu uapkan sampai tinggal 0,5 ml, totolkan pada pelat KLT. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

- 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 atau kuning.

### **Identifikasi Terpenoid/Steroid Bebas secara KLT**

Sedikit ekstrak ditambahkan beberapa tetes etanol diaduk sampai larut, lalu totolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : n-heksana - etil asetat (4 : 1)

Penampak noda : anisaldehyda asam sulfat

Adanya terpenoid/steroid bebas ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu.

### **4.2.3.3. Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid**

#### **Preparasi Sampel**

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dikocok dengan 3 ml n-heksana berkali-kali sampai ekstrak n-heksana tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam etanol dan dibagi menjadi empat bagian yang masing-masing disebut larutan IIIA, larutan IIIB, larutan IIIC, larutan IIID.

#### **Uji Bate Smith dan Metcalf**

Larutan IIIA sebagai blanko, larutan IIIB ditambahkan 0,5 ml HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin.

#### **Uji Wilstater**

Larutan IIIA sebagai blanko, larutan IIIC ditambahkan 0,5 ml HCl pekat dan empat potong magnesium. Diamati warna yang terjadi, kemudian diencerkan dengan air suling dan ditambahkan 1 ml butanol. Diamati perubahan warna yang terjadi pada setiap lapis. Perubahan warna merah

jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavanon.

### **Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Larutan IIID ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi ini menggunakan :

Fase diam : lapisan tipis selulosa

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

(lapisan atas diambil sebagai fase gerak)

Penampak noda : pereaksi sitrat borat atau uap ammonia

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif. Noda kuning yang ditimbulkan oleh uap ammonia akan hilang secara perlahan ketika ammonia menguap dari noda. Sedangkan noda kuning yang ditimbulkan oleh pereaksi sitrat borat sifatnya permanen.

#### **4.2.3.4. Identifikasi Senyawa Golongan Polifenol dan Tanin**

##### **Preparasi Sampel**

Sebanyak 0,3 gram ekstrak ditambahkan 10 ml akuades panas, diaduk dan dibiarkan sampai temperatur kamar lalu ditambahkan 3-4 tetes 10% NaCl, diaduk dan disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian masing-masing sekitar 4 ml dan disebut sebagai larutan IVA, larutan IVB, dan larutan IVC.

##### **Uji Gelatin**

Larutan IVA digunakan sebagai blanko, larutan IVB ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.

### **Uji Ferriklorida**

Sebagian larutan IVC diberi beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ , kemudian diamati terjadinya perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman maka senyawa menunjukkan adanya polifenol. Jika pada penambahan gelatin dan  $\text{NaCl}$  tidak timbul endapan tetapi setelah ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol.

### **Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Sebagian larutan IVC digunakan untuk pemeriksaan dengan KLT.

Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel gel GF 254  
Fase gerak : kloroform - etil asetat - asam formiat  
(0,5 : 9 : 0,5)

Penampak noda : pereaksi  $\text{FeCl}_3$

Jika timbul warna hitam menunjukkan adanya polifenol dalam sampel.

### **4.2.3.5. Identifikasi Senyawa Golongan Antrakinon**

#### **Uji Brontrager**

Ekstrak sebanyak 0,3 gram diekstraksi dengan 10 ml akuades, saring, lalu filtrate diekstraksi dengan 5 ml benzene dalam corong pisah. Ekstrak dilakukan sebanyak dua kali. Kemudian fase benzene dikumpulkan dan dibagi menjadi dua bagian, disebut sebagai larutan VA dan VB. Larutan VA sebagai blanko, larutan VB ditambah ammonia dan dikocok. Warna merah menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

### Uji Modifikasi Brontrager

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambahkan dengan 5 ml KOH 0,5 N dan 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encer. Dipanaskan dan disaring, filtrate ditambah asam asetat glacial, kemudian diekstraksi dengan benzene. Fase benzene diambil dan dibagi menjadi dua sebagai larutan VIA dan VIB. Larutan VIA sebagai blanko, larutan VIB ditambahkan ammonia. Warna merah atau merah muda pada lapisan alkalis menunjukkan adanya antrakininon.

### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel gel GF 254  
Fase gerak : benzena - etil asetat - asam asetat glacial  
(75 : 24 : 1)

Penampak noda : larutan 10% KOH dalam metanol

Timbulnya noda berwarna kuning, kuning coklat, merah ungu atau hijau ungu menunjukkan adanya senyawa antrakininon.

