

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun lindur jenis *Bruguiera gymnorrhiza* didapatkan dari kawasan konservasi mangrove Kabupaten Trenggalek. Bahan ekstraksi yang digunakan adalah pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Setelah didapatkan hasil ekstraksi kemudian dilakukan uji fitokimia, uji kadar air dan uji toksisitas. Tetapi sebelum dilakukan uji fitokimia dan uji toksisitas terlebih dahulu sampel daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) dilakukan uji kadar air. Dalam uji kadar air menggunakan bahan silika gel dan ekstraksi daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*). Dalam uji fitokimia menggunakan bahan klorofom, pereaksi meyer, etanol 96%, asam sulfat (H_2SO_4) 2 N, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, magnesium, aquades, $FeCl_3$ 1%, Na_2CO_3 , folin ciocelteau, dan HCl pekat. Dalam pengujian toksisitas menggunakan bahan artemia dan air laut. Dalam pengujian viabilitas sel HeLa bahan yang digunakan adalah sel HeLa yang dikultur didapatkan dari laboratorium sentral biomedik fakultas kedokteran Brawijaya, media *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMIM) sebagai media kultur sel HeLa, 10-20 mL serum free media, alkohol 70%, larutan D-PBS, 2-3 mL tripsin-EDTA, MTT kitt dan kemudian sel HeLa disubkultur dengan menggunakan metode MTT assay.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah ultrasonik *bath* "Branson 3510" 50 kHz, gelas ukur 500 mL, spatula, *beaker glass* 500 mL, *beaker glass* 1000 mL, corong, *magnetic stierer*, *hotplate*, *oven*, *Rotary evaporator*, labu evaporator, timbangan, dan blender. Dalam uji kadar air,

desikator, oven, cawan petri, *crusable* tank, dan timbangan analitik. Dalam pengujian fitokimia menggunakan alat tabung reaksi, *beaker glass* 500 mL, pipet tetes, pipet volume, bola hisap, dan timbangan digital. Dalam pengujian toksisitas menggunakan alat *beaker glass* 500 mL, botol vial, gelas ukur 500 mL, pipet tetes, aerator, dan kaca pembesar. Proses subkultur sel HeLa menggunakan alat *Laminar air-flow*, *falcon*, inkubator dan tabung gas CO₂, *Syringe*, *Inverted microscope*, filter 0,2 µm, sumuran, spiritus, *cover glass* yang dipatahkan, *sentrifuge tube*, *disposable* pipet. Proses pengecatan menggunakan pipet, *cover glass*, *microscope*, dan *ELISA reader*.

3.2 Metode Penelitian

Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan terdiri dari pengeringan daun lindur, ekstraksi, uji kadar air, uji fitokimia, dan uji toksisitas. Pada penelitian utama terdiri dari uji aktivitas antikanker bioaktif pada viabilitas sel HeLa.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pada tahap ini memiliki tujuan yaitu untuk mengetahui senyawa bioaktif di dalam ekstrak daun lindur, mengetahui tingkat toksisitas dari daun lindur serta mengetahui rendemen dan kadar air dari ekstrak daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*).

3.2.1.1 Parameter Pendahuluan

Parameter uji yang dilakukan pada tahap ini adalah adanya kandungan fitokimia dari ekstrak daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*), rendemen

dan kadar air pada ekstrak daun lindur, serta tingkat toksisitas dari ekstrak daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) dengan menggunakan pelarut yang berbeda.

3.2.1.2 Prosedur Penelitian Pendahuluan

3.2.1.2.1 Proses Pengeringan

Sebelum dihaluskan daun lindur terlebih dahulu di cuci dengan air mengalir sampai bersih. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven selama 2 jam dengan suhu 60 °C sampai kadar air nya berkurang. Kemudian daun lindur yang sudah di oven dihaluskan dengan blender hingga benar-benar halus dengan tekstur daun lindur seperti serbuk (Astuti, 2012).

3.2.1.2.2 Proses Ekstraksi

Serbuk dari daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) yang sudah dihaluskan kemudian diekstraksi dengan menggunakan metode sonikasi. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi ini adalah metanol, eti asetat, dan n-heksan. Ekstraksi metode sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik, hasil dari beberapa penelitian adalah metode sonikasi merupakan metode terbaik dengan rendemen tertinggi dengan pelarut metanol. Efek mekanik dari metode sonikasi dapat meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sel bahan serta meningkatkan transfer massa sehingga waktu yang dibutuhkan untuk pemecahan sel hanya beberapa menit (Sani *et al.* 2014).

Ekstraksi pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan cara bertingkat yaitu dari pelarut non polar ke polar. Adapun proses ekstraksi diawali dengan merendam serbuk daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) menggunakan pelarut n-heksan yang bersifat non polar. Dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar pada residu yang didapatkan dari n-

heksan, selanjutnya residu dari ekstraksi etil asetat diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol yang bersifat polar.

Ekstraksi dilakukan dengan menimbang daun lindur (*Bruguiera gymnorhiza*) sesuai kebutuhan dan ditambah dengan pelarut (n-heksan, etil asetat, dan metanol) dengan rasio daun lindur : pelarut adalah 1 : 5 (b/v). Campuran serbuk daun lindur dan pelarut tersebut diekstrak dengan gelombang ultrasonik pada frekuensi 50 kHz selama 45 menit. Penggunaan frekuensi dibawah 50 kHz dipastikan gelombang ultrasonik tidak mampu memecah dinding sel bahan, sedangkan frekuensi 50 kHz digunakan untuk memecah dinding sel bahan sehingga dapat mempercepat proses penarikan senyawa bioaktif dari dalam bahan ke pelarut. Waktu yang digunakan pada saat proses ekstraksi adalah 45 menit hal ini karena lama waktu sonikasi akan menghasilkan sampel yang lebih homogen. Pernyataan ini didukung oleh penelitian Delmifiana dan Astuti (2013), bahwa semakin lama waktu sonikasi partikel cenderung lebih homogen dan mengecil yang akhirnya menuju ukuran nanopartikel yang stabil serta penggumpalan pun semakin berkurang. Ditambahkan oleh Handayani *et al* (2016), semakin lama waktu ekstraksi kesempatan bahan untuk kontak dengan pelarut semakin besar sehingga hasilnya juga akan bertambah sampai titik jenuh larutan. Kemudian hasil ekstraksi tersebut disaring dengan kertas saring untuk menghilangkan ampasnya sehingga diperoleh ekstrak dengan pelarut. Untuk mendapatkan ekstrak murni, dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes.

Tahap selanjutnya adalah uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan bioaktif dalam ekstrak daun lindur *B. gymnorhiza*. Uji fitokimia ini meliputi tanin, steroid, flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin, total fenol, dan kadar air. Adapun uji toksisitas yang dilakukan menggunakan metode BSLT

(*Brine Shrimp Lethal Test*) dengan menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina*.

3.2.1.2.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian pendahuluan ini memiliki tujuan yaitu untuk mengetahui adanya kandungan senyawa bioaktif pada sampel yang akan diuji. Adapun uji fitokimia yang dilakukan antara lain tanin, steroid / terpenoid, flavonoid, alkaloid, saponin, dan total fenol.

a. Uji tanin

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 1 ml dan ditambahkan 1 ml larutan FeCl_3 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Jones dan Kinghorn, 2006)

b. Uji steroid/triterpenoid

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 1 ml dan ditambahkan 0,5 ml kloroform kemudian ditambahkan juga 0,5 mL asam asetat anhidrida. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid. Sedangkan bila warnanya kecoklatan adanya triterpenoid (Jones dan Kinghorn, 2006).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 1 ml kemudian ditambahkan dengan 5 tetes etanol, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu ditambahkan dengan serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika menghasilkan warna kuning, orange, dan merah menandakan adanya flavonoid (Nafisah *et al.* 2014).

d. Uji Saponin

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 1 ml dan ditambahkan 1 ml aquades lalu dikocok. Didiamkan, lalu ditambahkan dengan HCl sebanyak 3 tetes. Apabila terbentuknya busa stabil kurang dari 10 menit, maka sampel mengandung senyawa saponin (Harborne, 1987).

e. Uji Alkaloid

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 1 ml dan ditambahkan pereaksi mayer sebanyak 3 tetes, terbentuknya endapan putih hingga kekuningan pada tabung menunjukkan adanya alkaloid (Jones dan Kinghorn, 2006).

f. Uji Total Fenol

Ekstrak dari mangrove *Brugueira gymnorrhiza* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 ml yang dilarutkan dengan aquades hingga 10.000 ppm dan diambil sebanyak 0,1 ml. Ditambahkan larutan folin ciocelteau perbandingan 1 : 2 (1 ml reagen + 2 ml aquades) di vortex mixer selama 15 menit. Kemudian didiamkan selama 5 menit dan ditambahkan 1 ml Na_2CO_3 7%. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 30°C dan dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis 750 nm (Djapiala *et al.* 2014).

3.2.1.2.4 Uji Kadar Air

Uji kadar air pertama-tama dilakukan adalah timbang sampel yang telah halus sebanyak 1 – 2 gram dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya. Kemudian keringkan dalam oven pada suhu $100 - 105^\circ\text{C}$ selama 3 – 5 jam tergantung bahannya. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang.

Panaskan lagi dalam oven selama 6 jam, dinginkan dalam desikator dan kemudian ditimbang (Sudarmadji *et al.* 1997).

Peranan air dalam bahan pangan sangat mempengaruhi aktivitas metabolisme seperti aktivitas enzim, mikroba, dan kimiawi. Kadar air daun lindur dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%wb = \frac{(A + B) - C}{B} \times 100 \%$$

3.2.1.2.5 Uji Toksisitas

Penyiapan larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dari larutan uji 1000 ppm ini, selanjutnya dibuat lagi larutan dengan konsentrasi 125, 250, 500, dan 1000 ppm dengan cara pengenceran. Untuk kontrol (0 ppm) dilakukan tanpa penambahan ekstrak.

Menurut Muaja *et al* (2013), uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina*. Dimana uji ini diawali dengan penyiapan hewan uji *Artemia salina* yaitu dengan cara telurnya direndam selama 48 jam dalam air laut sebanyak 1 liter dan hewan uji ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian disiapkan wadah (botol vial) untuk masing-masing perlakuan. Dalam uji toksisitas ini menggunakan konsentrasi 125, 250, 500 dan 1000 ppm dengan perlakuan kontrol negatif (0 ppm). Kemudian setiap konsentrasi dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina*, diamati kematian *Artemia* setelah 24 jam menggunakan kaca pembesar.

3.2.2 Penelitian Utama

Penelitian utama yang dilakukan adalah uji *in vitro* dengan beberapa dosis terhadap viabilitas sel HeLa. Penelitian utama bertujuan untuk

mengetahui pengaruh senyawa bioaktif ekstrak daun lindur terhadap viabilitas sel HeLa.

3.2.2.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini menggunakan hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat. Pada metode eksperimen ada dua variabel yang perlu diperhatikan, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Dinamakan variabel terikat karena nilai variabel ini tergantung atau terikat dan berubah-ubah sesuai dengan nilai variabel bebas (Hasrudin, 2005).

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pelarut yang berbeda, yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode sonikasi. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah parameter uji yang diamati, yaitu pengaruh terhadap viabilitas sel hela dengan pemberian ekstrak dari daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) dengan pelarut ekstraksi yang berbeda.

Berdasarkan perlakuan, penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dimana dalam penelitian ini menggunakan tiga perlakuan dengan pelarut yang berbeda yaitu terdiri dari metanol, etil asetat, dan n-heksan serta menggunakan ulangan sebanyak 3 kali. Adapun hubungan perlakuan dengan ulangan yang digunakan adalah $(r \times t - 1) - (t - 1)$. Rancangan percobaan penelitian utama dapat dilihat pada tabel 4 dibawah ini:

Tabel 4. Rancangan Percobaan Penelitian Utama

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
PM A	PM A1	PM A2	PM A3
PM B	PM B1	PM B2	PM B3
PM C	PM C1	PM C2	PM C3
PM D	PM D1	PM D2	PM D3
PE A	PE A1	PE A2	PE A3
PE B	PE B1	PE B2	PE B3
PE C	PE C1	PE C2	PE C3
PE D	PE D1	PE D2	PE D3
PN A	PN A1	PN A2	PN A3
PN B	PN B1	PN B2	PN B3
PN C	PN C1	PN C2	PN C3
PN D	PN D1	PN D2	PN D3

Keterangan

- PM : metanol
 PE : etil asetat
 PN : n-heksan
 A : dosis 250 ppm
 B : dosis 125 ppm
 C : dosis 62,5 ppm
 D : dosis 31,25 ppm

Model untuk rancangan acak lengkap (RAL) faktorial adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + B_j + (ab)_{ij} + E_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} : Hasil pengamatan untuk faktor A level ke- i , faktor B level ke- j , pada ulangan ke- k
 μ : Rataan umum
 a_i : Pengaruh faktor A pada level ke- i
 B_j : Pengaruh faktor B pada level ke- j
 $(ab)_{ij}$: Interaksi antara A dan B pada faktor A level ke- i , faktor B level ke- j
 E_{ijk} : Galat percobaan untuk faktor A level ke- i , faktor B level ke- j pada ulangan atau kelompok ke- k

Hasil dari penelitian selanjutnya dilakukan pengujian normalitas dengan menggunakan SPSS untuk mengetahui nilai F hitung, dan kemudian dilanjutkan

dengan uji ANOVA. Jika hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.2.2.2 Prosedur Penelitian

3.2.2.2.1 Uji Viabilitas Sel HeLa

Uji viabilitas dari sel HeLa dimulai dengan proses *thawing freezing*, sel HeLa kemudian disubkultur dan diakhiri dengan proses perhitungan jumlah sel yang mati dan hidup.

- Pembuatan Larutan Uji Untuk Uji Sitotoksisitas

Pembuatan dosis diawali dengan pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dibuat seri kadar sampel dalam media RPMI 1640 masing-masing dengan konsentrasi 250, 125, 62,5, dan 31,25 ppm.

- *Thawing* sel HeLa

Cyrotube atau tabung cryo yang didalamnya terdapat sel hela dikeluarkan dari nitrogen tank dan dibawa ke dalam LAF. Semprot seluruh peralatan yang digunakan untuk kultur dengan alkohol 70% sebelum masuk ke dalam LAF. Tabung cryo dithawing sampai es yang didalamnya separuh mencair. Kemudian Pindahkan isi tabung cryo kedalam centrifuge tube yang telah berisi 10 mL MC dan sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit. Buang supernatant dan resuspensi pellet dengan 5 mL MC, selanjutnya tanam dalam flask kultur 25 cm² dengan ditambahkan 7-8 mL MC dan Inkubasi 1 X 24 jam dalam inkubator dengan kelembaban CO₂ , 5% , suhu 37°C, kemudian ganti media kultur 2-3 hari sekali (ATCC, 2003).

- Subkultur sel HeLa

Hela di dalam flask kultur diamati di mikroskop inverter. Subkultur dilakukan apabila hela telah melekat dan konfluen 80-90%. Bawa flask kultur hela ke dalam LAF. Tarik semua sisa media di dalam flask. Cuci dalam flask

dengan D-PBS. Tambahkan 2-3 ml tripsin-EDTA ke dalam flask, inkubasi pada suhu 37°C, sesekali dilihat dengan mikroskop inverter, jika sel telah detach semua, tambahkan 5 mL MC. Pindah semua larutan di dalam flask ke dalam centrifuge tube. Sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit. Buang supernatan dan resuspensi pellet dengan 1 mL MC. Hitung viabilitas sel dengan mengambil 10µl suspense ditambah *trypan blue* (1:1) kemudian ditaruh di haemocytometer. Tanam sel hela sesuai dengan kebutuhan Ex. 10⁸ sel/well untuk well 6. Inkubasi 1 x 24 jam dalam inkubator dengan kelembaban CO₂ 5% suhu 37°C dan ganti media kultur 2-3 hari sekali (ATCC, 2003).

Persentase kematian sel dengan metode MTT assay dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(\text{OD kontrol} - \text{OD medium}) - (\text{OD perlakuan} - \text{OD medium})}{(\text{OD kontrol} - \text{OD medium})} \times 100 \%$$

3.2.3 Uji LC-MS

Analisis LC - MS dilakukan dengan menggunakan sebuah *Mariner Biospectrometry* dilengkapi dengan pompa biner. HPLC itu dihubungkan dengan spektrometer massa yang dilengkapi dengan sumber ESI (*electrospray ionisation*). Modus full -scan dari 100-1200 m/z dilakukan dengan sumber suhu 140 °C. HPLC kolom (Phenomenex 5µ C18 , 150 × 1 mm) digunakan untuk analisis. Menggunakan pelarut metanol dengan 0,3 % asam format, dengan menginjeksikan sampel sebanyak 2 µL, pelarut yang digunakan pada laju alir total 0,1 mL / menit. Pelarut berjalan dengan elusi isokratik selama 30 menit.