

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) secara *in vitro* menggunakan jenis *post test* dengan kelompok kontrol (*control group design*).

4.2 Besar Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel MCF-7 yaitu *cell line* kanker payudara yang di kultur. Untuk uji aktivitas dan uji apoptosis menggunakan dosis IC_{50} yang diperoleh melalui MTT, dosis yang digunakan yakni dosis IC_{50} , $\frac{1}{2}IC_{50}$ dan $2xIC_{50}$ serta kontrol (tanpa antibodi primer). Jumlah pengulangan untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus Federer.

4.2.1 Penentuan IC_{50} menggunakan MTT Assay

Perhitungan pengulangan MTT 1:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(22-1)(n-1) \geq 15$$

$$21(n-1) \geq 15$$

$$21n \geq 15 + 21$$

$$n \geq 1,71 \approx 2$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Berdasarkan hasil perhitungan, pengulangan sampel diperoleh sebanyak dua kali. Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali untuk menghindari terjadinya kekurangan data. Selain itu bila menggunakan dua data maka rata-rata yang diperoleh kurang mewakili hasil dari sampel setiap kelompok perlakuan. Pembagian kelompok tersaji dalam tabel 4.1 berikut:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 1

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 berisi DMEM
3	I	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1000 µg/ml
4	II	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 500 µg/ml
5	III	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 250 µg/ml
6	IV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 125 µg/ml
7	V	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 62,5 µg/ml
8	VI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 31,25 µg/ml
9	VII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 15,625 µg/ml
10	VIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 7,8125 µg/ml
11	IX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 700 µg/ml
12	X	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 650 µg/ml
13	XI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 600 µg/ml
14	XII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 550 µg/ml
15	XIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 500 µg/ml
16	XIV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 450 µg/ml
17	XV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 400 µg/ml
18	XVI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 350 µg/ml
19	XVII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 300 µg/ml
20	XVIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 250 µg/ml
21	XIX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 200 µg/ml
22	XX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 150 µg/ml
23	XXI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 100 µg/ml
24	XXII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 50 µg/ml

Perhitungan pengulangan MTT 2:

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(30-1) (n-1) \geq 15$$

$$29(n-1) \geq 15$$

$$29n \geq 15 + 29$$

$$n \geq 1,52$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini harus lebih dari 1,52 sehingga dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Berikut merupakan tabel 4.2 pembagian kelompok sampel MTT2:

Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 2

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 berisi DMEM
3	I	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 20.000 µg/ml
4	II	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 10.000 µg/ml
5	III	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 5000 µg/ml
6	IV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2500 µg/ml
7	V	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1250 µg/ml
8	VI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 6200 µg/ml
9	VII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 6000 µg/ml
10	VII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 5800 µg/ml
11	IX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 5600 µg/ml
12	X	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 5400 µg/ml
13	XI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 5200 µg/ml
14	XII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 4800 µg/ml
15	XII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 4600 µg/ml
16	XIV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 4400 µg/ml
17	XV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 4200 µg/ml
18	XVI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 4000 µg/ml
19	XVII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 3800 µg/ml
20	XVIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 3600 µg/ml
21	XIX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 3400 µg/ml
22	XX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 3200 µg/ml
23	XXI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 3000 µg/ml
24	XXII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2800 µg/ml
25	XXIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2600 µg/ml

26	XXIV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2400 µg/ml
27	XXV	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2200 µg/ml
28	XXVI	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 2000 µg/ml
29	XXVII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1800 µg/ml
30	XXVIII	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1600 µg/ml
31	XXIX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1400 µg/ml
31	XXX	Sel MCF-7 dengan dosis ekstrak daun kelor 1200 µg/ml

4.2.2 Pengujian aktivitas NF κB menggunakan Metode Imunositokimia

Perhitungan pengulangan Imunositokimia NF κB dan Tunnel Assay:

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

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

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 6$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan dapat dilihat pada table 4.3 sebagai berikut.

Tabel 4.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 diberi ekstrak daun kelor (<i>M.oleifera</i>) dengan konsentrasi sesuai IC ₅₀
3	I	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor konsentrasi dua kali IC ₅₀
4	II	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan konsentrasi setengah kali IC ₅₀

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kelor.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah NF κ B aktif, IC_{50} dan apoptosis sel MCF-7.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Februari – Juni 2014. Ekstraksi dilakukan di laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Brawijaya. Pengeringan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Kultur sel MCF-7 dan *MTT* Assay dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dan uji aktivitas NF κ B dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Foto hasil imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Kultur Sel MCF-7

Sel MCF-7, medium RPMI 1640, penicillin-streptomycin, mikropipet (*blue tip* dan *yellow tip*), tabung sentrifugal steril, FBS (Fetal Bovine Serum), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), Sodium Bicarbonate, HCl, Tripsin-EDTA, aquadest, spirtus, alkohol 70%, *Laminar air-flow*, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , mikroskop

inverted, 96-well *plates*, cover glass, *sentrifuge*, pipet disposable, pipet Tetes steril, hemasitometer, syringe, Filter 0.2 μm , dan tisu.

4.5.2 Maserasi

Serbuk daun kelor (*M. oleifera*) diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) Batu. Bahan lain yang digunakan adalah etanol 70% yang didapatkan dari Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah wadah maserat, *rotary evaporator*, botol kaca, kain flannel sebagai penyaring, bejana *stainless steel*, aluminium foil, timbangan digital, spatel, stirer, cawan porselen, gelas ukur.

4.5.3 Pemaparan pada Kultur Sel

Serbuk ekstrak daun kelor, sel MCF-7, *plate*, label, dan pipet tetes,

4.5.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia

4.5.4.1 Flavonoid

Bahan yang digunakan dalam uji flavonoid adalah ekstrak daun kelor, HCL p.a, serbuk magnesium, air suling, butanol. Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.5.4.2 Saponin

Bahan yang digunakan dalam uji saponin adalah ekstrak daun kelor, aquades. Alat yang digunakan adalah tabung reaksi dan pipet tetes.

4.5.4.3 Alkaloid

Bahan yang digunakan dalam uji alkaloid adalah ekstrak daun kelor, HCL 2N, NaCl, HCl, pereaksi mayer. Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, plat tetes dan pipet tetes.

4.5.4.4 Tanin

Bahan yang digunakan dalam uji tanin adalah ekstrak daun kelor, FeCl_3 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.5.4.5 Terpenoid

Bahan yang digunakan dalam uji terpenoid adalah ekstrak daun kelor, CHCl_3 dan H_2SO_4 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.5.4.6 Fenol

Bahan yang digunakan dalam uji fenol adalah ekstrak daun kelor, FeCl_3 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.5.5 Penentuan IC_{50} menggunakan MTT Assay

Plat 96-well dengan volume 100 $\mu\text{l/well}$, inkubator, larutan MTT, *solubilization solution*, spektrofotometer.

4.5.6 Pengujian Aktivitas NF κB menggunakan Metode Imunositokimia

Sel MCF-7, inkubator CO_2 , stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, DMEM, PBS, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk NF κB , xylol, dan mounting media. Mikropipet (20, 200, 1000 μL), tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, *cover slip*, *object glass*, *24-well plate*, *6-well plate*, pinset, pipet Tetes, *laminair air-flow*,

label, akuades , *blue tip*, *yellow tip*, buangan untuk media bekas, dan mikroskop cahaya.

4.5.7 Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Xylene, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, air, aquadest steril, 50 μ l TUNEL *labeling mix* (terdiri dari 5 μ l enzim terminal deoxynucleotidyl transferase dan 45 μ l fluorescein-dUTP), *siliconize cover slip*, incubator, PBS, *Rnase solution*, larutan propidium iodide, *cover slide*, mikroskop fluoresensi.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- 1) Sel MCF-7 diperoleh dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- 2) Serbuk daun kelor (*M. oleifera*) diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) Batu, Malang, Jawa Timur.
- 3) Ekstrak daun kelor diperoleh melalui ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
- 4) IC_{50} ditentukan melalui dari pengujian MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay.
- 5) Imunisitokimia dilakukan dengan imunostaining kemudian dihitung jumlah inti sel dengan NF κ B (p50) aktif berdasarkan warna yang tampak yaitu warna coklat tua pada inti sel.
- 6) Apoptosis diuji menggunakan *TUNEL* assay kemudian dihitung sel yang mengalami apoptosis (berwarna coklat).
- 7) Indeks aktivasi NF κ B adalah metode untuk menghitung jumlah NF κ B aktif di intisel. Dihitung dengan cara melihat jumlah sel yang terwarnai oleh antibodi monoklonal NF κ B di intisel. Indeks dihitung dengan cara

melihat 10 lapang pandang dalam satu slide. Indeks aktivasi NF κB dihitung dengan cara membandingkan jumlah NF κB aktif di intisel dengan jumlah total sel dari lapang pandang.

Rumus indeks aktivasi NF κB:

(Sel kategori 1+2+3 / jumlah total sel) x 100%

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur Sel MCF-7 (CCRC, 2013)

4.7.1.1 Penumbuhan Sel

- 1) Disiapkan aliquot 3 mL DMEM 1640 dalam tabung sentrifugal steril.
- 2) Diambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel MCF-7 dari tangki nitrogen cair.
- 3) Dicairkan suspensi sel dalam ampul pada suhu kamar hingga tepat mencair.
- 4) Diambil suspensi sel menggunakan mikropipet 1 ml, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam DMEM 1640 yang telah disiapkan dalam tabung sentrifugal.
- 5) Ditutup tabung sentrifugal dengan rapat. Disentrifugasi menggunakan *sentrifuge* untuk tabung sentrifugal (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali.
- 6) Disemprot tabung sentrifugal dan tangan dengan alkohol 70 % dalam *laminair air-flow*.
- 7) Dibuka tabung sentrifugal, dituang supernatan DMEM 1640 ke dalam pembuangan.
- 8) Ditambahkan 4 ml DMEM 1640 baru, diresuspensikan kembali sel hingga homogen.

- 9) Ditransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *cell culture dish*.
- 10) Ditambahkan masing-masing 5 ml DMEM 1640 ke dalam *dish*, dihomogenkan dan diamati kondisi sel dengan mikroskop, serta dipastikan sel homogen pada seluruh permukaan *dish*.
- 11) Diberi penandaan dan disimpan sel ke dalam inkubator inkubator 37°C ± 5% CO₂.

4.7.1.2 Pergantian Media

- 1) Dibuat aliquot PBS dan DMEM 1640 di dalam tabung sentrifugal.
- 2) Dibuang media lama secara perlahan menggunakan pipet tetes.
- 3) Dituang 3 ml PBS ke dalam *dish*, digoyang-goyangkan *dish* ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel.
- 4) Dibuang PBS menggunakan pipet tetes.
- 5) Dituang 7 ml DMEM 1640 ke dalam *dish* yang berisi sel.
- 6) Diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*.
- 7) Diinkubasi semalam dan diamati keadaan sel setelah semalam.

4.7.1.3 Pemanenan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator 37°C ± 5% CO₂, diamati kondisi sel, dipanen sel setelah sel 80% konfluen.
- 2) Dibuang media menggunakan pipet tetes steril.
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah ± ½ volume media awal).
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.

- 5) Ditambahkan DMEM 1640 \pm 5 mL untuk menginaktifkan tripsin, diresuspensikan sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, diresuspensikan kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam tabung sentrifugal steril baru.

4.7.1.4 Perhitungan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , diamati kondisi sel.
- 2) Dibuang media menggunakan pipet tetes steril.
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + $\frac{1}{2}$ volume media awal).
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Ditambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin, diresuspensikan sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, diresuspensikan kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam tabung sentrifugal steril baru, tambahkan DMEM 1640 kurang lebih 2-3 ml, diresuspensikan sel.
- 8) Diambil 10 μl panen sel dan dipipetkan ke hemasitometer.
- 9) Dihitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*.

4.7.1.5 Subkultur Sel

- 1) Dilakukan panen sel sesuai dengan protokol panen sel.
- 2) Diresuspensikan suspensi sel di dalam tabung sentrifugal.

- 3) Diambil 300 μ l panen sel dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugal yang lain. Ditambahkan 7 ml DMEM 1640 dan diresuspensikan kembali.
- 4) Dituang sel ke dalam wadah (*dish*) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif.
- 5) Diinkubasi semalam dan diganti DMEM 1640 setelah semalam, diamati keadaan sel sebelum dan setelah dilakukan pergantian media.

