

BAB III METODE

3.1 Waktu dan Tempat

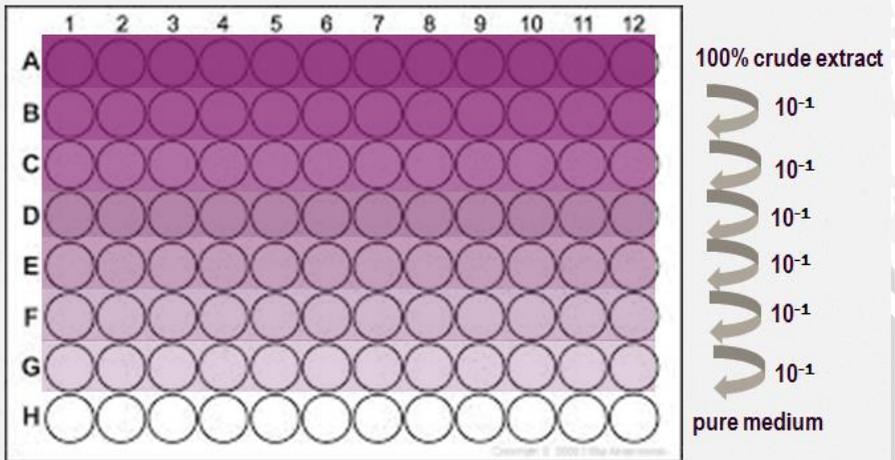
Penelitian dilaksanakan pada bulan September-Desember 2013 di Laboratorium Ekologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, serta DAILAB (DBT-AIST Laboratorium) *National Institute of Advanced Science and Technology*, Tsukuba, Jepang.

3.2 Cara Kerja

3.3.1 Ekstraksi Kasar Biji Juwet

Buah juwet yang telah masak atau berwarna ungu kehitaman dipisahkan antara biji dan daging buahnya. Biji kemudian dikeringkan pada suhu 60°C agar kandungan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya tidak rusak (Arce, dkk. 2007). Biji yang telah mengering ditandai dengan berubahnya warna kulit biji menjadi coklat, dihaluskan menjadi bubuk yang selanjutnya diambil sebanyak 5 gram untuk dicampur dengan 25 ml aquades di dalam botol falcon. Ekstraksi dilakukan dengan cara *slow shaking* selama semalam pada *shaker* dengan suhu 40°-50°C. Ekstrak didiamkan pada suhu ruangan dan dilakukan penyaringan dengan kertas Whatman. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit dan kemudian dilakukan penyaringan kembali dengan filter 0,45 µm (Wadhwa, dkk., 2013).

Perlakuan ekstrak biji juwet dilakukan dengan mencampurkan ekstrak ke dalam medium tumbuh sel. Medium tumbuh sel disiapkan dengan dosis ekstrak 0-100%. Dilakukan dilusi bertingkat dengan cara mengisi sebanyak 90 µl medium ke dalam 96 sumuran cawan kultur, dimulai dari baris kedua. Sumuran cawan pada baris pertama hanya diberi ekstrak biji juwet 100% sebanyak 100 µl yang kemudian diambil sebanyak 10 µl untuk dicampur pada sumuran baris kedua dan dilakukan *pipetting* sehingga diperoleh medium kultur dengan konsentrasi 10X pengenceran. Dilusi dihentikan pada baris terakhir yang digunakan sebagai kontrol atau medium murni.

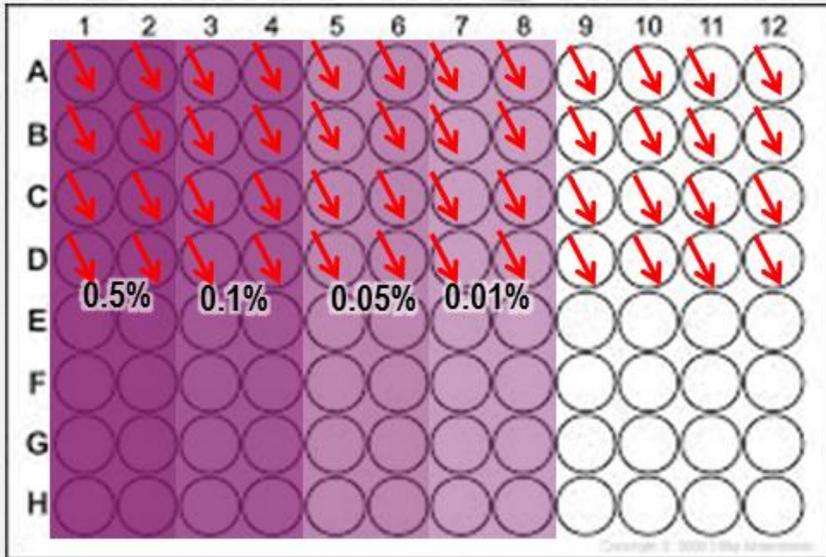


Gambar 4. Persiapan medium dengan dilusi bertingkat sehingga diperoleh dosis 100%; 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; dan 0%

