

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni secara laboratoris *in Vitro*. Penelitian dilakukan pada kultur sel *Burkitt's lymphoma* yang diujikan dengan menggunakan beberapa konsentrasi fraksi etil asetat sarang semut (*Myrmecodia pendens Merr. & Perry*).

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Bahan uji yang digunakan adalah fraksi etil asetat tanaman *Myrmecodia pendens Merr. & Perry* dengan konsentrasi (1000, 500, 250 dan 125) $\mu\text{g/mL}$ yang dilakukan fraksinasi dengan corong pisah.
2. Sel *Burkitt's lymphoma* (kultur sel limfoma) yang dibiakan dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) yang diberi *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, antibiotik penisillin-streptomisin 2% dan fungizon 0,5%.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK-KMK UGM, meliputi pembiakan sel *Burkitt's lymphoma* serta uji sitotoksisitas dengan metode MTT Assay. Proses ekstraksi dan pembuatan

fraksi atau fraksinasi etil asetat tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

2. Waktu

Penelitian telah dilakukan pada bulan Februari 2019

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dengan berbagai konsentrasi, yaitu (1000, 500, 250 dan 125) µg/mL.

2. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah uji sitotoksitas sel *Burkitt's lymphoma*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain:

- a. Konsentrasi dari fraksi etil asetat sarang semut yaitu antara lain 1000, 500, 250 dan 125 µg/mL
- b. Jumlah sel *Burkitt's lymphoma* yang digunakan.
- c. Jenis sarang semut yang digunakan.
- d. Kondisi inkubasi selama 24 jam
- e. Suhu ruangan 37°C
- f. Media pertumbuhan sel dengan 96 well plate

E. Definisi Operasional

1. Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) tanaman herbal yang telah diproses ekstraksi dan fraksinasi yang dilakukan di Laboratorium Farmasi UGM dan diperoleh dari perkebunan Papua Jayapura.
2. Konsentrasi fraksi etil asetat adalah banyaknya fraksi etil asetat tanaman sarang semut yang akan diujikan dalam biakan sel *Burkitt's lymphoma*.
3. Jenis biakan sel *Burkitt's lymphoma* adalah sel raji yang berasal dari kultur sel limfoma yang terinfeksi *Epstein-Barr Virus* yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FK-KMK UGM.
4. Uji sitotoksitas adalah pengujian toksisitas kuantitatif secara *in vitro* untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa dengan cara menetapkan kematian sel.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Almari pengering (Lab. Parasitologi UGM)
- b. *Blender* (Philips, Indonesia)
- c. *Blue tip* (Eppendorf AG, Germany)
- d. *Yellow tip* (Eppendorf AG, Germany)
- e. *Centrifuge* (Sakura Seiki Co., Ltd, Japan)
- f. Corong gelas (Pirex, Iwaki, Japan)
- g. Corong Pisah

- h. ELISA reader (Lab. Parasitologi UGM)
- i. Filter (Millex, Corrightwohill, Co., Ltd, Japan)
- j. *Flasks* (Lab. Parasitologi UGM)
- k. Lampu spiritus (Lab. Parasitologi UGM)
- l. Korek api (Lab. Parasitologi UGM)
- m. *Freezer* (Sanyo Electric Biomedial Co., Ltd, Japan)
- n. Gelas ukur (Duran, Germany)
- o. Gelas *vacuum evaporator* (Jencons, Leighton Buzzard, England)
- p. Inkubator CO₂ (Mettmert, Germany)
- q. *Laminary airflow cabinet* (Labonco Co., Kansas City, Missouri)
- r. *Magnetic stirrer* (Barsntead themolyne, USA)
- s. Mikroskop *Inverted* (Leitz, Germany)
- t. *Microplate reader* (Lab. Parasitologi UGM)
- u. Mikroskop *fluorescence* (Carl Zeiss, Germany)
- v. Neraca digital (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)
- w. Objek gelas (Sail Brand, China)
- x. Mikropipet (Socorex, Acura, Swiss)
- y. *Hemocytometer* (Marien Feld, Japan)
- z. Tabung *Eppendorf* (Pirex, Underlic, Japan)
- aa. Rak *Eppendorf* (Lab. Parasitologi UGM)
- bb. Spuit (BD, Singapore)
- cc. *Suction pump* (Lab. Parasitologi UGM)
- dd. Tabung *Centrifuge* (Iwaki, Japan)

- ee. Tabung *Conical* 15 ml (BD, USA)
- ff. Tabung *Conical* 50 ml (BD, USA)
- gg. Tabung *Erlenmeyer* (Pirex, Iwaki, Japan)
- hh. *Vacuum evaporator rotary* (Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)
- ii. *Vortex* (Barsntead thermolyne, USA)
- jj. *Water bath* (Mettler, Germany)
- kk. *Well Plate 96* sumuran

2. Bahan

- a. Biakan sel *Burkitt's lymphoma* yang disimpan di Lab. Parasitologi UGM
- b. Fraksi etil asetat tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans* Merr. & Perry)
- c. Penisilin-streptomisin 2%
- d. Fungizon 0,5%
- e. *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%
- f. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) / Media Komplit
- g. *Phospat buffer saline*
- h. MTT 5mg/mL
- i. SDS 10 % dalam 0,1 N HCL
- j. Alkohol
- k. Etanol 96%
- l. Pelarut etil asetat
- m. Tissue

G. Jalannya Penelitian

Penelitian meliputi pembuatan fraksi etil asetat tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dan uji sitotoksitas pada sel *Burkitt's lymphoma*.

