

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian pengaruh vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) terhadap kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer 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 ( $\alpha$ -tokoferol) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, dan 125  $\mu$ M. Variabel terikat yang digunakan yaitu kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah sel saraf otak hamster yang berumur 2 hari yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.

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

Penelitian pengaruh vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) terhadap kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol dilaksanakan pada bulan Juli - November 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan

Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **3.4 Instrumen Penelitian**

#### **3.4.1 Alat**

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

#### **3.4.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah sel saraf otak hamster kultur primer yang sudah konfluen, 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), vitamin E (*α-tokoferol*) Nacalai (150233), 0,2% DMSO, etanol absolut, *deionized irrigation* (DI), NaHCO<sub>3</sub>, HCl 0.1 N, *tripan blue*, hepes, alkohol 70%, dan tipol.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Preparasi Alat**

Sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dengan cara direndam dalam tipol selama 1x24 jam, kemudian dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir, pada bilasan terakhir dibilas dengan aquades. Dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disterilisasi kering dan basah. Dimasukkan ke dalam LAF kemudian di UV selama 1 jam.

##### **A. Sterilisasi Kering**

1. Disiapkan alat-alat yang berbahan kaca yang telah dikeringkan dalam oven.
2. Dibungkus dengan aluminium foil
3. Disterilisasi dalam oven dengan suhu 125 °C selama 3 jam

##### **B. Sterilisasi Basah**

1. Disiapkan alat-alat yang berbahan plastik dan kaca yang telah dikeringkan dalam oven.
2. Dibungkus dengan aluminium foil
3. Disterilisasi dalam oven dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

#### **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, penisilin 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$  diencerkan pada 100  $\mu\text{l}$  medium. Konsentrasi akhir Penicilin 100  $\mu\text{g/ml}$  dan Streptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.5.2.3 Media Kultur dan Media Maintenance**

Media yang digunakan untuk sel saraf otak hamster kultur primer yaitu media DMEM dengan 20% FBS dan fungizon. Media pencucian 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 ( *$\alpha$ -tokoferol*)**

Vitamin E ( *$\alpha$ -tokoferol*) Nacalai (150233) bersifat hidrofobik, sehingga dilarutkan dalam DMSO 0,2%. DMSO merupakan pelarut yang tidak bersifat karsinogen dan teratogen, karena potensial toksisitasnya rendah. DMSO bereaksi cepat dengan sejumlah zat terutama air, dan mampu mempertahankan sel pada temperatur rendah (Elzay, 1967).

### 3.6 Isolasi Sel Saraf Otak

Hamster yang digunakan adalah fetus yang berumur 2 hari, kemudian didislokasi, dibedah dan diambil otak, kemudian dicuci dengan 2 ml PBS, 3 tetes fungizon, dan 1 tetes penisilin, streptomycin sebanyak 3 kali, selanjutnya dicacah dalam DMEM 0% dengan gunting steril. Hasil cacahan 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 penisilin dan streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

Dibuang supernatan dan pelet ditambah dengan 3 ml DMEM 20% FBS dan 3 tetes fungizon kemudian disentrifus kembali, setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 1,5 ml kemudian dilakukan pipeting. Hasil pelet diambil 100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam well yang diisi medium 20% FBS dan pemberian vitamin E dengan berbagai konsentrasi. Diinkubasi dan diamati setiap 3 hari sekali.

### 3.7 Pembagian Kelompok Sampel

- a. Kelompok K (-) : sel saraf otak hamster kontrol negatif (tanpa perlakuan vitamin E dan pemaparan etanol)
- b. Kelompok K (+) : sel saraf otak hamster kontrol positif (tanpa perlakuan vitamin E tetapi dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
- c. Kelompok P1 : sel saraf otak hamster yang diberi vitamin E ( *$\alpha$ -tokoferol*) konsentrasi 25  $\mu$ M yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.

- d. Kelompok P2 : sel saraf otak hamster yang diberi vitamin E (*α-tokoferol*) konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- e. Kelompok P3 : sel saraf otak hamster yang diberi vitamin E (*α-tokoferol*) konsentrasi 75  $\mu\text{M}$  yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- f. Kelompok P4 : sel saraf otak hamster yang diberi vitamin E (*α-tokoferol*) konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.
- g. Kelompok P5 : sel saraf otak hamster yang diberi vitamin E (*α-tokoferol*) konsentrasi 125  $\mu\text{M}$  yang dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.

