

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang Lingkup Penelitian

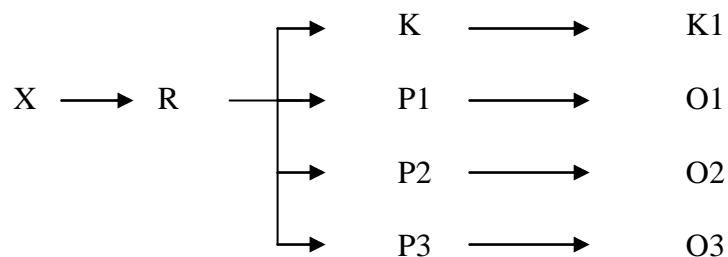
Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Imunologi.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat pemeliharaan dan intervensi hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang selama 30 hari, sedangkan tempat pemeriksaan produksi NO makrofag dan produksi ROI makrofag dilaksanakan di Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang .

4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan the post test only-control group, yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian jus mengkudu pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok. Parameter pengukuran variabel berupa produksi NO dan ROI makrofag bronchoalveolar.



Keterangan :

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : randomisasi

K : Kontrol , tikus diberi pakan standard, dan paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari, tanpa pemberian jus mengkudu.

P1 : Perlakuan 1, tikus diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari, dan pemberian jus mengkudu dengan dosis 1 ml/ hari melalui sonde.

P2 : Perlakuan 2, tikus diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok, kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari, dan pemberian jus mengkudu dengan dosis 2 ml / hari melalui sonde.

P3 : Perlakuan 3, tikus diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok, kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari, dan pemberian jus mengkudu dengan dosis 4 ml / hari melalui sonde.

4.4. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.

4.5. Sampel Penelitian

4.5.1. Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan WHO⁶⁵ untuk penelitian eksperimental uji toksisitas akut dan level dosis, sedikitnya menggunakan 5 ekor per kelompok yang diambil secara acak, dibagi dalam 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, sehingga jumlah yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.5.2. Cara Pengambilan Sampel

Kriteria inklusi meliputi :

- 1) Tikus galur murni wistar
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 15 minggu
- 4) Berat badan 180 - 220 gram
- 5) Sehat dan aktif selama pemberian paparan asap rokok.

Kriteria eksklusi meliputi :

Tikus tampak sakit selama perlakuan.

4.6. Variabel Penelitian

4.6.1. Variabel bebas :

- Jus mengkudu.

4.6.2. Variabel tergantung:

- Produksi NO makrofag bronchoalveolar.
- Produksi ROI makrofag bronchoalveolar.

4.7. Definisi Operasional

1. Pemberian Jus mengkudu adalah pemberian Tahitian Noni Juice melalui sonde yang diberikan 30 menit setelah pemaparan asap rokok dengan dosis; pada kelompok 1 sejumlah 1 ml/hari; kelompok 2 sejumlah 2 ml/hari; kelompok 3 sejumlah 4 ml / hari.
2. Asap rokok adalah asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan jam 14.00 wib selama 30 hari.
3. Produksi NO makrofag bronchoalveolar adalah jumlah NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag bronchoalveolar yang diukur dengan Metode Griess dan dibaca absorbansinya menggunakan automated microplate reader (Elisa reader) pada panjang gelombang 550 nm.
Skala : Rasio
4. Produksi ROI makrofag bronchoalveolar adalah index jumlah ROI yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag bronchoalveolar yang distimulasi dengan larutan PMA dan dioksidasi dengan larutan NBT dan larutan Neutral Red menjadi presipitat formazan yang hasilnya dibaca di bawah mikroskop cahaya dengan diukur prosentase dan derajatnya.
Skala : Interval

4.8. Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang hewan, sonde lambung, semprit steril 1 cc, semprit steril 10 cc dengan jarum ukuran 20G dan 22G, seperangkat alat bedah steril, mikroskop cahaya, tabung sentrifus 50 ml steril, tabung flacon, inkubator CO₂, sentrifus, microplate dasar rata, ELISA reader, mikropipet, pipet pasteur steril, coverslip, Laminar flow hood.

4.8.2. Bahan dan Reagen Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah Tahitian Noni Juice (TNJ), pakan standard untuk tikus galur wistar, rokok kretek tanpa filter, cairan bronchoalveolar.

Reagen yang digunakan adalah alkohol 70%, larutan HBSS (*Free Hank's* balanced salt solution), larutan asam asetat 3%, larutan RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640(GIBCO), larutan FBS (Fetal Bovine Serum)10%, reagen Griess, larutan NBT (Nitro Blue Tetrazolium), larutan PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), larutan PBS (Phosphat buffer Saline), larutan Neutral Red 2%, Canada Balsam.

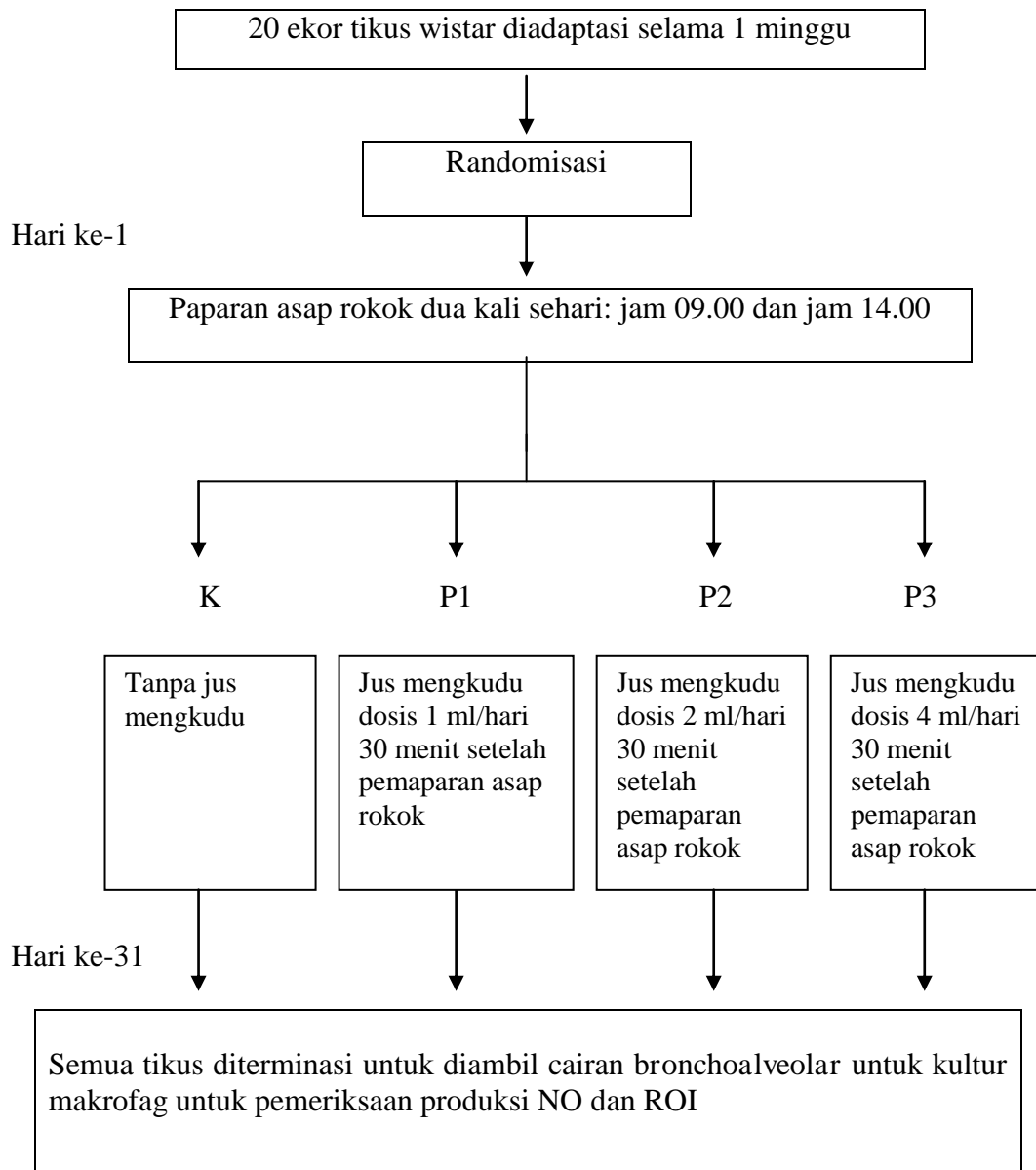
4.9. Prosedur Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- 1) Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standard.

- 2) Pengelompokan dilakukan dengan acak sederhana, 20 ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok.
- 3) Kelompok K diberi pakan standard dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari.
- 4) Kelompok P1 diberi pakan standard dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari, pagi dan sore dan pemberian jus mengkudu melalui sonde lambung dengan dosis 1 ml/hari selama 30 hari.
- 5) Kelompok P2 diberi pakan standard dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari, pagi dan sore dan pemberian jus mengkudu melalui sonde lambung dengan dosis 2 ml/hari selama 30 hari
- 6) Kelompok P3 diberi pakan standard dan paparan asap rokok dengan rokok dengan dosis dua kali dalam sehari, pagi dan sore dan pemberian jus mengkudu melalui sonde lambung dengan dosis 4 ml/hari selama 30 hari.
- 7) Hari ke 31, cairan bronchoalveolar dari semua kelompok tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan NO dan ROI makrofag.

