

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α -tocoferol*) terhadap proliferasi sel paru-paru fetus hamster kultur primer ini, merupakan penelitian yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian vitamin E dengan berbagai konsentrasi yang berbeda yaitu 0 μ M (kontrol), 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, dan 125 μ M. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah konfluen, viabilitas dan abnormalitas sel. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah eksplan sel yang digunakan berasal dari organ paru-paru fetus hamster berumur 2 hari yang dikembangbiakkan dalam media DMEM + 20% FBS.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α -tocoferol*) dalam media DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) terhadap proliferasi sel paru-paru fetus hamster kultur primer dilakukan pada bulan Juni sampai

November 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan 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 digunakan dalam penelitian ini adalah oven, autoklaf, timbangan analitik, *Laminar Air Flow* (LAF), mikroskop *inverted*, *refrigerator*, inkubator CO₂ 5%, *hot plate*, sentrifus, tabung sentrifus, *sput*, gunting, pinset, mikropipet 20 – 200 µl dan 100 – 1000 µl (SOCOREX), *blue tip*, *yellow tip*, cawan petri, *Well Cell Culture Cluster* sumuran 12 (USA, Costor 3524), erlenmeyer, botol tutup ulir (*scot*), corong, gelas ukur 25 ml, tabung *tube* 1 ml, *scalpel*, gunting, pipet pasteur, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass, saringan sel, *filter single use* 0,20 µm (Sartorius mini start), kertas label, tisu, aluminium foil, parafilm, hemositometer, *hand counter*, bunsen, korek api, masker, *hand glove*, penutup kepala, karet.

3.4.2 Bahan-Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sel paru-paru fetus hamster yang berumur 2 hari, DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) (GIBCO 12800-017), Vitamin E yang digunakan adalah jenis α -*tocoferol* (Nacalai 150233) dilarutkan dalam 0,2% DMSO (*Sulfoxide Dimetil*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*) (GIBCO 21600-051), tripsin (GIBCO 15090), FBS (*Foetal Bovine Serum*) (Sigma 12003), tripsin EDTA 2,5% (GIBCO, 15050-065), fungizon (Gibco, 15290-08),

penicillin (Meiji Indonesia), streptomycin (Meiji Indonesia), hepes, alkohol 70%, NaHCO_3 , DI (*Deionized Irrigation*), aquades, tipol.

3.5 Persiapan Alat (Sterilisasi)

Penelitian pengaruh pemberian vitamin E dalam media DMEM terhadap proliferasi sel paru-paru fetus hamster kultur primer ini dimulai dengan mensterilkan alat-alat dan tempat yang akan digunakan untuk penelitian. Alat-alat dipisahkan antara *dissecting set*, alat-alat gelas, non gelas dan logam. Direndam dalam tipol selama 1 X 24 jam, kemudian dibersihkan dan dibilas sebanyak 21x pada air yang mengalir, dan pada bilasan terakhir dibilas dengan aquades. Dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C , kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Alat-alat yang berbahan kaca dan logam disterilisasi dalam oven dengan suhu 125°C selama 3 jam, sedangkan alat-alat yang berbahan plastik disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Semua alat yang dibutuhkan dimasukkan kedalam LAF kemudian di UV selama 2 jam apabila akan digunakan.

3.6 Persiapan Bahan

3.6.1 Pembuatan Media Kultur

Bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang dengan timbangan analitik sesuai ukuran yang digunakan, untuk pembuatan media digunakan 100 ml stok media DMEM komplet yang komposisinya adalah: medium DMEM powder 1,35 gram, NaHCO_3 0,37 gram, hepes 0,238 gram, penicillin 0,06 gram, streptomycin 0,01 gram, dan DI steril 100 ml. Semua bahan dihomogenasi, kemudian disaring

dengan *filter single use* dan disimpan dalam *refrigerator*. Media untuk kultur sel paru-paru fetus hamster yang digunakan adalah media stok DMEM dengan penambahan FBS sebanyak 20% dan fungizon 3 tetes.

3.6.2 Pembuatan Media Washing

Media *washing* ada dua macam yaitu DMEM non serum dan PBS. Pada media *washing* tersebut telah ditambah fungizon, penicillin dan streptomycin. Media *washing* digunakan untuk mencuci organ paru-paru terutama dari darah yang menempel pada organ, untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

3.6.3 Pembuatan Larutan Vitamin E (α -Tocopherol)

Vitamin E bersifat hidrofobik, sehingga perlu dilarutkan dalam pelarut organik yaitu DMSO (*Sulfoxide Dimetil*) 0,2%. DMSO (*Sulfoxide Dimetil*) 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 (Elzay, 1967).

3.6.4 Pembagian Kelompok Sampel

Sampel sel paru-paru fetus hamster dikelompokkan menjadi 6 kelompok.

- a. Kelompok P0, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 0 μ M

- b. Kelompok P1, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 25 μ M
- c. Kelompok P2, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 50 μ M
- d. Kelompok P3, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 75 μ M
- e. Kelompok P3, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 100 μ M
- f. Kelompok P3, sel paru-paru fetus hamster + DMEM + 20% FBS + Vitamin E 125 μ M

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Isolasi Sel Paru-Paru Fetus Hamster

Hamster yang digunakan adalah hamster yang masih *baby* atau sekitar umur 2 hari, hamster diletakkan diatas alumunium foil steril, kemudian didislokasi, setelah itu dibedah dan diambil organ paru-paru, kemudian *washing* dengan PBS 2 ml yang ditambah 3 tetes fungizon dan 1 tetes penicilin-streptomycin, *washing* di ulang sebanyak 3x.

Organ paru-paru dilisiskan dalam 500 μ l tripsin setelah halus dihomogenasi dengan spuit kemudian diinkubasi selama 20 menit dan disaring dengan *nylon mesh* 180. Kemudian ditambah DMEM + 5% FBS dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan dibuang, pelet ditambah DMEM + 5% FBS dan disentrifus 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm.

Supernatan dibuang, pelet ditambah medium + 10% serum FBS, dan disentrifus 1500 rpm selama 10 menit kemudian disisakan 1 ml pelet sel.

Hasil pelet dihomogenasi dengan mikropipet kemudian diambil 100 μ l pelet kemudian dihitung jumlah sel dengan hemositometer. Setelah mengetahui jumlah sel kemudian sel ditanam dalam *well* yang sudah berisi DMEM + 20% FBS serta diberi perlakuan vitamin E. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, selama 96 jam, kemudian diamati konfluen, viabilitas, dan abnormalitas sel kultur primer paru-paru fetus hamster.

3.7.2 Perlakuan Pemberian Vitamin E (α -Tocoferol)

Kultur primer paru-paru fetus hamster dengan DMEM dan 20% FBS ditambah vitamin E dengan berbagai konsentrasi (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M), kemudian diinkubasi sampai konfluen dengan suhu 37°C dan 5% CO₂ untuk melihat pengaruh Vitamin E terhadap sel (Stanzyk, *et al.* 2005).

3.7.3 Pengamatan Konfluen Sel Paru-Paru Fetus Hamster

Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut telah berkembang dan memenuhi *well*, untuk mengamati konfluennya sel paru-paru fetus hamster ini digunakan *microscop invert*, Kriteria dari pengukuran konfluen sel mencakup persentase sel dalam mencapai konfluen. Sel diamati pada hari ke-4 kemudian dicatat hasilnya dengan kriteria, persentase 0% apabila sel belum melekat dalam *well*, 25% ketika sel sudah memenuhi satu perempat *well*, 50% apabila sel sudah memenuhi

setengah dari *well*, 75 % apabila sel telah memenuhi tiga perempat *well* dan 100% apabila sel telah memenuhi seluruh *well*.

3.7.4 Pengamatan Viabilitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster

Pengukuran viabilitas sel paru-paru fetus hamster ini berguna untuk melihat tingkat perkembangan sel. Sel hasil kultur disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 1500 rpm, dibuang supernatan dan pelet dicuci dengan PBS 2 ml kemudian pipeting, diulang sebanyak 2x. Di sisakan pelet sebanyak 500 μ l kemudian ditambah tripsin 500 μ l (1:1). Di masukkan *well* kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 15 menit, setelah itu ditambah PBS 1 ml untuk menghilangkan sisa tripsin. Disentrifus 1500 rpm selama 5 menit. Di buang 2 ml supernatan kemudian ditambah PBS sampai volume tabung mencapai 2 ml disentrifus kembali 1500 rpm selama 10 menit.

Sisakan 1 ml pelet pipeting kemudian diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan pewarna *tripan blue* 0,5% karena *tripan blue* tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. *Tripin blue* juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop. Kemudian dihitung jumlah sel per ml dan jumlah total sel dengan rumus (Freshney, 2000):

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

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

3.7.5 Pengamatan Abnormalitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster

Sel hasil kultur ketika pengamatan dibedakan menjadi sel mati dan sel hidup. Sel yang hidup dibedakan lagi antara sel yang 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 yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa (*cell giant*) yaitu sel yang volume sel, DNA, RNA, serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat dari sel normal (Freshney, 2000).

Kriteria dari pengukuran abnormalitas sel ini mencakup persentase sel. Sel abnormal dihitung dalam kotak tengah bilik hitung dan empat kotak di tepi sudut. Sel dihitung secara terpisah antara sel yang hidup normal dan hidup abnormal. Perhitungan abnormalitas sel dilakukan dengan menggunakan rumus (Freshney, 2000):

$$\% \text{ Abnormalitas sel} = (\square \text{ sel yang hidup abnormal} / \square \text{ sel yang hidup}) \times 100\%$$

3.8 Analisis Data

Parameter yang diamati untuk menentukan melihat pengaruh pemberian vitamin E dalam media DMEM terhadap proliferasi sel paru-paru fetus hamster adalah konfluen, viabilitas dan abnormalitas sel. Data hasil pengamatan konfluen, viabilitas dan abnormalitas sel, kemudian diuji statistik dengan uji ANAVA tunggal. Jika hasil uji ANAVA tunggal menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut.

Uji lanjut dilakukan setelah menentukan nilai KK (Koefisien Keragaman). KK merupakan suatu koefisien yang menunjukkan derajat ketelitian yang diperoleh dari suatu percobaan. Nilai KK yang semakin kecil menunjukkan derajat ketelitian yang semakin tinggi dan validitas kesimpulan yang diperoleh dari percobaan tersebut juga tinggi (Hanafiah, 2010).

Berdasarkan nilai KK, kriteria yang digunakan untuk menentukan uji lanjut adalah apabila nilai KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah UJD (Uji Jarak Duncan). Jika KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Jika KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen) maka menggunakan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) (Hanafiah, 2010). Uji lanjut yang digunakan pada pengamatan konfluen sel paru-paru fetus hamster adalah BNJ (Beda Nyata Jujur), untuk pengamatan viabilitas digunakan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil), dan untuk pengamatan abnormalitas digunakan menggunakan UJD (Uji Jarak Duncan). Hasil pengamatan dicatat dalam tabel, untuk menentukan persentase konfluen, viabilitas, dan abnormalitas sel paru-paru fetus hamster.

Tabel 3.1 Pengaruh Pemberian Vitamin E (α -Tocoferol) dalam Media DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) terhadap Konfluen Sel Paru-Paru Fetus Hamster Kultur Primer

Perlakuan	Persentase Konfluen Pada Ulangan Ke-				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
P0 (kontrol)						
P1 (25 μ M)						
P2 (50 μ M)						
P3 (75 μ M)						
P4 (100 μ M)						
P5 (125 μ M)						

Tabel 3.2 Pengaruh Pemberian Vitamin E (α -Tocoferol) dalam Media DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) TERHADAP Viabilitas Sel Paru-Paru Fetus Hamster Kultur Primer dengan Menggunakan Pewarnaan *Tripan Blue* 0,4%

Perlakuan	Persentase Viabilitas Pada Ulangan Ke-				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
P0 (kontrol)						
P1 (25 μ M)						
P2 (50 μ M)						
P3 (75 μ M)						
P4 (100 μ M)						
P5 (125 μ M)						

Tabel 3.3 Pengaruh Pemberian Vitamin E (α -Tocoferol) dalam Media DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) terhadap Abnormalitas (%) Sel Paru-Paru Fetus Hamster Kultur Primer

Perlakuan	Persentase Abnormalitas Pada Ulangan Ke-				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
P0 (kontrol)						
P1 (25 μ M)						
P2 (50 μ M)						
P3 (75 μ M)						
P4 (100 μ M)						
P5 (125 μ M)						