

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan dengan menguji, mengumpulkan, dan menganalisis data dari hasil riset di laboratorium. Penelitian eksperimen adalah suatu metode penelitian yang melibatkan variabel-variabel yang datanya belum diketahui sebelumnya (Jaedun, 2011). Dalam pendekatan ini, dilakukan manipulasi terhadap variabel dengan memberikan perlakuan khusus kepada sampel penelitian. Dampak dari perlakuan ini kemudian diamati dan diukur untuk menghasilkan data baru yang relevan. Penelitian ini melibatkan pemberian NKJM pada lini sel MCF-7 untuk mengamati dan mengukur sitotoksitas MCF-7, ekspresi gen *NFKB*, dan ekspresi gen *CASP3*.

3.2. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu pemberian NKJM pada sel MCF-7. Konsentrasi NKJM yang digunakan untuk uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 adalah 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/mL. Konsentrasi tersebut merujuk pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Nemati & Janitermi (2015), Poobalan *et al.* (2018), dan Marzanti *et al.* (2023). Namun, untuk analisis ekspresi gen *NFKB* dan *CASP3*, konsentrasi NKJM yang digunakan adalah 125; 250; 500 µg/mL.

3.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

3.3.1. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Februari 2024.

3.3.2. Lokasi Penelitian

Pengujian sitotoksitas dan kuantifikasi ekspresi gen *NFKB* dan *CASP3* terhadap sel MCF-7 yang diberi perlakuan NKJM dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama, *Biomolecular and Biomedical Research Center*, Bandung, Jawa Barat, Indonesia.

3.4. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari sel MCF-7 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dan dipelihara oleh PT Aretha Medika Utama, *Biomolecular and Biomedical Research Center*, Bandung, Indonesia. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel MCF-7 yang dikultur dan diberi perlakuan NKJM untuk eksperimen yang berkaitan dengan sitotoksitas serta ekspresi gen *NFKB* dan *CASP3*.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini disiapkan. Alat *consumable* dibersihkan, lalu dibalut dengan kertas dan plastik tahan panas sebelum disterilkan menggunakan autoklaf selama 20 menit (1,5 atm, 121°C). Alat utama yang digunakan adalah *biosafety cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II), *centrifuge* (DLAB, DM0412), inkubator CO₂ (Thermo IH3543), mikroskop *inverted* (Olympus, CKX41-F32FL), spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific, 51119300), *microdrop plate* (Thermo Scientific, N12391), PCR *cabinet* (Esco, 2017-122662), PCR *thermal cycler* (Clever Scientific, GTC96S), RT-qPCR (Agilent AriaMx Real-time PCR System, G8830A), dan selengkapnya disajikan pada Lampiran 1.

Bahan utama yang digunakan adalah NKJM, MCF-7 *cell lines* (ATCC #HTB22), *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) *high* (Biowest, L0103-500), *fetal bovine serum* (FBS) (Biowest, S181B-500), *antibiotic-antimycotic* (ABAM) (Biowest, L0010-100), 1% Amphotericine B (Biowest, L0009-050), *minimum essential medium* (MEM) vitamin (Biowest, X0556-100), L-Glutamine (Biowest, X0550-100), 0.2% nanomycopolitine (Biowest, L-X16-100) dan, gentamicin (Gibco, 15750060), *phosphate buffer saline* (PBS) (Biowest, X0515-100), *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10% dan 100%, *Enhanced Cell Counting Kit 8* (WST-8/CCK8) (Elabscience, E-CK-A362), kit Direct-zol™ RNA *Miniprep Plus* (Zymo Research, R2073), SensiFAST cDNA *Synthesis Kit* (Meridian Bioscience, BIO-65054), sekuens primer gen *NFKB*, *CASP3*, dan *β-Actin* (Macrogen), SensiFAST SYBR® No-ROX *Mix* (Meridian Bioscience, BIO-98005), dan selengkapnya disajikan pada Lampiran 1.