3.3.2 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay

Pengaruh ekstrak pada terhadap viabilitas kultur sel TIG-3 diukur dengan metode *MTT assay*. Sel TIG-3 dikultur pada cawan kultur dengan 96 sumuran menggunakan medium DMEM (*life technologies*). Jumlah sel setiap sumur kultur adalah 5×10^3 sel/ml. Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Cawan kultur diletakkan dalam *UV linker chamber* (funakoshi) dengan setengah dari jumlah sumuran ditutupi *aluminium foil*, lalu sel dipapar dengan sinar UV 30 mJ/cm^2 . Medium tumbuh sel diganti setelah pemaparan sinar UV dengan medium yang telah mengandung ekstrak dengan rentang dosis 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; dan 0% sebagai kontrol negatif. Pengukuran absorbansi MTT dilakukan setelah sel diinkubasi dengan ekstrak biji juwet selama 24 jam. Medium tumbuh sel dibuang lalu ditambahkan $100 \mu\text{l}$ larutan *MTT* (*life technologies*) dan diinkubasi selama 4 jam. Larutan *MTT* dibuang dan diganti dengan DMEM lalu dilakukan *shaking* selama 10 menit. Absorbansi kultur diukur dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 540nm (Hseu, dkk., 2012).

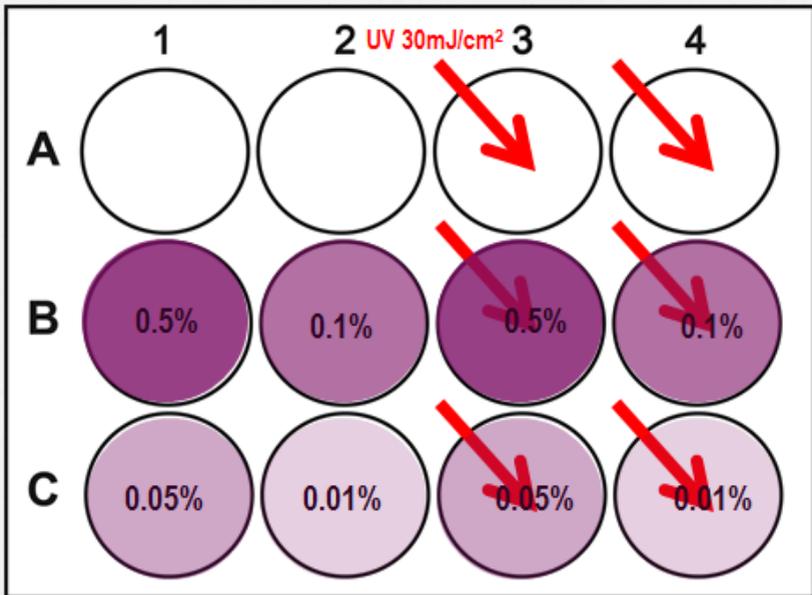
UV 30mJ/cm²



Gambar 5. Peta perlakuan pada kultur sel TIG-3 untuk persiapan *MTT Assay* UV 30mJ/cm² ekstrak biji juwet (0,5%; 0,1%; 0,05%; dan 0,01%)

3.3.3 Imunoflouresensi

Sel TIG-3 dikultur pada cawan kultur dengan 12 sumuran yang telah diberi *coverslip glass* di dasarnya. Paparan sinar UV dilakukan setelah sel mencapai konfluen 70% yaitu setelah 48jam. Medium tumbuh sel yang telah dipapar dengan sinar UV dibuang dan diganti dengan medium yang telah ditambahkan ekstrak biji juwet dengan konsentrasi 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; dan kontrol. Pencucian *coverslip glass* dilakukan pada akhir perlakuan menggunakan PBS dan kemudian sel difiksasi menggunakan larutan methanol:aseton (1:1) dingin. Sel yang telah terfiksasi dipermeabilisasi menggunakan PBS-Tween 0.2% selama 10 menit dan dilakukan *blocking* menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) selama 20 menit. Deteksi dilakukan dengan menambahkan antibody primer rabbit anti γ -H2AX *primary antibody* (*cell signaling*). Visualisasi menggunakan antibody sekunder *goat anti rabbit alexa conjugated secondary antibody* (santa cruz). Nukleus diwarnai menggunakan flourokrom Hoecsht (*life technologies*). Sel diamati menggunakan mikroskop epiflourescence Carl Zeiss (Wadhwa, dkk., 2013).



Gambar 6. Peta perlakuan pada kultur sel TIG-3 untuk persiapan pengecekan pelepasan γ -H2AX setelah paparan UV 30mJ/cm² dan pemberian ekstrak biji juwet.