

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain quasi eksperimental. Pengertian dari quasi eksperimental merupakan penelitian yang memiliki perlakuan, pengukuran-pengukuran dampak, dan unit-unit eksperimen namun tidak menggunakan penempatan secara acak untuk menciptakan perbandingan dalam rangka menyimpulkan perubahan yang disebabkan perlakuan (Cook *et al*, 1979). Sampel pada quasi eksperimental tidak diambil secara acak. Digunakan metode quasi eksperimental karena pada dasarnya sulit untuk mendapatkan kelompok kontrol yang sebenarnya, sehingga kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi variabel bebas.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di Laboratorium Penelitian farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Perikanan Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel penelitian

Variabel penelitian dalam suatu penelitian dibedakan menjadi 3, yakni variabel bebas, variabel kontrol dan variabel tergantung. Variabel bebas merupakan variabel yang dapat divariasikan nilainya. Variabel kontrol yakni variabel yang

nilainya tetap selama penelitian berlangsung. Variabel tergantung merupakan variabel yang nilainya tergantung dari variabel bebas.

a. Uji Toksisitas

- 1) **Variabel bebas** : Konsentrasi ekstrak buah mengkudu.
- 2) **Variabel kontrol** : Larva *Artemia salina* Leach, metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*, lama uji BSLT selama 24 jam
- 3) **Variabel tergantung** : Nilai absorbansi, nilai LC_{50} .

b. Uji Sitotoksik

- 1) **Variabel bebas** : Konsentrasi sampel.
- 2) **Variabel kontrol** : Suhu inkubasi, waktu inkubasi, media, panjang gelombang pengukuran, sel kanker WiDr.
- 3) **Variabel tergantung** : Nilai absorbansi, nilai IC_{50} .

c. Molecular Docking

- 1) **Variabel bebas** : Bentuk konformasi senyawa alizarin
- 2) **Variabel kontrol** : Perangkat lunak dan keras komputer, struktur protein bcl-xl
- 3) **Variabel tergantung** : *docking score*

d. Uji Kromatografi Lapis Tipis

- 1) **Variabel bebas** : konsentrasi ekstrak etanolik buah mengkudu
- 2) **Variabel kontrol** : waktu eluen mencapai batas plat
- 3) **Variabel tergantung** : nilai R_f

2. Definisi operasional

a. Faktor retensi (Rf)

Rf merupakan perbandingan jarak yang ditempuh *solute* dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Nilai Rf ini yang kemudian dibandingkan dengan nilai Rf senyawa standar

b. Docking score

Docking score merupakan nilai yang menggambarkan kekuatan ikatan antara reseptor dengan ligan. Semakin kecil *docking score* menunjukkan semakin kuat ikatan antara reseptor dengan ligan.

c. Lethality Concentration 50% (LC₅₀)

Nilai LC₅₀ merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 50% populasi dari suatu sel. Semakin kecil nilai LC₅₀ maka semakin potensial suatu senyawa atau ekstrak dalam membunuh sel target.

d. Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀)

Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% pertumbuhan suatu sel. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin potensial suatu senyawa atau ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel target.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat gelas, kain flannel hitam, lampu, aerator, flakon, timbangan analitik (Sartorius), eppendorf (Brand), vorteks, autoklaf (Hirayama), inkubator CO₂ (Heraceus), *Laminar Air Flow Hood* (Labconco), *tissue culture flask* (Nunc), tabung konikal 15 ml steril (Falcon), *sentrifuge* (Sorvall), haemositometer (Nebauer), *cell counter*, *yellow tip* (Brand), *blue tip* (Brand), mikropipet (Gilson), mikroskop inverted

(Zeiss), 96-well plate (Nunc), shaker (Gemmy), ELISA reader (Bio-Rad), 24-well plate (Nunc), cover slip diameter 13 mm (Nunc), mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80), dan kamera digital (Canon Power Shoot A460, 5,0 mega pixels), evaporator, waterbath, gelas ukur 100 ml, tabung reaksi 5 ml; 10 ml; 100 ml, pipet volume 1 ml, mikropipet, laptop yang sudah terinstalasi software *docking PLANTS*.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan utama

Ekstrak buah *Morinda citrifolia* L. didapat dari daerah Kotagede, Yogyakarta.

b. Bahan uji toksisitas

Larva *Artemia salina* Leach diperoleh dari Fakultas Perikanan Universitas Gadjah Mada, air laut.

c. Bahan uji sitotoksisitas

Sel kanker kolon. Digunakan jenis WiDr, diperoleh dari koleksi laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Media Sel WiDr ditumbuhkan pada media *Dulbecco's Modified Eagle's Media* (DMEM) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco). Larutan pencuci *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Pelarut yang digunakan adalah dimetil sulfoksida (DMSO) untuk preparasi larutan uji dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2% . Reagen 3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) 5 mg/ml dalam media kultur. Reagen stopper sodium dodesil sulfat (SDS) dalam HCl 0,1%. Selain bahan-bahan di atas juga digunakan Tripsin-EDTA untuk membantu melepas sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*. Bahan-

bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti berderajat proanalisis

E. Cara Kerja

1. Ekstraksi

a. Pengumpulan dan determinasi bahan baku

Buah mengkudu yang sudah berwarna kuning bening tetapi masih mengkal dipanen di daerah Kotagede, Yogyakarta. Sebagian mengkudu digunakan untuk dikeringkan, sebagian untuk dideterminasikan.

b. Pengeringan bahan baku

Mengkudu yang sudah dipanen dan dipilih berdasarkan kekerasan dan warna dicuci bersih dengan air mengalir sebanyak tiga kali untuk memastikan bahwa mengkudu sudah benar-benar bersih dari kotoran yang menempel. Kemudian buah mengkudu dipotong tipis-tipis, selanjutnya buah mengkudu dijemur di bawah sinar matahari dan dilapisi kain hitam. Kain hitam berfungsi untuk mencegah kerusakan simplisia akibat sinar ultraviolet dengan tetap mempertahankan panas dan memberikan penyebaran panas yang merata pada proses pengeringan sehingga kerusakan akibat paparan sinar matahari dapat dicegah (Nuria *et al.*, 2009). Mengkudu dijemur setiap jam 8 pagi dan diangkat jam 5 sore selama 5 hari. Karena cuaca kurang mendukung, penjemuran diganti dengan oven dengan suhu 60°C sampai benar-benar kering.

c. Penyerbukan simplisia

Simplisia yang sudah kering kemudian diserbuk dengan menggunakan blender. Penyerbukan dilakukan untuk mempermudah penarikan zat aktif dari

simplisia tetapi tidak terlalu halus agar pada saat penyaringan tidak terlalu banyak ampas yang tersaring. Serbuk halus yang didapat sebesar 300 gram.

d. Maserasi

Dalam maserasi, pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol dipertimbangkan sebagai cairan penyari karena etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur, tidak beracun terhadap manusia, netral dan absorpsinya baik. Etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit (Hargono, 1986). Sebanyak 300 gram serbuk mengkudu dibagi ke dalam 2 bejana. Masing-masing bejana berisi 150 gram serbuk yang dimaserasi dengan 700 ml etanol. Kemudian bejana dilapisi dengan kain hitam agar terhindar dari kontak langsung dengan sinar matahari. Maserasi dilakukan selama 5 hari. Selama proses maserasi bejana digojog setiap hari. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan. Sisa penyaringan di remaserasi selama 2 hari tanpa penggojogan. Maserat hasil penyaringan yang pertama disimpan dalam erlenmeyer dan dilapisi dengan kain hitam. Setelah 2 hari, dilakukan penyaringan hasil remaserasi. Hasil dari seluruh penyaringan kemudian dievaporasi agar didapatkan ekstrak kental. Didapatkan ekstrak kental sebesar 85 gram. Rendeman ekstrak adalah sebesar 28%.

2. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT adalah uji kualitatif untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa golongan antrakuinon pada ekstrak etanolik buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diduga memiliki aktivitas kemopreventif dengan menggunakan fase gerak toluene-ether dan fase diam silika gel 60 F₂₅₄. Pemeriksaan antrakuinon dengan melarutkan ekstrak dengan etanol 70% dan menotolkannya di atas plat

hingga berpendar ketika dilihat dengan lampu UV. Fase gerak dicampurkan ke dalam bejana kemudian ditunggu hingga jenuh. Setelah jenuh, plat dimasukkan ke dalam bejana secara tegak lurus dan ditunggu sampai eluen mencapai batas kemudian ditunggu dan dikeluarkan hingga plat mengering dan dilihat bercak yang muncul menggunakan lampu UV.

3. Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Larva *Artemia salina* Leach berumur 48 jam sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam bejana yang telah berisi 5 ml air laut. Larutan ekstrak sebanyak 2,5 mg diencerkan dengan 5 ml air laut kemudian dibuat 5 seri konsentrasi (2000, 1000, 500, 100 dan 10 $\mu\text{g/ml}$). Air laut dapat melarutkan ekstrak karena air laut memiliki kandungan garam yang tinggi sehingga memungkinkan terjadinya proses penggaraman. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung dengan menggunakan bantuan alat kaca pembesar (Khurniasari, 2004).

4. Uji sitotoksik

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 96% dan dilap.

b. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan DMEM dibuat dengan melarutkan DMEM dalam aquadest, ditambah 2,0 gram NaHCO_3 dan 2,0 gram Hepes. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian di-buffer dengan HCl encer 1N 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 DMEM steril dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF.

c. Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C , kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 *rpm* selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO_2 . 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 dan jika perlu resuspensikan 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 disentrifugasi pada 3000 *rpm* selama 3 menit. Sel dicuci dua

kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 5×10^3 sel/100 μ l dan siap digunakan untuk penelitian.

