

BAB 3

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian eksperiment laboratoris murni terhadap biakan sel kanker lidah manusia Supri's Clone-1 (SP-C1) yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis).

B. Lokasi dan Waktu penelitian

Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan pembiakan *sel Supri's clone* (SP-C1) serta uji apoptosis dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan Maret- April 2013.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Sel kanker pada penelitian ini menggunakan kultur sel kanker lidah manusia (SP-C1) yang dibiakkan menggunakan media Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) yang diberi Foetal Bovine Serum (FBS) 10 %

Bahan uji dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun binahong dengan konsentrasi 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$

D. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1) Identifikasi variabel

a) Variabel Pengaruh

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dengan konsentrasi 0,50,100,200,300,400 dan 500 $\mu\text{g/ml}$

b) Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh pada penelitian ini adalah peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia (SP-C1).

c) Variabel Terkendali

- 1) Konsentrasi ekstrak etanol daun binahong
- 2) Jenis Biakan sel SP-C1 yang digunakan
- 3) Jumlah sel SP-C1 yang digunakan
- 4) Waktu inkubasi sel SP-C1
- 5) Kondisi inkubasi
- 6) Temperatur ruangan
- 7) Media pertumbuhan sel.
- 8) Waktu pengamatan Apoptosis

2) Definisi operasional

- a) Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah ekstrak dengan menggunakan cara maserasi dan dilakukan dengan larutan etanol 70%. Konsentrasi ekstrak yaitu banyak ekstrak daun binahong dalam larutan (0,50,100,200,300,400 dan 500 µg/ml)
- b) Pembiakan sel kanker lidah manusia (SP-C1) dengan memasukkan jaringan kanker pada *flask* berisi larutan DMEM, FBS yang di suplementasi dengan streptomisin 100 µg/ml dan penisilin 100 unit/ml.
- c) Alat ukur apoptosis adalah alat yang digunakan untuk melihat potensi peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia setelah diberi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) selama 24 jam, dengan perhitungan sel yang mengalami apoptosis.
- d) Jumlah sel adalah banyaknya sel yang dimasukkan setiap sumuran sebanyak 20.000 sel/*Well*
- e) Kondisi inkubasi plat 24 isi sel kanker lidah manusia (SP-C1) pada suhu 37°C dan CO₂ 5%

E. ALAT DAN BAHAN

1) Alat

- a. *Laminar air flow* (Sanyo electric Biomedica Co., Ltd., Japan)
- b. Alat Penyerbuk (LPPT UGM)
- c. Kipas angin (LPPT UGM)
- d. Mikropipet

- e. Corong gelas (*Pirex, Iwaki, Japan*)
- f. Inkubator CO₂ (*Sanyo Electric Biomedical CO.,Ltd.,Japan*)
- g. Neraca digital (*Mettler-Toledo GmbH, Switerland*)
- h. Tabung *centrifuse*
- i. *Centrifuge* (*Sakura Seiki Co., Ltd, Japan*)
- j. Plat 24 *Well*
- k. *Coverslip* (NUNC)
- l. Mikroskop *flourosence* (*Nikon., Ltd., Japan*)
- m. Mikroskop inverted (*Nikon Corporation, Japan*)
- n. *Flasks*
- o. Almari pengering (LPPT UGM)
- p. Vacuum evaporator (*Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan*)
- q. *Apendorrf cups* (*Eppendorf AG, Germany*)
- r. Rak *apendorrf*
- s. Gelas *Vacum evaporator* (*Jencons, Leighton Buzzard, England*)
- t. Obyek glass
- u. Pinset
- v. blender

2) Bahan

- a. Biakan sel *Supri's clone* (SP-C1, LPPT UGM)
- b. Ekstrak etanol daun binahong (LPPT UGM)
- c. DMEM (*Dubecco's modfield eagle medium*)
- d. Penisilin streptomisin 2% (*Utah, USA*)