3.5.2. Kultur Sel MCF-7

Metode kultur sel MCF-7 diadaptasi dari *American Type Culture Collection* (n.d.). Kultur sel MCF-7 dilakukan di dalam *biosafety cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II). Sel MCF-7 yang terdapat pada tanki nitrogen cair (-196°C) diambil, kemudian didiamkan pada suhu ruang hingga mencair. Sel MCF-7 dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 mL (SPL, 50015) yang berisi medium basal DMEM *high glucose* (Biowest, L0103-500) sebanyak 10 mL. Sel MCF-7 disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit menggunakan *centrifuge* (DLAB, DM0412). Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan 4 ml medium kultur. Medium kultur sel MCF-7 dibuat dengan mencampurkan 15% FBS (Biowest, S181B-500), 1% ABAM (Biowest, L0010-100), 1% Amphotericine B (Biowest, L0009-050), 1% MEM vitamin (Biowest, X0556-100), L-Glutamine (Biowest, X0550-100), 1% nanomycopolitine (Biowest, L-X16-100), gentamicin (Gibco, 15750060), dan medium basal DMEM *high glucose* (Biowest, L0103-500) hingga 100% dari total volume di dalam *tube* 50 mL (Corning, 430824) (Girsang *et al.*, 2023). Suspensi sel dimasukkan pada *flask* T25 (SPL, 70025). Sel MCF-7 diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ (Thermo IH3543), bersuhu 37°C. Dengan menggunakan mikroskop inverted (Olympus, CKX41-F32FL), sel yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati hingga *confluent* sekitar 70-80%.

3.5.3. Subkultur Sel MCF-7

Metode subkultur sel MCF-7 diadaptasi dari *American Type Culture Collection* (n.d.). Sel MCF-7 yang telah tumbuh pada *flask* T25 (SPL, 70025) diamati menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus, CKX41-F32FL) hingga *confluent* sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang, kemudian dibilas dengan PBS 1x (Biowest, X0515-100). Selanjutnya, ditambahkan 2 ml Trypsin-EDTA (Biowest, L0931-100), kemudian diinkubasi selama 5 menit di inkubator 5% CO₂ (Thermo IH3543), suhu 37°C. Pengecekan sel MCF-7 dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* untuk mengonfirmasi bahwa sel MCF-7 sudah sepenuhnya terlepas dari dasar *flask*. Sel MCF-7 dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 mL (SPL, 50015), kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1600 rpm menggunakan *centrifuge* (DLAB, DM0412). Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 mL medium kultur. Suspensi sel MCF-7 dibagi ke dalam 2

buah *flask* T25. Sel MCF-7 diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂, suhu 37°C. Saat pemeliharaan sel MCF-7, setiap 2 – 3 hari sekali medium pertumbuhan harus diganti atau ditambah.

3.5.4. Persiapan Nanokristal Jahe Merah

Nanokristal jahe merah dibuat dari ekstrak rimpang jahe merah. Ekstrak rimpang jahe merah yang digunakan telah memenuhi standar Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB) (CoA No. Batch 001.07.25.ERJM.01) dari PT Fathonah Amanah Shidiq Tabligh (FAST), Depok, Jawa Barat, Indonesia, yang diekstraksi dengan etanol 70% (Lampiran 2). Proses pembuatan ekstrak rimpang jahe merah tersebut dimulai dengan menyortir rimpang jahe merah untuk memisahkan rimpang dari kotoran berupa tanah, sisa tanaman, atau kotoran lainnya. Setelah itu, rimpang jahe merah segar dicuci hingga bersih di bawah air mengalir. Setelah dicuci, rimpang jahe merah dipotong menjadi potongan kecil. Rimpang jahe merah dikeringkan dalam oven pada suhu rendah (40-50°C) hingga kadar airnya berkurang, lalu dihaluskan dengan blender atau penggiling hingga menjadi bubuk. Rimpang jahe merah diekstraksi dengan pelarut ethanol 70%, lalu dihomogenkan dan filtrasi. Setelah diekstraksi, dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan 40-50°C (Susanty & Yulendra, 2018).

Nanokristal jahe merah dibuat di PT Nanotech Herbal Indonesia, Tangerang Selatan, Banten. Produksi nanokristal dari ekstrak rimpang jahe merah dilakukan dengan metode *top-down* menggunakan *High Energy Milling Machine (HEM-Ellipse 3 Dimension)*, dengan pengaturan *on/off* (2 menit/5 menit) selama 30-60 menit. NKJM telah terkarakterisasi sebagai nanokristal melalui uji *Zeta Potential Analyzer* (HORIBA Scientific SZ-100) dan *scanning electron microscopy (SEM)* (Lampiran 3). NKJM yang digunakan berwujud serbuk. Pembuatan larutan NKJM dilakukan dengan cara membuat *stock solution* dan *working solution*. Proses ini dilakukan dalam *biosafety cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II).

