

BAB III SUBJEK/OBJEK/BAHAN PENELITIAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/ Objek/ Bahan 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 Fakultas kedokteran, kesehatan masyarakat dan keperawatan (FKKMK) UGM, dengan 3 kali pengulangan.

Kriteria inklusi:

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

Kriteria ekslusi:

- 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 Bandung.
2. Kultur sel kanker payudara yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
3. Media *Roswell Park Memorial Instituted*.
4. Primer GAPDH *forward* (GAAGGTGAAGGTCGGAGTC).

5. Primer GAPDH *reverse* (GAAGATGGTGATGGGATTTTC).
6. Primer Bcl-2 *forward* (GACAGAAGATCATGCCGTCC).
7. Primer Bcl-2 *reverse* (GGTACCAATGGCACTTCAAG).
8. *Fetal bovine serum*, penisilin, streptomisin, fungizone.
9. Alumunium foil.
10. RNAlater™ *stabilization solution*.
11. Isopropanolol.
12. Kloroform.
13. Diethyl Pyrocarbonate.
14. Alcohol absolut.
15. Aquabidest.
16. Qiyagen.

3.1.3 Alat Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. *Medical Kit Catalogue* no. 717164.
2. Mikropipet terkalibrasi 2000 μL dan 1000 μL .
3. *Centrifuge* Eppendrof 5424R terkalibrasi.
4. *Centrifuge* Hermle.
5. Tabung reaksi kecil.
6. Rak tabung kecil.
7. *6-well plate*.

8. *Elisa reader*.
9. Mikropipet 1 set.
10. *Vortex mixer*.
11. *Conical tube* 15 ml.
12. *White tip*.
13. *Blue tip*.
14. Tisu.
15. Tempat buang untuk media bekas dan PBS.
16. *Laminar flow/PCR cabinet*.
17. Mesin qPCR.

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 payudara T47D dengan rancangan penelitian adalah *randomized post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak air daun sirsak terhadap ekspresi gen Bcl-2 pada kultur sel kanker payudara T47D. Rancangan penelitian menggunakan *simple randomized design* yaitu alokasi perlakuan secara acak untuk dimasukan 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, dimana nilai IC_{50} ekstrak air daun sirsak, doksorubisin, dan tamoksifen terhadap kultur sel kanker payudara T47D masing-masing sebagai berikut: 86,029 $\mu\text{g/mL}$, 10,3 $\mu\text{g/mL}$, 16,5 $\mu\text{g/mL}$. (Yuniarti, data tidak dipublikasi)

3.2.3 Definisi Konsep dan Operasional Variable

3.2.3.1 Definisi Konsep Variable

1. Variable terikat
 - Tingkat ekspresi gen Bcl-2 relatif.
2. Variable terkendali
 - Inkubasi (waktu 24 jam, kadar CO_2 , dan temperatur).
3. Variable bebas
 - Konsentrasi ekstrak air daun sirsak, doksorubisin dan tamoksifen

3.2.3.2 Definisi Operasional Variable

Variabel	Konsep/ Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Kanker payudara	Adalah penyakit yang timbul akibat sel pada payudara berkembang tanpa terkendali ¹⁹ .	-	-	-
Konsentrasi tamoksifen	Dosis tamoksifen yang diberikan pada kultur sel T47D	1 IC_{50}	MTT	Numerik

Konsentrasi ekstrak air daun sirsak	Sediaan kental yang berupa pasta didapat dari proses pengestrakan simplisia daun sirsak yang dilakukan dengan cara maserasi pelarut air	$\frac{1}{2}$ IC ₅₀ 1 IC ₅₀ 2 IC ₅₀	MTT	Numerik
Konsentrasi doksorubisin	Doksorubisin adalah doksorubisin HCL yang merupakan antibiotic golongan antracyclin	1 IC ₅₀	MTT	
Ekspresi gen Bcl-2	Ekspresi gen Bcl-2 pada kultur sel T47D ⁵	Tingkat ekspresi dihitung menggunakan kuantifikasi relative dengan membandingkan dengan ekspresi Bcl-2 dengan GAPDH sebagai <i>housekeeping gene</i>	q-PCR	Numerik
T47D	Merupakan Kultur sel kanker yang berasal dari sel karsinoma duktal pada jaringan payudara dan dapat mewakili hampir seluruh jenis kanker payudara karena mengekspresikan ER dan HER2	-	-	-

3.2.4 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok didasarkan pada formulasi Gomez.

Banyaknya perlakuan (t) adalah 3, sehingga jumlah sampel tiap kelompok (r) 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.

3.2.5 Kelompok Perlakuan

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

- a. kelompok I (kontrol negatif): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI.
- b. kelompok II (perlakuan 1): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI + $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (43,0145 μ g/mL) ekstrak air daun sirsak.
- c. kelompok III (perlakuan 2): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI + 1 IC₅₀ (86,029 μ g/mL) ekstrak air daun sirsak.
- d. kelompok IV (perlakuan 3): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI + 1 IC₅₀ (172,058 μ g/mL) ekstrak air daun sirsak.
- e. kelompok V (perlakuan 3): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI + 1 IC₅₀ (10,3 μ g/mL) doksorubisin.
- f. kelompok VI (perlakuan 3): kultur sel kanker payudara T47 dalam media kultur RPMI + 1 IC₅₀ (16,5 μ g/mL) tamoksifen.

