

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Jenis penelitian ini memberikan kebebasan kepada peneliti untuk memberikan perlakuan terhadap objek penelitian dengan adanya kontrol dengan tujuan menguji pengaruh suatu variabel terhadap variabel lain (Nazir, 2003).

3.2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang mana terdapat kontrol dengan faktor lingkungan yang serupa serta beberapa perlakuan yang disusun secara acak untuk setiap percobaan (Nazir, 2003). Populasi dalam penelitian ini adalah kultur sel-sel kanker payudara (MCF-7) yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun Kelor serta daun Ciplukan dan formulasi ekstrak etanol daun Kelor dengan perbandingan (1:1). Adapun jumlah sampel uji yang digunakan berdasarkan dari perhitungan rumus Federer (1977) yaitu:

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(12 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(11) \geq 15$$

$$11n \geq 26$$

$$n \geq 2.3$$

$$n \approx 2$$

Keterangan:

n= Besar Pengulangan

t= Jumlah Kelompok Perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut diketahui bahwa perlu dilakukan pengulangan minimal sebanyak 2 kali. Pada penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah hanya *well plate* yang berisi sel dan medium sel. Kelompok

perlakuan dan kontrol ditanam dalam 12 dan 96 *well plate* dengan peta kelompok perlakuan dan kontrol sebagai berikut:

Tabel 3.1. Peta 96 *well plate* untuk Penanaman Sel Kelompok Perlakuan dan Kontrol

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	M	MS	KP	B	Kdc1	Kdc2	Kdc3	Kdc4	Kdc5	Kdc6	P1	P2
2	M	MS	KP	B	Kdc1	Kdc2	Kdc3	Kdc4	Kdc5	Kdc6	P1	P2
3	M	MS	KP	B	Kdk1	Kdk2	Kdk3	Kdk4	Kdk5	Kdk6	P1	P2
4	M	MS	KP	B	Kdk1	Kdk2	Kdk3	Kdk4	Kdk5	Kdk6	P1	P2
5												
6												
7												
8												

Keterangan:

Kdc1: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 500 $\mu\text{g/mL}$

Kdc2: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 750 $\mu\text{g/mL}$

Kdc3: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 1000 $\mu\text{g/mL}$

Kdc4: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 1250 $\mu\text{g/mL}$

Kdc5: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 1500 $\mu\text{g/mL}$

Kdc6: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Ciplukan 2000 $\mu\text{g/mL}$

Kdk1: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 500 $\mu\text{g/mL}$

Kdk2: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 750 $\mu\text{g/mL}$

Kdk3: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 1000 $\mu\text{g/mL}$

Kdk4: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 1250 $\mu\text{g/mL}$

Kdk5: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 1500 $\mu\text{g/mL}$

Kdk6: Pemberian Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Kelor 2000 $\mu\text{g/mL}$

P1: Pemberian Perlakuan Formulasi Ekstrak Daun Ciplukan dan Daun Kelor 1:1 (500:500 $\mu\text{g/mL}$)

P2: Pemberian Perlakuan Formulasi Ekstrak Daun Ciplukan dan Daun Kelor 1:1 (625:625 $\mu\text{g/mL}$)

- M: Media
MS: Media + Sel
KP: Kontrol Positif (Menggunakan Cisplatin)
KN: Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan, DMSO 10%)
B: Hanya berisikan medium saja

3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian pada pengukuran kandungan senyawa metabolit adalah ekstrak etanol daun Ciplukan dan ekstrak etanol daun Kelor. Sampel penelitian aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun Ciplukan, ekstrak etanol daun Kelor dan formulasi keduanya dengan rasio 1:1. Sampel pengujian viabilitas sel pada penelitian ini ini adalah Sel Kanker Payudara (*MCF-7 cell lines*) yang didapat dari American Type Culture Collection (ATCC).

3.4. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-Agustus 2023. Pembuatan ekstrak daun muda Kelor dan daun muda Ciplukan dilaksanakan di PT. Fathonah Amanah Shidiq Tabligh (PT. FAST), Depok. Pengukuran kandungan senyawa metabolit sekunder dengan *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy* (GC-MS), kultur sel dan pengujian viabilitas dilaksanakan di Laboratorium Sentral UNPAD Jatinangor.

3.5. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Sentral UNPAD Jatinangor. Daftar alat dan bahan utama yang digunakan dapat dilihat pada berikut. dan alat dan bahan keseluruhan terdapat pada Lampiran 1.

3.6. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dalam penelitian terdiri dari tahapan-tahapan sebagai berikut:

3.6.1. Koleksi Daun Ciplukan dan Daun Kelor

Kelor dan daun Ciplukan muda didapatkan dari Kebun Percobaan Manoko Balitro, Lembang. Keduanya dipisahkan dari organ batang, buah dan bunganya

sehingga hanya menyisakan daun saja, kemudian dicuci dan dikeringkan dengan cara dijemur selama 7 hari.

3.6.2. Ekstraksi Daun dan Preparasi Sampel

Ekstraksi daun Kelor dan daun Ciplukan ini merujuk kepada penelitian Insanie (2018), Fatmawati *et al* (2021) dan Wang *et al* (2021) dengan rincian sebagai berikut:

Daun yang didapatkan dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan pada suhu ruangan sampai dipastikan benar-benar kering. Setelah itu diambil berat sampel sebanyak 100 gr direndam dalam pelarut etanol 70% 500mL dengan bertujuan menyaring senyawa-senyawa polar sehingga didapatkan kondisi non polar dari dalam sel (Saifudin *et al.*, 2011). Setelahnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dan diambil fitratnya.

Perendaman dan pengambilan filtrat dilakukan secara berulang sampai filtrat yang dihasilkan berubah warnanya menjadi agak pudar. Metode yang dilakukan ini bernama metode maserasi. Hasil filtrat yang dihasilkan disimpan dalam wadah botol untuk kemudian di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* sampai berubah bentuk menjadi pasta. Setelah itu pasta yang didapatkan dibuat dalam bentuk powder dengan *freeze drying*. Sampel yang telah disiapkan dilarutkan dalam DMSO 10% dan diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, yakni 500, 750, 1000, 1500, dan 2000 $\mu\text{g/mL}$

3.6.3. Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)

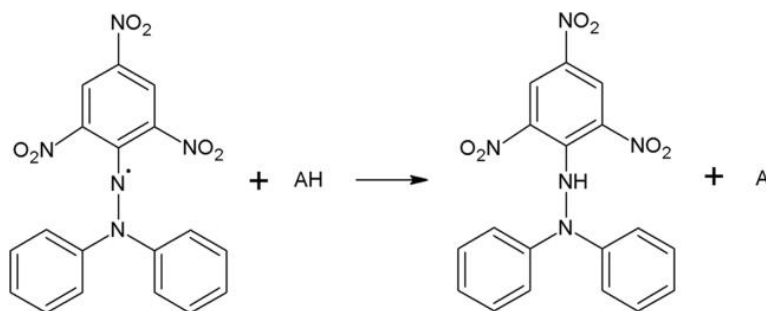
Analisis GC-MS dilakukan setelah hasil ekstraksi dari daun Kelor dan daun Ciplukan didapatkan. GC-MS merupakan teknik kromatografi gas yang digunakan bersama dengan spektrometri massa. Penggunaan Kromatografi gas dilakukan untuk mencari senyawa yang mudah menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah jika dipanaskan. Sedangkan spektrometri massa untuk menentukan bobot molekul, rumus molekul, dan menghasilkan molekul bermuatan (Darmapatni *et al.*, 2016). Kromatografi gas mampu membaca senyawa dengan konsentrasi terendah sehingga metabolit sekunder dalam tanaman dapat teridentifikasi dengan hasil berupa kromatogram dan spektrum massa (Al-Rubaye *et al.*, 2017).

Pada penelitian ini analisis GC-MS dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak daun Kelor dan daun Ciplukan. Waktu diatur selama 60 menit dengan suhu injektor 260°C, detektor 250°C, dan kolom 325°C. Gas pembawa yang digunakan yaitu gas helium sebagai pembawa laju aliran konstan 1 ml/menit. Proses identifikasi menggunakan alat GC-MS menghasilkan beberapa senyawa-senyawa bioaktif dapat dilihat dari puncak (*peak*) kromatogram sebagai identifikasi data hasil kromatografi dan spektrometri massa (MS) dilihat dari spektrum massa dengan masing-masing berat molekul senyawa bioaktif (Hotmian *et al.*, 2021). Data hasil GC-MS ini diidentifikasi dengan cara melihat kemiripannya (*similarity index*) dengan data yang ada di pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dan *Pubchem National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Hasil kromatogram dan spektrum massa dari proses GC-MS diidentifikasi menggunakan perangkat lunak MassHunter. Hasil pengolahan data disajikan dengan menggunakan tabel.

3.6.4. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Metode ini digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan menggunakan senyawa 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) sebagai radikal bebas yang akan diikat oleh senyawa antioksidan dari sampel dan mengubahnya menjadi DPPH-H sehingga dapat ditentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀) dengan pengukuran menggunakan Spektrofotometri IV-VIS pada panjang gelombang 517 nm (Marinova dan Batchvarov, 2011).



Gambar 3.1 Struktur DPPH dan DPPH-H (Hidayat *et al*, 2017)

Adapun rincian prosedur dari pengujian antioksidan dengan metode DPPH berdasarkan Molyneux, 2004 serta Marinova dan Batchvarov, 2011 adalah sebagai berikut:

- a. Pembuatan DPPH 160 ppm dengan alur sebagai berikut:
 - 1) Menyiapkan 25 mg DPPH dalam vial coklat dan tambahkan 25 ml methanol p.a
 - 2) Masukkan 800 μ l methanol p.a ke dalam tabung reaksi coklat dengan menggunakan pipet dan tambahkan 200 μ l larutan DPPH
 - 3) Lakukan inkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit
 - 4) Mengukur larutan DPPH menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm
 - 5) Lakukan absorbansi DPPH harus berkisar pada angka 0,8-0,9
- b. Pembuatan larutan stok sampel 10.000 ppm dengan alur sebagai berikut:
 - 1) Menyiapkan sampel sebanyak 0,1 gr dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml
 - 2) Lalu tambahkan methanol sampai tanda batas pada labu ukur 10 ml
 - 3) Selanjutnya homogenkan dengan menggunakan sonicator
 - 4) Setelah itu sentrifugasi sampel pada kecepatan 10.000rpm selama 10 menit dan ambil filtrat dan sampel siap diujikan
- c. Pengujian Sampel dengan prosedur sebagai berikut:
 - 1) Larutan stok sampel 10.000 ppm diencerkan menjadi 1000 ppm dan 100 ppm dengan menambahkan methanol dan DPPH (konsentrasi dibuat dalam 1ml)

Tabel 3.2. Pengujian Sampel DPPH

Tabung Reaksi	Konsentrasi (ppm)	Larutan uji (μ l)		
		Larutan stock (10.000ppm)	Metanol	DPPH
A	0	0	800	200

B	1000	100	700	200
C	100	10	790	200

- 2) Selanjutnya lakukan inkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit
- 3) Setelah itu lakukan pengukuran larutan DPPH menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm
- 4) Menghitung %Inhibisi pada setiap variasi konsentrasi dan buat diagram aktivitas antioksidan untuk menentukan nilai IC₅₀ menggunakan rumus

$$\%Penghambatan (\%IC) = \frac{Absorbansi kontrol - Absorbansi Sampel}{Absorbansi Sampel} \times 100$$

3.6.5. Kultur Sel Kanker Payudara (*MCF-7 Cell lines*)

Berikut adalah langkah-langkah dari kultur dan treatment sel berdasarkan Dulbecco dan Freeman (1959), Gibco (tanpa tahun), dan Priyandoko *et al* (2022):

a. Preparasi Medium

Larutan RPMI dicairkan dengan cara direndam dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama ± 30 menit. Setelah itu larutan dibawa ke dalam *Bio Safety Cabinet* dan ditambahkan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan antibiotic 5%. Selanjutnya dihomogenkan kemudian ditutup rapat dan simpan dalam suhu 4°C.

b. Preparasi Sel

Berdasarkan Nugraheni (2019) penanaman sel dilakukan dengan cara mengambil sel yang inaktif dalam cryotube diambil dari kulkas -80°C, dicairkan dengan cara direndam dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama ± 10 menit. Setelah itu sel di centrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 5 menit dan dibawa ke *Bio Safety Cabinet*. Selanjutnya medium dibuang dan diganti dengan medium yang baru. Setelah itu, sel dapat di tanam pada *well plate*.

c. Penenman Sel ke dalam 96 Well Plate

Menentukan jumlah dan viabilitas sel dengan trypan blue exclusion), dan resuspend sel dengan kepadatan sel akhir 170.000 sel/ml atau 17.000 sel/well dalam media. Dengan cara menyiapkan 10 μ L trypan blue dalam microtube steril, kemudian menambahkan 10 μ L suspensi sel ke dalam larutan trypan blue lalu membersihkan hemacytometer dan tutup slip menggunakan etanol 70% setelah itu dikeringkan. Dengan menggunakan pipet, perlahan-lahan dimasukkan 10 μ L larutan seltrypan blue ke salah satu sisi bilik/chamber dan menghitung jumlah sel yang sehat dan tentukan jumlah sel (viabel) per mL. Setelah itu Seeding/kultur sel kedalam 96 wellplate, kemudian diinkubasi selama 24 jam (atau sampai sel konfluen min. 50%) pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂.

3.6.6. Pemberian Perlakuan

Disiapkan delapan buah microtube 1,5 mL, lalu masing-masing microtube diberi label konsentrasi pengenceran yang sesuai, kemudian stock sampel diencerkan menjadi delapan varian konsentrasi menggunakan pelarut media. Dikeluarkan 96 well plate yang telah berisi sel dari inkubator. Diberi label pada plate sepanjang margin kiri untuk baris mana yang akan diberi perlakuan oleh standar dan baris mana yang akan diberi sampel. Lalu dibuang media dari setiap well. Dengan menggunakan mikropipet dipindahkan 100 μ L masing-masing sampel dan kontrol positif dari microtube ke dalam masing-masing well yang sesuai pada 96 well plate yang telah berisi sel. Kemudian di inkubasi kembali selama 48 jam.

3.6.7. Uji Viabilitas Sel

Presto blue adalah salah satu metode pengujian viabilitas sel yang umum digunakan dengan berbasis resazurin. Resazurin memiliki warna biru dan hampir tidak berflouresensi, namun pada sel hidup, senyawa ini dapat terseduksi oleh lingkungan seluler sehingga menjadi resorufin yang berwarna merah dan sangat berflouresens. Hal ini dapat dimanfaatkan sebagai indikator viabilitas sel yang mana semakin banyak resorufin yang terbentuk, maka viabilitas sel dapat semakin mudah terukur dengan menggunakan alat pembaca absorbansi atau flouresensi (Lall

et al, 2013; Life Technologies Corporation., 2012). Adapun prosedur pengujian viabilitas pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. Membuang media pada setiap *well*
- b. Menyiapkan 9ml media pada tube yang ditambahkan 1ml “PrestoBlue™ Cell Viability Reagent” (10 µl reagen untuk 90 µl media)
- c. Memasukkan larutan tersebut ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi selama 1-2 jam sampai terlihat adanya perubahan warna
- d. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 570 dan 600 nm menggunakan multimode reader.

3.6.8. Analisis Data

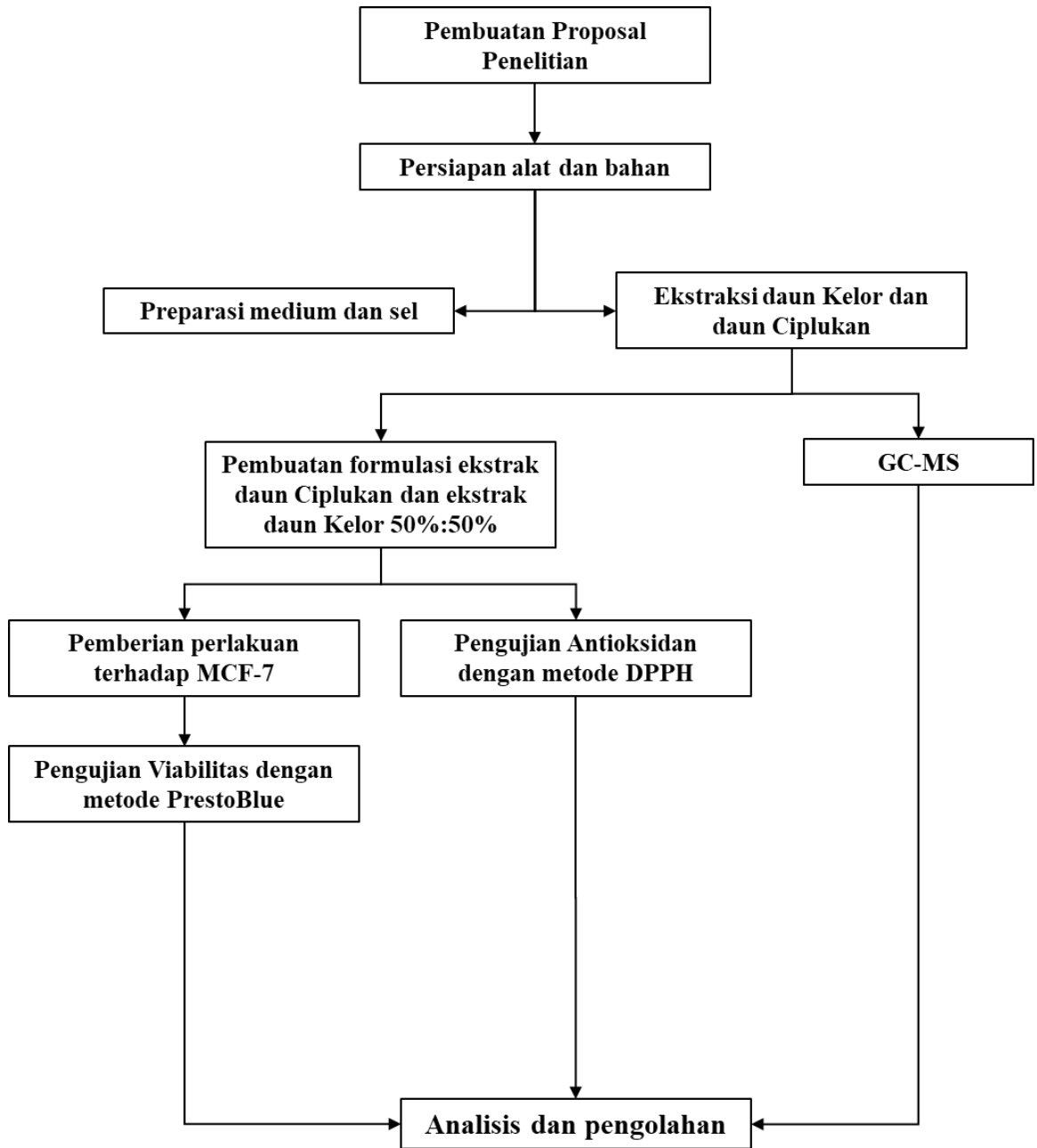
Analisis data pada penelitian ini menggunakan parameter sebagai seperti pada Tabel 3.3. berikut:

Tabel 3.3. Parameter Analisis Data

Data	Parameter
GC-MS	Luas persen area
DPPH	Nilai IC50
Uji Viabilitas	Reaksi perubahan warna yang terbaca oleh spektrofotometri dan morfologi sel

3.6.9. Alur Penelitian

Alur pada penelitian dapat di lihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Alur Penelitian