

### **3.3 Hipotesis**

1. Terdapat perbedaan kadar NO makrofag antara mencit yang terpapar LPS yang mendapat vitamin C 0.52 mg, 1.04 mg dan 2.6 mg intravena perhari dengan yang tidak mendapat vitamin C intravena.
2. Pemberian vitamin C intravena akan menurunkan kadar NO makrofag pada mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Rancangan penelitian**

Penelitian ini termasuk eksperimental murni uji praklinis yang dilakukan secara acak tersamar ganda, dengan tujuan mencari pengaruh pemberian vitamin C intravena pada mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal terhadap kadar NO intraperitoneal.

Kelompok ada 4 yaitu kelompok kontrol (P1), Perlakuan 1 (P2), Perlakuan 2 (P3), Perlakuan 3 (P4). Pembagian kelompok perlakuan :

P1 : Kelompok kontrol, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal

P2 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat Vitamin C 0.52 mg / hari intravena

P3 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat Vitamin C 1.04 mg/ hari intravena

P4 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat Vitamin C 2.6 mg/ hari intravena

Dosis obat yang diberikan disetarakan dengan dosis pada manusia dengan berat badan 70 kg, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026. Jadi dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok:

$$200 \text{ mg/ hari} \rightarrow 200 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,52 \text{ mg}$$

$$400 \text{ mg/ hari} \rightarrow 400 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,04 \text{ mg}$$

$$1000 \text{ mg/hari} \rightarrow 1000 \text{ mg} \times 0,0026 = 2,60 \text{ mg}$$

## 4.2. Ruang Lingkup Penelitian

#### **4.2.1. Keilmuan**

Penelitian dilakukan oleh bagian Ilmu Bedah dan Biologi molekuler FK  
UNDIP, RS.Dr.Kariadi.

#### **4.2.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Waktu penelitian : 14 hari

Tempat penelitian : Laboratorium bioteknologi dan Laboratorium  
Parasitologi FK UNDIP Rumah Sakit Dr.  
Kariadi Semarang

#### **4.3. Subyek Penelitian**

Populasi : Mencit Balb/c jantan

Sampel : Sampel diambil secara acak tersamar ganda yang  
memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

##### **4.3.1. Kriteria Inklusi**

- Mencit Balb/c jantan.
- Belum pernah digunakan untuk penelitian
- Umur dua sampai dua setengah bulan
- Berat badan 20 - 40 gram.

##### **4.3.2. Kriteria Eksklusi**

- Mencit sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif).

- Mati selama perlakuan berlangsung.

#### 4.4. Randomisasi

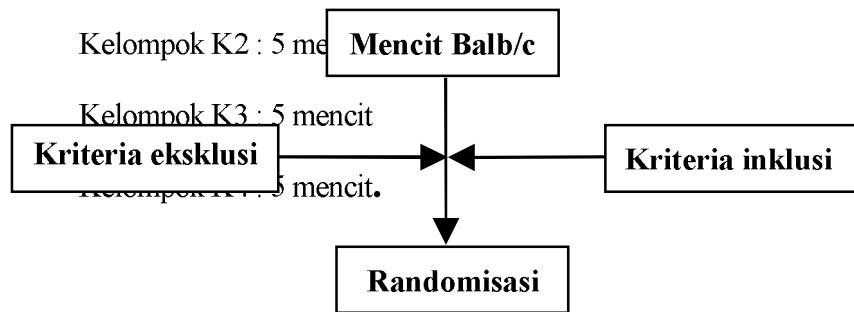
Besar sampel sebanyak 20 mencit berdasarkan *Research Guidelines For Evaluation The safety and Efficacy of Herbal Medicines* dari WHO, kemudian sampel dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K1 : 5 mencit

Kelompok K2 : 5 me

Kelompok K3 : 5 mencit

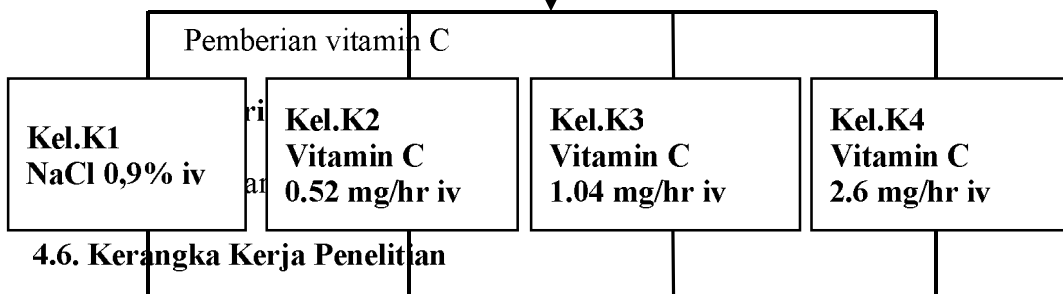
Kelompok K4 : 5 mencit.



#### 4.5. Variabel Penelitian

LPS 20 mg/KgBB intra peritoneal (1x)

##### 4.5.1. Variabel Bebas



#### 4.6. Kerangka Kerja Penelitian

Kultur makrofag intra peritoneal

Kadar NO makrofag intra peritoneal

Uji statistik

#### **4.7. Definisi Operasional**

- Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negative E. coli yang merupakan inisiator awal

terjadinya endotoksemia yang disuntikkan intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kgBB.

- Vitamin C adalah suatu antioksidan kuat yang merupakan suplemen diberikan dengan dosis 0.52 mg, 1.04 mg dan 2.6 mg intravena.
- Kadar *nitric oxide* (NO) makrofag adalah kadar NO yang diukur dari supernatan makrofag peritoneal dengan metode Griess dan dinyatakan dengan satuan  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **4.8. Cara Pengumpulan Data**

Data yang dikumpulkan adalah data primer, hasil pemeriksaan kadar NO dari supernatan kultur makrofag.

#### **4.9. Bahan, Alat Penelitian dan Cara Pemeriksaan**

##### **4.9.1. Bahan untuk pemeriksaan**

1. *Chloroform*
2. Alkohol 70%
3. Asam acetat 3% + *crystal violet* 1mg/100 ml
4. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 yang mengandung L-glutamin (1mM), *Fetal Bovine Serum* (FBS)5% dan antibiotik Penisillin 50 unit dan Streptomisin 50 $\mu\text{g/ml}$

##### **4.9.2. Alat yang dibutuhkan**

1. Gunting dan Pinset
2. Semprit 10 ml dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
3. Tabung sentrifuse 50 ml steril
4. Pipet pasteur steril
5. Tabung berlapis sikon
6. *Hemacytometer*
7. *Refrigerated centrifuge*

#### **4.9.3. Cara pengambilan makrofag**

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan kloroform, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan perut disiram dengan alkohol 70%.
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial perut. Robek kulit menggunakan 2 pinset kearah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
3. Suntikkan 10 ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS kedalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
4. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.

5. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400xg, 4oC selama 10 menit.
6. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2%FBS.
7. Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin (1mM), Fetal Bovine Serum (FBS)5% dan antibiotik Penisillin 50 unit dan Streptomisin 50µg/ml, kemudian disentrifus pada 400xg, 4oC selama 10 menit.
8. Buang supernatan, bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah, kemudian disentrifus pada 400xg, 4oC selama 10 menit.
9. Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
10. Resuspensikan dengan medium komplit.
11. Hitung sel dengan Hemacytometer.
12. Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml selama 24 jam dalam CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C.

#### **4.9.4. Bahan untuk pemeriksaan NO**

##### **1. Reagen**

- Reagen 1 : N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml distilled water.
- Reagen 2: Sulfanilamide (Sigma): 1 g dilarutkan dalam 100 ml 5%



phosphoric acid.

Keduanya harus disimpan pada refrigerator dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tak berubah warna menjadi lebih gelap.

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

- Nitrit standard : Larutkan 69 mg  $\text{NaNO}_2$  dalam 500 ml Distilled water (2 mM stock), kemudian buat pengenceran bertingkat dari 0 - 200  $\mu\text{M}$  dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

## 2. Supernatan Kultur Makrofag peritoneal.

### 4.9.5. Alat dan bahan untuk pemeriksaan kadar NO

1. *Microplate*
2. Tabung reaksi
3. *ELIZA reader*
4. Reagen *Griess*

### 4.9.6. Prosedur pemeriksaan $\text{NO}^{41}$

Penentuan kadar NO dalam supernatan kultur.

Modifikasi Metode Griess menurut Green *et al* (1982) dan Ding *et al* (1988)

1. Gunakan microplate 96-well bawah datar (untuk ELISA), masukkan 100  $\mu\text{l}$  reagen Griess pada tiap sumuran.
2. Pipet 100  $\mu\text{l}$  supernatan / standard  $\text{NaNO}_2$  ke dalam sumuran (duplo/triplo). Gunakan kontrol (medium) untuk blanko.
3. Tunggu 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna & stabilisasi.
4. Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (ELISA reader).
5. Buat kurva standard menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan standard. Tentukan konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standard atau formula regresi.

#### 4.10. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Data dikumpulkan dan diolah dengan menggunakan program komputer *SPSS 15.0 for windows* dan analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, *standart deviation* dan grafik. Variabel bebas berskala pengukuran nominal yaitu diberi vitamin C dan tidak diberi vitamin C sedang variabel terikat untuk kadar NO berskala pengukuran rasio. Uji normalitas data masing-masing kelompok menggunakan *Shapiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data, didapatkan data berdistribusi normal tidak homogen, sehingga digunakan uji beda Kruskal Wallis dilanjutkan dengan Mann Whitney untuk melihat beda antara kelompok P2, P3, dan