

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 Penelitian

1. Populasi

Populasi merupakan wilayah generalisasi yang terdiri atas objek atau subjek yang mempunyai kualitas dan karakter tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiono,2011). Populasi pada penelitian ini adalah kultur sel kanker kolon WiDr.

2. Sampel dan Pengulangan

a. Ekstrak Daun Bandotan

Ekstrak Etanol Daun Bandotan diperoleh dari Laboratorium
Teknologi Farmasetika Universitas Muhammadiyah
Yogyakarta.

b. Sel Kanker Kolon WiDr

Sel kanker kolon WiDr didapatkan dari *Cancer Chemoprevention Research Center* Universitas Gajah Mada.

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. Pada tiap-tiap perlakuan kontrol akan dilakukan tiga kali pengulangan. Sedangkan pada larutan uji dilakukan menggunakan dosis 160-800 $\mu\text{g/mL}$. Pada masing-masing dosis akan dilakukan 3 kali pengulangan.

2) Uji Antimigrasi

Pada penelitian ini akan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada tiap-tiap kelompok sel kanker. Kelompok 1 adalah sel kanker sebagai kontrol yaitu, sel kanker yang tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok 2 adalah sel kanker yang diberikan ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides L*) dengan kadar $1/4\text{IC}_{50}$. Kelompok 3 adalah sel kanker yang diberi ekstrak daun bandotan sebesar $1/2\text{IC}_{50}$. Kelompok ke 4 adalah selkanker yang

diberi ekstrak daun bandotan³/₄IC₅₀. Kelompok ke 5 adalah sel kanker yang diberi doxorubicin sebesar¹/₄IC₅₀. Kelompok ke 6 adalah sel kanker yang diberi doxorubicin sebesar ¹/₂IC₅₀. Kelompok ke 7 adalah sel kanker yang diberi doxorubicin sebesar ³/₄IC₅₀. .

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Proses ekstraksi daun bandotan pada penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasetika Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
2. Kultur sel kanker kolon WiDr dan Uji Sitotoksik dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama bulan Februari – Mei 2018.
3. Uji antimigrasi sel kanker kolon WiDr dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama bulan Juni – Juli 2018.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

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

- a. Variabel bebas : ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides*)

- b. Variabel terikat : kemampuan sitotoksik dan migrasi sel kanker kolon WiDr

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak daun sirsak dan daun bandotan diperoleh dari proses pengekstrakan daun sirsak di laboratorium Teknologi Farmasi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- b. Sel kanker kolon WiDr merupakan turunan dari sel kanker primer adenokarsinoma kolon. Sel ini memiliki kemampuan untuk menyelesaikan satu siklus hidupnya selama 15 jam.
- c. Uji Sitotoksik berdasarkan protokol uji sitotoksik suatu ekstrak yang digunakan oleh *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Universitas Gajah Mada adalah uji kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik yang diberikan. Senyawa toksik yang dipakai dalam penelitian ini adalah ekstrak daun bandotan. 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 sistem reduktase. Penambahan reagen stopper yang bersifat detergenik akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*.

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

E. 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) *Phosphat Buffer Saline*
- 2) Media Kultur RPMI
- 3) DMSO
- 4) MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT dan 10mL PBS)
- 5) SDS 10% dalam 0,1 N HCL

6) Tissue makan

7) Sel kanker kolon WiDr

2. Uji Antimigrasi

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 bandotan

2) Phosphate Buffered Saline (PBS)

3) Media Kultur RPMI

4) Kultur sel kanker kolon WiDr

F. 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 penghitungan sel.
- c. Transfer sel ke dalam masing masing *well plate* dengan kepadatan sel 5×10^3 sel/sumuran.
- d. Tambahkan media komplit RPMI ke dalam masing masing sumuran
- e. Tambahkan ekstrak etanol daun sirsak dan daun bandotan ke dalam sumuran yang terpisah dengan konsentrasi 160-800µg/mL untuk masing-masing ekstrak
- f. Inkubasi selama 24 jam
- g. Buang media sel, kemudian tambahkan reagen MTT 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Inkubasi lagi selama 24 jam.
- h. Periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazon telah terbentuk, tambahkan stopper sebanyak 100 µL SDS 10% dalam 0,1 N HCL.

- i. Hidupkan ELISA *reader*, baca absorbansi masing masing sumuran dengan panjang gelombang 595 nm, lalu tekan start.

2. Uji Antimigrasi

- a. Ambil sel dari inkubator dan amati kondisi sel.
- b. hitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer.
- c. Siapkan 24 well plate
- d. Tanam sel dengan kepadatan 6×10^4 sel/ sumuran.
- e. Inkubasi sel dalam inkubator sampai keadatan 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 ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi $1/2IC_{50}$, $1/4IC_{50}$, $3/4IC_{50}$
- i. Inkubasi plate di dalam inkubator
- j. Amati kondisi sel setelah inkubasi 0,12,24 jam dan dokumentasikan.
- k. Lakukan analisis data.

G. Cara Pengumpulan Data

1. Ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) diperoleh Laboratorium Teknologi Farmasi 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 antimigrasi sel kanker kolon WiDr dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan In Vitro Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

H. 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 antimigrasi dilakukan dengan menggunakan metode *In Vitro Starch Assay* dengan alat ukur *software image pro-plus 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 24 jam untuk uji antimigrasi.

I. Analisis Data

Teknik analisis data dari uji sitotoksik ekstrak etanol daun sirsak ini dianalisis IC_{50} -nya dengan menggunakan regresi linier dari log konsentrasi sedangkan data yang diperoleh dari uji antimigrasi ekstrak etanol daun sirsak dianalisis dengan menggunakan program pengolahan data SPSS yaitu 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 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 limbah penelitian, proses penelitian dan penyusunan keaslian laporan penelitian.