

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris murni. Penelitian dilakukan pada kultur sel kanker lidah manusia *Supri's clone 1* (SP-C1) yang diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanolik daun pukul empat (*Mirabilis jalapa L.*).

#### **B. Subyek Penelitian**

Subjek dalam penelitian ini adalah:

1. Kultur sel kanker lidah manusia SP-C1 yang dibiakkan dalam media *Rosswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640) yang diberi *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%.
2. Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol daun pukul empat (*Mirabilis jalapa L.*)

#### **C. Tempat dan Waktu Penelitian**

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

Pembuatan ekstrak etanolik daun pukul empat (*Mirabilis jalapa L.*) dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian uji potensi antiinvasi sel kanker menggunakan ekstrak etanolik daun pukul empat (*Mirabilis jalapa*

L.) dilaksanakan di Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

## **2. Waktu**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2010 sampai dengan bulan Juni tahun 2011.

## **D. Identifikasi Variabel Penelitian**

### **1. Variabel pengaruh**

Variabel pengaruh dalam penelitian ini adalah ekstrak etanolik daun pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) dengan konsentrasi 0, 7.5, 15, 25, 50 dan 75 g/ml.

### **2. Variabel terpengaruh**

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah invasi sel kanker lidah manusia SP-C1.

### **3. Variabel terkendali**

- a. Konsentrasi ekstrak etanolik daun pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.)
- b. Jenis biakan sel yang digunakan
- c. Jumlah sel yang digunakan
- d. Waktu pengamatan invasi
- e. Kondisi inkubasi
- f. Alat ukur invasi menggunakan *Boyden Chamber*
- g. Media pertumbuhan sel
- h. Temperatur ruangan

## E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol pukul empat adalah ekstrak pukul empat yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanolik pukul empat yang akan diaplikasikan pada biakan sel SP-C1 dalam berbagai konsentrasi, yaitu 0, 7.5, 15, 25, 50 dan 75 g/ml. Pembuatan ekstrak ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
2. Sel kanker lidah manusia SP-C1 berasal dari hasil kloning oleh drg. Supriatno M.Kes, Ph. D dari pasien kanker lidah yang telah bermetastasis ke limfonodi regional.
3. Invasi karsinoma sel skuamosa lidah adalah jumlah sel SP-C1 yang mampu menembus membran *polivinylidone* (PVD).
4. Jumlah sel adalah banyaknya sel SP-C1 yang dimasukkan pada alat *Boyden Chamber*, yaitu sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/kit *Boyden Chamber*.
5. Waktu pengamatan invasi adalah waktu yang digunakan oleh peneliti untuk mengamati invasi, setelah inkubasi selama 24 jam.
6. Kondisi inkubasi adalah keadaan suhu dan kelembaban ruang inkubasi (*incubator*), yaitu pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan  $\text{CO}_2$  5%.

## F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian
  - a. Blender (Sanyo, Japan)
  - b. Pipet standar *Eppendorf* 200 ul dan 1 ml (Eppendorf, Germany)

- c. Tabung conical 50 ml (Iwaki, Japan)
  - d. *Boyden Chamber* (Merck, Germany)
  - e. Membran *polivinylidone* (PVD) (Biorad, USA)
  - f. Vortex (Genie, USA)
  - g. Timbangan elektrik (Mettler, Switzerland)
  - h. Mikroskop cahaya (Nikon, Japan)
  - i. CO<sub>2</sub> inkubator (Sanyo, Japan)
  - j. Water Bath (Eyela, Japan)
  - k. Alat tulis
2. Bahan penelitian
- a. Biakan sel kanker lidah manusia SP-C1 (Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada)
  - b. Ekstrak etanol daun pukul empat (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada)
  - c. *Rosswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640) (Biowest, USA)
  - d. Hematoksilin (Merck, Germany)
  - e. *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (Gibco, USA)
  - f. Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
  - g. Fungizone (Hyclone, USA)
  - h. Mill-Q Methanol pure 96% dan Aquadest steril (Merck, Germany)

## G. Cara Penelitian

Kegiatan yang akan dilakukan adalah pembuatan ekstrak etanol daun pukul empat dan uji invasi sel kanker lidah SP-C1 menggunakan *Boyden Chamber*. Tahapan penelitian sebagai berikut:

### 1. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun pukul empat

Daun pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) yang basah dikeringkan dalam mesin pengering pada suhu 45°C, kemudian dijadikan serbuk menggunakan blender sampai halus. Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam 1000 mg bubuk simplisia daun pukul empat dalam 1000 ml etanol 96%, kemudian diinkubasi selama 3 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan pemisahan zat aktif dan etanol menggunakan *vaccum evaporator*. Zat aktif dibuat stok sebanyak 1 gr/ml dan selanjutnya diencerkan menjadi konsentrasi 0, 7.5, 15, 25, 50 dan 75 µg/ml.

