

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian kuantitatif eksperimental laboratorik yang akan dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel kanker kolon WiDr. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek yang ditimbulkan dari perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakter tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2011). Populasi pada penelitian ini diambil dari kultur sel kanker kolon WiDr.

2. Sampel dan Pengulangan

a. Ekstrak daun sirsak

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) diperoleh dari Laboratorium Teknologi Farmasetika Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

b. Sel kanker kolon WiDr

Sel Kanker kolon WiDr didapatkan dari *Cancer Chemoprevention Research Center* Farmasi UGM

c. Pengulangan

1) Uji Sitotoksik

Pada uji sitotoksik dilakukan 3 macam perlakuan kontrol dan satu perlakuan senyawa uji. Kontrol pertama yaitu *plate* yang berisi sel dan media kultur. Kontrol kedua yaitu *plate* yang berisi media kultur saja. Kontrol ketiga yaitu *plate* yang berisi media kultur sel dan ditambah doxorubicin dengan 3 macam dosis yang berbeda yaitu 5 µg/mL, 10 µg/mL, dan 15 µg/mL. Pada tiap – tiap perlakuan kontrol akan dilakukan 3 kali pengulangan. Sedangkan pada larutan uji dilakukan menggunakan ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi 80 µg/ml, 160 µg/mL, 320 µg/mL, 640 µg/mL, dan 800 µg/mL.

2) Uji Antimigrasi

Pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada tiap – tiap kelompok sel kanker. Kelompok 1 adalah sel kanker sebagai kontrol yang tidak diberi perlakuan apapun dan hanya dibiarkan tumbuh di media tumbuhnya. Kelompok 2 adalah sel kanker sebagai kontrol positif yang diberi obat doxorubicin sebagai obat standar kanker dengan konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$. Kelompok 3 adalah sel kanker yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan Konsentrasi $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara 2 tahap, yaitu :

1. Ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Kultur sel kanker kolon WiDr dilakukan di Laboratorium Kultur In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
3. Uji Antimigrasi dengan metode *wound healing scratch* dilakukan di Laboratorium Kultur In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini ada dua yaitu variabel bebas dan variabel terikat, yaitu

1. Variabel bebas : ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*)
2. Variabel terikat : kemampuan migrasi sel kanker kolon WiDr

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) diperoleh dari proses pengestrakkan daun sirsak (*Annona muricata L.*) di Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Sel kanker kolon WiDr berasal dari sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon wanita umur 78 tahun dan merupakan turunan dari sel kanker kolon lain yaitu sel HT-29. Sel WiDr merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skring suatu senyawa baru sebagai agen kemoterapi.

3. Migrasi sel adalah proses yang diamati dalam penelitian dengan menghitung jarak yang ditempuh sel kanker kolon WiDr untuk berpindah ke tempat lain di bidang pandang peneliti pada waktu tertentu.

F. Instrumen Penelitian

1. Ekstraksi

a. Bahan Penelitian

- 1) Daun sirsak (*Annona muricata* L.) didapat dari daerah Tamantirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta sebanyak 20 kg.

- 2) Etanol 70%

b. Alat Penelitian

- 1) Ayakan
- 2) Blender
- 3) Cawan porselen
- 4) *Chamber*
- 5) Evaporator
- 6) Gelas ukur
- 7) Kertas saring
- 8) *Measuring cylinder*
- 9) Pot obat
- 10) *Shaker waterbath*
- 11) Tabung *Erlenmeyer*
- 12) Timbangan analitik digital

2. Uji Sitotoksik

a. Bahan Penelitian

- 1) Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.)
- 2) Sel kanker kolon WiDr
- 3) Media sel WiDr RPMI
- 4) PBS (*Phosphat Buffer Saline*)
- 5) Reagen MTT
- 6) SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*)

b. Alat Penelitian

- 1) Mikropipet
- 2) Tabung reaksi kecil
- 3) Rak tabung kecil
- 4) 96 – *well plate*
- 5) *Conical tube*
- 6) *ELISA reader*

3. Uji Antimigrasi

a. Bahan Penelitian

- 1) Larutan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis 36 $\mu\text{g/mL}$, 38 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$
- 2) Obat standar kanker doxorubicin dengan dosis 10 mg/5 mL
- 3) BSA (*Bovine serum albumin*)
- 4) PBS (*Phospate Buffered Saline*)
- 5) ECM (*Substrat Extracellular Matrixs*)

6) Kultur sel kanker kolon WiDr

b. Alat Penelitian

1) Inkubator

2) Mikroskop *fluorescence*

3) Pipet tip p200

4) Media kultur RPMI mengandung foetal bovine serum 10%

5) Kamera

6) *Software image pro-plus ImageJ*

G. Cara Pengumpulan Data

1. Penyiapan Simplisia Uji

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) diambil dari beberapa pohon sirsak yang ada di daerah Sleman, Yogyakarta. Selanjutnya daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang terkumpul ditimbang kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang telah dicuci selanjutnya dikeringkan pada udara terbuka namun terlindungi dari sinar matahari. Simplisia yang telah dikeringkan di potong menjadi beberapa bagian kecil kemudian di blender dan selanjutnya dilakukan pengayakan untuk menghasilkan serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.)

