

## **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*).

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

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap pelaksanaan. Tahap pertama uji sitotoksik dengan menggunakan 5 sampel, terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 4 sampel ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan konsentrasi 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 3,125 µg/ml. Tahap kedua dengan uji apoptosis menggunakan 6 sampel.

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

Pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) 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. Variabel Penelitian**

#### a) Variabel bebas

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

#### b) Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi *caspase 3* sebagai tanda terjadinya apoptosis sel HeLa kanker serviks.

#### c) Variabel terkontrol

- 1) Konsentrasi ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)
- 2) Suhu incubator
- 3) pH
- 4) Sterilitas
- 5) Media pertumbuhan sel
- 6) Sel HeLa kanker serviks

## 2. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol rimpang temulawak adalah ekstrak temulawak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
2. Konsentrasi ekstrak adalah banyaknya ekstrak etanol rimpang temulawak dalam larutan yang akan dimasukkan ke dalam biakan sel hela kanker serviks yaitu 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 3,125 µg/ml µg/ml.
3. Ekspresi gen *Caspase 3* diukur menggunakan reagen *Caspase 3* dengan metode *immunocytochemistry*.

## E. Alat dan bahan Penelitian

### 1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah spuit injeksi, kanula intragastrikum, timbangan minor set, formulir inform consent, mikroskop cahaya, kamera, mikroskop, inkubator CO<sub>2</sub>, alat ekstrak, 96 *well-plate*, 6 *well-plate*, *Laminar air flow cabinet*, mikropipet, ELISA *reader*, Mikroskop *inverted*.

### 2. Bahan

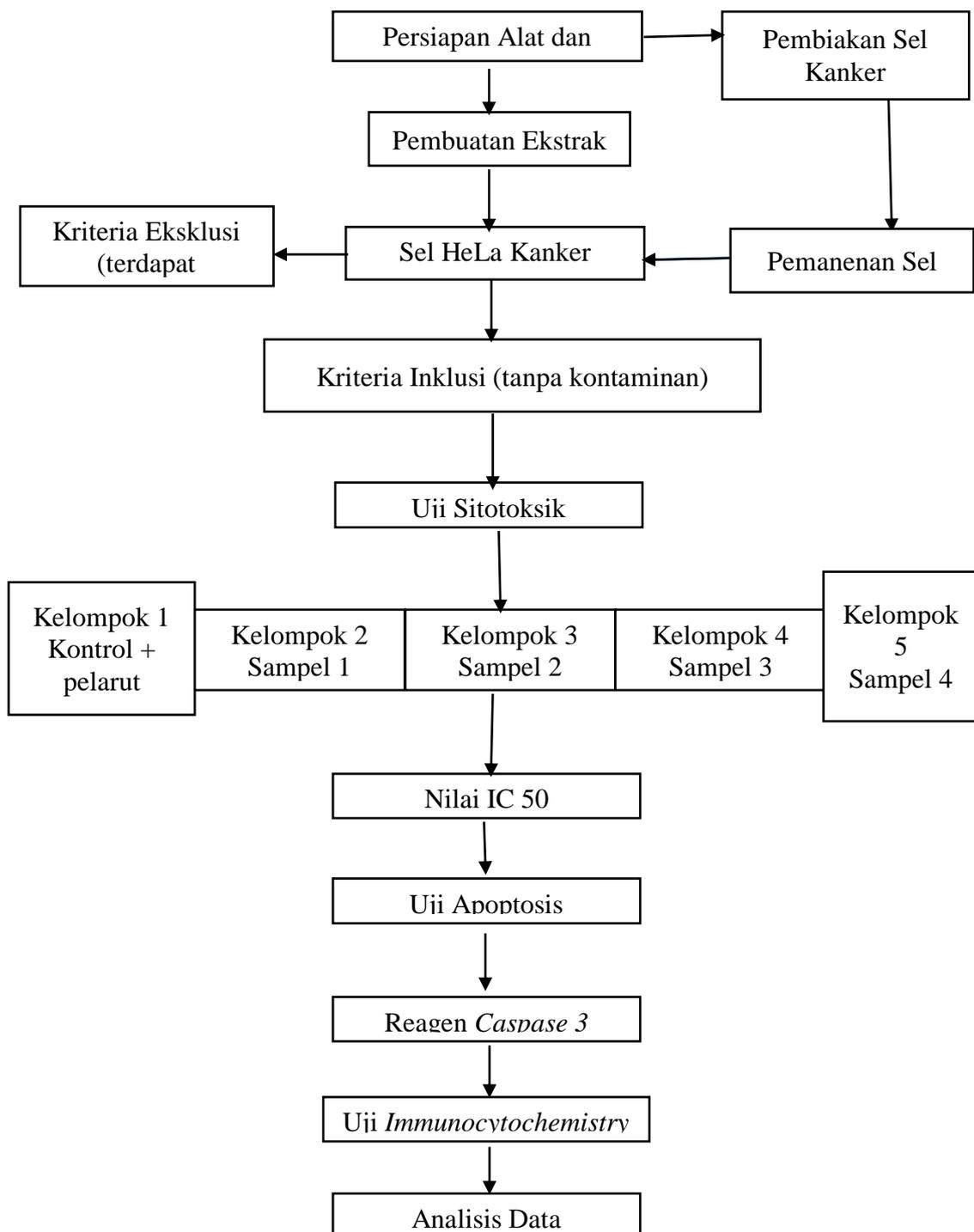
Rimpang temulawak yang dibeli dari penjual tanaman obat tradisional di Pasar Bering Harjo untuk pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) yang akan dilakukan di Lembaga Pusat Penelitian Terpadu (LPPT) UGM. Antibodi monoklonal *Caspase 3* mAb perCP untuk uji proapoptosis pada 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*), kemudian uji sitotoksik dan dilanjutkan dengan uji *Immunocytochemistry*