3.5.4.1. Pembuatan *stock solution*

Stock solution adalah larutan sampel berkonsentrasi tinggi yang dilarutkan dalam DMSO 100% (Merck, 1029521000). *Stock solution* NKJM yang dibuat memiliki konsentrasi 40.000 µg/mL atau 40 mg/mL. Pembuatan *stock solution* tersebut dimulai dengan menimbang 40.000 µg atau 40 mg NKJM, kemudian

dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL (SPL, 62015). Ditambahkan 1 mL DMSO 100% dan dihomogenkan dengan melakukan resuspensi dan menggunakan *vortex* (Thermo Scientific, 88880017).

3.5.4.2. Pembuatan *working solution*

Working solution adalah larutan sampel yang digunakan untuk pengujian. *Working solution* dibuat dari hasil pengenceran *stock solution* dengan perbandingan 1:10. *Working solution* dibuat dalam 7 seri konsentrasi, yaitu 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Berikut merupakan tahapan pembuatan *working solution* NKJM.

1. Sediakan 7 *microtube* 1,5 mL (SPL, 62015), lalu diberi nama A–G.
2. Dimasukkan 900 μL ddH₂O pada *microtube* A.
3. Dimasukkan 500 μL DMSO 10% (Merck, 1029521000) pada *microtube* B–G.
4. Dimasukkan 100 μL *stock solution* (40000 $\mu\text{g/mL}$) pada *microtube* A lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 4000 $\mu\text{g/mL}$.
5. Diambil 500 μL larutan A dan dimasukkan pada *microtube* B, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 2000 $\mu\text{g/mL}$.
6. Diambil 500 μL larutan B dan dimasukkan pada *microtube* C, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 1000 $\mu\text{g/mL}$.
7. Diambil 500 μL larutan C dan dimasukkan pada *microtube* D, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 500 $\mu\text{g/mL}$.
8. Diambil 500 μL larutan D dan dimasukkan pada *microtube* E, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 250 $\mu\text{g/mL}$.
9. Diambil 500 μL larutan E dan dimasukkan pada *microtube* F, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 125 $\mu\text{g/mL}$.
10. Diambil 500 μL larutan F dan dimasukkan pada *microtube* G, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 62,5 $\mu\text{g/mL}$.
11. *Working solution* disaring menggunakan *syringe filter tissue culture* pori 0,22 μm (Sartorius, 17845), sehingga didapatkan *working solution* yang steril.

3.5.5. Uji Sitotoksitas

Sitotoksik pada sel MCF-7 diuji menggunakan *Enhanced Cell Counting Kit 8* (WST-8/CCK8) (Elabscience, E-CK-A362) dan digunakan sesuai dengan petunjuk dari pabriknya (Yamashita *et al.*, 2020). Prosedur uji sitotoksitas dikerjakan dalam

biosafety cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II). Sel kultur MCF-7 disentrifugasi dengan kecepatan 4000g selama 5 menit menggunakan *centrifuge* (DLAB, DM0412), kemudian buang supernatan. Resuspensi sel tersebut dengan media kultur yang segar. Sel tersebut dihitung dengan menggunakan *hemocytometer* (Neubauer). Suspensi sel MCF-7 sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam *96-well plate* (Costar, 3596) dengan kepadatan 1×10^4 sel/*well*, kemudian diinkubasi dengan inkubator 5% CO_2 (Thermo, IH3543) pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, medium kultur dibuang, kemudian ditambahkan dengan medium kultur baru sebanyak 90 μL dan *working solution* NKJM sebanyak 10 μL pada setiap *well* sesuai dengan penempatan perlakuan kontrol dan NKJM pada Tabel 3.1. Medium yang berisi sel MCF-7 yang telah diberi perlakuan NKJM diinkubasi dengan inkubator 5% CO_2 (Thermo, IH3543) pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, WST-8 *buffer* sebanyak 10 μL ditambahkan ke setiap *well*, kemudian diinkubasi dengan inkubator 5% CO_2 (Thermo, IH3543) pada suhu 37°C selama 3 jam. Nilai OD diukur dengan spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific, 51119300) pada panjang gelombang 450 nm.

Tabel 3.1. Peta perlakuan kontrol dan konsentrasi NKJM untuk uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 pada *96-well plate*

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	Blank	KDMSO	KDMSO	KDMSO	Blank				
B	NKJM1	NKJM1	NKJM1	Blank								
C	NKJM2	NKJM2	NKJM2	Blank								
D	NKJM3	NKJM3	NKJM3	Blank								
E	NKJM4	NKJM4	NKJM4	Blank								
F	NKJM5	NKJM5	NKJM5	Blank								
G	NKJM6	NKJM6	NKJM6	Blank								
H	NKJM7	NKJM7	NKJM7	Blank								

Keterangan:

KN (Kontrol Negatif): Sel MCF-7 + medium kultur normal

KDMSO (Kontrol DMSO): Sel MCF-7 + DMSO 1%

NKJM1: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 6,25 $\mu\text{g/mL}$

NKJM2: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 12,5 $\mu\text{g/mL}$

NKJM3: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 25 $\mu\text{g/mL}$

Ainun Nisa, 2024

PENGARUH NANOKRISTAL JAHE MERAH TERHADAP SITOTOKSISITAS SERTA EKSPRESI GEN NFKB DAN CASP3 PADA LINI SEL MCF-7

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

NKJM4: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 50 $\mu\text{g/mL}$

NKJM5: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 100 $\mu\text{g/mL}$

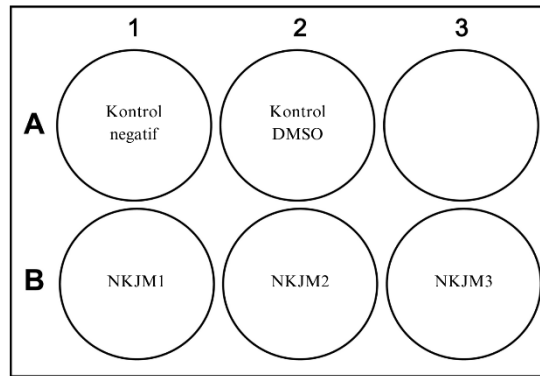
NKJM6: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 200 $\mu\text{g/mL}$

NKJM7: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 400 $\mu\text{g/mL}$

3.5.6. Analisis Ekspresi Gen *NFKB* dan *CASP3* dengan Metode RT-qPCR

3.5.6.1. *Plating* sel MCF-7 dan Pemberian Perlakuan Nanokristal Jahe Merah

Metode *plating* sel MCF-7 dan pemberian perlakuan NKJM diadaptasi dari penelitian Widowati et al. (2023). Prosedur ini dilakukan pada *biosafety cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II). Medium pertumbuhan sel MCF-7 yang telah *confluent* sekitar 80-100% dibuang, kemudian dicuci dengan PBS (Biowest, X0515-100) 1x sebanyak 2 kali. Ditambahkan 2 ml *Trypsin*-EDTA (Biowest, L0931-100), kemudian diinkubasi selama 5 menit di inkubator 5% CO_2 (Thermo IH3543), suhu 37°C . Selanjutnya, dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus, CKX41-F32FL) untuk mengonfirmasi bahwa sel sudah sepenuhnya terlepas dari dasar *flask* T25 (SPL, 70025). Sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 mL (SPL, 50015) dan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit menggunakan *centrifuge* (DLAB, DM0412). Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 mL medium kultur. Selanjutnya, resuspensi sel MCF-7 dihitung menggunakan *hemocytometer* (Neubauer). Setelah diketahui jumlah sel MCF-7 pada 1 mL resuspensi sel, sel MCF-7 ditanam sebanyak 5×10^5 pada *6-well plate* (Corning, 3516), lalu dipelihara hingga sel *confluent* 80 – 100%. Sel MCF-7 diinkubasi pada suhu 37°C menggunakan inkubator 5% CO_2 . Setelah sel MCF-7 *confluent*, dilakukan penggantian medium perlakuan 1800 μL , lalu ditambahkan *working solution* NKJM sebanyak 200 μL (Gambar 3.1). Selanjutnya, medium yang berisi sel MCF-7 yang telah diberi perlakuan NKJM diinkubasi dengan inkubator 5% CO_2 (Thermo, IH3543) pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, medium sel dibuang, sel dilepaskan dari *flask* dengan penambahan *trypsin* dan disentrifugasi. Pelet sel yang didapatkan kemudian diisolasi RNA-nya.



Gambar 3.1. Peta perlakuan kontrol dan konsentrasi NKJM untuk analisis ekspresi gen *NFKB* dan *CASP3* pada 6-well plate.

Keterangan:

Kontrol Negatif: Sel MCF-7 + medium kultur normal

Kontrol DMSO: Sel MCF-7 + DMSO 1%

NKJM1: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 125 $\mu\text{g/mL}$

NKJM2: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 250 $\mu\text{g/mL}$

NKJM3: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 500 $\mu\text{g/mL}$

3.5.6.2. Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan kit Direct-zolTM RNA Miniprep Plus (Zymo Research, R2073) dan digunakan sesuai dengan petunjuk dari pabriknya (Widowati *et al.*, 2023). Kit ini berisi *Direct-zolTM RNA PreWash*, *RNA Wash Buffer*, *DNase I*, *DNA Digestion Buffer*, *DNase/RNase-Free Water*, *Zymo-SpinTM IICG Columns*, dan *collection tubes*. Prosedur isolasi RNA dilakukan dalam PCR cabinet (Esco, 2017-122662). Pelet sel MCF-7 yang telah diberi perlakuan ditambahkan TRI reagent (R2050-1-200) sebanyak 300 μL , lalu diresuspensi. Selanjutnya, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Sel disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 1000 xg menggunakan *refrigerated centrifuge* (MPW-260R). Supernatan ditambahkan dengan etanol absolut (Merck, 1.00983.2500) sebanyak 300 μL , lalu diresuspensi. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam Zymo-SpinTM IICG Columns pada *collection tubes*, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 10.000 xg. Selanjutnya, pindahkan *column* ke *collection tubes* baru dan filtrat dibuang. Direct-zol RNA *PreWash* sebanyak 400 μL ditambahkan ke dalam Zymo-spin IICG *column*, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 10.000 xg. Filtrat pada *collection tube* dibuang

dan langkah ini diulangi dua kali. RNA *Wash Buffer* sebanyak 700 μ L ditambahkan ke dalam *column*, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 10.000 xg. *Column* dipindahkan ke *collection tube free RNase dan DNase baru*. *DNase/RNase-Free water* sebanyak 100 μ L ditambahkan untuk melarutkan RNA yang terisolasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 xg selama 3 menit. Konsentrasi RNA yang terisolasi diukur pada *microdrop plate* (Thermo Scientific, N12391) menggunakan spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific, 51119300).

3.5.6.3. Desain Primer dan Sintesis cDNA

Dalam penelitian ini, desain primer gen *NFKB*, *CASP3*, dan β -*Actin* manusia diperoleh dari Macrogen. β -*actin* digunakan sebagai *housekeeping gene*. Tabel 3.2 menyajikan sekuens primer yang digunakan untuk kuantifikasi ekspresi gen.

Tabel 3.2. Sekuens primer yang digunakan dalam RT-qPCR

Gen		Sekuens Primer	TM (°C)	Panjang (bp)	Referensi
<i>NFKB</i>	F	5'-AAGTCATGACAACATAGGCG-3'	56.31	20	NM_199267.2
	R	5'-ACACCTCAATGTCTTCTTTCTG-3'	56.29	22	
<i>CASP3</i>	F	5'-AGAAGTGGACTGTGGCATTGAG-3'	60.55	22	NM_032991.3
	R	5'-GCTTGTCGGCATACTGTTTCAG-3'	60.16	22	
β - <i>Actin</i>	F	5'-TCTGGCACCACCTTCTACAATG-3'	62.85	24	NM_001101.5
	R	5'-AGCACAGCCTGGATAGCAACG-3'	63.04	21	

Keterangan: F: *Forward primer*; R: *Reverse primer*; TM: *Melting Temperature* (°C); bp: *base pair* atau pasang basa (pb)

Sintesis cDNA dilakukan menggunakan *SensiFAST cDNA Synthesis Kit* (Meridian Bioscience, BIO-65054) digunakan sesuai dengan petunjuk dari pabriknya (Poyraz *et al.*, 2023). Kit ini berisi 5x *TransAmp buffer* dan *reverse transcriptase*. Prosedur sintesis cDNA dikerjakan dalam *PCR cabinet* (Esco, 2017-122662). Prosedur ini dimulai dengan membuat *mix reaction PCR*. *Mix* reaksi PCR terdiri dari *reverse transcriptase* (1 μ L), 5x *TransAmp buffer* (4 μ L), dan hasil isolasi RNA yang telah disamakan konsentrasinya dengan penambahan *nuclease free water* (NFW) (Thermo Scientific, R0581) (15 μ L). *Mix reaction PCR* dihomogenkan menggunakan *vortex* (Thermo Scientific, 88880017), di-*spindown* menggunakan *mini centrifuge* (OHAUS Frontier, FC5306), dan di-*run* dengan PCR

thermal cycler (Clever Scientific, GTC96S) menggunakan protokol *priming* pada suhu 25°C selama 10 menit, *reverse transcription* pada suhu 42°C selama 15 menit, *RT inactivation* pada suhu 85°C selama 5 menit, dan *optional step* pada suhu 4°C (*hold*).

