

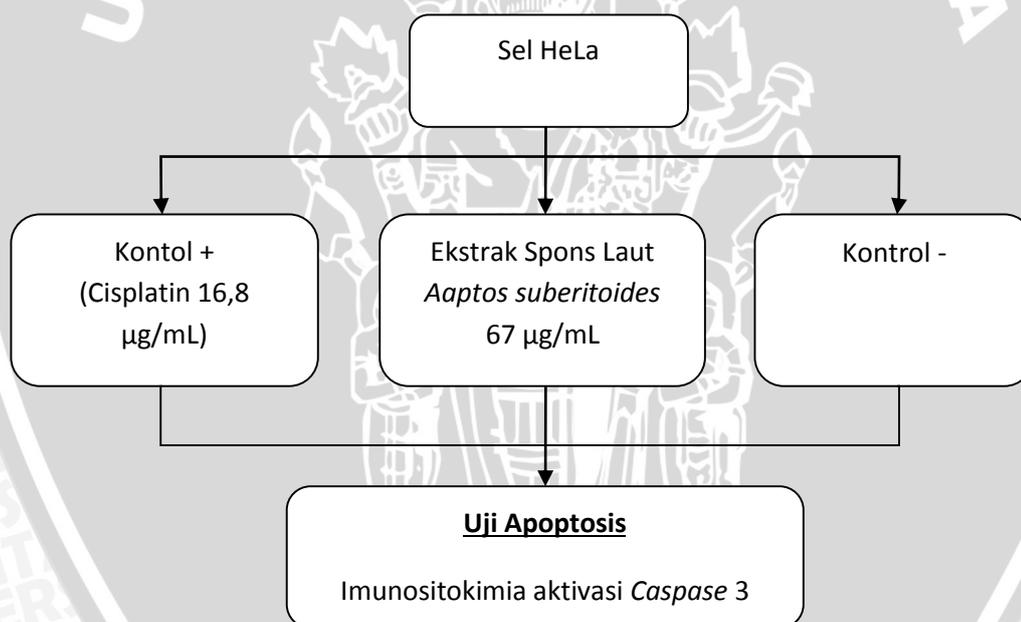
BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan studi pustaka dengan pendekatan kuantitatif dan semikualitatif menggunakan *true experimental design* secara *in vitro*, *post test only*, dan *control group design* untuk mengetahui efek pemberian ekstrak spons *Aaptos suberitoides* terhadap aktivitas *caspase 3* pada sel HeLa.

4.1.1 Uji Induksi Apoptosis



4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel HeLa *cell line* kanker serviks yang dikultur. Sel ini didapatkan dari *American Type Culture Collection* (ATCC) Yogyakarta. Sedangkan cisplatin adalah produk dari Kalbe Farma.

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian dengan satu dosis ekstrak spons laut yakni 67 $\mu\text{g/mL}$.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* (67 $\mu\text{g/mL}$). Sedangkan variable terikat berupa induksi apoptosis dari aktivitas *caspase 3* pada sel HeLa.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut adalah lokasi dan waktu penelitian yang ditetapkan.

4.4.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian berlangsung di Laboratorium Fitokimia Farmasi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA dan Balai Materi Medika Kota Batu untuk melakukan proses ekstraksi dan uji kandungan serta di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk proses kultur sel HeLa dan uji apoptosis.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung selama 4 bulan, mulai bulan Februari hingga bulan Juni 2015.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

4.5.1.1 Bahan Ekstraksi

Spons Laut *Aaptos suberitoides* segar yang diambil dari Pantai Pasir Putih Situbondo Jawa Timur, Indonesia dengan koordinat 7° 41' 35.97" LS dan 113° 49' 35.50" BT dan etanol 96%.

4.5.1.2 Bahan Uji Alkaloid

Ekstraks Spons Laut *Aaptos suberitoides*, reagen Dragendorf, reagen Mayer, dan reagen Wagner.

4.5.1.3 Bahan Kultur

Sel HeLa CCI-2, Alkohol 70%, *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (D-PBS), tripsin, EDTA, *trypan blue* 0.05%, *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Penicillin streptomycin*, Dimetil Sulfoksida (DMSO), Akuades steril dan NaHCO₃.

4.5.1.4 Bahan Uji Aktivitas Caspase 3

Stok sampel Buffer sodium sitrat pH 6,0, hidrogen peroksida, metanol, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), antibody monoklonal primer untuk *caspase 3* dari Santa Cruz Biotechnology Inc (Europe), media *mounting*, *Streptavidin Horseradish Peroxidase* (SA-HRP), Diaminobenzidine (DAB), akuades steril, *Mayer's Hematoxilen* (BioCare) dan BSA.

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Ekstraksi

Pisau, nampan aluminium, oven, blender, *orbital shaker*, toples kaca, pipet tetes, gelas *beaker*, Erlenmeyer, kain flannel, sarung tangan, gelas ukur, pengaduk, *rotary evaporator*, *freezer* dan *freeze dryer*.

4.5.2.2 Alat Uji Alkaloid

Pipet tetes, tabung reaksi, sendok tanduk dan rak tabung reaksi.

4.5.2.3 Alat Kultur

Tangki nitrogen, mikropipet, sentrifuse suhu ruang, *Laminar Air Flow* (LAF)-*Biosafety Cabinet level II*, inkubator CO₂, mikroskop *inverted*, *flask* kultur, sumuran kultur, filter 0.2µm, botol *scott*, tips, *centrifuge tube*, jarum suntik sekali-pakai, masker operasi, sarung tangan, pipet sekali-pakai, *haemocytometer*.

4.5.2.4 Alat Uji Aktivitas Caspase 3

Sumuran kultur, *waterbath*, mikropipet, gelas *beaker*, stopwatch, gelas objek, *cover slip*, tip biru, tip kuning, Erlenmeyer dan mikroskop.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- a. **Spons Laut *Aaptos suberitoides*** adalah hewan kelompok porifera yang mempunyai tubuh berpori-pori dengan karakter massa lobus globular yang berwarna hijau atau biru gelap di permukaannya dan kuning terang di dalamnya serta bentuknya yang irregular (Voogd, *et al*, 2004).
- b. **Apoptosis** adalah kematian sel terprogram yang normal terjadi untuk menjaga populasi sel dalam suatu jaringan dalam batas tertentu dan juga sebagai mekanisme pertahanan ketika sel dirusak oleh penyakit atau agen

yang berbahaya (Elmore, 2007; Cancer Chemoprevention Research Center, 2014).

- c. **Caspase 3** (*cysteiny l aspartate-specific proteases*) adalah enzim protease yang berperan sebagai *Caspase* efektor pada permulaan kematian sel yang menandakan masuknya sel pada jalur apoptosis. *Caspase 3* diaktivasi oleh *Caspase* sebelumnya yakni *Caspase 8* (ekstrinsik) dan *Caspase 9* (intrinsik), oleh karena itu *Caspase 3* juga berperan sebagai titik pertemuan berbagai jalur *signaling* yang berbeda (Porter and Janicke, 1999; BD Bioscience, 2012).
- d. **Immunositokimia** adalah metode untuk identifikasi konstituen jaringan *in situ* dengan cara interaksi antigen-antibodi spesifik (Javois, 1999)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi Spons Laut *Aaptos suberitoides*

- a. Membersihkan alat-alat yang akan digunakan.
- b. Memotong 2500 gram spons laut segar.
- c. Mengeringkannya dibawah sinar matahari hingga spons menjadi kering.
- d. Mengeringkan lagi dengan oven suhu 40°C selama 5 hari.
- e. Membuat spons kering menjadi serbuk dengan blender.
- f. Merendam serbuk spons dengan larutan etanol 96% (1:4) dalam Erlenmeyer selama 5 hari dengan 5 kali penggantian pelarut.
- g. Melakukan pengadukan dengan *orbital shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 3 jam setiap setelah penggantian pelarut.
- h. Mencatat waktu tepat setelah proses pengadukan.
- i. Menyaring hasil rendaman menggunakan kain flanel dan mencampurnya jadi satu di toples kaca.

- j. Menguapkan pelarut ekstrak dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan kecepatan 70 rpm.
- k. Membekukan ekstrak pekat dalam *freezer* -70°C selama 1 jam.
- l. Memasukkan ekstrak beku ke *freeze dryer* -60°C selama 24 jam untuk siklus pertama dan suhu -60°C selama 30 jam untuk siklus kedua.

4.7.2 Penentuan Kualitatif Alkaloid (Sangi dkk, 2008)

- a. Mengambil sampel ekstrak sebanyak 4 gram.
- b. Menambahkan kloroform secukupnya.
- c. Menambahkan 10 mL amoniak dan 10 mL kloroform.
- d. Menyaring larutan ke dalam tabung reaksi.
- e. Menambahkan 10 tetes H₂SO₄.2N.
- f. Mengocok campuran dengan teratur.
- g. Mendinginkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan.
- h. Memindahkan lapisan atas ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL.
- i. Menambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff pada masing-masing tabung sesuai dengan labelnya.
- j. Mengamati hasil reaksi ekstrak dengan reagen.

4.7.3 Kultur Sel HeLa (Biomedik FKUB)

4.7.3.1 Pembuatan Media

- a. Untuk pembuatan 1 ml trypan blue 0.05%, menimbang 0.05 gram padatan *trypan blue* kemudian melarutkannya dalam 1 ml akuades dan vortex sampai homogeny.
- b. Untuk pembuatan 1L serum *free-media* kultur (SF-M), melarutkan 1 sachet MEM dalam 1L *deionized water* lalu menambahkan 2 gram NaHCO₃ dan

100 UI/ml-Penicillin 100µl/ml-streptomycin dan adjust pH 7.2-7.4 kemudian mesterilkan dengan filter 0.2 µm di dalam LAF.

- c. Untuk pembuatan medium *complete* (MC), menambahkan 10-20 ml FBS ke 100 ml SF-M.
- d. Untuk pembuatan 1 ml media *cryo*, menambahkan 300µl FBS dan 100µl DMSO ke dalam 600µl MC.

4.7.3.2 Thawing Sel HeLa

- a. Mengeluarkan tabung *cryo* yang terdapat sel HeLa dari nitrogen tank dan membawanya ke dalam LAF.
- b. Menyemprot seluruh peralatan yang digunakan untuk kultur dengan alkohol 70% sebelum masuk ke dalam LAF.
- c. Tabung krio di-*thawing* sampai es yang didalamnya separuh mencair.
- d. Memindahkan isi tabung *cryo* kedalam tabung sentrifus yang telah berisi 10 ml MC.
- e. Sentrifus dengan kecepatan 700x g 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 1 X 24 jam dalam inkubator dengan kelembapan CO₂ 5% 37°C.
- i. Mengganti media kultur 2-3 hari sekali.

4.7.3.3 Subkultur HeLa:

- a. Mengamati sel HeLa di dalam flask kultur dengan mikroskop *inverted*.
- b. Melakukan subkultur apabila sel HeLa telah melekat dan konfluen 80-90%.
- c. Membawa botol kultur HeLa ke dalam LAF.
- d. Menarik semua sisa media di dalam botol kultur.
- e. Mencuci bagian dalam botol kultur dengan D-PBS.

- f. Menambahkan 2-3 ml tripsin-EDTA ke dalam botol kultur.
- g. Menginkubasi botol kultur pada suhu 37°C dengan sesekali melihatnya menggunakan mikroskop *inverted*.
- h. Menambahkan 5 ml MC, jika sel telah detach semua.
- i. Memindah semua larutan di dalam botol ke dalam tabung sentrifus.
- j. Sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit.
- k. Membuang supernatan dan resuspensi pelet dengan 1 ml MC.
- l. Menghitung viabilitas sel dengan mengambil 10µl suspense ditambah trypan blue (1:1) kemudian menaruhnya di *haemocytometer*.
- m. Menanam sel HeLa sesuai dengan kebutuhan (10^8 sel/well untuk well 6).
- n. Menginkubasi 1 X 24 jam dalam inkubator dengan kelembapan CO₂ 5% 37°C.
- o. Mengganti media kultur 2-3 hari sekali.

4.7.3.4 Freezing HeLa

- a. Mengkultur HeLa dalam botol yang telah confluent 80-90% dibawa ke dalam LAF.
- b. Menarik semua sisa media kultur di dalam botol.
- c. Mencuci bagian dalam botol dengan D-PBS.
- d. Menambahkan 2-3 ml tripsin-EDTA ke dalam botol.
- e. Inkubasi pada suhu 37°C dengan sesekali dilihat dengan mikroskop *inverted*.
- f. Menambahkan 5 ml media kultur, jika sel telah *detach* semua.
- g. Memindah semua larutan di dalam botol ke dalam tabung sentrifus.
- h. Sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit.
- i. Membuang supernatan dan resuspensi pelet dengan 0.1 ml MC.

- j. Menghitung viabilitas sel dengan mengambil 10 μ l suspense ditambah *trypan blue* (1:1) kemudian meletakkannya di *haemocytometer*.
- k. *Freezing* 10⁶ sel HeLa pada media *cryo*

4.7.4 Pemaparan Ekstrak Spons Laut *Aaptos suberitoides* ke Kultur Sel

- a. Mengencerkan ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan di medium sel HeLa.
- b. Menambahkan larutan ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* ke dalam sumuran kultur dan mendinginkan selama 24 jam.
- c. Mencuci larutan ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* dengan medium sel kembali.

4.7.5 Imunositokimia *Caspase 3*

- a. Memberi larutan buffer sitrat dan tween dengan pH 6 pada sumuran kultur.
- b. Memanaskan sumuran kultur dalam waterbath dengan suhu 95°C selama 10 menit.
- c. Mengeluarkannya dari penangas air dan didiamkan hingga mencapai suhu ruangan.
- d. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- e. Meneteskan 3% H₂O₂ lalu ditambahkan metanol lalu diinkubasi selama 15 menit.
- f. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- g. Menambahkan larutan *blocking buffer* (FBS, PBS, dan Triton X100) guna *blocking* protein yang tidak spesifik lalu diinkubasi 1 jam pada suhu ruang.
- h. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- i. Meneteskan antibodi primer dan bloking buffer dengan perbandingan (1:250).

- j. Menambahkan *caspase 3* sebanyak 200 μ L ke tiap sumur.
- k. Menginkubasi sel semalam pada suhu 4°C.
- l. Mendinginkan sel 15 menit pada suhu ruang.
- m. Meneteskan antibodi sekunder lalu menginkubasinya selama 1 jam pada suhu ruang.
- n. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- o. Meneteskan SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*) dan diinkubasi 40 menit pada suhu ruang.
- p. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- q. Membilas dengan akuades.
- r. Meneteskan campuran DAB - Chromagen : DAB Buffer (1:3) (*Diaminobenzidine*) dan diinkubasi 40 menit pada suhu ruang.
- s. Mencuci sumuran dengan PBS sebanyak 2 X 3 menit.
- t. Membilas dengan akuades.
- u. Counterstain dengan Mayer's Hematoxilen dengan campuran Mayer dan *Tap water*. pada perbandingan 1:10 lalu diinkubasi 10 menit pada suhu ruang.
- v. Membilas dengan akuades.
- w. Di-*mounting* dengan entelan.
- x. Mengeringkannya dengan diangin-anginkan.
- y. Mengamati ekspresi protein *caspase 3* dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x
- z. Menghitung indeks ekspresi *caspase 3* pada tiap lapang pandang dengan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah sel yang mengekspresikan caspase 3}}{\text{jumlah total sel}}$$

4.8 Analisis Data

Hasil perhitungan indeks ekspresi caspase 3 dianalisis secara deskriptif dengan menjabarkan *absolute number*. Analisa ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak spons *Aaptos suberitoides* terhadap ekspresi caspase 3 pada sel HeLa. Adapun penggunaan analisa secara deskriptif dipilih karena adanya keterbatasan data dan tidak adanya pengulangan.