### **3.8 Perlakuan**

#### **3.8.2 Perlakuan Pemaparan Etanol**

Sel saraf otak hamster dikultur dengan media DMEM 20% FBS dan diberi perlakuan vitamin E dengan konsentrasi yang berbeda kemudian diinkubasi. Sel saraf otak hamster kultur primer yang sudah konfluen selanjutnya dipapar etanol selama 24 jam dengan cara media dibuang, kemudian dicuci dengan 1 ml PBS dan 10  $\mu\text{l}$  fungizon sebanyak 2 kali, setelah itu media 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>.

### **3.9 Pengamatan**

#### **3.9.1 Pengamatan Kerusakan Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer**

Kerusakan sel merupakan perubahan atau gangguan yang dapat mengurangi viabilitas sel. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui kerusakan yang terjadi akibat paparan etanol dan mengetahui peran vitamin E terhadap pertumbuhan sel saraf otak hamster kultur primer setelah dipapar etanol (peran

vitamin E terhadap toksisitas etanol). Kerusakan sel dapat dilihat jika sel mengelupas dari substrat dan tidak berlekatan antar sel. Pengamatan ini menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 100x hingga 400x.

Kriteria untuk pengamatan kerusakan sel adalah 100% apabila sel yang rusak tidak tumbuh pada wadah kultur, 75% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi 1/4 wadah kultur, 50% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi 1/2 wadah kultur, dan 25% apabila sel yang tumbuh hanya memenuhi 3/4 wadah kultur.

### **3.9.2 Pengamatan Viabilitas Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer**

Pengukuran viabilitas sel saraf otak hamster ini adalah untuk mengetahui jumlah sel yang mampu berkembang dalam media kultur dan mengetahui persentase perbandingan antara sel yang hidup dan mati. Pengamatan ini dilakukan menurut prosedur *Laboratorium for Human Cell Culture* (2004). Perhitungan viabilitas dilakukan dengan cara dibuang media, kemudian dicuci dengan 1 ml PBS dan 10  $\mu$ l 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  $\mu$ l fungizon kemudian disentrifus 13000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan 1 ml PBS, 10  $\mu$ l fungizon kemudian disentrifus kembali 13000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, dibuang supernatan, pelet dipipeting dan diambil 100  $\mu$ l serta ditambah dengan

100 µl pewarna tripan blue 0,4% kemudian diamati di bawah mikroskop untuk dihitung viabilitas selnya dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase Viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{total sel dihitung}} \times 100$$

*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 (Trenggono, 2009).

### 3.9.2 Pengamatan Abnormalitas Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer

Pengamatan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer dilakukan berdasarkan morfologi sel tersebut. Sel hasil kultur ketika pengamatan dibedakan menjadi sel mati dan sel hidup. Sel yang hidup dibedakan lagi menjadi sel yang normal dan yang abnormal. Pengamatan abnormalitas secara morfologi meliputi sel yang nekrosis dengan bentuk sel yang tidak beraturan misalnya membran sel yang berkerut-kerut dan mengalami perubahan bentuk dari asalnya (Djati, 2006).

Kriteria dari pengukuran abnormalitas sel mencakup persentase sel. Sel yang abnormal termasuk sel hidup. Perhitungan abnormalitas sel dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase Abnormalitas} = \frac{\text{jumlah sel abnormal}}{\text{jumlah seluruh sel hidup}} \times 100$$

### 3.10 Analisis Data

Data hasil pengamatan yang terkait dengan kerusakan, viabilitas, dan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer dianalisis dengan uji statistik ANAVA tunggal. Jika hasil analisis tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilakukan uji lanjut.

Menurut Hanafiah (2010), uji lanjut dilakukan setelah menentukan nilai KK (Koefisien Keragaman). Koefisien keragaman merupakan suatu koefisien yang menunjukkan derajat ketelitian hasil yang diperoleh dari suatu percobaan. Jika KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan, jika KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji BNT. UJD (Uji Jarak Duncan) 0,05 digunakan untuk mengetahui kerusakan dan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer, sedangkan BNT (Beda Nyata Terkecil) 0,05 digunakan untuk mengetahui viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer. Hasil KK masing-masing parameter dapat dilihat pada lampiran 3.