

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in vitro*. Penelitian uji sitotoksik pada sel kanker serviks HeLa merupakan penelitian kuasi eksperimental dengan rancangan *post-test only with control group design* sedangkan penelitian *in silico* dilakukan pada senyawa rutin terhadap protein Bcl-xl.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada dan Laboratorium Penelitian Terpadu Universitas Ahmad Dahlan. Penelitian dilaksanakan dari bulan Juni -- Oktober 2013.

C. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Uji Antioksidan

- (1) Variabel Bebas : Konsentrasi FEDW.
- (2) Variabel Tergantung : Daya antioksidan (IC₅₀) terhadap DPPH.
- (3) Variabel Terkendali : Konsentrasi DPPH, OT (*Operating Time*),

λ_{max}

b. Uji Sitotoksik

- (1) Variabel Bebas : Konsentrasi FEDW.
- (2) Variabel Tergantung : Konsentrasi hambat (IC_{50}) terhadap sel kanker serviks HeLa.
- (3) Variabel Terkendali : Sel kanker serviks HeLa, media biakan, waktu inkubasi, suhu inkubasi.

2. Definisi Operasional

a. IC_{50}

Nilai IC_{50} pada uji antioksidan menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat daya antioksidannya. Nilai IC_{50} pada uji sitotoksik menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

a. Ekstraksi dan Fraksinasi

Blender (Philips), alat-alat gelas (Pyrex), Rotary evaporator (IKA[®] RV10).

b. KLT

Silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), bejana, pipa kapiler, sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

c. Uji Antioksidan

Alat-alat gelas (Pyrex), kuvet kuarsa, gelas arloji, rak tabung reaksi, mikro pipet (Gilson), pipet tetes, sendok tanduk, cawan porselen, timbangan analitik (Sartorius), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu).

d. Uji Sitotoksisitas

Alat-alat gelas (Pyrex), 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), sentrifus (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).

e. *Molecular Docking*

Perangkat keras berupa PC (Intel^{inside} Core i3), Sistem Operasi Linux Ubuntu Versi 10.10, PLANTS (*Protein Ligand ANT System*) versi 1.2. *MarvinSketch* 5.6.2 dari YASARA versi 6.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Ekstraksi dan Fraksinasi

Daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) yang diperoleh di daerah Ngebel, Kasihan, Bantul. Pelarut untuk ekstraksi dan fraksinasi etanol 70% (Bratachem) dan kloroform (Bratachem).

b. Bahan Uji KLT : etil asetat p.a (Merck), asam asetat glasial p.a (Merck), asam format p.a (Merck), air, pereaksi uap amoniak (Merck), rutin p.a (Merck)

c. Bahan Uji Antioksidan : Metanol p.a (Merck), 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) p.a (Merck), aquabidest (Merck), rutin p.a (Merck).

d. Bahan Uji Sitotoksik

Sel kanker serviks diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. *Media*. Sel HeLa ditumbuhkan pada media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco). *Larutan pencuci Phosphat Buffer Saline* (PBS). *Pelarut*. Digunakan dimetil sulfoksida (DMSO) untuk preparasi larutan uji dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2%. *Reagen MTT*. MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] 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. Bahan *Molecular Docking*

Protein diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) di *download* dari situs: <http://www.rcsb.org/pdb>.

E. Cara Kerja

1. Pengumpulan Bahan

Daun waru yang digunakan merupakan daun yang tidak terlalu muda juga tidak terlalu tua. Daun waru yang telah terkumpul dibersihkan dari kotoran-kotoran, kemudian dikeringkan di udara terbuka. Daun yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk simplisia

2. Determinasi Tanaman

Determinasi daun waru dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

3. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daun waru disari dengan penyari etanol 70% menggunakan metode maserasi yaitu dengan merendam serbuk daun waru 100 mg dalam etanol 70% hingga 2 cm dari permukaan serbuk simplisia selama 5 x 24 jam. Selama maserasi, sesekali serbuk digojog agar penyarian sempurna. Selanjutnya, disaring dan diambil sarinya. Serbuk diremaserasi menggunakan penyari yang sama selama 3 hari. Filtrat diuapkan dengan *Rotary Evaporator*

dengan suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm hingga menghasilkan ekstrak kental hingga beratnya konstan.

Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi cair-cair di dalam corong pisah dengan etanol dan kloroform. Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak dilarutkan dengan etanol kemudian diekstraksi dengan kloroform. Lapisan etanol dipisahkan dari lapisan kloroform, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh masa kental, sehingga diperoleh fraksi etanol.