Tahap penelitian sebagai berikut :

Gambar 2.5 Bagan Alur Penelitian



### **1. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak**

Sampel dimasukkan dalam botol bertutup dengan ukuran 25 ml; 10,0 ml etanol ditambahkan secara saksama. Sampel disimpan pada tempat gelap selama 24 jam; 1 ml bagian bening diambil dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse; sampel disentrifus selama 5 menit pada 10.000 rpm (sampel siap ditotalkan).

### **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. Konsentrasi ekstrak etanol temulawak yang diuji adalah empat konsentrasi terendah yaitu 50  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 12,5  $\mu$ g/ml dan 3,125  $\mu$ 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%

O2. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (Ola *et al.*, 2008).

#### **4. Pemanenan sel HeLa**

Setelah jumlah sel HeLa cukup atau konfluen ( $\pm 70\%$ ), medium dibuang. Selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Kemudian ditambahkan tripsin 0,25% sebanyak 300  $\mu\text{L}$ , dan diinkubasi selama tiga menit di dalam inkubator. Selanjutnya ditambahkan  $\pm 5$  mL medium kultur, lalu diresuspensi secara perlahan menggunakan pipet. Sel telah siap digunakan untuk penelitian (CCRC, 2009).

#### **5. Uji sitotoksik**

Sel sebanyak  $1 \times 10^6$  sel/mL yang telah diinkubasi selama 24 jam dan didapati sudah konfluendan segera diberi perlakuan. Media kultur dibuang terlebih dahulu. Pada sumuran 96 *well-plate* diberi 100 $\mu\text{L}$  seri konsentrasi sampel. Kolom kontrol sel hanya diberi media kultur, kemudian diinkubasi selama 24 jam dan diinkubasi selama 24 jam dalam incubator CO<sub>2</sub>. Setelah diinkubasi selama 24 jam, media kultur dibuang, kemudian ditambahkan 100 $\mu\text{L}$  larutan MTT 5 mg/mL yang telah disiapkan dan diinkubasi selama 4 jam di dalam *incubator* CO<sub>2</sub>. Setelah 4 jam ditambahkan 100 $\mu\text{L}$  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 *Immunocytochemistry*

