

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini berupa penelitian analitik eksperimental.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Biomedik Fakultas kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta dilaksanakan pada Bulan Desember 2009 sampai Januari 2010.

4.3. Subjek Penelitian

Sel karsinoma Mammae T47D dari *ATCC (American Tissue Culture Colection)*

4.4. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 24 *well kultur* sel T47D pada medium RPMI 1640, masing-masing well berisi 2×10^5 sel/ 200 μ l. Empat well pada perlakuan dengan fraksi etanolik batang sarang semut, pada konsentrasi 0 μ gr/ ml; 31,25 μ gr/ ml; 62,5 μ gr/ ml; 125 μ gr/ ml. Dalam menentukan jumlah sampel tersebut digunakan patokan *rule of thumb*, sebagaimana dituliskan oleh Murti (2006), yang menyatakan apabila sampel dibagi dalam sejumlah kelompok studi berdasar tingkat perlakuan maka ujangsan sampai kurang dari 5 subjek

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

- Laminar Air Flow Hood/ Tissue Culture Cabinet
- Incubator CO₂
- Sentrifuse
- Mikroskop Inverted
- Improved Neubauer Hemocytometer Chamber

4.5.2 Bahan

- Galur sel karsinoma Mammae T47D
- Ekstrak sarang semut
- RPMI 1640
- Penicilin Streptomisin 2%
- Fetal Bovine Serum
- Fungizone: Amphotericin B 0,5%

4.6. Cara Kerja

4.6.1 Kultur Sel

Kultur sel karsinoma Mammae T47D dilakukan setelah thawing dari tangki nitrogen cair. Sel dikultur pada media RPMI 1640, FBS 10%, Penstrep 2 %, Fungizone 0,5%. Adaptasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan CO₂ 5%. Setelah konfluen sel dipanen dengan tripsin 0,25%.

4.6.2 Starvasi

Tujuan langkah ini adalah mencapai keseragaman umur sel T47D dalam kultur, dengan menggunakan RPMI 1640, FBS 10%, Penstrep 2 %, Fungizone 0,5% selama 7 hari setiap 3 hari sekali media diganti dengan yang

baru dalam inkubator CO₂ 5%. Setelah hari ke-tujuh, sel dilepas dari flask dengan tripsin 0,25% ditambah RPMI 1640, disentrifuse selama lima menit kemudian supernatan dibuang, jumlah sel dihitung dengan bilik hitung *Improved Neubauer haemocytometer*.

Disiapkan mikroluktur 48 sumuran yang terdiri baris A sampai dengan F dan kolom 1 sampai 6. Masing-masing sumuran diisi dengan sel karsinoma Mammae T47D yang telah dilakukan starvasi dengan kepadatan sel sama, yaitu 2×10^5 sel/ 200 μ l.

4.6.3 Uji Sitotoksisitas

Bahan uji fraksi etanolik batang sarang semut yang telah disiapkan dengan masing-masing enam konsentrasi, ditambahkan dengan menggunakan mikro pipet ke dalam sumuran. Setiap konsentrasi dibuat lima kali ulangan.

Perlakuan dengan fraksi etanolik batang sarang semut, sel mammae T47D untuk sarang semut ditentukan dengan variasi konsentrasi 0 μ gr/ ml; 31,25 μ gr/ ml; 62,5 μ gr/ ml; 125 μ gr/ ml. Dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dengan menggunakan *Improved Neubauer* dan mikroskop *interved*.

4.6.4 Imunositokimia

Biakan sel T47D pada media RPMI 1640 dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak batang sarang semut pada konsentrasi 0 μ gr/ ml; 31,25 μ gr/ ml; 62,5 μ gr/ ml; 125 μ gr/ ml sebanyak 2×10^5 sel ditetaskan di atas gelas slide poli L-lysine masing-masing kelompok dengan 5 ulangan. Dilakukan *blocking* dengan normal serum selama 20 menit, diinkubasi dengan *monoklonal antibodi primer anti-human p21* (dengan pengenceran 1:100)

selama 18 jam pada 4⁰C. Dicuci dengan *wasing buffer* (PBS) 2 kali selanjutnya diinkubasi 20 menit dengan *polyvalent universal HRP conjugate*. Dicuci dengan PBS 2 kali selanjutnya diinkubasi dengan DAB (*Deamino Benzidin*) sebagai substrat enzim. Pewarnaan tanding (*counterstain*) menggunakan Hematoxilin Mayer. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus DP40 untuk menentukan intensitas ekspresi dan prosentase sel.

Penilaian makna tampilan p21, ki67 dinyatakan sebagai Skor Sitologi (SS) dilakukan berdasar rumus sebagai berikut:

$$SS = (IK \times PK) + (IS \times PS) + (IL \times PL) + (IN \times PN)$$

(Tan, et al., 2002)

Keterangan:

I = Intensitas	S = Sedang
P = Prosentase	L = Lemah
K = Kuat	N = Negatif

Tabel 1. Prosentase Jumlah Sel (P) pada galur sel karsinoma Mammae T47D (Budiani, et al., 2006)

PROSENTASE	GRADE
0 – 25%	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
76 – 100%	4

Tabel 2. Penilaian Intensitas (I) warna pengecatan positif tampilan p21, ki 67 pada galur sel karsinoma Mammae T47D (Budiani, et al., 2006)

INTENSITAS	KISARAN NILAI INTENSITAS YANG TERBACA SOFTWARE	GRADE
KUAT	21 – 65,5	3
SEDANG	65,5 – 110	2
LEMAH	110,1 – 154,5	1
NEGATIF	154,6 - 199	0

1	2	3	4	5	6
A	A	A	A	A	A
B	B	B	B	B	B
C	C	C	C	C	C
D	D	D	D	D	D

Gambar 3. Skema Pengisian sumuran pada *mikroplate*

Keterangan:

A	sarang semut pada konsentrasi 0 $\mu\text{gr}/\text{ml}$
B	sarang semut pada konsentrasi 31,25 $\mu\text{gr}/\text{ml}$
C	sarang semut pada konsentrasi 62,5 $\mu\text{gr}/\text{ml}$
D	sarang semut pada konsentrasi 125 $\mu\text{gr}/\text{ml}$

4.7 Variabel Penelitian

4.7.1 Pada Analisa Korelasi

- **Variabel Pengaruh** : konsentrasi ekstrak batang sarang semut
- **Variabel Terpengaruh** : skor sitologi dari ekspresi p21, ki67

4.7.2 Pada Analisa Uji Beda

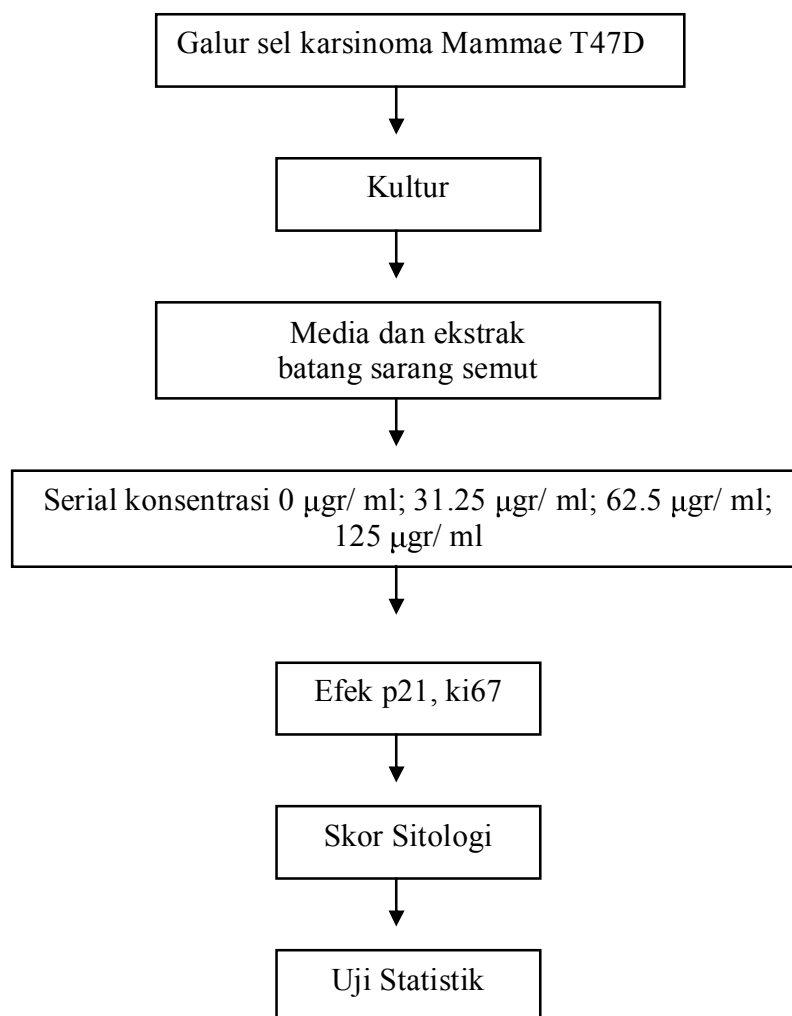
- **Variabel Pengaruh** : Jenis perlakuan ekstrak batang sarang semut
- **Variabel Terpengaruh** : skor sitologi dari ekspresi p21, ki67

4.8 Definisi Operasional

1. Fraksi etanolik batang sarang semut adalah ekstrak cair serbuk sarang semut 25 gr yang diekstraksi dengan 100 ml pelarut etanol (*pro analis*) dengan metode *shocletase*. Dalam penelitian digunakan ekstrak batang sarang semut murni (*Myrmecodia pendens*, Merr & Perry) dari LIPI.
2. Konsentrasi dosis adalah banyaknya ekstrak dari batang sarang semut dalam larutan yang akan dimasukkan ke dalam mikrokultur dengan konsentrasi bertingkat per mililiter media kultur.

3. Proliferasi sel dihitung setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37°C dan dilakukan perhitungan jumlah sel secara *direct counting* menggunakan mikroskop *inverted* dan bilik hitung *Improved Neubauer* haemocytometer.

4.9 Rancangan Penelitian



4.10 Analisa Data

Dari data yang diperoleh dalam penelitian, dilakukan uji statistik untuk mengetahui pemberian ekstrak batang tumbuhan sarang semut terhadap penghambatan proliferasi galur sel karsinoma mammae T47D serta uji regresi pemberian fraksi etanolik ekstrak batang tumbuhan sarang semut pada galur sel karsinoma mammae T47D terhadap skor sitologi efek p21, ki67.