Nilai IC₅₀ yang digunakan berdasarkan uji pendahuluan menggunakan metode MTT. (Yuniarti, data belum dipublikasikan)

3.2.6 Prosedur Penelitian

3.2.6.1 Pembuatan Ekstrak Air Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Daun sirsak yang digunakan adalah dari Manoko herbarium. Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan air, pengestrakan ini dilakukan di Laboratorium central UNPAD, pembuatan ekstrak dilakukan sesuai dengan prosedur yang ada. Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan air, pengestrakan ini dilakukan Lab central UNPAD. Daun sirsak yang sudah dipanen diambil 1kg lalu diekstraksi dengan 8L air dalam suhu 100 °C selama 1,5 jam di dalam *kondensor reflux*. Terus disaring, 90% dari total gabungan filtratnya dipekatkan pd tekanan 50 °C oleh *evaporator*, lalu diisolasi utuk memperoleh hasil 26,3 g ekstrak kering.⁵⁸ cara lain membuat ekstrak air daun sirsak ditimbang dulu 3g dalam 300ml air, dengan suhu 121 derajat °C kemudian di ekstraksi 3x lalu di sentrifuse untuk memperoleh supernatan.⁵⁹

3.2.6.2 Penumbuhan Sel T47D

Media tumbuh yang digunakan adalah RPMI-164 (*Roswell Park Memorial Instituted*), yaitu medium yang digunakan secara luas untuk menumbuhkan sel mamalia, dengan penambahan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), *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 suspensi sel. Lalu *microplate* diinkubasi dalam incubator 5% CO₂ selama 72 jam pada suhu 37 °C sampai 80% sel *subconfluent* (kira-kira 24-48 jam).

3.2.6.3 Ekstraksi RNA

Sampel sel yang telah disimpan dalam RNA later pada suhu -80°C diambil dan dicampurkan dengan larutan RNA Isopus (Qiyagen) dan dihancurkan menggunakan *homogenizier manual (sample pestle)*. Homogenate yang telah diperoleh dimasukkan kedalam *Eppendorf*. Ditambahkan Qiyagen hingga volumenya mencapai 1 mL. Lalu ditambahkan *chloroform* 0,2 mL dan diaduk dengan vortex. Homogenat dimasukkan kedalam *centrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan pada *Eppendorf*, lalu ditambahkan *isopropanolol* sebanyak supernatan yang terbentuk dan dilakukan pengocokan. Masukkan kembali kedalam *centrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang secara cepat hingga menyisakan *pelletnya* saja. Selanjutnya DEPC 70% dimasukkan kedalam etanol 1 mL dalam tabung *pallet* tersebut. Dilakukan kembali *centrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang kembali dan dikeringkan hingga tersisa hanya *pellet*. DEPC ditambahkan sebanyak 30-50 μL hingga *pellet* larut. Dilanjutkan 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 digunakan spektrofotometer (*Nano Vlue Plus*) untuk menganalisisnya. Hasilnya dinilai memiliki kemurnian atau purifikasi yang baik jika nilai λ 260/280 pada kisaran nilai 1,8 -2,00.

3.2.6.4 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 yang terdiri dari:

- 5x buffer 4 μL .
- Random primer 1 μL .
- dNTP 2 μL .
- ReverTraAce 1 μL (Toyobo).

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.

3.2.6.5 Pemeriksaan qPCR

Pemeriksaan ini menggunakan kit SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (2x) kemudian tambahkan primer oligonucleotida dan menggunakan *consensus sequences* dan *Blast* dari *database* sesuai genomik NCBI. Komposisi Master *mix* yang digunakan untuk volume akhir laurtan sebanyak 20 μL adalah PCR *water* 7,8 μL , SYBR[®] FAST qPCR Master *mix* (2x) *Universal* 10 μL ⁶⁰, 10 μL primer *forward* dan 10 μM primer

reverse untuk mengambil BCL-2. Selanjutnya PCR dilakukan pada mesin *real time* PCR (*Applied Biosystem, 7500 Real Time PCR System, USA*) 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. Aktivasi awal (*holding stage*) pada suhu 95°C selama 10 menit, 40 siklus PCR dalam suhu 95°C 15 detik, 60°C selama 1 menit (*cycling stage*), dilanjutkan dengan *melt curve stage* pada suhu 60°C selama 1 menit.

