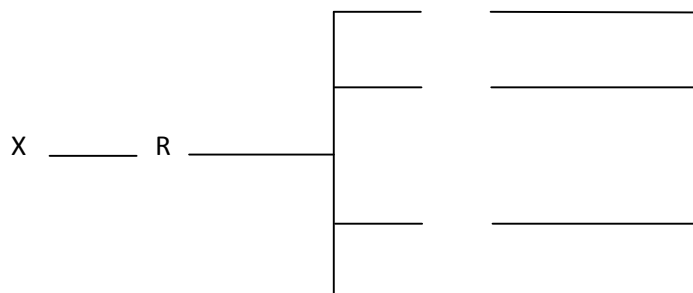


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba mencit Balb/c sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap yaitu rancangan dengan beberapa perlakuan yang disusub secara random untuk seluruh unit percobaan. Perlakuan adalah pemberian ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dengan keluaran adalah perubahan peningkatan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.



7 Hari	1 Hari	13 Hari	
Adaptasi	Randomisasi	Mulai Perlakuan	Evaluasi Penelitian

Gambar 5. Bagan Rancangan Eksperimen

Keterangan :

- X →R : Masa adaptasi 1 minggu
- R : Randomisasi
- K : Kontrol , sebagai pembanding mencit hanya mendapat pakan standar dan disonde dengan air selama 13 hari dan infeksi dengan *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P1 : Mencit diberi ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dosis 0,32mg/mencit per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P2 : Mencit diberi ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dosis 1,6mg/mencit per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P3 : Mencit diberi ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dosis 8mg/mencit per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1.
- O2 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2.
- O3 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

3. 2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dilakukan di Laboratorium Ilmu Obat Alam Universitas Diponegoro. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Diponegoro. Kultur makrofag untuk fagositosis makrofag dan pemeriksaan NO makrofag dilakukan di Laboratorium Cebior Universitas Diponegoro. Pembacaan jumlah sel makrofag dilakukan di Universitas Gadjah Mada.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain Balb/c berusia 8-10 minggu dengan berat 20-30gr. Strain yang dipilih adalah Balb/c sebab strain ini pada umur 6-12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas selluler apabila mencit diinokulasi dengan *Salmonella typhimurrium* hidup. Mencit strain Balb/c juga *susceptible* terhadap infeksi *Salmonella typhimurrium*.

3.3.2 Sampel

3.3.2.1 Jumlah sampel

Jumlah sampel yang digunakan ditentukan besarnya dengan rumus Federer yaitu: $(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana t = perlakuan dan r = jumlah ulangan. Dalam penelitian ini jumlah ulangan adalah 4, sehingga sampel perkelompok perlakuan harus lebih dari 5. Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang

dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorik sebanyak 24 ekor mencit.

3.3.2.2 Kriteria Inklusi

- Jenis kelamin jantan
- Mencit dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal
- Umur 8-10 minggu
- Berat badan 20-30 gr

3.3.2.3 Eksklusi

- Gerakan mencit tidak aktif
- Bobot tikus menurun
- Tikus mati dalam masa penelitian

3.3.2.4. Cara Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari mencit yang secara genetik sifatnya sama, maka pengambilan sampel secara random atau tidak, bukan merupakan masalah. Untuk menghindari bias karena faktor umur dan berat badan maka pengelompokkan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan mencit sebelum dan sesudah perlakuan.

Mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan. Mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum* selama dalam pemeliharaan. Mencit yang telah menjalani masa adaptasi, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, masing-masing 6 ekor yaitu kelompok K, P1, P2, P3.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dengan dosis bervariasi .

3.4.2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah:

1. Kemampuan fagositosis makrofag
2. Produksi NO makrofag

3.5. Definisi Operasional Variabel

- a) Pemberian ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) adalah pemberian ekstrak dosis 0,32mg/mencit, 1,6mg/mencit, 8mg/menci secara oral.
- b) Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase sel yang memfagositosis partikel latex yang dihitung sebagai indeks fagositosis dengan skala rasio.
- c) Produksi nitrit oksida (NO) adalah konsentrasi NO diukur dengan reagen Griess dengan satuan μM dengan skala rasio.

3.6 Alat, Bahan dan Reagen Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: mikroskop, spuit disposable 1 cc, 10 cc, timbangan elektrik, objek glass, tabung reaksi, kandang hewan coba, yellow dan blu tip, incubator CO₂ 5%, seperangkat alat-alat bedah steril, laminar air flow, Elisa reader, pipet Pasteur, pipet

Eppendorf, bilik hitung Neubauer improve, sentrifugasi sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu, micro plate 24 well, 96 well dasar rata, thermanox plastic coverslip diameter 13 mm, falcon blue max 15 ml polypropylene conical tube.

3.6.2 Bahan dan Reagen Penelitian

1. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) yang diperoleh dari Gedung Songo Ungaran-Semarang. Umur umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) yang digunakan adalah 6 bulan-1 tahun.
2. *Salmonella typhimurium* diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Tlogosari Semarang.
3. *Peritoneal Exudate Cell* (PEC) mencit jantan strain Balb/c berumur 6-12 minggu, sehat, aktivitas dan tingkah laku normal, diperoleh dari Laboratorium Muhammadiyah Jogjakarta.
4. Larutan *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) komplet, Bovine Serum (FBS) 10 %, alcohol 70 %, penicillin, asam asetat 3 %, Latex beads, methanol absolute, Giemsa 20%, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), Reagen Griess (reagen chromogenic), Canada Balsam, aquadest steril, media *Salmonella-Shigella* (SS), media *Brain Heart Infusion* (BHI).

3.7 Prosedur Pembuatan Ekstrak

3.7.1 Determinasi umbi bidara upas

Determinasi dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh kepastian bahwa tanaman yang digunakan berasal dari tanaman yang dimaksud, sehingga kemungkinan timbulnya kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian dapat dihindari. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Universitas Diponegoro Semarang.

3.7.2 Pengeringan dan Penyiapan Sampel

Umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) diambil lalu dikupas kulitnya kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) yang benar-benar telah bersih dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan dan dijemur di bawah matahari secara tidak langsung atau dengan ditutup menggunakan kain hitam hingga kering agar kandungan aktif di dalamnya tidak rusak. Simplisia yang telah kering ini dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak.

Ekstrak bahan aktif dari umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) diperoleh dengan cara ekstraksi secara meserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia yang telah diayak dalam etanol selama tiga hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke

dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. Filtrat etanol tadi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga didapatkan krut senyawa umbi bidara upas (*Merremia mammosa*).

3.8 Prosedur Perhitungan Dosis

Dosis ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) yang akan diberikan kepada *Salmonella typhimurium* sebagai imunomodulator didasarkan pada dosis penggunaan umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) sebagai antibakteri di masyarakat. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dimasyarakat yang digunakan untuk mengobati antibakteri pada tifus adalah 10-100gr dalam bentuk serbuk. Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 100gr kemudian dihitung dan dikonversikan dengan mencit sehingga diperoleh hasil di bawah ini.

$$70/50 \times 100 \times 0,0026 = 400 \text{ mg/mencit (dosis lazim)}$$

Dosis serbuk 400gr ini diolah dengan proses ekstraksi meserasi sehingga diperoleh ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) dengan berat 1,6mg (dosis lazim) atau dosis P2. Penelitian ini menggunakan 3 peringkat dosis. Dosis 1, 0,32 merupakan 1/5 dari dosis lazim, dosis 3 merupakan 5 kali besar dosis lazim. Pemelihan rentang dosis ini didasarkan pada hasil pre-penelitian. Rentang dosis 10 kali dosis lazim menyebabkan kematian pada hari pertama, sehingga diturunkan menjadi 5 kali. Rentang dosis yang terlalu rendah yaitu 3 kali dosis lazim, ditakutkan tidak memberikan efek yang signifikan terhadap tiap pada perlakuan. Pertimbangan penentuan dosis ini didasarkan pada kurva *dose relationship*.

3.9. Prosedur Pengenceran Bakteri

Strain murni *Salmonella typhimurium* diletakkan di media Salmonella-Shigella (SS) kemudian dipindahkan ke media penyubur menggunakan salenit cair kemudian dipindahkan kembali ke media isolasi sehingga didapatkan koloni *Salmonella typhimurium* dan dilakukan uji biokimia, pembacaan tabel, tes serologi, antigen spesifik yang kesemuanya dilakukan untuk mengidentifikasi bahwa kuman yang dikulturkan benar *S.typhimurium*. Digunakan HIB untuk menumbuhkan bakteri dan diencerkan 10^5 menggunakan NaCl fisiologis

3.10. Prosedur Pemeriksaan Kemampuan Fagositosis dan Produksi Makrofag

3.10.1. Prosedur Isolasi Makrofag Mencit

Mencit dibunuh dengan cara dislokasi servik. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70% (v/v) dan disuntikkan ± 10 ml RPMI dingin ke rongga peritoneum. Kemudian didiamkan selama ± 3 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan (agar makrofag yang menempel di rongga peritoneum dan di sekitar usus dapat terlepas dan tersuspensi dalam medium RPMI). Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan dilakukan penekanan organ dalam dengan 2 jari, kemudian cairan diaspirasi dengan tabung injeksi. Aspirat dipusingkan pada 1.200 rpm, 40°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan kemudian ditambahkan 3 ml "medium RPMI komplet" (mengandung FBS 10% v/v). Jumlah sel dihitung dengan hemositometer, kemudian diresuspensikan dengan medium komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6/\text{ml}$. Suspensi sel yang telah dihitung ditumbuhkan dalam *plate* 24 sumuran yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran berisi 200 l (5×10^5 sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO_2 5%, 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplet 1 ml / sumuran dan inkubasi dilanjutkan selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2x kemudian ditambahkan medium komplet 1 ml / sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

3.10.2. Fagositosis makrofag dengan *latex beads*

Pemeriksaan Fagositosis Makrofag dengan *Latex Beads*

- a) Suspensi makrofag yang telah dikultur pada *microplate* 24 *wells* yang telah diberi *coverslips*, setiap sumuran $200 \mu\text{l}$ (5×10^5), diinkubasi dalam CO_2 5% 37°C selama 30 menit.
- b) Tambahkan medium komplet 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) Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit.
- f) Keringkan pada suhu ruangan, fiksasi dengan methanol absolut.
- g) Setelah kering, *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.
- h) Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
- i) Setelah kering di-*mounting* pada kaca objek.
- j) 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.

3.10.3. Prosedur Pemeriksaan Produksi NO

Produksi nitrit oksida dihitung menggunakan 96 sumuran microplate ELISA dengan dasar rata. Caranya adalah sebagai berikut:

- a) Memasukkan 100 μ l reagen Griess (reagen *chromogenic*) dalam tiap sumuran.
- b) Memasukkan 100 μ l supernatan kultur makrofag peritoneal yang akan diuji dan nitrit standar ke dalam sumuran (duplo) dengan 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 standar menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan nitrit standar, kemudian menghitung konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi

Cara membuat reagen *chromogenic* dan nitrit standar adalah sebagai berikut:

- a) Reagen 1: *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0,1g dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b) Reagen 2: Sulfanilamide : 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 reagen* : campurkan dengan volume yang sama, banyak reagen 1 dan reagen 2 setiap akan digunakan harus sama dan dapat digunakan dalam 1 jam setelah disiapkan.

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

3.11. Analisis Data

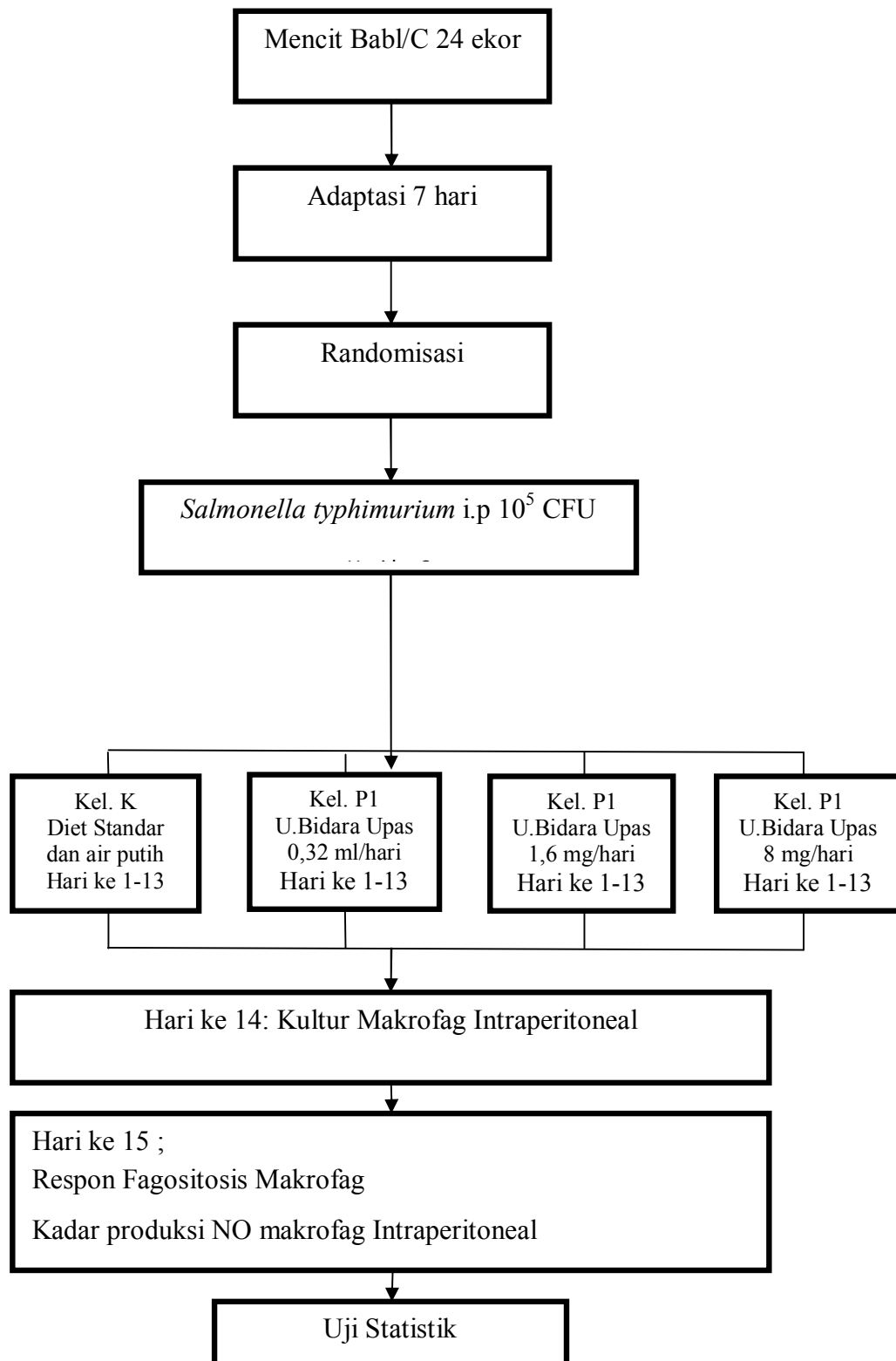
Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dahulu di-*edit*, di-*coding*, di-*entery* dalam file computer dan di-*cleaning*, setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif.

Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (mean dan median) dan sebaran (SD) dari variabel tergantung (kemampuan fagositosis makrofag dan kadar NO). Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel silang. Dibuat grafik box-plot menurut kelompok perlakuan. Untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji Shapiro-Willk.

Data kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositosis, dianalisis menggunakan *One-way* ANOVA jika data terdistribusi normal. Apabila data tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji non

parametrik Kruskal-Wallis kemudian diteruskan dengan uji Mann Whitney. Nilai signifikan dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki $P < 0,05$.

3.12 Alur Kerja Penelitian



3.13. Persyaratan Etik

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya.