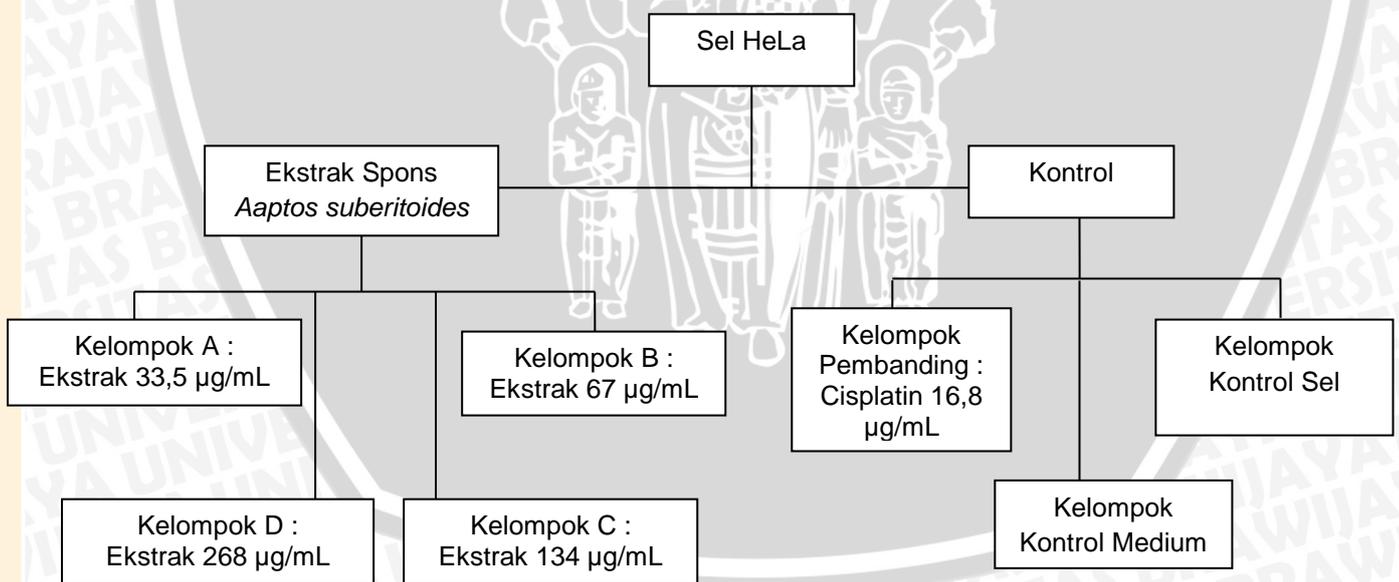


BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan studi pustaka dengan pendekatan kuantitatif menggunakan *true experimental design* secara *in vitro*, dilakukan pengecekan saat setelah perlakuan, dan menggunakan desain kelompok kontrol untuk mengetahui efek pemberian ekstrak spons *Aaptos suberitoides* pada konsentrasi tertentu terhadap proliferasi sel HeLa CCL2.

4.1.1 Uji aktivitas Antikanker melalui Hambatan Proliferasi



Gambar 4.1 Desain Penelitian Uji Aktivitas Antikanker Melalui Hambatan Proliferasi

Desain penelitian yang digunakan dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak spons *Aptos suberitoides* dan kelompok kontrol. Kelompok pemberian perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok berisi kultur sel HeLa dengan pemberian dosis ekstrak yang berbeda-beda. Sedangkan kelompok kontrol dibagi menjadi 3 yaitu kelompok pembanding dengan baku standar cisplatin, kontrol medium, dan kontrol sel. Kelompok pembanding baku standar berisi kultur sel HeLa dan pemberian cisplatin dengan dosis 16,8 µg/mL. Pada kelompok kontrol medium hanya berisi medium kultur. Sedangkan kontrol sel berisi medium kultur dan sel HeLa.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah kultur sel HeLa CCL-2, *cell line* kanker serviks yang dikultur. Sel tersebut diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) Yogyakarta. Sedangkan untuk cisplatin merupakan produk dari Kalbe Farma. Dalam penelitian ini terdapat 4 macam pengujian dengan dosis yang berbeda-beda. Semua kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan replikasi masing-masing 5 kali. Uji MTT dilihat setelah inkubasi 24 jam.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Dosis ekstrak spons laut *Aptos suberitoides* yaitu 33,5 µg/mL, 67 µg/mL, 134 µg/mL, 268 µg/mL dan cisplatin 16,8 µg/mL .

Variabel Tergantung : Jumlah sel HeLa yang mengalami hambatan proliferasi.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pelaksanaan penelitian ini adalah :

- Pengambilan spons laut *Aaptos suberitoides* dilakukan di pantai Pasir Putih, Situbondo, Jawa Timur, Indonesia di kedalaman 3-5 meter dengan titik koordinat 7°41'35,97" Lintang Selatan dan 113°49'35,50" Bujur Timur.
- Proses ekstraksi spons laut *Aaptos suberitoides* dilakukan di Laboratorium Fitokimia Farmasi FKUB.
- Proses evaporasi menggunakan *rotary evaporator* ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* dilakukan di Balai Materia Medika Kota Batu.
- Proses pembuatan ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* menjadi ekstrak kering di Laboratorium Biologi FMIPA UB.
- Kultur sel HeLa dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB.
- Uji antikanker melalui antiproliferasi sel HeLa dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB.

Penelitian dan proses administrasi ini dilakukan selama 6 bulan yaitu pada bulan Februari-Juli 2015

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Ekstraksi *Aptos suberitoides*

Bahan yang diperlukan untuk mengekstrak spons laut tersebut yaitu berupa spons *Aptos suberitoides* segar dan diambil semua bagian dari spons laut tersebut. Dari bahan segar tersebut diambil sebanyak 2500 gram. Selain itu dibutuhkan pula air laut untuk menjaga kesegaran spons tersebut saat akan didistribusikan dari Situbondo ke Malang. Selanjutnya es batu juga diperlukan untuk menjaga kesegaran spons saat penyimpanan dan distribusi agar tidak mudah busuk atau berubah menjadi tidak segar. Sedangkan etanol 96% merupakan bahan yang berperan sebagai pelarut saat ekstraksi menggunakan metode maserasi.

4.5.1.2 Kultur Sel HeLa

Untuk pembuatan medium sel HeLa digunakan bahan berupa 0,05 gram padatan *tryptan blue*, aquades, MEM, air deionisasi, NaHCO_3 , UI/mL-Penisilin-100 μl /mL-streptomisin, DMSO, dan tripsin EDTA. Selanjutnya dibutuhkan pula FBS dan 100 ml *Serum Free-Media* kultur (SF-M) untuk pembuatan *Medium complete* (MC). Sedangkan alkohol 70% dibutuhkan untuk menghindari peralatan kultur dari bakteri. Selanjutnya dibutuhkan D-PBS diperlukan untuk mencuci botol (Sigma, USA).

4.5.1.3 Uji Fitokimia Alkaloid

Bahan yang diperlukan untuk uji fitokimia alkaloid adalah amonia 10 mL, kloroform 10 mL dan juga dibutuhkan H_2SO_4 2 N. Reagen yang digunakan adalah

beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff pada masing-masing tabung.

4.5.1.4 Uji Proliferasi dengan MTT

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk melihat proliferasi sel dengan metode uji MTT sejatinya hanya dua yaitu reagen MTT dan detergen. Reagen MTT terdiri dari 1% (w/v) MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difenil-tetrazolum bromida. Sedangkan larutan detergen terdiri dari SDS yang bersifat iritan. Namun keduanya biasanya sudah disediakan dan bersifat siap pakai (Trevigen, MD).

4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Ekstraksi *Aaptos suberitoides*

Spons laut diambil dengan menggunakan pisau dan disimpan dalam plastik berisi air laut lalu diletakkan dalam kotak pendingin (*coolbox*) berisi es batu. Selanjutnya untuk mengekstrak spons tersebut digunakan oven pada suhu 40°C untuk mengeringkan spons *Aaptos suberitoides*. Selain itu digunakan blender untuk menghancurkan dan mengecilkan ukuran partikel. *Orbital shaker* (Innova) digunakan pencampuran ekstrak dengan pelarut sebelum maserasi dimulai dan *rotary evaporator* (Bochi) digunakan untuk menguapkan pelarut yang digunakan untuk mengekstrak. *Freezer* dengan suhu -70°C digunakan untuk membekukan ekstrak dan *Freeze dryer* (Christ) digunakan untuk membuatnya menjadi bentuk ekstrak kering. Selain itu dibutuhkan pula alat-alat seperti Erlenmeyer (Pyrex), toples maserasi, *aluminium foil*, botol kaca gelap untuk menyimpan ekstrak basah, kain flanel, loyang untuk oven, batang pengaduk dan cawan petri tertutup untuk menyimpan ekstrak kering.

4.5.2.2 Kultur Sel HeLa

Dari tahap pembuatan media, pencairan sel HeLa, dan subkultur HeLa dibutuhkan peralatan seperti tangki nitrogen, mikropipet (Socorex), sentrifuge (Thermo), vortex, *Laminar Air Flow* (LAF) pada kabinet dengan *biosafety* level II, inkubator CO₂, mikroskop *inverted*, botol kultur, sumuran plat 24 untuk kultur (Corning), penyaring 0.2µm (Corning), botol *scott*, tips steril, tabung sentrifuge (Thermo), *syringe* sekali pakai, tabung krio, masker operasi, sarung tangan karet, pipet sekali pakai, haemositometer.

4.5.2.3 Uji Fitokimia Alkaloid

Bahan yang diperlukan adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pengaduk, *aluminium foil*, gelas beaker, pipet tetes, sarung tangan, masker, dan harus dilakukan di lemari asam.

4.5.2.3 Uji Proliferasi dengan MTT

Untuk menguji proliferasi dengan MTT digunakan pembaca ELISA (BioRad) dengan penyaring 650 dan 570 nm, mikroskop *inverted* manual yang dirubah menjadi digital, pipet dengan banyak saluran, pipet pembantu, inkubator 37°C, dan *laminar flow hood*.

4.6 Daftar Istilah/Operasional

- Spons Laut : Organisme invertebrata multiseluler sederhana dalam laut yang memiliki kulit tebal dan berpori (Hooper, 1997).
- Proliferasi : Peningkatan jumlah sel sebagai hasil dari pertumbuhan dan pembelahan sel (Ghobrial *et al.*, 2005).

-Sel HeLa : Sel *continuous* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim seorang wanita bernama Henrietta Lacks pada 1951. Kultur ini sebagai model sel kanker serviks dan aman untuk kepentingan penelitian kultur sel (Rosita *et al.*, 2014).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstrak *Aptos suberitoides*

- a. Spons segar yang telah diambil di potong-potong menjadi ukuran yang lebih kecil.
- b. Spons tersebut lalu dikeringkan untuk menghilangkan kandungan airnya selama 5 hari pada suhu 40°C.
- c. Setelah kering spons diblender agar hancur.
- d. Selanjutnya spons dicampur etanol 96%. Spons dan etanol 96% digunakan dengan perbandingan 1:2 lalu dilakukan pengadukan dengan *orbital shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 3 jam dibagi dalam botol Erlenmeyer.
- e. Hasil adukan tersebut lalu direndam selama 24 jam di dalam toples dan siap dilakukan maserasi.
- f. Maserasi dilakukan dengan menyaring rendaman tersebut dengan kain flanel dan diambil hasil penyaringannya lalu pelarutnya ditambah lagi ke dalam ampasnya dengan perbandingan yang sama dengan sebelumnya. Penyaringan dan pengadukan dilakukan selama 24 jam sekali dan dilakukan sebanyak 5 kali.
- g. Kelima filtrat tersebut lalu dicampur dan dilakukan evaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm untuk menguapkan pelarutnya.