3.2.6.6 Perhitungan Tingkat Ekspresi mRNA

Hasil dari *real time* PCR berupa *Cycle of Treshold* (Ct) ditentukan untuk setiap primer yang digunakan Ct ini akan menunjukkan jumlah siklus saat *fluorescence* dari sampel melampaui *background* dari *fluorescence*. Ini menunjukkan bahwa amplifikasi yang terjadi telah melewati ambang. Kuantifikasi relative terhadap gen target ditentukan dengan metode *final fold change calculation* ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Nilai Ct dari gen target disesuaikan dengan Ct gen endogen kontrol (*housekeeping gen* kalibrator)/ kalibrator ini dipilih dari salahsatu sampel kelompok kontrol, hasil yang diperoleh akan menggambarkan mRNA kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

3.2.7 Analisis Data

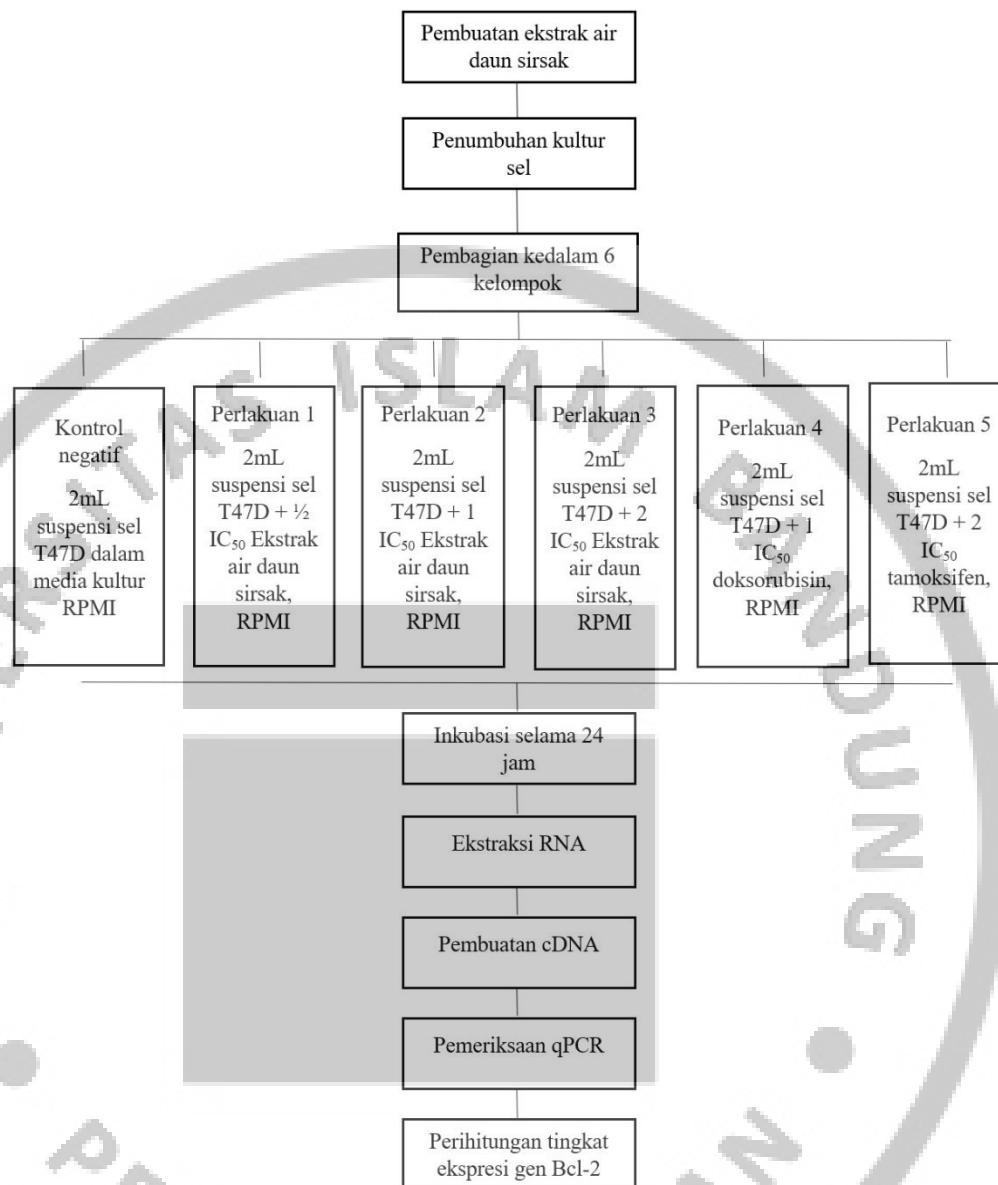
Analisis data pada penelitian ini menggunakan program spss versi 24 (IBM Company) dengan nilai $p \leq 0,05$. Sebelum melakukan analisis statistik untuk menguji hipotesis, keseluruhan data diuji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 40. Karena distribusi data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji beda menggunakan *Kruskall Wallis test* (non-parametrik). Uji *Kruskall Wallis* dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan *Mann Whitney test*.

3.2.8 Aspek Etika

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: Nomor: 23/Komite Etik.FK/IV/2019

3.2.9 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



Gambar 3. 1. Bagan Alur Penelitian