

BAB III

SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek, Bahan, dan Alat Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah kultur sel kanker payudara T47D dalam 18 sumuran dengan kepadatan $1,5 \times 10^6$ sel/mL yang diperoleh dari laboratorium terpadu UGM, dengan 3 kali pengulangan.

Kriteria inklusi:

- Kultur sel kanker payudara T47D tidak terkontaminasi
- Kultur sel kanker payudara T47D telah *subconfluent*

Kriteria eksklusi:

- Terjadi perubahan morfologi sel kanker payudara T47D

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Daun sirsak yang telah dideterminasi di Institut teknologi Bandung⁴²
2. Kultur sel kanker mammae yang diperoleh dari laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
3. Media *Roswell Park Memorial Instituted*
4. *Fetal bovine serum*, penisilin, streptomisin, fungizon
5. Isopropanolol
6. Kloroform
7. Diethyl Pyrocarbonate
8. Alkohol 70%

9. Aquabidest
10. Etanol
11. RNA *free water*
12. *Buffer phosphate*
13. Tripsin
14. Primer VEGF F (TGCAGATTATGCGGATCAAACC)
15. Primer VEGF R (TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG)
16. GAPDH F (GAAGGTGAAGGTCCGAGTC)
17. GAPDH R (GAAGATGGTGATGGGATTC)

3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. *Medical Kit Catalogue* no. 717164
2. Mikropipet terkalibrasi 200 μ L dan 1000 μ L
3. *Centrifuge* Eppendorf 5424R terkalibrasi
4. *Centrifuge* Hermle
5. Nanodrop
6. *Collection tube*
7. 6-well plate
8. *Elisa reader*
9. *Vortex mixer*
10. *Conical tube* 15 ml
11. *White tip*
12. *Blue tip*

13. Tisu
14. Tempat buang untuk media bekas dan PBS
15. *Laminar flow/PCR cabinet*
16. Mesin qPCR
17. *Cool box column*
18. *Microtube 0,2mL*
19. Kit Qiagen (misc Hispec, misc Nuclei mix, miScript RT mix)

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vitro*. Metode uji yang digunakan adalah pemberian senyawa ekstrak air daun sirsak terhadap kultur sel kanker mamae T47D dengan rancangan penelitian adalah *randomized post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak air daun sirsak terhadap ekspresi gen VEGF pada kultur sel kanker payudara T47D. Rancangan penelitian menggunakan *simple randomized design* yaitu alokasi perlakuan secara acak untuk dimasukkan sebagai kelompok eksperimen dan kontrol.

3.2.2 Penentuan Kadar Ekstrak Air Daun Sirsak

Kadar ekstrak air daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian pendahuluan menggunakan uji MTT, dimana nilai IC_{50} ekstrak air daun sirsak, doksorubisin, dan tamoksifen terhadap sel kanker payudara masing-masing sebagai berikut 86,029 μ g/mL, 10,3 μ g/mL, dan 16,5 μ g/mL.

3.2.3 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

3.2.3.1 Definisi Konsep Variabel

1. Variable terikat
 - Ekspresi gen VEGF
2. Variable terkendali
 - Konsentrasi sel kanker mammae
 - Medium panen
 - Inkubasi
3. Variable bebas
 - Konsentrasi ekstrak air daun sirsak
 - Konsentrasi tamoksifen
 - Konsentrasi doksorubisin

3.2.3.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Konsep/Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Ekspresi gen VEGF	Ekspresi gen yang dihasilkan di kultur sel T47D	Tingkat ekspresi yang dihitung menggunakan kuantifikasi relatif dengan membandingkan ekspresi VEGF dengan GAPDH sebagai <i>house keeping gene</i> .	<i>real time</i> PCR	Numerik
Konsentrasi ekstrak air daun sirsak	Sediaan kental berupa pasta yang didapat dari proses	$\frac{1}{2}$ IC ₅₀ (43,014 μ g/mL), IC ₅₀ (86,029 μ g/mL),	MTT	Numerik