4.10. Alur Penelitian



4.11. Prosedur Kerja

4.11.1. Cara paparan asap rokok

- 1) Tikus dipindahkan satu demi satu dengan cara memegang ekornya dari kandang pemeliharaan ke dalam kotak pengasapan. Setiap kelompok terdiri

dari 5 ekor tikus dimasukkan dalam kandang pengasapan yang sama. Bagian samping terdapat lubang sebagai tempat dimasukkannya rokok yang dibakar, pada bagian atas kotak pengasapan terdapat lubang untuk jalan keluarnya asap.

- 2) Saat rokok terbakar, di ujung lainnya diberi spuit dan spuit ditarik berulang kali dengan gerakan memompa sehingga asap rokok dapat dihembuskan berulang kali ke dalam kotak sampai satu batang rokok terbakar habis selama 28 menit. Pengasapan diberikan dua kali dalam sehari; jam 09.00 dan jam 14.00 wib.

4.11.2. Prosedur isolasi makrofag tikus (dikutip dari Lewis JG, 1995)⁶⁶

- 1) Cairan bronchoalveolar dalam tabung flacon disentrifus dengan kecepatan 2500g selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan dibuang dan suspensi sel ditambah dengan 2 ml PBS, pencucian dilakukan sebanyak 2 kali.
- 2) Suspensi ditambah 1 ml medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10%.
- 3) Sel suspensi dihitung dengan hemocytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisiskan eritrosit.
- 4) Sel dikultur dalam medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10% dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 2 jam inkubator CO₂ pada suhu 37°C.
- 5) Sel dicuci dengan larutan HBSS sebanyak 3x dan ditambahkan 1 ml medium komplet RPMI 1640, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.11.3. Prosedur pengukuran produksi NO makrofag.

Modifikasi Metode Griess menurut Green et al (1982) dan Ding et al (1988)⁶⁷ dengan cara sebagai berikut :

- 1) 100 ul reagen Griess dimasukkan dalam tiap sumuran microplate 96 wells dengan dasar rata.
- 2) 100 ul supernatan kultur makrofag alveoli yang akan dites dan nitrit standard sebagai blanko dimasukkan ke dalam sumuran (duplo).
- 3) Diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna dan stabilisasi.
- 4) Absorbansi diukur pada 550 nm dengan menggunakan ELISA reader.
- 5) Kurva standard dibuat menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan nitrit standard, kemudian konsentrasi nitrit dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standard atau formula regresi.

4.11.4. Prosedur pengukuran produksi ROI makrofag.

Pemeriksaan produksi ROI makrofag dengan cara reduksi NBT (Metode Leijh dkk, 1986) :

- 1) Suspensi makrofag bronchoalveolar yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran diberi 200 ul (5×10^5 sel), kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37°C selama 30 menit.
- 2) Tiap sumuran ditambah 1 ml medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10% dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37°C selama 2 jam.

- 3) Sel dicuci 2x dengan RPMI, kemudian ditambahkan 1 ml medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10% pada tiap sumuran, diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 4) Makrofag bronchoalveolar yang telah dikultur sehari sebelumnya kemudian dicuci 2x dengan RPMI dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37°C selama 10 menit
- 5) Tiap sumuran ditambahkan 500 ul larutan NBT. Pada sumuran kontrol hanya diberi larutan NBT.
- 6) Microplate diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 60 menit.
- 7) Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3x, lalu dikeringkan pada suhu kamar (25 °C)
- 8) Difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik.
- 9) Setelah kering diwarnai dengan larutan Neutral Red 2 % selama 15 menit, dicuci dengan aquades dan dikeringkan pada suhu kamar (25 °C)
- 10) Coverslip dimounting pada gelas benda dengan canada balsam.
- 11) Presentasi sel dengan reduksi NBT dihitung dengan scoring 1-4

Derajat presipitat didasarkan pada presentasi terbentuknya presipitat, dengan kriteria sebagai berikut :

Derajat 1	: presipitat <25%	Derajat 3	: presipitat 50-75%
Derajat 2	: presipitat 25-50%	Derajat 4	: presipitat >75%

Perhitungan index produksi ROI makrofag dibaca pada $\times 50$ sel dan dihitung berdasarkan jumlah sel yang ada dikalikan derajat masing-masing, kemudian dibagi dengan total jumlah sel yang ada.

4.12. Analisis Statistik

Data yang diperoleh dilakukan editing, coding, dan entry dalam file komputer. Setelah dilakukan clearing, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program komputer.

Analisis deskriptif dari variabel tergantung produksi NO makrofag ditampilkan nilai rerata dan simpang baku serta Box-Plot. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro Wilks. Uji beda antar kelompok dilakukan uji One Way Anova.

Analisis deskriptif dari variabel tergantung index produksi ROI makrofag ditampilkan nilai rata-rata dan simpang baku serta Box-Plot. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro Wilks, dilanjutkan analisis nonparametrik Kruskal Wallis.

4.13. Etika Penelitian

Penelitian ini telah dimintakan persetujuan ethical clearance dari Komisi Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro – RSUP Dr Kariadi Semarang.