

### **BAB III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium murni. Penelitian dilakukan pada kultur sel HeLa kanker serviks yang diujikan dengan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.).

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap pelaksanaan. Tahap pertama uji sitotoksik dengan menggunakan 1 sampel dengan 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok konsentrasi pengenceran ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) dengan konsentrasi 3,125 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, dan 50 µg/ml. Tahap kedua dengan uji apoptosis menggunakan 3 kelompok konsentrasi IC<sub>50</sub> yaitu ½ IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, 2xIC<sub>50</sub> dan kelompok kontrol.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) dilakukan di Laboratorium Penelitian Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada dan tempat penelitian di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tempat pengujian di laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2018.

## D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 1. Variable Penelitian

#### a. Variable bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) dengan konsentrasi 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 3,125 µg/ml.

#### b. Variable terikat

Variable terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi p53 sebagai tanda terjadinya apoptosis sel Hela kanker serviks.

#### c. Variable terkontrol

Variable terikat dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.), Suhu incubator, pH, sterilitas, media pertumbuhan sel, dan sel HeLa kanker serviks.

### 2. Definisi Operasional

a. Ekstrak etanol rimpng temulawak adalah ekstrak temulawak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

b. Konsentrasi ekstrak adalah banyaknya ekstrak etanol rimpang temulawak dalam larutan yang akan dimasukkan ke dalam biakan sel hela kanker serviks yaitu 3,125 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml dan 50 µg/ml.

- c. Apoptosis adalah sel yang mengalami kematian terprogram. Penampakan sel yang mengalami apoptosis akan dilihat menggunakan reagen p53 dengan metode ICC.
- d. Biakan sel adalah pertumbuhan sel karsinoma serviks dalam media DMEM 10% FBS dalam *well-plate*.
- e. Jenis biakan sel HeLa kanker serviks
- f. Kondisi inkubasi adalah keadaan suhu dan kelembaban ruangan *incubator* saat *well-plate* disimpan.
- g. Kriteria inklusi
- h. Kriteria eksklusi

## **E. Instrument Penelitian**

### 1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah timbang analitik, mikroskop cahaya, kamera, inkubator, alat ekstrak, ELISA reader.

### 2. Bahan

Rimpang temulawak yang dibeli dari penjual tanaman obat tradisional di Pasar Beringharjo untuk pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) yang akan dilakukan di Lembaga Pusat Penelitian Terpadu (LPPT) UGM. Antibodi monoklonal p53 mAb perCP untuk uji proapoptosis pada sel Hela. Penelitian ini menggunakan sel kanker Hela yang merupakan sel kanker model untuk kanker servix yang diperoleh dari Lab Parasitologi FK UGM.

## F. Jalannya Penelitian

Kegiatan yang akan dilakukan pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.), kemudian uji sitotoksik dan dilanjutkan dengan uji proapoptosis sel Hela kanker serviks menggunakan metode imunositokimia.

Tahap penelitian sebagai berikut :

### 1. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak

Sampel dimasukan dalam botol bertutup 25 ml; 10,0 ml etanol 96% ditambahkan secara seksama. Sampel disimpan pada tempat gelap selama 24 jam; 1 ml bagian bening diambil dan dimasukan dalam tabung sentrifuse; sampel disentrifus selama 5 menit pada 10.000 rpm (sampel siap ditotolkan).

### 2. Pembuatan berbagai konsentrasi larutan uji

Sampel dari ekstrak etanol temulawak ditimbang sebanyak 10mg kemudian dilarutkan kedalam 100 $\mu$ l DMSO sehingga diperoleh konsentrasi larutan sampel adalah 100.000  $\mu$ g/ml. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi sebesar 3,125  $\mu$ g/ml, 12,5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml dan 50  $\mu$ g/ml.

### 3. Biakan sel Hela kanker serviks

Kultur sel HeLa diambil dari stok yang disimpan dalam tangki cair yang diletakkan dalam lokator pada suhu -196°C. Ampul yang berisi sel dicairkan dalam air  $\pm$  37.7 °C, kemudian ampul disemprot dengan alkohol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi 10 ml medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifuge dengan

kecepatan 1500 rpm selama  $\pm$  5 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml medium penumbuh RPMI 1640 yang mengandung FBS 10%. Lalu diresuspensikan perlahan sampai homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa (2-3) buah tissue culture flask kecil dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> dan 95% O<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (Meye, 2009).

#### 4. Pemanena sel HeLa

Sel HeLa yang sudah dikultur selanjutnya dihitung jumlahnya pada tiap sumuran. Jumlah sel HeLa cukup atau konfluen ( $\pm$  70%), medium dibuang. Selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Kemudian ditambahkan tripsin 0,25% sebanyak 300  $\mu$ L, dan diinkubasi selama tiga menit di dalam inkubator. Selanjutnya ditambahkan  $\pm$ 5mL medium kultur, lalu diresuspensi secara perlahan menggunakan pipet. Sel telah siap digunakan untuk penelitian (CCRC, 2009).

#### 5. Uji sitotoksik pada sampel rimpang teulawak untuk mendapatkan nilai IC50.

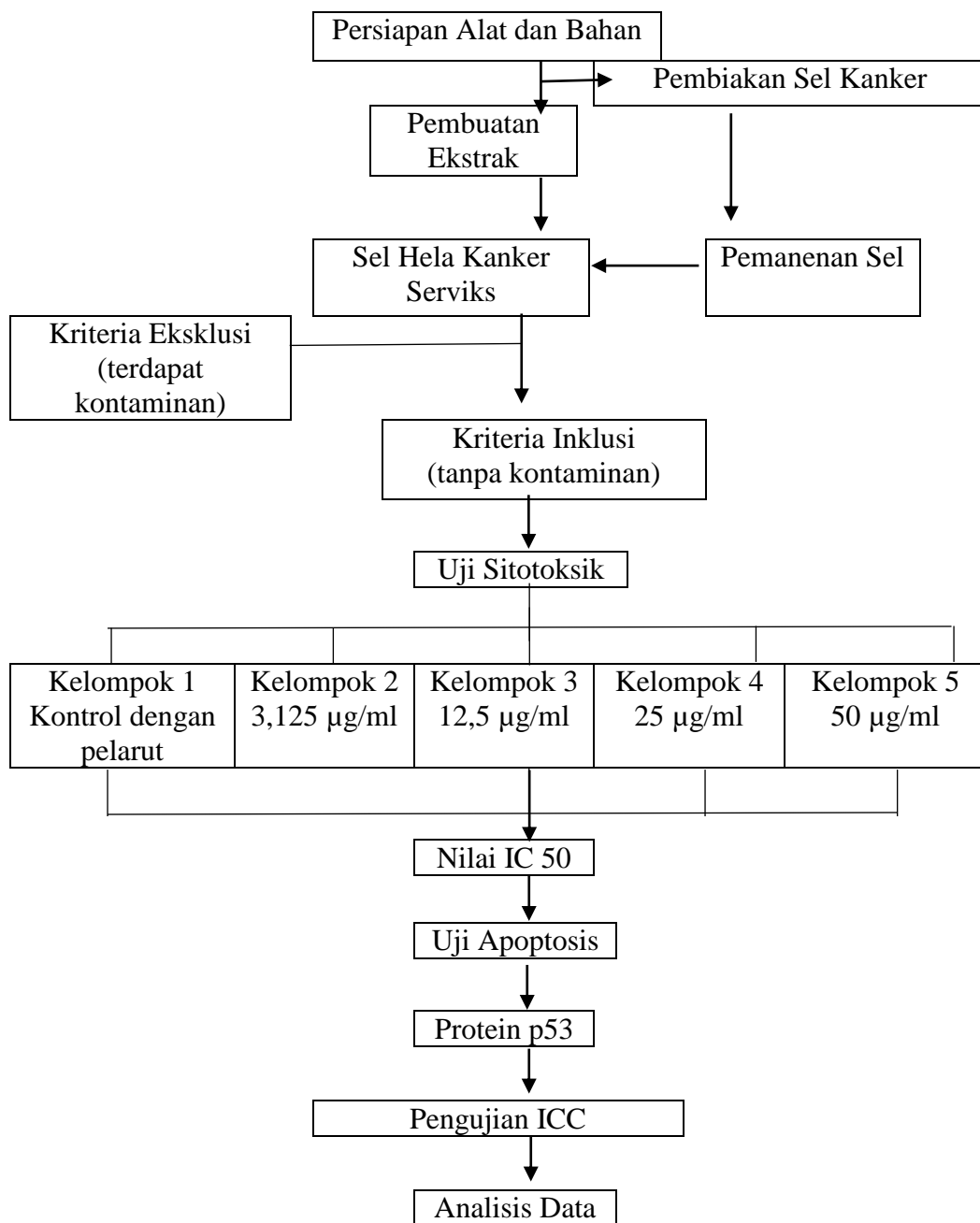
Sel sebanyak  $1 \times 10^6$  sel/mL yang telah diinkubasi selama 24 jam dan didapati sudah konfluen dan segera diberi perlakuan. Media kultur dibuang terlebih dahulu. Pada sumuran 96 *well-plate* diberi 100 $\mu$ L seri konsentrasi sampel. Kolom kontrol sel hanya diberi media kultur, kemudian diinkubasi selama 24 jam selama 24 jam dalam incubator CO<sub>2</sub>. Setelah diinkubasi selama 24 jam, media kultur dibuang, kemudian ditambahkan 100 $\mu$ L

