

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan menguji, mengumpulkan, dan menganalisis data dari hasil riset di laboratorium. Penelitian ini mengimplementasikan formulasi nanokristal ekstrak daun kelor dan ciplukan yang dianalisis aktivitas antioksidan dan antiinflamasi serta pemberian pada sel kanker payudara *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) untuk mengamati dan mengukur sitotoksisitas, induksi penuaan (*senescence*), dan pengaruhnya terhadap siklus sel kanker MCF-7. Akbar *et al.* (2023) menyatakan bahwa penelitian eksperimental merupakan penelitian yang sifatnya sistematis, teliti, dan logis. Peneliti pada penelitian ini memanipulasi keadaan atau kondisi eksperimental serta melakukan observasi pengaruh yang disebabkan oleh perlakuan.

#### **3.2 Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu pemberian nanokristal pada sel kanker payudara MCF-7. Uji antioksidan DPPH dilakukan terhadap nanokristal ekstrak kelor dan nanokristal ekstrak ciplukan (NKEKC) dengan lima konsentrasi. Uji antiinflamasi dilakukan terhadap protein albumin telur dengan kontrol positif dan lima konsentrasi dari NKEKC. Uji sitotoksisitas NKEKC dilakukan terhadap sel MCF-7 dengan kontrol positif, kontrol negatif, kontrol dimetil sulfoksida (DMSO), dan delapan konsentrasi dari NKEKC. Uji *senescence* sel dilakukan terhadap sel MCF-7 dengan lima konsentrasi dari NKEKC. Uji siklus sel dilakukan terhadap sel MCF-7 dengan dua konsentrasi.

#### **3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2024 sampai dengan Juni 2025. Ekstrak dalam bentuk powder dibuat di PT Fathonah Amanah Shidiq Tabligh (PT. FAST), Depok, Jawa Barat, Indonesia. Pembuatan nanokristal dilakukan di PT Nanotech Global Indonesia (tbk), Tangerang Selatan, Banten, Indonesia. Nanokristal yang telah dibuat, dikarakterisasi di Pusat Penelitian Nanosains dan

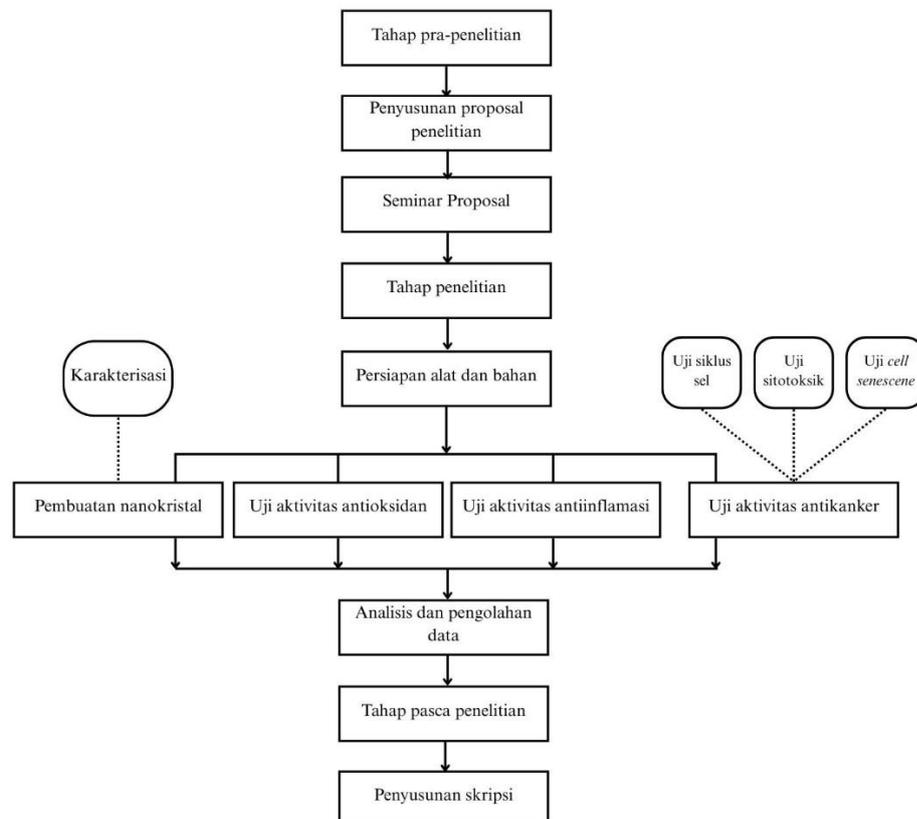
Nanoteknologi (PPNN ITB) Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat, Indonesia. Pengujian antioksidan dan uji antiinflamasi dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi I FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Uji sitotoksitas nanokristal ekstrak kelor dan ekstrak ciplukan dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Jatinangor, Jawa Barat, Indonesia. Analisis uji *senescence* dan analisis siklus sel dilakukan di Laboratorium Riset Translasi Farmasi Universitas Padjajaran Jatinangor, Jawa Barat, Indonesia.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari sel MCF-7 yang dipelihara di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran dan Laboratorium Riset Translasi Farmasi Universitas Padjajaran. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel MCF-7 yang dikultur dan diberi perlakuan nanokristal untuk eksperimen yang berkaitan dengan aktivitas antikanker.

### 3.5 Alur Penelitian

Alur dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1:



**Gambar 3.1.** Alur Penelitian

Sekar Putri Firlianti, 2025

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN POTENSI ANTIKANKER FORMULASI NANOKRISTAL EKSTRAK DAUN KELOR DAN CIPLUKAN SECARA IN VITRO**

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

### **3.6 Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang diperlukan pada penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

### **3.7 Prosedur Penelitian**

#### **3.7.1 Ekstraksi Daun Kelor dan Daun Ciplukan**

Pembuatan ekstrak menggunakan metode yang sudah memenuhi standar Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB) menggunakan pelarut etanol. Hasil dari ekstraksi berupa ekstrak serbuk dari daun kelor dan daun ciplukan.

#### **3.7.2 Pembuatan Nanokristal dan Karakterisasi**

Metode yang digunakan untuk membuat nanokristal ini adalah metode *top-down* menggunakan *Planetary Ball-Mill* (PBM). Karakterisasi meliputi analisis ukuran partikel menggunakan alat *Particle Size Analyzer* dan zeta potensial menggunakan alat *Zeta Potensial Analyzer*.

#### **3.7.3 Pembuatan Formulasi Nanokristal Ekstrak Kelor dan Nanokristal Ekstrak Ciplukan**

Formulasi nanokristal ekstrak kelor dan nanokristal ekstrak ciplukan (NKEKC) dilakukan dengan menimbang masing-masing nanokristal sebanyak 5 gram. Kedua nanokristal kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon 50 mL dan dicampurkan dengan cara diaduk. Setelah itu, tabung falcon ditutup rapat dan dilakukan pencampuran lebih lanjut menggunakan alat vortex.

#### **3.7.4 Uji Aktivitas Antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan dilaksanakan mengikuti protokol dari Madhuranga dan Samarakoon (2023) dengan modifikasi. Padatan 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ditimbang sebanyak 3.94 mg dan dimasukkan ke dalam vial coklat selanjutnya ditambahkan 50 ml methanol. Dimetil sulfoksida (DMSO) 10% dibuat dengan melarutkan 10 mL DMSO pekat dengan akuades hingga 100 mL. Larutan kontrol positif (KP) yang digunakan adalah larutan asam askorbat dengan konsentrasi 250, 200, 150, 100, dan 50 ppm. Larutan KP dibuat dengan membuat stok 500 ppm dalam 10 ml DMSO 10% dan kemudian diencerkan menjadi konsentrasi larutan KP yang akan digunakan. Larutan uji NKEKC 4 mg/mL ppm dibuat dengan melarutkan 8 mg NKEKC dalam 2 mL DMSO 10% didalam tabung reaksi. Larutan uji 4 mg/mL kemudian diencerkan dengan DMSO 10% menjadi

Sekar Putri Firlianti, 2025

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN POTENSI ANTIKANKER FORMULASI NANOKRISTAL EKSTRAK DAUN KELOR DAN CIPLUKAN SECARA IN VITRO**

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

larutan uji dengan konsentrasi di bawahnya, yaitu 2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL. Larutan uji sebanyak 500  $\mu$ L dicampurkan dengan 500  $\mu$ L DPPH di dalam vial coklat. Untuk pembuatan larutan kontrol positif dilakukan hal yang sama. Semua larutan dalam vial coklat kemudian digoyang (*shaking*) selama 30 menit di atas *shaker electric*. Setelah 30 menit, larutan uji dan larutan KP dimasukkan ke dalam 96-well plate (plat sumur), skema seperti pada Gambar 3.2 dan diukur dengan *plate reader* spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dihitung persentase inhibisinya (Madhuranga & Samarakoon 2023) dengan rumus:

$$\%inhibisi = \frac{Absorbansi\ DPPH - Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ sampel} \times 100$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Gambar 3.2** Skema plat 96 sumur (*96 well plate* untuk uji antiksidan DPPH)

Keterangan:

	Kontrol positif (asam askorbat)		Blanko (DPPH+metanol)
	NKEKC 4 mg/mL		Kontrol negatif (aquades)
	NKEKC 2 mg/mL		
	NKEKC 1 mg/mL		
	NKEKC 0.5 mg/mL		
	NKEKC 0.25 mg/mL		

### 3.7.5 Uji Aktivitas Antiinflamasi

Uji aktivitas antiinflamasi menggunakan metode denaturasi protein albumin telur. Uji ini dilakukan berdasarkan referensi Fitriana *et al.* (2024) dengan modifikasi. Preparasi albumin putih telur dilakukan dengan menimbang putih telur sebanyak 10 gram kemudian dihomogenkan selama 1 menit menggunakan

Sekar Putri Firlianti, 2025

AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN POTENSI ANTIKANKER FORMULASI NANOKRISTAL EKSTRAK  
DAUN KELOR DAN CIPLUKAN SECARA IN VITRO

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

pengaduk bermagnetik (*magnetic stirrer*). Sebanyak 50 mL aquades ditambahkan dan dihomogenkan lagi selama 5 menit. Larutan albumin disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm, lalu diambil supernatannya sebagai komponen albumin. Larutan uji NKEKC dibuat dalam DMSO dengan konsentrasi 4, 2, 1, 0.5, dan 0.25 mg/mL. Sebanyak 2 mL larutan uji NKEKC, 2.5 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS), dan 0.5 mL albumin dicampur di dalam tabung reaksi. pemanasan di suhu 37°C selama 15 menit dan 70°C selama 5 menit. Larutan uji dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 660 nm. Nilai absorbansi dihitung inhibisinya (Fitriana *et al.* 2024) dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi sampel}} \times 100$$

### 3.7.6 Preparasi Sel dan Larutan Stok NKEKC

Preparasi sel dilakukan sebelum melakukan uji sitotoksik NKEKC terhadap sel kanker payudara MCF-7 sesuai dengan protokol kerja di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran. Sel MCF-7 dikultur dalam media kultur cair komplet *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan 50 µL/ 50mL antibiotik pada inkubator (30°C, 5% CO<sub>2</sub>, 24 jam) hingga konfluensi minimum 70%. Setelah 24 jam, media pada cawan dibuang, lalu sel dibilas menggunakan 1 mL *Phosphate Buffered Serum* (PBS) sebanyak dua kali. Setelah PBS dibuang, ditambahkan 1 mL larutan Trypsin-EDTA lalu diinkubasi dalam inkubator selama 5 menit agar lapisan sel yang menempel pada cawan terlepas (*detaching*). Sel dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi media kultur cair komplet RPMI yang mengandung FBS. Sel disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, lalu pelet diencerkan sampai homogen ke dalam tabung berisi media.

Untuk membuat larutan stok dari NKEKC, bahan tersebut dilarutkan dengan DMSO, pelarut yang tidak bersifat toksik terhadap sel, hingga konsentrasi akhir tertentu sebagai stok. Nanokristal ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO 100% sehingga didapatkan larutan stok masing-masing nanokristal sebanyak 5 mg/mL atau 5.000 µg/mL.

### 3.7.7 Uji Sitotoksitas sel MCF-7 dengan perlakuan Nanokristal

Uji sitotoksitas dilakukan sesuai dengan protokol standar kerja di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran. Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  *trypan blue* disiapkan dalam tabung mikro steril. Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  suspensi sel yang sebelumnya telah dipreparasi ditambahkan (pada bagian Preparasi Sel 3.7.6), ke dalam larutan *trypan blue* lalu dihomogenkan. Hemacytometer dan tutup slip dibersihkan menggunakan etanol 70% kemudian dikeringkan. Sebanyak larutan 10  $\mu\text{L}$  *trypan blue* dimasukkan ke salah satu sisi bilik dengan menggunakan pipet secara perlahan. Jumlah sel yang sehat dihitung dan ditentukan jumlah sel (viabel) per mL. Sel diresuspensi dengan kepadatan sel akhir 170.000 sel/ml dalam media (17.000 sel/sumur). Selanjutnya sel dikultur di dalam plat 96 sumur dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan 5%  $\text{CO}_2$ . Setelah 24 jam, perlakuan NKEKC dilakukan pada sel kanker MCF-7.

Tabung mikro 1,5 mL diberi label sesuai konsentrasi pengenceran, kemudian larutan stok sampel NKEKC diencerkan menjadi delapan varian konsentrasi (1 s.d. 0.0007 mg/mL) menggunakan pelarut media. Plat 96 sumur yang telah berisi sel dikeluarkan dari inkubator. Plat diberi label pada sepanjang margin kiri untuk baris mana yang akan diberi perlakuan oleh standar dan baris mana yang akan diberi sampel seperti pada Gambar 3.3, kemudian semua media dibuang. Masing-masing sampel NKEKC sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  kontrol positif dipindahkan dari tabung mikro ke dalam masing-masing sumur yang sesuai pada plat 96 sumur yang telah berisi sel kemudian diinkubasi kembali selama 48 jam. Setelah 48 jam, dilakukan pemberian reagen resazurin dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 570 nm. Media dalam sumur dibuang, lalu disiapkan 9 mL media pada tube yang ditambahkan dengan 1 mL *Resazurin Sodium Salt-Powder, BioReagent* (10  $\mu\text{L}$  reagen untuk 90  $\mu\text{L}$  media). 100  $\mu\text{L}$  campuran larutan tersebut dimasukkan kedalam tiap sumur dan diinkubasi selama 1-2 jam sampai terlihat perubahan warna. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 570 nm menggunakan *multimode reader*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Gambar 3.3** Skema plat 96 sumur (*96 well plate*) untuk uji sitotoksik

Keterangan:

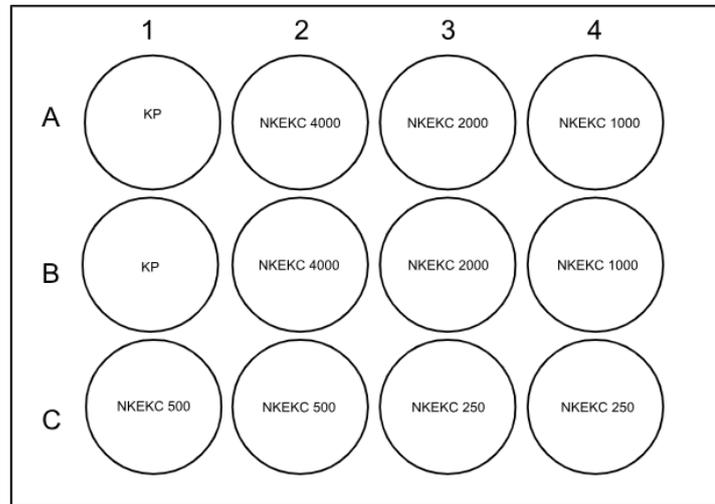
	Media		NKEKC 0.062 mg/mL
	Media dan sel		NKEKC 0.031 mg/mL
	Kontrol positif (Cisplatin)		NKEKC 0.015 mg/mL
	Kontrol negatif (DMSO)		NKEKC 0.007 mg/mL
	NKEKC 1 mg/mL		
	NKEKC 0.5 mg/mL		
	NKEKC 0.25 mg/mL		
	NKEKC 0.125 mg/mL		

### 3.7.8 Uji *Senescence* Sel MCF-7

Uji *senescence* pada sel MCF-7 dilakukan berdasarkan referensi perlengkapan pewarnaan sel *senescence* Sigma CS0300 atau protocol standar sesuai instruksi protocol/prosedur *company*. Pada plat 12 sumur dimasukkan kaca penutup bundar (*circle coverslips*). Sel ditanam pada plat 12 sumur dengan kepadatan 10.000 sel/sumur lalu diinkubasi hingga konfluensi 70%. Skema penanaman seperti pada Gambar 3.4. Dibuat larutan uji NKEKC dengan konsentrasi 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL. Sel yang sudah konfluens dicuci dengan PBS 1x. Larutan uji masing-masing sebanyak 100 uL dan medium sel sebanyak 900 uL dimasukkan ke dalam sumur. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium dibuang dan dicuci dengan PBS 1x sebanyak 400 uL/sumur. Larutan fiksasi ditambahkan dan diamkan selama 6-7 menit. Sel dicuci kembali menggunakan PBS 1x sebanyak 400 uL/sumur sebanyak dua kali bilas. Larutan pewarnaan ditambahkan sebanyak 400 uL/sumur. Sel diinkubasi dalam inkubator tanpa CO<sub>2</sub> selama 2 jam atau paling lama semalaman. Sel diamati di bawah mikroskop dengan mengambil kaca penutup yang diletakan terbalik di kaca

objek. Sel yang terwarnai biru kehijauan merupakan sel yang mengalami penuaan dan dihitung jumlahnya dan persentasenya (Noren & Evans, 2017) menggunakan rumus:

$$\% \text{induksi senescences} = \frac{\text{Sel yang terinduksi}}{\text{Total sel}} \times 100$$



**Gambar 3.4** Skema plat 12 sumur (*12-Well plate*) untuk uji *senescence* sel

### 3.7.9 Uji Aktivitas Siklus Sel

Pengujian siklus sel dilakukan menggunakan *Cell Cycle Kit Assay* dari Elabscience (kode: E-CK-A351) dan dikerjakan sesuai dengan protokol yang tercantum dalam kit. Tahapan dimulai dari persiapan reagen, di mana etanol absolut disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  semalaman, dan reagen RNase A yang telah larut dicampurkan lalu disimpan di atas es sebelum digunakan. Untuk persiapan sampel, sebanyak  $5 \times 10^5$  sel MCF-7 dikumpulkan, disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Sel disuspensikan kembali menggunakan PBS dan dihitung, lalu kembali disentrifugasi dengan kecepatan yang sama dan supernatan dibuang. Setelah itu, sel disuspensikan kembali dalam 0,3 mL PBS, lalu ditambahkan 1,2 mL etanol absolut dingin (dari lemari es  $-20^{\circ}\text{C}$ ), dicampur dengan baik, dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama satu jam atau semalaman untuk fiksasi. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Sel disuspensikan kembali dalam 1 mL PBS dan dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi ulang dan supernatan dibuang. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  reagen RNase A ditambahkan untuk mensuspensikan kembali sel, kemudian diinkubasi dalam

penangas air pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, 400 µL reagen PI (Propidium Iodide) dengan konsentrasi 50 µg/mL ditambahkan, diaduk hingga merata, dan diinkubasi pada suhu 2–8°C selama 30 menit dalam kondisi gelap. Sampel dianalisis segera menggunakan flowsitometri.

### **3.7.10 Analisis statistik**

Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS (versi 2022). Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% ( $P \geq 0,05$ ). Apabila data tidak terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji nonparametrik.