

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Pada penelitian ini jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa kultur sel fibroblas dari *Baby Kidney Hamster* (BHK-21) dengan media *Eagles* dalam *microplate*.

#### 4.3 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus (Lemeshow, 1990):

$$n = \frac{2\delta^2(Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n = \frac{2 \times 0,032^2 (1,645 + 1,282)^2}{(0,6013 - 0,685)^2}$$

$$n = 3$$

Keterangan:

n = besar sample

$\delta$  = standart deviasi

$Z_{1-\alpha}$  = harga standart normal (tergantung harga  $\alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ )

$Z_{1-\beta}$  = besar kekuatan penelitian

$\mu_1 - \mu_2$  = beda rata - rata masing - masing kelompok

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*) dalam berbagai konsentrasi

Variabel tak bebas : Proliferasi sel fibroblas BHK-21

Variabel terkendali : Metode kultur sel fibroblas, metode pembuatan ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*), dan metode penghitungan jumlah sel fibroblas.

#### 4.5 Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*) adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara merangsang permukaan tubuh bekicot dengan menggunakan *electric shock* yaitu suatu aliran listrik, kemudian dilakukan maserasi dengan air dan diteteskan pada sediaan sel fibroblas BHK-21.
2. Kadar protein *acharan sulfate* ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*) dalam etanol dihitung dengan menggunakan metode Biuret.
3. Sel fibroblas merupakan sediaan hasil kultur sel fibroblas dari *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) dengan media *Eagles* dalam *microplate*.
4. Sel fibroblas yang hidup akan terwanai dengan formazan menjadi ungu saat dilihat menggunakan mikroskop cahaya.
5. Jumlah sel fibroblas merupakan persentase dari nilai absorbansi yang dihitung dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm.
6. *Optical Density* adalah angka yang ditampilkan oleh read out display Elisa Reader mencerminkan hasil logaritma dari intensitas cahaya.

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses pembuatan ekstrak lendir bekicot dan penghitungan kadar ekstrak lendir bekicot dilakukan di Laboratorium Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Surabaya. Penelitian dan pembuatan sediaan sel fibroblas BHK-21 dilakukan di Pusat Veterinari Farma (PUSVETMA) Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan September-Oktober 2014.

#### 4.7 Alat dan Bahan

##### 4.7.1 Alat

- a. *Electric shock*
- b. Botol bekas
- c. Sentrifus
- d. Magnet stirrer
- e. Tabung reaksi
- f. Kuvet kaca
- g. *Ependorff tube*
- h. *ELISA reader*
- i. Mikroskop cahaya
- j. Mikropipet
- k. Ujung pipet steril
- l. Inkubator 37°C
- m. *Microplate*
- n. Botol kultur Roux
- o. *Shaker*

- p. Gelas ukur
- q. Kamera

#### 4.7.2 Bahan

- a. Ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*)
- b. Sel fibroblas BHK-21
- c. Aquades steril
- d. *Phosphate-buffered salin (PBS)*
- e. *Fetal bovine serum (FBS)* 10%
- f. *Media Eagles*
- g. Larutan *Trypsine versene*
- h. MTT assay[3-(4,5-dymethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyl-tetrazolim bromide]
- i. *Dimethyl Sulfoxide (DMSO)*
- j. Cetylpyridinium chloride 5%
- k. 2,5 M NaCl
- l. Etanol
- m. Sodium potassium tartrate
- n. Copper sulfate x 5H<sub>2</sub>O (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)
- o. Potassium iodide
- p. NaOH

## 4.8 Cara Kerja

### 4.8.1 Isolasi Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

1. Dilakukan pengambilan lendir dari bekicot *Achatina fulica* sebanyak 16 ekor, dengan cara merangsang permukaan tubuh bekicot dengan menggunakan *electric shock* pada tegangan listrik 10 Volt selama 60 detik.



**Gambar 4.1** Merangsang permukaan tubuh bekicot menggunakan *electric shock*

2. Lendir bekicot dicampur dengan aquades sebanyak dua kali volume sampel. Kemudian ditambahkan potassium asetat 1% dalam etil alcohol sebanyak lima kali volume sampel lalu campuran didiamkan selama semalam pada suhu 4°C di atas magnet stirrer dalam lemari pendingin. Setelah itu ekstrak disentrifus pada kecepatan 8000 X g selama 30 menit.
3. Supernatan diukur volumenya dan dilarutkan dalam aquades sebanyak 2,5 kali volume sampel dan cetylpyridinium chloride 5% sebanyak 5/8 kali volume sampel, lalu disimpan selama 1 jam dalam suhu ruangan. Setelah 1 jam, campuran disentrifus pada 8000 X g selama 30 menit, kemudian endapan dilarutkan dalam 2,5 M NaCl sebanyak ¼ volume sampel pada suhu 45°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambah etanol sedikit demi sedikit sebanyak 3 kali volume sampel, kemudian didiamkan selama 1 jam lalu disentrifus pada 4000 rpm selama 30 menit.

4. Presipitasi diencerkan kembali dengan tris-HCl pH 8,0 dan didapatkan ekstrak lendir bekicot presipitasi etanol hasil resuspensi. Hasil resuspensi yang didapat dikumpulkan dan disimpan di dalam  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk dilakukan *freeze dry* sehingga didapat ekstrak lendir bekicot yang pekat dan mudah disimpan serta mengandung *crude acharan sulfate*.

#### 4.8.2 Penghitungan Kadar Protein Ekstrak Lendir Bekicot Metode Biuret

1. 200  $\mu\text{l}$  larutan protein ditambah 800  $\mu\text{l}$  reagen biuret kemudian dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Reagen biuret didapat dari campuran 2,25 g Sodium potassium tartrate, 0,75 g Copper sulfate x 5H<sub>2</sub>O dan Potassium iodide yang dilarutkan dalam 100 ml 0,2 NaOH dan ditambahkan aquades sampai 250 ml.
2. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum BSA. Larutan stok BSA didapat dari 1 g BSA yang dilarutkan dengan aquades dalam beaker glass 50 ml dan ditambahkan beberapa tetes NaOH 3% lalu diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas.
3. Absorbansi dikonversikan pada kurva baku BSA. Untuk reagen blank, dipipet 200  $\mu\text{l}$  reagen biuret lalu diukur absorbansinya.

#### 4.8.3 Persiapan Kultur Sel

1. Kultur sel fibroblas BHK-21 dalam bentuk monolayer dengan media *Eagles* dan FBS 10% ditanam dalam botol kultur Roux kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.





**Gambar 4.2** Kultur sel fibroblas BHK-21 dalam botol Roux

2. Sel yang telah penuh, dipanen, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali yang bertujuan untuk membuang sisa serum yang tersisa. Setelah itu ditambahkan *trypsine versene* untuk melepaskan sel dari dinding botol dan memisahkan ikatan antar sel agar tidak menggerombol. Kultur sel dalam botol roux diganti dengan media *Eagles* yang baru.