Sel HeLa dengan populasi  $2 \times 10^5$  ditanam dalam 24 *well*-plate yang telah diberi *cover slip*. Setelah inkubasi 24 jam, media kultur dibuang. Sel diberi perlakuan dengan menambahkan 1 mL sampel konsentrasi  $\frac{1}{2}IC_{50}$  dan cisplatin konsentrasi  $IC_{50}$ , diinkubasi selama 24 jam pada inkubator  $CO_2$ . PBS ditambahkan ke *cover slip*, lalu dibuang. Penambahan PBS dilakukan sebanyak dua kali dan difiksasi menggunakan metanol 300  $\mu$ L yang bertujuan mempertahankan morfologi sel, diinkubasi selama 10 menit di dalam *freezer*, lalu dibuang. *Cover slip* diambil dan dipindahkan ke kaca preparat, kemudian *cover slip* ditambahkan larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) sebanyak 1 mL untuk menghambat peroksidase endogen, diinkubasi selama 10 menit, lalu dibuang. Cuci *cover slip* dengan akuades sebanyak 1 mL. PBS 1 mL ditambahkan pada *cover slip*, dan didiamkan selama 5 menit, lalu dibuang. *Cover slip* diberi larutan *blocking* 20  $\mu$ L selama 10 menit untuk mencegah ikatan tidak spesifik antibodi sekunder, lalu dibuang, diberi antibodi primer untuk antigen yaitu gen *capase 3* didiamkan selama 1 jam, setelah itu dibuang dan diberi PBS diulang sebanyak dua kali. Kemudian *cover slip* diberi antibodi sekunder dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), untuk memperjelas pewarnaan dan diinkubasi selama 10 menit, lalu ditambahkan PBS inkubasi 2 menit, lalu dibuang, dan diulang 2 kali. *Cover slip* diberi larutan diaminobenzidin (DAB) sebagai pewarna coklat sebanyak 50  $\mu$ L diinkubasi selama 7 menit, dan ditambahkan akuades lalu dibuang. Larutan *MayerHaematoxylin* ditambahkan dan diinkubasi selama 3 menit untuk membedakan warna sel, lalu ditambahkan akuades dan dibuang. *Cover slip* diangkat dengan pinset dan digenangi etanol, lalu *cover*

*slip* dikeringkan. *Cover slip* diletakkan di atas *object glass*, dan ditetesi dengan lem (mounting media), kemudian ditutup dengan *cover slip* kotak. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya (Guimaraes, *et al.*, 2005 ; CCRC, 2009)

#### **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**

Pengaruh ekstrak etanol rimpang temulawak terhadap ekspresi *Caspase 3* pada kultur sel HeLa masing-masing akan dimasukan ke dalam perangkat lunak SPSS 15 menggunakan pengujian normalitas Shapiro-Wilk untuk menilai distribusinya. Jika terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan Analisis Varians (ANOVA) Satu-Arah, yaitu menguji perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan, maka disimpulkan minimal terdapat dua (2) kelompok perlakuan yang memiliki rata-rata ekspresi gen *Caspase 3* pada kultur sel HeLa. Bila hasil uji ANOVA menunjukkan hasil yang bermakna, maka diuji statistik lanjutan dengan menggunakan Uji *Duncan* yaitu *Posthoc* untuk melihat signifikansi antar kelompok.

Jika tidak terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan uji nonparametrik dengan menggunakan metode *Kruskall-Wallis*. Adapun jika hasil uji *Kruskall-Wallis* menunjukkan hasil yang bermakna, maka diuji statistik lanjutan

dengan menggunakan Uji *Mann-whitney* yaitu untuk melihat signifikansi antar kelompok

### **I. Etik Penelitian**

Sel HeLa yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sel yang disimpan dan dikembangkan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada. 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.