- e. DMSO (*Dimethylsulphoxide*)
- f. Aquadest (LPPT UGM)
- g. Etanol 70% (LPPT UGM)
- h. FBS (*Fetal bovine serum*) Gibco, Brooklyn, MA, USA
- i. Fungizon 1%
- j. PBS (*Phospat buffer saline*)
- k. *Etidium bromida acridine*
- l. *Acridine orange*
- m. Gelatin (Merck KGaA, Germany)
- n. *Dimethylsulphoxide* (DMSO)

F. Cara Penelitian

Penelitian ini terdapat 7 kelompok terdiri dari satu kelompok kontrol dan 6 kelompok uji. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta :

1) Penentuan daun binahong

Daun binahong yang dipilih untuk diekstrak dalam penelitian ini adalah daun binahong yang segar dan strukturnya lengkap.

2) Pembuatan ekstrak Binahong

Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) yang sudah dicuci bersih kemudian dikeringkan dalam almari pengering 45⁰ C kemudian dibuat serbuk menggunakan blender sampai halus. Pembuatan ekstrak

menyempatkan cara preparasi yaitu dengan merendam 1000 mg bubuk

simplisia daun binahong dalam 1000 ml etanol 70%, kemudian di inkubasi selama 3 kali 24 jam atau 3 hari. Selanjutnya dilakukan pemisahan zat aktif dan etanol menggunakan vacuum evaporator. Zat aktif dibuat stok 1 gr/ml. Selanjutnya diencerkan menjadi konsentrasi (0,50, 100, 200,300,400 dan 500 µg/ml).

3) Persiapan biakan sel SP-C1

Sel SP-C1 dibiakan dalam larutan DMEM 10% FBS. Sel diinkubasi pada suhu 37⁰ C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5%

4) Uji apoptosis

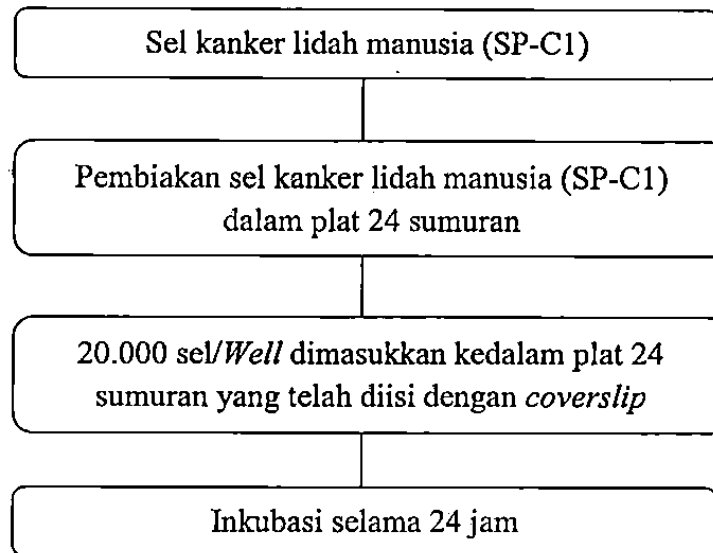
Sel kanker lidah manusia (sel SP-C1) diuji menggunakan model Pengujian yang dilakukan untuk menganalisis beberapa aspek biologi sel khususnya apoptosis. Tahap pertama pada proses apoptosis sel adalah starvasi Sel SP-C1 dibiakkan pada *cover slip* berdiameter 13 mm. *Coverslip* diletakkan di plat 24 berdiameter 60 mm dan media DMEM diteteskan melewati dinding plat 24 sebanyak 3 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kemudian dilakukan *treatment* dengan pemberian DMEM yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak etanolik daun binahong (0, 50, 100,200,300,400 dan 500 µg/ml) diletakkan kemudian dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam.