**Gambar 4.3** Kultur sel fibroblas BHK-21 dicuci dengan PBS

3. Kultur sel yang sudah diganti dengan media baru dibagi dalam *microplate* sebanyak 100  $\mu$ l.

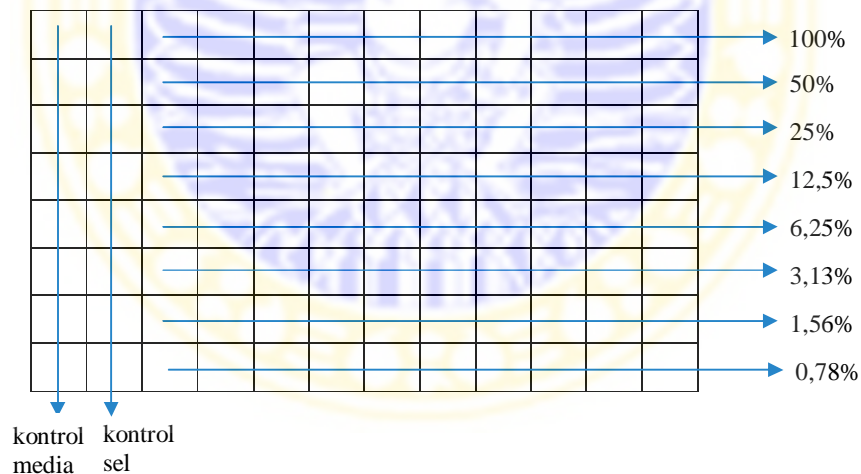


**Gambar 4.4** Pengisian sel *BHK-21* dengan media *Eagles* ke dalam *microplate*

4. *Plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

#### 4.8.4 Pengenceran Seri Ekstrak Lendir Bekicot

1. Mengamati *microplate* yang berisi sel fibroblas yang diinkubasi di bawah mikroskop cahaya untuk melihat banyak tidaknya sel fibroblas dalam setiap *well* untuk dilakukan penelitian.
2. Menyiapkan 10 tabung reaksi, dengan 9 tabung berisi aquades sebanyak 5 ml, dan 1 tabung tanpa aquades yaitu tabung pengenceran seri yang pertama pada konsentrasi 100% berisi ekstrak lendir bekicot 10 ml.
3. Membuat pengenceran seri menggunakan ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*) dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.13%; 1.56%; 0.78%. Kemudian diteteskan ke dalam *well microplate* sebanyak 10  $\mu$ l. Diberikan perlakuan kontrol yaitu media *Eagles* dan fibroblas tanpa ekstrak lendir bekicot.



**Gambar 4.5** Pembagian ekstrak lendir bekicot (*Achatina fulica*) dalam *microplate*

4. *Microplate* diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### 4.8.5 Uji MTT

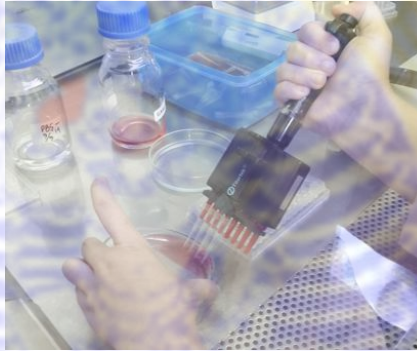
1. *Microplate* dikeluarkan dari alat inkubasi, media *Eagles* dan ekstrak lendir bekicot di dalam *well* diambil menggunakan *syringe*, sel *BHK-21* akan



tertinggal di dalam *well*. Setiap *well* dicuci dengan PBS dan diisi kembali dengan media *Eagles* sebanyak 100  $\mu$ l.



**Gambar 4.6** Microplate sel fibroblas BHK-21 dicuci dengan PBS



**Gambar 4.7** Microplate diisi kembali dengan media *Eagles*

2. Garam *Tetrazolium* (MTT) dilarutkan dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 5 mg/ml. MTT sebanyak 10  $\mu$ l ditambahkan secara langsung pada *microplate* yang berisi media *Eagles*, kemudian diinkubasi kurang lebih 4 jam pada suhu 37°C.



**Gambar 4.8** MTT diteteskan sebanyak 10  $\mu$ l ke setiap *well*

3. Seluruh media dan bahan uji dibuang kemudian setiap *well* ditambahkan *Dymethyl sulfoxide* (DMSO) 50  $\mu$ l.



**Gambar 4.9** DMSO ditambahkan ke setiap *well*

4. Plate diaduk secara mekanis dengan *plate shaker* sampai kristal formazen terlarut selama 5 menit. Sel fibroblas akan terwarnai dengan formazen menjadi ungu.
5. Formazen dibaca absorbansinya dengan alat ELISA *reader*.



**Gambar 4.10** Membaca hasil menggunakan ELISA *reader*

#### 4.8.6 Perhitungan

Persentase kehidupan sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut

(Reddy, 2011) :

$$\% \text{ kehidupan sel} = \frac{\text{mean grup tes}}{\text{mean kontrol sel}} \times 100\%$$

Keterangan:

- % kehidupan sel = persentase jumlah kehidupan sel setelah uji
- Mean grup tes = nilai rata-rata OD (*Optical Density*) formazen setiap sampel setelah tes
- Mean kontrol sel = nilai rata-rata OD (*Optical Density*) formazen pada rata-rata kontrol sel

#### 4.8.7 Analisa Data

Data yang diperoleh ditabulasi kemudian dilakukan analisis menggunakan uji normalitas *Kormogrov-Smirnov* untuk mengetahui distribusi dan dilanjutkan dengan uji *One-way ANOVA* dan *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui signifikansi dari perlakuan.

#### 4.9 Alur Penelitian