### 2. Persiapan biakan sel kanker lidah manusia SP-C1

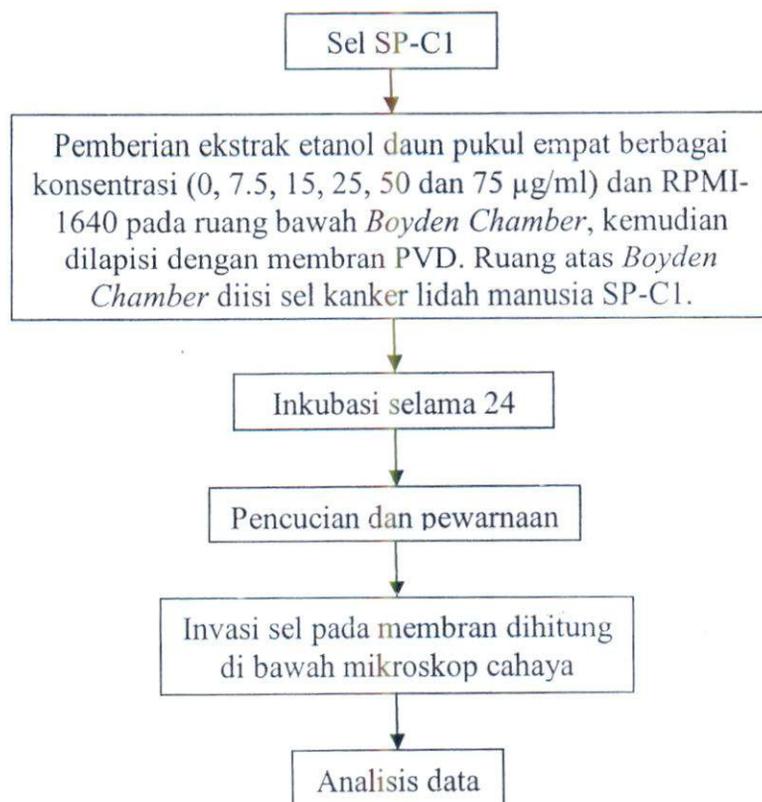
Sel kanker lidah manusia SP-C1 dibiakkan dengan media RPMI-1640 dan FBS 10% dalam cawan petri. Sel tersebut diinkubasi pada suhu 37° C dengan kelembaban udara 95 % dan CO<sub>2</sub> 5 %.

### 3. Pengujian potensi antiinvasi sel kanker lidah manusia SP-C1

Aktivitas antiinvasi ekstrak etanol daun pukul empat terhadap sel kanker lidah manusia SP-C1 diukur menggunakan alat *Boyden Chamber*. Sel kanker lidah manusia SP-C1 yang tumbuh *subconfluent* dipanen menggunakan Trypsin-EDTA 0.25%. Sel sebanyak 5x10<sup>5</sup> sel/kit BD

dicampur dengan RPMI-1640 di dalam tabung conical. Ruang bawah membran polivinylidone diberi RPMI-1640 dan FBS 10% dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pukul empat (0, 7.5, 15, 25, 50 dan 75  $\mu\text{g/ml}$ ). Ruang atas membran polivinylidone diisi dengan sel kanker lidah manusia SP-C1. Setelah inkubasi selama 24 jam, membran polivinylidone dicuci menggunakan Mill-Q dan diwarnai menggunakan karatin atau hematoksilin. Invasi sel pada membran dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali.

#### H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

## I. Analisis Statistik

Analisis statistik yang dilakukan adalah dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Kemudian data dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANAVA) satu jalur yang dilanjutkan dengan *LSD (Least Significant Different)* dengan