

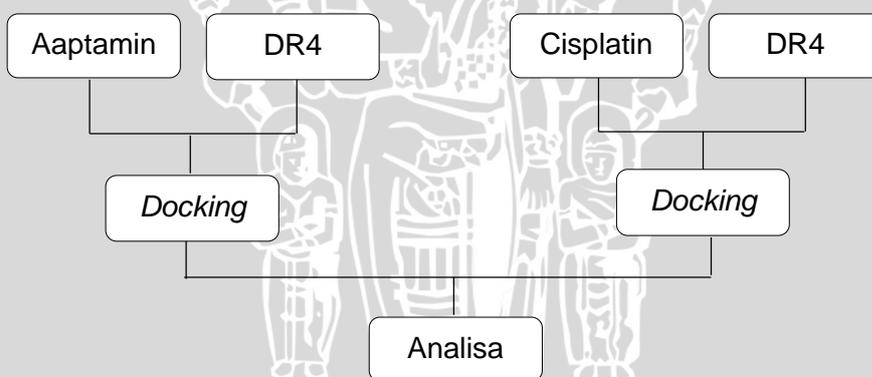
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

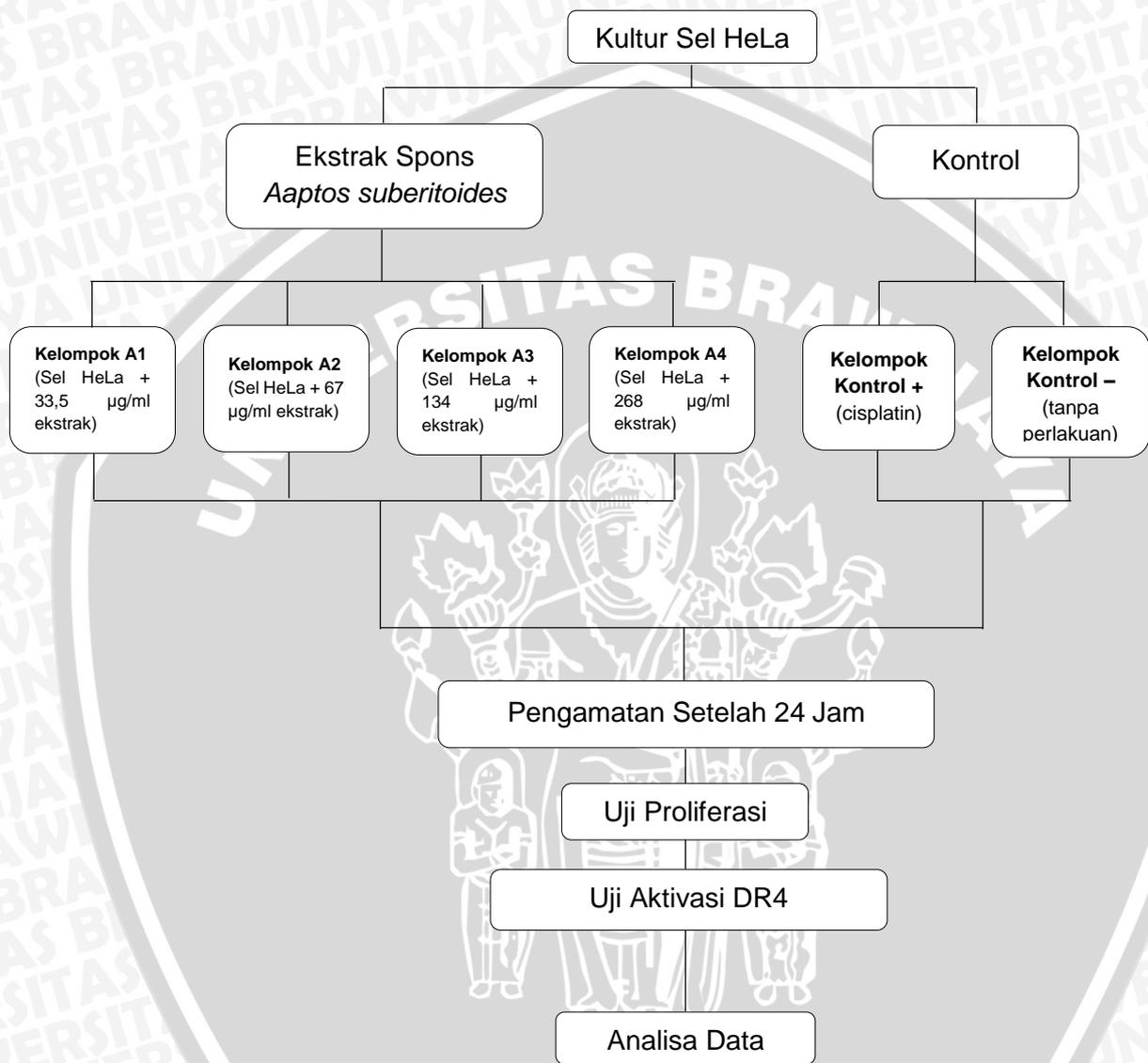
Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris melalui pendekatan kuantitatif dan semikualitatif secara eksperimental menggunakan desain *true experimental in vitro*, *post test only*, dan *control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak spons *Aaptos suberitoides* terhadap kemampuan menginduksi apoptosis sel HeLa CCL-2 melalui aktivasi jalur DR4/TRAIL-R1. Berikut adalah desain penelitian ini :

4.1.1 Uji secara *In Silico*



Gambar 4.1 Desain Uji *In Silico*

4.1.2 Uji secara *In Vitro*



Gambar 4.2 Desain Uji *In Vitro*

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel HeLa CCL-2 yang merupakan *cell line* kanker leher rahim (serviks) yang dikultur. Sel HeLa diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC). Dalam pengujian tersebut terdapat

3 kelompok yakni kontrol negatif, perlakuan, dan kontrol positif. Dalam kelompok perlakuan, digunakan sel HeLa yang dipaparkan dengan dosis ekstrak 67 µg/mL untuk pengujian aktivasi DR4/TRAIL-R1. Pada kelompok kontrol positif digunakan agen kemoterapi cisplatin dengan dosis 16,8 µg/mL. Penelitian ini tidak dilakukan pengulangan untuk masing-masing perlakuan, disebabkan karena terbatasnya bahan pada laboratorium dan waktu yang tidak mencukupi.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides*. Sedangkan variabel tergantungan pada penelitian ini adalah indeks aktivasi jalur DR4/TRAIL-R1 pada sel HeLa CCL-2.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian berada di Laboratorium Farmasi FKUB dan Laboratorium Biomedik FKUB. Penelitian dilakukan bulan Februari-Juli 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Ekstraksi Maserasi

Bahan yang digunakan untuk maserasi adalah spons laut segar *Aaptos suberitoides* sebanyak 2,5 kg dan etanol 96% (Makmur Sejati).

4.5.1.2 Bahan Uji Fitokimia Alkaloid

Bahan yang digunakan untuk skrining alkaloid adalah H₂SO₄ 2 N, amoniak, kloroform, reagen *Dragendorff*, *Mayer*, dan *Wagner* (Makmur Sejati).

4.5.1.3 Bahan Kultur Sel HeLa

Bahan yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah sel HeLa-CCL2 (ATCC), medium RPMI 1640, alkohol 70%, FBS (*Fetal Bovine Serum*), D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*), MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*), DMSO (*Dimetil Sulfoksida*), sodium bikarbonat, penisilin-streptomisin, HCl, tripsin, EDTA, *trypan blue* 0,05%, akuades steril, spirtus (*Trevigen*).

4.5.1.4 Bahan Uji Aktivasi DR4/TRAIL-R1

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi DR4/TRAIL-R1 adalah stok sampel dalam sumuran, larutan H₂O₂ 3%, metanol, PBS, larutan *blocking buffer* (FBS, PBS, dan Triton X100), cisplatin (Kalbe), antibodi primer DR4/TRAIL-R1 (*Bioss-USA*), antibodi sekunder, SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*), kromagen DAB (*Deaminobenzidine*), mayer hematoksilen (*Biocare*), dan lem.

4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Alat Ekstraksi Maserasi

Alat yang digunakan untuk maserasi adalah blender, oven, toples kaca, gelas ukur (*Pyrex*), gelas beaker (*Pyrex*), neraca (*Mettler Toledo*), erlenmeyer (*Pyrex*), batang pengaduk, *orbital shaker* (*Innova*), kertas saring, *rotary evaporator* (*Bochi*), dan *freeze dryer* (*Christ*).

4.5.2.2 Alat Uji Fitokimia Alkaloid

Alat yang digunakan untuk uji fitokimia alkaloid adalah cawan porselen, pipet tetes, tabung reaksi (*Pyrex*), dan rak tabung reaksi.

4.5.2.3 Alat Kultur Sel HeLa

Alat yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah LAF (*Laminair Air Flow*), inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, mikroskop cahaya, sumuran-24 (*Corning*), sentrifuge (*Thermo*), *disposable spuit*, mikropipet (*Socorex*), *conical tube*, *cryo tube*, filter $0,2 \mu\text{L}$ (*Corning*), tip biru, dan tip kuning.

4.5.2.4 Alat Uji Aktivasi DR4/TRAIL-R1

Alat yang digunakan untuk uji aktivasi DR4/TRAIL-R1 adalah mikropipet 20, 200, dan $1000 \mu\text{L}$, kaca objek, kaca penutup (*Thermo*), tip biru, tip kuning, tip putih, sentrifuge (*Thermo*), *spuit disposable*, sumuran-24 (*Corning*), media buangan, lemari es, dan *stopwatch* (*Elabscience*).

4.6 Definisi Operasional

- **Spons *Aaptos suberitoides*** yang digunakan adalah spons laut segar yang diambil di Pantai Pasir Putih, Situbondo, Jawa Timur, Indonesia. Diambil pada titik koordinat $7^{\circ}41'35,97''\text{LS}$; $113^{\circ}49'35,50''\text{BT}$ dan pada kedalaman ± 4 m dibawah permukaan laut.
- **Apoptosis** merupakan kematian sel secara terprogram, yang mana jika regulasinya menurun akan menyebabkan kanker. Dalam penelitian ini, yang diamati adalah proses apoptosis yang melalui jalur ekstrinsik.
- **Imunositokimia** merupakan suatu metode pewarnaan sel untuk melihat aktivasi suatu protein atau antibodi, dalam hal ini adalah DR4/TRAIL-R1.
- **DR4/TRAIL-R1** merupakan reseptor transmembran yang berperan dalam inisiasi apoptosis jalur ekstrinsik.

- **Indeks Aktivasi DR4/TRAIL-R1** merupakan metode untuk menghitung sel yang diperkirakan mengaktivasikan DR4/TRAIL-R1. Dihitung dengan cara melihat jumlah sel yang telah terwarnai dengan antibodi DR4/TRAIL-R1 berdasarkan intensitas tertentu. Indeks dihitung dengan melihat minimal total 200 sel dalam satu slide per lapang pandang. Sel yang terwarnai dihitung, kemudian dibandingkan dengan total sel dalam setiap lapang pandang.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 *Docking*

- Pemilihan *software* yakni PyRx[®] untuk melakukan *docking*, PyMOL[®] untuk menganalisa letak ikatan, *Discovery Studio*[®] untuk membuka struktur molekul, dan *Marvin Sketch*[®] untuk mengedit struktur maupun format *file* molekul.
- Pengumpulan *database* aaptamin, cisplatin, dan DR4.
- Membuka semua *database* yang akan digunakan pada *software* PyRx[®].
- Memasangkan ligan dan protein yang akan di-*docking*, dalam hal ini yakni Aaptamin-DR4 dan Cisplatin-DR4.
- Melakukan *docking* dengan mengidentifikasi seluruh area ligan-protein.
- Data yang diperoleh disimpan.
- Data kemudian dibuka menggunakan *software* PyMOL[®] untuk menganalisa letak ikatan antara Aaptamin-DR4 dan Cisplatin-DR4.
- Analisa kekuatan ikatan antara Aaptamin-DR4 dan Cisplatin-DR4.

4.7.2 Kultur Sel HeLa (CCRC, 2008)

4.7.2.1 Pembuatan Media Kultur

- a. Menyiapkan 1 mL *trypan blue* 0,05% yang di-*vortex* sampai homogen.
- b. Menyiapkan 1 L serum *free-media* kultur (SF-M), larutkan 1 *sachet* MEM dalam 1 L air deionisasi, tambahkan 2 g NaHCO₃, 100 UI/mL-penisillin, 100 µL/mL-streptomisin, kemudian *adjust* pH 7,2-7,4, selanjutnya sterilkan dengan filter 0,2 µm di dalam LAF.
- c. Menyiapkan *medium complete* (MC) dengan menambahkan 10-20 mL FBS ke 100 mL SF-M.
- d. Menyiapkan 1 mL media *cryo* dengan menambahkan 300 µL FBS dan 100 µL DMSO ke dalam 600 µL MC.

4.7.2.2 Thawing Sel HeLa

- a. Sel HeLa di dalam tabung *cryo* dikeluarkan dari tangki nitrogen dan dibawa ke dalam LAF.
- b. Disemprot seluruh peralatan yang digunakan untuk kultur dengan alkohol 70% sebelum masuk ke dalam LAF.
- c. Men-*thawing* tabung *cryo* sampai es yang didalamnya separuh mencair.
- d. Memindahkan isi tabung *cryo* kedalam tabung sentrifuge yang telah berisi 10 mL MC.
- e. Menyentrifuge dengan kecepatan 700x selama 10 menit.
- f. Membuang supernatan dan resuspensi pelet dengan 5 mL MC.
- g. Menanam dalam botol kultur 25 cm² dengan menambahkan 7-8 mL MC.
- h. Inkubasi 1x24 jam di dalam inkubator dengan kelembapan CO₂ 5% 37°C.
- i. Mengganti media kultur 2-3 hari sekali.

4.7.2.3 Sub Kultur Sel HeLa

- a. Sel HeLa di dalam botol kultur diamati menggunakan mikroskop cahaya.
- b. Subkultur dilakukan apabila sel telah melekat dan konfluen 80-90%.
- c. Bawa botol kultur sel ke dalam LAF.
- d. Tarik semua sisa media di dalam botol.
- e. Cuci bagian dalam botol dengan D-PBS.
- f. Menambahkan 2-3 mL tripsin-EDTA ke dalam botol.
- g. Inkubasi pada 37°C, sesekali dilihat dengan mikroskop cahaya, jika sel telah lepas semua, tambahkan 5 mL MC.
- h. Memindahkan semua larutan di dalam botol ke dalam tabung sentrifuge.
- i. Sentrifus dengan kecepatan 700x selama 10 menit.
- j. Membuang supernatan dan resuspensi pelet dengan 1 mL MC.
- k. Menghitung viabilitas sel dengan mengambil 10 µL suspensi ditambah *trypan blue* (1:1) kemudian diletakkan di hemositometer.
- l. Menanam sel hela sesuai dengan kebutuhan.
- m. Inkubasi 1x24 jam di dalam inkubator dengan kelembapan CO₂ 5% 37°C.
- n. Ganti media kultur 2-3 hari sekali.

4.7.2.4 Freezing Sel HeLa

- a. Ketika telah konfluen 80-90%, kultur sel di dalam botol dibawa ke dalam LAF.
- b. Menarik semua sisa media kultur di dalam botol.
- c. Mencuci dalam botol dengan D-PBS.
- d. Menambahkan 2-3 mL tripsin-EDTA ke dalam botol.

- e. Inkubasi pada 37°C, sesekali dilihat dengan mikroskop cahaya, jika sel telah terlepas semua, tambahkan 5 mL media kultur.
- f. Memindahkan semua larutan di dalam botol ke dalam tabung sentrifuge.
- g. Menyentrifuge dengan kecepatan 700x selama 10 menit.
- h. Membuang supernatan dan resuspensi pelet dengan 0,1 mL MC.
- i. Menghitung viabilitas sel dengan mengambil 10 µL suspensi ditambah *trypan blue* (1:1) kemudian diletakkan di hemositometer.
- j. Mem-*freezing* sel HeLa pada media *cryo*.
- k. Menyimpan dalam gradien minus (-20°C lalu -40°C lalu -80°C) selama masing-masing 2 jam kemudian disimpan dalam tangki nitrogen untuk penyimpanan yang lama (*long term storage*).

4.7.3 Ekstraksi Spons *Aaptos suberitoides*

4.7.3.1 Pengambilan Spons *Aaptos suberitoides*

- a. Menyiapkan semua alat yang akan digunakan.
- b. Melakukan penyelaman di Pantai Pasir Putih Sitobondo .
- c. Mengambil spons pada kedalaman ±4 m.
- d. Memasukkan spons sebanyak 2,5 kg ke dalam plastik yang telah berisi air laut.
- e. Memasukkan plastik yang berisi spons kedalam *cool box* yang telah diberi es batu.

4.7.3.2 Maserasi Spons *Aaptos suberitoides*

Metode maserasi dilakukan mengacu pada referensi (Rosmiati dan Suryati, 2014; Quiao and Uy, 2013) yang telah dimodifikasi:

- a. Membersihkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.
- b. Mengeringkan spons menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 5 hari.
- c. Memberikan label pada toples kaca.
- d. Membentuk serbuk spons yang telah kering dengan cara di blender.
- e. Menimbang 100 g serbuk spons.
- f. Memasukkan 100 g serbuk spons kedalam erlenmeyer yang telah diberi label.
- g. Menambahkan etanol 96% kedalam toples kaca yang telah berisi serbuk spons dengan perbandingan (4:1).
- h. Membiarkan rendaman selama 5 hari dengan pergantian pelarut sebanyak 5 kali.
- i. Melakukan pengadukan setiap 3 jam setiap hari menggunakan *orbital shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm.
- j. Mencampurkan semua filtrat pada toples kaca tertutup, kemudian disaring menggunakan kain flanel.
- k. Menguapkan pelarut hasil ekstraksi menggunakan *rotary evaporator*.
- l. Menghilangkan residu air dari hasil akhir ekstrak dengan cara di-*freeze drying*.
- m. Menyimpan hasil ekstrak di desikator untuk digunakan selanjutnya.

4.7.4 Pemaparan Ekstrak Spons pada Kultur Sel

- a. Mengencerkan ekstrak spons sesuai dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel HeLa.
- b. Menambahkan larutan ekstrak spons kedalam sumuran, kemudian diinkubasi selama 24 jam.

- c. Mencuci sumuran dengan medium sel.

4.7.5 Penentuan Kualitatif Fitokimia Alkaloid (Mira *dkk.*, 2012)

- a. Sampel ekstrak spons diambil sebanyak 4 g.
- b. Larutan ditambahkan 10 mL amoniak dan 10 mL kloroform.
- c. Ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 N.
- d. Campuran dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan.
- e. Lapisan atas dipindahkan masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam empat tabung reaksi yang telah diberi label.
- f. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol.
- g. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendorff*, jika terbentuk endapan jingga, maka positif mengandung alkaloid.
- h. Tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi *Mayer*, jika terbentuk endapan putih, maka positif mengandung alkaloid.
- i. Tabung keempat ditambahkan 3 tetes pereaksi *Wagner*, jika terbentuk endapan coklat, maka positif mengandung alkaloid.

4.7.6 Imunositokimia DR4/TRAIL-R1

Pengujian imunositokimia dilakukan mengacu pada referensi (CCRC, 2009) yang telah dimodifikasi:

- a. Mengambil sel HeLa dari inkubator CO_2 , mengamati kondisi selnya, kemudian sel dipanen sesuai dengan protokol panen sel.

- b. Menghitung jumlah sel HeLa sesuai dengan perhitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5×10^4 sel/1000 μL RPMI 1640).
- c. Membuat pengenceran 1:200 suspensi sel sampai konsentrasi 5×10^4 sel/1000 μL RPMI 1640.
- d. Memasukkan *cover slip* yang sesuai ukurannya ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.
- e. Mentransfer 1000 μL RPMI 1640 suspensi sel ke atas *cover slip*, kemudian distribusi sel diamati menggunakan mikroskop.
- f. Menginkubasi sel selama semalam.
- g. Membuat konsentrasi sampel menggunakan konsentrasi ekstrak sebagai kelompok perlakuan dengan sampel, kontrol sel tanpa antibodi primer, dan kontrol sel dengan antibodi primer.
- h. Mengambil sumuran-24 dari inkubator dan membuang media kultur yang ada pada sumuran menggunakan pipet *Pasteur* secara perlahan.
- i. Memasukkan sampel sebanyak 1000 μL ke dalam sumuran, kemudian memasukkan media kultur 1000 μL untuk kelompok kontrol sel.
- j. Menginkubasi dalam inkubator CO_2 selama 3 jam lalu mengamati kondisi sel dan didokumentasikan.
- k. Membuang semua media dari sumuran menggunakan pipet *Pasteur* secara perlahan dan memasukkan PBS 500 μL ke dalam masing-masing sumuran untuk mencuci sel, kemudian membuang PBS menggunakan pipet *Pasteur*.
- l. Mengambil *cover slip* dan meletakkannya pada sumuran lain yang telah diberi label.

- m. Meneteskan 300 μ L metanol dingin, diinkubasi 10 menit didalam *freezer*, dan buang metanol pada sumuran.
- n. Menambahkan 500 μ L PBS pada *cover slip*, didiamkan 5 menit, dan buang dengan mikropipet, dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak dua kali.
- o. Menambahkan 500 μ L akuades, didiamkan 5 menit, dan buang dengan mikropipet, dilakukan pencucian dengan akuades sebanyak dua kali.
- p. Meneteskan larutan hidrogen peroksida 3%, kemudian ditambahkan metanol, diinkubasi 15 menit, dan dicuci dengan PBS.
- q. Meneteskan larutan *blocking buffer* (FBS, PBS, dan Triton X100), inkubasi 1 jam pada suhu ruang, dicuci dengan PBS.
- r. Meneteskan antibodi primer DR4/TRAIL-R1 sebanyak 200 μ L tiap sumur, inkubasi semalam pada suhu 4°C.
- s. Sumur dikeluarkan dari inkubator, didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian diteteskan antibodi sekunder dan diinkubasi 1 jam pada suhu ruang, cuci dengan PBS dua kali.
- t. Meneteskan SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*), inkubasi 40 menit pada suhu ruang, cuci dengan PBS dua kali dan akuades satu kali.
- u. Meneteskan campuran DAB *Chromagen*:DAB *Buffer* (1:3), inkubasi 40 menit pada suhu ruang, cuci dengan PBS dua kali dan akuades satu kali.
- v. Meneteskan mayer hematoksilen, inkubasi 10 menit pada suhu ruang, lalu dibilas dengan akuades.
- w. Mengangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, lalu celupkan ke dalam *xylo*, kemudian ke dalam alkohol, lalu *cover slip* dikeringkan.
- x. Meletakkan *cover slip* diatas *object glass*, diberi lem, dan *cover slip* ditutup dengan *cover slip* kotak.

- y. Mengamati aktivasi protein dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x untuk melihat aktivasi DR4/TRAIL-R1 yang tampak pada sitoplasma sel.
- z. Melakukan perhitungan indeks aktivasi DR4/TRAIL-R1, dengan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah sel yang mengaktifkan DR4}}{\text{Total Sel}}$$

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran dianalisis secara deskriptif dengan menjabarkan *absolute number* yang diperoleh dari perhitungan sel secara manual. Sel pada lapang pandang dihitung dan ditentukan yang mengalami aktivasi terhadap DR4/TRAIL-R1. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian secara statistik disebabkan karena data yang diperoleh hanya satu data dan tidak dilakukan pengulangan.

