

BAB V Prosedur Penelitian

V.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Buah ranti hitam (*Solanum nigrum* L.) diperoleh dari perkebunan warga di daerah Ciwidey Bandung, dan determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung. Starter Kombucha diperoleh dari Wikikombucha. Sel kanker payudara MDA-MB 231 berasal dari laboratorium Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran, Bandung, Jawa Barat.

V.2 Pembuatan Simplisia

Buah ranti hitam dilakukan sortasi basah kemudian dicuci sampai bersih kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C dengan kadar air yang terkandung dalam simplisia tidak boleh lebih dari 10 %. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan buah ranti hitam dari pengotor dan bagian tumbuhan yang tidak diperlukan. Buah ranti hitam yang sudah kering kemudian di haluskan menggunakan blender, sebelum dihaluskan terlebih dahulu dilakukan sortasi kering. (Depkes RI, 2000). Selanjutnya dilakukan penetapan kadar air. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk simplisia kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 2 jam, didinginkan dan ditimbang sampai mencapai bobot tetap (Sopian, Nashrianto and Iryani, 2013).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

V.3 Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Buah Ranti Hitam

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 70% dan remaserai selama 2 hari. Selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Fraksinasi dilakukan dengan memasukkan sebanyak 10 gram ekstrak kental yang dilarutkan dalam 100 mL etanol 70% kedalam corong pisah kemudian untuk menarik senyawa non polar ditambahkan n-heksan (1:1). Dilakukan pemisahan dua lapisan yang berbeda kepolaran yaitu lapisan etanol dan n-heksan. Lapisan etanol ditambahkan etil asetat (1:1) untuk memisahkan senyawa polar dan semi polar. Hasil fraksi berbeda kepolaran ini diuapkan sampai pekat (Aryantini, Sari and Juleha, 2017).

V.4 Analisis Senyawa Alkaloid

V.4.1 Metode Gravimetri

Analisis senyawa alkaloid dengan metode gravimetri dilakukan dengan menimbang masing-masing sebanyak 5 gram fraksi n-heksan buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi kemudian di maserasi selama 4 jam menggunakan 10% HCL dalam etanol 70%. Setelah 4 jam campuran di saring dan diambil filtratnya. Filtrat diuapkan sampai satu per empat bagian dari volume semula. Ditambahkan amonium hidroksida pekat tetes demi tetes sampai terbentuk endapan. Endapan disaring menggunakan kertas saring yang sudah ditimbang sebelumnya dan dibilas menggunakan amonium hidroksida 1%. Endapan dikeringkan menggunakan oven selama 30 menit pada suhu 60°C kemudian ditimbang.

Perhitungan persentase kadar alkaloid :

$$\% \text{ Alkaloid} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

Keterangan W = Berat sampel

W_1 = Berat kertas saring

W_2 = Berat endapan + kertas saring

(Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017)

V.4.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tahap pertama dari analisis senyawa alkaloid menggunakan KLT adalah penjuanan, chamber diisi dengan eluen (fase gerak) yaitu etil asetat : metanol (10:1). Kertas saring dimasukkan ke dalam chamber sampai seluruh permukaan kertas saring basah. Selanjutnya dilakukan penotolan sampel yaitu dengan melarutkan masing-masing hasil endapan alkaloid total yang diperoleh dari metode gravimetri menggunakan metanol sampai larut dan homogen. Kemudian ditotolkan pada plat silika gel (Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017)

Setelah penotolan dilakukan pengembangan dengan memasukkan plat ke dalam chamber dan dibiarkan proses pengembangan berlangsung sampai fase gerak mencapai batas garis atas dari plat kemudian plat diangkat dan dikeringkan. Tahap selanjutnya dilakukan identifikasi alkaloid menggunakan sinar tampak, sinar UV 254 nm, 365 nm dan disemprot menggunakan reagen dragendorft (Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017).

V.5 Pembuatan Starter Kombucha

Alat dan bahan yang digunakan di cuci dan disterilkan terlebih dahulu. Sebanyak 3000 ml air dididihkan dengan penambahan sukrosa sebanyak 10% (b/v) diaduk hingga larut. Teh hijau ditambahkan sebanyak 5% (b/v). Penambahan starter kombucha sebanyak 10% (b/v) dan 3% *microbial cellulose* ke dalam larutan teh dilakukan setelah teh disaring dan dibiarkan dingin pada suhu ruangan. Kemudian wadah ditutup menggunakan kain dan dilakukan fermentasi selama 14 hari pada suhu ruangan (25° C) dan terhindar dari sinar matahari (Nurikasari, 2017; Zubaidah *et al.*, 2018).

V 6. Peremajaan Starter Kombucha Menggunakan Sari Buah Ranti Hitam

Peremajaan kombucha dilakukan dengan sebanyak 300 gram buah ranti hitam yang di ambil sari buahnya. Dimasukkan 200 gram sari buah ranti hitam, sukrosa 20% (b/v), starter kombucha 20 % (v/v), satu lembar SCOBY kombucha dan ditambahkan akuades sampai 200 ml kedalam wadah steril. Wadah ditutup menggunakan kain, diikat menggunakan tali dan dilakukan fermentasi selama 14 hari pada suhu ruangan (25°C) terhindar dari sinar matahari. (Ziska, Muhsinin and Zamzam, 2017). Hasil fermentasi digunakan sebagai starter dalam fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam.

V. 7 Proses Fermentasi Menggunakan Fraksi n-heksan Buah Ranti Hitam (*Solanum nigrum* L)

Sterilisasi wadah yang akan digunakan untuk proses fermentasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Dilarutkan fraksi n-heksan buah ranti hitam menggunakan akuades 300 mL

dengan konsentrasi 1,5 % (b/v) dan dimasukkan kedalam wadah. Kemudian ditambahkan sukrosa 30 % (b/v) dan starter kombucha sebanyak 15%. Wadah ditutup menggunakan kain dan dilakukan fermentasi selama 14 hari pada suhu ruangan (Napitupulu, Setyohadi and Lubis, 2017; Ziska, Muhsinin and Zamzam, 2017; Zubaidah *et al.*, 2018).

Pemisahan hasil fermentasi dilakukan setelah 14 hari ditandai dengan terciumnya aroma khas kombucha. *Microbial cellulose* dipisahkan dari larutan hasil fermentasi, diambil bagian larutannya kemudian larutan dikeringkan dengan cara *freeze-dry* menggunakan alat *freeze dryer*, dan dilakukan uji stotoksik.

V. 8 Analisis Fenol Total

Metode yang digunakan untuk analisis total fenol adalah metode Folin-Ciocalteu. Reagen Folin-Ciocalteu dibuat dengan mencampurkan 1,5 mL folin-Ciocalteu dalam 15 mL akuades (1: 10). Sebanyak 5 mL folin-Ciocalteu ditambahkan kedalam 0,5 ml sampel kemudian diinkubasi selama 5 menit, ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1 M dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Uji dilakukan triplo, sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 756 nm (Ghasemi, Ghasemi and Ebrahimzadeh, 2009; Bhattacharya, Gachhui and Sil, 2013).

V.9 Analisis Total Asam Titrasi

Sebanyak 10 ml sampel dilarutkan menjadi 250 ml dalam labu takar dan diambil 50 ml kemudian ditambahkan 2-3 tetes indikator fenolfalein. Larutan dititrasi menggunakan NaOH 0,1 M sampai

terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Total asam tertitrasi (TAT) dinyatakan dalam persen asam asetat sebagai berikut (Galih and Karina, 2015) :

$$\text{TAT (\% asam laktat)} = \frac{V \times m \times P \times BM}{B} \times 100\%$$

Keterangan : TAT : Total Asam Tertitrasi

V : Jumlah larutan NaOH (mL)

N : Normalitas NaOH

P : Jumlah pengenceran

BM : Berat molekul asam asetat (60,05)

B : Berat sampel (mg)

V.10 Evaluasi pH

Evaluasi pH dilakukan dengan pH meter dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4 dan pH 7, dibersihkan dengan akuades kemudian dilakukan pengukuran pH sampel, Sebanyak 30 ml sampel dimasukkan kedalam beaker glass 50 ml kemudian diukur pH nya menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi, setiap kali mengukur pH sampel lainnya pH meter dibersihkan terlebih dahulu (Galih and Karina, 2015). Nilai pH hasil fermentasi kombucha yang biasa dikonsumsi berkisar 2,5 – 3,5 (Bunga and Paskah, 2-15).

V.11 Kurva Pertumbuhan Kombucha

Pengukuran OD (*Optical Density*) dilakukan menggunakan metode langsung dengan spektrofotometer berdasarkan turbiditas yang diukur setiap hari selama 14 hari. Pengukuran dilakukan dengan cara 1 mL sampel diencerkan sampai 10 kali menggunakan akuades (1:9) kemudian diamati nilai OD menggunakan spektrofotometer pada

panjang gelombang 441 nm (Yuliana, 2008).

V.12 Pengaktifan dan Pemeliharaan Sel Kanker MDA-MB 231

Pembuatan media

FBS 10% dan penisilin – streptomisin 1% yang disimpan dalam *conical tube* sebagai aliquot di dalam *freezer* pada suhu 20°C dicairkan. Kemudian 10 mL FBS dan 1 mL penisilin- streptomisin dimasukkan kedalam botol duran dan ditambahkan 100 mL media RPMI kedalam botol duran (CCRC, 2009b).

Penanaman dan penumuhan sel

Suspensi sel MDA-MB 231 dikeluarkan dari dalam tangki nitrogen cair (*freezer* -80°C) kemudian diencerkan dalam *cyro tube*. Dimasukkan 3 mL aliquot RMPI kedalam *conical tube* dan ditambahkan 1000 µL suspensi sel MDA-MB 231 tetes per tetes. Campuran suspensi dan aliquot di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1500 *rpm* kemudian dibuang supernatant RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), ditambahkan RPMI baru sebanyak 4 mL (CCRC, 2009a).

Selanjutnya suspensi dihomogenkan. Sebanyak 2 mL suspensi sel MDA-MB 231 dituangkan kedalam 2 *dish* dan ditambahkan 5 mL RPMI, homogenkan kemudian diamati kondisi sel MDA-MB 231 menggunakan mikroskop dan pastikan sel MDA-MB231 homogen secara keseluruhan pada permukaan *dish*. Sel disimpan kedalam incubator 5% CO₂ pada suhu 37°C. (CCRC, 2009a).

Panen sel

Diambil sel dari incubator CO₂ dan diamati kondisi sel, panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Media dibuang menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steril, sel dicuci menggunakan PBS (volume PBS adalah ½ dari volume diawal). Media tripsin-EDTA ditambahkan secara merata dan diinkubasi dalam incubator selama 3 menit, ditambahkan media 5 mL untuk mengaktifkan tripsin. Keadaan sel diamati menggunakan mikroskop, jika masih ada sel yang menggerombol maka dilakukan resuspensi. Sel yang sudah lepas di transfer ke dalam *conical tube* steril baru (CCRC, 2012)

Perhitungan sel

Setelah dilakukan panen sel selanjutnya dilakukan resuspensi sel di *conical tube* dengan mengambil 10 µL panen sel dan dipipet ke hemisitometer. Jumlah sel dihitung menggunakan mikroskop (inverted atau cahaya) dengan *counter*. Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung dengan setiap kamar terdiri dari 16 kotak (CCRC, 2009c).

Sel dihitung pada 4 kamar hemositometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung.

Dihitung jumlah sel per mL menggunakan rumus :

Jumlah sel terhitung/mL :

$$\frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Dihitung jumlah total sel yang diperlukan. Misalnya untuk menanam sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang

diperlukan adalah $5 \times 10^3 / \text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran}$ (dibuat lebih) = 5×10^5 .

Perhitungan volume panen sel menggunakan rumus :

Volume panen sel yang di transfer (mL) :

$$\frac{\text{jumlah total sel diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}}$$

Diambil volume panen sel transfer ke *conical tube* baru kemudian tambahkan MK sampai total volume yang diperlukan. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel = $100 \mu\text{L} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$ (CCRC, 2009c).

Perlakuan sampel pada sel

Sampel fraksi sebanyak 40 mg dilarutkan (fraksi n- heksan buah ranti hitam dan hasil fermentasi kombucha buah ranti hitam) dengan akuades:DMSO (1:1) sampai 1 mL kemudian di vortex sampai homogen. Dibuat seri konsentrasi sampel yaitu 15 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$, digunakan kontrol positif yaitu doxorubicin yang dilarutkan dengan seri konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan kontrol negatif digunakan media komplit dan sel MDA-MB 231 dan untuk blanko digunakan medium komplit.

V.13 Uji Sitotoksik Metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazo 1-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Plate dari inkubator CO_2 diambil dan dibawa ke LAF. Media sel dibuang dengan membalikkan plate 180° diatas tempat buangan

dengan jarak 10 cm, plate ditekan secara perlahan daitas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Sebanyak 100 μ PBS dimasukkan kedalam semua sumuran yang terisi sel kemudian PBS dibuang dan dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo). Inkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 48 jam pada suhu 37°C (CCRC, 2009d).

Menjelang akhir waktu inkubasi didokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan. Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara mengambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5mg/mL), diencerkan menggunakan MK sampai 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). Stok MTT dibuat dengan menimbang 50 mg serbuk MTT kemudian dilarutkan dalam PBS sampai 10 mL disimpan dalam *freezer* tertutup alumunium foil (CCRC, 2009d).

Media sel dibuang kemudian dicuci dengan PBS dan tambahkan reagen MTT 100 μ L ke dalam setiap sumuran, inkubasi selama 2-4 jam di dalam incubator CO₂ pada suhu 37°C . Kondisi sel diperiksa menggunakan mikroskop inverted, jika formazan telah jelas terbentuk ditambahkan stopper 100 μ L SDS 10% dalam 0,01 N HCL. Dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. (CCRC, 2009d).

V. 14. Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengamatan diperoleh berupa data absorbansi yang selanjutnya dilakukan perhitungan persentase sel hidup dan analisis harga IC₅₀. Langkah-langkah perhitungan IC₅₀ adalah sebagai berikut: (CCRC, 2009d). Pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode MTT diperoleh

absorbansi dari ELISA *reader* perhitungam % inhibisi (% Kematian sel) dengan rumus :

$$\frac{(Abs\ kontrol - Abs\ blanko) - (Abs\ sampel - Abs\ blanko)}{(Abs\ kontrol - Abs\ blanko)} \times 100\%$$

Setelah didapatkan nilai persentase inhibisi, dibuat grafik konsentrasi terhadap persentase inhibisi, kemudian dicari persamaan regresi linier dan dilihat parameter *r*. Jika nilai *r* lebih dari *r* tabel maka persamaan regresi linier memnuhi standar untuk mencari IC₅₀. Pada persamaan regresi linier dimasukkan *y*= 50 dan dicari *x* nya ataaau konsentrasi sehingga diperoleh nilai IC₅₀ sampel fraksi buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi kombucha (CCRC, 2009d). *Inhibitory Concentration* (IC₅₀) merupakan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% serta dapat menunjukkan potensi suatu metabolisme senyawa aktif sebagai sitotoksik. (Wahyuni *et al.*, 2011).

No	Nilai IC50 (µg/mL)	Tingkat Toksisitas
1	< 100	Sitotoksik potensial
2	100-1000	Sitotoksik moderat (sedang)
3	≥ 1000	Tidak Toksik

Tabel II.1. Kategori dalam senyawa sitotoksik

(Soliha, Widiyantoro and Destiarti, 2017).