

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian tentang Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.) terhadap Pertumbuhan Sel Hepar *Baby hamster* yang Dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen ini merupakan penelitian yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 2000 $\mu\text{g/mL}$, 4000 $\mu\text{g/mL}$
2. Variabel terikat : konfluen, viabilitas, dan sitotoksisitas sel hepar *baby hamster*.
3. Variabel kendali : sel hepar fetus hamster yang berumur 2 hari yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian tentang ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) terhadap Pertumbuhan Kultur Primer sel hepar *baby hamster* yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dalam kultur secara *in vitro* ini dilakukan pada bulan Juni-

Juli 2012 di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), refrigator, inkubator CO₂ 5%, timbangan analitik, sentrifus, tabung sentrifus 10 ml, botol tutup ulir (scot), spuit, gunting, pinset, pipet pasteur, mikropipet 20-200 µl dan 100-1000 µl (Biored), blue tips dan yellow tips, cawan petri, Multiwell 24, tabung tube 1 ml, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass, filter single use 0.2 µm (Sartorius mini start), scalpel, parafilm, masker, hand glove, penutup kepala, kertas label, tissue, aluminium foil, mikroskop inverted, hemocytometer, hand counter, bunsen, korek dan karet.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sel hepar *baby hamster* yang berumur 2 hari, media *Dulbeccos Modified Eagles Medium with High Glucose* (DMEM, Gibco, Burlington, ON 12800-017), Phosphat Buffer Saline (PBS, Gibco 21600-051), tripsin (Gibco, 15090), tripsin EDTA 2.5% (Gibco, 15050-065), Foetal Bovine Serum (FBS, Sigma 12003c), penicillin (Meiji Indonesia), streptomycin (Meiji Indonesia), fungizone (Gibco, 15290-08), 1 % DMSO, 7.12-dimetilbenz(α)antrasen (Sigma T-2271), DI steril, NaHCO₃, *trypan blue*, hepes, alkohol 70%, Hepes, DI, tipol.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Preparasi Alat

Sterilisasi dalam penelitian ini dimulai dengan cara direndam alat-alat dengan tipol selama 1 x 24 jam, kemudian digosok dan dibilas sebanyak 21 kali pada air yang mengalir, pada bilasan terakhir dibilas dengan Aquades. Dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C, kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disterilisasi.

Sterilisasi terdiri dari sterilisasi kering dan basah. Sterilisasi kering dilakukan pada alat-alat yang berbahan kaca dan di oven dengan suhu 125°C selama 3 jam. Sterilisasi basah dilakukan untuk alat berbahan plastik dan di autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1.5 atm selama 15 menit dan dikeringkan di oven dengan suhu 50°C. Dimasukkan ke dalam LAF kemudian di UV selama 2 jam sebelum digunakan.

3.5.2 Preparasi Bahan

3.5.2.1 Media DMEM

Pembuatan stok media DMEM untuk 100 ml yaitu ditimbang DMEM 1.35 g, NaHCO₃ 0.37 g, hepes 0.238 g, penisilin 0.006 g, streptomycin 0.01 g, fungizone 100 µl, dan dilarutkan dalam DI steril 100 ml. Semua bahan-bahan di dihomogenkan dan disaring dengan filter *single use* 0.2 µm didalam Laminar Air Flow (LAF).

3.5.2.2 Antibiotik

Pengenceran Fungizon yaitu diambil 5 ml dilarutkan pada 10 ml DI steril. Hepes ditimbang 0.24 g dan diencerkan dengan 100 ml DI steril. Pembuatan stok Penicilin dan Streptomycin yaitu ditimbang Penicilin dan Streptomycin masing-masing 1 g dan di encerkan pada 2 ml DI. Untuk pemakaiannya yaitu 100 µl diencerkan pada 100 µl medium. Konsentrasi akhir Penicilin 100 µg/ml dan Streptomycin 100 µg/ml.

3.5.2.3 Media Kultur, Media Pemeliharaan dan Media Pencuci

Media kultur yang digunakan untuk kultur sel hepar *baby hamster* adalah media stock DMEM dengan 10% FBS dan fungizon. Media pemeliharaan yang digunakan untuk kultur sel hepar hamster adalah media stock DMEM non serum dan fungizone. Media pencuci yang digunakan adalah PBS dan fungizon, media DMEM non serum dan fungizon.

