

### **BAB III**

#### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian ini termasuk penelitian yang bersifat eksperimental laboratoris murni pada hewan uji (*in vivo*).

##### **B. Tempat dan Waktu**

###### **1. Tempat Penelitian**

- a) Pembuatan ekstrak tanaman sarang semut dilaksanakan di laboratorium penelitian UMY
- b) Pengembangbiakan Sel Kanker Lidah Manusia (SP-C1) dilakukan di Laboraturium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) pusat UGM.
- c) Penginjeksian sel kanker di lakukan di LPPT Unit 4 Fakultas Kedokteran Hewan UGM.
- d) Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY.
- e) Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Umum UGM.

2. Waktu Penelitian dilakukan selama 4 bulan (25 februari sampai 2 mei 2013)

##### **C. Populasi dan sampel**

1. Hewan uji yang digunakan adalah mencit Balb/c

Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta. Mencit yang digunakan sebanyak 8 ekor dengan kriteria : jenis kelamin jantan dengan berat sekitar 30 hingga 40 gram dan umur 2-3 bulan. Kondisi lingkungan sekitar termasuk kandang dan konsumsi makanan yang diberikan pada mencit laboratorium dikendalikan.

2. Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*)

Tanaman sarang semut diambil secara random dari pohonnya.

**D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

Subyek penelitian yang digunakan adalah 8 ekor mencit jantan dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi

a. Mencit jantan

1. Jenis kelamin : jantan
2. Umur 2-3 bulan
3. Berat 30-40 gram
4. Keadaan sehat dan aktif
5. Terdapat nodul pasca injeksi

b. Tanaman Sarang semut (*Myrmecodia pendens*)

Tanaman sarang semut yang sudah matang, dan berwarna merah.

2. Kriteria eksklusi

a. Mencit Jantan

- 1) Diketahui terjangkit penyakit/tidak aktif
- 2) Diketahui mati sebelum perlakuan selesai.
- 3) Tidak adanya nodul pasca injeksi

b. Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*)

Tanaman sarang semut yang tidak berwarna merah dan tidak diekstraksi.

**E. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

1. Identifikasi Variable Penelitian

a) Variabel Pengaruh.

Ekstrak etanol tanaman sarang semut dengan kadar 3 mg/kgBB dan 0.27 cisplatin mg/ml

b) Variabel Terkendali

Jenis hewan uji, jenis kelamin, umur, dan berat badan.

c) Variabel Terpengaruh

Gambaran histopatologi, insidensi tumor, perkembangan berat badan dan volume tumor.

2. Definisi Operasional

a) Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut

Ekstrak etanol tanaman sarang semut didapat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pembuatan ekstrak etanol tanaman sarang semut ini dilakukan di laboratorium penelitian UMY.

b) Sel Kanker Lidah Manusia (SP-C1)

Sel kanker lidah manusia diperoleh dari *moderately-differentiated squamous cell carcinoma* lidah dan belum mengalami invasi ke jaringan otot. Sel kanker lidah manusia dikloning dan dikubasi dengan kelembaban udara 95% dan kadar CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C (Supriatno,

*et al.*, 2007). Pembiakan sel kanker lidah manusia dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Jumlah sel yang dibutuhkan untuk penginjeksian adalah  $5.10^6$  per ekor yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquades.

## F. Instrumen Penelitian

### 1. Bahan

- a. Bahan utama yaitu ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* dan sel SP-C1 (*Supri's Clone One*), dan Cisplatin.
- b. Bahan yang digunakan untuk mengekstraksi adalah ethanol 70%
- c. Bahan yang digunakan untuk kultur sel SP-C1 antara lain Methanol Absolute, Aquadest, media RPMI 1640, FCS 10%, *Phosphat Buffernet Salin* (PBS), dan *Nitroblue Tetrazolum* (NBT)
- d. bahan lain yang digunakan pada penelitian kali ini antara lain yaitu aquades, Formalin 10%, pewarnaan HE,.

### 2. Alat – Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol sarang semut adalah alat-alat gelas, *evaporator*, panci maserasi, corong *buchner*, labu hisap, pengaduk, kipas angin, penangas air, kertas saring, plastik, blender, timbangan analitik, gelas ukur, batang pengaduk dari kaca.

Alat yang digunakan untuk kultur sel SP-C1 antara lain inkubator, *sentrifuge*, mikro pipet, objek gelas dan kulkas.

Alat untuk uji karsinogenesis adalah spuit injeksi 0,5 ml , kandang individual, meja operasi, seperangkat alat bedah (pinset, *scalpet*, *blade*,

gunting), neraca elektrik (Shimazu, type LS-6DT), mikroskop, kamera dan sliding caliper.

