

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif eksperimental laboratorik dengan penelitian yang akan dilakukan secara in vitro menggunakan kultur sel kanker kolon (WiDr).

B. Populasi dan Sampel

Populasi diambil dari kultur sel kanker kolon (WiDr) yang sebelumnya dilakukan. Sel kolon (WiDr) adalah pertumbuhan tumor yang bersifat ganas dan merusak sel DNA dan jaringan sehat di sekitar kolon dan rektum. Proses terbentuknya kanker kolon ini melibatkan akumulasi dari defek genetik, modifikasi protein dan interaksi sel dengan matriks pada sel epitel kolon (Tedja dan Abdullah, 2013).

C. Sampel dan Pengulangan

1. Ekstrak Daun Teh hitam (*Camellia sinensis*)

Ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) diperoleh dari dalam lemari laboratorium Teknologi Farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Sel Kanker Kolon (WiDr)

Sel kanker kolon (WiDr) yang didapatkan dari *Cancer Chemoprevention Research Center* Universitas Gadjah Mada.

3. Pengulangan

a. Uji Sitotoksik

Pada uji sitotoksik terdapat 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari kontrol negatif yaitu berisi sel kanker WiDr yang tidak di beri perlakuan, kontrol positif yaitu berisi sel kanker WiDr yang di beri perlakuan doxorubicin, dan 4 perlakuan senyawa uji yang berisi sel kanker WiDr di campur ekstrak teh hitam (*Camellia sinensis*). Pada tiap-tiap perlakuan control akan dilakukan tiga kali pengulangan. Sedangkan pada larutan uji dilakukan menggunakan dosis 80-500 µg/mL. Pada masing-masing perlakuan akan dilakukan 7 kali pengulangan.

b. Uji migrasi

Pada penelitian ini akan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada tiap-tiap kelompok sel kanker. Kelompok 1 adalah sel kanker sebagai kontrol negatif yaitu, sel kanker yang tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok 2 adalah sel kanker yang diberikan ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) dengan dosis $1/8$ IC₅₀, $1/4$ IC₅₀, $1/3$ IC₅₀, $1/2$ IC₅₀, IC₅₀. Kelompok 3 adalah kontrol positif yaitu berisi sel kanker WiDr yang di beri perlakuan $1/2$ doxorubicin.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) diperoleh dari dalam lemari laboratorium Teknologi Farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Uji migrasi sel kanker colon (WiDr) dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

E. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

Penelitian ini terdiri dari variable bebas dan variable terikat, yaitu :

- a. Variabel bebas : ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*)
- b. Variabel terikat : kemampuan migrasi sel kanker kolon (WiDr)

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) diperoleh dari dalam laboratorium Teknologi Farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- b. Sel kanker kolon WiDr adalah turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Palozza *et al.*, 2005). *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penanganannya serta memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, sel kanker yang dipakai ini dikhususkan sel kanker colon (WiDr) yang dikultur di laboratorium Kultur Jaringan *In Vitro* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- c. Uji Sitotoksik berdasarkan protokol uji sitotoksik suatu ekstrak yang digunakan oleh *Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC)* Universitas Gadjah Mada adalah uji kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik yang diberikan. Senyawa toksik yang dipakai dalam penelitian ini adalah ekstrak daun teh hitam.

Metode uji sitotoksik pada penelitian ini menggunakan *MTT Assay*, yaitu metode yang memiliki prinsip dasar mereduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) oleh *system reductase*. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan Kristal berwarna yang kemudian diukur absorbansi menggunakan *ELISA reader*.

- d. Migrasi sel adalah proses yang diamati dalam penelitian dengan menghitung jarak yang ditempuh oleh sel kanker kolon WiDr yang telah diberi ekstrak etanol daun teh hitam untuk berpindah menuju ke tempat tertentu dan waktu tertentu yang berada di bidang pandang peneliti.

F. Instrumen Penelitian

1. Uji Sitotoksik

- a. Alat penelitian :
 - 1) Media Kultur sel RPMI
 - 2) Pipet tip *yellow* atau *blue*
 - 3) *Well plate* 96
 - 4) *ELISA reader*
 - 5) Mikropipet
 - 6) Inkubator CO₂
- b. Bahan penelitian :
 - 1) *Phospat Buffer Saline*
 - 2) Media Kultur RPMI

- 3) DMSO
- 4) MTT 5 mg/mL, PBS (50 mg MTT dan 10 mL PBS)
- 5) SDS 10% dalam 0,1 N HCL
- 6) Tissue

2. Uji migrasi

- a. Alat penelitian :
 - 1) Media Kultur sel RPMI
 - 2) Pipet tip *yellow*
 - 3) *Software image pro-plus ImageJ*
 - 4) Mikroskop *Inverted*
 - 5) Inkubator
 - 6) Video Kamera
 - 7) Well plate 24
- b. Bahan penelitian :
 - 1) Larutan ekstrak daun teh dengan kadar 10 mL
 - 2) Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - 3) Media Kultur RPMI
 - 4) Kultur sel kanker colon (WiDr)
 - 5) Ekstrak Daun Teh Hitam (*Camellia sinensis*)

G. Cara Kerja Penelitian

1. Uji Sitotoksik

- a. Ambil sel dari inkubator CO₂ dan amati kondisi sel.

- b. Hitung jumlah sel dengan hemositometer dan buat pengenceran dengan MK sesuai kebutuhan mengikuti protokol perhitungan sel.
- c. Transfer sel ke dalam masing-masing *well plate* dengan kepadatan sel 5×10^3 sel/sumuran.
- d. Tambahkan ekstrak komplit RPMI ke dalam masing-masing sumuran
- e. Tambahkan campuran ekstrak ethanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) dengan 4 konsentrasi yang masing-masing bernilai 80, 160, 320 dan 500 $\mu\text{g/mL}$.
- f. Inkubasi selama 24 jam.
- g. Buang media sel, kemudian tambahkan reagen MTT, ke setiap sumuran, termasuk control media. Inkubasi lagi selama 24 jam.
- h. Periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazon telah terbentuk, tambahkan stopper 100 $\mu\text{g/mL}$, SDS 10% dalam 0,1 N HCL.
- i. Hidupkan ELISA *reader*, baca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 595 nm, lalu tekan start.
- j. Kemudian baca hasil yang telah di ujikan dengan ELISA.

2. Uji migrasi

- a. Ambil sel dari incubator dan amati kondisi sel.
- b. Hitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer.
- c. Siapkan 24 well plate
- d. Tanam sel dalam incubator sampai kepadatan 5×10^4 sel/sumuran.
- e. Inkubasi sel dalam inkubator sampai kepadatan mencapai 80%.

- f. Setelah diinkubasi 24 jam cuci sel dengan menggunakan PBS 1%.
- g. Buat *scratch* dengan *yellow tip* secara tegak lurus.
- h. Masukkan media kultur yang telah ditambah dengan ekstrak ethanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*)
- i. Inkubasi plate di dalam inkubator.
- j. Amati kondisi sel setelah inkubasi tiap per 12 jam dan dokumentasikan
- k. Lakukan analisis data

H. Cara Pengumpulan Data

1. Ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) di peroleh dari dalam lemari laboratorium Teknologi Farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Kultur sel kanker kolon WiDr dan uji sitotoksik dilakukan oleh peneliti di Laboratorium Kultur Jaringan *In Vitro* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
3. Uji migrasi sel kanker kolon WiDr dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan *In Vitro* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

I. Validitas dan Reabilitas

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *MTT Assay* untuk uji sitotoksik sel kanker kolon WiDr. Metode ini biasa dilakukan untuk melihat proses menghambat proliferasi sel kanker yang kemudian dibaca dengan menggunakan *ELISA reader*. Sedangkan untuk uji migrasi dilakukan dengan menggunakan metode *Wound Healing Scratch Assay* dengan alat ukur *software image ImageJ* yang telah banyak digunakan sebagai *software*

penghitung migrasi sel. Selain itu kultur sel kanker yang akan dilakukan, menggunakan media tanam sel kanker RPMI yang telah terstandarisasi. Alat yang akan digunakan untuk mengamati yaitu *mikroskop inverted* yang dilengkapi dengan kamera dan video. Waktu yang dibutuhkan untuk mengamati sel kanker adalah 24 jam untuk uji sitotoksik dan 48 jam untuk uji migrasi.

J. Analisis Data

Teknik analisis data dari uji sitotoksik ekstrak ethanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) ini dianalisis IC_{50} nya menggunakan regresi linier dari konsentrasi.

$$\frac{(\text{Absorbansi perlakuan}-\text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel}-\text{Absorbansi kontrol media})} \times 100$$

Sedangkan data yang diperoleh dari uji migrasi ekstrak ethanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) yang dianalisis dengan menggunakan program pengolah data SPSS yaitu uji ANOVA satu jalan (One Way ANOVA), karena pada penelitian kali ini sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda. Kemudian rerata luas area sel diubah ke dalam bentuk persen dengan rumus:

$$\frac{(\text{Luas area jam ke-0} - \text{Luas area jam ke-x})}{\text{Luas area jam ke-0}} \times 100$$

K. Etik Penelitian

Penelitian ini tidak menggunakan subjek manusia secara langsung, melainkan menggunakan kultur sel kanker kolon (WiDr) yang telah dikultur

sesuai dengan standart dan diperoleh dari sumber resmi. Maka dari itu, peneliti harus memenuhi karakteristik kode etik penelitian sebagai berikut.

1. Penelitian yang dilakukan oleh peneliti tidak merugikan pihak manapun.
2. Penelitian yang dilakukan oleh peneliti tidak melanggar kode etik penelitian.
3. Hasil dari penelitian yang dilakukan oleh peneliti diharapkan dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya yang lebih baik.
4. Selama penelitian berlangsung, peneliti bertanggung jawab atas hal-hal yang menyangkut penelitian, baik berupa proses penelitian dan penyusunan keaslian laporan penelitian.