	pengekstrakan simplisia daun sirsak dengan cara maserasi pelarut air	dan, 2IC50 (172,058 µg/mL)			
Konsentrasi tamoksifen	Dosis tamoksifen yang diberikan pada kultur sel T47D	IC50 (16,5µg/mL)	MTT		Numerik
Konsentrasi doksorubisin	Merupakan antibiotik golongan antrasiklin	IC50 (10,3µg/mL)	MTT		Numerik
Konsentrasi sel kanker payudara	Kultur sel kanker T47D	18 sumuran dengan kepadatan 1,5x10 ⁶ sel/mL	Real time PCR		Numerik
IC50	Konsentrasi yang mampu untuk menghambat 50% pertumbuhan sel	MTT menggunakan reagen <i>microtetrazolium</i>	ELISA reader		Numerik

3.2.3.3 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok didasarkan pada formulasi Gomez. Banyaknya perlakuan adalah 3, sehingga jumlah sampel tiap kelompok adalah :

$$T(r-1) \geq 6$$

$$3(r-1) \geq 6$$

$$3r - 3 \geq 6$$

$$3r \geq 9$$

$$R \geq 3$$

Jumlah minimal sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah 3 buah sampel untuk setiap kelompok perlakuan.

3.2.4 Kelompok

Sel dibagi menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok 3 sample yaitu:

- a) Kelompok I: kultur sel kanker payudara T47D dalam media kultur RPMI
- b) Kelompok I: kultur sel kanker payudara T47D + $\frac{1}{2}$ IC50 ekstrak air daun sirsak dalam media kultur RPMI.
- c) Kelompok III: kultur sel kanker payudara T47D + IC50 ekstrak air daun sirsak dalam media kultur RPMI.
- d) Kelompok IV: kultur sel kanker payudara T47D + 2IC50 ekstrak air daun sirsak dalam media kultur RPMI.
- e) Kelompok V: kultur sel kanker payudara T47D + IC50 doksorubisin dalam media kultur RPMI.
- f) Kelompok VI: kultur sel kanker payudara T47D + IC50 tamoksifen dalam media kultur RPMI.

3.2.5 Prosedur Penelitian

3.2.5.1 Pembuatan Ekstrak Air Daun Sirsak

Daun sirsak yang digunakan adalah dari Manoko herbarium . Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan air, pengekstrakan ini dilakukan dilaboratorium central UNPAD, pembuatan ekstrak dilakukan sesuai dengan prosedur yang ada. Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan air, pengekstrakan ini dilakukan lab central UNPAD. Daun sirsak yang sudah dipanen diambil 1kg lalu dimasukkan ke dalam alat maserasi. Pelarut pengekstraksi dimasukkan sampai simplisia terendam oleh pelarut. Biarkan selama 24jam. Tampung ekstrak di penampung. Ulangi

ekstraksi sampai diperoleh ekstrak cair yang tidak berwarna sampai 3 kali. Ekstrak cair yang diperoleh disatukan dan dipekatkan, diperoleh ekstrak kental.

3.2.5.2 Penumbuhan Sel T47D

Media tumbuh yang digunakan adalah RPMI-164, yaitu medium yang digunakan secara luas untuk menumbuhkan sel mamalia, dengan penambahan 10% FBS, *fungison* 0,5% dan 1% *penisilin-streptomisin*. Konsentrasi sel yang digunakan yaitu $1,5 \times 10^6$ sel/mL ke dalam 18 sumuran masing-masing dimasukan 2mL *suspense* sel. Lalu *microplate* diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ selama 24 jam pada suhu 37 °C sampai 80% sel *subconfluent*.

3.2.5.3 Ekstraksi RNA

Sample sel yang telah disimpan dalam RNA later pada suhu -80 °C diambil dan dicampurkan dengan larutan RNA Isopus dan dihancurkan menggunakan *homogenizier manual*. Homogenate yang telah diperoleh dimasukkan kedalam *Eppendorf*. Tambahkan Qiagen hingga volumenya mencapai 1 mL. lalu tambahkan *chloroform* 0,2 mL dan aduk dengan vortex. Homogenat dilanjutkan dengan *centrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 20 menit. Ambil supernatant yang terbentuk dan pindahkan pada *Eppendorf* baru, dan tambahkan *isopropanolol* sebanyak superatan yang terbentuk dan lakukan pengocokan. Aduk dengan *centrifuge* kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Lalu buang supernatant secara cepat hingga menyisakan *pelletnya* saja. Selanjutnya masukan DEPC 70% dalam etanol 1 mL kedalam

tabung *pallet* tersebut. Lakukan lagi *centrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Buang kembali supernatant dan keringkan hingga tersisa hanya *pellet*. Tambahkan DEPC 30-50 μL hingga *pellet* larut. Lanjutkan dengan proses inkubasi dengan suhu 55°C selama 10 menit. RNA yang terbentuk selanjut disimpan dalam lemari es suhu -80°C . dilanjutkan dengan kuantifikasi RNA. Dengan cara mengambil 2 μL dan gunakan spektrofotometer untuk menganalisisnya. Hasilnya dinilai memiliki kemurnian atau purifikasi yang baik jika nilai λ 260/280 pada kisaran nilai 1,8 -2,00.

3.2.5.4 Pembuatan cDNA

Pembuatan cDNA dilakukan dengan RNA hasil ekstraksi yang telah dikuantifikasi. Total RNA yang dipakai sesuai dengan hasil kuantifikasi dapat diubah menjadi konsentrasi cDNA 1000ng dengan menghitung pengenceran menggunakan *RNAse free water* hingga volume total 12 μL , lalu masukan dalam tabung PCR 0,2 mL. volume *mixture* sebanyak 8 μL .

Pada setiap tabung memiliki RNA sehingga volume total mix yang diperoleh adalah 20 μL . Selanjutnya PCR dilakukan dengan kondisi 30°C selama 10 menit, 42°C selama 60 menit, dan 99°C selama 5 menit. *Complementary DNA* yang sudah terbentuk akan disimpan dalam suhu -20°C .

3.2.6.1 Pemeriksaan real time PCR

Pemeriksaan ini menggunakan kit SYBR[®] FAST qPCR *Master Mix* kemudian tambahkan primer oligonoxleotida dan menggunakan *consensus*

sequences dan *Blast* dari database sesuai genomic NCBI. Komposisi Master mix yang digunakan untuk volume akhir laurtan sebanyak 20 μL adalah PCR water 7,8 μL , SYBR[®] FAST qPCR Master mix Universal 10 μL , 10 μL primer *forward* dan 10 μM primer *resrvse* untuk mengambil VEGF. Selanjutnya PCR dilakukan pada mesin *real time* PCR dengan jumlah siklus, suhu dan waktu yang sesuai dengan optimisasi yang dilakukan sebelumnya untuk masing-masing gen yang diperiksa. siklus PCR beserta waktu dan suhunya sama untuk keseluruhan gen. Initial aktivasi pada suhu 95^o selama 10 menit, 40 siklus PCR dalam suhu 95 ^oC 15 detik , 60 ^oC selama 1 menit, dilanjutkan dengan *melt curve stage* pada suhu 60 ^oC selama 1 menit

3.2.6.2 Perhitungan tingkat ekspresi mRNA

Hasil dari *real time* PCR berupa *Cycle of Treshold* ditentukan untuk setiap promoter yang digunakan V_t ini akan menunjukkan jumlah siklus saat *fluorescence* dari sample melampaui *background* dari *florescence*. Ini menunjukkan bahwa amplifikasi yang terjadi telah melewati ambang. Kuantifikasi relative terhadap gas target ditentukan dengan metode *final fold change calculation*. Nilai C_t dari gen target disesuaikan dengan C_t gen endogen kontrol/kalibrator ini dipilih dari salah satu sample kelompok kontrol, hasil yang diperoleh akan menggambarkan VEGF kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol

3.2.6 Analisis Data

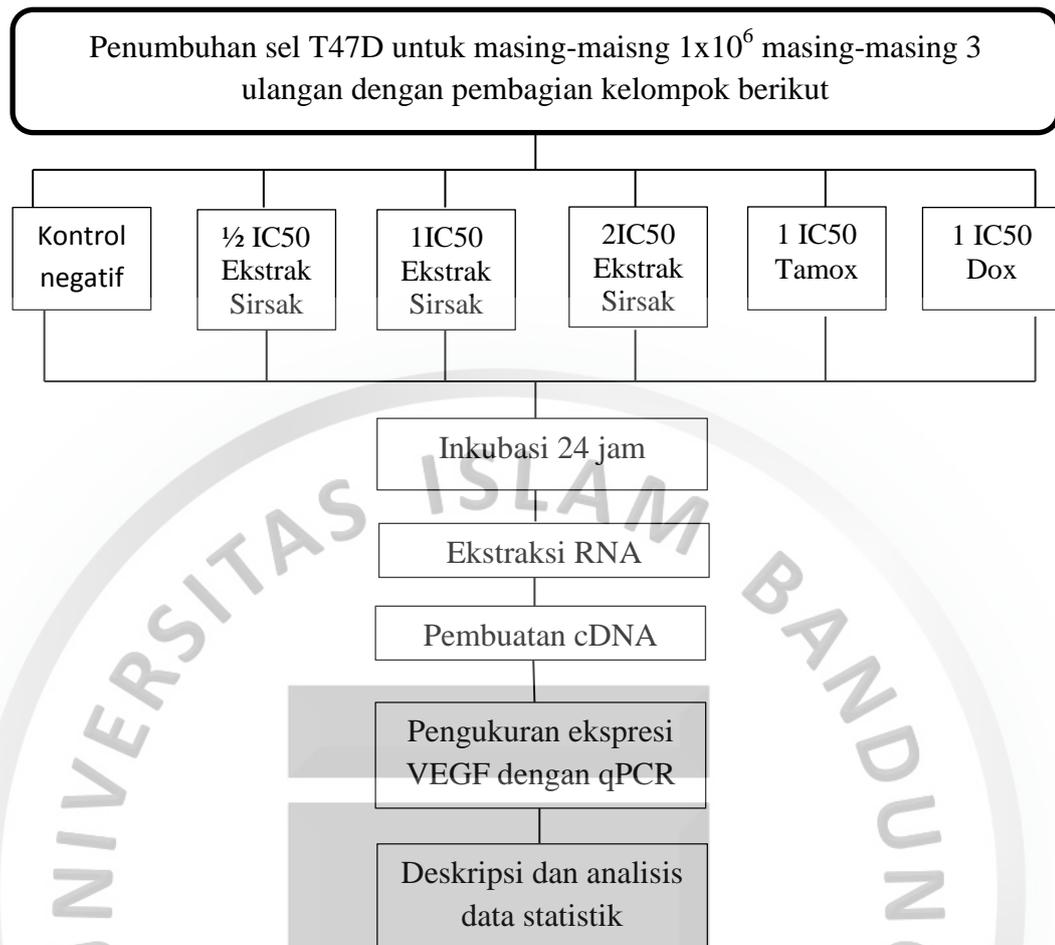
Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS versi 24 dengan nilai $p < 0,05$. Sebelum melakukan analisis statistik untuk menguji hipotesis, keseluruhan data diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sample kurang dari 40. Karena data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji beda menggunakan *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan *Mann Withney*.

3.2.7 Aspek Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan sel T47D yang telah lama disimpan dan dikembangkan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada. Penggunaan sel T47D dalam penelitian ini dilakukan sebaik-baiknya untuk kemajuan ilmu pengetahuan, penelitian dan kepentingan masyarakat dengan mempertimbangkan aspek manusia. Komite etik penelitian Fakultas Kedokteran Islam Bandung telah menyetujui Penelitian ini dengan nomer persetujuan penelitian 95/Komite Etik.FK/IV/2019

3.2.8 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada laboratorium terpadu FKKMK UGM sebagai tempat ekstraksi RNA, pemeriksaan kadar mRNA total, pembuatan cDNA, dan pemeriksaan *real time* PCR. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3. 1 Bagan Alur Kerja