### 3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan berumur 2-3 bulan dengan berat 30-40 gram, yang diperoleh dari LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan Ekstrak

- a) Tanaman sarang semut diiris-iris dengan ketebalan 2 cm untuk dibuat simplisia.
- b) Simplisia dijemur hingga kering, lalu ditumbuk hingga menghasilkan 300 gram serbuk tanaman sarang semut.
- c) Serbuk tanaman sarang semut kemudian direndam dalam 3 Liter Alkohol 70% selama 5 hari. Setiap harinya dilakukan pengadukan hingga seluruh serbuk terendam alkohol 70%.
- d) Pada hari ke-5 cairan ekstrak dan serbuk tanaman sarang semut dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kain flanel.
- e) Cairan serbuk kemudian diuapkan menggunakan kompor listrik hingga alkoholnya menguap dan menyisakan ekstrak kental tanaman sarang semut.

## 2. Persiapan Sel Kanker Lidah Manusia *Supri Clone's 1* (SP-C1)

### a. Preparasi Sel Kanker Lidah Manusia

Awalnya sel disimpan dalam tangki utama nitrogen  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sel dalam keadaan inaktif dan beku dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  kemudian disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan kedalam tabung *conical* steril yang berisi media RPMI 1640. Suspensi sel disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm suhu dingin selama 5 menit kemudian *supernatant* dibuang dan ditambah dengan medium penumbuh yang mengandung 10% FBS. Selanjutnya diresuspensi perlahan hingga homogen. Sel ditumbuhkan dalam beberapa *culture flask* kecil (2 jam) kemudian medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga kofluen sampai 24-48 jam dan ketika jumlahnya cukup untuk penelitian lalu dipanen.

### b. Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, medium dibuang dan sel dicuci koloninya dengan cara ditambah PBS. Larutan PBS digoyang perlahan kemudian dibuang dan sel ditambah larutan Tripsin-EDTA (1:1) sebanyak 1-2 mL agar merata dan *flash* dapat dimiringkan. Sel didiamkan selama 2-3 menit dalam inkubator agar tripsin-EDTA bekerja dengan baik sehingga dapat melepaskan sel dari dinding *tissue culture flask*. Sel dipindah ke dalam tabung *conical* steril dan ditambah PBS atau media sampai volume 10 mL dan disentrifus 1500

rpm selama 15 menit pada suhu 15°C. Pelet putih adalah koloni sel yang mengendap karena pemusingan sedang supernatannya dibuang. Sisa pelet dicuci dengan menambah sedikit media, lalu dibuang. Untuk menghitung sel kemudian ke dalam pellet diberi media komplet 1mL atau 2mL, diresuspensi dan dihitung kepadatan selnya menggunakan *haemocytometer* sesuai penambahan media 1mL atau 2 mL. Suspensi sel 10 mikro liter ditetaskan dalam kaca bilik hitung. Sel yang dihitung adalah sel yang berada dalam empat bilik hitung yang masing-masing bilik terdiri dari 16 kotak. Jika sel ada di garis pembatas dan lebih dekat ke arah kotak hitung, maka sel dihitung. Jumlah sel dapat dihitung dengan cara (total jumlah sel dalam 4 bilik dibagi 4) x faktor  $10^4$  sel / mL. Suspensi sel sel kanker lidah pada penelitian ini dibuat dengan kepadatan sel sebesar  $40.10^6/4\text{mL}$ .

### 3. Pengujian pada Hewan Coba (*In vivo*)

8 ekor mencit diinjeksi sel kanker lidah lalu dibagi menjadi 4 kelompok dimana :

- Kelompok I : tidak diberi perlakuan maupun injeksi sel kanker
- Kelompok II : diinjeksi sel kanker SP-C1 sebanyak  $5.10^6$  sel/0,5 mL + aquades 0.5 ml
- Kelompok III : diinjeksi sel kanker SP-C1 sebanyak  $5.10^6$  sel/0,5 mL + ekstrak etanol tanaman sarang semut 3mg/kg BB
- Kelompok IV : diinjeksi sel kanker SP-C1 sebanyak  $5.10^6$  sel/0,5

mL + Cisplatin 0.27mg/ml

Masing masing kelompok diberi perlakuan selama 6 hari kerja dan pada hari ke enam dilakukan pembedahan untuk mengukur volume masing-masing nodul.

#### 4. Pengukuran Volume Nodul Tumor dan Berat Badan Mencit Balb/c

Pengukuran volume nodul dilakukan dengan mengukur panjang (L) dan lebar (W) diameter tumor, lalu dimasukkan kedalam rumus  $V = L \times W^2$  (Supriatno, 2007).

