

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan, Alat, dan Sel Kultur Kanker

4.1.1 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan herba sambiloto yang diambil dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) di daerah kota Mojokerto, Jawa Timur, Indonesia yang telah disediakan di Departemen Fitokimia dan Farmakognosi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain

Etanol 96%, NaHCO₃, 5-Fluorouracil, Aqua bidestilata, RPMI, DMSO, FBS, Tripan Blue, Penisilin – streptomisin, MTT, PBS, Fungizone, Tripsin-EDTA, SDS.

4.1.3 Alat

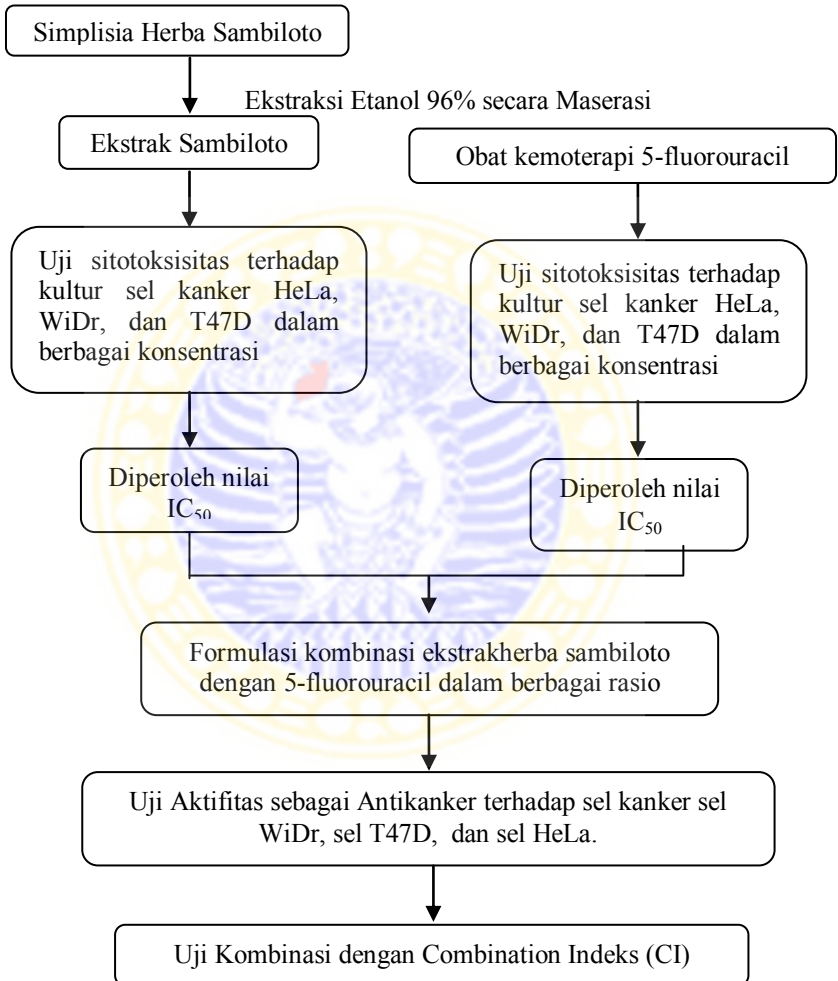
LAF, Otoklaf, Mikropipet, 96 well plat, Pipet Pasteur, Sentrifugator, Hemasitometer, Vortex, Conical Tube, Inkubator CO₂, ELISA reader, Cryo, Mikroskop inverted, Flask, Freezer -20°C, Blue tip, Yellow tip.

4.1.4 Sel Kultur Kanker

Sel kultur kanker yang digunakan adalah sel kanker serviks (sel HeLa), Sel kanker payudara (T47D), dan sel kanker kolon (Sel WiDr) diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.2 Rancangan Penelitian

Skema dari rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut ini.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.3 Jalannya Penelitian

4.3.1 Preparasi Ekstrak Sambilotto

Herba Sambilotto dicuci bersih terlebih dahulu. Lalu potong kecil-kecil. Potongan-potongan kecil Herba Sambilotto kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat terbuka dengan suhu ruang hingga benar-benar kering (kadar air sedikit). Setelah kering, diserbuk hingga halus menggunakan mortir dan stamper.

Ambil 1 bagian serbuk kering Herba Sambilotto dimasukkan ke dalam maserator. Tambahkan 10 bagian pelarut (Etanol 96%). Rendam selama 6 jam pertama sambil diaduk-aduk perlahan. Lalu diamkan hingga 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian diatas sekurang-kurangnya 2 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. Selanjutnya ekstrak dapat digunakan sebagai bahan uji (Departemen Kesehatan RI, 2008).

4.3.2 Penyiapan Media Kultur

a. Pembuatan Media Cair

Pembuatan media cair dilakukan dengan menggunakan prosedur sebagai berikut :

1. Menyiapkan media padat yang akan digunakan
2. Menyiapkan 950 mL akuabides steril dalam gelas beaker 1 liter di dalam LAF
3. Menuang media bubuk ke dalam akuabides steril ke dalam gelas beaker, aduk hingga rata

4. Membilas bagian dalam pembungkus media bubuk dengan akuabides, menuang cairannya ke dalam gelas beaker di atas
5. Menambahkan 2,2 gram NaHCO_3 untuk setiap liter media yang dibuat, aduk rata
6. Menambahkan akuabides steril hingga volume 1 liter
7. Mengaduk dengan magnetic stirrer hingga semua media padat dan NaHCO_3 dapat larut
8. Melakukan adjusting pH (seharga 0,2-0,3 dibawah ph yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1N atau HCL 1N
9. Melakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, menampung ke dalam botol Duran 500mL
10. Memberi tanda dan menyimpan media di kulkas dengan suhu 4°C

b.Pembuatan Media Kultur Lengkap

Sedangkan pembuatan media kultur lengkap dilakukan dengan menggunakan prosedur berikut:

1. Mencairkan FBS dan Penisilin-streptomisin pada suhu kamar terlebih dahulu sebelum digunakan
2. Menyiapkan botol Duran volume 100mL
3. Mengambil 10 mL FBS, dituang ke dalam botol Duran
4. Mengambil 1 mL Penisilin-streptomisin, dituang ke dalam botol Duran, ad 100 mL (sekitar leher botol)
5. Diberi penandaan pada botol berupa nama media, tanggal pembuatan media

4.3.3 Preparasi Sel

a.Penumbuhan Sel

Penumbuhan Sel dilakukan dengan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menyiapkan MK yang sesuai untuk sel, yaitu 3 ml MK dalam conical tube steril
2. Mengambil ampul (cryo tube) yang berisi sel dari tangki nitrogen cair (atau dari freezer -80°C)
3. Mencairkan suspensi sel dalam cryo tube pada suhu kamar hingga tepat mencair
4. Mengambil suspensi sel dengan mikropipet 1 ml (blue tip), memasukkan tetes demi tetes ke dalam MK yang telah disiapkan (langkah 1)
5. Menutup conical tube dengan rapat. Disentrifugasi dengan dengan sentrifus untuk conical tube (tanpa pendingin) pada 600 g selama 5 menit
6. Pengerjaan kembali dilakukan di dalam LAF. Menyemprot conical tube dan tangan dengan alcohol 70%
7. Membuka conical tube, menuang supernatant MK ke dalam pembuangan
8. Menambahkan 4 ml MK baru, resuspensi kembali sel hingga homogen
9. Mentransfer masing-masing 2 ml suspense sel ke dalam 2 cell culture dish
10. Menambahkan masing-masing 5 ml MK ke dalam dish, dihomogenkan
11. Mengamati kondisi sel dengan mikroskop
12. Memberi penandaan dan disimpan sel ke dalam inkubator CO_2

Pada kultur sel, sel yang akan diteliti ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur suhu 37°C , lingkungan gas (5% CO_2 / 95% O_2) dan pH 7,4-7,7 (Spector, 1998).

b. Penggantian Media Sel

Penggantian Media Sel dilakukan dengan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menyiapkan PBS dan MK di dalam *conical tube*.
2. Menghisap dan membuang media lama secara perlahan dengan pipet Pasteur
3. Menuang 3 ml PBS ke dalam dish, menggoyang-goyangkan dish ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel
4. Membuang PBS dengan pipet Pasteur
5. Menuang 7 ml MK ke dalam dish yang berisi sel, dihomogenkan
6. Mengamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop inverted
7. Menginkubasi semalam dan mengamati keadaan sel keesokan harinya

c. Panen Sel

Sedangkan untuk proses panen sel dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

1. Mengambil sel dari inkubator CO₂, mengamati kondisi sel. Memanen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen
2. Membuang media dengan menggunakan pipet Pasteur steril
3. Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal)
4. Menambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
5. Menambahkan media ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin. Meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol)

6. Mengamati keadaan sel di mikroskop. Meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
7. Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru

d. Perhitungan Sel

Perhitungan sel dilakukan dengan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut :

1. Mengambil sel dari inkubator CO₂ dan mengamati kondisi sel
2. Membuang media dengan menggunakan pipet Pasteur steril
3. Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + ½ volume media awal)
4. Menambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam incubator selama 3 menit
5. Menambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin. Meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol)
6. Mengamati keadaan sel di mikroskop. Meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
7. Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru. Menambahkan MK kurang lebih 2-3 ml. Meresuspensi sel
8. Mengambil 10 µl panen sel dan memipet ke hemasitometer
9. Menghitung sel di bawah mikroskop (inverted atau mikroskop cahaya) dengan counter. Prosedur penghitungan sel dibawah
10. Melakukan sub kultur atau cryopreservation, dengan sisa sel pada *conical* (no. 7)
11. Untuk sel yang akan ditanam (untuk perlakuan) dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *conical* yang lain dan menambahkan MK sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki

Cara perhitungan sel:

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak.

1. Menghitung sel pada 4 kamar hemositometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung.
2. Menghitung jumlah sel per mL dengan rumus dibawah

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

3. Menghitung jumlah total sel yang diperlukan.

Misal untuk menanam sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang diperlukan adalah $5 \times 10^3 / \text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran}$ (dibuat lebih) = 5×10^5

4. Menghitung volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus di bawah ini

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

5. Mengambil volume panen sel transfer ke *conical tube* baru kemudian menambahkan MK sampai total volume yang diperlukan. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100 μl MK berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel = $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$.

4.3.4 Pembuatan Larutan Induk

a. Ekstrak Herba Sambiloto

Ditimbang ekstrak sambiloto 5,0 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO dalam tabung ependorf, kemudian divortex sampai larut, sehingga diperoleh larutan ekstrak sambiloto sebesar 50000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. selanjutnya dilakukan pengenceran dengan 7 seri konsentrasi pada tiga kultur sel kanker yaitu 5,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50,41 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 126,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 252,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 504,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Dari ke tujuh seri konsentrasi tersebut didapatkan IC_{50} tunggal ekstrak herba sambiloto pada sel HeLa 37,939 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sel T47D 62,615 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dan sel WiDr 68,924 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

b. Agen kemoterapi 5-Fluorouracil

Diambil 10 μL dari sediaan injeksi 5-Fluorouracil sebesar 50.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dilakukan pengenceran dengan 7 seri konsentrasi pada tiga kultur sel kanker yaitu 0,188 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,313 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,625 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; dan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Dari ke tujuh seri konsentrasi tersebut didapatkan IC_{50} tunggal agen kemoterapi 5-Fluorouracil pada sel HeLa 71,493 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sel T47D 2,975 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dan sel WiDr 38,050 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tabel 4.1. Desain Plate Perlakuan Tunggal

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Rentang konsentrasi 5-Fluorouracil			Rentang konsentrasi 5-Fluorouracil			Rentang konsentrasi 5-Fluorouracil			Kontrol sel		
B										WiDr		
C										Kontrol sel		
D										T47D		

E	(triplo)			(triplo)			(triplo)			Kontrol sel		
F	Sel kanker			Sel kanker			Sel kanker			HeLa		
G	WiDr			T47D			HeLa			Kontrol Media		
H												

Kontrol sel = media kultur + sel

Kontrol pelarut = media kultur + sel + DMSO

Kontrol media = media kultur

Senyawa uji = media kultur + sel + senyawa uji

4.3.5 Uji sitotoksisitas dan kokemoterapi dengan metode MTT

Sel sejumlah 10^4 sel/sumuran ditanam dalam *96-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Keesokan harinya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung DMSO 0,5% v/v saja (kontrol) atau sampel baik dalam bentuk tunggal yaitu ekstrak herba sambiloto atau agen kemoterapi 5-Fluorouracil saja maupun gabungan keduanya (kombinasi), inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 PBS. Kemudian kedalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung MTT 0,5 mg/ml, inkubasi lagi selama 3-4 jam pada suhu 37°C . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, ditambahkan larutan SDS untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Hasil absorbansi kemudian diolah dengan program SPSS 20 sehingga didapatkan IC_{50} ekstrak herba sambiloto dan 5-Fluorouracil terhadap sel HeLa, WiDr, dan T47D.

4.3.6 Uji Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Sambilotto dengan 5-Fluorouracil

Dosis yang digunakan untuk kombinasi ini dilihat terlebih dahulu berdasarkan efek sitotoksitas yang ditimbulkan oleh masing-masing dosis dari ekstrak herba sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees.) serta obat kemoterapi 5-Fluorouracil. Kemudian ditentukan formulasi kombinasi dengan perbandingan, $1/2 IC_{50}$, $3/8 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$, dan $1/8 IC_{50}$

Tabel 4.2. Perbandingan kadar kombinasi

5-Fluorouracil (IC_{50}) (ppm)	Ekstrak herba sambilotto (IC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)			
	1/8	1/4	3/8	1/2
1/8	1/8 : 1/8	1/8 : 1/4	1/8 : 3/8	1/8 : 1/2
1/4	1/4 : 1/8	1/4 : 1/4	1/4 : 3/8	1/4 : 1/2
3/8	3/8 : 1/8	3/8 : 1/4	3/8 : 3/8	3/8 : 1/2
1/2	1/2 : 1/8	1/2 : 1/4	1/2 : 3/8	1/2 : 1/2

Tabel 4.3. Desain plate uji kombinasi pada sel T47D, sel HeLa, dan sel WiDR

	1	2	3	1/2 IC_{50} 5-FU			1/2 IC_{50} 5-FU			10	11	12
				4	5	6	7	8	9			
A	Seri konsentrasi 1-4 Ekstrak etanol			1/2 IC_{50} Ekstrak			1/2 IC_{50} Ekstrak			Kontrol sel		
B				3/8 IC_{50} Ekstrak			3/8 IC_{50} Ekstrak					
C				1/4 IC_{50} Ekstrak			1/4 IC_{50} Ekstrak			Kontrol media		
D				1/8 IC_{50} Ekstrak			1/8 IC_{50} Ekstrak					

E	Seri konsentrasi	1/2 IC ₅₀ Ekstrak	1/2 IC ₅₀ Ekstrak			
F	1-4	3/8 IC ₅₀ Ekstrak	3/8 IC ₅₀ Ekstrak			
G	5-Fluorouracil	1/4 IC ₅₀ Ekstrak	1/4 IC ₅₀ Ekstrak			
H		1/8 IC ₅₀ Ekstrak	1/8 IC ₅₀ Ekstrak			
		$\left[\begin{array}{c} \text{3/8 IC}_{50}\text{5-FU} \\ \text{1/8 IC}_{50}\text{5-FU} \end{array} \right]$				

Kontrol sel = media kultur + sel

Kontrol media = media kultur

4.4 Perhitungan dan Interpretasi Data

Pembacaan absorbansi menggunakan ELISA *reader* dengan λ 595 nm pada *96-well plate*, didapatkan data sampel (ekstrak herba sambiloto atau agen kemoterapi 5-Fluorouracil) ke dalam tabel di bawah ini:

a. Perhitungan sel hidup

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

b. Perhitungan IC₅₀ didapatkan dengan menggunakan persen probit melalui program SPSS

c. Perhitungan Harga CI (*Combination index*)

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

Dx : Konsentrasi satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi

(D)₁, (D)₂ : Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama

Tabel 4.4 Interpretasi nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat

0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,9	efek sinergis ringan-sedang
0,9 – 1,1	mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	efek antagonis ringan-sedang
1,45 – 3,3	efek antagonis
>3,3	efek antagonis kuat-sangat kuat

