

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan memberikan perlakuan dan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kelompok kontrol (Nazir, 2003).

#### **B. Desain Penelitian**

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Penelitian ini diawali dengan melakukan ekstraksi daun *P. angulata*. Daun yang telah diekstrak dijadikan sebagai kelompok perlakuan yang diuji untuk mengetahui sifat sitotoksik dari senyawa yang ada dalam daun tersebut. Adapun objek penelitian dalam penelitian ini yaitu kultur sel kanker darah (HL-60 *cell lines*). Ekstrak dari daun *Physalis angulata* L. dibuat serbuk dan pasta yang nantinya dibuat menjadi beberapa konsentrasi. Ekstrak serbuk dan pasta dibuat dalam seri konsentrasi 750, 325, 187,5, 93,75, 46,87, 23,46 dan 11,72 µg/ml. Konsentrasi tersebut merupakan perlakuan yang diberikan terhadap HL-60 *cell lines*. Dalam penelitian ini juga terdapat dua kelompok kontrol yaitu kontrol positif HL-60 *cell lines* diberi perlakuan dengan obat kanker yang telah teruji pengaruhnya, obat yang dimaksud yaitu *doxorubicin* sel yang diberi *doxorubicin* mengalami kematian atau kerusakan dari segi morfologi. Kelompok kontrol selanjutnya yaitu kontrol negatif, sel yang termasuk kedalam kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan apa-apa sehingga sel dibiarkan untuk terus tumbuh. Kedua kelompok tersebut dijadikan sebagai pembanding dalam penelitian ini.

Setiap kelompok perlakuan, dilakukan dengan beberapa pengulangan yang didasarkan pada perhitungan Menurut Federer (1977) di bawah ini,

$$(T - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(7 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$6(n - 1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3.5 \sim 4$$

Keterangan :

n = jumlah replikasi

T = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan pengulangan dari setiap perlakuan adalah 4 seri setiap konsentrasi ekstrak pasta maupun serbuk. Parameter yang diukur dalam penelitian ini yaitu viabilitas dari HL-60 *cell lines* setelah diberi perlakuan ekstrak pasta dan serbuk. Viabilitas merupakan kemampuan sel untuk bertahan hidup. Viabilitas sel didapatkan dengan menghitung jumlah sel pada masing-masing perlakuan. Parameter lain yang digunakan adalah inhibisi. Inhibisi merupakan penghambatan. Nilai inhibisi dari perlakuan dihitung berdasarkan viabilitas sel. Perhitungan jumlah sel menggunakan teknik spektrofotometri yang diukur nilai *optical density* dengan panjang gelombang 490 nm. Setelah mendapatkan nilai *optical density* nilai tersebut dikalikan dengan rumus regresi yang didapat dari kurva standar. Hasil akhir dari penelitian ini diuji menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 22 *for windows*.

### C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah sel kanker darah (HL-60 *cell lines*). Sampel penelitian ini adalah sel kanker darah (HL-60 *cell lines*) yang diberi perlakuan. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dari sel kanker darah (HL-60 *cell lines*) yang sudah diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak pasta dan serbuk daun Ciplukan.

### D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan. Identifikasi tanaman Ciplukan (*Physalis angulata* L.) dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan FPMIPA UPI, Bandung. Pembuatan ekstrak daun Ciplukan dilakukan di Laboratorium In Vitro dan Kultur sel, pemberian perlakuan dan uji MTS dilakukan di

**Fajar Sukma Perdana, 2018**

SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.) TERHADAP SEL KANKER DARAH (HL-60 CELL LINES)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Laboratorium Kultur Aretha Medika Utama *Bimolecular and Biomedical Research Center*, Bandung.

## **E. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan terdapat di laboratorium PT. Aretha Medika Utama *Bimolecular and Biomedical Research Center*, Bandung. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Tahap Persiapan**

Semua alat dan bahan yang digunakan disiapkan. Alat yang sudah disiapkan dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas untuk disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C.

### **2. Tahap Penelitian**

#### **a. Pengambilan Sampel**

Sebelum sampel diambil Tanaman diidentifikasi secara morfologi dan didokumentasikan. Setelah struktur morfologi tanaman mirip dengan *Physalis angulata* L., maka sampel penelitian dapat diambil dari tanaman tersebut.