4.7.2 Maserasi Daun Kelor

100 gram serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*) yang sudah ditimbang dilarutkan dalam 1 L etanol 70% dengan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 30 menit. Larutan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup. Kemudian dilakukan remaserasi. Larutan yang sudah didiamkan 24 jam disaring dengan menggunakan kain saring sedikit demi sedikit. Larutan disaring sebanyak 2 kali. Hasil filtrat dipisahkan dengan maseratnya pada toples yang berbeda. Maserat kemudian dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 1 L dengan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 30 menit. Setelah itu larutan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup. Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Selanjutnya, dilakukan pemisahan ekstrak dengan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* selama 3 hari pada suhu 40°C dengan kecepatan rotary 70 rpm. Ekstrak kemudian dikeringkan dengan menggunakan *vacuum oven* dengan suhu *vacuum oven* 40°C dan suhu *safety vacuum oven* 80°C. Pengeringan selesai dilakukan jika didapatkan berat ekstrak yang konstan.

4.7.3 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Kultur Sel

- 1) Diencerkan ekstrak daun kelor dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel MCF-7.
- 2) Ditambahkan larutan ekstrak daun kelor ke dalam *plate*, didiamkan selama 24 jam.
- 3) Dicuci kembali larutan ekstrak daun kelor dengan medium sel.

4.7.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia

a. Uji Tannin

10 mg sampel ditimbang dengan menggunakan gelas arloji, dilarutkan dalam 15 mL aquades pada tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes FeCl_3 , diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung tanin jika berwarna coklat kehijauan sampai biru kehitaman.

b. Uji Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1, 2 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 2 ml aquades, dikocok selama 15 menit, diamati sampel, mengandung saponin jika terbentuk lapisan buih.

c. Uji Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1, 1 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 5% NaOH sebanyak 5 tetes, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung flavonoid jika berwarna kuning.

d. Uji Terpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1, 5 mL larutan ekstrak diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan kloroform sebanyak 2 ml, ditambahkan H₂SO₄ pekat sebanyak 3 ml, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung terpenoid jika berwarna coklat kemerahan.

e. Uji Alkaloid

125 mg sampel ditimbang, dilarutkan dalam HCl sebanyak 5 ml, disaring dengan menggunakan kertas saring, diambil filtratnya sebanyak 2 ml, ditambahkan 2 – 3 tetes reagen dragendorf dengan menggunakan pipet tetes, diamati perubahan warna yang terbentuk, sampel berwarna kecokelatan jika mengandung alkaloid.

f. Uji Fenol

50 mg ekstrak ditimbang, dilarutkan dalam 5 ml aquades, ditambahkan 23 tetes larutan 5% FeCl₃, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung fenol jika berwarna hijau gelap.

4.7.5 Penentuan IC₅₀ menggunakan MTT Assay

Pengujian menggunakan 96 sumur, dimana tiap pengkondisian harus dilakukan 3 kali atau lebih, sebagai berikut,

- 1) Hari pertama: Trypsinize One T-25 di dalam labu dan ditambahkan 5ml dari media ke *trypsinized cells*. Disentrifugasi di 15 ml *falcon tube sterile* pada 500 rpm pada *swinging bucked rotor* (~400 x g) selama 5 menit.
- 2) Dipindahkan media dan diresuspensikan sel 1.0 ml dengan media

- lengkap.
- 3) Dihitung dan dicatat sel per ml (dipindahkan sel secara aseptik saat menghitung).
 - 4) Diencerkan sel (cv=cv) hingga 75.000 sel per ml dan digunakan media lengkap untuk mencairkan sel.
 - 5) Ditambahkan 100 μ l sel (7500 jumlah sel) ke masing-masing sumur dan diinkubasi selama semalam.
 - 6) Hari kedua: diperlakukan sel pada hari kedua dengan agonis, inhibitor atau obat.
 - a. Jika memindahkan media, dilakukan dengan sangat hati-hati. Ini adalah di mana sebagian besar variasi dalam data dapat terjadi.
 - b. Volume akhir harus mencapai 100 μ l per sumur.
 - 7) Hari ketiga: ditambahkan 20 μ l 5 mg / ml MTT masing-masing pada sumuran. Disertakan satu set sumur dengan MTT tetapi tidak dengan sel-sel (kontrol). (Dilakukan secara aseptik).
 - 8) Diinkubasi selama 3,5 jam pada suhu 37C dalam *culture hood*.
 - 9) Dikeluarkan media secara hati-hati. Jangan mengganggu sel dan jangan dibilas dengan PBS.
 - 10) Ditambahkan 150 μ l pelarut MTT.
 - 11) Ditutup dengan kertas timah dan dikocok sel pada *orbital shaker* selama 15 menit.
 - 12) Dibaca absorbansi pada 590 nm dengan filter referensi dari 620 nm.
 - 13) Dihitung hambatan proliferasi sel dengan rumus:

$$\frac{(\text{Absorbansi Rata} - \text{rata Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel})}{\text{Absorbansi rata} - \text{rata kontrol}} \times 100\%$$

(Putra *et al.*, 2011)

14) Dibuat grafik garis linier untuk menentukan IC_{50} .

4.7.6 Pengujian Aktivitas NF κ B menggunakan Metode Imunositokimia

Prosedur kerja imunositokimia NF κ B sebagai berikut (Nethercott *et al.*, 2011) :

- 1) Diambil sel MCF-7 dari inkubator CO_2 , diamati kondisi sel.
- 2) Dipanen sel sesuai dengan protokol panen.
- 3) Dihitung jumlah sel MCF-7 sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5×10^4 sel/sumuran (5×10^4 sel/1000 μ l DMEM 1640)).
- 4) Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^4 sel/1000 μ l DMEM 1640.
- 5) Disiapkan 24 *well plate* dan *cover slip*.
- 6) Dimasukkan *cover slip* sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.
- 7) Ditransfer 1000 μ l DMEM 1640 suspensi sel ke atas *cover slip*.
- 8) Diamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.
- 9) Diinkubasi sel di dalam inkubator selama semalam.
- 10) Dibuat tiga konsentrasi sampel (ekstrak daun kelor (*M. oleifera*)), yaitu pada IC_{50} , dua kali IC_{50} , dan setengah kali IC_{50} , untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan : a. Perlakuan dengan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), c. Kontrol sel dengan antibodi primer (akan menunjukkan warna coklat).
- 11) Diambil 24 *well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO_2 .

- 12) Dibuang semua media kultur dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan-lahan.
- 13) Diisikan PBS masing-masing 500 μ l ke dalam sumuran untuk mencuci sel.
- 14) Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan.
- 15) Dimasukkan tiga sampel dengan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sesuai poin 10 sebanyak 1000 μ l ke dalam sumuran.
- 16) Dimasukkan 1000 μ l media kultur untuk kontrol sel.
- 17) Diinkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 15 jam.
- 18) Diamati kondisi sel setelah 14 jam, didokumentasikan dengan kamera.
- 19) Disiapkan metanol dingin dan PBS.
- 20) Diinkubasi dengan sampel dihentikan pada jam ke-15 (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF)
- 21) Dibuang semua media dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan.
- 22) Disikan PBS 500 μ l ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.
- 23) Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan.
- 24) Diambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.
- 25) Diletakkan di dalam sumuran *6-well plate* bekas atau *dish* bekas yang bersih.
- 26) Diberi label pada masing-masing sumuran.

- 27) Diteteskan 300 μ l metanol dingin, diinkubasi 10 menit di dalam freezer.
- 28) Diberikan metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik.
- 29) Ditambahkan 500 μ l PBS pada *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, diambil dan dibuang PBS dengan mikropipet 1 ml, dilakukan pencucian dengan PBS 2 kali.
- 30) Ditambahkan 500 μ l akuades, didiamkan selama 5 menit, dibuang akuades, dilakukan pencucian dengan akuades 2 kali.
- 31) Diteteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet.
- 32) Diteteskan *prediluted blocking serum*, diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.
- 33) Diteteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, yaitu untuk NF κ B (p50).
- 34) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.
- 35) Diteteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), diinkubasi selama 10 menit.
- 36) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.
- 37) Diteteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, diinkubasi selama 10 menit.
- 38) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.
- 39) Diteteskan larutan substrat kromogen DAB, diinkubasi selama 10 menit.
- 40) Ditambahkan 500 μ l akuades, kemudian dibuang kembali.
- 41) Diteteskan larutan MayeHaematoxylin, diinkubasi selama 3 menit.

