

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 5×10^5 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°C dan 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. CO₂ 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

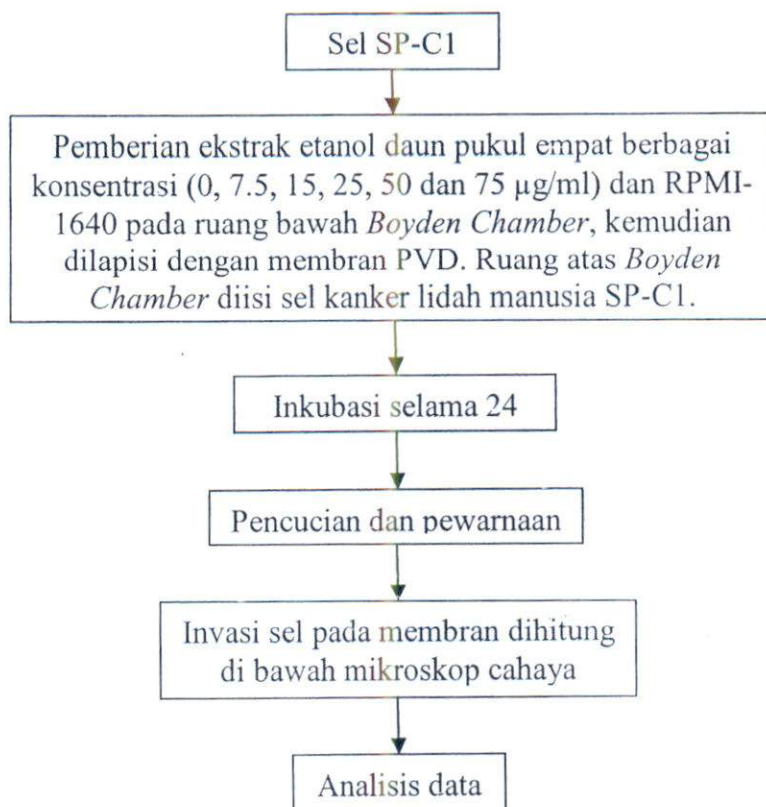
Sel kanker lidah manusia SP-C1 dibiakkan dengan media RPMI-1640 dan FBS 10% dalam cawan petri. Sel tersebut diinkubasi pada suhu 37° C dengan kelembaban udara 95 % dan CO₂ 5 %.

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 5x10⁵ 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