

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini termasuk jenis eksperimental laboratorik yang menggunakan pendekatan “*Post test only control group design*” yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.<sup>20</sup> Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3). Pembagian kelompok sebagai berikut:

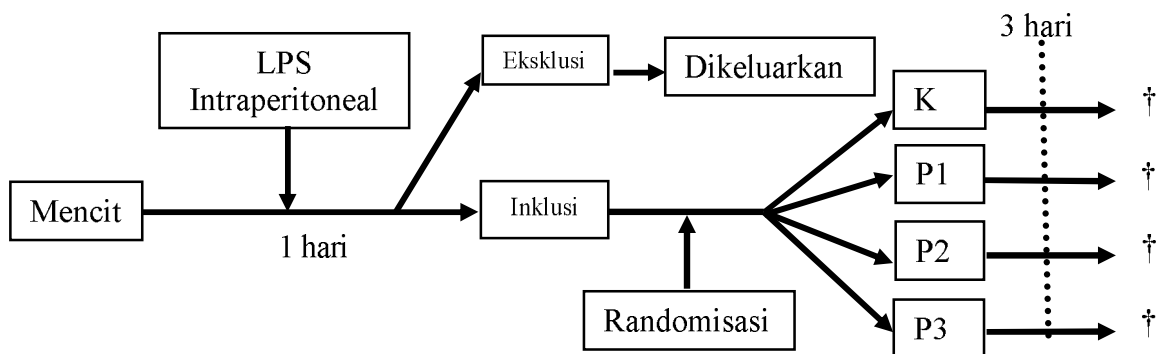
- K : Kelompok kontrol ; mencit yang disuntik LPS intraperitoneal
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 0.52 mg intravena/hari
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 1.04 mg intravena/hari
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 2.6 mg intravena/hari

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 perhitungan dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok:

- P1 : 200 mg/ hari  $\rightarrow 200 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,52 \text{ mg}$
- P2 : 400 mg/ hari  $\rightarrow 400 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,04 \text{ mg}$
- P3 : 1000 mg/hari  $\rightarrow 1000 \text{ mg} \times 0,0026 = 2,6 \text{ mg}$

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



**Gambar 7.** Skema Rancangan Penelitian

#### 4.2. Sampel Penelitian

Hewan coba adalah mencit strain Balb/C berusia 8-10 minggu dengan berat badan 20-40 gram. Mencit strain Balb/C ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian juga dapat diamati respon imunologisnya. Sedang jenis kelamin tidak ditentukan karena pada sepsis dapat terjadi pada jantan dan betina.

Besar sampel berdasarkan *Research Guidelines For Evaluation The safety and Efficacy of Herbal Medicines* dari WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 1 ekor.<sup>21</sup>

Randomisasi: 24 ekor mencit yang menjadi sepsis kemudian dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 5 mencit dengan cadangan 1 ekor

Kelompok P1 : 5 mencit dengan cadangan 1 ekor

Kelompok P2 : 5 mencit dengan cadangan 1 ekor

Kelompok P3 : 5 mencit.dengan cadangan 1 ekor

Kriteria inklusi:

- Mencit Balb/C yang sepsis setelah disuntik LPS dengan kriteria: tanda-tanda *piloerection*, *periocular discharge*, tampak lesu/tidak aktif bergerak, penurunan nafsu makan dan minum, demam dan diare (Diding dkk, 2008)<sup>22</sup>
- Umur dua sampai dua setengah bulan.
- Berat badan 20 - 40 gram.

Kriteria eksklusi:

- Mencit sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif) sebelum disuntik LPS

Drop out:

- Mencit mati selama perlakuan berlangsung
- Mencit tidak sepsis setelah disuntik LPS

### **4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Waktu penelitian : 20 hari

Tempat pemeliharaan : Laboratorium Biokimia Universitas Diponegoro

Tempat penelitian : Laboratorium Cebior FK Universitas Diponegoro  
Laboratorium Ilmu pangan dan gizi Unika Soegijapranata

### **4.4. Variabel penelitian**

#### **4.4.1. Variabel bebas**

Sebagai variabel bebas adalah pemberian dosis bertingkat vitamin C

#### **4.4.2. Variabel tergantung**

Sebagai variabel tergantung adalah:

- Fagositosis makrofag
- Kadar vitamin C intraperitoneal

#### **4.4.3. Definisi Operasional**

1. Vitamin C yang digunakan adalah asam askorbat dosis 0,52 mg/hari, 1,04 mg/hari dan 2,6 mg, yang diberikan intravena melalui ekor tikus yang dikompres air hangat 1 menit agar terjadi vasodilatasi.
2. Aktifitas fagositosis makrofag adalah kemampuan makrofag dalam memfagosit partikel *latex* dihitung dari 200 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya, dengan 3x penghitungan jumlah makrofag yang memfagosit partikel *latex*, dan hasilnya dirata-rata.
3. Kadar vitamin C intraperitoneal adalah diukur dengan menggunakan alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC Shimadzu).

#### **4.5. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.5.1. Bahan untuk perlakuan**

Hewan coba adalah mencit strain Balb/C dengan umur 8-10 minggu dan berat 20-40 gram. Vitamin C yang digunakan adalah ekstrak asam askorbat 100mg/ml yang telah diencerkan dengan aquadest menjadi 4mg/ml.

Dosis yang diberikan disetarakan dengan dosis pada manusia dengan berat badan 70 kg dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu  $0,0026^{23}$ . Jadi dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok:

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

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

$$1000 \text{ mg/hari} \rightarrow 1000 \text{ mg} \times 0,0026 = 2,6 \text{ mg/hari}$$

Dosis pengenceran vitamin C: 1ml asam askorbat (100mg/ml), diencerkan dengan aquadest sebanyak 25ml menjadi 4mg/ml.

$$P1 : 0,52 \text{ mg} / 4 = 0,13 \text{ ml}$$

$$P2 : 1,04 \text{ mg} / 4 = 0,26 \text{ ml}$$

$$P3 : 2,6 \text{ mg} / 4 = 0,65 \text{ ml}$$

#### **4.5.2. Bahan untuk penyuntikan LPS intraperitoneal**

1. Alkohol 70%
2. LPS E.Coli IU/KgBB

#### **4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan Fagositosis Makrofag**

1. *Chloform*
2. Alkohol 70%
3. Asam asetat 3 % + *crystal violet* 1 mg/100 ml
4. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 yang mengandung L-glutamin ( 1mM), Fetal Bovine Serum (FBS) 5% dan antibiotik Penicillin 50 unit dan Streptomisin 50 $\mu$ g/ml
5. *Foetal Bovine Serum (FBS)*
6. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*

7. Metanol, pewarna giemsa, *Tripican Blue*

8. Aquadest steril

#### **4.5.4. Alat/instrumen penelitian**

1. Gunting dan pinset
2. Lampu bunsen
3. Cawan petri
4. Gunting bengkok, dan lurus
5. ELISA reader
6. Laminar flow
7. Inkubator buatan Schwabach
8. *Colony counter*
9. Mikroskop
10. Spuit 1cc , 10 cc
11. *Needle*
12. Tabung sentrifus 15 cc dan 50 ml
13. Pipet pasteur steril
14. Timbangan elektronik
15. Kandang hewan coba
16. Alat sentrifugasi yang dilengkapi pengatur suhu
17. Termometer
18. Tabung reaksi
19. Kaca benda
20. *Autoclav*

21. Cover slip bulat

22. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC Shimadzu)

#### 4.6. Pelaksanaan Penelitian

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit Balb/C diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan.

Dua puluh empat ekor mencit tersebut kemudian disuntik LPS intraperitoneal, diamati selama 1 hari. Setelah mencit menjadi sepsis, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum*. Perlakuan yang diberikan kepada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

K : Kelompok kontrol, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal

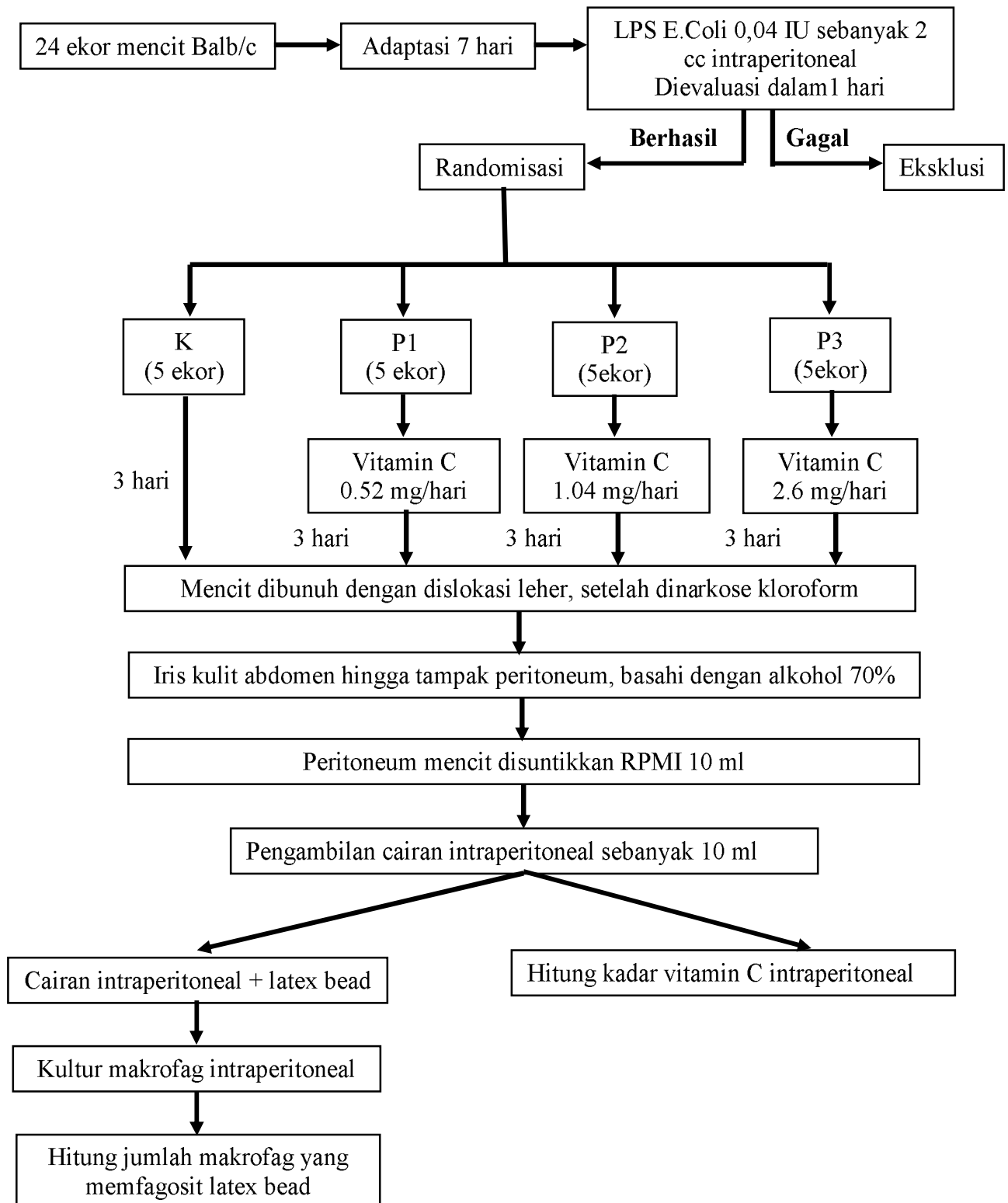
P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 0.52 mg intravena/hari

P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 1.04 mg intravena/hari

P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal, mendapat vitamin C 2.6 mg intravena/hari

Mencit dianastesi dengan *chloroform* selanjutnya mencit dibunuh dengan diskolasi vertebra cervical, kemudian disuntikkan cairan RPMI, setelah itu dipungsi cairan intraperitonealnya.

#### 4.7. Alur Kerja



Gambar 8. Alur Kerja



## **4.8. Prosedur Pemeriksaan**

### **4.8.1. Prosedur penyuntikan LPS**

Mencit diletakkan terlentang pada alas fiksasi, kemudian disuntikan LPS E.Coli 0,04 IU sebanyak 2 cc intraperitoneal dengan menggunakan spuit 1cc. Mencit yang sepsis terdapat tanda-tanda *piloerection*, *periocular discharge*, tampak lesu/tidak aktif bergerak, penurunan nafsu makan dan minum, demam dan diare.

### **4.8.2. Prosedur penyuntikan vitamin C**

Mencit dimasukkan dalam wadah, ekornya ditarik lalu dikompres air hangat, kemudian disuntik vitamin intravena lewat ekornya dengan menggunakan *needle*.

### **4.8.3. Prosedur pengambilan sampel makrofag intraperitoneal dari hewan coba**

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 ke arah 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.
5. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus pada 400xg, 4°C 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, 4°C selama 10 menit
8. Buang supernatan, bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah, kemudian disentrifus pada 400xg, 4°C selama 10 menit
9. Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS
10. Resuspensikan dengan medium komplit
11. Jumlah sel yang didapat, dihitung dengan menggunakan bilik hitung Neubauer setelah diwarnai dengan Tripian Blue sehingga didapatkan suspense sel dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  ml.
12. Untuk pemeriksaan fagositosis dengan latex beads, diambil 200 µL untuk tiap sumuran ( microplate 24 well).

#### 4.8.4. Prosedur pemeriksaan fagositosis makrofag dengan latex beads

1. Suspensi makrofag yang telah dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel), inkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit.
2. Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2x, kemudian tambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran, inkubasikan sampai 24 jam.
4. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2x dengan RPMI.
5. Latex beads diresuspensikan sehingga mendapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml.
6. Tambahkan suspensi latex 200  $\mu$ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37<sup>0</sup>, CO<sub>2</sub>.
7. Cuci 3x dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tak difagosit.
8. Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan metanol absolut, setelah kering *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.
9. Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
10. Setelah kering, dimounting pada object glass.
11. Hitung jumlah partikel latex yang difagositosis dalam 200 makrofag, diperiksa dengan mikroskop cahaya, dengan replikasi penghitungan 3x.

#### **4.9. Cara pengumpulan data**

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil pemeriksaan aktifitas fagositosis makrofag yang dinyatakan dengan jumlah makrofag yang memfagosit partikel latex dalam 200 makrofag yang diperiksa dengan mikroskop cahaya. Untuk perhitungan kadar vitamin C intraperitoneal digunakan cairan intraperitoneal dan diukur dengan alat HPLC.

#### **4.10. Analisis data**

Pertama dilakukan analisis deskriptif dengan menghitung ukuran kecenderungan sentral (mean dan median) serta sebaran data (SD), kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Penelitian ini distribusi data normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji *Anova* dilanjutkan perbedaan masing-masing ke 4 kelompok perlakuan dengan *Post Hoc Test Bonferroni*. Uji korelasi antara kadar vitamin C intraperitoneal dan tingkat aktifitas fagositosis makrofag dengan menggunakan uji korelasi *Spearman*. Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $p < 0,05$ .<sup>24</sup> Analisa data dilakukan dengan program komputer.

#### **4.11. Pengkajian etik**

Binatang coba yang kami gunakan adalah tikus Balb/C sebanyak 24 ekor. Tikus dipelihara di laboratorium Biokimia FK UNDIP, dimana yang kami perhatikan adalah kandang dibersihkan tiap hari dan tikus diberi ransum pakan standard yang dilakukan secara ad libitum. Tikus terlebih dahulu diadaptasi selama 7 hari sebelum diberikan perlakuan. Tujuh hari setelah dilakukan perlakuan, tikus dibunuh dengan cara dislokasi vertebra cervical.