

BAB 4 METODA 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 adenokarsinoma paru-paru. Kultur dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia; berupa galur sel HSC-4, dan galur sel A549. Sedangkan bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan yang didapat dari BATAN (Lampiran 2).

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 A-549 (galur sel adenokarsinoma paru-paru).

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Kitosan

Adalah polisakarida linear berupa turunan dari kitin yang didapat dari ekstrak eksoskeleton hewan krustasea. Dalam penelitian ini, kitosan dilarutkan dalam pelarut 1% asam asetat. Larutan kitosan didapat dari BATAN, dengan volume total 7 mL serta 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-sel kanker

Adalah kemungkinan sel-sel kanker untuk dapat hidup setelah terpajan suatu bahan. Pada penelitian ini viabilitas sel diukur dengan *MTT assay*, yaitu suatu metoda 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 dipresertasekan terhadap kontrol. Bubuk MTT digunakan dengan merek Sigma-Aldrich dengan pelarut *MiliQ*.

4.5.3 Galur sel HSC-4 dan galur sel A549

Merupakan merupakan galur sel kanker skuamosa mulut (HSC-4) dan galur sel adenokarsinoma paru-paru (A549). Didapat dari cryopreservation di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

HSC-4 merupakan galur sel kanker skuamosa yang dibuat dari kanker skuamosa pada lidah manusia.^(60, 61) Galur sel ini

dikultur dalam medium DMEM dengan 10% FBS, dengan 5% CO₂, temperatur 37°C dan tumbuh dalam satu lapisan menempel di dasar medium. Sel ini memiliki rentan hidup yang tidak terbatas dan memiliki struktur morfologi seperti sel epitel.⁽⁶¹⁾

Galur sel A-549 merupakan galur sel adenokarsinoma paru-paru dikultur dalam medium D-MEM dengan 10% FBS, dalam 5% CO₂, temperatur 37°C. Galur sel ini memiliki rentan hidup yang tidak terbatas, dan memiliki struktur morfologi seperti sel epitel yang tumbuh dalam satu lapisan pada dasar medium

4.6 Alat, Bahan, Dan Cara Kerja

4.6.1 Alat

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

21. Label kertas

22. Timer

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 µg Penicilline Streptomycine
 - d. 10 µg Fungizone
2. PBS 10% (1 tab untuk 1 cc pelarut → 1 tab dilarutkan dalam 1L *MiliQ*)
3. Ethanol 95%
4. Kitosan 10 mg/mL
5. Isopropanol
6. HCl 1 N
7. *MiliQ*
8. Trypan Blue
9. MTT Powder (M-2128 Sigma)
10. *Aqua Bidestilata*
11. Galur sel kanker skuamosa HSC-4
12. Galur sel adenokarsinoma A-549

4.6.3 Cara kerja

4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

Tips, DMEM dan PBS di sterilisasi dengan autoklaf 20 menit pada suhu 120°C. Semua alat dan ruang laminar didisinfektan dengan disemprotkan ethanol 70%. Dan sebelum dipakai, semua alat dimasukkan ke ruang laminar, dan disterilisasi dengan sinar UV selama 5-20 menit.

Pembuatan medium kultur lengkap dilakukan di dalam biohazard cabinet. Berupa campuran DMEM cair sebanyak 45 mL yang ditambahkan FBS sebanyak 5 mL, *Penicillin-Streptomycin*

sebanyak 10 µg, *Fungizone* (*Amphotericin B*) sebanyak 10 µL serta FBS sebanyak 5 mL. 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 dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

Pembuatan PBS dilakukan dengan melarutkan tablet PBS dan MilliQ dalam perbandingan 10 tablet PBS untuk 1 L MilliQ lalu diautoclaf selama 20 menit.

4.6.3.2 Aktifasi sel

Medium lengkap dipersiapkan sebanyak 20 mL, lalu dibagi kedalam 2 tube ukuran 15 mL. Sentrifuge disiapkan pada suhu 4°C, dengan cara mengatur sentrifuge pada suhu 4°C, kecepatan 2.000 rpm, lalu diputar selama 20 menit. Vial yang berisi sel HSC-4 dan A-549 diambil dari *cryopreservation*. Lalu vial dihangatkan dengan suhu tubuh agar cairan yang berisi sel dalam vial mencair. Seluruh sel HSC-4 dalam vial diambil menggunakan tips 1000µL, 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 dalam medium kemudian disentrifugasi dengan 2000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C. Supernatant dan medium dibuang dengan pipet, hingga tersisa pellet sel di dasar tube. 5 mL medium lengkap dimasukkan kedalam tube yang berisi pelet sel, lalu dilakukan homogenisasi hingga pelet tercampur rata dengan medium pada kedua jenis sel. Disiapkan 4 buah petri dish yang diisi masing-masing 5 mL medium lengkap. Sel dalam 5 mL medium lengkap, dibagi ke dalam 2 petri dish (2.5 mL tiap petri dish). Tahap ini dilakukan pada kedua jenis sel. Ditambahkan kembali 5 mL medium lengkap kedalam tiap tube, dan dilakukan pipeting untuk membilas tube, kemudian medium dibagi rata kembali kedalam

tiap petri dish hingga volume medium dengan sel dalam petri dish menjadi 10 mL tiap petri dish. Tahap ini dilakukan pada kedua jenis sel. Tiap petri dish diberi label jenis sel serta tanggal. Petri dish dimasukkan dalam inkubator 37°C dan 5% CO₂ dimana inkubator sebelumnya disemprotkan Ethanol 70%.

4.6.3.3 Panen sel, penghitungan jumlah sel dan *splitting* sel ke 96 well.

Petri dish yang berisi sel HSC-4 dan A-549 dikeluarkan dari inkubator setelah terlihat *confluent* (padat) dibawah mikroskop cahaya. Seluruh DMEM dibuang dengan pipet. Sel dalam petri dish kemudian dicuci dengan PBS, kemudian PBS dibuang. Tahap ini diulangi hingga tiga kali. Lalu 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 disentrifugasi pada 37°C, 2.000 rpm, selama 10 menit. PBS dibuang, sisahkan pellet dibawahnya. Masukan 1 mL media lengkap, lalu pipeting.

10 µL suspensi sel dimasukan ke dalam eppendorf tube. 80 µL PBS dimasukan kedalam eppendorf tube tersebut. Lalu ditambahkan 10 µL Tripian blue. Lalu suspense tersebut dimasukan kedalam hemositometer. Jumlah sel pada R1, R2, R3, R4, dan R5 dihitung di bawah mikroskop cahaya. Dihitung rata-rata sel dalam tiap kamar hitung menggunakan rumus:

$$\sum R = \frac{R1+R2+R3+R4+R5}{5}$$

Jumlah yang dimasukan ke dalam tiap well minimum 1 x 10⁶. Setiap well harus berisi 50 µL suspensi yang berisi medium lengkap dengan sel. Lalu dilakukan penghitungan jumlah sel dalam medium:

$$\text{Jumlah sel} = \sum R \times \text{Pengenceran} \times 10^4.$$

Jumlah sel yang dimasukan dalam penelitian ini adalah 1x10⁶ sel per well. Lalu sel diinkubasikan pada 37°C, 5% CO₂,

selama satu hari sesuai protokol agar didapat kultur sel dalam keadaan semi-konfluen dan melekat pada dasar well.

4.6.3.6 Memajanan kitosan

Setiap well yang berisi 50 μ L sel beserta DMEM dipajankan dengan 50 μ L kitosan dengan berbagai konsentrasi. Kitosan yang telah dilarutkan dalam asam asetat, diencerkan menggunakan DMEM untuk didapat kitosan dalam konsentrasi yang diinginkan. Dalam penelitian ini, digunakan kitosan dalam konsentrasi 0,0005%; 0,0025%; 0,005%; 0,25%; serta 0,5%. Lalu plate diinkubasikan pada lingkungan 37⁰C, 5% CO₂ selama 4 jam.