Setelah itu dilakukan pengecatan menggunakan *acridine orange* yang dilanjutkan dengan *etidium bromide* lalu diamati meggunakan mikroskop *flouresence* dari tiap-tiap konsentrasi dimulai konsentrasi tertinggi hingga konsentrasi terendah. Kemudian dilakukan foto sel dari

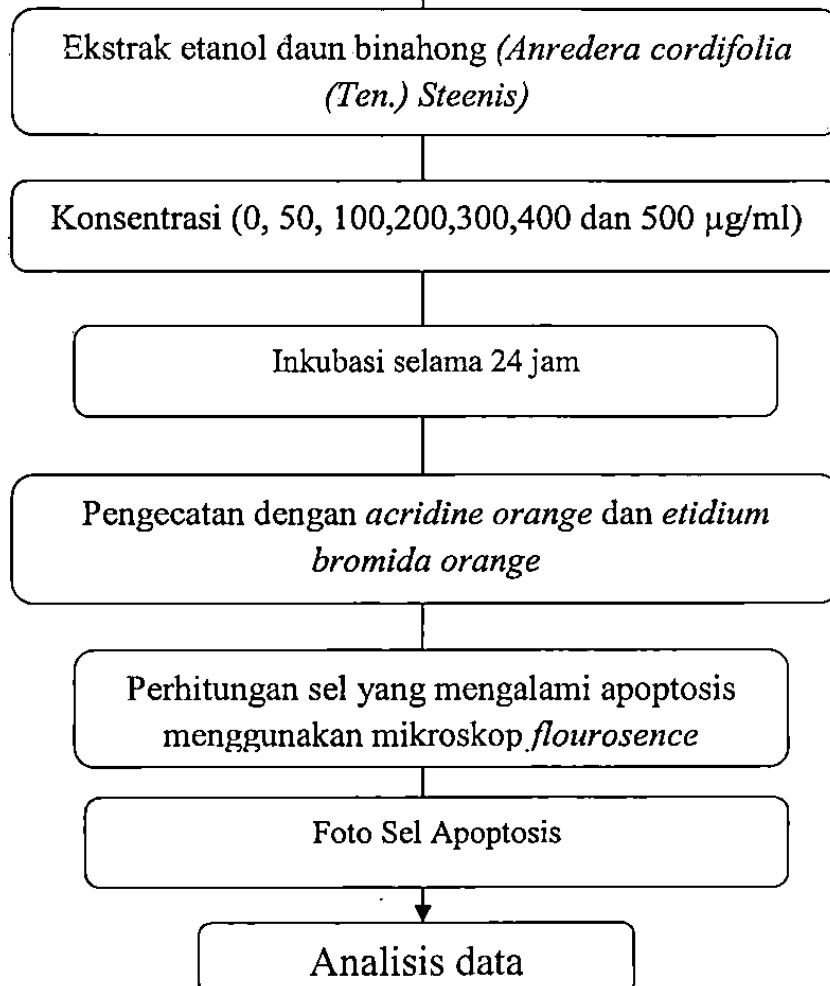
pengecatan yang dilakukan. Hasil penelitian potensi peningkatan apoptosis dengan ekstrak etanol daun binahong terhadap sel kanker lidah manusia (SP-C1) dapat diketahui dengan uji apoptosis sel kanker lidah manusia.

Semakin banyak tingkat apoptosis sel akibat perlakuan dengan ekstrak etanol daun binahong menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak tersebut berpotensi pada apoptosis sel SP-C1. Sebaliknya, jika sel SP-C1 tidak banyak yang terapoptosis maka ekstrak etanol daun binahong tidak mempunyai efek dalam potensi peningkatan apoptosis

G. Alur Penelitian



Media plat 24 *Well* diganti ekstrak etanol daun binahong (*Anderea cordifolia* (Ten.) Steenis).



Gambar 2. Skema alur penelitian

H. Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan data dianalisis menggunakan Analisa Varian (ANOVA) satu jalus dan LSD (*Least significant difference*) dengan nilai