

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan *metode true experimental post test only control group design*, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan perbandingan pemberian eugenol dan ester eugenol terhadap daya bunuh sel kanker serviks pada kultur sel HeLa.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah kultur sel HeLa kanker serviks yang dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah kultur sel HeLa yang diberikan delapan jenis perlakuan seperti yang terdapat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kelompok sampel sel HeLa dengan berbagai jenis perlakuan yang diberikan

Kelompok	Perlakuan
Kontrol negatif	Kultur sel HeLa tanpa perlakuan
Kontrol pelarut	Kultur sel HeLa + DMSO
Perlakuan 1	Eugenol dengan konsentrasi 0.01%
Perlakuan 2	Eugenol dengan konsentrasi 0.1%
Perlakuan 3	Eugenol dengan konsentrasi 1%
Perlakuan 4	Ester eugenol dengan konsentrasi 0.01%
Perlakuan 5	Ester eugenol dengan konsentrasi 0.1%
Perlakuan 6	Ester eugenol dengan konsentrasi 1%

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Kultur sel HeLa hidup dan berkembang 100%
- Kultur sel HeLa tidak ada kontaminasi

4.2.3.2 Kriteria Ekslusi

- Kultur sel HeLa tidak hidup dan berkembang 100%
- Adanya kontaminasi pada sel HeLa

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Sampel dinyatakan *drop out* apabila termasuk dalam kriteria eksklusi dan dilakukan pengulangan kultur sel HeLa yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapatkan kultur sel HeLa yang sesuai dengan ketentuan inklusi sampel.

4.3 Identifikasi Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah eugenol hasil isolasi dari minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan berbagai konsentrasi dan ester eugenol hasil isolasi dengan berbagai konsentrasi.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah kematian sel kultur HeLa kanker serviks.

4.4 Tempat dan waktu penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama enam bulan, yaitu pada bulan Januari 2016 sampai bulan Juni 2016.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

- *Flow Cytometry*
- *Incubator*
- *ELISA reader*

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan sampel :

- Eugenol murni
- Ester eugenol hasil sintesis

Sel Uji :

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

Bahan kimia :

- *Media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Gibco)*
- *Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma)*
- *Penisilin – streptomisin (Sigma)*
- *Amfoterizin B (Sigma)*
- *Dimethyl sulfoxide (DMSO)*
- *Trypsin-EDTA (Sigma) (trypsin 0,25%)*
- *Trypan Blue (Sigma)*
- *3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)difeniltetrazoliumbromida (MTT) (Sigma)*
- *Sodium Duodecyl Sulfate (SDS)*
- *Phosphat Buffer Saline (PBS) (Invitrogen)*

4.6 Definisi Operasional

1. Senyawa eugenol murni yang diperoleh dari laboratorium kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
2. Senyawa ester eugenol hasil sintesis yang diperoleh dari laboratorium kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
3. Pengukuran daya bunuh ester eugenol terhadap sel HeLa diukur menggunakan *flow cytometry*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Uji Antiproliferatif terhadap Sel HeLa Kanker Serviks

Uji antikanker serviks menurut metode Ola, dkk., (2008) : Suspensi sel kanker serviks (HeLa) sebanyak 100 μL dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 μL media didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada *96-well plate* dan diinkubasikan selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100 μL larutan uji pada berbagai seri konsentrasi yaitu eugenol dengan konsentrasi 0.01%, 0.1%, dan 1% dan ester eugenol dengan konsentrasi 0.01%, 0.1%, dan 1%. Sebagai kontrol positif ditambahkan 100 μL medium kultur, kemudian 100 μL cisplatin pada berbagai seri konsentrasi ke dalam sumuran yang telah berisi 100 μL suspensi sel. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100 μL medium kultur ke dalam sumuran yang berisi 100 μL suspensi sel dan sebagai kontrol pelarut ditambahkan 100 μL DMSO ke dalam sumuran yang berisi 100 μL medium kultur dan 100 μL suspensi sel dengan delusi yang sesuai dengan delusi konsentrasi larutan uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO_2 dan

95% O₂. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang lalu ditambahkan 10 µL larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190 µL medium RPMI 1640 komplet. Kemudian sel diinkubasi selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen stopper SDS (100 µL). *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 cytometry* untuk menentukan tingkat apoptosis sel kultur dan menentukan nilai LC₅₀.

4.8 Uji Analisis Data

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