

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang lingkup penelitian

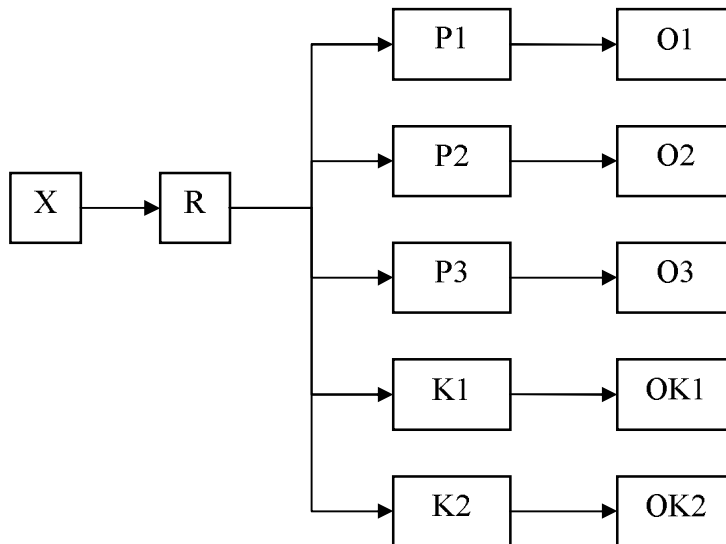
Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Gizi dan Imunologi.

3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Yogyakarta selama 2 (dua) bulan.

3.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test-only controlled group*, yang menggunakan binatang percobaan sebagai subyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian teh kelopak rosela, pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium*. Parameter pengukuran variable berupa produksi NO makrofag dan fungsi fagositosis makrofag.



Keterangan :

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : Randomisasi

P1 : Perlakuan 1, mencit diberi pakan standard, diinduksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1, diberi teh kelopak rosella dengan dosis 2×0.24 ml yang diencerkan dengan pelarut aqua sampai dengan 1 ml /hari selama 7 hari per oral.

P2 : Perlakuan 2, mencit diberi pakan standard, diinduksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1, diberi teh kelopak rosella dengan dosis 2×0.50 ml yang diencerkan dengan pelarut aqua sampai dengan 1 ml /hari selama 7 hari per oral.

P3 : Perlakuan 3, mencit diberi pakan standard, diinduksi *Salmonella*

typhimurium dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 dan diberi teh kelopak rosella dengan dosis $2 \times 0,98$ ml yang diencerkan dengan pelarut aqua sampai dengan 1 ml /hari selama 7 hari per oral.

K1 : Kontrol positif. Mencit mendapatkan pakan standard dan diinduksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU pada hari ke 1 dan diberi air 2×1 ml/hari selama 7 hari per oral.

K2 : Kontrol negatif, merupakan kontrol sehat dimana mencit tidak diberi perlakuan apapun, hanya mendapatkan pakan standard dan diberi air 2×1 ml/hari selama 7 hari per oral

O1 : Observasi terhadap perlakuan 1.

O2 : Observasi terhadap perlakuan 2.

O3 : Observasi terhadap perlakuan 3.

OK1 : Observasi terhadap kontrol positif.

OK2 : Observasi terhadap kontrol negatif.

Dosis pemberian larutan kelopak rosella didasarkan pada konversi dosis manusia dewasa ke mencit menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026.⁽³¹⁾ Dosis penggunaan teh kelopak rosella yang lazim adalah dengan cara menyeduh 3 kelopak bunga rosella kering dengan 250 ml air mendidih, dikonsumsi 3 kali sehari, sehingga didapatkan dosis lazim untuk mencit adalah $3 \times 0,65$ ml per hari.

Pada penelitian ini diberikan 3 dosis yang berbeda, yaitu $\frac{1}{2}$ x dosis lazim, 1 x dosis lazim, dan $2 \times$ dosis lazim. Dasar pemberian $\frac{1}{2}$ x dosis adalah

mempertimbangkan faktor efisiensi, yaitu dengan harapan melalui pemberian $\frac{1}{2}$ x dosis sudah memberikan hasil yang menunjang hipotesis, maka dapat menghemat penggunaan kelopak rosela. Dasar pemberian 2 x dosis adalah untuk mengantisipasi apabila pemberian 1 x dosis belum memunculkan hasil yang mendukung hipotesis.

Mengingat bahwa asupan air mencit adalah 15 ml/100 gram/hari, sehingga jika diberikan dalam jumlah lebih dari 1 ml pada satu kali pemberian akan menyebabkan overhidrase dan distensi lambung, maka dalam penelitian ini prosedur pembuatan teh kelopak rosela adalah dengan menyeduh 6 kelopak rosela dalam 250 ml air mendidih kemudian diambil 0,325 ml sebagai patokan 1 x dosis lazim.⁴⁰

Mengingat bahwa frekuensi pemberian sonde sebanyak 3 x per hari adalah dapat menimbulkan iritasi dan stres terhadap mencit, maka pemberian perlakuan dilakukan sebanyak 2 x per hari dengan penyesuaian volume.

Fungsi makrofag mencit dilihat setelah mencit diterminasi pada hari ke-7 pasca inokulasi *Salmonella typhimurium*, dengan alasan pada hari ke-7 pasca terpapar antigen telah terjadi aktifasi sel-sel yang terlibat dalam respon imun dan dimulai fase eliminasi antigen.¹

3.4. Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/c. Strain yang dipilih adalah Balb/c sebab strain ini dapat menimbulkan respon imunitas apabila dinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup.

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit Balb/c karena merupakan mencit yang sering digunakan pada penelitian bertujuan umum maupun penelitian di bidang imunologi.⁴¹

Pada penelitian ini respon imun seluler diinduksi dengan pemberian *Salmonella typhimurium*. *Salmonelle typhimurium* adalah basil gram negatif anaerob fakultatif intraseluler. *Salmonella* mempunyai faktor stimulator respon imun *host* berupa lipopolisakarida (LPS).³⁰

3.5. Sampel

3.5.1. Jumlah sampel

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan ketentuan dari WHO jumlah sampel minimal 5 pada tiap kelompok perlakuan.⁴² Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor mencit, untuk mengantisipasi *drop-out*.

3.5.2. Cara pengambilan sampel

Kriteria inklusi meliputi :

1. Galur murni Balb/c.

2. Jenis kelamin jantan.
3. Umur 6 minggu.
4. Berat badan 20-30 gram.
5. Aktif, sebelum diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Kriteria eksklusi adalah mencit cacat sebelum perlakuan.

3.6. Variabel penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah teh kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa L.* dengan dosis bervariasi. Sedangkan variabel tergantung penelitian ini adalah fungsi makrofag yang dalam penelitian ini diukur dengan parameter sebagai berikut :

- a) Produksi NO makrofag, diukur jumlah NO dari supernatan makrofag menggunakan reagen Griess dengan metode modifikasi Griess menurut Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988).
- b) Kemampuan fagositosis makrofag diperiksa dengan menggunakan partikel *latex bead* yang dinyatakan dalam indeks fagositosis.

Variabel kendali penelitian ini adalah *Salmonella typhimurium* sebagai imunogen. *Salmonella typhimurium* yang digunakan sebagai strain *Salmonella* virulen dengan LD50 10^6 CFU, sehingga dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas seluler adalah 10^5 CFU, yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP.

3.7. Definisi operasional

No.	Variabel	Satuan	Skala
1.	Teh kelopak rosella dibuat dengan cara 6 (enam) kelopak kering bunga rosella, yang diseduh dalam 250 ml air mendidih, didiamkan selama 15 menit, diambil airnya, dan diberikan kepada kelompok perlakuan 1 dengan dosis 2 x 0,24 ml/hari; diberikan kepada kelompok perlakuan 2 dengan dosis 2 x 0.5 ml/ hari, dan diberikan kepada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 2 x 0.98 ml/ hari melalui sonde lambung.	ml/ hari	Ordinal
2.	Produksi NO makrofag adalah konsentrasi NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag yang diukur dengan reagen Griess.	μM	Rasio
3.	Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase sel yang memfagosit partikel lateks yang dihitung pada 200 sel dikali rata-rata jumlah partikel yang difagosit pada sel yang positif.	Indeks	Rasio

Pemeriksaan variabel kemampuan fagositosis makrofag dilakukan oleh peneliti dan analis yang berpengalaman dari LPPT UGM secara membuta, bertujuan untuk mengurangi subyektifitas.

3.8. Alat dan bahan

3.8.1. Alat/ instrumen penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang hewan, sonde lambung, semprit 1 cc steril, semprit 10 cc steril dengan jarum ukuran 20 G, kaca objek, bilik hitung *neubauer improve*, mikroskop cahaya, tabung reaksi, 15-ml *conical centrifuge tube*, tabung sentrifus 50 ml steril, tabung berlapis silikon, seperangkat alat bedah steril, inkubator CO₂ 5%, *ELISA reader*, pipet *Pasteur*, sentrifugator sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu, *microplate 24 wells*, *microplate 96 wells* dasar rata, *thermanox plastic coverslip* diameter 13 mm.

3.8.2. Bahan dan reagen penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan adalah pakan standar untuk mencit Balb/c, bakteri *Salmonella typhimurium* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP Semarang, larutan kelopak rosela yang dibuat di LPPT UGM Yogyakarta dan telah dianalisis kandungannya di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, UNDIP Semarang. Sampel berupa cairan peritoneal mencit.

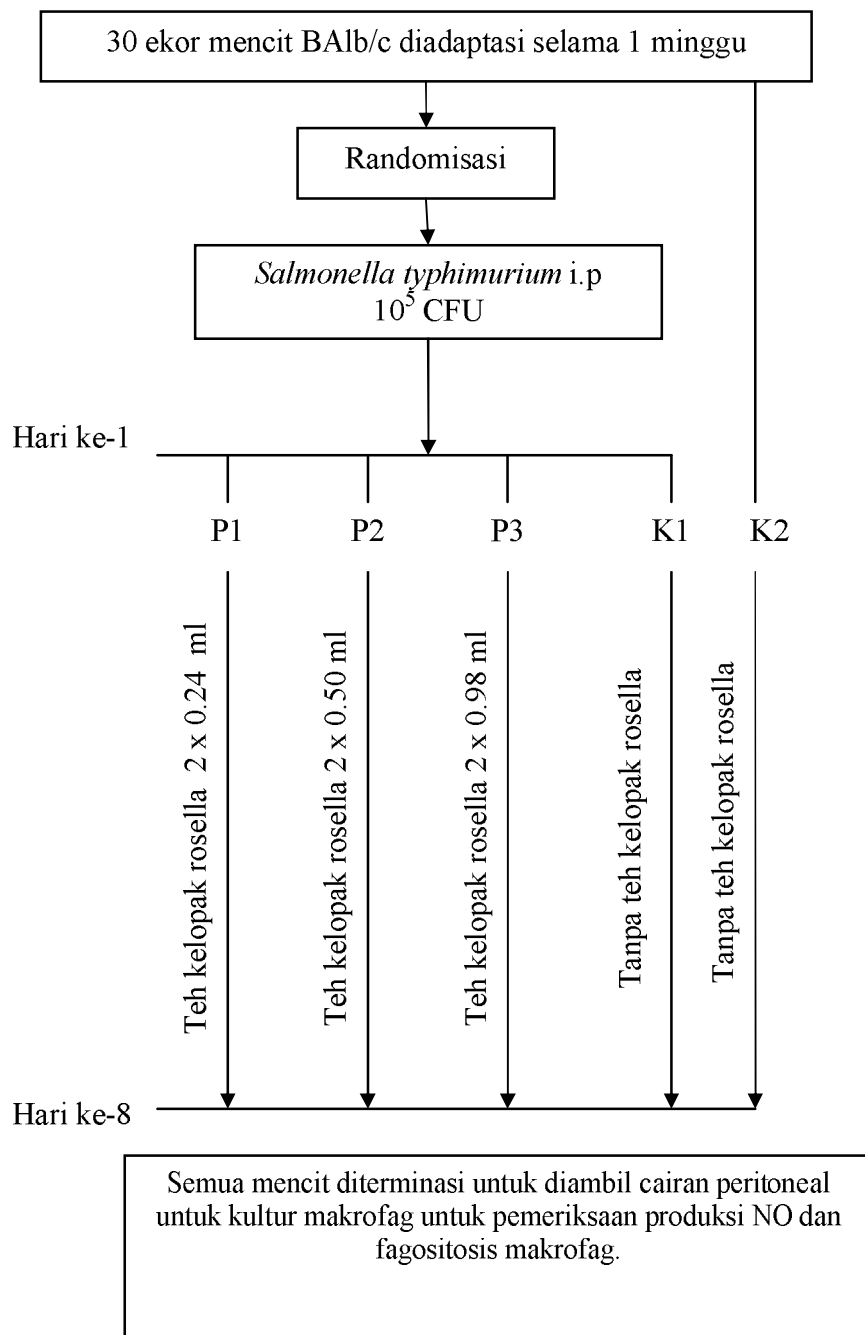
Reagen yang digunakan adalah alkohol 70%, *Phosphat buffer saline (PBS)*, larutan *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*, *Fetal Bovine Serum (FBS)*, asam asetat 3%, glutamin (GIBCO), penicillin-streptomycin (GIBCO), *Latex beads 3µm* (Sigma. Cat. L30), metanol absolut, Giemsa 20%, Reagen Griess (reagen *chromogenic*), *Canada balsam*, aquades steril, media *Salmonella-Shigella*.

3.9. Prosedur pengumpulan data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- a) Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standard.
- b) Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor mencit dibagi dalam 5 kelompok.
- c) Kelompok P1-3 diberi pakan standard dan larutan kelopak rosella setelah 12 jam injeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-1 dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 7 hari. Pada hari ke-8 semua mencit diterminasi untuk diambil cairan peritoneal untuk pemeriksaan NO dan kemampuan fagositosis makrofag.
- d) Kelompok K1 diberi pakan standard selama 7 hari, dilakukan injeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal namun tidak diberi teh kelopak rosella hanya diberi air, sedangkan kelompok K2, merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

3.10. Alur penelitian



3.11. Prosedur pemeriksaan

3.11.1. Prosedur pemeriksaan produksi NO

Untuk memeriksa produksi Nitrit Oksida digunakan *microplate 96 wells* (untuk ELISA) dengan dasar rata, dengan cara sebagai berikut :

- a) Memasukkan 100µl reagen Griess (reagen *chromogenic*) dalam tiap sumuran.
- b) Memasukkan 100µl supernatan kultur makrofag peritoneal yang akan dites dan nitrit standard ke dalam sumuran (duplo). Menggunakan medium kontrol sebagai blanko. (supernatan kultur makrofag diperoleh dari proses yang tertulis pada prosedur isolasi makrofag).
- c) Tunggu 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna dan stabilisasi.
- d) Mengukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader*.
- e) Membuat kurva standard menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan nitrit standar, kemudian menghitung konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

Adapun cara membuat reagen *chromogenic* dan nitrit standar adalah sebagai berikut :

- a) Reagen 1 : N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b) Reagen 2 : Sulfanilamide (Sigma): 1 g dilarutkan dalam 100 ml 5% *phosphoric acid*.

Keduanya harus disimpan dalam lemari pendingin dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tidak berubah warna menjadi lebih gelap.

Chromogenic reagent (Griess reagent) : campurkan dengan volume sama banyak reagen 1 dan reagen 2 setiap akan digunakan. Dapat digunakan dalam 1 jam setelah disiapkan.

- c) Nitrit standar : Larutkan 69mg NaNO_2 dalam 500 ml air suling (2mM stock), kemudian dibuat pengenceran bertingkat dari 0–200 μM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

3.11.3. Prosedur pemeriksaan fagositosis makrofag dengan *latex beads*

Pemeriksaan variabel kemampuan fagositosis makrofag dilakukan oleh peneliti dan analis yang berpengalaman dari LPPT UGM secara membuta, bertujuan untuk mengurangi subyektifitas.

Prosedur isolasi makrofag mencit

Prosedur di bawah ini dilakukan untuk mendapatkan 5×10^5 sel/ml. Mencit diterminasi dengan dislokasi cervix, mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit abdomen dibuka sehingga tampak peritoneum kemudian dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diinjeksi dengan 10cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup

banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse steril. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut dengan PBS sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 cc medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10%, penicillin, streptomycin, dan glutamin. Sel-sel dihitung dengan hemasitometer setelah dilarutkan dalam asam asetat 3% untuk melisiskan eritrosit, kemudian diresuspensi lagi dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Setelah itu sel dikultur dalam medium komplit di dalam *microplate 24 wells* dasar rata, masing-masing sumuran 200µl (kepadatan 5×10^5 sel/ml) dan pada dasaran diberi *coverslip*, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO2 pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml dalam tiap sumuran dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplit 1 ml dalam tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

Pemeriksaan fagositosis makrofag dengan *latex beads*

- a) Suspensi makrofag yang telah dikultur pada *microplate 24 wells* yang telah diberi *coverslips*, setiap sumuran 200 µl (5×10^5), diinkubasi dalam CO2 5% 37°C selama 30 menit.
- b) Tambahkan medium komplit 1 ml setiap sumuran, inkubasikan selama 24 jam.

- c) Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2 kali.
- d) *Latex beads* diresuspensikan sehingga didapatkan konsentrasi 10 kali lipat.
- e) Tambahkan suspensi latex 200 μ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C pada inkubator CO₂.
- f) Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit.
- g) Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan methanol absolut.
- h) Setelah kering, coverslips dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.
- i) Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
- j) Setelah kering di-*mounting* pada kaca objek.
- k) Kemampuan fagosit dihitung dari prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang kemudian dihitung pada 200 sel dikali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan dalam indeks fagositosis.

3.12. Analisis statistik

Data yang diperoleh dilakukan *editing*, *coding* dan *entry* dalam file komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS 15.0. Analisis deskriptif menampilkan nilai rerata dan simpangan baku dari variabel tergantung (produksi NO dan indeks fagositosis). Hasil ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik batang. Untuk uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilks*. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji *One way ANOVA* dilanjutkan *post hoc*

test Bonferroni. Data yang terdistribusi tidak normal akan dilakukan uji Kruskal Wallis. Nilai signifikansi dalam penelitian dengan hasil analisis $p < 0,05$.

3.13. Kode Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan spesimen cairan peritoneal subjek penelitian. Cairan peritoneal diperoleh dari rongga peritoneal yang dilakukan oleh peneliti dan laboran LPPT UGM yang berpengalaman. Prosedur pengambilan cairan peritoneal mengharuskan subjek penelitian dibunuh terlebih dahulu, yaitu dilakukan dekapitasi secara dislokasi serviks.

Seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti. Protokol penelitian telah disetujui oleh Pembimbing I, Pembimbing II, Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana UNDIP.