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam berupa plat yang digunakan terbuat dari silika gel 60 F₂₅₄, sedangkan fase gerak berupa eluen campuran dari etil asetat : asam asetat glasial : asam format : air dengan perbandingan 100 : 11 : 11 : 27. Plat KLT dioven pada suhu 105°C selama 10 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat. Larutan ekstrak kemudian ditotolkan pada plat silika gel 60 F₂₅₄ dengan panjang 5 cm dan lebar 5 cm, penotolan dilakukan pada jarak ± 0,5 cm dari bawah plat KLT menggunakan pipa kapiler. Apabila noda telah kering plat diletakkan dengan cara meletakkannya vertikal di dalam bejana pengembang. Plat silika gel 60 F₂₅₄ dikeringkan kemudian amati noda-noda hasil pemisahan menggunakan sinar tampak (*visible*), UV_{254 nm} dan UV_{366 nm}. Deteksi dilakukan dengan penampak bercak menggunakan uap amoniak untuk deteksi flavonoid. Lalu ukur nilai R_f bercak pada plat.

5. Uji Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 19,72 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol p.a hingga 25 ml. Sebanyak 10,0 ml larutan DPPH diambil dan ditambahkan metanol p.a hingga volume 100 ml.

b. Persiapan Larutan Uji Dari FEDW

(1) Pembuatan larutan induk

Sampel FEDW dikeluarkan dari *freezer* dan diamkan hingga suhu kamar. Sebanyak 10,0 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 ml. Diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/ml.

(2) Pembuatan larutan induk ekstrak

Lima larutan seri kadar dibuat dari larutan tersebut dengan cara memipet sejumlah sampel dan dilarutkan dengan pelarut metanol p.a. Seri kadar FEDW 10; 20; 30; 40 dan 50 µg/ml.

c. Pembuatan Larutan Rutin Sebagai Pembanding.

Pembuatan larutan induk dengan menimbang 5 mg rutin dalam 25 ml metanol hingga homogen. Lima larutan seri kadar dibuat dari larutan tersebut dengan cara memipet sejumlah sampel dan dilarutkan dengan pelarut metanol p.a. Seri kadar rutin 1; 2; 3; 4 dan 5 µg/ml.

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 1000 μ l larutan DPPH dan 1000 μ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan spektra panjang gelombang larutan tersebut dibaca pada rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari spektra panjang gelombang.

e. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Sampel

Sebanyak 1000 μ l larutan DPPH dan 1000 μ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan spektra panjang gelombang larutan tersebut dibaca pada rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari spektra panjang gelombang

f. Penentuan *Operating Time* Sampel

Sebanyak 1000 μ l larutan DPPH dan 1000 μ l metanol ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Absorbansi larutan tersebut dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh selama 120 menit. Waktu stabil ditentukan dari absorbansi larutan sampel.

g. Pengujian Aktivitas Antioksidan Terhadap Sampel dan Rutin.

Larutan seri kadar standar dan sampel yang telah dibuat sebelumnya disiapkan. Sebanyak 1000 μ l larutan DPPH dan 1000 μ l metanol

ditambahkan ke dalam tabung ulir 10 ml. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Larutan didiamkan selama *operating time* (OT) yang diperoleh. Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH yang diperoleh sebelumnya yaitu 516 nm.

6. 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 70% dan dilap.

b. Pembuatan Larutan Media dan Media Kultur

Larutan RPMI dibuat dengan melarutkan serbuk RPMI dalam aquades sampai 800 ml lalu ditambahkan 2,0 gram *Na Bicarbonat* dan 2,0 gram HEPES kemudian ditambah aquades 1 liter. Larutan dibuat sampai pH 7.2-7.4 dengan menambahkan HCl 1N atau NaOH 1N, kemudian larutan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilensulfon steril 0.2 µm, kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C.

Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan 100 ml RPMI ditambah FBS 10% dan ditambahkan penisilin-streptomisin 3% dan fungison 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% 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 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 1×10^4 sel/100 μ l dan siap digunakan untuk penelitian.

e. Preparasi Bahan Uji

FEDW ditimbang dengan berat 5 mg dan dilarutkan dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) sebanyak 100 μ l, dibantu dengan alat *vortex*. Diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 5×10^5 μ g/ml, selanjutnya dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentrasi yang akan diujikan yaitu 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 μ g/ml.

f. Uji Sitotoksik dengan Metode MTT

Sel dengan kepadatan 1×10^4 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 dalam bentuk tunggal (fraksi etanol daun waru) 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.

7. *Molecular Docking*

a. Pengambilan Data

Dalam penelitian ini, data struktur protein target diambil melalui *Protein Data Bank* (PDB) dengan membuka link <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?> dan download target *docking* dengan PDB ID: 1YSG. Data ini merupakan hasil teknik biofisika seperti kristalografi *X-ray* maupun spektroskopi NMR dari Bcl-xl yang meliputi struktur, sisi aktif dan sekuens.

b. Pemodelan Molekul Senyawa

Data struktur sampel rutin digambar dengan menggunakan *MarvinSketch* v. 5.6 (disimpan dalam format file *ligand_2D.mrv*). Kemudian senyawa rutin di protonasi pada pH = 7.4, kemudian dilanjutkan mencari konformasi dengan menggunakan program yang sama untuk yang diperlihatkan dalam bentuk 3 dimensi diperoleh 10 konformasi. Kemudian simpan hasil konformasi dengan nama ligand dan tipe file mol2.

c. Preparasi Protein Target

Protein target dipreparasi dengan menggunakan YASARA, yaitu berkas protein dalam format #.pdb. *Load file* 1YSG.pdb ke YASARA, kemudian hapus bagian dari sistem yang tidak diperlukan dalam *protocol docking* seperti air sehingga hanya tersisa molekul asam amino. Hidrogen ditambahkan ke dalam sistem sebab resolusi struktur kristal tidak mampu memprediksi keberadaan hidrogen. Simpan *file* sebagai YASARA *Object*

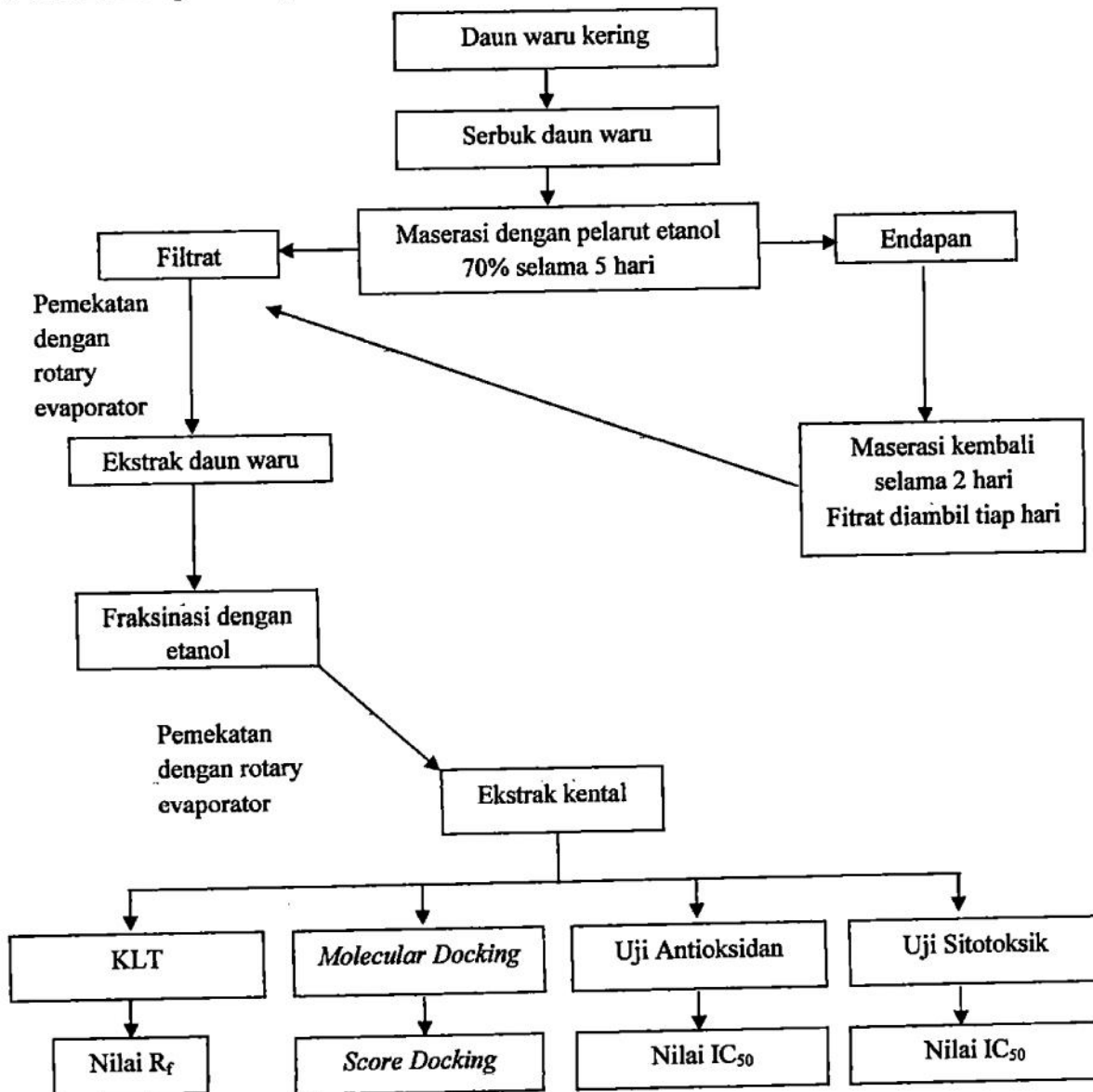
(simpan sebagai 1YSG.yob). Hapus ligan asli (4FC) sehingga hanya menyisakan protein target saja dengan *pocket* untuk *docking*. Simpan hasil sebagai protein.mol2. Koordinat *pocket* dapat diketahui dengan merujuk pada koordinat 3D asli. Untuk itu hanya diperlukan *file* mol2 yang hanya berisi ligan asli. Hasil disimpan sebagai *ref_ligand* dengan tipe *file* *mol2*. Preparasi protein untuk docking sudah selesai, *file* protein .mol2 dan *ref_ligand.mol2* sudah tersedia untuk simulasi *docking* menggunakan program PLANTS.

d. Simulasi dan Validasi *Docking*

File input ligan dan *file* protein target disimpan bersama dalam sebuah folder bersama PLANTS versi 1.2, kemudian ditentukan pose konfigurasi dan konfigurasi *docking* (*plantsconfig*) yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar dari PLANTS. Jalankan *pendrivelinux* dan kopi *file* yang dibutuhkan ke *pendrivelinux* untuk melihat koordinat pusat tempat ikatan x,y,z dan radiusnya. Lakukan simulasi program *docking* PLANTS, kemudian lakukan evaluasi dan interpretasi hasil simulasi. Pilih konformasi yang memberikan hasil dengan *score* terendah (dapat dikatakan yang terbaik). Dimana konformasi yang memiliki nilai skoring terbaik dipilih sebagai sebagai tempat sampel diperkirakan berikatan. Kemudian *docking* ligan asli (4FC), setelah itu dilakukan perhitungan RMSD (*Root Mean Square Deviance*) dengan menggunakan YASARA (RMSD dinyatakan valid apabila lebih rendah dari 2Å). Apabila nilainya kurang dari

2Å, maka dapat digunakan sebagai protokol *docking* untuk skrining virtual dalam usaha penemuan senyawa inhibitor Bcl-xl.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 5. Skema Langkah Kerja

G. Analisis Data

1. Uji Fitokimia

FEDW yang telah dielusi menggunakan campuran dari etil asetat : asam asetat glasial : asam format : air (100 : 11 : 11 : 27) kemudian diuapi amoniak untuk deteksi flavonoid. Perubahan warna pada spot dilihat pada sinar tampak (*visible*), $UV_{254\text{ nm}}$ dan $UV_{366\text{ nm}}$ dan serta ukur nilai R_f pada plat.

2. Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang telah dihitung dari setiap konsentrasi selanjutnya digunakan untuk perhitungan IC_{50} . *Inhibitory Concentration 50%* (IC_{50}) adalah nilai konsentrasi suatu bahan untuk menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Nilai konsentrasi dari larutan yang telah diencerkan dari ekstrak dan persen inhibisi diplotkan masing-masing pada sumbu x dan y. Kemudian nilai IC_{50} dihitung dengan regresi linier $y = b(x) + a$, dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} . Tingkat kekuatan antioksidan untuk senyawa dapat dilihat pada Tabel 2.

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

| Intensitas | IC ₅₀ |
|-------------|------------------|
| Sangat kuat | < 50 µg/ml |
| Kuat | 50-100 µg/ml |
| Sedang | 101-150 µg/ml |
| Lemah | 151-200 µg/ml |

3. Uji Sitotoksik

Analisis data pada uji sitotoksik dilakukan dengan uji sitotokisitas aplikasi tunggal, dimana data yang didapat dari *ELISA Reader* berupa hasil absorbansi. Data yang diperoleh dari hasil pembacaan *ELISA Reader* ($\lambda=595$ nm) berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversikan dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus :

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

Kemudian dihitung konsentrasi IC₅₀ dari hubungan linieritas antara logaritma konsentrasi larutan uji dengan persen sel hidup. IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksisitasnya. Klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu kategori sangat toksik jika nilai IC₅₀ < 10 µg/mL, kategori toksik jika nilai IC₅₀ 10-100

$\mu\text{g/mL}$, dan kategori cukup toksik jika nilai IC_{50} 100-500 $\mu\text{g/mL}$ (Weerapreeyakul *et al.*, 2012).

4. *Molecular Docking*

Dilakukan analisis data nilai *score* dan pose. Molekul dengan nilai *score* terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik, setelah itu visualisasi interaksi dengan menggunakan program YASARA.