

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian Pengaruh Vitamin E (*α-tocoferol*) Terhadap Kerusakan, Viabilitas, dan Abnormalitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster Yang Dipapar Etanol ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi : 1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel kendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Vitamin E dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, dan 125 μM. Variabel terikat yang digunakan adalah kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas kultur primer sel paru-paru fetus hamster. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah sel paru-paru fetus hamster yang berumur 2 hari yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam dan jenis kelamin fetus hamster.

#### **3.3 Waktu dan Tempat**

Penelitian tentang Pengaruh Vitamin E (*α-tocoferol*) Terhadap Kerusakan, Viabilitas, dan Abnormalitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster Yang Dipapar Etanol dilakukan pada bulan Juni-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**

#### **3.4.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, autoklaf, *Laminar Air Flow (LAF)*, *refrigator*, *incubator CO<sub>2</sub> 5%*, timbangan analitik, sentrifus, tabung sentrifus 10 ml, botol tutup ulir (*scot*), *sputit*, pipet pasteur, mikropipet 20-200  $\mu$ l dan 100-1000  $\mu$ l (SOCOREX), *blue tips* dan *yellow tips*, cawan petri, *well 12* (Costar), mortal dan alu, tabung tube 1 ml, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass, pH meter, *filter single use 0,2  $\mu$ m* (Sartorius mini start), *scalpel*, parafilm, masker, *hand glove*, penutup kepala, kertas label, tissue, aluminium foil, mikroskop *inverted*, *hemocytometer*, *hand counter*, bunsen, korek dan karet.

#### **3.4.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah fetus hamster umur 2 hari, media *Dulbeccos Modified Eagles Medium With High Glucose* (DMEM, Gibco, Burlington, ON 12800-017), *Phosphat Buffer Saline* (PBS, Gibco 21600-051), tripsin EDTA 0.25% (Gibco, 15050-065), *Foetal Bovine Serum* (FBS, Sigma 12003c), *penicillin* (Meiji Indonesia), *streptomycin* (Meiji Indonesia), fungizon (Gibco, 15290-08), 0,2% DMSO, vitamin E ( *$\alpha$ -tocoferol*) Nacalai (150233), etanol absolut, DI steril, NaHCO<sub>3</sub>, HCl 0.1 N, *tripan blue*, hepes, alkohol 70%, tipol.

### **3.5 Prosedur Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Alat**

Sterilisasi merupakan proses yang dilakukan agar alat-alat yang akan digunakan sebelum kultur terhindar dari kontaminasi. Sebelum penelitian dimulai dengan sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dengan cara direndam alat-alat dengan tipol selama 1 x 24 jam, kemudian digosok dan dibilas sebanyak 21 kali pada air yang mengalir, pada bilasan terakhir dibilas dengan Aquades. Dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C, kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disterilisasi.

Sterilisasi terdiri dari sterilisasi kering dan basah. Sterilisasi kering dilakukan pada alat-alat yang berbahan kaca dan dioven dengan suhu 125°C selama 3 jam. Sterilisasi basah dilakukan untuk alat berbahan plastik dan diautoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit dan dikeringkan dioven dengan suhu 50°C. Dimasukkan ke dalam LAF kemudian di UV selama 2 jam sebelum digunakan.

#### **3.5.2 Preparasi Bahan**

##### **3.5.2.1 Media DMEM**

Pembuatan stok media DMEM untuk 100 ml yaitu ditimbang DMEM 1,35 g, NaHCO<sub>3</sub> 0,37 g, hepes 0,238 g, *penicilin* 0,06 g, *streptomycin* 0,01 g, fungizon 100 µl, dan dilarutkan dalam DI steril 100 ml. Semua bahan-bahan dihomogenkan dan disaring dengan filter *single use* 0,2 µm di dalam *Laminar Air Flow (LAF)*.

### 3.5.2.2 Antibiotik

Pengenceran fungizon yaitu diambil 5 ml dilarutkan pada 10 ml DI steril. Hepes ditimbang 0,24 g dan diencerkan dengan 100 ml DI steril. Pembuatan stok *penicilin* dan *streptomycin* yaitu ditimbang *penicilin* dan *streptomycin* masing-masing 1 g dan diencerkan pada 2 ml DI. Untuk pemakaiannya yaitu 100 µl diencerkan pada 100 µl medium. Konsentrasi akhir *penicilin* 100 µg/ml dan *streptomycin* 100 µg/ml.

### 3.5.2.3 Media Kultur dan Media Washing

Media kultur yang digunakan untuk kultur sel primer paru-paru fetus hamster adalah media DMEM dengan 20% FBS dan fungizon. Media washing yang digunakan adalah PBS, *penicilin streptomycin* dan fungizon, media DMEM non serum dan fungizon serta media DMEM dengan 20% FBS dan fungizon.

### 3.5.2.4 Pembuatan Larutan Vitamin E (*α-tocoferol*)

Vitamin E (*α-tocoferol*) Nacalai (150233) bersifat hidrofobik, sehingga dilarutkan dalam DMSO 0,2%. DMSO merupakan pelarut yang memiliki toksisitasnya rendah dan mampu memelihara sel pada temperatur rendah (Elzay, 1967).

## 3.6 Isolasi Sel Paru-paru Fetus Hamster

Fetus hamster yang digunakan adalah hamster yang berumur 2 hari, fetus hamster di dislokasi, dibedah dan diambil organ paru-paru, kemudian dicuci

dengan 2 ml PBS, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin sebanyak 3 kali. Organ dipindah pada mortal yang telah berisi 1 ml tripsin kemudian dihancurkan, selanjutnya dicacah dengan gunting sampai halus, dihomogenasi dengan spuit kemudian diinkubasi selama 25 menit.

Hasil cacahan organ yang diinkubasi diambil dan disaring dengan kain nilon dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, selanjutnya disentrifus 3000 rpm selama 10 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet ditambah dengan 3 ml DMEM non serum, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambah dengan 3 ml DMEM non serum, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penicilin streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan dengan 3 ml DMEM 20% FBS dan 3 tetes fungizon kemudian disentrifus kembali. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 2 ml kemudian dipipeting. Hasil pelet diambil 100  $\mu$ l kemudian di masukkan ke dalam well yang telah berisi masing-masing perlakuan. Diinkubasi dan diamati setiap 3 hari sekali.

### **3.7 Pembagian Kelompok Sampel**

- a. Kelompok K (-) : sel paru-paru fetus hamster kontrol negatif (tanpa perlakuan vitamin E dan pemaparan etanol)
- b. Kelompok K (+) : sel paru-paru fetus hamster kontrol positif (tanpa perlakuan vitamin E tetapi dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)

- c. Kelompok P<sub>1</sub> : sel paru-paru fetus hamster yang diberi vitamin E konsentrasi 25 µM yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- d. Kelompok P<sub>2</sub> : sel paru-paru fetus hamster yang diberi vitamin E konsentrasi 50 µM yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- e. Kelompok P<sub>3</sub> : sel paru-paru fetus hamster yang diberi vitamin E konsentrasi 75 µM yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- f. Kelompok P<sub>4</sub> : sel paru-paru fetus hamster yang diberi vitamin E konsentrasi 100 µM yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- g. Kelompok P<sub>5</sub> : sel paru-paru fetus hamster yang diberi vitamin E konsentrasi 125 µM yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.

### **3.8 Perlakuan**

#### **3.8.1 Perlakuan Pemaparan Etanol**

Sel paru-paru fetus hamster dikultur dengan media DMEM 20% FBS dan diberi perlakuan vitamin E dengan konsentrasi yang berbeda kemudian diinkubasi. Kultur primer sel paru-paru fetus hamster yang sudah konfluen selanjutnya dipapar etanol selama 24 jam dengan cara media dibuang, kemudian diwashing dengan 1 ml PBS dan 10 µl fungizon sebanyak 2 kali, kemudian medianya diganti dengan DMEM 20% FBS dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> (Stanczyk, 2005).

### **3.9 Pengamatan**

#### **3.9.1 Pengamatan Kerusakan Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster**

Kerusakan sel merupakan perubahan atau gangguan yang dapat mengurangi viabilitas sel. Pengamatan kerusakan sel dilakukan untuk melihat pengaruh vitamin E terhadap pertumbuhan kultur sel paru-paru fetus hamster setelah dipapar etanol (peran vitamin E terhadap toksisitas etanol).

Kriteria untuk pengamatan kerusakan sel adalah 100% apabila sel tidak tumbuh pada wadah kultur, 75% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi satu per empat wadah kultur, 50% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi setengah wadah kultur, dan 25% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi tiga per empat wadah kultur (Freshney, 2002).

#### **3.9.2 Perhitungan Viabilitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster**

Pengukuran viabilitas sel paru-paru fetus hamster ini adalah untuk melihat tingkat perkembangan sel. Perhitungan viabilitas dilakukan menurut metode *Laboratorium for Human Cell Culture* (2004) dengan cara dibuang media, kemudian diwashing dengan 1 ml PBS dan 10 µl fungizon sebanyak 2 kali, kemudian diberi tripsin EDTA 0,25% sebanyak 1 ml. Kemudian dikocok pelan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 25 menit.

Hasil tripsinasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan ditambahkan 1 ml PBS dan 10 µl fungizon kemudian disentrifus 13000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan kemudian pelet ditambahkan 1 ml PBS dan 10 µl fungizon kemudian disentrifus kembali 13000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan kemudian pelet dipipeting dan diambil 100 µl kemudian

ditambah dengan 100  $\mu$ l pewarna *tripan blue* 0,4% dan diamati di bawah mikroskop untuk dihitung viabilitas sel dengan menggunakan rumus :

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

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

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

*Tripan blue* merupakan pewarna yang biasa digunakan untuk membedakan sel hidup dan sel mati (melihat viabilitas sel). Sel yang hidup tidak terwarnai, berbentuk bulat dan relatif kecil dibandingkan dengan sel yang mati. Sel yang mati akan membengkak dan berwarna biru karena terjadi kerusakan pada membran selnya (Djajanegara, 2009).

### 3.9.3 Pengamatan Abnormalitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster

Pengamatan abnormalitas kultur primer sel paru-paru fetus hamster dilakukan berdasarkan morfologi sel tersebut. Pengamatan abnormalitas secara morfologi meliputi bentuk sel yang tidak beraturan misalnya membran sel yang berkerut-kerut dan ukuran tiap sel yang berbeda (*Laboratorium for Human Cell Culture*, 2004). Rumus abnormalitas sel adalah :

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



### 3.10 Analisis Data

Data hasil pengamatan diuji dengan ANAVA Tunggal. ANAVA Tunggal digunakan untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan pemberian konsentrasi vitamin E dan kontrol. Jika hasil uji ANAVA menunjukkan perbedaan signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan  $\alpha = 1\%$ .

Hanafiah (2010) menjelaskan bahwa uji lanjut ditentukan setelah mengetahui nilai Koefisien Keragaman (KK). KK merupakan koefisien yang menunjukkan derajat ketelitian hasil 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.

Penggunaan uji lanjut pada parameter penelitian ini dilakukan berdasarkan nilai KK dengan kriteria sebagai berikut : jika KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan (UJD). Jika KK sedang (antara 5%-10% pada kondisi homogen atau antara 10%-20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan jika nilai KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen dan maksimal 10% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (Hanafiah, 2010).

Untuk menentukan persentase kerusakan dan viabilitas sel serta jumlah abnormalitas sel paru-paru fetus hamster maka hasil pengamatan dibuat tabel sebagai berikut :

**Tabel 3.1 Persentase Kerusakan Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster setelah Dipapar Etanol 10 mM selama 24 Jam**

Perlakuan	Kerusakan Sel (%)			Jumlah	Rata-rata
	Ulangan				
	1	2	3		
K (-)					
K (+)					
P <sub>1</sub> (25 µM)					
P <sub>2</sub> (50 µM)					
P <sub>3</sub> (75 µM)					
P <sub>4</sub> (100 µM)					
P <sub>5</sub> (125 µM)					

**Tabel 3.2 Persentase Viabilitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster setelah Dipapar Etanol 10 mM selama 24 Jam**

Perlakuan	Viabilitas Sel (%)			Jumlah	Rata-rata
	Ulangan				
	1	2	3		
K (-)					
K (+)					
P <sub>1</sub> (25 µM)					
P <sub>2</sub> (50 µM)					
P <sub>3</sub> (75 µM)					
P <sub>4</sub> (100 µM)					
P <sub>5</sub> (125 µM)					

**Tabel 3.3 Persentase Abnormalitas Kultur Primer Sel Paru-Paru Fetus Hamster setelah Dipapar Etanol 10 mM selama 24 Jam**

Perlakuan	Abnormalitas Sel (%)			Jumlah	Rata-rata
	Ulangan				
	1	2	3		
K (-)					
K (+)					
P <sub>1</sub> (25 µM)					
P <sub>2</sub> (50 µM)					
P <sub>3</sub> (75 µM)					
P <sub>4</sub> (100 µM)					
P <sub>5</sub> (125 µM)					