1. Penyusunan proposal penelitian

Penyusunan proposal penelitian dan pengajuan izin penelitian serta etik penelitian (*ethical clearance*).

2. Persiapan

Menyiapkan alat dan bahan serta sterilisasi alat yang diperlukan dalam penelitian.

3. Identifikasi tanaman

Tanaman *M.pendens* Merr. & Perry yang telah dikumpulkan kemudian diambil beberapa sampel untuk di ekstrak dan fraksinasi.

4. Pembuatan ekstrak etanol tanaman *M. pendens*

Tanaman *M.pendens* Merr. & Perry dipilih dan diambil sebanyak 1000 gram kemudian dicuci dengan air mengalir dan dipotong menjadi beberapa bagian. Setelah itu, potongan tanaman *M. pendens* dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Kemudian, setelah kering tanaman dijadikan serbuk menggunakan mesin penyerbuk hingga halus. Sebelum dilakukan proses maserasi, tanaman *M. pendens* yang sudah berbentuk serbuk ini akan dilakukan proses penyaringan lemak terlebih dahulu dengan cara direndam dalam *petroleum eter* agar tidak mengganggu proses ekstraksi.

Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi kemudian disaring sebanyak 3 kali menggunakan corong *bruncher* sehingga didapat filtrat I. Filtrat I kemudian diuapkan dengan *waterbath*, sedangkan ampasnya kembali dimaserasi menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam. Setelah itu, filtrat disaring lagi sehingga didapatkan filtrat II dan ampasnya dimaserasi lagi untuk mendapatkan filtrat III. Untuk memperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%, filtrat I, filtrat II dan filtrat III dicampur kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60-70°C.

5. Pembuatan fraksi etil asetat tanaman *M. pendens* dengan fraksinasi

Pembuatan fraksi etil asetat dengan sebelumnya dilakukan ekstraksi pada tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Setelah itu dilakukan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang diinginkan. Untuk mendapatkan fraksi etil asetat, maka sebelumnya harus didapatkan hasil lapisan fraksi heksan yang jernih dan lapisan residu heksan, kemudian lapisan residu heksan ditambahkan dengan dengan pelarut n-heksan hingga diperoleh fraksi n-heksan yang jernih dan lapisan residu n-heksan. Setelah itu, lapisan residu n-heksan ditambahkan dengan pelarut etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat yang jernih (tidak memberikan hasil positif terhadap pereaksi FeCl_3). Hasil fraksi etil asetat selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan

dilakukan *freeze dryer* (-40°C) hingga diperoleh ekstrak kering dari fraksi tersebut.

6. Persiapan panen sel *Burkitt's lymphoma*

Sel *Burkitt's lymphoma* dibiakan dalam larutan RPMI-1640, FBS 10%, antibiotik penisillin-streptomisin 2% dan fungizon 0,5% dalam flask. Setelah itu sel di inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5% selama 24 jam.

7. Uji MTT Assay

Prinsip metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) direduksi menjadi garam formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan reagen *stopper*. Fungsi *stopper* tersebut akan melisis membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi).

Besarnya efek sitotoksik ketika pemberian paparan terhadap suatu kultur sel bersifat *dose-dependent*. *Dose-dependent* memiliki arti bahwa semakin besar konsentrasi paparan yang diberikan akan menyebabkan persentase viabilitas sel semakin kecil. Menurut CCRC (2013) Prosedur MTT Assay meliputi :

- a) Mengambil sel dari inkubator CO₂
- b) Memanen sel sesuai dengan protokol panen
- c) Menghitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan MK sesuai kebutuhan mengikuti protokol perhitungan sel
- d) Mentransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100µl
- e) Menyiapkan 3 sumuran kosong untuk kontrol media
- f) Mengamati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel
- g) Melakukan proses inkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam agar sel *attach* kembali setelah pasien
- h) Memberi perlakuan pada sel dengan sampel setelah sel kembali dalam keadaan normal
- i) Membuat konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel
- j) Mengambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂
- k) Membuang media sel (balikkan *plate* (180⁰) di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, kemudian menekan *plate* secara perlahan diatas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan
- l) Memasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian membuang PBS dengan cara membalikkan *plate*, dilanjutkan dengan meniriskan sisa cairan dengan tisu
- m) Memasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran

- n) Melakukan proses inkubasi dalam inkubator CO₂. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam (total waktu 24-48 jam)
- o) Menyiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara ambil 1 ml stok MTT dalam PBS (50 mg/mL). Selanjutnya mengencerkan reagen dengan MK 10 ml
- p) Membuang media sel, mencuci PBS 1 x dan menambahkan reagen MTT 100 µl ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel) kemudian proses inkubasi selama 2-4 jam
- q) Memeriksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, menambahkan *stopper* 100 µl SDS 10% dan 0,1 N HCL
- r) Membungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan menginkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama 1 malam
- s) Menghidupkan ELISA *reader*
- t) Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Memasukkan ke dalam ELISA *reader*
- u) Membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan $\lambda = 595 \text{ nm}$

8. Analisis data

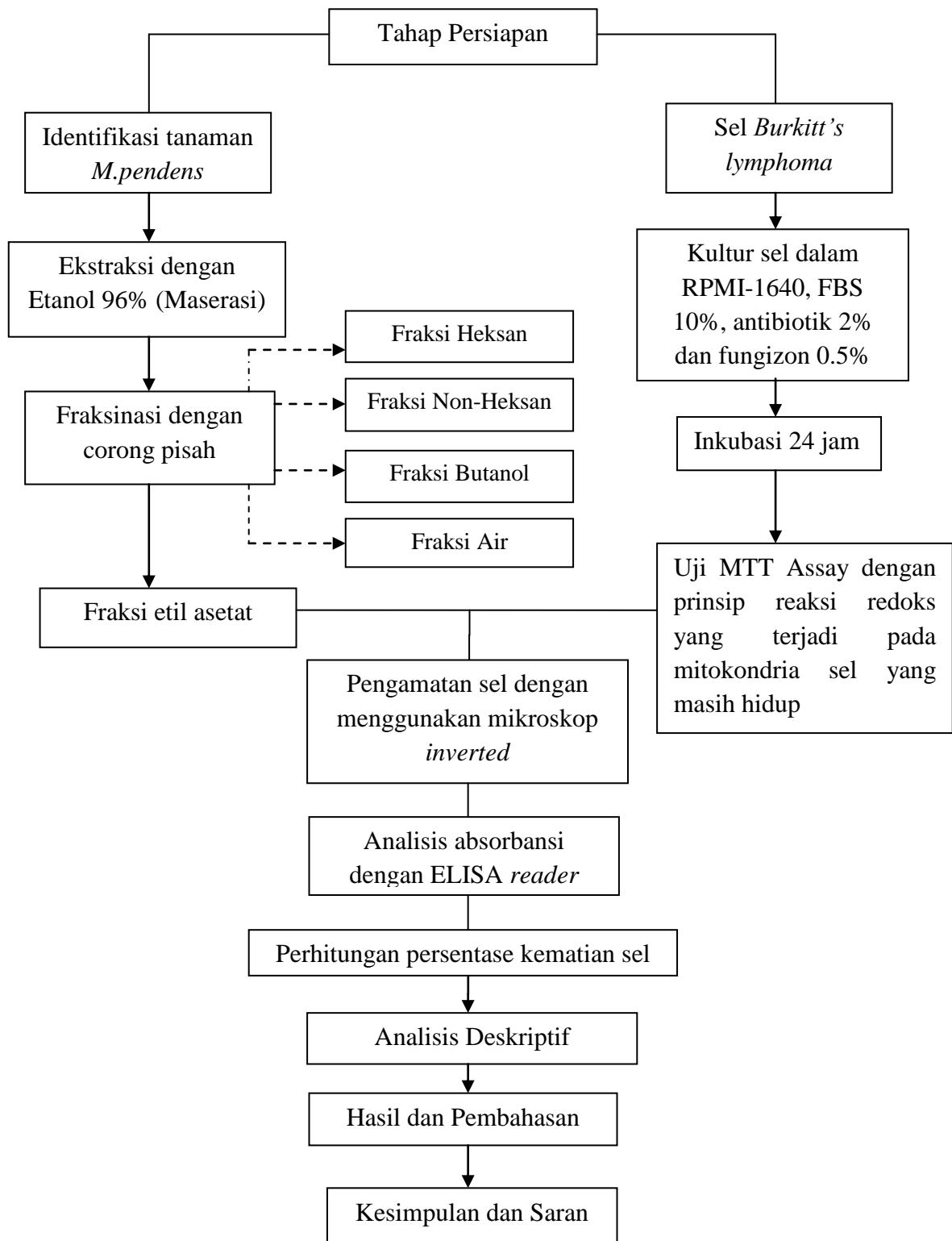
Analisis data dengan dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pertama lakukan pengamatan absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari kontrol sel atau sama dengan kontrol sel. Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung prosentase kematian sel dengan rumus berikut:

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

Setelah didapatkan persentase viabilitas sel maka untuk mendapatkan persentase kematian sel dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Kematian sel} = \% \text{ Viabilitas sel} - 100$$

H. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

I. Analisis Data

Perhitungan aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menghitung persentase kematian sel setelah diberi perlakuan, kemudian pembacaan hasil absorbansi menggunakan ELISA *reader* serta dilanjutkan dengan uji analisis deskriptif untuk mengetahui potensi sitotoksitas fraksi etil asetat tanaman sarang semut secara deskriptif.