

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris murni. Penelitian dilakukan pada kultur sel skuamosakarsinoma rongga mulut *Supri's clone 1* (SP-C1) yang diujikan pada ekstrak etanolik kulit jeruk manis (*citrus sinensis*). Penghitungan jumlah biakan sel skuamosa yang hidup dilakukan dengan uji proliferasi (MTT assay).

B. Identifikasi dalam Penelitian

1. Variabel pengaruh

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah ekstrak etanolik kulit jeruk manis (*citrus sinensis*) berbagai konsentrasi

2. Variabel terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah proliferasi sel skuamosa rongga mulut (SP-C1).

3. Variabel terkendali

- a. Konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk manis (*citrus sinensis*)
- b. Jenis biakan sel yang digunakan
- c. Jumlah sel yang digunakan
- d. Waktu pengamatan proliferasi
- e. Kondisi inkubasi

- f. Alat ukur proliferasi menggunakan Bio Rad Microplate reader (Biorad)
- g. Suhu udara
- h. Media pertumbuhan sel
- i. Sel SP-C1 yang digunakan adalah *passage* ke-8
- j. Jenis jeruk yang digunakan

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Biakan sel skuamosa karsinoma rongga mulut (SP-C1) yang di simpan di laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Sel SP-C1 hasil cloning dari drg. Supriatno M.kes, Ph.D (OMFS & Oncology) pada penderita kanker lidah di Yogyakarta
2. Ekstrak etanol kulit jeruk manis (*citrus sinensis*) dibuat di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
3. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*
4. *Dimethylsulphoxide (DMSO)*
5. Phospat buffer saline (PBS)
6. Fetal Bovine Serum (FBS) 10%
7. Tripsin-EDTA
8. Penisilin-Streptomisin 3%
9. Fungizon 0,5 %
10. Pipet standar Eppendorf 200 μ l dan 1 ml

11. Yellow tip dan blue tip
12. Disk plate diameter 100 mm
13. MTT powder
14. Etanol 70%
15. Bio Rad microplate reader
16. Alat tulis

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol kulit jeruk manis (*citrus sinensis*) adalah ekstrak kulit jeruk manis yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%
2. Konsentrasi ekstrak adalah banyaknya ekstrak kulit jeruk manis (*citrus sinensis*) dalam larutan yang akan dimasukkan biakan sel kanker SP-C1 yaitu 0, 75, 150, 250, dan 500 µg/ml
3. Proliferasi sel skuamosa karsinoma rongga mulut adalah pertumbuhan dan perkembangan sel karsinoma akibat tidak terkontrolnya pertumbuhan sel
4. Biakan sel adalah pertumbuhan sel skuamosa karsinoma rongga mulut dalam media pertumbuhan DMEM 10% FBS dalam cawan petri.
5. Jenis biakan sel kanker SP-C1 yang digunakan adalah sel skuamosa karsinoma pada lidah manusia.
6. Jumlah sel adalah banyaknya sel karsinoma skuamosa rongga mulut yang dimasukkan pada setiap sumuran pada microplate 24 sumur, yaitu sebanyak

7. Waktu pengamatan proliferasi adalah waktu yang digunakan oleh peneliti untuk mengamati proliferasi, setelah inkubasi selama hari ke-1, 2, dan 3
8. Inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan pengaplikasian ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dalam kultur sel sampai efek yang akan diamati.
9. Kondisi inkubasi adalah keadaan suhu dan kelembaban ruang inkubasi (incubator) microplate 24 sumur yang berisi sel skuamosa karsinoma rongga mulut dan ekstrak etanol kulit jeruk manis, yaitu pada suhu 37° dan CO₂ 5%.
10. Alat ukur proliferasi adalah alat yang digunakan untuk melihat proliferasi sel skuamosa karsinoma rongga mulut setelah diberi ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) selama hari ke-1, 2, dan 3, menggunakan alat Bio Rad Microplate reader.

E. Cara Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Kegiatan yang akan dilakukan berupa pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dan uji proliferasi sel skuamosa karsinoma rongga mulut menggunakan BioRad microplate reader.

Tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Pembuatan ekstrak dan konsentrasi ekstrak kulit jeruk manis (0, 125, 250 dan 500 mg/ml)
2. Persiapan biakan sel SP-C1
3. pengujian hambatan proliferasi sel SP-C1.

