BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif eksperimental laboratorik yang akan dilakukan secara in vitro dengan menggunakan sel kanker kolon WiDr. Penelitian eksperimental laboratorik bertujuan untuk mengetahui efek yang ditimbulkan dari perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi diambil dari kultur sel kanker kolon WiDr yang didapatkan dari *Cancer Chemopreventive Research* Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Sampel

2.1.Uji Sitotoksik

Sampel yang akan digunakan pada uji sitotoksik terdiri atas sembilan kelompok perlakuan. Kelompok 1 adalah sel WiDr sebagai kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun dan hanya dibiarkan tumbuh di media tumbuhnya. Kelompok 2 adalah sel WiDr sebagai kontrol positif yang diberi obat doxorubicin sebagai obat standar kanker dengan dosis 7,5 μg/ml, 15 μg/ml, dan 20 μg/ml. Kelompok 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 adalah sel WiDr yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml, 120 μg/ml, dan 240 μg/ml. Kelompok kontrol positif dan negatif dilakukan tiga kali

pengulangan setiap kelompok perlakuan. Sedangkan, kelompok sel yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin dilakukan lima kali pengulangan setiap kelompok perlakuan.

2.2.Uji Migrasi

Sampel yang akan digunakan pada uji migrasi terdiri atas tujuh kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan kultur sel kanker sebanyak tiga kali. Kelompok 1 adalah sel kanker sebagai kontrol negatif 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 dosis IC_{50}. Kelompok 3, 4, 5, 6, 7 adalah sel kanker yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC_{50}, dan IC_{50}.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara dua tahap, yaitu :

1. Uji sitotoksik dengan metode MTT assay dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Uji migrasi dengan metode *scratch wound healing assay* dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

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

1. Variabel bebas : ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*).
2. Variabel terikat : kemampuan migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) adalah ekstrak kental kulit jeruk Mandarin yang diperoleh dari sisa ekstrak yang telah dipakai dan disimpan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Sel kanker kolon WiDr merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun dan merupakan turunan dari sel kanker kolon HT-29.
3. Uji sitotoksik dengan metode MTT assay adalah metode yang digunakan untuk mengetahui presentase viabilitas sel WiDr setelah pemberian ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin dan dinyatakan dalam parameter IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*).
4. Uji migrasi dengan metode *scratch wound healing assay* adalah metode yang digunakan untuk mengetahui jarak yang ditempuh sel untuk berpindah ke tempat lain (bermigrasi) di bidang pandang pada waktu tertentu yang dinyatakan dalam persentase penutupan sel (% migrasi).

F. Instrumen Penelitian

1. Uji Sitotoksik dengan metode MTT Assay

a. Alat

- 96 well plate
- Mikropipet 200 µL, 1000 µL
- Blue tip dan yellow tip
- Conical tube
- ELISA Reader
- Inkubator CO_2

b. Bahan

- Media komplit RPMI
- Sel kanker kolor WiDr
- Esktrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml, dan 240 µg/ml
- Doxorubicin dosis dosis 7,5 µg/ml, 15 µg/ml, dan 20 µg/ml
- DMSO
- Aquades
- Reagen MTT
- SDS 10% dalam 0,1 N HCl

2. Uji Migrasi dengan metode *Scratch wound healing assay*

a. Alat

- 24 well plate

- Mikropipet
- Yellow tip
- Inkubator CO_2
- Mikroskop inverted
- Kamera
- *software ImageJ*

b. Bahan

- Media kultur RPMI
- Sel kanker kolon WiDr
- PBS (*Phospate Buffered Saline*)
- Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC_{50}, dan IC_{50}.
- Doxorubicin dengan dosis IC_{50}.

G. Cara Pengumpulan Data

1. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) merupakan ekstrak kental kulit jeruk Mandarin yang telah dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang diperoleh dari sisa ekstrak yang telah dipakai dan disimpan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Ekstrak kental *Citrus reticulata* akan dibuat seri konsentrasi dengan stok 10 mg/ml dengan cara

a. Timbang ekstrak kental kulit jeruk Mandarin pada neraca analitik seberat 10 mg di atas kertas alumunium foil.

b. Lakukan pengenceran ekstrak kental kulit jeruk Mandarin menggunakan aquades dan DMSO 1% sehingga diperoleh stok ekstrak 10 mg/ml.

c. Lakukan pengenceran ekstrak etanol kulit buah jeruk Mandarin dengan menambahkan media komplit RPMI hingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml, 120 μg/ml, dan 240 μg/ml.

2. Uji Sitotoksik

a. Ambil sel dari inkubator CO_2 dan amati kondisi sel di bawah mikroskop inverted.

b. Hitung jumlah sel menggunakan hemositometer sesuai protokol perhitungan sel. Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik dengan metode MTT assay adalah $5x10^3$ sel/ sumuran.

c. Tanam sel ke dalam 96 well plate, masing-masing 100 μl/ sumuran.

d. Sisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media.

e. Inkubasi sel ke dalam inkubator CO_2 selama semalam atau hingga sel konfluen 80%.

f. Ambil 96 well plate dari incubator, dan amati kondisi sel di bawah mikroskop inverted.

g. Cuci semua sumuran menggunakan PBS masing-masing 100 μl/ sumuran.

h. Masukkan seri konsentrasi larutan uji (ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin dosis 10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml,

120 μg/ml, dan 240 μg/ml) ke dalam sumuran sesuai peta MTT yang telah dibuat.

i. Inkubasi sel dalam inkubator CO_2 selama semalam.

j. Buang media sel, cuci sel menggunakan PBS 1x, dan tambahkan reagen MTT 100 μl ke dalam setiap sumuran termasuk kontrol media.

k. Inkubasi sel selama 2-4 jam dalam inkubator CO_2 hingga terbentuk formazan.

l. Periksa kondisi sel di bawah mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper 100 μl SDS 10% dalam 0,1 N HCl.

m. Bungkus plate menggunakan kertas alumunium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam.

n. Buka pembungkus plate dan tutup plate.

o. Masukkan 96 well plate ke dalam ELISA reader dan baca absorbansi masing-masing sumuran menggunakan ELISA reader dengan λ =550-600 nm (595 nm).

(CCRC, 2013)

3. Uji Migrasi

a. Ambil sel dari inkubator CO_2 dan amati kondisi sel di bawah mikroskop inverted.

b. Hitung jumlah sel menggunakan hemositometer sesuai protokol perhitungan sel. Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji migrasi dengan metode *scratch wound healing assay* adalah $7{,}5 \times 10^3$ sel/ sumuran

c. Tanam sel ke dalam 24 well plate, masing-masing 500 μl/ sumuran.

d. Amati keadaan sel pada mikroskop inverted untuk melihat distribusi sel.
e. Inkubasi sel ke dalam inkubator CO_2 selama semalam atau hingga sel konfluen 80%.
f. Cuci semua sumuran menggunakan PBS masing-masing 100 µl/ sumuran.
g. Ganti media komplit RPMI dengan 0,5% FBS.
h. Inkubasi sel ke dalam inkubator CO_2 selama 24 jam.
i. Buat scratch pada tiap sumuran menggunakan yellow tip steril secara tegak lurus.
j. Buang semua media komplit, dan cuci sel menggunakan PBS 1x masing-masing 500 µl.
k. Dokumentasikan hasil scratch dengan perbesaran yang sama.
l. Buang PBS dari sumura menggunakan pipet.
m. Masukkan ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin dosis 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC_{50}, dan IC_{50} sesuai peta yang telah dibuat masing-masing sebanyak 500 µl.
n. Inkubasi 24 well plate ke dalam inkubator CO_2.
o. Amati kondisi sel setelah inkubasi 0,12,24,36 jam dan dokummentasikan hasil scratch setiap waktu dengan perbesaran yang sama.

(CCRC, 2015)

H. Uji Validitas dan Reabilitas

Penelitian ini dilakukan secara 2 tahap, yaitu uji sitotoksik dan uji migrasi. Penanaman sel kanker kolon WiDr menggunakan media tanam RPMI yang telah terstandarisasi. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT assay yaitu evaluasi yang telah terstandarisasi untuk mengetahui potensi sitotoksik dari ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin terhadap sel WiDr yang kemudian hasilnya dibaca menggunakan ELISA reader. Sedangkan, uji migrasi menggunakan metode *scratch wound healing assay* dengan membuat goresan pada sel monolayer. Alat yang akan digunakan untuk mengamati yaitu mikroskop *inverted* yang biasa dipakai untuk mengamati migrasi sel kanker maupun sel normal. Waktu yang dibutuhkan untuk mengamati sel kanker pada uji sitotoksik adalah 12 jam sedangkan uji migrasi adalah setiap 12 jam. Alat ukur yang akan digunakan pada penelitian ini adalah software SPSS 15 untuk uji sitotoksik dan migrasi serta *software ImageJ* yang telah banyak digunakan sebagai *software* penghitung migrasi sel.

I. Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dari uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin, dihitung persen viabilitas sel dengan menggunakan rumus

$$\frac{(\textit{Absorbansi perlakuan-Absorbansi kontrol media})}{(\textit{Absorbansi kontrol sel-Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Data persen viabilitas sel dihitung IC_{50}nya menggunakan persamaan regresi linier menggunakan SPSS 15.

Sedangkan, data yang diperoleh dari uji migrasi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin terhadap sel WiDr, dihitung persentase penutupan sel (% migrasi) dengan rumus

$$\frac{\text{(Luas area jam ke-0 - Luas area jam ke-x)}}{\text{Luas area jam ke-0}} \times 100\%$$

Kemudian hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 15 dengan uji ANOVA satu jalan (*One way ANOVA*), karena pada penelitian ini sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda.

J. Etik Penelitian

Penelitian ini tidak melibatkan subjek manusia secara langsung, melainkan menggunakan sel kultur kanker kolon WiDr yang telah dikultur sesuai standard dan diperoleh dari sumber resmi yaitu CRCC (*Cancer Chemoprevention Research Center*) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang telah mendapat izin secara resmi sehingga peneliti harus mematuhi 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. Selama penelitian berlangsung, peneliti bertanggungjawab 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.