## 4.2.4. Pengujian Sitotoksik secara *In Vitro*

### 4.2.4.1. Pembuatan Media Kultur Lengkap

Media Kultur Lengkap adalah media yang mengandung faktor pertumbuhan seperti *Fetal Bovine Serum* (FBS), Penisilin-Streptomisin sebagai antibiotik, dan Ampoterizin B sebagai anti jamur. Pembuatan media kultur lengkap dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF) pada kondisi aseptis.

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

#### 4.2.4.2. Penumbuhan Sel (*Cell Thawing*)

Sel apabila tidak dipergunakan dalam penelitian disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk waktu penyimpanan yang lama atau dapat penyimpanan dalam suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan selama 2-3 bulan. Saat akan dipakai untuk uji *in vitro* sel ditumbuhkan kembali (*Cell Thawing*) dalam media. Penumbuhan sel dilakukan dengan cara menyiapkan 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, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media kultur yang telah disiapkan. *Conical tube* ditutup dengan rapat, disentrifus pada 600 rpm 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 ditransfer ke dalam *flask*. Kondisi sel diamati dengan mikroskop dan *flask* disimpan ke dalam inkubator  $\text{CO}_2$ .

#### 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.

Media dihisap dan dibuang secara perlahan dengan mikropipet. PBS sebanyak 0,5 ml dituang ke dalam *flask*, lalu digoyang-goyangkan ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel. PBS dibuang dengan mikropipet. Media kultur sebanyak 3 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.

#### 4.2.4.4. Panen Sel

Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Poin utama dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel itu sendiri.

Sel dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub> dan dipastikan 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 (tripsin 0,25%) ditambahkan secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Tambahkan media sebanyak 5 ml untuk menginaktifkan tripsin. Resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Kemudian sel dipindahkan ke dalam *Conical tube*, dan ditambahkan Media ad 10 ml.

#### 4.2.4.5. Perhitungan Sel

Sel yang akan digunakan untuk uji sitotoksik harus memiliki jumlah tertentu dan antar kelompok perlakuan harus homogen. Perhitungan sel tersebut dapat dilakukan dengan hemositometer dibawah mikroskop. Syarat perhitungan sel dengan metode hemositometri adalah sel harus berdiri sendiri atau dikatakan tidak menggerombol.

Pipet 50  $\mu\text{l}$  panen sel lalu pindahkan dalam *cryo tube*, setelah itu tambahkan 50  $\mu\text{l}$  *tripan blue*. Penambahan *tripan blue* adalah untuk membedakan sel yang hidup dan sel yang sudah mati. Sel yang telah mati akan berwarna biru.

Ambil 10  $\mu\text{l}$  dan di pipetkan ke hemasitometer. Sel dihitung di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*. Sisa sel pada *conical* dilakukan *cryopreservation*, atau dilakukan sub kultur. Berikut cara perhitungan sel :

- Sel dihitung pada 4 kamar hemasitometer. Sel yang berwarna biru (mati) dan sel yang berada pada dibatas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung.
- Lakukan perhitungan jumlah sel per mL dengan rumus berikut,  
Jumlah sel terhitung / ml :

$$\frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 2 \times 10^4$$

- Jumlah sel yang dibutuhkan untuk ditanam setiap sumuran *96-well plate* adalah  $5 \times 10^3$ . Maka jumlah yang dibutuhkan 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 =

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

- 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  $\mu\text{l}$  media kultur berisi sel, maka  $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$ .

#### 4.2.4.6. Preparasi Sampel

Tahap awal preparasi sampel adalah dengan menimbang kurang lebih 10,0 mg sampel di dalam eppendorf, selanjutnya ditambahkan 50  $\mu$ l DMSO dan larutkan dengan bantuan vortex. Jika belum larut dapat ditambahkan 50  $\mu$ l DMSO lagi dan coba larutkan dengan bantuan vortex. Jika belum larut, dapat ditambahkan 50  $\mu$ l 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 ppm. Setiap perlakuan dibuat tiga kali replikasi.

#### 4.2.4.7. Tahapan Pengujian

1. Sel yang sudah konfluen dipanen.
2. Transfer sejumlah sel yang dibutuhkan dimana jumlah sel persumuran yang dibutuhkan adalah  $5 \times 10^3$  sel/sumuran, kemudian masukkan ke dalam inkubator selama semalaman.
3. Setelah 24 jam lihat kondisi sel, apabila sel sudah pulih ditambahkan seri kadar konsentrasi sampel yang telah dibuat. Setelah itu dilakukan inkubasi kembali dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama semalaman.
4. Keesokan harinya lakukan pengamatan terhadap kondisi sel setelah diberi sampel perlakuan dan dilakukan dokumentasi.
5. Tambahkan MTT ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 100  $\mu$ l/sumuran, kemudian diinkubasi kembali selama 3-4 jam sampai terbentuk kristal formazan.
6. Lakukan dokumentasi kembali dengan mikroskop apabila Kristal formazan sudah terbentuk, lalu tambahkan SDS *stopper* sebanyak 100  $\mu$ l/sumuran kedalam masing-masing sumuran.

7. *96-well plate* ditutup rapat dengan menggunakan aluminium foil dan diletakkan di tempat tertutup (tidak lagi di dalam inkubator).
8. Setelah 15-24 jam berikutnya, amati nilai absorbansinya dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pada percobaan akan diperoleh absorbansi dari 3 macam kontrol dan senyawa uji meliputi :
  - a. Kontrol sel berisi sel + media kultur, tanpa bahan uji (kontrol positif).
  - b. Kontrol media kultur, tanpa sel (kontrol negatif).
  - c. Kontrol pelarut berisi sel + media kultur + DMSO dengan konsentrasi terbesar pada seri konsentrasi (% DMSO terbesar dilihat dari konsentrasi DMSO dalam seri konsentrasi sampel yang paling pekat).
  - d. Senyawa uji berisi sel + media kultur + senyawa uji.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	7 seri konsentrasi sampel												
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H	Kontrol sel + media			Kontrol sel + media + DMSO			Kontrol Media						

**Gambar 4.1.** Desain percobaan pada *96-well plate*

### 4.3. Analisis Data

Pada percobaan diperoleh absorbansi dari tiga macam kontrol dan senyawa uji meliputi kontrol sel berisi media kultur dan sel, kontrol pelarut berisi media kultur ditambah sel dan DMSO, kontrol media berisi media kultur, dan senyawa uji berisi media kultur ditambah sel dan senyawa uji.

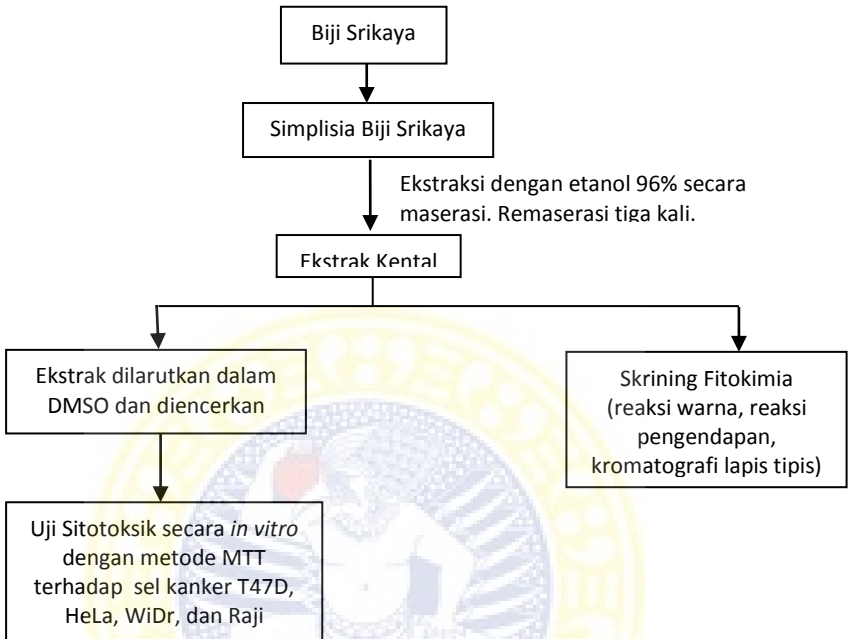
Berdasarkan nilai absorban yang diperoleh dilakukan penentuan persen viabilitas dengan menggunakan rumus :

Persentase sel hidup =

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

Bersama dengan data seri kadar ditentukan nilai  $IC_{50}$  dengan analisis probit menggunakan program komputer SPSS.

#### 4.4. Skema Rancangan Penelitian



**Gambar 4.2.** Skema Rancangan Penelitian