

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian yang berjudul pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap kultur primer sel hepar *baby* hamster yang diberi DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antrasena) secara *in vitro* merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan, karena merupakan percobaan yang mempunyai keseragaman medium. Perlakuan yang digunakan adalah sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA kemudian diberi ekstrak daun *Annona muricata* Linn dengan konsentrasi berbeda (10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 160 ppm) dalam medium kultur dan dua perlakuan kontrol (positif dan negatif).

3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi yang berbeda (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 160 µg/mL).
2. Variabel terikat : konfluen, viabilitas, sitotoksitas sel *baby* hamster.
3. Variabel kendali : sel hepar *baby* hamster yang berumur 2 hari yang dipapar 7,12 dimetil benz (α) atrasen (DMBA) 0,1 µg/mL.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (*annona muricata l*) terhadap kultur primer sel hepar *baby* hamster yang diinduksi DMBA (7,12-*adimetilbenz(a)antrasena*) secara in vitro ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 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), inkubator CO₂ 5%, timbangan analitik, sentrifus, mortar, mikroskop fluoresen, tabung sentrifus 10 ml, botol tutup ulir (scot), spuit, gunting, pinset, pipet pasteur, mikropipet 20-200 µl dan 100-1000 µl (Biorad), *blue tips* dan *yellow tips*, cawan petri, *multiwell* (isi 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, ekstrak etanol daun sirsak, 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), 0.2% DMSO, DI steril, NaHCO_3 , *tripan blue*, hepes, alkohol 70%, DI, tipol, aquades.

3.5 Preparasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam kultur jaringan hewan harus disterilkan, hal tersebut dilakukan agar alat-alat tersebut terhindar dari kontaminan dan menjauhkan kontaminasi. Langkah awal dalam sterilisasi alat adalah merendam 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.

Langkah selanjutnya, peralatan yang terbuat dari bahan kaca di oven selama 3 jam dengan suhu 125°C (metode sterilisasi panas kering) sedangkan peralatan yang terbuat dari plastik harus diautoklaf dengan suhu 121°C , tekanan 1.5 atm selama 15 menit dan dikeringkan di oven dengan suhu 50°C . Dimasukkan kedalam LAF kemudian di UV selama 2 jam sebelum digunakan.

3.6 Preparasi Bahan

3.6.1 Media DMEM

Pembuatan stok media DMEM untuk 100 ml yaitu ditimbang DMEM 1.35 g, NaHCO_3 0.37 g, hepes 0.238g, penicilin 0.06 g, streptomycin 0.01g,

fungizone 100µl, dan dilarutkan dalam DI steril 100ml. Semua bahan-bahan dihomogenkan dan disaring dengan filter *single use* 0.2 µm di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

3.6.2 Antibiotik

Pengenceran Fungizon yaitu di ambil 5ml dilarutkan pada 10ml DI steril. Pembuatan stok Ditimbang Penicilin dan Streptomycin masing-masing 1g dan diencerkan pada 2ml DI. Untuk pemakaiannya yaitu 100µl diencerkan pada 100mL medium. Konsentrasi akhir Penicilin 100 µg/mL dan Streptomycin 100 µg/mL.

3.6.3 Media Kultur, Media Maintenance dan Media Washing

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

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak ini dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Daun yang diambil adalah daun ke tiga dan ke empat dari pucuk. Selanjutnya, daun *Annona muricata* Linn dicuci bersih, dikeringkan dengan suhu ruang dan dibuat serbuk simplisia kering. Selanjutnya

diambil 200 gr serbuk simplisia ke dalam botol bermulut lebar, kemudian ditambah etanol 70% sebanyak 1 liter. Setelah 3 hari perendaman dengan pengadukan berkala, campuran disaring dan ampas yang diperoleh dilakukan perendaman berkali-kali hingga filtratnya tidak berwarna. Perendaman selama 3 hari bertujuan agar senyawa yang dimaserasi dapat terangkat sempurna oleh pelarut. Maserat yang diperoleh lalu dipartisi, kemudian sisanya dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C (Ira, 2009).

3.6.5 Isolasi Sel Hepar Baby Hamster

Baby hamster yang digunakan adalah hamster yang berumur 2 hari, *baby* hamster didislokasi, dibedah dan diambil organ hepar, kemudian dicuci dengan 2 ml PBS, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin 3 kali. Organ dipindah dan dicacah pada 500 µl tripsin sampai halus, dihomogenasi dengan spuit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Sisa homogenasi ditambah 500µl PBS (1:1), kemudian diinkubasi selama 20 menit.

Tabung sentrifus diambil dari inkubator dan disentrifus 1500 rpm selama 10 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet ditambah dengan 3 ml DMEM non serum, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan dengan 3 ml DMEM 10% FBS dan 3 tetes fungizon kemudian disentrifus kembali. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 1 ml kemudian dipipeting. Hasil pelet diambil 100µl kemudian

dimasukkan ke dalam *multiwell* yang telah berisi DMEM 10% FBS dan fungizon. Diinkubasi dan setelah 3 hari dipapar dengan dimetilbenz (α) antrasen 6 mM, 3 hari kemudian diberi perlakuan ekstrak etanol daun sirsak.