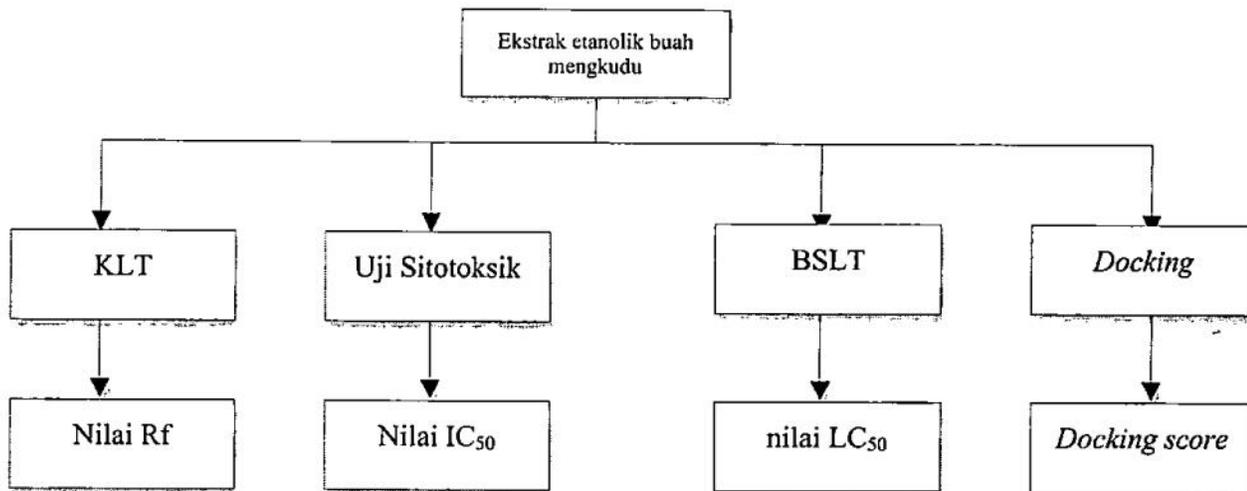
e. Pembuatan larutan uji

Ekstrak etanolik *Morinda citrifolia* L. dibuat stok dengan kadar 2×10^5 μ g/ml dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi dalam media kultur.

f. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT (Mosmann, 1983)

Sel dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung DMSO 0.2% saja (kontrol) atau sampel uji diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 3. Skema langkah kerja

G. Analisis dan Pengolahan Data

1. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Uji KLT merupakan uji kuantitatif yang dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya senyawa antrakuinon dalam ekstrak etanolik buah mengkudu. Bercak yang didapatkan dibandingkan nilai Rf nya dengan nilai Rf antrakuinon pada tabel.

2. Analisis uji toksisitas

Efek toksisitas dianalisis melalui pengamatan yang dilakukan dengan melihat persen kematian dengan rumus :

$$\% \text{kematian larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina* Leach, kemudian dihitung menggunakan persamaan regresi linear, y adalah % kematian dan x adalah log konsentrasi. Setelah mendapatkan persamaan regresi linear kemudian dihitung nilai LC_{50} dengan memasukkan nilai probit (50% kematian) (Meyer *et*

al., 1982). Jika suatu ekstrak memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ maka ekstrak tersebut memiliki sifat sitotoksik yakni toksik terhadap sel (Mayer *et al.*, 1982).

3. Uji sitotoksik

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media}}{\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi Kontrol Media}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai IC_{50} menggunakan analisis probit (SPSS 14.0) untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik. Jika nilai IC_{50} kurang dari $100 \mu\text{g/ml}$, maka ekstrak tersebut dikatakan poten sebagai agen kemopreventif (Meiyanto *et al.*, 2003).

4. Penelitian *in silico*

a. Preparasi protein

Protein target dicari dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan PDB ID untuk Bcl-xl: 1YSG yang digunakan sebagai protein target dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand*. *Native ligand* kemudian dihilangkan dengan proses YASARA untuk menyediakan ruang (*pocket/cavity*). Ruang ini yang akan digunakan dalam analisis interaksi ligan dan protein dalam uji *in silico*.

b. Preparasi senyawa uji antrakuinon

Optimasi struktur senyawa uji dilakukan menggunakan bantuan program *Marvin Sketch*. Struktur 3D alizarin digambar lengkap dengan atom hidrogen, kemudian dilakukan optimasi konformasi.

c. Validasi metode *molecular docking*

Native ligand dipasangkan kembali pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program PLANTS. Perbedaan koordinat antara dua ligand dilihat dari nilai *root mean square distances* (RMSD). Jika nilai RMSD < 2,0 angstrom, protokol diterima dan proses *docking* senyawa uji pada protein target dapat dilakukan. Jika nilai RMSD > 2,0 Å, maka digunakan protein dengan kode (PDB ID) lain.

d. Docking alizarin pada protein target

Senyawa uji alizarin selanjutnya ditambahkan pada protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan program PLANTS. Hasil analisis akan menunjukkan senyawa dengan konformasi yang mana yang memiliki energi terendah untuk berikatan dengan protein target. Visualisasi residu asam amino yang berinteraksi dengan ligand diolah dengan menggunakan program PLANTS.