1. Pembuatan ekstrak dan konsentrasi kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)

Kulit jeruk manis dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 60° C, kulit jeruk manis yang sudah kering dijadikan serbuk menggunakan blender sampai halus. Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam 1000 mg bubuk simplisia kulit jeruk manis dalam 1000 ml etanol 96 % selama 1 minggu. Selanjutnya dilakukan pemisahan zat aktif dan etanol menggunakan vacuum evaporator. Zat aktif dibuat stok 1 gr/ml, selanjutnya diencerkan menjadi konsentrasi 125, 250 dan 500 µg/ml.

2. Persiapan biakan sel

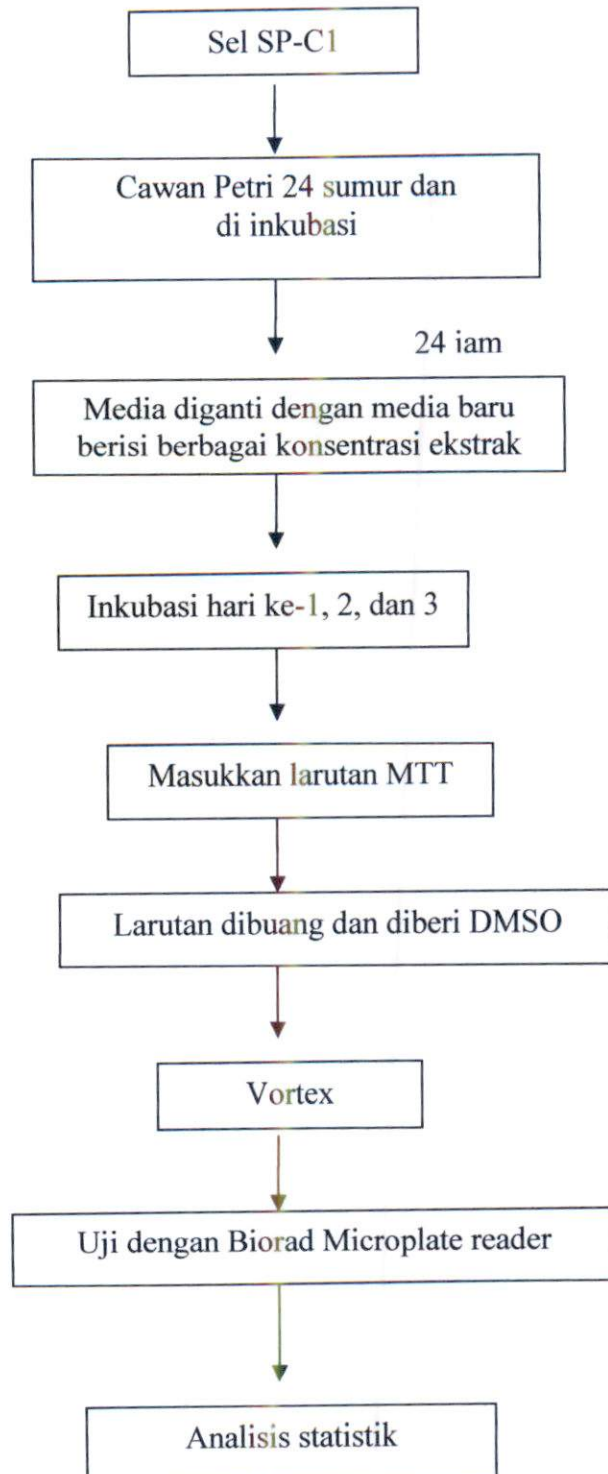
Sel SP-C1 dibiakkan dengan larutan DMEM 10% FBS dalam cawan Petri. Sel di inkubasi pada suhu 37° C dengan kelembaban udara 5 %.

3. Uji proliferasi

Sel SP-C1 yang tumbuh sub-confluent dipanen menggunakan Tripsin-EDTA 0,25%. Sel sebanyak 1×10^4 sel/sumur dibiakkan dalam cawan petri 24 sumur, sesuai jumlah konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk manis yang digunakan. Sel di inkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, semua media dibuang dan diganti dengan media baru yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak kulit jeruk manis. Sel di inkubasi selama 0, 24, 48 dan 72 jam.

F. Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *KOSMOLOGOROV-Smirnof* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya dilakukan uji Analisis Varian (ANAVA) dua jalur dan LSD dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.



Gambar 4. Skema alur jalannya penelitian uji proliferasi menggunakan uji MTT