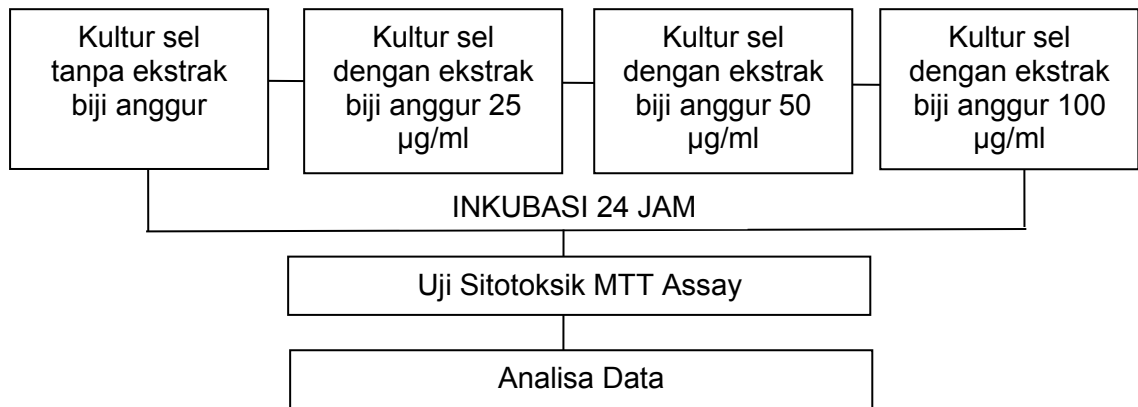


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental in vitro* dengan metode eksplorasi laboratorium dan metode penelitian eksperimental. Penelitian ekplorasi menggunakan kultur sel kanker payudara. Sedangkan penelitian ekperimental menggunakan kontrol dan kelompok dengan penambahan ekstrak biji anggur pada kultur dengan 3 konsentrasi yang berbeda.



Gambar 4.1 Skema Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah kultur sel kanker payudara (MCF-7) dengan medium RPMI. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

Banyaknya pengulangan adalah sebagai berikut $p(n-1) \geq 15$ dimana p = jumlah kelompok perlakuan. n = jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan dan n harus bilangan bulat

sehingga : $4(n-1) \geq 15$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

Jadi, minimal dilakukan lima kali pengulangan. Dan dalam penelitian ini dilakukan lima kali pengulangan untuk setiap perlakuan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium Kimia UB dan Politeknik Negeri Malang.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*).

Perlakuan dalam penelitian ini adalah (Dinicola *et al*, 2010).:

Kontrol : kultur sel MCF-7 yang tidak diberi perlakuan apapun.

Perlakuan 1 : kultur sel MCF-7 yang diberi ekstrak biji anggur dengan konsentrasi 25 µg/ml.

Perlakuan 2 : kultur sel MCF-7 yang diberi ekstrak biji anggur dengan konsentrasi 50 µg/ml.

Perlakuan 3 : kultur sel MCF-7 yang diberi ekstrak biji anggur dengan konsentrasi 100 µg/ml.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel kanker payudara pada kultur sel kanker payudara.

4.5 Definisi Operasional

1. Kanker payudara adalah perubahan sel-sel yang mengalami pertumbuhan tidak normal dan tidak terkontrol pada payudara.

2. Kultur Sel MCF-7 adalah kultur sel line sel kanker payudara yang diambil dari manusia penderita kanker payudara yang kemudian dikulturkan dengan medium RPMI.
3. Ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) adalah proses ekstraksi biji anggur hitam menggunakan pelarut n-hexane.
4. MTT assay adalah metode yang digunakan untuk mengetahui jumlah sel kultur kanker yang hidup/ proliferasi.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Pembuatan Ekstrak Biji Anggur

Blender, timbangan, *Soxhlet*, termometer, *water bath*, labu leher tiga, pendingin bola, statif, gelas erlenmeyer, corong gelas, pendingin spiral/*rotary evaporator*, labu penampung.

2. Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Anggur

Biji anggur kering bubuk, n-hexane, kertas saring, botol kaca 10 ml.

3. Alat Pembuatan Kultur Sel Kanker Payudara

Beker glass volume 1000 ml, *Magnetic stirrer*, pH-meter, Filter 0,2 mikron, Botol duran 1000 ml, Mikropipet 1000 μ l, Botol duran 100 ml, *Conical tube* baru, Culture dish baru, Pulpen marker, Sentrifugator, Mikroskop

4. Bahan Pembuatan Kultur Sel Kanker Payudara

Media padat, Aquadest 1000 ml, NaHCO₃, HCl/NaOH, Penisilin-streptomisin, FBS (Fetal bovine serum) qualified, Media RPMI

5. MTT assay

96-Well Plate, RPMI, PBS, MTT reagen, SDS, ELISA *reader*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur sel MCF-7

A. Persiapan Media Cair

- a. Siapkan media padat yang akan digunakan
- b. Siapkan 950 ml akuabides steril dalam gelas beker 1000 ml dalam LAF.
- c. Tuang media bubuk ke dalam akuabides steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata
- d. Bilas bagian dalam pembungkus media bubuk dengan akuabides, tuang cairannya ke dalam gelas beker di atas
- e. Tambahkan 2,2 g NaHCO_3 untuk setiap liter media yang dibuat, aduk rata
- f. Tambahkan akuades steril hingga volume 1000 ml
- g. Aduk dengan magnetik stirer hingga semua media padat dan NaHCO_3 dapat larut.
- h. Lakukan *adjust* pH (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N
- i. Lakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, tampung ke dalam botol Duran 1000 ml
- j. Beri penandaan dan simpan media di kulkas dengan suhu 4°C.

B. Pembuatan Media Kultur Lengkap RPMI

- a. Cairkan FBS dan pen-strep pada suhu ruangan
- b. Disiapkan botol 100 ml
- c. Ditambahkan FBS 10 ml, tuang ke dalam botol duran
- d. Ditambahkan penstrep 1 ml, tuang ke dalam botol duran

- e. Jika diperlukan, tambahkan fungizone 0,5 ml
- f. Ditambahkan media cair hingga 100 ml
- g. Diberi label

C. Cell Thawing

- a. Persiapkan RPMI
- b. Ambil cryo tube berisi sel dari freezer
- c. Cairkan suspensi pada suhu ruangan hingga mencair
- d. Ambil suspensi dengan mikropipet dan masukan ke dalam flask berisi medium lengkap
- e. Tutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* pada 600 g selama 5 menit
- f. Kembali ke dalam LAF. Semprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70 %
- g. Buka *conical tube*, tuang supernatan MK ke dalam pembuangan.
- h. Tambahkan 4 ml MK baru, resuspensi kembali sel hingga homogen.
- i. Transfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 dish
- j. Tambahkan masing-masing 5 ml MK ke dalam dish, homogenkan.
- k. Amati kondisi sel dengan mikroskop.
- l. Simpan sel ke dalam incubator CO₂.

D. Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7

- a. Media yang ada dibuang dan kemudian dicuci dengan media tanpa FBS
- b. Ditambahkan Tripsin-EDTA sebanyak 1 ml

- c. Ditambahkan media 15 mL ke dalam tabung
- d. Sel MCF-7 disentrifuge 3000 rpm selama 8 menit
- e. Supernatant dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan medium kultur (RPMI) sebanyak 1 ml
- f. Dihomogenkan

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Biji Anggur

Untuk mengekstrak biji anggur digunakan metode *soxhlet* dengan pelarut n-hexane dan dievaporasi dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60 °C (Damayanti, S. 2014). Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

1. Biji anggur yang digunakan berasal dari anggur hitam (*Vitis vinifera*)
2. Diambil bijinya dan dikeringkan dengan diangin-anginkan dalam suhu ruang selama beberapa hari.
3. Setelah kering, biji anggur dihaluskan menggunakan blender.
4. Setelah itu, ditimbang sebanyak 2 x 40 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring.
5. Biji anggur yang telah terbungkus kertas saring tersebut dimasukkan dalam alat *soxhlet* yang labu alas bulatnya telah diisi menggunakan n-hexane sebanyak ± 350 ml.
6. Set suhu Heating Mantle pada 60-80°C (titik didih n-hexane : 69 °C), alirkan air pada kondensor dan proses ekstraksi dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih (sekitar 9-12 kali putaran pelarut).
7. Setelah proses ekstraksi selesai , hasil ekstrak diambil dan dimasukkan dalam labu evaporator.
8. Pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C sampai tidak keluar lagi pada labu alas bulat tempat sisa penampungan pelarut.

4.7.3 Uji sitotoksisitas dengan MTT

1. Sel diencerkan dengan pengenceran 1×10^6 / ml pada 96-Well Plate.
2. Siapkan pengenceran sel dari 1×10^6 menjadi 1×10^4 sel/ml dimana pada tiap plate sel dimasukkan $10^3 - 10^5$ sel/ well.
3. Sebarkan 100 μ l pengenceran pada tiap well.
4. Ditunggu hingga 24 jam dan diberi perlakuan pemberian ekstrak biji anggur.
5. Sel yang diberi perlakuan dicuci dengan PBS dan 10 μ L larutan MTT di setiap well.
6. Sel diinkubasi selama 2-4 jam sampai warna ungu terlihat.
7. Ketika warna ungu telah terlihat dengan jelas dibawah mikroskop, tambahkan 100 ml reagen Deterjen pada semua well. Jangan di kocok.
8. Pindahkan plate dengan penutup (cover) selama 2-4 jam atau semalam pada suhu kamar.
9. Lepaskan penutup plate dan ukur nilai absorbansi dengan ELISA reader pada panjang gelombang 570 nm pada tiap well, termasuk blanko.
10. Persentase sel hidup dihitung dari data absorbansi sel.

4.8 Pengolahan Data

Hasil pengukuran MTT pada kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 20.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji one-way ANOVA, post hoc test (uji *Least Significant Difference*) dan uji korelasi Pearson.

4.9 Jadwal Kegiatan

No	Jenis Kegiatan	Bulan
----	----------------	-------

		1	2	3
1	Persiapan Laboratorium, alat dan bahan			
2	Persiapan Ethical Clearance			
3	Kultur sel kanker payudara			
4	Penyediaan dan pembuatan ekstrak biji anggur			
7	Pemberian ekstrak biji anggur			
9	MTT assay			
10	Pengumpulan data			
11	Analisa dan pengolahan data			
12	Penarikan kesimpulan dan penyusunan laporan akhir penelitian			