

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode *true eksperimental Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ester eugenol terhadap daya bunuh sel kanker servix pada kultur sel HeLa.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah Kultur sel HeLa kanker servix .Kultur sel HeLa disimpan dan dikembangkan di Laboraturium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang dibutuhkan adalah dengan perincian sebagai berikut:

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif	Kultur sel HeLa tanpa perlakuan
Kontrol Pelarut	Kultur sel HeLa +DMSO
Perlakuan 1	Eugenol Konsentrasi 0.01%
Perlakuan 2	Eugenol Konsentrasi 0.1%
Perlakuan 3	Eugenol Konsentrasi 1%
Perlakuan 4	Ester Eugenol Konsentrasi 0.01%
Perlakuan 5	Ester Eugenol Konsentrasi 0.1%

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Kultur berkembang dengan sempurna
- b. Tidak adanya kontaminasi pada kultur sel HeLa

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Kultur sel HeLa tidak berkembang
- b. Terdapat kontaminasi pada kultur sel HeLa

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Sampel dinyatakan *drop out* apabila sesuai kriteria eksklusi dan melakukan kultur sel ulang yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat kultur sel HeLa yang sesuai dengan ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *Ester Eugenol* dari minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum.*) dalam berbagai konsentrasi.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah Tingkat kematian sel HeLa.

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Januari hingga bulan Juli.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian :

- Seperangkat alat gelas
- Seperangkat alat refluks
- Seperangkat alat distilasi skala mikro
- Kolom kromatografi
- Rotary evaporator Buchii
- Incubator
- Elisa Reader
- Flow Cytometer
- Spektrofotometer UV-Vis
- Spektrofotometer IR
- Gas Chromatograph-Mass spectrometer.

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan sampel:

Minyak cengkeh perdagangan diperoleh dari pasar.

Sel Uji :

Sel uji berupa sel HeLa yang diperoleh dari stok Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Bahan kimia :

- Aquades, NaOH (pa)
- Na₂SO₄ anhidrat
- HCl (37%)
- Diklorometana (teknis)
- Asam format (pa)
- Dietileter (teknis)
- Natrium bikarbonat (pa)
- Eugenol standar (pa)
- Etanol 96%
- Media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma)
- Penisilin – streptomisin (Sigma)
- Amfoterizin B (Sigma)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- tripsin-EDTA (Sigma) (tripsin 0,25%)
- Tripan Blue (Sigma)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)difeniltetrazoliumbromida (MTT) (Sigma)
- Sodium Duodecyl Suphate (SDS)
- Phosphat Buffer Saline (PBS) (Invitrogen).

4.6 Definisi operasional

1. Minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*) perdagangan diperoleh dari pasar.
2. Pengukuran daya bunuh ester eugenol terhadap sel HeLa diukur menggunakan *Flowcytometry*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Isolasi Eugenol dari Minyak Cengkeh

4.7.1.1 Isolasi Eugenol dari Minyak Cengkeh dengan Reaksi Asam Basa

Sebanyak 30 mL minyak cengkeh perdagangan dijernihkan dengan cara dimasukkan dalam kolom kromatografi yang telah diisi dengan tanah diatom (bahan penyerap) dengan tekanan vakum. Proses penjernihan dilakukan sampai volume minyak cengkeh yang jernih didapatkan hingga volume yang cukup untuk reaksi lanjut. Ambil minyak cengkeh dan tentukan massanya. Masukkan minyak cengkeh hasil penjernihan ke dalam labu erlenmeyer. Tambahkan larutan NaOH 5% (sebanyak 0,5 kali volume dari minyak cengkeh), kocok dengan kuat kurang lebih selama lima menit. Tambahkan lagi NaOH (0,25 sampai 0,5 kali volume minyak cengkeh), dan kocok. Lalu ditutup rapat dan dibiarkan selama semalam atau lebih. Pindahkan ke dalam corong pisah, ambil lapisan airnya. Lapisan air diasamkan dengan HCl pekat sampai asam (pH=1). Kemudian lakukan ekstraksi dengan 3x10 mL diklorometana. Keringkan lapisan organik dengan Na₂SO₄ anhidrous, dan evaporasi diklorometana dengan rotary evaporator. Timbang eugenol yang diperoleh.

4.7.1.2 Isolasi Eugenol dari Minyak Cengkeh dengan Distilasi Fraksinasi

Sebanyak 150 mL minyak cengkeh perdagangan dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang merupakan rangkaian distilasi fraksinasi dihubungkan dengan vakum. Tekanan dikontrol pada 100 mmHg dan distilasi dilaksanakan. Distilat didapatkan pada suhu 80° - 82°C dan dikumpulkan dalam wadah gelas erlenmeyer. Eugenol hasil isolasi diukur berat jenisnya dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer Infra Red dan GC-MS.

4.7.2 Sintesis Ester Eugenol

Metode yang digunakan diadaptasi dari metode Rahman, MF (2002) : Dimasukkan 248,40 g (203,90 mL, 5,40 mol) asam format 98% ke dalam labu leher dua kapasitas 500 mL yang telah dilengkapi dengan kondensor bola, pengaduk magnet, dan corong penetes yang telah diisi 32,80 g (30,83 mL, 0,20 mol) eugenol. Pengaduk magnet dihidupkan, dan eugenol ditambahkan ke dalam labu. Setelah semua eugenol ditambahkan, dilakukan refluks selama 11 jam di atas penangas minyak dengan suhu 130°C. Selanjutnya dilakukan distilasi pada suhu 100°-105°C (1 atm) untuk mendapatkan asam format sisa reaksi. Residu dicuci dengan larutan NaHCO₃ jenuh sampai pH netral kemudian diekstraksi dengan 30 mL dietil eter sebanyak 2 kali. Lapisan dietil eter dikumpulkan dan dikeringkan dengan Na₂SO₄ dengan rotary evaporator Buchii. Cairan hasil sintesis dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer Infra Red dan GC-MS. anhidrat. Larutan dietil eter dipisahkan dengan penyaringan dan selanjutnya dipekatkan

4.7.3 Uji Antiproliferatif terhadap Sel HeLa kanker Serviks

Uji antikanker serviks menurut metode Ola,et al (2008) : Suspensi sel kanker serviks (HeLa) sebanyak 100 μ L dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 μ L media didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada *96-well plate* dan diinkubasikan selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100 μ L larutan uji pada berbagai seri konsentrasi. Sebagai kontrol positif ditambahkan 100 μ L medium kultur, kemudian 100 μ L cisplatin pada berbagai seri konsentrasi ke dalam sumuran yang telah berisi 100 μ L suspensi sel. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100 μ L medium kultur ke dalam sumuran yang berisi 100 μ L suspensi sel dan sebagai kontrol pelarut ditambahkan 100 μ L DMSO ke dalam sumuran yang berisi 100 μ L medium kultur dan 100 μ L suspensi sel dengan delusi yang sesuai dengan delusi konsentrasi larutan uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ dan 95% O₂. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang lalu ditambahkan 10 μ L larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190 μ L medium RPMI 1640 komplit. Kemudian sel diinkubasi selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen stopper SDS (100 μ L). Microplate kemudian dibungkus dengan tissue dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu kamar dan ruangan gelap. Sel yang hidup maupun yang mati dianalisis menggunakan instrumen Flow Cytometer untuk menentukan tingkat apoptosisitas sel kultur dan menentukan nilai LC50.

4.8 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik dan trendline menggunakan Microsoft Excel 2016.