

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 hingga Juni 2017. Penelitian dilaksanakan di *Animal Room* dan Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dan dilakukan secara *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) BALB/c betina. Sebanyak 16 mencit betina dengan umur delapan minggu dan berat badan  $\geq 20$  gram dibagi kedalam empat kelompok perlakuan yaitu normal (empat mencit sehat tanpa perlakuan), DMBA (empat mencit sehat dengan perlakuan induksi DMBA), DL50 (empat mencit sehat dengan induksi DMBA dan pemberian ekstrak lemon 50 mg/kg BB mencit), dan DL200 (empat mencit sehat dengan induksi DMBA dan pemberian ekstrak lemon 200 mg/kg BB mencit). Pengaruh dari perlakuan tersebut kemudian diamati perubahan sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada organ limpa (*spleen*). Berikut ini merupakan tabel kelompok perlakuan mencit pada penelitian ini

Tabel 1. Kelompok perlakuan mencit

<b>Kelompok</b>	<b>Keterangan</b>
Normal	Mencit tanpa perlakuan DMBA dan Ekstrak Lemon
DMBA	Mencit yang hanya induksi DMBA (kontrol negatif)
DL50	Mencit yang diinduksi DMBA + Ekstrak Lemon dosis 50 mg/kg BB mencit
DL200	Mencit DMBA Mencit yang diinduksi DMBA + Ekstrak Lemon dosis 200 mg/kg BB mencit

### 3.3 Induksi DMBA pada Mencit

Semua kelompok mencit dengan umur delapan minggu kecuali kelompok mencit normal diinduksi dengan senyawa karsinogenik 7-12 *dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) dengan dosis 0,015 mg/g BB. DMBA dilarutkan dengan minyak jagung. Induksi DMBA dilakukan secara subkutan di bagian kelenjar *mammae* mencit sebanyak sekali dalam seminggu selama 6 minggu. Selanjutnya dilakukan uji konfirmasi kanker payudara pada mencit secara histopatologi.

### 3.4 Pemberian Ekstrak Lemon (*Citrus limon*)

Setelah enam minggu induksi DMBA, kelompok mencit dengan perlakuan DL50 dan DL200 diberi perlakuan ekstrak lemon secara oral dengan dosis yang sesuai dengan perlakuan. Ekstrak lemon dilarutkan kedalam aquades. Pemberian ekstrak lemon dilakukan setiap hari selama 14 hari.

### 3.5 Isolasi dan Penghitungan Jumlah Sel dari *Spleen*

Semua kelompok perlakuan mencit didislokasi pada bagian leher hingga tidak menunjukkan aktivitas kemudian diposisikan terlentang dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Mencit dibedah pada bagian dorsal kiri hingga ventral untuk mengambil organ limpa / *spleen*. Masing-masing organ tersebut dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak dua kali. Organ limpa dihaluskan dengan menggunakan pangkal *syringe* searah jarum jam hingga homogen. Hasil gerusan ditampung dalam tabung propilen 15 mL. Suspensi sel ditampung dalam tabung propilen. Tabung propilen yang telah berisi suspensi dari masing-masing organ disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, suhu 10 °C selama 5 menit. *Supernatant* dibuang dan *pellet* yang terbentuk diresuspensi dengan 1 mL PBS.

### 3.6 Pewarnaan Sel dan *Flow Cytometry*

Hasil resuspensi isolasi sel diambil sebanyak 60 µL kemudian dipindahkan ke dalam *microtube*. Sebanyak 300 µL PBS ditambahkan ke dalam *microtube* berisi sel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm dengan suhu 10 °C selama 5 menit. *Pellet* hasil sentrifugasi dipisahkan dari *supernatant*, kemudian diwarnai dengan 50 µL antibodi ekstraseluler yaitu FITC-*conjugated rat anti-mouse* CD4, PE-*conjugated rat anti-mouse* CD8, PE-*conjugated rat anti-mouse*

CD62L. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dalam ice box. Sel yang telah diinkubasi pasca pewarnaan antibodi ekstraseluler ditambah dengan 400  $\mu$ L PBS, kemudian dipindah ke kuvet *flow cytometry* dan dilakukan analisis menggunakan *flow cytometry* dengan *software* BD Cellquest Pro™ pada komputer.

### **3.7 Analisis Data**

Data jumlah relatif sel hasil *flow cytometry* dianalisis dan dilanjutkan analisis statistika secara parametrik *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95 % menggunakan *software* SPSS versi 16 for Windows, kemudian dilakukan uji Tukey sebagai uji lanjutan.

### 3.8 Kerangka Operasional

