

## BAB V. METODE PENELITIAN

1. Kategori Penelitian  
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental.
2. Variabel Penelitian
  - 1). Variabel bebas : konsentrasi ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan doxorubicin.
  - 2). Variabel kendali : daun dewandaru, waktu uji sitotoksik.
  - 3). Variabel tergantung : aktivitas antiproliferasi dan nilai *combination index*
3. Alat dan bahan
  - 1). Alat  
*Plate 96, flask, blue tip, yellow tip, rangkaian alat soxhlet, waterbath, evaporator, LAF cabinet, inkubator CO<sub>2</sub>, mikro pipet, eppendorf.*
  - 2). Bahan  
Serbuk daun Dewandaru, etil asetat, FBS, doxorubicin, tripsin, fungison, pen-strep, RPMI, DMSO
4. Prosedur penelitian :
  - 1). Pembuatan ekstrak daun dewandaru  
Serbuk daun Dewandaru (80 g) disoxhletasi dengan etil asetat. Selanjutnya filtrat diambil melalui penyaringan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.
  - 2). Uji Sitotoksisitas  
Uji sitotoksisitas dengan metode MTT dilakukan pada plate 96 sumuran terhadap biakan sel yang diberi perlakuan sampel uji. Inkubasi di dalam inkubator dalam waktu 24 jam. Jumlah sel yang hidup dihitung dengan mengukur serapan dengan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran serapan diplotkan kedalam grafik prosentase sel

hidup versus konsentrasi senyawa uji selanjutnya dilakukan penghitungan  $IC_{50}$ . Uji dilakukan individual terhadap masing-masing sampel uji (ekstrak etil asetat daun dewandaru dengan konsentrasi 10-350  $\mu\text{g/mL}$  dan doxorubicin (Dox) dengan konsentrasi 5-100 nM). Luaran tahap ini adalah penentuan  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat daun dewandaru dan agen kemoterapi (Dox).

### 3). Uji Kombinasi

Dibuat seri konsentrasi sampel (ekstrak etil asetat daun dewandaru) dan agen kemoterapi (Dox) untuk perlakuan (termasuk kontrol sel). Seri konsentrasi terdiri dari 4 konsentrasi:  $IC_{50}$ ,  $\frac{3}{4} IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , dan  $\frac{1}{4} IC_{50}$ . Dilakukan uji sitotoksitas dengan metode MTT. Jumlah sel yang hidup dihitung dengan mengukur serapan dengan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Luaran penelitian ini adalah penentuan CI (*Combination index*) (Chou and Talalay, 1983).