3.5.6.4. Kuantifikasi Ekspresi Gen *NFKB* dan *CASP3*

Proses pembuatan *mix reaction* PCR dikerjakan dalam PCR *cabinet* (Esco, 2017-122662). *Mix reaction* PCR dibuat dengan mencampurkan NFW (3,2 µL), 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Meridian Bioscience, BIO-98005) (5 µL), cDNA *template* (1 µL), *primer reverse* (0,4 µL), dan *primer forward* (0,4 µL) (Negi *et al.*, 2023). *Mix reaction* PCR dimasukkan ke 96-well PCR *plates* sesuai dengan penempatan kontrol dan perlakuan NKJM pada Tabel 3.3., kemudian di-*run* pada RT-qPCR (Agilent AriaMx Real-time PCR System, G8830A) dengan pengaturan suhu, waktu, dan siklus RT-qPCR yang terdapat pada Tabel 3.4. Selanjutnya, kuantifikasi ekspresi gen ditentukan dengan metode Livak (Widowati *et al.*, 2019).

Tabel 3.3. Peta perlakuan kontrol dan konsentrasi NKJM untuk uji kuantifikasi ekspresi gen *NFKB*, *CASP3*, dan β -*Actin* pada sel MCF-7 pada 96-well PCR *plate*

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	Blank								
B	KDMSO	KDMSO	KDMSO	Blank								
C	NKJM1	NKJM1	NKJM1	Blank								
D	NKJM2	NKJM2	NKJM2	Blank								
E	NKJM3	NKJM3	NKJM3	Blank								
F												
G												
H												

Keterangan:

KN (Kontrol Negatif): Sel MCF-7 + medium kultur normal

KDMSO (Kontrol DMSO): Sel MCF-7 + DMSO 1%

NKJM1: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 125 µg/mL

NKJM2: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 250 µg/mL

NKJM3: Sel MCF-7 + nanokristal jahe merah 500 µg/mL

Tabel 3.4. Pengaturan suhu, waktu, dan siklus RT-qPCR

Gen	Suhu; Waktu; Siklus					
	Pre-denaturasi	Denaturasi	Annealing	Pre-elongasi	Elongasi	~
<i>NFKB</i>	95°C; 5'	95°C; 30"; 40 siklus	57°C; 50"; 40 siklus	72°C; 50"	72°C; 5'	4°C
<i>CASP3</i>	95°C; 5'	95°C; 30"; 40 siklus	58°C; 50"; 40 siklus	72°C; 50"	72°C; 5'	4°C
<i>β-Actin</i>	95°C; 5'	95°C; 30"; 40 siklus	58°C; 50"; 40 siklus	72°C; 50"	72°C; 5'	4°C

3.6. Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan perangkat lunak SPSS (versi 24.0). Data dianalisis menggunakan *One Way ANOVA*, kemudian diikuti *Tukey HSD Post Hoc Test* untuk data yang berdistribusi normal dan homogen, sedangkan untuk data yang berdistribusi normal tetapi tidak homogen digunakan *Dunnett T3 Post Hoc Test*. Nilai $P \leq 0,05$ digunakan sebagai nilai signifikansi dari data. Data hasil penelitian divisualisasikan sebagai rata-rata \pm standar deviasi dalam grafik batang yang dibuat menggunakan perangkat lunak GraphPad (versi 8.0.1) (Widowati *et al.*, 2023).