3.6 Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.)

Pegagan segar (*Centella asiatica* L.) dikeringkan anginkan dalam suhu 30⁰C. Hasil dari pengeringan daun pegagan (*Centella asiatica* L.) diblender untuk mendapatkan serbuk. Kemudian ditimbang 200 g serbuk digunakan untuk persiapan ekstrak air dengan perbandingan 1:20 dimasukkan ke dalam 1L *Water Steril*. Serbuk pegagan dimaserasi sambil diaduk-aduk selama 24 jam. Larutan disaring dengan kertas saring dan kemudian dievaporator untuk mendapatkan hasil ekstrak, lalu disimpan pada suhu -80⁰C hingga digunakan.

3.7 Isolasi Sel Hepar *Baby hamster*

Baby hamster didislokasi, dibedah, diambil organ hepar kemudian dicuci dua kali dengan 2 mL NaCl dan dicuci tiga kali dengan 2 ml PBS, 20 μ L Fungizon dan 20 μ L penicilin streptomycin dalam kondisi steril. Organ dipindahkan dan dicacah dengan 1 mL tripsin 0.25% hingga menjadi bagian-bagian kecil dan fragmen dipipeting melalui spuit 20 G. Kemudian dimasukkan tabung sentrifus dan diinkubasi selama 20 menit. Disaring suspensi sel dengan nilon mesh dan ditambahkan 1 mL PBS lalu disentrifus pada 1300 rpm selama 10 menit. Kemudian dibuang supernatan, pellet ditambahkan 3 mL DMEM 0% ke dalam suspensi sel dan disentrifugasi pada 1300 rpm selama 5 menit sebanyak dua kali. Kemudian dibuang supernatan, pellet ditambahkan 3 mL DMEM 10% dan disentrifugasi pada 1300 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan, disisakan pellet 1mL dan dipipeting, kemudian diambil 100 μ l pellet dan ditanam dalam medium DMEM dengan suplementasi 10% FBS dan penicillin streptomycin. Kemudian sel sebanyak $1.04 \times 10^5 \text{ sel/mL}$ dikultur pada suhu 37°C , 5% CO_2 .

3.8 Pembagian Kelompok Sampel

- a. Kelompok K(-) (kontrol negatif): sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS
- b. Kelompok K(+) (kontrol positif): sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$
- c. Kelompok P2 : sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam,

- kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi 24 jam
- d. Kelompok P3 : sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam, kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi 48 jam
- e. Kelompok P4 : sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen selama dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 48 jam, kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi 24 jam
- f. Kelompok P5 : sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam, kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi 24 jam
- g. Kelompok P6 : sel sel hepar *baby hamster* dalam DMEM 10% FBS yang dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam, kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi 4000 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi 24 jam.

3.9 Pemaparan 7.12-dimetilbenz (α) antrasen dan Pemberian Konsentrasi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L)

Sel hepar *baby hamster* dikultur, kemudian dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen dengan konsentrasi 0.1 $\mu\text{g/mL}$ selama 48 jam kemudian diberi perlakuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi yang

berbeda, dan inkubasi selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) yang digunakan ada lima yaitu 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, dan 4000 µg/mL.

3.10 Perlakuan Pemaparan 7.12-dimetilbenz (α) antrasen dan Pemberian Konsentrasi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.)

Sel hepar *baby hamster* dikultur dalam medium DMEM suplemen 10% FBS hingga konfluen. Hasil kultur dipapar dengan 7.12-dimetilbenz(α)antrasen konsentrasi 0.1 µg/mL selama 48 jam. Setelah itu, masing-masing sel kultur di cuci dua kali dengan 1 ml PBS, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin. Kemudian dicuci dua kali dengan 1 ml media DMEM non serum, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin. Diganti baru dengan DMEM 10% FBS dan penicillin streptomycin serta diberi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan konsentrasi yang berbeda.

3.11 Pengamatan Konfluen Kultur primer Sel Hepar

Kultur sel hepar dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen selama 48 jam. Setelah sel konfluen \pm 50% menutupi permukaan well. Kemudian dicuci, medianya diganti dengan DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan konsentrasi yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam.

Pada akhir inkubasi sel diamati di bawah mikroskop inverted. Kriteria untuk pengamatan konfluen sel adalah 100% apabila sel sudah menutupi semua wadah well, 75% apabila sel menutupi tiga per empat well, 50% apabila sel menutupi setengah well, 25% apabila sel menutupi satu per empat well dan 0% apabila sel belum menutupi well.

3.12 Pengukuran Viabilitas Kultur Primer Sel Hepar dengan Pewarnaan *Trypan Blue*

Kultur sel hepar dipapar 7.12-dimetilbenz(α)antrasen selama 48 jam. Setelah sel konfluen $\pm 50\%$ menutupi well. Kemudian dicuci, medianya diganti dengan DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dengan konsentrasi yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, masing-masing medium kultur sel hepar dibuang dan dicuci tiga kali dengan 1 mL PBS, kemudian ditambahkan tripsin EDTA 0.25% dan diinkubasi 30 menit untuk mempermudah lepasnya sel hepar yang menempel didasar well dengan cara memotong protein membran yang berfungsi untuk melekatkan sel dengan well. Pengujian sitotoksitas ini dilakukan berdasarkan parameter kerusakan membran yang dilakukan menggunakan *trypan blue*.

Jumlah sel dihitung menggunakan hemositometer dengan mencampurkan 10 μ l suspensi sel dan 10 μ l *trypan blue*. Perhitungan sel dilakukan pada lima bilik hitung yang masing-masing terdiri dari 16 kotak dan diambil rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (volumenya 10^4 ml). Jumlah sel dihitung dengan rumus (Freshney, 2010):

$$(n/5) \times P \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

n : Jumlah sel dalam 5 bilik

4: Jumlah bilik hemositometer yng dihitung

10^4 : Kapasitas hemositometer

P: faktor pengencer

Untuk menghitung jumlah sel yang hidup (tidak menyerap warna) maupun mati (menyerap warna biru), diambil 10 μ l suspensi sel dan direaksikan dengan *trypan blue* sebanyak 10 μ l (konsentrasi stok 0.4%) selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi dan diambil 10 μ l untuk dihitung jumlah selnya. Persentase kematian sel dengan metode secara langsung (*viable cell count*) dilakukan menggunakan rumus yang dipakai oleh Doyle dan Griffith (Djajanegara, 2010), yaitu:

$$\% \text{viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel hidup} + \text{mati}} \times 100\%$$

$$\% \text{kematian} = 100\% - \% \text{viabilitas}$$

3.13 Pengujian Sitotoksisitas Kultur Primer Sel Hepar dengan Analisis probit

Persentase kematian yang diperoleh dari pengukuran viabilitas kultur primer sel *baby hamster*, masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit. Selanjutnya, dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antara perlakuan dan kematian sel. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier dengan komputersasi BioStat Plus, hasilnya kemudian disubsitusi dan diantilogaritma untuk mendapatkan nilai LC50 .

3.11 Analisa Data

Data konfluen dan viabilitas kultur primer *baby hamster* dianalisis dengan uji ANAVA tunggal dengan taraf signifikan 1% ($\alpha=0.01$). Jika ada

perbedaan yang signifikan maka dilakukan uji lanjut berdasarkan nilai koefisien keragaman (KK).

Nilai KK menunjukkan derajat kejituan (*accuracy* atau *precision*) serta keandalan kesimpulan suatu percobaan yang merupakan deviasi baku per unit percobaan dan dapat menggambarkan seberapa besar keragaman data yang telah diperoleh dari hasil pengukuran. Semakin kecil nilai KK, menunjukkan data untuk perlakuan yang sama relatif seragam dan validasi kesimpulan semakin tinggi (Suhaemi, 2011; Murdiyanto, 2005).

Ketentuan nilai koefisien keragaman (KK) diantaranya yaitu jika nilai KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen atau 20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Jika nilai KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen atau 10-20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji BNT (Beda Nyata terkecil). Jika nilai KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen atau 10% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji BNJ (Beda Nyata Jujur) (Hanafiah, 2010).

Analisis data sitotoksitas menggunakan program BioStat 2009 Professional dengan nilai kepercayaan 95%. Untuk perhitungan LC50, persentase kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit. Metode regresi linier digunakan untuk melihat kurva hubungan antara unit dan log dosis.