

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorik.

#### **4.2 Sampel Penelitian Dan Bahan Uji**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker skuamosa mulut dan sel ameloblas. Kultur dilakukan di laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Sel yang dikultur adalah berasal dari galur sel HSC-4 dan galur sel HAT-7. Dan bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan yang didapat dari BATAN.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan September 2008 sampai November 2008.

#### **4.4 Variable Penelitian**

##### **4.4.1 Variable Terikat**

Viabilitas sel dalam medium kultur.

##### **4.4.2 Variabel bebas**

Kitosan dengan konsentrasi 0.0005%, 0.0025%, 0.005%, 0.25%, 0.5%, serta sel HSC-4 (galur sel kanker sel skuamosa mulut) dan HAT-7 (galur sel epitel dental).

#### **4.5 Definisi Operasional**

##### **4.5.1 Kitosan**

Kitosan adalah polisakarida yang merupakan turunan dari kitin yang didapat dari ekstrak eksoskeleton hewan krustasea. Dalam penelitian ini, didapat kitosan dalam sediaan larutan dengan

pelarut 1% asam asetat. Kitosan didapat dari BATAN, kemudian dibuat larutan dengan konsentrasi 10 mg/mL (1%). Kitosan yang diperoleh memiliki berat molekul 7.000 hingga 8.000 Da, dengan derajat deasetilasi 72% hingga 80%. Kelarutan dalam asam asetat 1% adalah 0.02 g/mL serta memiliki kadar air kurang dari 10%.

#### 4.5.2 Viabilitas sel

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup setelah terpapar suatu bahan. Pada penelitian ini viabilitas sel diukur dengan *MTT assay*, yaitu suatu metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas selular setelah terpapar dengan bahan uji berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria sel yang mengubah *methylthiazole tetrazolium* berwarna kuning menjadi kristal formazan ungu. Perubahan warna yang terjadi, diukur dengan menggunakan *microplate reader* panjang gelombang 490 nm. Kemudian hasilnya dibaca dengan program *microplate manager* lalu dipresentasikan terhadap kontrol. Bubuk MTT digunakan dengan merek Sigma-Aldrich dengan pelarut *Aqua Bidestilata*.

#### 4.5.3 HSC-4

Sel HSC-4 merupakan galur sel kanker skuamosa mulut dan didapat dari sediaan sel yang disimpan dalam *cryopreservation* di Laboratorium Biologi Oral Universitas Indonesia.

#### 4.5.4 HAT-7

Sel HAT-7 merupakan galur sel epitel dental dan didapat dari sediaan sel yang disimpan didalam *cryopreservation* di Laboratorium Biologi Oral Universitas Indonesia.

## 4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

### 4.6.1 Alat

1. Pipet Pasteur
2. Pipet Eppendorf
3. Tips 1000  $\mu$ L
4. Tips 50  $\mu$ L
5. Tips 10  $\mu$ L
6. *Tube* 15 mL (Falcon)
7. *Tube* 50 mL (Falcon)
8. Eppendorf *Tube*
9. *Petri dish*
10. Gelas Ukur 100 mL (Iwaki Pyrex)
11. Timer
12. Centrifuge (Legend RT, Sorvall)
13. Ruang laminar/Cabinet (ESCO Micro PTE LTD.)
14. Inkubator (Inco 2, Memmert)
15. Hemocytometer (Naubauer)
16. Microscope cahaya (Olympus Tokyo)
17. Microplate Reader (Benchmark, Biorad)
18. Microplate manager (V.5.2 Bulid 103)
19. Nitrogen cryopreservation (Bio cane 20, Termolyne)
20. Filter steril cairan 0.20  $\mu$ m (Gema Medical S.L.)
21. Syringe besar (Terumo)
22. Label

### 4.6.2 Bahan

1. 50 mL Media lengkap:
  - a. 45 mL DMEM High Glucose L-Glutamine
  - b. 5 mL FBS 10% (Bio West)
  - c. 50  $\mu$ g Penicilline Streptomycine
  - d. 10  $\mu$ g Fungizone
2. PBS 10% (1 tab untuk 1 cc pelarut  $\rightarrow$  1 tab dilarutkan dalam 1L *Aqua Bidestilata*)
3. Ethanol 95%
4. Kitosan 10 mg/mL

5. Isopropanol
6. HCl 1 N

### 4.6.3 Cara Kerja

#### 4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

##### A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Tips, DMEM dan PBS disterilisasi dengan autoclave 20 menit pada suhu 120°C. Semua alat dan ruang laminar dibersihkan, kemudian disemprotkan ethanol 70%. Sebelum memulai pekerjaan, semua alat dimasukan ke ruang laminar, dan disterilisasi dengan sinar UV selama 5-20 menit.

##### B. Pembuatan Medium Kultur Lengkap (dilakukan di dalam biohazard cabinet)

DMEM (45 mL) cair ditambahkan FBS (5 mL), *Penicillin-Streptomycin* (10 µg), *Fungizone* (*Amphotericin B* 10 µg) dan FBS (10%). Selanjutnya, medium kultur tersebut disaring ke dalam *tube* 50 ml dengan menggunakan *syringe* 50 ml dengan '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 µm). Lalu medium lengkap disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C

##### C. Pembuatan PBS

Dibuat PBS dengan perbandingan 10 tablet PBS untuk 1 L *Aqua Bidestilata*. Kemudian tablet-tablet tersebut dilarutkan dengan *Aqua Bidestilata*.

#### 4.6.3.2 Aktivasi sel

Medium lengkap dipersiapkan sebanyak 20 mL, lalu dibagi kedalam 2 *tube* ukuran 15 mL. Sementara itu, sentrifuge disiapkan pada suhu 4°C. Vial yang berisi sel HSC-4 dan A-549 diambil dari *cryopreservation* untuk

dilakukan “*quick thaw*” dengan suhu tubuh agar cairan yang berisi sel didalam vial mencair. Seluruh sel HSC-4 di dalam vial diambil menggunakan tips 1000 $\mu$ L lalu dipindahkan ke *tube* 15 mL yang telah diisi 10 mL medium lengkap sebelumnya kemudian dihomogenisasi. Dilakukan hal yang sama untuk sel A-549. Sel yang berada di dalam medium kemudian disentrifuge dengan 2000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C. Setelah itu, supernatant dan medium dibuang dengan pipet, hingga tersisa pelet sel di dasar *tube*. Kemudian dimasukkan 5 mL medium lengkap kedalam *tube* yang berisi pelet sel, lalu dilakukan *pipeting* hingga pelet tercampur rata dengan medium pada kedua jenis sel. Dua buah *petri dish* yang diisi masing-masing 5 mL medium lengkap disiapkan dan sel-sel tersebut dibagi ke dalam 2 *petri dish* (2.5 mL tiap *petri dish*). Ditambahkan kembali 5 mL medium lengkap kedalam tiap *tube* agar medium menutupi semua permukaan *petri dish* Tiap *petri dish* diberi label jenis sel serta tanggal dan kemudian dimasukan dalam inkubator.

#### 4.6.3.3 Panen sel

*Petri dish* yang berisi sel HSC 4 dan HAT-7 dikeluarkan dari inkubator kemudian dicek apakah kondisi sel sudah *confluent* (padat) atau belum dengan menggunakan mikroskop. Seluruh DMEM dibuang dengan pipet. *Petri dish* kemudian dicuci dengan PBS, kemudian PBS dibuang. Tahap tersebut diulang sebanyak 3 kali. Sel dikumpulkan dengan *scraper* hingga terkonsentrasi pada satu titik. PBS dimasukan sebanyak 5 mL kedalam *petri dish*. PBS yang bercampur dengan sel dikumpulkan dan dimasukan kedalam *tube* 15 mL, lalu disentrifuge pada suhu kamar, dengan kecepatan 2000 rpm, selama 10 menit. PBS

dibuang, sisakan pellet dibawahnya. Selanjutnya, dimasukan media lengkap, lalu pipeting. Lalu sel dipindahkan ke beberapa *petri dish* dan ditambahkan 5 mL media lengkap sampai seluruh permukaan *petri dish* tertutup media.

#### 4.6.3.4 Penghitungan jumlah sel dan memasukan sel ke well

Sebanyak 10  $\mu$ L suspensi sel dimasukan ke dalam *eppendorf tube*. Lalu 80  $\mu$ L PBS dimasukan kedalam *eppendorf tube* tersebut dan ditambahkan 10  $\mu$ L Tripan blue. Lalu suspensi tersebut dimasukan kedalam hemositometer. Jumlah sel pada R1, R2, R3, R4, dan R5 dihitung di bawah mikroskop. Setelah didapat data-datanya, kemudian dihitung rata-rata  $\sum R = \frac{R1+R2+R3+R4+R5}{5}$ .

Dihitung jumlah sel dalam medium =  $\sum R \times \text{Pengenceran} \times 10^4$ . Ke dalam setiap *well* dimasukkan  $1 \times 10^6$  sel sebanyak 50  $\mu$ L. Sel diinkubasi selama satu hari.

#### 4.6.3.5 Memajan kitosan

Berbagai jenis konsentrasi kitosan disiapkan dengan melalui beberapa kali pengenceran. Kemudian setiap *well* yang berisi 50  $\mu$ L sel beserta DMEM dipajankan dengan 50  $\mu$ L kitosan dengan berbagai konsentrasi. Lalu diinkubasikan selama 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 4 jam.

#### 4.6.3.6 Uji Viabilitas Sel kanker dengan MTT Assay

Bubuk MTT disiapkan dan dilarutkan dalam *Aqua Bidestilata* dengan konsentrasi 5 mg/ml. Kemudian dimasukan ke dalam tiap well sebanyak 15  $\mu$ L. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 3 jam. Setelah itu, setiap *well* ditambahkan 150  $\mu$ l *acidified isopropanol* (HCl + Isopropanol). Letakkan di atas *orbital*

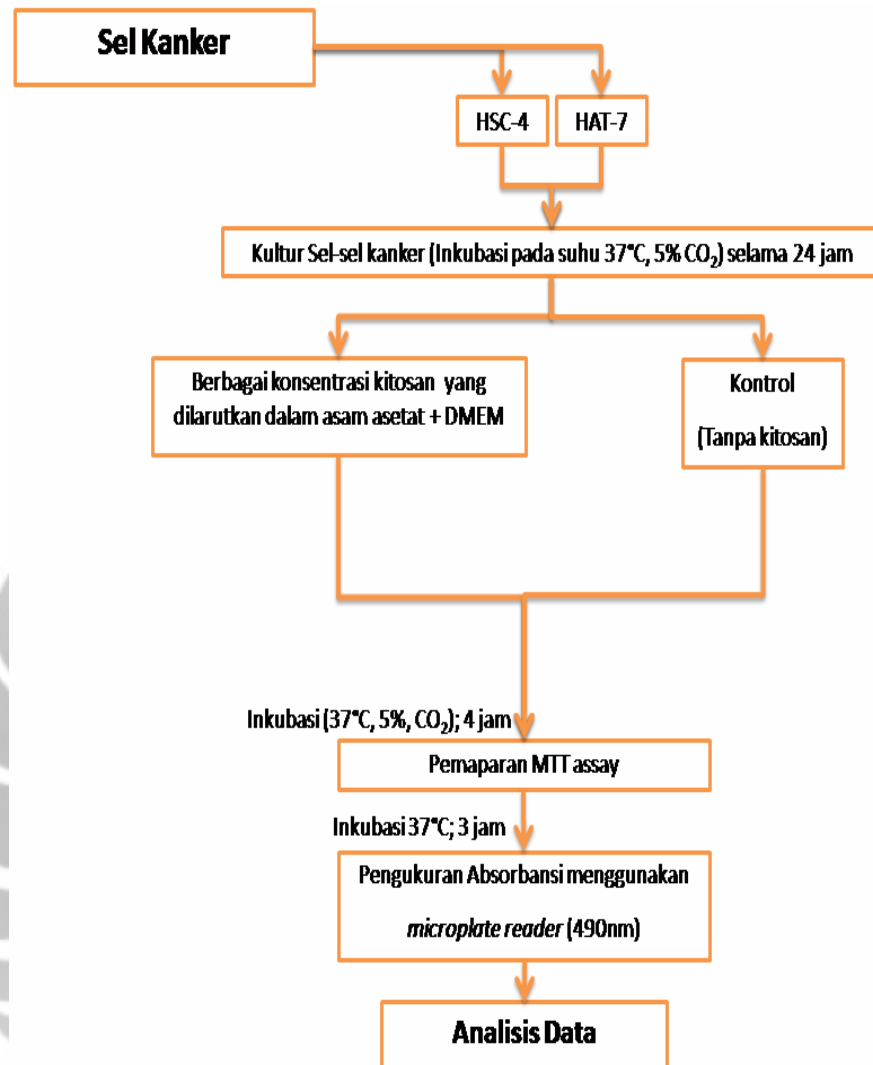
*shaker* (50 rpm) selama 1 jam. Masukkan *plate* ke dalam *microplate reader* untuk dibaca dengan panjang gelombang 490 nm.

#### **4.6.3.7 Persiapan komputer dan microplate reader MTT assay**

Hidupkan komputer dan microplate reader. Click microplate manager pada desktop. Klik File dan pilih menu New endpoint protocol. Atur panjang gelombang 490nm dan incubator 37°C Klik ShowTemplate, atur posisi control dan sampel. Klik report, tandai RawData, AbsorbanceData. Masukkan 96 well plate kedalam microplate reader. Klik Run untuk melihat hasil MTT.



#### 4.7 Alur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Perbedaan viabilitas sel-sel HSC-4 dan HAT-7 antara kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan dan di antara kelompok Perlakuan dianalisis dengan uji statistic *one way ANOVA* dan *T-test*.

#### 4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh surat lolos etik dari Komisi Etik Penelitian FKG UI pada tanggal 6 Oktober 2008.