

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian tentang pengaruh Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol) terhadap persentase kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas sel yang dipapar etanol pada kultur sel primer ginjal hamster ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah : variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali.

1. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian  $\alpha$ -tokoferol sebagai pencegah terjadinya radikal bebas etanol dengan berbagai konsentrasi yaitu 0  $\mu$ M (kontrol), 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 125  $\mu$ M.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase kerusakan sel, viabilitas dan abnormalitas kultur sel ginjal yang telah diberi perlakuan.
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kultur sel ginjal hamster dan konsentrasi pemberian etanol pada kultur sel sebanyak 10 mmol/L.

### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-November 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Alat-alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah : laminar air flow (LAF), incubator CO<sub>2</sub> 5 %, *mikroskop inverted*, oven, *hemocitometer*, autoklaf, timbangan analitik, *Tissue Culture disk* 30 mm-SPL, 12 well cell culture cluster USA (Costar 3524), sentrifus, *hot plate stirrer*.

Peralatan gelas yang meliputi : botol tutup ulir (scot), erlenmeyer, pipet pasteur, beaker glass, petri disk, rak tabung, corong, gelas ukur 25 ml, tabung tube 1 ml. Peralatan section meliputi : scalpel, gunting, spuit, blue tip, yellow tip, mikropipet 2-20 $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l dan 100-1000  $\mu$ l (SOCOREX), aluminium foil, *filter single use* 0,20  $\mu$ m (Sartorius mini start), saringan sel, bunsen, korek api, masker, *hand glove*, penutup kepala, karet, kertas label, tissue serta alat-alat lainnya.

#### 3.4.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah : ginjal hamster, media DMEM (GIBCO 21600-051), Vitamin E (Nacalai 150233) yang dilarutkan dalam 0,2% DMSO, etil alkohol p.a, serum FBS (Sigma 12003), PBS

(Phosphate Buffer Saline GIBCO), tripsin 2,5% (GIBCO, 15050-065), Tripsin EDTA 0,25% (Sigma), kloroform, alkohol 70%, fungizon/ amphotericin B (Gibco, 15290-08), penicillin (Meiji Indonesia), streptomycin (Meiji Indonesia), hepes,  $\text{NaHCO}_3$ , dan DI steril. Dengan catatan semua pengerjaan sel harus steril, dan seluruh pengerjaan di dalam *Laminar Air Flow*.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Preparasi**

Pada tahap ini yang perlu dilakukan adalah preparasi dan sterilisasi alat-alat, preparasi bahan dan pembuatan media kultur, pembuatan larutan Vitamin E, serta pengelompokan perlakuan. Berikut prosedur dalam tahap preparasi :

##### **3.5.1.1 Tahap Sterilisasi Alat**

Langkah- langkah sterilisasi alat adalah sebagai berikut : Alat-alat dissecting set (scalpel, pinset gunting dll), alat-alat gelas, non gelas dan logam direndam dengan tipol, selama 1 x 24 jam. Kemudian digosok dan dibilas sebanyak 21 kali dalam air mengalir. Bilasan terakhir dengan aquadest. Dikeringkan dalam oven dengan suhu  $50^\circ\text{C}$ . Selanjutnya semua peralatan dibungkus dengan *alluminium foil*. Peralatan gelas dan logam disterilisasi dalam oven dengan suhu  $125^\circ\text{C}$  selama 3 jam. Peralatan yang sifatnya plastik disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1.5 atm selama 15 menit.

##### **3.5.1.2 Pembuatan Media Kultur dan Media Pencuci**

Media yang digunakan sebagai kultur sel primer ginjal fetus hamster adalah campuran media stock DMEM *complete* dengan 20 % suplementasi FBS

(*Fetal Bovine Serum*). Pembuatan 100 ml stok media DMEM *complete*, komposisinya adalah : medium DMEM powder 1,35 gr, NaHCO<sub>3</sub> 0,37 gr, hepes 0,238 gr, penicillin 0,06 gr, streptomycin 0,01 gr, fungizon/ amphotericin B 100 µl dan DI steril 100 ml. Semua bahan-bahan dilarutkan sampai homogen, kemudian disaring dengan filter *single use* (membran miliporus 0,20 µm) pengerjaan ini dilakukan dengan steril di dalam *laminar air flow* (LAF).

Sedangkan untuk media pencuci menggunakan PBS dengan antibiotik (penstrep dan fungizon) dan medium DMEM tanpa serum. Pembuatan PBS 100 ml adalah dengan menimbang 0,96 gr PBS powder dan diencerkan dalam 100 ml DI (*Dionisasi Water*).

#### **3.5.1.3 Pembuatan Larutan Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) Stok 155µM**

Vitamin E yang digunakan adalah  $\alpha$ -Tokoferol (Nacalai-150233). Konsentrasi Stock Vitamin E yang dibuat adalah 155 µM. Vitamin E bersifat hidrofobik, sehingga dilarutkan dalam DMSO 0,2% . DMSO merupakan pelarut yang tidak karsinogenik dan teratogen pada tikus atau kelinci, karena potensial toksisitasnya rendah. DMSO bereaksi cepat dengan sejumlah zat terutama dengan air, selain itu DMSO merupakan pemelihara sel pada temperatur rendah (Sugiyama, 1989).

#### **3.5.1.4 Pembagian Kelompok Sampel**

Setelah dilakukan isolasi Kultur Primer Sel Ginjal Hamster, selanjutnya sampel kultur primer sel ginjal hamster dikelompokkan menjadi 7 kelompok perlakuan sesuai variasi konsentrasi Vitamin E, kemudian pada hari ketiga semua

perlakuan dipapar etanol kecuali kelompok K(+). Berikut pembagian kelompok sampel :

- a. Kelompok K (-), kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh (DMEM yang mengandung 20% FBS dan antibiotik).
- b. Kelompok K (+), kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh kemudian dipapar etanol 10 mmol/L 24 jam.
- c. Kelompok P1, kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh ditambah Vitamin E 25 $\mu$ M dan dipapar etanol 10 mmol/L 24 jam.
- d. Kelompok P2, kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh ditambah Vitamin E 50 $\mu$ M dan dipapar etanol 10 mmol/L selama 24 jam.
- e. Kelompok P3, kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh ditambah Vitamin E 75 $\mu$ M dan dipapar etanol 10 mmol/L selama 24 jam.
- f. Kelompok P4, kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh ditambah Vitamin E 100  $\mu$ M dan dipapar etanol 10 mmol/L 24 jam.
- g. Kelompok P5, kultur sel primer ginjal hamster dalam media penumbuh ditambah Vitamin E 125 $\mu$ M dan dipapar etanol 10 mmol/L 24 jam.

### **3.5.2 Kegiatan Penelitian**

#### **3.5.2.1 Isolasi dan Kultur Sel Primer Ginjal Hamster**

Hamster didislokasi kemudian diletakkan di atas alumunium steril, dibedah dan diambil ginjalnya. Kemudian dicuci dengan PBS *complete* 3 kali. Ginjal dicacah dengan tripsin sampai halus. Suspensi ginjal kemudian diinkubasi 15 menit, dan disaring dengan *Nylon Mesh* 180. Kemudian diletakkan dalam

tabung sentrifus 10ml dan ditambah DMEM non serum dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang, pelet ditambah media penumbuh (DMEM yang mengandung 20% FBS dan antibiotik) dan disentrifus 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang, kemudian disisakan 3 ml pelet sel.

Hasil pelet dihomogenkan dengan mikropipet kemudian diambil 100  $\mu$ l pelet kemudian dihitung jumlah sel dengan Hemositometer. Setelah mengetahui jumlah sel kemudian sel ditanam sebanyak  $1,92 \times 10^4$  dalam *12 well cell culture cluster USA (Costar 3524)* yang sudah berisi media sesuai perlakuan. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , selama 3 sampai 4 hari, sambil diobservasi, bila sudah konfluen maka sel dapat diberi perlakuan.

### **3.5.2.2 Perlakuan Pemberian Vitamin E dan Induksi Etanol pada Kultur Primer Sel Ginjal Fetus Hamster**

Metode yang digunakan pada perlakuan ini adalah menurut Stanzyk, *et. al.*, (2005). Perlakuan pemberian Vitamin E diberikan ketika awal sel ditanam pada media. Vitamin E secara langsung dicampurkan pada media yang akan digunakan sebagai penumbuh sel. Variasi konsentrasi vitamin E yang dicampurkan adalah: perlakuan P1 (Vitamin E konsentrasi  $25\mu\text{M}$ ), perlakuan P2 (Vitamin E konsentrasi  $50\mu\text{M}$ ), perlakuan P3 (Vitamin E konsentrasi  $75\mu\text{M}$ ), perlakuan P4 (Vitamin E konsentrasi  $100\mu\text{M}$ ), perlakuan P5 (Vitamin E konsentrasi  $125\mu\text{M}$ ).

Kemudian sel ditanam pada masing-masing media perlakuan dan diinkubasi sampai 3 hari pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , dihitung persentase konfluen

selnya. Media tanam sel yang lama dibuang, sel dicuci dengan PBS dua kali, kemudian diganti dengan Media penumbuh (DMEM yang sudah berisi 20% FBS dan Etanol 10mmol/L), sel diinkubasi selama 24 jam untuk mengetahui pengaruh etanol dan diamati konfluen selnya.

### 3.5.2.3 Tahap Pengamatan

#### A. Persentase Kerusakan Sel

Moody (2004) mengatakan bahwa kerusakan sel dapat dilihat dari perubahan dan gangguan yang dapat mengutangi viabilitas sel dan faktor esensial sel. Pengamatan persentase kerusakan sel dilakukan untuk melihat pengaruh Vitamin E terhadap pertumbuhan kultur sel ginjal yang telah dipapar etanol. Kerusakan sel dapat dilihat jika sel terlepas dari *attachemen site* dan tidak berlekatan antara sel satu dengan yang lain. Pengamatan ini menggunakan *mikroskop inverted* dengan perbesaran 100x sampai 400x. Persentase kerusakan sel pada penelitian ini dihitung berdasarkan selisih konfluen sel sebelum dipapar etanol dan setelah dipapar etanol selama 24 jam.

Ketentuan Persentase konfluenitas sel dilihat berdasarkan banyaknya sel yang tumbuh dan melekat satu dengan yang lain pada *well/Tc disk*, karena bentuk *well/Tc disk* nya bulat, maka dibagi menjadi 4 kuadran agar perhitungan lebih mudah, ketentuannya adalah sebagai berikut (Freshney, 2000):

- a. Konfluen 100%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi keseluruhan *attachtemen site*.

- b. Konfluen 75%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{3}{4}$  *attachemen site*.
- c. Konfluen 50%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{1}{2}$  *attachemen site*.
- d. Konfluen 25%, jika sel menempel dan berkembang memenuhi  $\frac{1}{4}$  *attachemen site*.

### **B. Pengamatan Viabilitas Sel**

Perhitungan viabilitas sel dilakukan untuk mengetahui persentase perbandingan antara sel yang hidup dan mati. Pengamatan viabilitas sel menggunakan Tripan biru 0.4% dilakukan menurut prosedur *Laboratorium for Human Cell Culture* (2004). Tripan biru tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. Tripan biru juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop (Bolt, 2001).

Langkah-langkah dalam menentukan viabilitas sel adalah sebagai berikut : Suspensi sel sebanyak 25  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tabung ependorf 1,5 ml, ditambah 62,5  $\mu$ l tripan biru 0,5%, dan 37,5  $\mu$ l PBS. Jadi total larutan 125 $\mu$ l, sehingga pengenceran suspensi sel 1:5. Di homogenkan sampai 5 menit, kemudian ditetaskan suspensi sel pada kedua bilik yang telah ditutup dengan deck glass, dan diletakkan di bawah mikroskop dengan objektif 10x. Kemudian sel dihitung dalam kotak tengah dan empat kotak dibagian sudut. Sel dihitung secara



terpisah antara sel yang viabel (bening) dengan non-viabel (terwarnai biru).

Kemudian dihitung jumlah sel per ml dan jumlah total sel dengan rumus berikut :

$$\text{Sel / ml} = \text{jumlah sel dihitung} / \text{jumlah kotak dihitung} \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\text{Jumlah sel} = \text{sel / ml} \times \text{vol. suspensi asli}$$

$$\% \text{ Viabilitas} = (\text{jumlah sel yang hidup} / \text{total sel}) \times 100$$

### C. Pengamatan Abnormalitas Sel

Sel hasil kultur ketika pengamatan dibedakan menjadi sel mati dan sel hidup. Sel yang hidup dibedakan lagi antara sel sehat (normal) dengan sel yang tidak sehat (abnormal). Sel dikatakan abnormal jika sel tersebut berukuran melebihi ukuran sel normal dan mengalami perubahan bentuk dari asalnya, terkontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas sel yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa (sel giant) yaitu sel yang volume selnya, DNA, RNA, serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat dari sel normal (Freshney, 2000).

Sel abnormal dihitung dalam kotak tengah bilik hitung dan empat kotak ditepi sudut. Sel dihitung secara terpisah antara sel yang hidup normal dan hidup abnormal. kemudian persentase sel abnormal dapat dihitung :

$$\% \text{ Sel Abnormal} = (\text{jumlah sel yang hidup abnormal} / \text{total sel hidup}) \times 100$$

### 3.5.3 Analisis Data

Parameter yang diamati untuk menentukan Pengaruh Vitamin E ( $\alpha$ -Tocoferol) terhadap etanol pada kultur sel primer ginjal hamster adalah persentase kerusakan sel, viabilitas dan abnormalitas sel hasil perlakuan. Data hasil pengamatan viabilitas, abnormalitas dan persentase kerusakan sel kemudian di uji statistik dengan uji *ANOVA One Way (Analysis Of Variance)*. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan parameter  $\alpha=1\%$ .