Penimbangan berat badan mencit dilakukan setiap akan diberikan perlakuan menggunakan neraca timbangan elektrik.

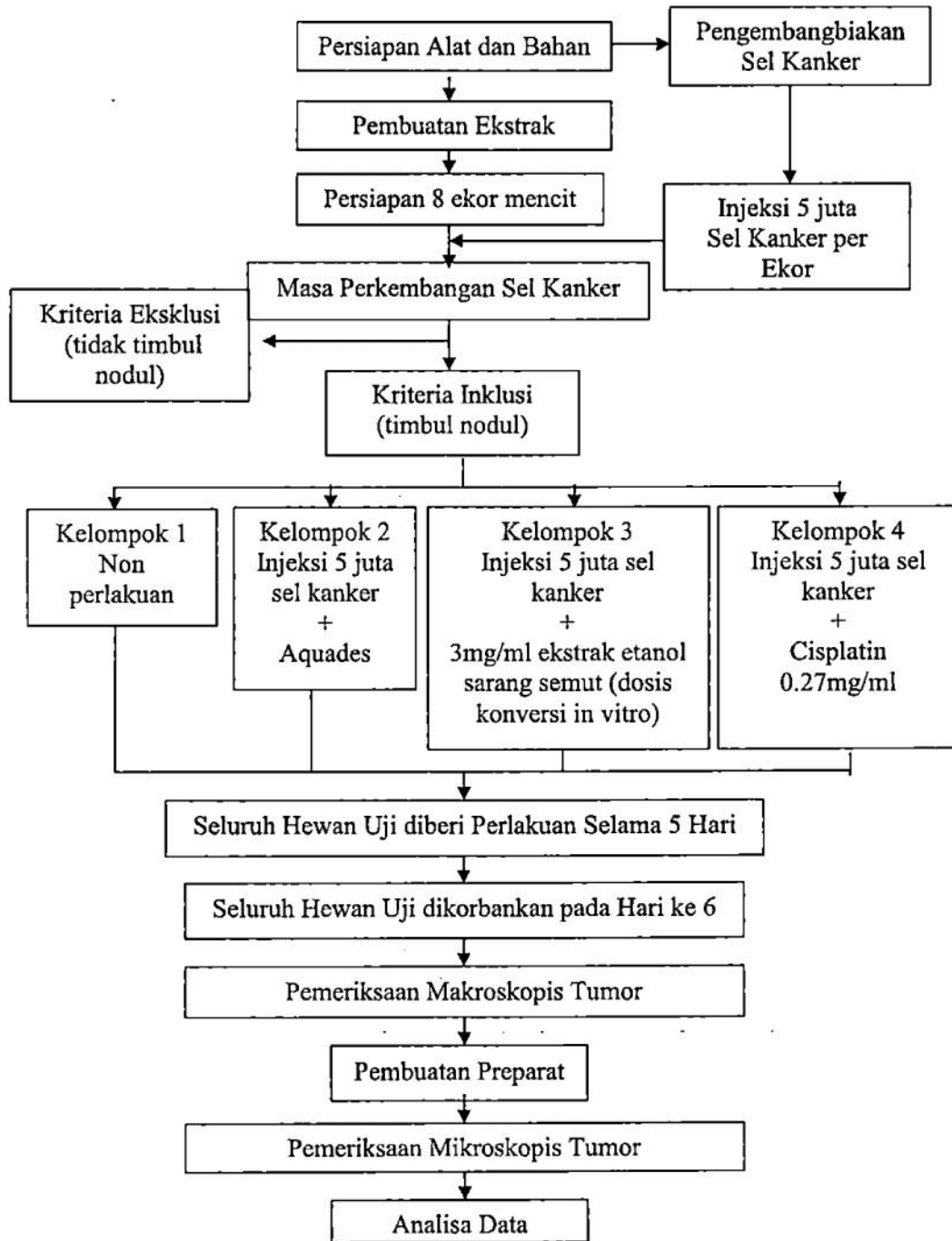
### H. Analisis Data

Evaluasi hasil uji antikarsinogenesis meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi perkembangan berat badan mencit, ukuran tumor baik kelompok kontrol ataupun kelompok perlakuan.

Analisa data dilakukan dengan menguji normalitas menggunakan Uji *Shapiro-Wilk*, bila data normal maka digunakan *one way ANOVA*. Bila diuji data tersebut tidak normal maka digunakan *Mann-Whitney*.



## I. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian