

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 kultur sel MCF-7 yaitu *cell line* kanker payudara. Uji ekspresi dan uji apoptosis menggunakan IC_{50} yang diperoleh melalui MTT, konsentrasi yang digunakan yakni IC_{50} , $\frac{1}{2}$ dari IC_{50} dan $2x IC_{50}$ 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 menggunakan rumus federer (Barnes, 2001):

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

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

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

$$21n \geq 15 + 21$$

$$n \geq 1,71$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan sampel sebanyak tiga kali untuk menghindari terjadinya kekurangan data. Pembagian kelompok tersaji dalam Tabel 4.1 berikut:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Uji Penentuan IC₅₀ menggunakan MTT Assay

Kontrol Negatif	Kontrol Media	Perlakuan Sel MCF-7 dengan Media DMEM dan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor:
Sel MCF-7 dengan media DMEM, tanpa pemberian ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	Medium DMEM	1200 µg/ml
		1400 µg/ml
		1600 µg/ml
		1800 µg/ml
		2000 µg/ml
		2200 µg/ml
		2400 µg/ml
		2600 µg/ml
		2800 µg/ml
		3000 µg/ml
		3200 µg/ml
		3400 µg/ml
		3600 µg/ml
		3800 µg/ml
4000 µg/ml		
4200 µg/ml		
4400 µg/ml		

4.2.2 Pengujian ekspresi Hsp70 menggunakan metode Imunositokimia dan apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Perhitungan pengulangan menggunakan rumus frederer (Barnes, 2001):

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

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

$$3n \geq 15 +3$$

$$n \geq 6$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah:

Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan untuk Uji Ekspresi Hsp70 metode Imunositokimia dan apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Kontrol Negatif	Kontrol Media	Perlakuan Sel MCF-7 dengan Media DMEM dan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor:
Sel MCF-7 dengan media DMEM, tanpa pemberian ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	Medium DMEM	½ x IC ₅₀
		IC ₅₀
		2 x IC ₅₀

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kelor pada waktu inkubasi (24 jam).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah ekspresi Hsp70 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 ekspresi Hsp70 dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Foto hasil immunositokimia 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 DMEM, 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, 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 Ekspresi Hsp70

4.5.7 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 Hsp70, 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.

4.5.8 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 adalah *cell line* kanker payudara yang 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) Uji Ekspresi Hsp70 dilakukan dengan metode imunisitokimia. Kemudian dihitung sel yang mengalami ekspresi Hsp70 yang ditunjukkan dengan warna yang tampak yaitu warna coklat pada sel. Kemudian jumlah sel yang mengalami ekspresi Hsp70 dibandingkan dengan jumlah sel total. Sehingga didapatkan indeks ekspresi Hsp70 sel MCF-7.
- 6) Apoptosis diuji menggunakan *TUNEL* assay kemudian dihitung sel yang mengalami apoptosis (berwarna coklat). Kemudian jumlah sel yang

mengalami apoptosis dibandingkan dengan jumlah sel total. Sehingga didapatkan indeks apoptosis sel MCF-7.

- 7) Indeks ekspresi Hsp70 adalah metode untuk menghitung jumlah Hsp70 yang terekspresi pada sel. Dihitung dengan cara melihat jumlah sel yang terwarnai oleh antibodi monoklonal Hsp70 di sel. Indeks dihitung dengan cara melihat 10 lapang pandang dalam satu slide. Indeks ekspresi Hsp70 dihitung dengan cara membandingkan jumlah sel yang mengalami ekspresi Hsp70 dengan jumlah total sel dari 10 lapang pandang. Sehingga didapatkan indeks ekspresi Hsp70 sel MCF-7.

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 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 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 ke dalam pembuangan.
- 8) Ditambahkan 4 ml DMEM 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 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.

4.7.1.2 Pergantian Media

- 1) Dibuat aliquot PBS dan DMEM 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 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, 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 $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal).
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Ditambahkan DMEM ± 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 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 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 setelah semalam, diamati keadaan sel sebelum dan setelah dilakukan pergantian media.

4.7.2 Ekstraksi 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 48 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: Tripsinize 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.

4.7.6 Pengujian Ekspresi Hsp70 menggunakan Metode Imunositokimia

Prosedur kerja imunositokimia Hsp70 sebagai berikut (Nethercott *et al.*, 2011) :

- 1) Diambil sel MCF-7 dari inkubator CO₂, 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)).
- 4) Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^4 sel/1000 μ l DMEM.
- 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 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 IC₅₀, dua kali IC₅₀, dan setengah kali IC₅₀, 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 CO₂.

- 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 Hsp70 (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 µl 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 Hsp70 yang tereksresi di sel dengan mikroskop cahaya.

4.7.7 Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Pengujian apoptosis menggunakan TUNEL Assay ialah sebagai berikut

(Darzynkiewicz *et al.*, 2008) :

- 1) Dilakukan deparafinasi preparat (blok paraffin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
- 2) Direhidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95%, dan etanol 70% masing-masing selama 2 menit, 2 menit, 1 menit, dan terakhir dengan air selama 1 menit.
- 3) Direhidrasi preparat dengan aquadest steril.
- 4) Ditetesi preparat dengan 50 µl TUNEL *labeling mix* (terdiri dari 5 µl enzim terminal deoxynucleotidyl transferase dan 45 µl fluorescein-dUTP).
- 5) Ditutup preparat dengan *siliconize cover slip*.
- 6) Diinkubasi preparat pada suhu 37°C selama 30 menit di dalam *moist chamber*.

- 7) Dicuci preparat dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 3 kali.
- 8) Diinkubasi dengan *RNase solution* pada suhu 37°C selama 30 menit.
- 9) Dicuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali.
- 10) Diinkubasi preparat dengan larutan propidium iodide pada suhu ruang selama 10 menit.
- 11) Dicuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali.
- 12) Ditutup preparat dengan *cover slide* diameter 18 mm.
- 13) Diamati sel apoptosis (fluoresensi hijau) menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 1000x.
- 14) Didokumentasi setiap pengamatan.

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 Kolmogorov-Smirnov 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 ekspresi Hsp70 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 ekspresi Hsp70 adalah :

H0 : Tidak terjadi penurunan jumlah ekspresi Hsp70 pada sel kultur MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

H1 : Terjadi penurunan jumlah ekspresi Hsp70 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 konsentrasi ekstrak daun kelor dengan ekspresi Hsp70 sel MCF-7 dan konsentrasi ekstrak daun kelor 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 konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah sel MCF-7 yang mengalami apoptosis ($r = 0$).

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

Sedangkan, hipotesis analisis korelasi ekspresi Hsp70 adalah :

H0 : Tidak terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan ekspresi Hsp70 ($r = 0$).

H1 : Ada hubungan antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan ekspresi Hsp70 ($r \neq 0$).

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 konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7.

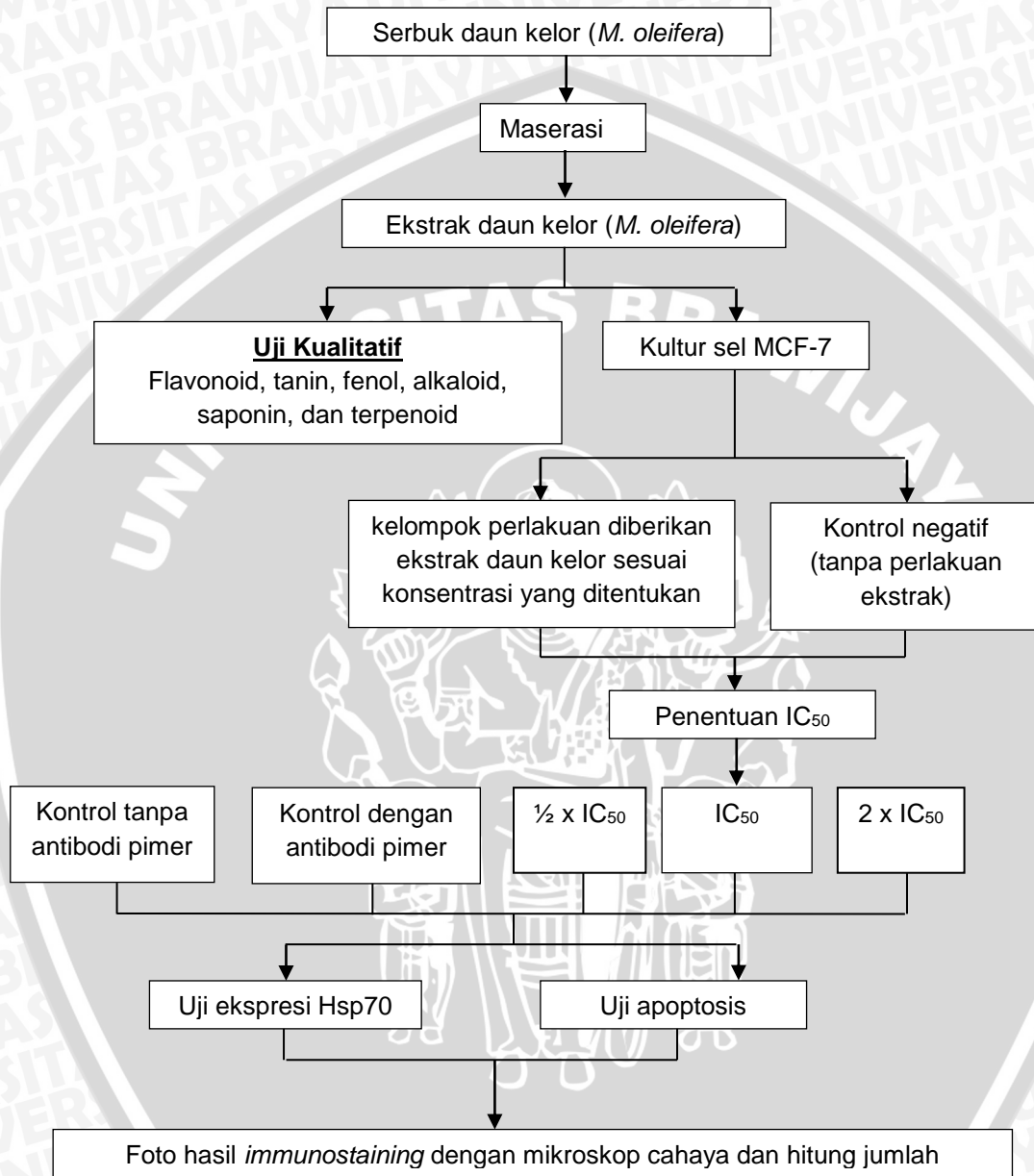
H1 : Terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7.

Sedangkan, hipotesis analisis regresi linier sederhana ekspresi Hsp70 adalah :

H0 : Tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan ekspresi Hsp70.

H1 : Terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan ekspresi Hsp70.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian