

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris yang dilakukan secara *in-vitro* dan *in-silico* yang bertujuan untuk menguak potensi kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* sebagai agen kemopreventif.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian, Teknologi Farmasi, dan Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2017 sampai bulan Agustus 2018.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Variabel Bebas : Konsentrasi ekstrak etanolik kombinasi daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata*

Variabel Tergantung : Harga Rf

Variabel Terkendali : Waktu eluen mencapai batas plat

b. Uji Antioksidan

Variabel Bebas :Konsentrasi ekstrak etanolik kombinasi daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata*

Variabel Tergantung : Nilai IC₅₀

Variabel Terkendali : Waktu dan suhu inkubasi

c. Uji Sitotoksik

Variabel Bebas :Konsentrasi ekstrak etanolik kombinasi daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata*

Variabel Tergantung : Nilai IC₅₀

Variabel Terkendali : Waktu dan suhu inkubasi

d. *Molekuler docking*

Variabel Bebas :Bentuk konformasi senyawa tangeretin, EGCG, 5-FU, dan doxorubicin

Variabel Tergantung : *Score docking*

Variabel Terkendali : Struktur protein HER2

e. Formulasi Tablet *Effervescent*

Variabel Bebas : Formulasi granul *effervescent*

Variabel Tergantung : Kekerasan tablet, waktu larut, pH larutan.

Variabel Terkendali : Waktu dan suhu pengeringan serbuk

2. Definisi Operasional

a. Harga Rf

Harga Rf adalah jarak yang ditempuh suatu sampel senyawa dari titik awal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik awal.

b. *Score Docking*

Score docking adalah nilai yang digunakan untuk mengetahui besarnya energi yang dibutuhkan ligan dan reseptor agar dapat berikatan. Semakin kecil nilai *score docking* maka semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk mengikat ligan dan reseptor.

c. Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ menggambarkan besarnya konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) senyawa uji yang dapat menghambat 50% populasi sel yang masih hidup.

D. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian

a. Bahan Utama

Daun teh (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari daerah Merapi, Kaliurang, Yogyakarta dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) dari daerah Bantul, Yogyakarta.

b. Bahan

Etanol 70% (Bratachem®), aquadest (Bratachem®), DPPH, Sel T47D koleksi laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, larutan MTT (Calbiochem®), lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, struktur protein reseptor HER2, amoniak (Bratachem®), butanol (Bratachem®), kontrol rutin, larutan RPMI (Merck®), larutan NaHCO₃ (Merck®), HCL encer 1 N (Merck®), reagen stopper *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) (Merck®), larutan PBS, asam sitrat (Bratachem®), asam tartat (Bratachem®), natrium bikarbonat (Bratachem®), sakarin.

2. Alat Penelitian

Seperangkat komputer ASUS, alat-alat gelas (Pyrex®), timbangan analitik (Sartorius®), oven (Mettler®), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), aluminium foil (Brand®), vorteks (Labinco® L46), autoklaf (Hirayama®), inkubator CO₂ (Heraceus®), *laminar air flow hood* (Labconco®), tabung konikal 15 ml steri (Nunc®), *centrifuge* (Sorvall®), mikropipet (Gilson®), *ELISA reader* (Bio-Rad®), *96-well plate* (Nunc®), mikroskop *inverted* (Zeiss®), *blue tip* (Brand®), evaporator (Shimadzu®), ayakan serbuk 16 mesh (Brand®), chamber (Falcon®), *water bath* (Falcon®), *blender* (Miyako®), kertas saring

(Brand®), *yellow tip* (Brand®), pipa kapiler (Brand®), kuvet (Brand®), dan pH meter (Hanna®).

E. Cara Kerja

1. Determinasi dan Ekstraksi Maserasi

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas Farmasi UGM Unit 2 pada bagian Laboratorium Biologi Farmasi.

b. Penyiapan Simplisia Uji

Sebanyak 10 kg daun *Camellia sinensis* dan 10 kg kulit *Citrus reticulata* yang akan digunakan dikumpulkan kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir lalu dikeringkan pada udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari sampai kering. Kemudian simplisia yang sudah kering siap untuk dihaluskan dengan menggunakan *blender*.

c. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* dengan cara serbuk simplisia kedua bahan yang diperoleh dicampur dan dilarutkan dalam etanol 70% dengan metode maserasi yaitu dengan merendam campuran serbuk simplisia ke dalam etanol 70% dan dilakukan pengadukan secara berkala setiap hari selama 4 hari agar mendapatkan hasil penyarian yang optimal. Maserat disaring kemudian diremaserasi

selama 2 hari untuk memaksimalkan hasil maserasi. Setelah 2 hari maserat disaring kembali, lalu diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental dan ditimbang bobotnya.

2. Uji Identifikasi Senyawa dengan KLT

Uji identifikasi senyawa dengan metode KLT yang dilakukan dengan cara menotolkan sampel uji yaitu kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* yang sudah dilarutkan dengan etanol pada plat KLT silika gel menggunakan pipa kapiler, kemudian di elusi dengan fase gerak yang sudah jenuh didalam bejana yang tertutup rapat. Untuk identifikasi senyawa flavonoid dalam ekstrak menggunakan fase gerak yaitu butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 7:2:1 sedangkan fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Setelah dielusi plat KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan selama 10 menit dalam oven suhu 60⁰ C, kemudian plat dilihat dan diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm sehingga didapatkan hasil nilai Rf-nya.

Uji identifikasi flavonoid dilanjutkan dengan plat KLT diberi uap amoniak, tunggu hingga 15 menit. Amati perubahan warna bercak pada KLT.

3. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Penyiapan larutan baku DPPH

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu takar, kemudian tambahkan 100 mL metanol p.a lalu dilarutkan hingga homogen dan didapatkan konsentrasi 0,4 mM. Larutan di *vortex* selama 30 detik kemudian dibungkus menggunakan aluminium foil.

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C analisis dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas sebagai larutan induk. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 20 mg kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk mandarin ditambahkan dengan 20 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan induk tersebut dibuat seri kadar 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

d. Pengukuran Absorbansi

Larutan uji kemudian dipipet sebanyak 0,2 mL kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,05 mM dalam metanol. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Serapan kemudian diukur dengan alat spektrofotometer UV-tampak pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai kontrol positif digunakan larutan uji vitamin C dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

e. Perhitungan IC₅₀

Untuk menghitung IC₅₀ dengan cara mengolah data absorbansi sampel menjadi bentuk persen antioksidan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ bisa diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan x=kadar dan y=% antioksidan.

4. Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian dicuci dengan sabun kemudian dibilas dan dikeringkan. Alat-alat kemudian disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit dan dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilkan menggunakan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dibersihkan.

b. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dibuat dengan melarutkan RPMI dalam aquadest, ditambah 0,2 gram NaHCO₃ dan 2,0 gram Hepes. Larutan kemudian di aduk (*stirer*) hingga homogen kemudian di *buffer* dengan HCl encer 1 N hingga pH 7,2-

7,4 diukur dengan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter *polietilensulfon* steril 0,2 μm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI steril dengan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% secara aseptis di dalam LAF.

c. Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan dalam suhu 37⁰ C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul lalu dibuka dan sel dipindahkan kedalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10 μl FBS, resuspensi perlahan hingga homogen. Sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dengan inkubator pada suhu 37⁰ C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

d. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS (*Phospate Buffer Saline*) dan jika perlu dilakukan resuspensi perlahan, buang larutan tersebut, tambahkan larutan 1 ml tripsin 2,5 % pada sel, namun agar merata ditambah 3 ml larutan PBS, diamkan selama 3-5 menit agar tripsin

bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan di sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi 5×10^3 sel/100 μ L dan siap digunakan untuk penelitian.

e. Pembuatan larutan uji

Kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* dibuat stok dengan kadar 2×10^5 μ g/ml dalam DMSO. Dari larutan tersebut dibuat seri kadar dalam media kultur.

f. Pemberian perlakuan

Sel dengan kepadatan 70%-80% (konfluen) didistribusikan ke dalam 96 well plate lalu amati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusinya kemudian inkubasi selama 48 jam di dalam inkubator agar sel beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Hari selanjutnya sumuran diambil, buang media sel dengan cara membalikkan plate 180° di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, tiriskan sisa cairan dengan tisu. Plate lalu dicuci menggunakan 100 μ L PBS yang ditambahkan pada semua sumuran yang terisi sel lalu masukkan seri konsentrasi sampel uji dan sumuran media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) dan diinkubasi

kembali selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dan dicuci dengan 100 μ L PBS.

g. Pemberian reagen MTT

Sel yang hidup atau bertahan akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah inkubasi 4 jam, periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Apabila formazan telah jelas terbentuk tambahkan larutan *stopper* SDS (dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal formazan). Bungkus *plate* dengan alumunium foil dan inkubasi dalam tempat gelap dan suhu kamar. Buka pembungkus *plate*, tutup *plate*, goyang diatas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Kemudian dari data absorbansi dapat dihitung prosentase sel hidup dan analisis nilai IC_{50} .

h. Perhitungan IC_{50}

Pada percobaan diperoleh absorbansi 3 macam uji meliputi kontrol sel (berisi media kultur dan sel), kontrol media (berisi media kultur) dan senyawa uji (berisi media kultur, sel, dan senyawa uji).

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Abs perlakuan} - \text{Abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol sel} - \text{Abs kontrol media}} \times 100\%$$

Buat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter*. Cari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menampilkan *add trendline* regresi linier. Masukkan $y = 50\%$

pada persamaan regresi linier dan cari x nya kemudian dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh IC_{50} .

5. *Molecular Docking*

a. Pengambilan data

Dalam penelitian ini, data struktur protein target didapatkan melalui Protein Data Bank (PDB) dengan PDB ID dari HER2 sebagai target *docking* yaitu 1N8Z.

b. Pemodelan molekul senyawa kemopreventif dari bahan alam

Struktur dari sampel bahan alam digambar dengan *Autodock Vina* kemudian disimpan dengan format *file ligant_2D.pdb*. Kemudian setiap senyawa diprotonasi pada pH 7,4 dan dilanjutkan dengan mencari bentuk konformasi menggunakan program *DS Visualizer* sehingga didapat bentuk 3 dimensi, lalu berkas disimpan dalam bentuk mol2 dan diperoleh sepuluh konformasi.

c. Preparasi Protein Target

Program yang digunakan untuk preparasi yaitu YASARA, yaitu berkas protein dalam format *#.pdb*, lalu dihapus salah satu rantai proteinnya atau rantai B untuk memperkecil wilayah *docking*. Dilanjutkan dengan menghapus NAG dan air bila diperlukan sehingga tersisa molekul asam amino. Tambahkan hidrogen,

hasilnya disimpan dalam berkas mol2 yang kemudian digunakan sebagai protokol *docking* untuk penapisan pada virtual HER2.

d. Simulasi dan Validasi *Docking*

Dalam satu folder *File input* ligan dan *file* protein target disimpan, kemudian *PLANTS* versi 1.2 ditambahkan kedalam folder, kemudian tentukan posisi konfigurasi dan konfigurasi *docking* yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar. Definisi konfigurasi diubah menjadi 5Å dari koordinat lokasi SC558 terikat pada HER2. Posisi yang memiliki skor terbaik dipilih sebagai tempat sampel diperkirakan berikatan. Dilanjutkan dengan *docking* ligan asli, setelah itu dilakukan perhitungan *Root Mean Square Deviance* (RMSD) dengan menggunakan YASARA, nilai RMSD dinyatakan valid apabila hasilnya lebih rendah dari 2Å.

6. Formulasi Tablet *Effervescent* Metode Granulasi Basah

Pada penelitian ini formulasi tablet *effervescent* mengikuti penelitian yang dilakukan saudara Mis Bakhul Munir (2012) dengan judul Formulasi Tablet *Effervescent* Ekstrak Temulawak karena memiliki bahan dasar yang mirip yaitu menggunakan ekstrak etanolik.

Tabel 1. Formula Tablet *Effervescent*

Komponen	Formula (g)	Fungsi
Kombinasi ekstrak daun <i>Camellia sinensis</i> dan kulit <i>Citrus reticulata</i>	0,100	Bahan dasar
<i>Effervescent mix</i>		
1. Asam sitrat	0,459	Zat asam
2. Asam tartrat	0,750	Zat asam
3. Natrium bikarbonat	1,191	Zat basa
Manitol	0,185	Zat pengisi
PEG 6000	0,150	Zat pengisi
PVP	0,090	Larutan pengikat
Aspartam	0,045	Pemanis
Perisa jeruk	0,030	Perisa
Total	3,000	

Metode dalam pembuatan tablet *effervescent* menggunakan metode granulasi basah dengan pemisahan antara pembuatan granul basa dan granul asam.

a. Pembuatan granul asam dan basa:

1). Granul asam

Pada tahap ini asam sitrat, asam tartrat, dan ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan kulit *Citrus reticulata* dicampur hingga homogen (campuran 1). Kemudian siapkan larutan pengikat, tambahkan etanol 95% sedikit demi sedikit sambil diaduk secara homogen pada serbuk PVP hingga larut, campurkan larutan tersebut kedalam campuran 1 sedikit demi sedikit hingga terbentuk massa basah yang dapat dikepal. Massa kemudian diayak dengan ayakan 8 mesh dan dioven pada suhu 50° C selama 24 jam.

2). Granul basa

Natrium bikarbonat dan manitol dicampur hingga homogen (campuran 2). Tambahkan larutan pengikat yang sebelumnya telah ditambah perisa jeruk ke dalam campuran 2 sedikit demi sedikit hingga terbentuk massa padat yang dapat dikepal. Massa kemudian diayak dengan ayakan 8 mesh dan dioven pada suhu 50 C selama 24 jam.

b. Penambahan Lubrikan

Setelah kering kedua granul (campuran 1 dan campuran 2), campuran 1 diayak dengan ayakan 16 mesh tambahkan PEG 6000 dan aspartam campur hingga homogen. Campuran 2 diayak dengan ayakan 16 mesh, kemudian masukkan kedalam campuran 1 campur hingga homogen.

c. Pencetakan Tablet

Granul yang telah dihasilkan dan telah dievaluasi kemudian dicetak dengan bobot 3000 mg pada tekanan tertentu dengan mesin tablet kemudian dilakukan evaluasi tablet. Tablet yang dihasilkan disimpan di tempat kering pada suhu di bawah 25°C dalam kemasan kedap udara yang tidak tembus uap air.

d. Uji Evaluasi Tablet *Effervescent*

1. Uji waktu larut

Ambil tiga tablet kemudian masukkan masing-masing tablet ke dalam beker gelas yang berisi aquadest 200 mL pada suhu 15-25°C. Amati waktunya menggunakan *stopwatch* hingga tablet telarut sempurna.

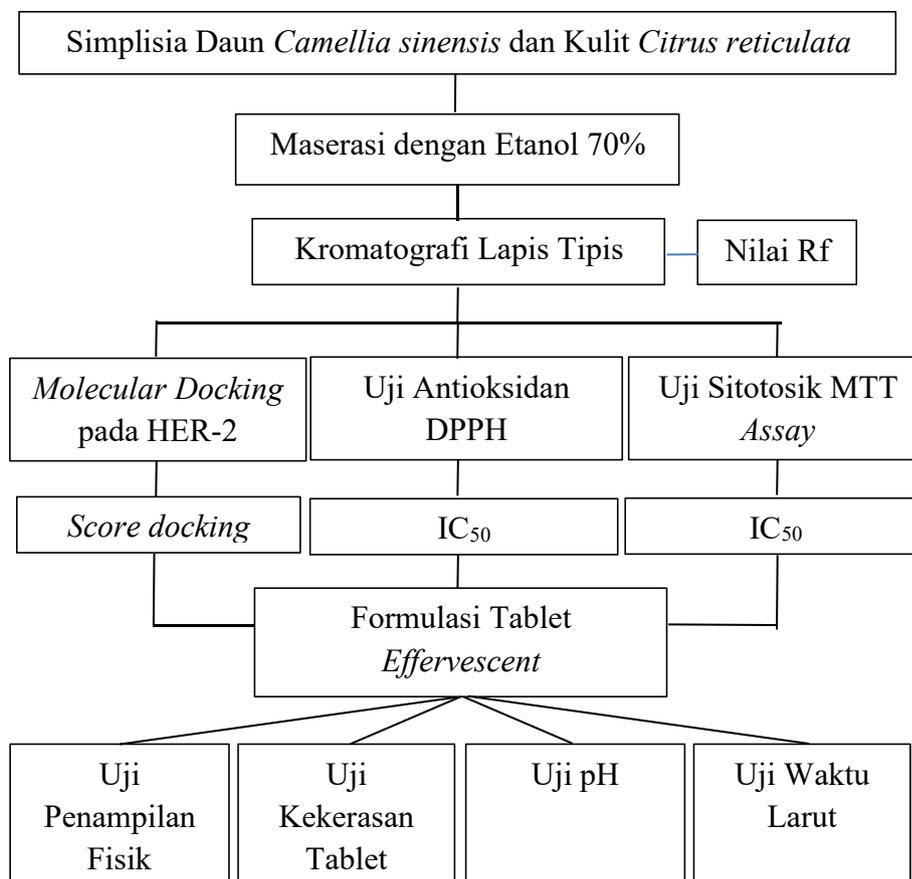
2. Uji kekerasan tablet

Kekerasan tablet ditentukan dengan alat *hardness tester*, dengan cara meletakkan sebuah tablet tegak lurus pada alat, tekan start kemudian dilihat tekanan berapa tablet tersebut pecah, tablet yang digunakan sebanyak enam tablet.

3. Uji pH

Larutkan tablet *effervescent* dalam beker gelas yang berisi 200 ml aquadest, ukur pH dengan alat pH meter.

F. Skema Langkah Kerja



G. Analisis data

1. Identifikasi Senyawa dengan KLT

Hasil KLT dapat dilihat di bawah sinar tampak, UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian dihitung nilai Rfnya. Untuk melihat adanya senyawa flavonoid, plat KLT diuapi menggunakan amoniak. Intensitas warna kuning pada bercak, mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid.

2. Uji Antioksidan

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan kemampuan inhibisi terhadap DPPH radikal

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol negatif} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\%$$

Apabila sudah didapatkan prosentase inhibisi dari masing-masing seri kadar konsentrasi, kemudian persamaan $y=bx+a$ dapat ditentukan dengan x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y adalah persen inhibisi (%). Uji antioksidan akan didapatkan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal DPPH.

Tabel 2. Tingkat kekuatan antioksidan (Mardawati *et. al.*, 2008)

Nilai IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Tingkat kekuatan antioksidan
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
101-150	Sedang
151-200	Lemah

3. Uji Sitotoksik

Data absorbansi yang diperoleh akan dikonversi dalam bentuk persen sel hidup. Rumus mencari persen sel hidup:

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Abs perlakuan} - \text{Abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol sel} - \text{Abs kontrol media}} \times 100\%$$

Dari data persen sel hidup dan konsentrasi dapat ditentukan nilai IC₅₀ melalui persamaan regresi linier untuk mengetahui efek

sitotoksiknya. IC_{50} adalah konsentrasi minimal yang dibutuhkan agar populasi sel hidup tinggal 50%.

4. *Molecular Docking*

Nilai *score docking* yaitu nilai yang menyatakan energi afinitas setelah dilakukannya proses *binding* antara senyawa uji dan ligan uji. Semakin kecil nilai *score docking* maka energi afinitas yang dibutuhkan semakin kecil sehingga kestabilannya semakin baik.

5. Formulasi tablet *effervescent*

Setelah dibuat formulasi tablet *effervescent* dilakukan uji evaluasi tablet *effervescent* yang meliputi uji penampilan, kekerasan tablet, uji pH, dan uji waktu larut.

Tabel Standar Evaluasi Tablet Effervescent

Nama uji	Standar	Sumber
Kekerasan tablet	4-8 kgf	Parrot (1971)
pH	6-7	Kailaku & Sumangat (2012)
Waktu larut	< 5 menit	Siregar (2010)