larutan MTT 5 mg/mL yang telah disiapkan dan diinkubasi selama 4 jam di dalam *incubator* CO<sub>2</sub>. Setelah 4 jam ditambahkan 100µL reagen *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCL. *Plate* dibungkus menggunakan aluminium foil dan diinkubasi pada tempat yang gelap pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595nm yaitu pada daerah cahaya tampak (Xu, *et al.*, 2014; CCRC, 2009).

6. Uji proapoptosis ekstrak temulawak pada sel Hela kanker serviks menggunakan metode immunositokimia.

Penanaman sel hela pada 24 *well plate*. Konsentrasi IC<sub>50</sub> disiapkan dalam 3 kelompok konsentrasi, IC<sub>50</sub>, ½ IC<sub>50</sub> dan 2xIC<sub>50</sub> masing-masing sebanyak 1000 µl. Setiap sumuran dimasukkan media sebanyak 1000 µl. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam. Sel hela pada setiap sumuran diamati untuk melihat ada tidaknya kontamin, kemudian dilakukan pencucian tiap-tiap sumuran dengan PBS sebanyak 2 kali. Pada 24 *well plate* dimasukkan *cover slip* pada setiap sumuran sebagai tempat sel untuk menempel. Kemudian masing-masing sumuran ditetaskan 300 µl metanol dingin, dilanjutkan dengan inkubasi 10 menit di dalam *freezer*. Pada tiap sumuran ditambahkan 500 µl akuades, didiamkan selama 5 menit kemudian akuades dibuang. Dilanjutkan dengan penambahan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*) kemudian diinkubasi selama 10 menit lalu larutan dibuang dengan mikropipet. Setelah itu Ditetaskan *prediluted blocking serum* dilanjutkan inkubasi

selama 10 menit lalu larutan dibuang. Antibodi monoklonal primer untuk antigen yaitu gene p53 ditetaskan pada setiap sumuran yang ingin diamati. Lalu ditambahkan 500  $\mu$ l PBS, inkubasi selama 5 menit lalu PBS dibuang. Teteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), inkubasi selama 10 menit dan ditambahkan 500  $\mu$ l PBS, inkubasi selama 5 menit kemudian PBS dibuang. Teteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS. Kemudian tambahkan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit lalu cuci dengan akuades. Teteskan larutan MayeHaematoxylin, dan diinkubasi selama 3 menit. Cover slip diangkat dengan pinset secara hati-hati, kemudian di celupkan ke dalam xylol kemudian alkohol. Keringkan cover slip. *cover slip* diletakkan di atas *object glass*, dan ditetesi dengan lem (*mounting media*). *Cover slip* ditutup dengan cover slip kotak. (CCRC, 2009).



**Gambar 5. Bagan Alur Penelitian**



### **G. Uji Validitas dan Reabilitasi**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Parasitologi UGM dengan didampingi laboran ahli. Alat penelitian menggunakan alat yang semestinya dan dengan metode penelitian yang tepat sehingga hasil pengukuran sesuai.

### **H. Analisis Data**

Pengujian normalitas menggunakan Shapiro-wilk untuk melihat distribusinya. Jika terbukti normal maka selanjutnya untuk pembuktian hipotesis penelitian menggunakan uji komparasi One Way ANOVA. Derajat kepercayaan adalah  $p < 0,05$ . Perhitungan analisis data dengan bantuan program piranti lunak SPSS 15. Analisis dilakukan terhadap persentase sel yang bertahan hidup dan sel mati terhadap nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol rimpang temulawak. Apabila distribusi tidak normal maka analisis data akan menggunakan kruskal-willis.

### **I. Etik Penelitian**

Sel HeLa yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sel yang disimpan dan dikembangkan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada. Peneliti tidak berhubungan langsung dengan sumber sel HeLa, maka masalah etik dapat diminimalkan. Peneliti mengerjakan penelitian ini dibawah pengawasan dari tim ahli. Penggunaan sel HeLa dalam penelitian ini dilakukan sebaik-baiknya untuk kemajuan ilmu

pengetahuan, penelitian dan kepentingan masyarakat dengan mempertimbangkan etika bahan biologi tersimpan.