#### **b. Ekstraksi Daun Ciplukan**

Tanaman yang telah diperoleh kemudian dipilih organ daun yang masih dalam keadaan baik dan tidak rusak. Daun dibersihkan menggunakan air biasa sehingga kotoran yang terdapat pada daun tersebut hilang. Setelah daun bersih kemudian daun dikeringkan dibawah sinar matahari. Pengeringan menggunakan sinar matahari dilakukan agar daun tidak berjamur dan proses pengeringan daun lebih alami. Setelah daun benar-benar kering dan tidak ada air di dalamnya daun diblender, hal ini bertujuan untuk mendapatkan serbuk daun. Serbuk daun disaring menggunakan saringan supaya kotoran daun tidak terdapat pada daun yang diekstraksi dan sebagian serbuk disimpan untuk perlakuan lainnya. Daun diekstrak dengan cara maserasi menggunakan etanol destilasi 70% dan diblender, lalu diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut

etanol destilasi 70%. Selanjutnya ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporimeter* untuk mendapatkan pasta.

Maserasi merupakan metode yang paling sederhana untuk dilakukan dalam skala laboratorium. Metode ini dilakukan dengan cara memasukan serbuk tanaman yang telah dihaluskan kedalam maserator dan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai (Tetti, 2014). Ahli kimia organik mengklasifikasikan pelarut sebagai pelarut non-polar, polar protik dan aprotik sesuai dengan struktur molekul dan kemampuannya membentuk ikatan hidrogen (Chemat & Abert, 2014). Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70% penggunaan etanol sebagai pelarut berdasarkan dari senyawa yang diinginkan. Senyawa alkaloid dan flavonoid bersifat polar maka pelarut etanol cocok untuk melarutkan senyawa tersebut karena sifat dari etanol yang polar. Penggunaan pelarut yang sesuai sangat dibutuhkan karena berguna untuk menghindari senyawa lain yang tidak memiliki aktivitas berarti bagi penelitian namun menimbulkan masalah seperti pengendapan (Wijesekera, 1991). Serbuk yang dimasukan kedalam maserator seberat 150 g dilarutkan dengan 1500 ml etanol dihari pertama. Waktu yang dibutuhkan untuk maserasi yaitu 5 hari dan etanol ditambahkan 1000 ml setiap harinya. Total 150 g serbuk daun Ciplukan dan total pelarut etanol sebanyak 6050 ml menghasilkan 5500 ml filtrat. Filtrat kemudian dievaporasi untuk didapatkan pasta.

### c. Penentuan Konsentrasi

Konsentrasi akhir ekstrak daun Ciplukan yang diberikan adalah 750, 325, 187,5, 93,75, 46,88, 23,46 dan 11,72  $\mu\text{g/ml}$ . Seri konsentrasi tersebut merupakan seri konsentrasi dari dua jenis perlakuan dalam penelitian ini yaitu ekstrak pasta dan serbuk daun Ciplukan. Seri konsentrasi ini dibuat untuk melihat nilai  $\text{IC}_{50}$ . Seri konsentrasi ini merupakan seri konsentrasi modifikasi dari penelitian *Physalis* oleh Giraldo *et al.* (2017) yaitu 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , 31.25  $\mu\text{g/ml}$ , 15.6  $\mu\text{g/ml}$ , dan 7.8  $\mu\text{g/ml}$ . Sebelum membuat konsentrasi akhir dibuat terlebih dahulu *working solution*. *Working solution* pada penelitian ini 7500, 3250, 1875, 937,5, 468,8, 234,6 dan 117,2  $\mu\text{g/ml}$ . Kedua perlakuan ini dilarutkan

menggunakan pelarut DMSO dengan konsentrasi akhir 1%. Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi aman bagi viabilitas sel (Yuan *et al.*, 2014) rentang konsentrasi yang dapat digunakan sebagai pelarut yakni 0,1 – 1 % DMSO (Leila *et al.*, 2016 ; Singh *et al.*, 2017) Pada kontrol negatif *cell line* hanya berisi medium saja. Pada kontrol positif konsentrasi doxorubicin diambil dari penelitian yang telah dilakukan dari penelitian tersebut didapatkan nilai  $IC_{50}$  dari doxorubicin yaitu 0,08  $\mu\text{M/ml}$ . Konsentrasi doxorubicin yang akan diberikan yaitu sesuai dengan  $IC_{50}$  dan dua kali  $IC_{50}$  yaitu 0,08 dan 0,16  $\mu\text{M/ml}$  (Lubgan *et al.*, 2009). Nilai aman 1% DMSO berdasarkan pada pra-penelitian dengan data dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Data penelitian DMSO 1%

DMSO(%)	Absorbansi	Absorbansi koreksi	Viabilitas (%)
1	0,4475	0,2684	100

#### d. Kultur Sel HL-60 Cell Lines

*Cell line* HL-60 didapatkan dari perusahaan bahan kimia Sigma Aldrich, USA. *Cell line* dikultur dalam *complete* medium IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (ATCC, USA) dengan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan 1% ABAM (Antibiotik antimikotik) ditambah 20  $\mu\text{M}$  gentamicin. Sel (HL-60) dikeluarkan dari *cryotank* yang berisi nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) kemudian dimasukkan dalam *water bath* yang telah diisi air suhu  $37^{\circ}\text{C}$  hingga mencair. Sel kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon yang telah berisi 9 ml medium kultur (HL-60 : IMDM + 10% FBS+ 1% ABAM + 20  $\mu\text{L}$  Gentamicin) Sel disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur dan dipindahkan ke *tissue culture flask* steril ukuran 25  $\text{cm}^2$ . Kultur sel diinkubasikan dalam inkubator pada kondisi suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .

**e. Perbanyak Sel HL-60 Cell Lines**

Subkultur sel dilakukan secara aseptik di dalam laminar dengan menggunakan peralatan dan medium yang telah disterilisasi. Perbanyak sel dilakukan dengan melakukan subkultur sel yang telah memenuhi substrat polistiren botol kultur sebanyak 80-90%. Sel disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 4-5 ml medium pertumbuhan. Suspensi sel dibagi ke dalam *T-flask* 25 dan 75 cm<sup>2</sup>. Untuk *T-flask* 25 diisi 3 ml medium terlebih dahulu dan untuk *T-flask* 75 diisi 5 ml medium terlebih dahulu. Selama perawatan sel, medium diganti setiap dua hari. Inkubasi dilakukan pada kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

**f. Perhitungan Jumlah Sel**

Setelah sel konfluen sel dipindahkan kedalam 96 *well plate*. Proses ini dinamakan plating. Sebelumnya sel dihitung dengan menggunakan hemositometer. Sel diambil dari *T-flask* lalu dimasukkan kedalam tube 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml medium pertumbuhan. 10 µl sel diambil dan ditambahkan dengan 90 µl medium untuk pengenceran. Setelah itu diambil 10 µl sel yang telah diencerkan dihomogenkan dengan menggunakan *trypan blue* sebagai pewarna. 10 µl diambil dan dimasukkan kedalam hemositometer sel dihitung pada mikroskop dan untuk menghitung jumlah sel total maka digunakan rumus yang telah dimodifikasi sebagai berikut (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2008), sebagai berikut:

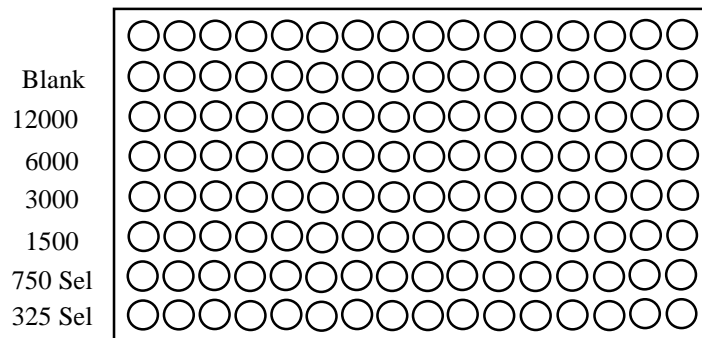
$$x = \frac{A + B + C + D}{4} \times 10 \times 20.000 \times 1$$

Stok sel dibuat setelah mendapatkan hasil hitungan jumlah sel. Sel yang dibutuhkan untuk dijadikan stok sel yaitu sebanyak 1.000.000 sel/ml.

**g. Pembuatan Kurva Standar**

Kurva standar dibuat dengan meregresikan nilai absorbansi kedalam persamaan garis kurva standar  $y=ax+b$ . Persamaan yang didapat ini digunakan dalam menghitung jumlah sel setelah perlakuan. Untuk membuat kurva standar sel ditanam pada *plate* sesuai dengan seri yang

dibuat berikut ini merupakan skema penanaman sel pada 96 *well plate*. Untuk skema yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.1.

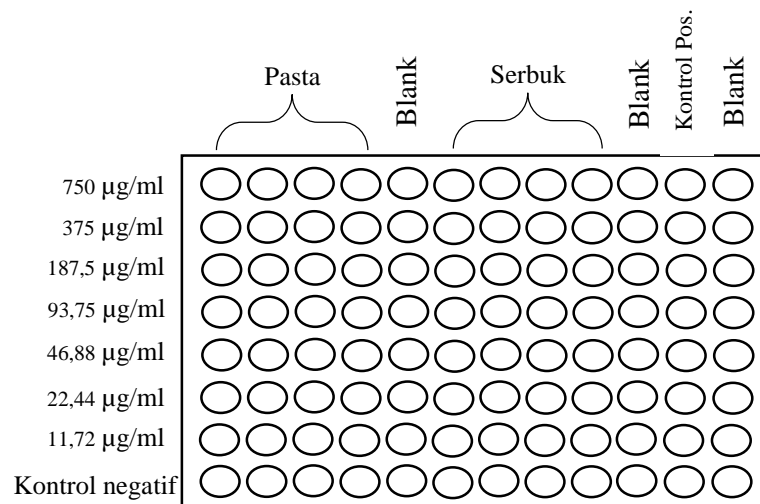


Gambar 3. 1 Skema penempatan sel HL-60 untuk pembuatan kurva standar

Dalam 1.000.000 sel tadi kemudian masing-masing ditanam sesuai dengan skema untuk membuat kurva standar. Dalam skema tersebut dilakukan 3 kali pengulangan. Sel yang telah ditanam diinkubasi selama 24 jam lalu ditambah dengan MTS 20  $\mu$ l diinkubasi selama 3 jam dan dilakukan spektrofotometri untuk melihat nilai absorbansinya.

#### h. Pemberian Ekstrak Daun

Pemberian perlakuan ekstrak daun dibuat skema penempatan sel dan treatment dan dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3. 2 Skema penempatan sel HL-60 dan skema pemberian perlakuan ekstrak pasta dan serbuk untuk melihat efek sitotoksik

Setelah didapatkan stok 1.000.000 sel/ml maka sel ditanam kedalam 96 *well plate* untuk uji sitotoksik dari sampel penelitian. Pertama sel

ditanam sebanyak 10.000 sel/sumur pada perlakuan pasta, serbuk dan kontrol positif serta kontrol negatif. Sel ditanam dengan memasukan 180 µl medium pertumbuhan ditambah dengan 10 µl stok sel. Setelah semua sumur kecuali blank terisi, selanjutnya sel diinkubasi selama 24 jam hal ini bertujuan agar sel beradaptasi terhadap lingkungan barunya. Setelah 24 jam sel siap diberi perlakuan, pemberian perlakuan dilakukan dengan cara memasukan 10 µl *working concentration*. Pemberian perlakuan dilakukan masing-masing konsentrasi 4 kali ulangan. Sel kembali diinkubasi selama 24 jam untuk melihat pengaruh sitotoksik dari sampel penelitian.

#### i. MTS Assay

Uji MTS dilakukan setelah inkubasi selesai sebelum diberikan MTS, sel diamati morfologinya dibawah mikroskop. 10 µl MTS dimasukan kedalam setiap *well plate*. Kemudian diinkubasi didalam inkubator selama 3 jam. Setelah selesai maka *well plate* dimasukan kedalam spektrofotometer dengan absorbansi 490-500 nm untuk dilihat pengaruh dari sitotoksiknya. Pengujian MTS assay ini modifikasi dari penelitian yang dilakukan (Hirano *et al.*, 1994) yang mana penelitiannya menggunakan MTT dengan konsentrasi 5 mg/ml pada setiap *well plate*.

### G. Analisis Statistik

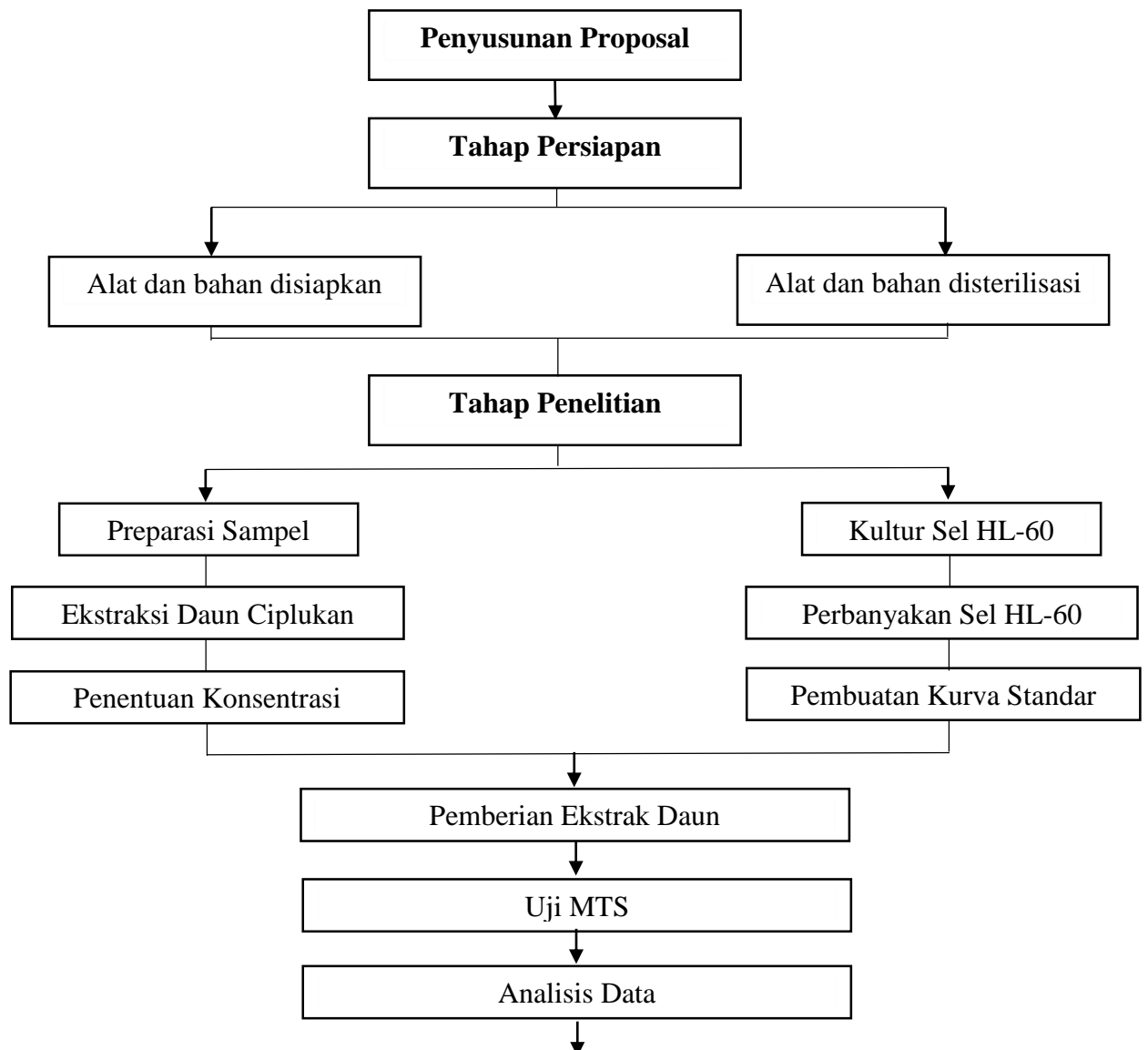
Hasil pengujian data dianalisis secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS 22 *for Windows*. Pertama dilakukan uji normalitas untuk melihat data yang diperoleh terdistribusi normal dan selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk melihat data yang diperoleh homogen. Data yang diperoleh normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji parametrik *Analysis of Variance (One way ANOVA)* untuk melihat nilai signifikansi dari masing-masing perlakuan data yang dianalisis berbeda signifikan dan dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Data dari penelitian ini diperoleh data tidak homogen dan normal sehingga tidak memenuhi syarat untuk melakukan uji anova maka dilakukan uji non parametrik *Kruskall- Wallis test* hasil data menunjukkan perbedaan signifikan dan diuji lanjut menggunakan uji *Mann Whitney*. Setelah melakukan analisis variansi selanjutnya dilakukan uji PROBIT test untuk mengetahui nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak daun Ciplukan (*Physalis angulata*



L.) dan dilakukan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari tiap-tiap konsentrasi.

#### H. Alur Penelitian

Kerangka alur penelitian tentang efek sitotoksik dari ekstrak pasta dan serbuk daun Ciplukan dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Bagan alur penelitian