3.7 Pelaksanaan

3.7.1 Pembagian Kelompok Sampel

1. Kelompok K (+) : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0,1 μ g/mL.
2. Kelompok K (-) : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS.
3. Kelompok P1 : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0.1 μ g/mL. + ekstrak etanol daun sirsak 10 μ g/mL.
4. Kelompok P2 : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0.1 μ g/mL. + ekstrak etanol daun sirsak 20 μ g/mL.
5. Kelompok P3 : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0.1 μ g/mL. + ekstrak etanol daun sirsak 40 μ g/mL.
6. Kelompok P4 : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0.1 μ g/mL. + ekstrak etanol daun sirsak 80 μ g/mL.
7. Kelompok P5 : sel hepar *baby* hamster + DMEM + 10% FBS + 7,12 Dimetylbenz (α) antrasen 0.1 μ g/mL. + ekstrak etanol daun sirsak 160 μ g/mL.

3.7.2 Pemberian Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang berbeda yaitu konsentrasi I 10 μ g/mL, konsentrasi II 20 μ g/mL, konsentrasi III 40

$\mu\text{g/mL}$, konsentrasi IV 80 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi V 160 $\mu\text{g/mL}$. Pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi berbeda tersebut didasarkan atas penelitian Rachmani (2012), bahwa pemberian ekstrak daun sirsak terhadap kultur sel line 74TD selama 24 jam menunjukkan LC_{50} 17,149 $\mu\text{g/mL}$.

3.8 Perlakuan

3.8.1 Perlakuan Pemberian Ekstrak Daun Sirsak

Kultur sel hepar *baby* hamster yang diberi 7,12 *dimetilbenz (α) antrasen* (DMBA) 0,1 $\mu\text{g/mL}$. ditanam selama 48 jam, kemudian diamati konfluenitas dan morfologi sel. Selanjutnya diberi perlakuan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi yang berbeda. P1 diberi ekstrak daun sirsak 10 $\mu\text{g/mL}$, P2 sebanyak 20 $\mu\text{g/mL}$, P3 sebanyak 40 $\mu\text{g/mL}$, P4 sebanyak 80 $\mu\text{g/mL}$ dan P5 sebanyak 160 $\mu\text{g/mL}$. Pemberian ekstrak daun sirsak ini dilaksanakan selama 24 jam. Kemudian diamati tingkat konfluen sel, apoptosis sel hepar *baby* hamster dengan menggunakan pewarna *tripan blue* serta sitotoksitas sel hasil kultur pada jam ke-72 kemudian dihitung nilai LC_{50} menggunakan analisis probit.

3.8.2 Pengamatan Konfluen Sel Hepar *Baby* Hamster

Pengamatan konfluenitas sel hepar *baby* hamster dilaksanakan pada jam ke-48 sebelum pemberian ekstrak daun sirsak serta jam ke-72 setelah pemberian ekstrak daun sirsak selama 24 jam. Pengamatan pada jam ke-48 bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian DMBA terhadap kultur primer sel hepar *baby* hamster, sedangkan pengamatan jam ke-72 bertujuan untuk mengetahui pengaruh

ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap konfluen sel hepar baby hamster setelah pemberian DMBA 0,1µg/mL selama 48 jam.

3.8.3 Perhitungan Sitotoksitas Sel Hepar Baby Hamster

Uji sitotoksitas sel hepar baby Hamster bertujuan untuk mengetahui nilai ketoksikan ekstrak daun *Annona muricata* L. terhadap sel hepar yang diinduksi DMBA. Uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung (*viable cell count*) dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang hidup (berwarna bening) maupun yang mati (berwarna biru), diambil 50 µl dan direaksikan dengan *tripan blue* 50 µl selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi diambil 10µl untuk dihitung jumlah selnya. Persentase kematian sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Doyle dan Griffith, 2000) :

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

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

Angka persen kematian yang diperoleh dari masing masing konsentrasi dirubah ke dalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Selanjutnya dibuat persamaan regresi linear untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan kematian sel. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian disubstitusi dan dianti logaritma untuk mendapat nilai LC₅₀ (Ira, 2009).

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian tentang konfluenitas dan viabilitas sel diuji menggunakan Anova satu jalur. Jika terdapat pengaruh ($F_{\text{hitung}} \geq F_{\text{tabel } 5\%}$) maka dilanjutkan dengan uji BNT 5 % dan uji BNJ 5%. Uji lanjut ditentukan setelah mengetahui nilai Koefisien Keragaman (KK). KK merupakan koefisien yang menunjukkan derajat ketelitian hasil yang diperoleh dari suatu percobaan. Nilai KK semakin kecil, maka menunjukkan derajat ketelitian semakin tinggi dan validitas kesimpulan yang diperoleh dari percobaan tersebut juga tinggi (Hanafiah, 2010)

Penggunaan uji lanjut pada parameter penelitian ini berdasarkan atas nilai KK dengan kriteria sebagai berikut (Hanafiah, 2010):

1. Jika KK besar, (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah uji Duncan, karena uji ini dapat dikatakan yang paling teliti.
2. Jika KK sedang, (antara 5-10% pada kondisi homogen atau antara 10-20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah uji BNT (Beda Nyata Terkecil) karena uji ini juga dapat dikatakan berketelitian sedang.
3. Jika KK kecil, (maksimal 5% pada kondisi homogen atau maksimal 10% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah BNJ (Beda Nyata Jujur) karena uji ini tergolong kurang teliti.

Data hasil pengamatan sitotoksitas dianalisis menggunakan probit untuk mengetahui LC_{50} sehingga dapat diketahui nilai sitotoksitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata Linn*) terhadap kultur sel hepar *baby hamster* yang diinduksi

DMBA (*12-Dimetilbenz(α)antrasena*). Radji, dkk (2010), menyatakan data yang diolah dengan menggunakan analisis Probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} dari masing-masing ekstrak. Nilai LC_{50} menunjukkan persentase kematian sel pada hasil kultur sebanyak 50%.