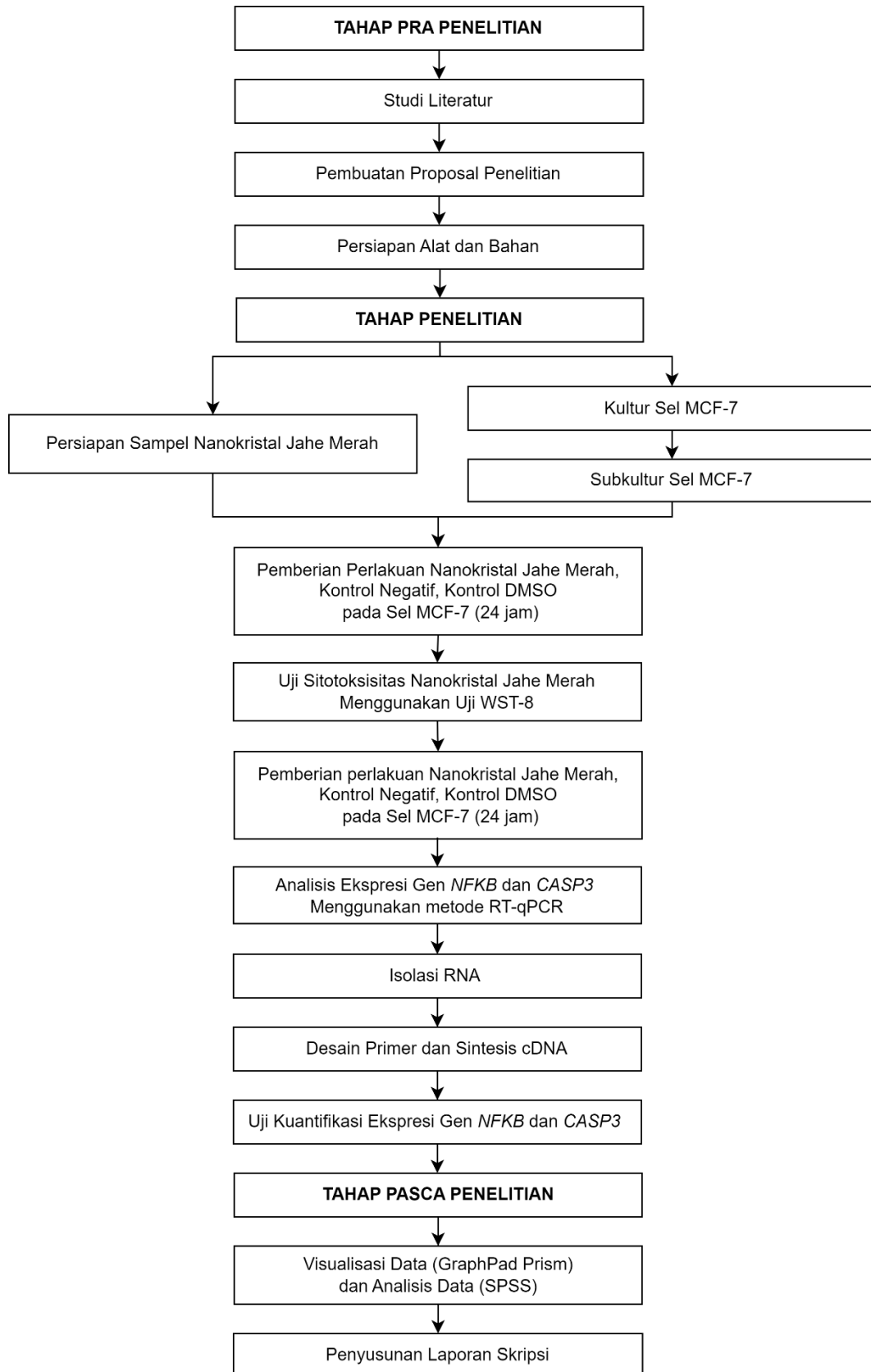
Data hasil pengujian sitotoksisitas disajikan dalam bentuk persentase viabilitas (%) dan penghambatan proliferasi sel (%). Rumus di bawah ini digunakan untuk menghitung persentase viabilitas sel (%) dan penghambatan proliferasi sel (%). *Half-maximal inhibitory concentration* (IC_{50}) ditentukan dengan menggunakan analisis probit (Sutjiatmo *et al.*, 2021). Hubungan antara ekspresi gen *NFKB* dengan *CASP3* ditentukan menggunakan analisis korelasi *Pearson* (*correlate bivariate*).

$$\text{Tingkat viabilitas sel (\%)} = \frac{OD_{\text{sampel}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\%$$

$$\text{Tingkat inhibisi sel (\%)} = \frac{OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{sampel}}}{OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\%$$

3.7. Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian yang telah dilakukan. Alur penelitian disajikan pada diagram alur (Gambar 3.2).



Gambar 3.2. Diagram alur penelitian