2. Ekstraksi

Serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam *chamber* kemudian di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1800 ml. Pada maserasi dilakukan pengadukan setiap hari selama 5 hari. Setelah 5 hari

dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, filtrat yang didapat dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 65⁰ C sehingga dapat diperoleh ekstrak daun sirsak, selanjutnya menggunakan *shaker waterbath* dengan suhu 90⁰ C untuk menghasilkan ekstrak kental daun sirsak.

3. Uji Sitotoksik

- a. Lakukan penanaman sel dan diinkubasi selama 24 jam
- b. Cek kondisi sel yang sudah ditanam dan buat konsentrasi sampel untuk perlakuan
- c. Jika sampel perlakuan sudah dibuat, masukan seri konsentrasi sampel ke sumuran yang sudah ditanami sel kanker.
- d. Inkubasi di dalam inkubator, jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam.
- e. Menjelang akhir inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan.
- f. Siapkan reagen MTT untuk perlakuan, buang media sel dan cuci menggunakan PBS dan tambahkan reagen MTT 100 μ L ke setiap sumuran.
- g. Inkubasi selama 24 jam
- h. Periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan sudah terbentuk tambahkan reagen stoper SDS.
- i. Bungkus plate menggunakan aluminium foil dan tempatkan pada temperature kamar.

- j. Hidupkan ELISA reader untuk melihat nilai absorbansinya yang selanjutnya akan digunakan untuk menentukan nilai IC_{50}

4. Uji Antimigrasi

- a. Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) diisi dengan substrat ECM (*Extracellular matrix*) yang sesuai untuk jenis kultur sel yang akan digunakan, kemudian diinkubasi selama 2 jam dengan suhu $37^{\circ}C$ tanpa rotasi atau getaran.
- b. Hilangkan substrat ECM (*Extracellular matrix*) yang tidak terikat dan lapisi media dengan 3 ml BSA (Bovine Serum Albumin) selama 1 jam pada suhu $37^{\circ}C$.
- c. Cuci media menggunakan PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
- d. Masukkan sel kanker kedalam media penumbuh 60 mm.
- e. Inkubasi piring sekitar 6 jam pada suhu $37^{\circ}C$ agar sel dapat tersebar merata.
- f. Buat scratch pada monolayer dengan pipet tip 200
- g. Isi masing-masing media dengan menggunakan larutan ekstrak etanol daun sirsak dengan kadar yang sesuai.
- h. Untuk mendapatkan bidang yang sama selama percobaan, buatlah tanda yang dijadikan titik acuan dengan menggambar garis di luar media.
- i. Letakkan media ke dalam inkubator pada suhu $37^{\circ}C$ selama 8 sampai 18 jam. Periksa piring secara berkala untuk mengetahui proses migrasi sel kanker.

- j. Setelah dilakukan inkubasi, letakkan piringan di bawah mikroskop, kemudian amati dan ambil gambar setiap terjadi perpindahan jarak sel.
- k. Untuk setiap gambar yang diperoleh, jarak antara satu sisi goresan dengan goresan yang lainnya dapat diukur dengan interval tertentu dengan menggunakan perangkat lunak image analyze (*software image pro-plus ImageJ*)

H. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *Wound Healing Scratch* secara *In Vitro* dengan alat mikroskop *Inverted* yang biasa dipakai untuk mengamati migrasi sel kanker maupun sel normal. Alat ukur *software image pro-plus ImageJ* telah banyak digunakan sebagai *software* penghitung migrasi sel. Kultur sel yang akan dilakukan, menggunakan media tanam sel kanker RPMI yang telah terstandarisasi sehingga validitas terjamin. Waktu yang dibutuhkan untuk mengamati sel kanker adalah 24 jam, karena jika melakukan pengamatan lebih dari 24 jam maka akan terjadi bias pada hasil penelitian, yaitu tidak dapat membedakan antara sel yang sedang bermigrasi atau sedang berproliferasi.

I. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS dengan uji ANOVA satu jalan (*One way anova*), karena pada penelitian kali ini sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda.

J. Etik Penelitian

Penelitian ini tidak melibatkan subjek secara langsung, melainkan menggunakan sel kultur WiDr yang telah mendapat izin secara resmi, untuk itu peneliti harus mematuhi kode etik dalam 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. Selama penelitian berlangsung, peneliti bertanggung jawab atas hal-hal yang menyangkut penelitian, baik berupa limbah penelitian, proses penelitian dan penyusunan proses keaslian penelitian.
4. Hasil yang digunakan pada penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya.