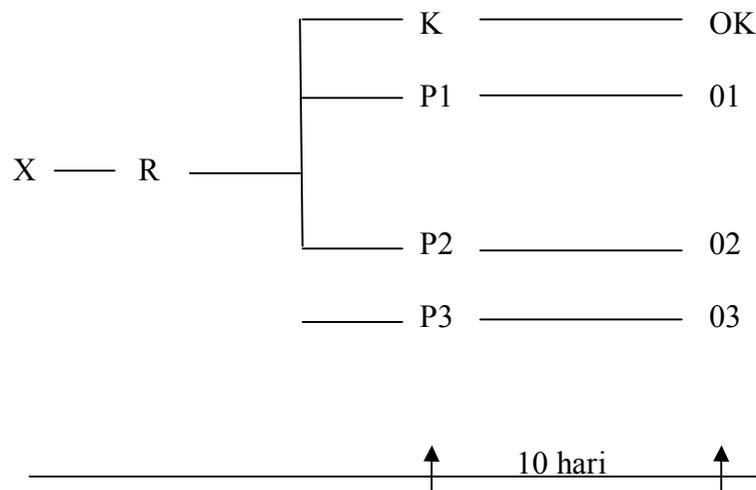


## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *the post test-only control group design* yang menggunakan mencit jantan strain BALB / C sebagai obyek penelitian. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian berbagai dosis ekstrak daun salam dengan keluaran berupa kemampuan fagositosis makrofag dengan menghitung jumlah partikel *latex beads* yang difagosit oleh makrofag (indeks fagositosis) dan *produksi nitric oxid (NO)* makrofag.



Keterangan :

X — R : Masa adaptasi 1 minggu

R : Randomisasi

- K : Kontrol, Mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke 1 dan sebagai pembanding mencit hanya mendapat pakan standar selama 9 hari
- P1 : Mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke 1 dan diberi ekstrak daun salam pada hari ke 6 dengan dosis 0,24 mg per oral setiap hari
- P2 : Mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke 1 dan diberi ekstrak daun salam pada hari ke 6 dengan dosis 2,4 mg per oral setiap hari
- P3 : Mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke 1 dan diberi ekstrak daun salam pada hari ke 6 dengan dosis 24 mg per oral setiap hari
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- 01 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1
- 02 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2
- 03 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan mencit dilakukan di laboratorim Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, pemeriksaan laboratorium dikerjakan di *Centre for Biomedical Research ( CEBIOR )* pada bulan Oktober - November 2011

### 3.3. Populasi dan Sampel

#### 3.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan *strain* BALB / c berusia 8-10 minggu dengan berat 20-30 gram.

#### 3.3.2. Sampel

Mengacu pada WHO, pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit perkelompok sehingga jumlah yang dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorium sebanyak 24 ekor mencit.

##### 3.3.2.1. Kriteria Inklusi

- Jenis kelamin jantan
- Gerakan mencit aktif
- Umur 8 -10 minggu
- Berat badan 20-30 gram

##### 3.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- Gerakan mencit tidak aktif

##### 3.3.2.3. Cara Pengambilan Sampel

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

Mencit sebanyak 24 ekor diadaptasi selama 1 minggu, dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*, setelah

menjalani masa adaptasi kemudian mencit 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 daun salam dengan berbagai dosis

#### 3.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

- a. Kemampuan fagositosis makrofag
- b. Kadar NO makrofag

### 3.5. Definisi Operasional Variabel

- a. Pemberian ekstrak daun salam berbagai dosis (0,24; 2,4; 24 mg/hari) adalah pemberian ekstrak daun salam peroral. Skala ordinal
- b. Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase makrofag yang memfagosit dan dinyatakan sebagai indeks fagositosis makrofag. Skala rasio
- c. Produksi *Nitric Oxide* (NO) adalah konsentrasi NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag yang diukur dengan metode *Griess* dengan satuan  $\mu\text{mol}$ . Skala rasio