4.6.3.7 Uji Viabilitas Sel kanker dengan *MTT Assay*

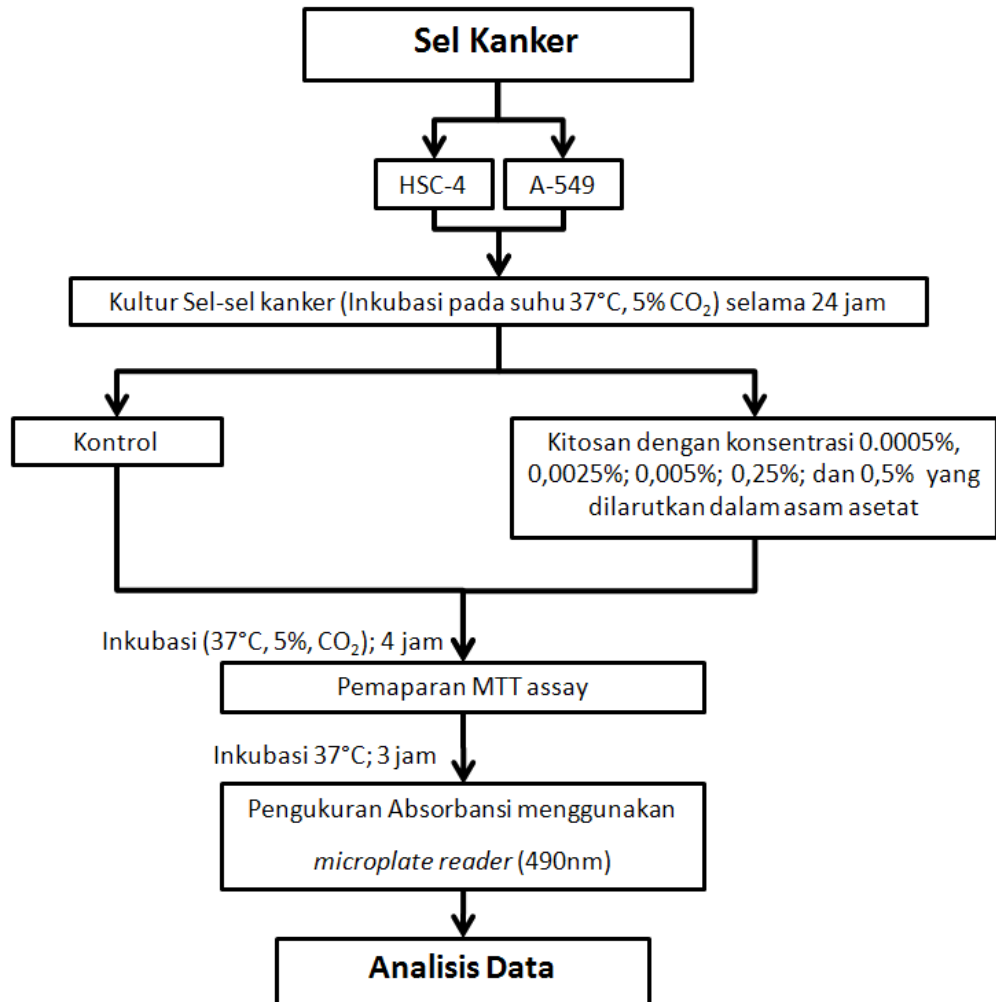
Larutkan bubuk MTT dengan Aqua Bidestilata dengan konsentrasi 5 mg/ml. Solusi MTT dimasukan kedalam tiap well sebanyak 15 μ L. Lalu inkubasi pada suhu 37⁰C dan 5% CO₂ selama 3 jam. Untuk melisiskan membran sel guna mengeluarkan produk kristal formazan, digunakan *acidified isopropanol*. Diberikan 150 μ L/well *acidified isopropanol*; berupa HCl yang diencerkan menggunakan Isopropanol. Lalu diletakan di atas *orbital shaker* (50 rpm) selama 1 jam. Untuk melihat nilai absorbansi tiap kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan, masukan plate kedalam microplate reader untuk dibaca pada gelombang 490 nm.

4.6.3.8 Persiapan komputer dan microplate reader MTT assay

Hidupkan komputer dan microplate reader. Aktifkan program microplate manager. Klik File dan pilih menu New endpoint protocol. Atur panjang gelombang 490nm dan inkubator 37⁰C. Klik ShowTemplate, atur posisi control dan sampel. Klik report, tandai RawData dan AbsorbanceData. Masukkan 96 well

plate kedalam microplate reader. Klik Run untuk melihat hasil MTT.

4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Perbedaan nilai absorbansi sel-sel HSC-4 dan A-549 antara kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan dianalisis dengan uji statistik *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.