

## BAB II METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2021 sampai dengan Juni 2022. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Universitas Nasional Jakarta. Evaporasi, analisis kadar air, analisis fenol total, analisis flavonoid total, analisis daya antioksidan, dan analisis flavonoid HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dilakukan di Laboratorium Biofarmaka Bogor, analisis *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), sedangkan uji *in vitro* dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, Malang.

### B. Instrumen penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji tumbuhan pandan samak (*Pandanus odoratissimus*) matang yang kulit luar buahnya berwarna merah (Gambar 1), yang diperoleh dari Desa Calang, Kabupaten Aceh Jaya, Provinsi Aceh. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Universitas Nasional.



**Gambar 1.** Buah dan biji pandan samak yang digunakan dalam penelitian ini

**Sumber:** *Top Tropicals*

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel preosteoblas MC3T3-E1 *subclone* 4 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plastik tahan panas ukuran 2 kg, kertas saring Whatman *grade* 1 ukuran 125 mm, metanol, larutan Folin Ciocalteu 7,5%, akuades, serbuk NaOH, larutan NaOH 1%, larutan baku asam galat, metanol p.a, larutan HMT (larutan heksametilentetramin 0,5% b/v), larutan HCl 25%, larutan asam asetat glasial (larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol), larutan AlCl<sub>3</sub> (larutan AlCl<sub>3</sub> 2% dalam larutan asam asetat glasial), larutan aseton, larutan etil asetat, kuersetin, *DPPH* (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), etanol p.a, vitamin C, dimetil sulfoksida (DMSO), larutan asam klorida 6 M, larutan *tertiary butyl hydroxyquinoline* (TBHQ), larutan asam format 0,2 %, larutan standar apigenin (kemurnian 95%), mirisetin (kemurnian 96%), kaempferol (kemurnian 97%), luteolin (kemurnian 97%), rutin (kemurnian 94%), dan kuersetin (kemurnian 95%), asetonitril (ACN) LC-grade, *solvent* A (H<sub>2</sub>O + asam format 0,1%), *solvent* B (ACN + 0,1% FA), alkohol 70%, MEM alpha, *fetal bovine serum* (FBS), Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin), tripsin-EDTA, *phosphate buffer saline* (PBS), air steril, *trypan blue*, reagen MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), aluminium foil, paraformaldehida (PFA), Triton X-100, *bovine serum albumin* (BSA), antibodi ALP, *anti mouse rhodamine*.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, *cutter* L-500, blender Philips HR2116, blender herb NEWTRY, ayakan 40 mesh dan 60 mesh, wadah plastik, timbangan duduk, erlenmeyer 1000 dan 2000 mL, gelas ukur 1000 mL, *beaker glass*, spatel, botol coklat, corong kaca, botol timbang bertutup, eksikator, oven, neraca analitik, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi, vorteks, alat sentrifugasi, spektrofotometer, labu alas bulat, refluks, corong pisah, *microplate*, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) reader, HPLC LC-20AD, LCMS/MS Xevo G2-XS QtoF, *laminar air flow* (LAF), botol duran, *conical tube* 50 mL, *conical tube* 15 mL, *conical tube rack*, mikropipet *adjustable* 100 µl – 1000 µl, mikropipet 10 µl dan 20 µl, pipet volume 10 mL, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *waterbath*, lemari pendingin, *freezer* -80 °C, *cell culture dish*, mikroskop *inverted*, inkubator CO<sub>2</sub>,

*microtube, cryotube, magnetic stirer, autoklaf, minisart syringe filter 0,22 µm, squid syring 10 cc, stopwatch, mixer, hemositometer, counter, 96-well plate, 24-well plate, cover slip bulat, cover slip 24 x 60 mm, Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus FluoView 1000.*

**Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)**

No	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1	Konsentrasi ekstrak biji pandan samak	Konsentrasi ekstrak metanol biji pandan samak yang diperlakukan terhadap kultur sel preosteoblas MC3T3-E1.	Hasil pengukuran	ppm
2	Aktivitas sitotoksik	Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol biji pandan samak terhadap kultur sel preosteoblas MC3T3-E1 yang ditentukan dengan metode MTT yang hasilnya diukur dengan ELISA <i>reader</i> .	Hasil pengukuran	ppm
3	Aktivitas ALP	Hasil pengukuran aktivitas alkalin fosfatase (ALP) kultur sel preosteoblas MC3T3-E1 setelah diberikan ekstrak metanol biji pandan samak yang diukur dengan CLSM ( <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> ) Olympus FluoView 1000.	Hasil pengukuran	U/L

## **C. Cara kerja**

### **1. Pembuatan simplisia biji pandan samak (*Pandanus odoratissimus*)**

Buah pandan samak matang yang kulit luar buahnya berwarna merah, dikupas daging buahnya hingga didapatkan bijinya, kemudian dikeringkan selama 7 hari (tidak boleh terkena sinar matahari langsung). Biji yang sudah kering dipecahkan dan diblender berulang hingga halus, disaring dengan ayakan 60 mesh, lalu ditimbang keseluruhan serbuk simplisia yang dihasilkan. Serbuk simplisia yang didapatkan sejumlah 2.200 g. Serbuk simplisia tersebut dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk dilakukan ekstraksi dan dilakukan pengujian lebih lanjut.

### **2. Pembuatan ekstrak metanol biji pandan samak (*Pandanus odoratissimus*)**

Pada proses ini dilakukan tiga kali maserasi, yaitu 5 x 24 jam untuk satu kali maserasi sehingga total waktu yang dibutuhkan untuk tiga kali maserasi, yaitu 15 hari dan setiap harinya dilakukan dua kali pengadukan pada pukul 12.00 dan 16.00 WIB. Maserasi dilakukan dengan menggunakan perbandingan serbuk simplisia : metanol sebanyak 1 : 3. Maserasi pertama dilakukan dengan menggunakan metanol sebanyak 6.600 mL, maserasi kedua dengan metanol sebanyak 3.300 mL, dan maserasi ketiga dengan metanol sebanyak 1.650 mL. Setiap hasil maserasi disaring dengan kertas saring Whatman *grade* 1. Hasil maserasi pertama, kedua, dan ketiga digabungkan dan disimpan di dalam botol coklat bertutup. Hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental.

### **3. Analisis kadar air**

Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Cawan bertutup dipanaskan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 30 menit. Setelah 30 menit,

cawan bertutup dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang bobot kosongnya menggunakan neraca analitik. Sampel sebanyak 10 g ditimbang dengan cawan bertutup yang sudah diketahui bobot kosongnya. Cawan yang berisi sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 5 jam. Selanjutnya, cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang. Kemudian dilakukan pengeringan kembali pada selang waktu 1 jam, dan setelah itu ditimbang kembali. Hal ini dilakukan berulang sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000). Perhitungan hasil analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar air} = \frac{W - (W1 - W2)}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W = bobot contoh sebelum dikeringkan (gram)

W1 = bobot contoh + cawan setelah dikeringkan (gram)

W2 = bobot cawan kosong yang sudah dipanaskan (gram)

#### **4. Analisis kadar fenol total**

Analisis kadar fenol total dilakukan dengan metode Folin Ciocalteu. Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak ke dalam labu ukur 25 mL kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. Campuran tersebut dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi Folin Ciocalteu 7,5% sebanyak 5 mL, divorteks dan diinkubasi di ruang gelap ± 8 menit. Setelah itu, ditambahkan NaOH 1% sebanyak 4 mL, divorteks dan diinkubasi di ruang gelap selama 1 jam. Selanjutnya, serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 730 nm dengan pembanding asam galat (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

## 5. Analisis kadar flavonoid total

Analisis kadar flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri aluminium klorida sebagaimana yang dilakukan para peneliti lain (Pine *et al.*, 2015; Prabowo, 2020; Soares *et al.*, 2003; Zulharmita *et al.*, 2017). Dibuat larutan induk dengan cara ditimbang ekstrak sebanyak 200 mg lalu dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambah dengan 1 mL larutan heksametilentetramin (HMT), 20 mL aseton, dan 2 mL larutan HCl. Dilakukan hidrolisis dengan cara direfluks selama 30 menit. Setelah itu, campuran disaring menggunakan kapas, lalu filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Residu direfluks kembali dengan 20 mL aseton selama 30 menit, disaring dan filtrat dicampur ke dalam labu ukur 100 mL. Campuran filtrat dalam labu ukur ditambah dengan aseton sampai 100 mL. Diambil 20 mL filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah 20 mL air, dan diekstraksi 3 kali masing-masing dengan 15 mL etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan ditambah dengan etil asetat sampai 50 mL dalam labu ukur.

Untuk membuat larutan sampel, larutan induk dimasukkan sebanyak 10 mL ke dalam labu ukur 25 mL, lalu ditambahkan 1 mL aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% dan asam asetat 5% sampai 25 mL. Setelah dihomogenkan, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $25^\circ\text{C}$ . Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm dengan pembanding kuersetin.

## 6. Analisis daya antioksidan

Analisis daya antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sebagaimana yang dilakukan para peneliti lain (Aranda *et al.*, 2011; Palupi dan Widyanto, 2020; Sagala dan Ripaldo, 2020; Sasmita *et al.*, 2021). Larutan stok DPPH 125  $\mu\text{m}$  dibuat dengan cara ditimbang DPPH sebanyak 2,5 mg, dilarutkan dengan etanol p.a di dalam labu ukur, dan ditambah etanol p.a. hingga volume 50 mL. Kemudian, labu ukur dilapisi dengan aluminium foil. Selanjutnya, dilakukan preparasi sampel dan vitamin C

dengan cara ditimbang sampel dan vitamin C, masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg. Kemudian, dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1 ml, disonikasi hingga larut, dan divorteks.

Setelah itu, sampel dan vitamin C yang telah disiapkan dimasukkan sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam *microplate*, kemudian ditambahkan DPPH sebanyak 100  $\mu$ L. Pada pengukuran blanko, blanko ulangan 1 dan 2 hanya berisi 100  $\mu$ l etanol p.a dan ditambahkan DPPH sebanyak 100  $\mu$ l. Untuk kontrol negatif hanya digunakan etanol p.a sebanyak 100  $\mu$ L. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu ruang dalam kondisi gelap selama 30 menit. Lalu diukur serapannya menggunakan alat ELISA pada panjang gelombang 517 nm.

## **7. Analisis flavonoid menggunakan HPLC**

Analisis flavonoid menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), dilakukan untuk menganalisis senyawa bioaktif, sebagaimana yang dilakukan para peneliti lain (Khuluk *et al.*, 2021). Ekstrak ditimbang secara akurat sebanyak 1 g, disonikasi dengan larutan HCl 6 M sebanyak 5 mL dan *tertiary butylhydroquinone* (TBHQ) sebanyak 20 mL selama satu jam pada suhu kamar. Setelah itu, disaring melalui filter membran 0,45 mm sebelum disuntikkan ke perangkat HPLC-DAD. Larutan stok standar apigenin, kaempferol, luteolin, mirisetin, rutin, dan kuersetin disiapkan dalam metanol pada konsentrasi 1000 g/mL. Jumlah yang tepat dari setiap larutan stok standar dicampur dan diencerkan dengan metanol untuk mendapatkan enam konsentrasi larutan standar kerja dari enam analit untuk membangun kurva kalibrasi yang relevan.

## **9. Analisis ekstrak menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS)**

Analisis LCMS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif sebagaimana yang dilakukan para peneliti lain (Nascimento *et al.*, 2021; Waters, 2013). Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 1 mL metanol (MeOH) atau asetonitril LC-grade (sesuai kelarutan sampel), kemudian sampel disonikasi selama 5 menit. Selanjutnya, larutan disentrifugasi 10.000 rpm untuk memisahkan padatan yang tidak larut (apabila larut sempurna tidak perlu

disentrifugasi), larutan ini disebut sebagai larutan stok. Larutan stok diencerkan dengan mengambil 100  $\mu$ L sampel kemudian diencerkan dengan MeOH atau ACN LC grade hingga volume akhir 1 mL dalam vial ukur dan sampel siap diinjeksikan pada alat Xevo G2-XS QToF.

Preparasi *instrument* dilakukan dengan dipersiapkan terlebih dahulu *solvent* yang akan digunakan, yaitu solvent A (H<sub>2</sub>O + 0,1 % Formic Acid (FA)) dan solvent B (ACN + 0,1% FA atau MeOH + 0,1 % FA). Eluen ini berperan sebagai fasa gerak. Kemudian masuk ke dalam aplikasi UNIFI, *instrument* dalam keadaan *standby* kemudian klik ‘*switch to operate*’. Setelah itu, dinyalakan lampu *source* dan *temperature* sampel dan kolom diatur. Dilakukan manual *tuning* untuk melihat apakah pada saat dijalankan rentang kalibrasi massa masih dalam rentang yang dapat ditoleransi (0.1mDa).

Pengambilan data dilakukan dengan cara dipilih *menu create* pada UNIFI menu utama, kemudian dipilih *create analysis by acquiring new data*, dipilih *create new sample list*, dipilih *analysis method* yang dibuat pada prosedur sebelumnya, lalu diberi nama *file* dan dipilih lokasi penyimpanan. Analisis metode pengujian diedit dengan memilih jenis kolom yang digunakan, lalu dipilih *solvent* sesuai yang akan digunakan pada line A1;B1;A2;B2 atau kombinasinya. Ditentukan juga metode elusi yang diinginkan (*gradient* atau isokratik) melalui *gradient setting*. Pada menu *acquire*, dipilih posisi sampel yang diinginkan, ditentukan volume injeksi yang diinginkan. Lalu diklik kanan pada sampel, dipilih menu *run selected sampel*. Sampel akan dianalisis sesuai waktu yang telah ditentukan.

## 10. Uji *In Vitro* Sel Preosteoblas MC3T3-E1

### a. Pembuatan media *complete*

Media *complete* mengandung 1% Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin) dan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Media *complete* dibuat dengan cara, dipipet 500  $\mu$ l larutan Pen-Strep dan 5 mL FBS, kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 mL. Selanjutnya, ditambahkan 44,5 mL media cair *Minimum Essential Medium Alpha* (MEM



α) konsentrasi 1 kali. Setelah itu, dihomogenkan agar tercampur merata dan diberi label (Maulida, 2018).

#### **b. Thawing sel preosteoblas MC3T3-E1**

*Thawing* sel preosteoblas MC3T3-E1 dilakukan mengikuti protokol persiapan kerja *in vitro* di laboratorium. Disiapkan aliquot media *complete* yang sesuai untuk sel, yaitu 5 mL media *complete* dalam *conical tube* baru. Dimasukkan *dish* untuk kultur dan diberi penandaan terlebih dahulu meliputi nama sel dan tanggal. Diambil ampul (*cryotube*) yang berisi sel dari *freezer* -80 °C. Suspensi sel dalam *cryotube* dicairkan menggunakan *waterbath* pada suhu 37 °C. Lalu suspensi sel dipipet dengan mikropipet 1000 µl kemudian dimasukkan secara perlahan ke dalam media *complete* yang telah disiapkan. *Conical tube* ditutup rapat, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 7 menit.

Selanjutnya pekerjaan dilakukan kembali di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). *Conical tube* dan tangan disemprot dengan alkohol 70%. *Conical tube* dibuka lalu dituang supernatan ke dalam pembuangan. Kemudian, media *complete* ditambahkan sebanyak 1 mL dan diresuspensi hingga homogen. Suspensi sel ditransfer ke dalam *dish*. Lalu media *complete* sebanyak 3 ml ditambahkan ke dalam *dish*, dihomogenkan, dan diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Sel disimpan di dalam inkubator (Habibah, 2018).

#### **c. Penggantian media**

Media lama dibuang secara perlahan dengan mikropipet. Setelah itu, dimasukkan 4 mL media *complete* ke dalam *dish* yang berisi sel. Dihomogenkan dan diamati kondisi serta jumlah sel pada mikroskop *inverted*. Selanjutnya, diinkubasi selama 24 jam dan media *complete* diganti apabila sudah berwarna merah pucat (Sorenggani, 2014).

#### **d. Subkultur sel preosteoblas MC3T3-E1**

Sel dari inkubator diambil lalu diamati kondisi sel menggunakan mikroskop. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Media lama dibuang dengan menggunakan mikropipet, lalu sel dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak dua kali. Ditambahkan 1 mL tripsin-EDTA secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 2 menit. Ditambahkan 2 mL media *complete* untuk menonaktifkan tripsin. Kemudian, keadaan sel diamati menggunakan mikroskop. Diresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Campuran 1 mL tripsin EDTA dan 2 mL media *complete* dipipet, lalu dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 mL. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 7 menit.

Selanjutnya, pekerjaan dilakukan kembali di dalam *laminar air flow* (LAF). *Conical tube* dan tangan disemprot dengan alkohol 70%. *Conical tube* dibuka, lalu dituang supernatan ke dalam pembuangan. Kemudian, ditambahkan 2 mL media *complete* dan diresuspensi hingga homogen. Masing-masing 1 ml suspensi sel ditransfer ke dalam 2 *dish*. Lalu masing-masing ditambahkan 3 mL media *complete* ke dalam *dish*, dihomogenkan, dan kondisi sel diamati dengan mikroskop *inverted*. Selanjutnya, sel disimpan di dalam inkubator (Huzeiry, 2020).

#### **e. Panen sel preosteoblas MC3T3-E1**

Panen sel preosteoblas MC3T3-E1 dilakukan mengikuti protokol persiapan kerja *in vitro* di laboratorium. Sel diambil dari inkubator, lalu kondisi sel diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Media lama dibuang dengan menggunakan mikropipet kemudian sel dicuci dengan 1 mL PBS sebanyak 2 kali. Kemudian, 1 mL tripsin-EDTA ditambahkan secara merata, lalu diinkubasi di dalam inkubator selama 2 menit. Media *complete* ± 2 mL ditambahkan untuk menonaktifkan tripsin, lalu keadaan sel diamati di mikroskop. Selanjutnya,

diresponsensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Sel yang telah lepas satu per satu ditransfer ke dalam *conical tube* baru (Hidayat, 2017).

#### f. Perhitungan sel preosteoblas MC3T3-E1

Sel diresponsensi pada *conical tube* dari hasil panen sel. Panenan sel sebanyak 10  $\mu$ l, dipipet dan dimasukkan ke dalam hemositometer, lalu sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* menggunakan *counter*. Sel pada 4 kamar hemositometer dihitung. Sel yang gelap atau mati dan sel yang berada dibatas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung sedangkan sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Dihitung jumlah sel per mL dengan rumus seperti dibawah ini.

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Kemudian, dihitung jumlah total sel yang diperlukan. Sel yang ditanam pada tiap sumuran *96-well plate* adalah 10.000 sel. Setelah itu, dihitung volume panenan sel yang diperlukan dengan rumus berikut:

$$\text{Volume panenan sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung /mL}}$$

Selanjutnya, diambil volume panenan sel yang ditransfer, lalu dimasukkan ke dalam *conical tube* baru. Ditambahkan media *complete* sampai total volume yang diperlukan. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100  $\mu$ l media *complete* berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100  $\mu$ l x 90 sumuran = 9 mL. Selain itu, pada sel yang akan ditanam untuk perlakuan, ditransfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *conical tube* yang lain dan ditambahkan media

*complete* sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki. Sisa suspensi sel dilakukan *cryopreservation* atau dilakukan subkultur (Rahmawati, 2015).

#### **g. Induksi proliferasi dan diferensiasi osteoblas**

Untuk menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel-sel preosteoblas MC3T3-E1, ke dalam media kultur ditambahkan asam askorbat (50 µg/mL) (Wang *et al.*, 1999). Selanjutnya, sel diinkubasi di dalam inkubator dan dilakukan penggantian media setiap 3 hari sekali.

#### **h. Uji sitotoksik ekstrak metanol biji pandan samak terhadap sel preosteoblas MC3T3-E1**

Sel diambil dari inkubator lalu diamati kondisi sel. Kultur sel digunakan dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Sel dipanen, lalu dihitung jumlah sel, dan dibuat pengenceran sel dengan media *complete* sesuai kebutuhan. Sel ditransfer ke dalam 96-*well plate*, masing-masing sumuran dimasukkan 100 µl lalu disisakan 5 sumuran yang kosong untuk blanko dan 5 sumuran yang kosong untuk kontrol media. Setiap mengisi 5 sumuran, sel diresuspensi kembali agar tetap homogen. Keadaan sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan dilakukan dokumentasi. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama semalam.

Perlakuan sel dengan ekstrak metanol biji pandan samak dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal. Apabila dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, dilakukan inkubasi kembali. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi ekstrak metanol biji pandan samak untuk perlakuan pada sel dengan konsentrasi 3,125 ppm, 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm dan kontrol pelarut yang berisi 6 µl DMSO dalam 600 µl *media complete*.

*Plate* yang telah berisi sel dari inkubator diambil, lalu media sel dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180° di atas pembuangan dengan jarak 15 cm. Kemudian, *plate*

ditekan secara perlahan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Selanjutnya, PBS sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam semua sumuran yang berisi sel. Lalu, PBS dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180° di atas pembuangan dengan jarak 15 cm. Kemudian, *plate* diletakkan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Pada kontrol sel dimasukkan masing-masing 100 µl media *complete* ke dalam 5 sumuran. Pada kontrol pelarut dimasukkan DMSO dalam media *complete*, masing-masing 100 µl ke dalam 5 sumuran. Seri konsentrasi ekstrak metanol biji pandan samak dimasukkan masing-masing 100 µl ke dalam 5 sumuran. Lalu, diinkubasi di dalam inkubator selama 48 jam. Menjelang akhir waktu inkubasi, kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan.

Reagen MTT disiapkan dengan cara 0,005 gram reagen MTT dilarutkan dalam 1 mL PBS, lalu ditambah *media complete* sampai 10 mL. Media sel dibuang, lalu dicuci dengan PBS dengan cara 100 µl PBS dimasukkan ke dalam semua sumuran yang berisi sel. PBS dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180° di atas pembuangan dengan jarak 15 cm. Kemudian, *plate* diletakkan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Selanjutnya, reagen MTT 100 µl ditambahkan ke setiap sumuran yang berisi sel dan kontrol media (tanpa sel). Sel diinkubasi selama 4 jam didalam inkubator. Inkubasi dilakukan sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop *inverted*. Setelah itu, ditambahkan *stopper* berupa DMSO. *Plate* dibungkus dengan aluminium *foil*, lalu digoyangkan selama 30 menit menggunakan *mixer*. Kemudian, masing-masing kontrol media, kontrol sel, kontrol pelarut, dan seri konsentrasi sampel dipindahkan ke *96-well plate* yang baru dengan posisi yang sama.

ELISA *reader* dihidupkan, lalu ditunggu proses *progressing* hingga selesai. Pembungkus dan tutup *plate* dibuka, lalu *plate* dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Kemudian, absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm dengan cara ditekan tombol *start*. Setelah selesai, ELISA *reader* dimatikan. Dari nilai absorbansi dihitung persentase sel hidup, lalu dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan Excell (regresi linier dari log konsentrasi) atau SPSS (probit atau logit) (Anandea, 2019).

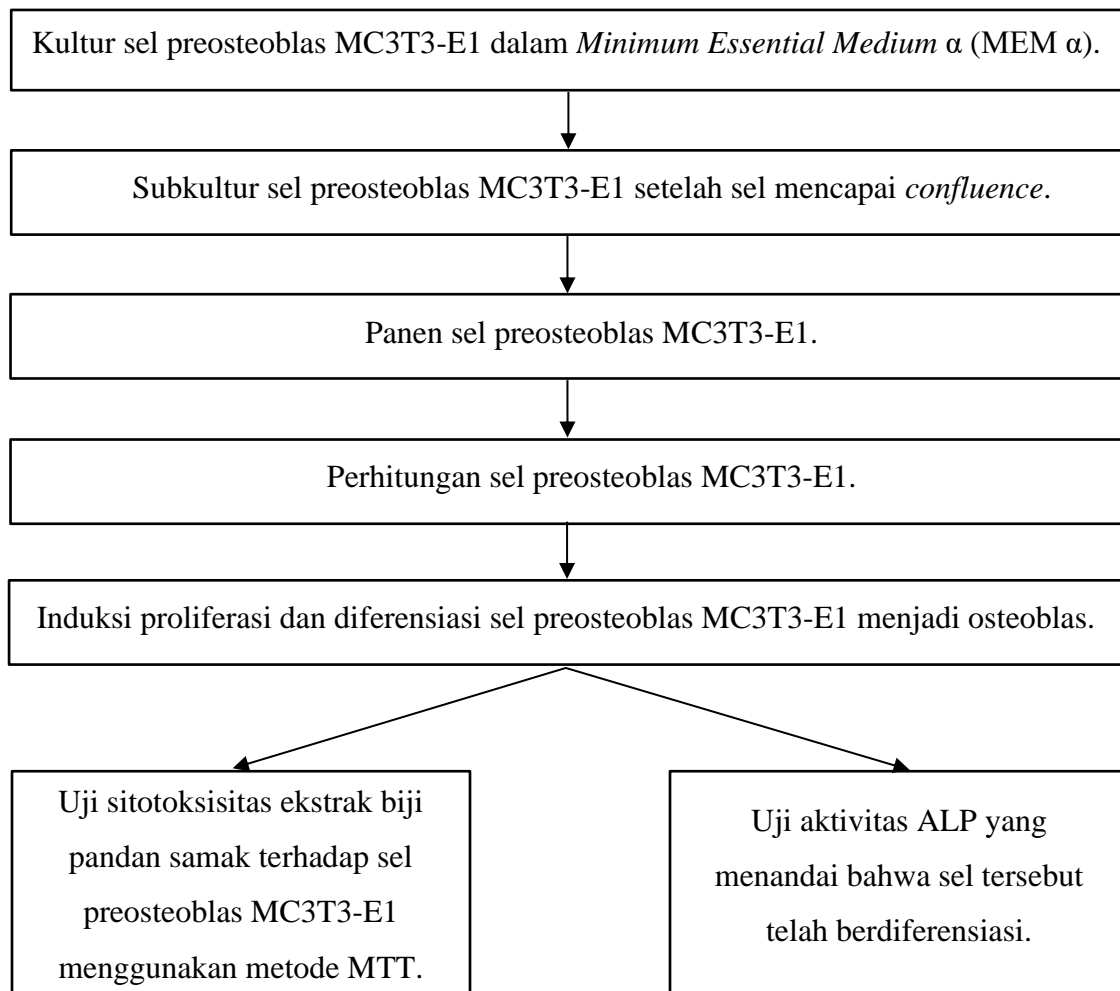
**i. Uji pengaruh ekstrak metanol biji pandan samak terhadap aktivitas ALP kultur sel preosteoblas MC3T3-E1**

Sel preosteoblas MC3T3-E1 diambil dari inkubator lalu diamati kondisi sel. Kultur sel digunakan dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Sel dipanen, lalu dihitung jumlah sel, dan dibuat pengenceran sel dengan media *complete* sesuai kebutuhan. Sebelum sel ditransfer ke dalam *24-well plate*, ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan *cover slip* bulat. Kemudian, ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan 300  $\mu$ l pengenceran sel dengan media *complete*. Keadaan sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan dilakukan dokumentasi. Lalu, sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam, keadaan sel diamati di bawah mikroskop *inverted*, apabila sel sudah menempel pada dasar sumuran dilakukan penggantian media *complete* dan sel diinkubasi di dalam inkubator.

Larutan sampel dibuat dengan cara, ekstrak metanol biji pandan samak sejumlah 0,0025 g dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 mL. Kemudian, ditambahkan 50  $\mu$ l DMSO dan dilarutkan dengan bantuan vorteks. Setelah itu, ditambahkan air steril sampai 5 mL. Selanjutnya, larutan sampel untuk perlakuan dibuat seri konsentrasi ekstrak metanol biji pandan samak untuk perlakuan pada sel dengan konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm. Selain itu, terdapat kontrol negatif berupa media *complete*.

Apabila sel sudah 80% konfluen, larutan sampel dari beberapa konsentrasi dimasukkan ke dalam *microplate 24-well* yang berisi sel preosteoblas MC3T3-E1, masing-masing dilakukan replikasi tiga kali. Kemudian, diinkubasi selama 48 jam. Setelah diinkubasi selama 48 jam, media dalam *microplate 24-well* dibuang, lalu sel dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Setelah itu, sel difiksasi dengan paraformaldehida 4% dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya, ditambahkan 0,25% Triton X-100 dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan ditambahkan dengan *blocking buffer* (5% *bovine serum albumin* dalam PBS) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Selanjutnya, ditambahkan antibodi primer (anti *mouse* ALP) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4 °C. Kemudian, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Setelah itu, ditambahkan antibodi sekunder (anti *mouse rhodamine*) dan ditunggu selama 1 jam pada suhu ruang dalam keadaan gelap. Lalu, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Analisis dilakukan dengan metode imunositokimia menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) Olympus FluoView 1000 pada panjang gelombang 488 nm (Aditama *et al.*, 2016; Ma'arif *et al.*, 2018). Alur uji aktivitas osteopotesis ekstrak metanol biji pandan samak disajikan dalam Gambar 2.



**Gambar 2.** Alur uji aktivitas antiosteoporosis

#### **D. Analisis data**

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dari analisis fitokimia kuantitatif dan analisis daya antioksidan ekstrak biji pandan samak dibuat dalam bentuk tabel kemudian hasilnya dijelaskan secara deskriptif. Uji aktivitas sitotoksik dengan metode MTT dianalisis menggunakan excel (regresi linear dari log konsentrasi). Uji aktivitas alkalin fosfatase (ALP) dianalisis dengan metode analisis varians satu arah, apabila terjadi perbedaan signifikan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Hasil uji ALP dibuat dalam bentuk diagram batang yang direpresentasikan sebagai *mean  $\pm$  standard error of mean (SEM)*.