### 3.6. Alat, Bahan dan Reagen Penelitian

#### 3.6.1. Alat / Instrument Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Mikroskop
2. Timbangan elektrik
3. Tabung reaksi
4. Inkubator
5. Sentrifuge
6. Elisa *reader*
7. Seperangkat alat-alat bedah steril
8. Kandang hewan coba
9. *Micro plate 24 well, 96 well* dasar rata
10. Bilik hitung
11. Dekglass dan cover slip
12. Mikropipet

#### 3.6.2. Bahan dan Reagen Penelitian

- a. Daun salam yang diperoleh didaerah Pedurungan, Semarang dan diambil 3 lembar setelah pucuk.
- b. *Salmonella typhimurium* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- c. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah : *peritoneal exudate cell (PEC)* mencit jantan strain BALB/c berumur 8-10 minggu,

sehat, aktivitas dan tingkah laku normal. Bahan perlakuan adalah ekstrak daun salam yang diberikan peroral selama 4 hari.

- d. Reagen yang dibutuhkan adalah: larutan *Roswell Park Memorial Institute (RPMI) komplet*, *bovine serum (FBS) 10 %*, *alkohol 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 infution (BHI)*

- e. Reagen *chromogenic*

1. *N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED)* 0,1 gram dilarutkan dalam 100 ml air suling

2. *Sulfanilic Acid* : 1 gram dilarutkan dalam 100 ml 5% phosphoric acid

Reagen 1 dan 2 harus disimpan dalam lemari pendingin dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tidak berubah warna menjadi gelap. Chromogenic reagen : campurkan reagen 1 dan 2 dengan perbandingan yang sama dan dilakukan 1 jam sebelum digunakan.

- f. Standar Nitrit

Larutkan 69 mg  $\text{NaNO}_2$  dalam 500 ml air suling ( larutan stock ) melakukan pengenceran dari larutan stock menggunakan medium yang dipakai untuk mengkultur makrofag

### 3.6.3. Prosedur Pembuatan Ekstrak

#### 3.6.3.1. Pengeringan dan persiapan sampel

Daun salam dipetik 3 lembar setelah pucuk, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung atau ditutup dengan kain hitam hingga kering. Simplisia yang telah kering ini dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan nomer ayakan 30 M.<sup>6</sup>

#### 3.6.3.2. Pembuatan ekstrak daun daun salam

Ekstrak dibuat dengan cara digesti (maserasi kinetik ( dengan pengadukan kontinu) pada temperature 40 – 50 ° C ). Satu bagian serbuk kering daun salam dimasukkan ke dalam alat digesti menggunakan 10 bagian air selama 1 jam dihitung sejak suhu mencapai 40 ° C, kemudian disaring. Ampas disaring kembali selama 30 menit dengan 5 bagian air sebanyak dua kali. Ekstrak dikeringkan dan diuapkan dengan menggunakan penangas air. Rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat. Pemerian (bentuk : kental, warna : hijau kehitaman, Bau : khas dan rasa agak pahit dan kelat).<sup>6</sup>

#### 3.6.3. Perhitungan dalam penentuan dosis

Masyarakat menggunakan daun salam untuk mengobati tifus adalah sebanyak 15 lembar , setelah ditimbang  $\pm$  11,805 gram, simplisia kering diperoleh ekstrak 0,668 gram setara dengan 5,66 %. Dosis dikonversi dari manusia ke mencit dengan faktor konversi 0,0026 dan berat manusia

dewasa internasional ( 70 Kg ). Dosis sekali minum manusia dewasa Indonesia ( 50 Kg )<sup>8</sup>

Dosis sekali minum manusia dewasa :

$$70/50 \times 11,805 = 16,53 \text{ gram} \times 0,0566 = 0,935 \text{ gram}$$

Dosis sekali minum mencit berat badan 20 gram

$$= 0,935 \text{ gram} \times 0,0026 = 0,0024 \text{ gram} / \text{mencit} = 2,4 \text{ mg} / \text{mencit}$$

#### 3.6.4. Pengenceran dosis ekstrak daun salam

Dosis III = 24 mg, menimbang sebanyak 2400 mg ekstrak daun salam diencerkan dengan aquadest sampai menjadi 50 ml. Dosis II = 2,4 mg, menimbang sebanyak = 240 mg ekstrak daun salam diencerkan dengan aquadest sampai menjadi 50 ml. Dosis I = 0,24 mg, menimbang sebanyak = 24 mg ekstrak daun salam diencerkan dengan aquadest sampai menjadi 50 ml. Volume pemberian ekstrak daun salam sebanyak 0,5 ml / mencit selama 4 hari.

### 3.7. Prosedur pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan kadar NO

#### 3.7.1. Prosedur isolasi makrofag mencit

Mencit dibunuh dengan cara melakukan dislokasi pada tulang leher. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70% (v/v) dan disuntikkan  $\pm$  10 ml RPMI dingin ke rongga peritoneum. Kemudian didiamkan selama  $\pm$  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 spuit (dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus). Aspirat dipusingkan pada 1.200 rpm, 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  $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung ditumbuhkan dalam *plate* 24 sumuran yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran berisi 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 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.

### 3.7.2. Fagositosis makrofag dengan *latex beads*

Kemampuan fagositosis non spesifik dilakukan *in vitro* menurut Leijh dkk. (1986) dengan menggunakan *latex beads*

- a. Suspensi makrofag yang telah dikultur pada *microplate 24 wells* yang telah diberi *coverslips*, setiap sumuran 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$ ), diinkubasi dalam CO<sub>2</sub> 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 mendapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7/\text{ml}$
- e. Tambahkan suspensi latex  $200 \mu\text{l}/\text{sumuran}$ , inkubasi selama 60 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$ .
- f. Cuci 3 x dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tak difagosit,
- g. Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan metanol 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 objek glass
- k. Seratus sel makrofag diamati dan dihitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag.
- l. Pengamatan makrofag dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

### 3.7.3. Prosedur pemeriksaan produksi NO dalam supernatan kultur makrofag

Untuk memeriksa produksi nitrit digunakan 96 sumuran *microplate* ELISA dengan dasar rata. Caranya adalah sebagai berikut:

- Masukkan  $100\mu\text{l}$  reagen Griess (reagen chromogenic) dalam setiap sumuran

- Pipet 100  $\mu$ l supernatan yang akan dites atau standar  $\text{NaNO}_2$  ke dalam plate dengan triplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko
- Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilitas
- Ukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader*
- Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linear sederhana/simple dari pembacaan standar  $\text{NaNO}_2$ . Hitung konsentrasi Nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi

### 3.8. 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 secara deskriptif dan analitik. Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (*mean dan median*) dan sebaran (SD) dari kemampuan fagositosis makrofag dan kadar NO makrofag. Hasilnya disajikan dalam bentuk *table* dan atau grafik. Kenormalan data kemampuan fagositosis makrofag dan kadar NO menggunakan uji Shapiro Wilk. Data kemampuan fagositosis makrofag tidak terdistribusi normal sehingga uji yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis, kemudian dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Data kadar NO terdistribusi normal sehingga uji yang digunakan adalah uji Oneway Anova, kemudian dilanjutkan dengan uji Tamhane. Nilai signifikan dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki  $p < 0,05$ . Analisis statistik menggunakan program SPSS.

Uji normalitas pada kemampuan fagositosis makrofag didapatkan nilai  $p$  masing-masing kelompok  $\leq 0,05$  jadi kemampuan fagositosis makrofag terdistribusi tidak normal sehingga uji yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis dan didapatkan hasil  $p = 0,001$ . Uji normalitas pada kadar NO didapatkan nilai  $p$  masing-masing kelompok  $> 0,05$  dan analisis uji homogenitas varians diperoleh hasil  $p = 0,031$ , sehingga uji yang digunakan adalah Oneway Anova dan didapatkan hasil  $p = 0,000$

### 3.9. Etik Penelitian

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

*Ethical Clearance* diajukan melalui Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK), Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang untuk memperoleh ijin menggunakan hewan coba sebelum penelitian dimulai, kemudian didapat *Ethical clearance* dengan No 146 / EC / FK / RSDK / 2001 telah setuju dilaksanakan penelitian.

- a. Jumlah makrofag/ml cairan peritoneum adalah jumlah makrofag dibagi dengan total cairan peritonium dan menggunakan skala ordinal