- h. Ekstrak yang telah dipekatkan dimasukkan dalam wadah dengan tinggi ± 12 cm hingga separuh tinggi wadah. Lalu ekstrak tersebut dibekukan dengan freezer pada suhu -70°C selama kurang lebih 1 jam.
- i. Selanjutnya ekstrak dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan freezer melalui dua siklus yaitu dengan suhu -60°C selama 24 jam untuk siklus pertama. Kemudian dengan suhu -60°C selama 30 jam untuk siklus kedua.

4.7.2 Kultur Sel HeLa (Biomedik FKUB)

4.7.2.1 Pembuatan Media

- a. 1 mL *trypan blue* 0,05% dibuat dengan cara melarutkan 0,05 gram padatan *trypan blue* ke dalam 1 mL aquades lalu divortex sampai homogen.
- b. 1 L *Serum Free-Media* kultur (SF-M), dibuat dengan melarutkan 1 bungkus MEM dalam 1 L air deionisasi kemudian ditambahkan 2 gram NaHCO_3 dan 100 UI/mL-Penisilin-100 μL /mL-streptomisin.
- c. Setelah itu diatur pH larutan antara 7,2 sampai 7,4 kemudian disterilkan dengan penyaring 0,2 μm di dalam LAF.
- d. Untuk pembuatan *Medium Complete* (MC), ditambahkan 10-20 mL FBS ke dalam 100 mL SF-M.
- e. 1 mL media krio dibuat dengan menambahkan 300 μL FBS dan 100 μL DMSO ke dalam 600 μL MC.

4.7.2.2 Metode Pencairan Sel HeLa

- a. Sel HeLa didalam tabung krio dikeluarkan dari tangki nitrogen dan dibawa ke LAF.

- b. Seluruh peralatan yang digunakan untuk mengkultur disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam LAF.
- c. Isi tabung krio dicairkan sampai es yang di dalamnya mencair setengahnya.
- d. Isi tabung krio tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge yang sudah diisi 10 mL MC.
- e. Sentrifuge dilakukan dengan kecepatan 700x g selama 10 menit.
- f. Supernatan dibuang dan resuspensi pelet tersebut dengan menggunakan 5 mL MC.
- g. Kultur tersebut ditanam dalam botol kultur 25 cm² dengan penambahan 7-8 mL MC.
- h. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ dengan kelembaban 5% pada suhu 37°C.
- i. Media kultur yang digunakan harus diganti 2-3 hari sekali.

4.7.2.3 Metode Subkultur Sel HeLa

- a. Sel HeLa yang terdapat di dalam botol, diamati perkembangannya di mikroskop *inverted*.
- b. Subkultur dapat dilakukan bila Sel HeLa telah konfluen sebanyak 80-90%. Selanjutnya botol kultur tersebut dapat dimasukkan ke dalam LAF.
- c. Semua sisa media di dalam botol dapat ditarik dengan tujuan pembersihan botol lalu dicuci dengan D-PBS.
- d. Setelah itu ditambahkan 2-3 mL tripsin-EDTA ke dalam botol dan perlu diinkubasi pada suhu 37°C. Kultur tersebut sesekali dilihat dengan mikroskop *inverted*, jika sel telah lepas semua ditambahkan MC sebanyak 5 mL.

- e. Larutan dalam botol kemudian dipindahkan kedalam tabung sentrifuge. Kemudian sentrifuge dilakukan dengan kecepatan 700x g selama 10 menit
- f. Supernatan dibuang dan resuspensi pelet tersebut dengan menggunakan 1 mL MC.
- g. Viabilitas sel kemudian dihitung dengan mengambil 10 μ L suspensi ditambah *trypan blue* dengan perbandingan 1:1 kemudian ditaruh di haemositometer.
- h. Sel HeLa kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ dengan kelembaban 5% pada suhu 37°C.
- i. Media kultur kemudian diganti setiap 2-3 hari sekali.

4.7.2.4 Metode Pembekuan Sel HeLa

- a. Setelah kultur Sel HeLa dalam botol konfluen sekitar 80-90% selanjutnya dibawa ke dalam LAF.
- b. Semua sisa media kultur dalam botol ditarik agar bersih. Kemudian cuci botol tersebut dengan D-PBS.
- c. Lalu ditambahkan 2-3 mL tripsin-EDTA ke dalam botol tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C.
- d. Sesekali hasil kultur tersebut dilihat dengan mikroskop *inverted*, jika sel telah lepas semua, ditambahkan 5 mL media kultur.
- e. Selanjutnya semua larutan dipindah ke dalam botol ke dalam tabung sentrifuge. Sentrifuge kemudian dilakukan dengan kecepatan 700x g selama 10 menit.
 - a. Selanjutnya supernatan dbuang dan resuspensi pelet dengan 0.1 mL MC.

- b. Dihitung viabilitas sel dengan mengambil 10 μ L suspensi dan ditambah *trypan blue* dengan perbandingan 1:1 kemudian ditaruh di haemositometer.
- c. Pembekuan 10⁶ sel HeLa dilakukan pada media krio.
- d. Penyimpanan dilakukan dalam gradien -20°C, -40°C, lalu -80°C selama masing-masing 2 jam kemudian simpan dalam tangki nitrogen untuk penyimpanan dalam jangka waktu yang lama.

4.7.3 Uji Fitokimia Alkaloid (Sangi at al., 2008)

- a. Sampel ekstrak diambil sebanyak 4 gram.
- b. Lalu ditambahkan 10 mL amoniak dan 10 mL kloroform.
- c. Setelah itu ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2N.
- d. Kocok campuran tersebut sampai homogen. Diamkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan.
- e. Lapisan yang telah terbentuk lalu dipisah dengan memindahkan lapisan atas ke dalam empat tabung reaksi.
- f. Satu digunakan untuk kontrol sedangkan tiga lainnya untuk diberikan reagen.
- g. Reagen yang digunakan adalah beberapa tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff pada masing-masing tabung sesuai dengan labelnya.
- h. Lalu diamati perubahan didalamnya.

4.7.4 Uji Proliferasi dengan MTT (Biomedik FKUB)

- a. Sel diresuspensi pada 10^6 per mL. Resuspensi tersebut diambil dari pemanenan suspensi sel dengan sentrifugasi.
- b. Disiapkan dilusi sel dari 10^6 sampai 10^4 per mL pada plat sel sekitar 10^3 - 10^5 sel per sumuran.
- c. Pindahkan dengan replikasi tiga kali sekitar 100 μ L dilusi per sumuran.
Termasuk tiga replikasi dari kontrol medium.
- d. Selanjutnya diinkubasi selama 6 sampai 48 jam.
- e. Tambahkan 10 μ L reagen MTT pada setiap sumuran.
- f. Kembalikan plat tersebut pada inkubator 2 sampai 4 jam sampai terlihat warna ungu.
- g. Ketika endapan ungu terlihat dengan mikroskop tambahkan 100 μ L reagen detergen.
- h. Letakkan plat dan tutupnya di tempat yang gelap selama 2 sampai 4 jam atau semalaman di suhu ruang.
- i. Diukur absorbansinya pada setiap sumuran termasuk pada blanko pada 570 nm di pembaca ELISA.
- j. Tentukan rata-rata dari setiap nilai yang terbaca pada tiga replikasi tadi dan juga pada blanko. Plotkan absorbansi melawan jumlah sel per mL.
Pilih nomer sel yang mempunyai absorbansi 0,75-1,25.
- k. Analisis sistem eksperimen tersebut dengan menggunakan jumlah sel yang tetap hidup pada setiap sumuran.

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran selanjutnya dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16 dengan Windows 7. Sebelumnya dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Untuk menghitung statistik data menggunakan *One-way* ANOVA. Dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Jika nilai yang diperoleh $p > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan atau pengaruh yang signifikan, namun apabila $p < 0,05$ menunjukkan ada perbedaan atau pengaruh yang signifikan. Untuk mengetahui analisis statistika antar variabel maka digunakan *Post Hoc* yang ditandai dengan $p < 0,05$ yaitu signifikan sedangkan $p > 0,05$ tidak signifikan.