- 42) Ditambahkan 500 μ l akuades, kemudian dibuang kembali.
- 43) Diangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, kemudian dicelupkan dalam xylol.
- 44) Dicelupkan *cover slip* dalam alkohol lalu dikeringkan *cover slip*.
- 45) Diletakkan *cover slip* di atas *object glass*, di tetesi dengan lem (*mounting media*). Ditutup *cover slip* dengan *cover slip* kotak.
- 46) Diamati dan dihitung jumlah NF κ B aktif di inti sel dengan mikroskop cahaya.

4.7.7 Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Pengujian apoptosis menggunakan TUNEL Assay ialah sebagai berikut:

- 1) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS
- 2) Kemudian sel diinkubasi dengan *blocking solution* 10 menit pada suhu 15 – 25 C.
- 3) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS.
- 4) Diinkubasi dengan *permeabilization solution* selama 2 menit di es dengan suhu 2 – 8 C.
- 5) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS.
- 6) Keringkan daerah sekitar sampel.
- 7) Ditambahkan TUNEL *Reaction Mixture* sebanyak 25 μ l.
- 8) Ditutup dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 C dalam kondisi lembab dan gelap.
- 9) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 2 kali.
- 10) Keringkan daerah sekitar sampel
- 11) Ditambahkan 25 μ l *converter* POD.
- 12) Diinkubasi pada tempat lembab 30 menit pada suhu 37 C.

- 13) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali.
- 14) Ditambahkan DAB substrat.
- 15) Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15 – 25 C.
- 16) Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali
- 17) Ditambahkan reagen MayeHaematoxilyn.
- 18) Dicuci dengan akuades
- 19) Dikeringkan dengan oven selama ± 24 jam.

4.8 Analisis Data

Data yang telah terkumpul diolah dan dilakukan analisis uji yang disebut 'Asumsi Dasar' yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji 'Asumsi Dasar' digunakan untuk mengetahui pola dan varian suatu data. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas dilakukan menggunakan rumus dari *Saphiro Wilk* melalui program SPSS. Distribusi data dikatakan normal bila hasil signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Bila data berdistribusi normal, maka digunakan uji statistik parametrik. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data memiliki varian yang sama. Uji homogenitas dilakukan menggunakan tingkat kepercayaan 95%. Bila data memiliki varian yang sama maka selanjutnya dilakukan uji ANOVA.

Uji ANOVA yang digunakan adalah *one way ANOVA*, yaitu analisis varian untuk menguji rata-rata perlakuan suatu percobaan yang menggunakan 1 faktor, dimana 1 faktor tersebut memiliki 3 atau lebih kelompok. Analisis data dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis dan mengalami penurunan jumlah NF κ B aktif terhadap perlakuan yang diberikan.

Perbedaan signifikan bila $p < 0,05$. Hipotesis uji ANOVA apoptosis sel MCF-7 adalah :

H0 : Tidak terjadi apoptosis sel MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

H1 : Terjadi apoptosis sel MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

Sedangkan hipotesis uji ANOVA aktivitas NF κ B adalah :

H0 : Tidak terjadi penurunan jumlah NF κ B aktif pada sel kultur MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

H1 : Terjadi penurunan jumlah NF κ B aktif pada sel kultur MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

Selanjutnya, analisis korelasi sederhana dilakukan untuk mengetahui kekuatan dan arah hubungan antara dua variabel, yaitu dosis dengan aktivitas NF κ B sel MCF-7 dan dosis dengan apoptosis sel MCF-7. Kekuatan dan arah hubungan antara dua variabel dinyatakan melalui koefisien korelasi ($r = (-1 \leq 0 \leq 1)$), dimana kekuatan hubungan, nilai koefisien korelasi berada di antara -1 sampai 1, sedangkan arah hubungan, dinyatakan dalam bentuk positif (+) bila terjadi hubungan searah dan negatif (-) bila terjadi hubungan bertolak belakang.

Dengan demikian, hipotesis analisis korelasi apoptosis sel MCF-7 adalah :

H0 : Tidak terdapat hubungan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah sel MCF-7 yang mengalami apoptosis ($r = 0$).

H1 : Ada hubungan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah sel MCF-7 yang mengalami apoptosis ($r \neq 0$).

Sedangkan, hipotesis analisis korelasi aktivitas NF κ B adalah :

H0 : Tidak terdapat hubungan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah NF κB aktif ($r = 0$).

H1 : Ada hubungan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah NF κB aktif ($r \neq 0$).

Analisis regresi linier sederhana dilakukan untuk mengetahui pengaruh satu variabel bebas terhadap satu variabel terikat. Hipotesis analisis regresi linier sederhana apoptosis sel MCF-7 adalah :

H0 : Tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7.

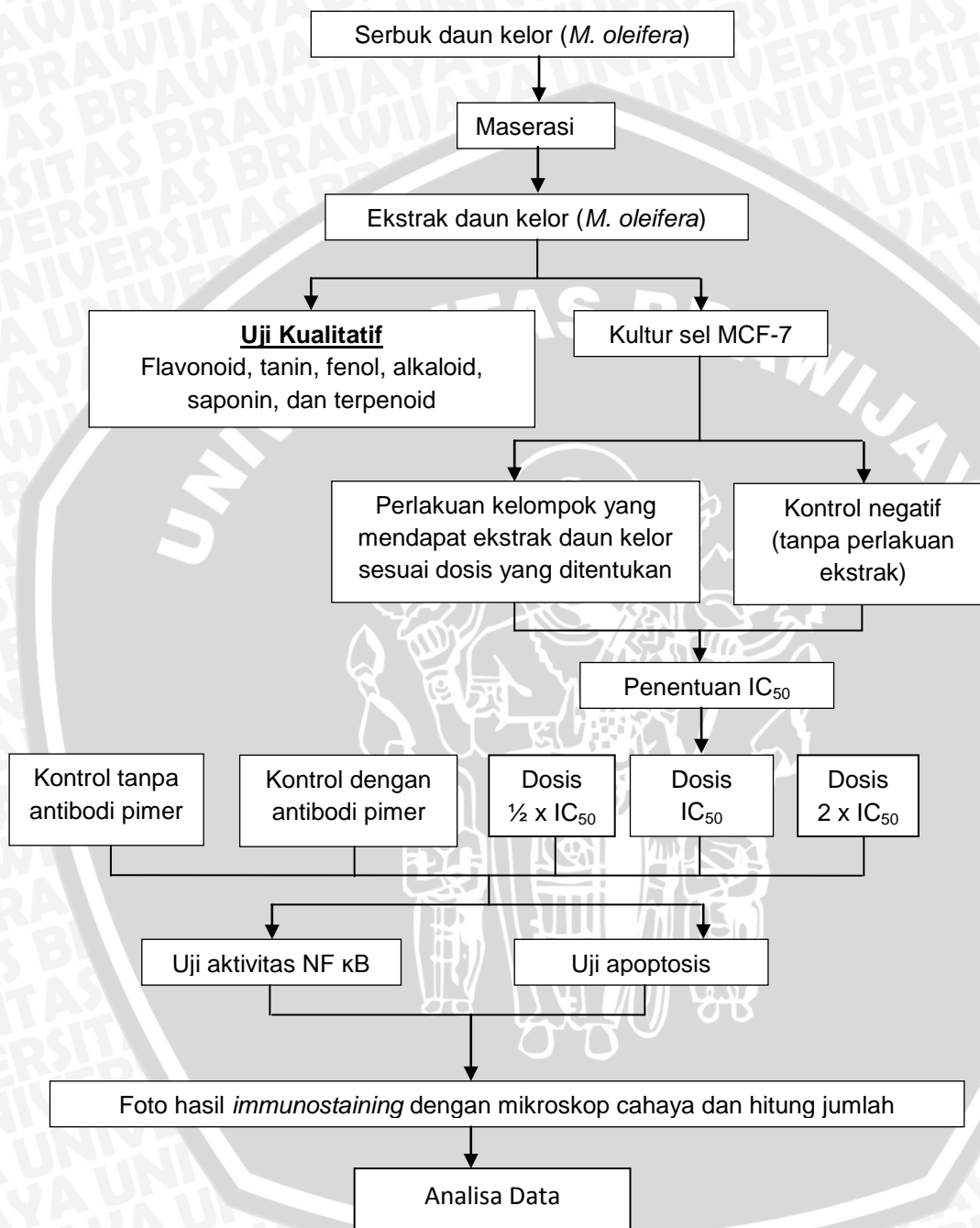
H1 : Terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7.

Sedangkan, hipotesis analisis regresi linier sederhana aktivitas NF κB adalah :

H0 : Tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah NF κB aktif.

H1 : Terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah NF κB aktif.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian