

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, lemari pendingin (Toshiba), *Laminar Air Flow* (Gelman Sciences), seperangkat alat VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*), corong *Buchner*, timbangan analitik (OHAUS 214), *cabinet drayer*, *rotary evaporator* (HeidolphL4000), desikator, lemari asam, mikropipet (Socorex dan VWRbranc), vortex (Thermolyne Sybron), mikroskop *inverted* (Carlzeiss), hemasitometer (Neubauer), incubator CO<sub>2</sub> (HERAcell), *ELISA reader* (Benchmark), tangi nitrogen cair (Cryolab 35), alat sonikator (Branson 2510), oven (Mettler), dan lampu UV<sub>254</sub> dan UV<sub>366</sub> (Camag)

#### **3.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia Rumput Gong dari penelitian sebelumnya (Nurmasari, 2017), *n*-heksan teknis, etil asetat teknis, etil asetat p.a (Merck), diklorometana p.a (Merck), *n*-heksan p.a (Merck), methanol p.a (Merck), aquadest, silika gel 60 GF<sub>254</sub>, plat silika gel GF<sub>254</sub>, pereaksi semprot *Liebermann Burchard*, sel kanker payudara (sel T47D) dan sel normal (Sel Vero) dari stok Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, media komplit RPMI (Merck), *96-well microplates* (Iwaki), media kultur M!((, FBS (*Fetal Bovine Serum*), penisilin dan streptomisin 1%, *fungizone* 5%, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) *stopper*, tripsin 0,025%, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, Merck), reagen MTT 0,5%, *blue tip*, *yellow tip*.

#### **3.3. Cara Penelitian**

##### **3.3.1. Pengajuan *Ethical Clearance***

*Ethical clearance* diajukan kepada komisi bioetika untuk memenuhi persyaratan penelitian sesuai standar etika penelitian menggunakan subjek uji yang digunakan.

### 3.3.2. Penyiapan Sampel Tanaman

Tanaman Rumput Gong yang digunakan dalam bentuk simplisia kering yang diperoleh dari Parittiga, Jebus, Provinsi Bangka Belitung yang telah dideterminasi (Nurmasari, 2017).

### 3.3.3. Ekstraksi Rumput Gong

Pada penelitian ini simplisia Rumput Gong yang digunakan sebanyak 200 gram kemudian disari terlebih dahulu menggunakan *n*-heksan dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:10. Penyarian kandungan menggunakan maserasi dengan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* selama 30 menit pada suhu 40°C. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipisahkan dari ampasnya menggunakan kertas saring dan bantuan vakum. Ampas sisa penyaringan dimaserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan tujuan mendapatkan senyawa-senyawa yang memiliki sifat semi-polar dengan perbandingan simplisia dan pelarut (1 : 10) menggunakan *Ultrasound-Assisted Extraction* (20 KHz) pada suhu 40°C selama 30 menit. Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali dalam proses ekstraksi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan bantuan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian diuapkan di *water bath* hingga memperoleh ekstrak kering dan pelarut menguap dengan sempurna dan ekstrak kering disimpan dalam desikator agar stabilitas ekstrak terjaga dan tidak lembab. Ekstrak yang sudah kering ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \quad (3.1)$$

### 3.3.4. Fraksinasi Rumput Gong

Ekstrak etil asetat dari Rumput Gong difraksinasi menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) dengan fase diam berupa *silica gel* serta perbandingan fase gerak yang telah dimodifikasi (Fan *et al.*, 2016). Sebanyak 0,35 gram ekstrak etil asetat Rumput Gong dicampurkan dengan fase diam silika gel menggunakan teknik impreknasi. Hasil dari impreknasi dikemas dalam tabung VLC bersama dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak diklorometana

dengan volume 100 ml untuk menarik senyawa steroid dari ekstrak Rumput Gong. Fraksi diklorometana yang telah diperoleh kemudian dikeringkan di dalam lemari asam. Fraksi diklorometana yang sudah kering kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya dengan rumus :

$$\text{Rendemen Fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\% \quad (3.2)$$

### 3.3.5. Identifikasi Golongan senyawa steroid dari Fraksi Diklorometana Ekstrak Etil Asetat Rumput Gong

Fraksi dari ekstrak etil asetat yang diperoleh dielusi menggunakan plat KLT dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dengan fase gerak berupa campuran *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan volume 8:2. Kemudian dilakukan identifikasi kualitatif senyawa steroid menggunakan pereaksi semprot LB (*Liebermann Burchard*) yang akan memberikan hasil positif warna biru atau hijau (*Wagner et al.*, 1983). Kemudian dilakukan pengukuran  $R_f$  pada plat KLT.

### 3.3.6. Pemisahan Golongan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif

Plat KLT preparatif yang dibuat dengan ukuran panjang 20 cm, lebar 20 cm dan ketebalan silika 0,5 mm. Fraksi diklorometana ditotolkan memanjang berbentuk pita pada batas bawah plat dan diangin-anginkan beberapa saat hingga kering. Plat dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen yang telah jenuh dengan campuran eluen *n*-heksan : etil asetat (8:2) kemudian plat dibiarkan terelusi hingga mencapai batas atas plat, setelah itu dikeluarkan dan dikeringkan di udara terbuka. Pengamatan pita yang terbentuk dilakukan dibawah sinar UV<sub>366</sub> nm. Kemudian dikoleksi pita yang positif mengandung golongan senyawa steroid berdasarkan hasil identifikasi fraksi dan identifikasi pita yang mengandung golongan senyawa steroid dengan cara dikerok. Silika yang sudah dikoleksi kemudian dicuci menggunakan pelarut diklorometana p.a untuk memperoleh senyawa dari hasil isolasi. Isolat kemudian ditimbang dan disimpan di dalam vial.

### 3.3.7. Pemiakan Sel T47D dan Sel Vero

Sel T47D dan sel Vero dikeluarkan dari tangki nitrogen dan dicairkan pada suhu 37°C (suhu tubuh). Sel T47D dalam media RPMI 10 mL disimpan didalam konikel steril, kemudian dihomogenkan dan disentrifugasi menggunakan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang untuk mendapatkan pellet. Media komplit sebanyak 10 mL ditambahkan untuk mensuspensikan pellet. Media berisi pellet kemudian disentrifugasi lagi selama 5 menit, lalu supernatan dibuang, pellet ditambahkan pada 1 mL media penumbuh dengan FBS 10%, diresuspensikan secara perlahan hingga homogen. Media berisi pellet dipindahkan ke dalam cawan petri, lalu disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C. Setiap 2-3 hari, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen 80% dan jumlahnya cukup.

### 3.3.8. Pemanenan Sel

Pemanenan sel dimulai dengan mengambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub> dan diamati kondisi sel. Kultur sel hanya dapat dilakukan apabila sel berada dalam 80% konfluen untuk dipanen. Konfluen yaitu meratanya sel sebagai monolayer sampai menutupi *tissue disk*.

Pemanenan sel dilakukan dengan cara membuang media yang mengandung komponen faktor pertumbuhan *Fetal Bovine Serum* (FBS). Sel dicuci sebanyak 2 kali menggunakan PBS dengan volume setengah dari volume awal. Setelah itu, sel ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dengan tujuan untuk melepaskan sel yang menempel pada matriks. Kemudian, sel diinkubasi pada inkubator selama 3 menit dan dilanjutkan dengan penambahan ±5 ml medium komplit DMEM untuk mengaktifkan tripsin dan diresuspensi sel menggunakan mikropipet agar sel tidak saling melekat satu sama lain. Sel diamati keadaannya menggunakan mikroskop *inverted*. Sel yang telah diamati dipindahkan dalam konikal steril yang masih baru dan dilakukan perhitungan jumlah sel dengan bantuan hemasitometer. Jumlah sel dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik} \times 10^4 \text{ sel/ml}}{4} \quad (3.3)$$

Jumlah sel yang telah diketahui kemudian dibuat dalam konsentrasi 10.000 sel/*well*.

### 3.3.9. Pembuatan Seri Pengenceran Sampel

Seri pengenceran sampel dibuat dengan konsentrasi 7,8125 $\mu$ g/ml, 15,625 $\mu$ g/ml, 31,25 $\mu$ g/ml, 62,5 $\mu$ g/ml, dan 125 $\mu$ g/ml. Proses pengenceran sampel dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat. Pengenceran tersebut menggunakan DMSO sebagai pelarut. Metode ini dilakukan dengan membuat larutan stok 5000 $\mu$ g/ml. Stok dibuat dengan melarutkan 1 mg sampel ke dalam 200  $\mu$ l DMSO, kemudian divorteks atau disonikasi hingga sampel larut sempurna. Apabila sampel dapat terlarut dengan sempurna dalam DMSO, dilanjutkan pembuatan seri kadar pengenceran dengan konsentrasi 7,8125 $\mu$ g/ml, 15,625 $\mu$ g/ml, 31,25 $\mu$ g/ml, 62,5 $\mu$ g/ml, dan 125 $\mu$ g/ml menggunakan 2 rangkaian seri konsentrasi, dengan 1 rangkaian seri konsentrasi menggunakan media RPMI dan 1 rangkaian seri konsentrasi dengan media M199.

1. Sampel Konsentrasi 125  $\mu$ g/ml

Sebanyak 25  $\mu$ l larutan stok sampel diambil dan dimasukkan ke dalam *Eppendorf*. Selanjutnya ditambahkan 975  $\mu$ l masing-masing media (M199 untuk sel Vero dan RPMI untuk sel T47D) kemudian dihomogenkan.

2. Sampel Konsentrasi 62,5  $\mu$ g/ml

Sebanyak 500  $\mu$ l larutan seri konsentrasi 125  $\mu$ g/ml diambil dan dimasukkan ke dalam *Eppendorf*. Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l masing-masing media (M199 untuk sel Vero dan RPMI untuk sel T47D) kemudian dihomogenkan.

3. Sampel Konsentrasi 31,25  $\mu$ g/ml

Sebanyak 500  $\mu$ l larutan seri konsentrasi 62,5  $\mu$ g/ml diambil dan dimasukkan ke dalam *Eppendorf*. Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l masing-masing media (M199 untuk sel Vero dan RPMI untuk sel T47D) kemudian dihomogenkan.

4. Sampel Konsentrasi 15,625  $\mu$ g/ml

Sebanyak 500  $\mu$ l larutan seri konsentrasi 31,25  $\mu$ g/ml diambil dan dimasukkan ke dalam *Eppendorf*. Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l masing-

masing media (M199 untuk sel Vero dan RPMI untuk sel T47D) kemudian dihomogenkan.

5. Sampel Konsentrasi 7,8125 µg/ml

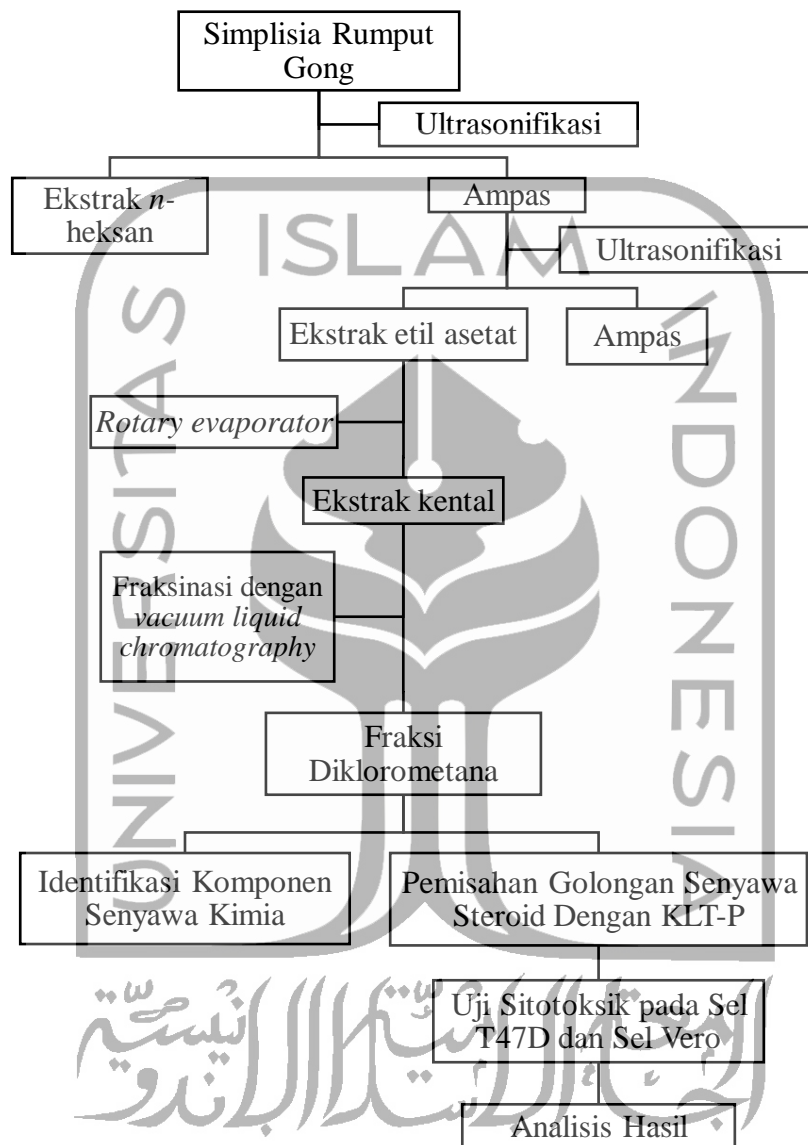
Sebanyak 500 µl larutan seri konsentrasi 15,625 µg/ml diambil dan dimasukkan ke dalam *Eppendorf*. Selanjutnya ditambahkan 500 µl masing-masing media (M199 untuk sel Vero dan RPMI untuk sel T47D) kemudian dihomogenkan.

### 3.3.10. Uji Sitotoksik pada Sel T47D dan Sel Vero

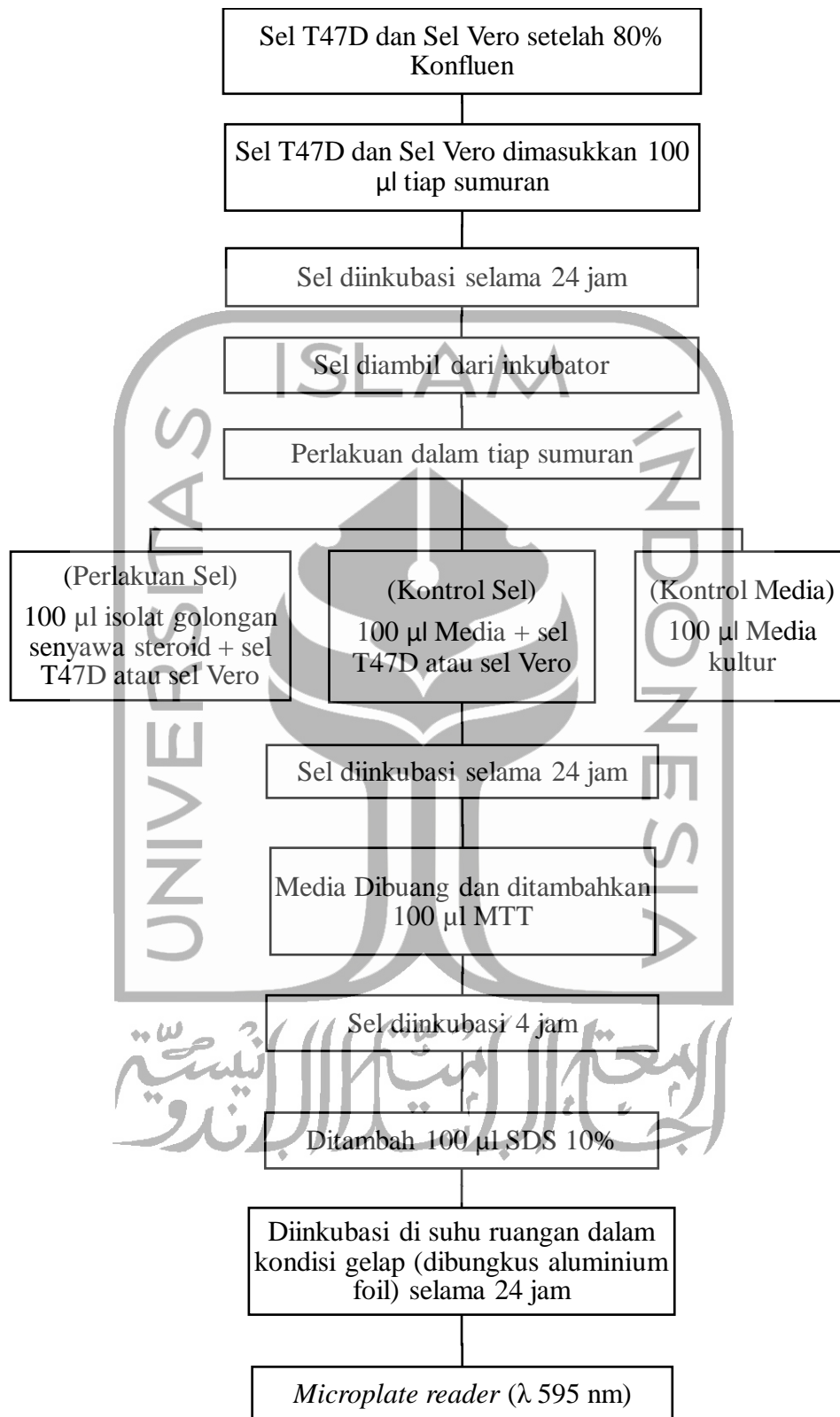
Uji sitotoksik pada sel T47D dan sel Vero dilakukan menggunakan metode MTT *assay*. Sebanyak 100 µl sel dengan kepadatan 10.000 sel/ml diambil, kemudian sel diletakkan ke dalam *microplate 96-well*, kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C selama 4 jam dengan tujuan untuk menormalkan kondisi sel. Setelah diinkubasi media dibuang. Sampel yang sudah diencerkan menggunakan pelarut DMSO sebanyak 100 µl dengan konsentrasi 7,8125µg/ml, 15,625µg/ml, 31,25µg/ml, 62,5µg/ml, dan 125µg/ml ditambahkan ke dalam *microplate* lalu diinkubasi di inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, media dibuang dan ditambahkan sebanyak 100 µl MTT 0,5% pada *microplate*, kemudian diinkubasi kembali selama 2-4 jam menggunakan inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C, kemudian ditambahkan 100 µl SDS *stopper* (SDS 10% dalam 0,01 N HCl) dan *microplate* diinkubasi pada suhu ruang selama ± 24 jam dalam kondisi gelap. Setelah proses inkubasi selesai, kemudian dilakukan analisis menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Proses pengujian menggunakan metode MTT *Assay* dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



### 3.4. Skema Penelitian



Gambar 3.1. Skema Penelitian Khusus



**Gambar 3.2.** Skema MTT Assay



### 3.5. Analisis Hasil

#### 3.5.1. Analisis Kualitatif

Pada penelitian ini analisis kualitatif yang dilakukan adalah mengidentifikasi golongan senyawa steroid menggunakan reagen semprot LB (*Liebermann Burchard*). Penggunaan reagen semprot LB (*Liebermann Burchard*) untuk memvisualisasi bercak dari golongan senyawa steroid yang kemudian digunakan untuk menghitung nilai  $R_f$  golongan senyawa steroid pada plat KLT yang dilanjutkan menggunakan plat KLT preparatif.

#### 3.5.2. Analisis Kuantitatif

Nilai absorbansi yang didapatkan dari percobaan diolah untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  dengan cara menghitung persamaan regresi linier antara jumlah sel hidup dalam persen dengan konsentrasi ekstrak yang dipaparkan pada sel yang diperoleh dari nilai absorbansi sampel pada *microplate reader*.  $IC_{50}$  menyatakan konsentrasi sampel yang digunakan untuk membunuh 50% sel. Nilai persen sel hidup dapat dihitung dengan persamaan :

$$\text{Persen Sel hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs. Sampel} - \bar{x} \text{ Abs. Kontrol Media}}{\bar{x} \text{ Abs. Kontrol Sel} - \bar{x} \text{ Abs. Kontrol Media}} \times 100\% \quad (3.4)$$

Perhitungan aktivitas sitotoksik yang dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) dapat diperoleh langsung menggunakan persamaan regresi linier. Nilai  $IC_{50}$  akan menunjukkan seberapa besar potensi sitotoksik senyawa steroid dari fraksi diklorometana Rumpu Gong (*Eriocaulon cinereum* R. Br.). Perbandingan nilai  $IC_{50}$  sel normal dengan  $IC_{50}$  sel hidup dapat digunakan untuk memperoleh nilai Indeks Selektivitas (SI). Perhitungan nilai Indeks Selektivitas (SI) dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Indeks Selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel normal}}{IC_{50} \text{ sel kanker}} \quad (3.5)$$