

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

##### **3.1.1 Ruang lingkup keilmuan**

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah bidang Ilmu Obat Tradisional, Biologi Molekular dan Penyakit Infeksi-Tropis.

##### **3.1.2 Ruang lingkup tempat**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69, Jakarta.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai dengan Mei 2016 di Laboratorium Dengue Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69, Jakarta.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vitro.

### **3.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi**

##### **3.4.1.1 Populasi Target**

Populasi target penelitian ini adalah DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-

4.

##### **1.4.1.2 Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau penelitian ini adalah DENV-1

#### **3.4.2 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah virus koleksi Laboratorium Dengue Lembaga Biologi Molekuler Eijkman (D1-JMB-034).

#### **3.4.3 Besar Sampel**

Pada penelitian ini pengulangan perlakuan akan dilakukan tiga kali sesuai penelitian sebelumnya.<sup>20</sup>

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi curcumin.

### 3.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah viabilitas sel dan titer virus.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 1. Definisi Operasional**

Variabel	Definisi operasional	Skala
Konsentrasi curcumin	Curcumin merupakan senyawa bis- $\alpha, \beta$ ,unsaturated $\beta$ -diketone (1,7-bis (4'hidroksi - 3 methoxyphenyl)-1,6 heptadien, 3,5-dione) yang banyak terkandung pada <i>Curcuma longa</i> . Konsentrasi diukur dalam $\mu$ M.  Curcumin pada penelitian ini diperoleh dari Sigma-Aldrich (Seelze, Germany).	Nominal 4 Kelompok
Viabilitas sel	Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan total sel yang ada. Viabilitas sel dinyatakan dalam %.  Viabilitas sel diukur dengan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.	Rasio
Titer virus	Titer virus merupakan jumlah partikel infeksius virus. Titer virus dapat dinyatakan dalam <i>plaque forming unit</i> / ml (pfu/ml). <i>Plaque forming unit</i> diukur dengan plaque assay.	Rasio

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

1. *Biological Safety Cabinet Class II (BSC II)* [ESCO]
2. 37<sup>0</sup> C waterbath [Memmert]

3. inkubator 28<sup>0</sup>C [Mettler]
4. inkubator CO<sub>2</sub> suhu 37<sup>0</sup> C [Sanyo]
5. *motorized pipettor* [Bio-Rad]
6. pipet serologis steril (5 ml, 10 ml, 25ml) [Corning]
7. tabung sentrifuge (15 ml, 50ml) [Corning]
8. rak tabung [Nalgene]
9. mesin sentrifugasi SORVALL<sup>®</sup> RT 6000D
10. tabung kriogenik [Nunc]
11. *flask* kultur (T-25, T-75) [Nunc, Falcon]
12. mikroskop fase kontras CKX31 [Olympus]
13. *repetitive pipet* (100--1000 l) [Gilson]
14. *Distritip Maxi* ST (12,5 ml) [Gilson]
15. *24 wells plate* [Nunc]
16. *vacuum pump* [Millipore]
17. oven 50<sup>0</sup> C [Amersham Biosciences]
18. tabung mikrosentrifuge 1,5 ml [Sorenson, Molecular BioProducts]
19. tips steril [Axygen Scientific]
20. *adjustable pipettor* (2--20 µl, 20--200 µl, dan 100--1000 µl) [Bio-Rad, Gilson],
21. mesin vorteks REAX control [Heidolph]
22. mesin sentrifugasi mini [Profuge 6K]
23. timer
24. *waste container*
25. rak tabung
26. kotak es

27. sarung tangan [Ansell]
28. parafilm [Whatman]
29. gunting
30. plastic wrap [Kinpak, Bagus]
31. *Improved Neubauer Hemacytometer* (Superior Marienfeld, Germany)

### 3.7.2 Bahan

1. DENV Serotipe 1 strain Indonesia
2. Curcumin [Sigma-Aldrich]
3. RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/l of L-glutamine, 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin [Gibco-Life Technologies].
4. Fetal Bovine Serum
5. trypsin-0.25% EDTA [Gibco-Life Technologies]
6. Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) tanpa CaCl<sub>2</sub> dan MgCl<sub>2</sub> [Gibco]
7. Dimetil sulfoksida (DMSO) [AppliChem]
8. 3,7% formalin [Applichem]
9. 1% crystal violet [Sigma]
10. 1 % methyl-cellulose-2% FBS
11. 70% etanol
12. 10% bleach

### 3.8 Cara Pengumpulan Data

#### 3.8.1 Kultur Sel A549

##### 3.8.1.1 Resusitasi Sel A549

1. Mengeluarkan satu vial sel stock beku A549 dari *liquid nitrogen tank* atau freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Meletakkannya ke dalam  $37^{\circ}\text{C}$  *water bath* dan secara perlahan memutarnya sampai cair secara sempurna.
3. Secara cepat, memindahkan sel ke tabung yang sudah berisi medium 10 ml RPMI 1640 dan mengendapkan sel dengan centrifuge  $500 \times g$  selama 3 menit pada suhu ruangan.
4. Membuang supernatant dan meresuspen sel di RPMI 1640 yang berisi 10% FBS and 1% Pen/Strep.
5. Memberi nutrisi sel selama di dalam *flask* dan menginkubasinya pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  selama 3-5 hari sampai sel konfluen.

##### 3.8.1.2 Subkultur Sel A549

1. Membuang medium dari *flask* dan menambahkan 1.5 ml dari 0.25% Trypsine-EDTA ke T75 *flask* (atau 0.5 ml ke T25 *flask*), menginkubasinya selama 2-3 menit atau sampai sel mudah lepas saat sisi dari *flask* dibenturkan.
2. Menambahkan medium baru dan membagi sel dengan rasio 1:3-4.
3. Menginkubasi sel pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.2 Persiapan DENV

#### 3.8.2.1 Propagasi virus

1. Subkultur galur sel Vero dengan split ratio 1:3 dengan 1xRPMI medium (+10%FBS dan 1% Pen/Strep). Menanam kira-kira  $2 \times 10^5$  cell pada T-25 *flask*. Menyiapkan sebuah *flask* untuk non-infection kontrol. Inkubasi pada 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> 5%.
2. Memeriksa keadaan sel di *flask* keesokan harinya. Kerapatan yang diperlukan adalah 80-100%.
3. Membuang medium dari *flask*, kemudian menambahkan 2 ml sampel serum (dilusi 1:10) dengan 1xRPMI medium (+10%FBS dan 1% Pen/Strep).
4. Menginkubasi *flask* pada 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> 5% selama 1 jam. Membuang inokulum dari *flask* dan kemudian menambahkan 3ml 1xRPMI -2% FBS. Menginkubasi pada 37<sup>0</sup>, CO<sub>2</sub> 5%.
5. Memeriksa setiap hari sampai ditemukan CPE (*Cytopathogenic Effect*) pada *flask*. Memanen virus dengan mengambil supernatan dari *flask*.
6. Memurnikan supernatan dengan cara memutar pada centrifuge pada 4000rpm selama 10 menit. Jika tidak ditemukan adanya CPE, virus dipanen pada hari ke sembilan, lalu menambahkan 3ml 1xRPMI -2% FBS medium dan menginkubasi kembali pada 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> 5% untuk memanen kedua kali pada hari ke 13 bila CPE tetap belum muncul.
7. Mengambil supernatan
8. Memberi label dan menyimpan pada -80<sup>0</sup> C sampai akan digunakan

### 3.8.2.2 Pengukuran Titer Awal Virus dengan Plaque Assay

1. Menumbuhkan sel BHK21 pada T-75 *flask* dan menginkubasinya pada suhu 37° C, 5% CO<sub>2</sub> sampai konfluen.
2. Me-tripsinisasi dan mendilusi sel pada medium lengkap (1X RPMI-10% FBS).
3. Menempatkan sel BHK21 di dalam 24-well *plate* dan menginkubasinya pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama semalam.
4. Memeriksa sel dan memastikan bahwa sel dalam kondisi sehat dan melapisi seluruh permukaan *well*.
5. Membuat dilusi serial 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-6</sup> kali dari sampel virus dalam medium 1X RPMI-2% FBS.
6. Membuang medium pada sel dengan hati-hati agar sel tidak kering.
7. Menambahkan 0.2 ml dilusi sampel virus ke masing-masing *well*
8. Menginkubasi *plate* pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam
9. Pada akhir dari inkubasi, dengan hati-hati mengambil virus dari *well* dengan menggunakan *vacuum pump* agar tidak mengganggu sel.
10. Menambahkan 0.5 ml medium 1 % *methyl-cellulose-2% FBS* yang telah dihangatkan sebelumnya menggunakan *repetitive pipet* dan *distritips* steril.
11. Menginkubasi *plate* pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 5 hari (4-7 hari)
12. Pada akhir inkubasi, memasukkan sel ke dalam tangki berisi 3.7% *formaldehyde* selama 1 jam atau sekurang-kurangnya 20 menit.
13. Mencuci *plate* dengan air yang mengalir dan menambahkan 1% *crystal violet* 0.2 ml ke masing-masing *well*.
14. Membuang pewarna setelah 5 menit pengecatan dan membilasnya dengan air mengalir.
15. Mengeringkan *plate* pada suhu 55° C dengan oven selama 30 menit.



16. Menghitung *plaque* (area yang tidak tercat) dalam *well*.
17. Berdasarkan Mahy dan Kangro (1996)<sup>45</sup>, titer virus dapat dihitung dengan persamaan :

$$\text{Titer virus (pfu/ml)} = \frac{\text{Jumlah plaque (pfu)}}{\text{Faktor dilusi} \times \text{Volume inokulum(ml)}}$$

### 3.8.3 Persiapan Curcumin

#### 3.8.3.1 Cell Toxicity Assay (MTT assay)

MTT assay merupakan metode yang akurat untuk mengukur viabilitas sel. Garam kuning 3-[4,5-di- methylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-**tetrazolium** bromide (MTT) akan direduksi oleh sel sel yang masih hidup yang menghasilkan enzim dehidrogenase pada saat mengubah NADH menjadi NADPH. Hasil reduksi ini akan menyebabkan pembentukan formazan pada intraseluler yang berwarna ungu dan dapat diukur dengan penggunaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm (550-600 nm)

Cara Kerja :

1. Membuat suspensi sel  $1 \times 10^6$  per mL.
2. Mendilusi sel dari  $1 \times 10^6$  menjadi  $1 \times 10^4$  sel per mL agar dapat menaruh sel pada *plate* dengan konsentrasi  $10^3$ - $10^5$  sel setiap *well*.
3. Mendistribusikan 100  $\mu$ L dilusi sel setiap *well*.
4. Mendistribusikan curcumin dengan konsentrasi 0, 10, 20, 40, 50, 100 dan 200  $\mu$ M pada masing masing *well*.
5. Menginkubasi sel selama 24 dan 48 jam.
6. Menambahkan 10  $\mu$ L MTT *reagent* ke setiap *well*.
7. Menginkubasi kembali selama 2 sampai 4 jam sampai warna ungu terlihat.

8. Menambahkan reagen detergent ketika presipitat ungu terlihat pada mikroskop.
9. Meletakkan *plate* yang telah ditutup pada tempat yang gelap selama 2 sampai 4 jam atau semalaman pada suhu ruang.
10. Melepaskan tutup *plate* dan mengukur absorbansi setiap *well* pada panjang gelombang 570 nm.
11. Menentukan nilai rata rata absorbansi.

#### **1.8.4 Uji aktivitas Antiviral Curcumin terhadap DENV**

Uji aktivitas Antiviral Curcumin dilakukan dengan dua metode :

##### **3.8.4.1 Metode *Full Time***

1. Menanam  $10^5$  sel A549 pada masing masing *well* dalam 96 *well plate*
2. Menginkubasi sel pada  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam
3. Menginfeksi sel dengan *Multiplicity of Infection* = 1 ( $10^5$  PFU) dan menambahkan curcumin dengan berbagai konsentrasi subtoksik
4. Menginkubasi sel pada  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  selama 48 jam
5. Mengambil supernatan untuk dilakukan *Plaque assay*

##### **3.8.4.2 Metode *After Entry***

1. Menanam  $10^5$  sel A549 pada masing masing *well* dalam 96 *well plate*
2. Menginkubasi sel pada  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam
3. Menginfeksi sel dengan *Multiplicity of Infection* = 1 ( $10^5$  PFU)
4. Menginkubasi sel pada  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  selama 1 jam
5. Membuang supernatan masing masing *well* dan menambahkan curcumin dengan berbagai konsentrasi subtoksik
6. Menginkubasi sel pada  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  selama 48 jam

7. Mengambil supernatan untuk dilakukan *Plaque assay*

### 3.8.5 Pengukuran Titer Virus Setelah Perlakuan dengan *Plaque Assay*

1. Menumbuhkan sel BHK21 pada T-75 *flask* dan menginkubasinya pada suhu 37° C, 5% CO<sub>2</sub> sampai konfluen.
2. Me-tripsinisasi dan mendilusi sel pada medium lengkap (1X RPMI-10% FBS).
3. Menempatkan sel BHK21 di dalam 24-*well plate* dan menginkubasinya pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama semalam.
4. Memeriksa sel dan memastikan bahwa sel dalam kondisi sehat dan melapisi seluruh permukaan *well*.
5. Mengambil supernatan hasil uji antiviral curcumin.
6. Membuat dilusi serial 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-6</sup> kali dari sampel virus dalam medium 1X RPMI-2% FBS.
7. Membuang medium pada sel dengan hati-hati agar sel tidak kering.
8. Menambahkan 0.2 ml dilusi sampel virus ke masing-masing *well*
9. Menginkubasi *plate* pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam
10. Pada akhir dari inkubasi, dengan hati-hati mengambil virus dari *well* dengan menggunakan *vacuum pump* agar tidak mengganggu sel.
11. Menambahkan 0.5 ml medium 1 % *methyl-cellulose*-2% FBS yang telah dihangatkan sebelumnya menggunakan *repetitive pipet* dan *distritips* steril.
12. Menginkubasi *plate* pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 5 hari (4-7 hari)
13. Pada akhir inkubasi, memasukkan sel ke dalam tangki berisi 3.7% *formaldehyde* selama 1 jam atau sekurang-kurangnya 20 menit.
14. Mencuci *plate* dengan air yang mengalir dan menambahkan 1% *crystal violet* 0.2 ml ke masing-masing *well*.

15. Membuang pewarna setelah 5 menit pengecatan dan membilasnya dengan air mengalir.
16. Mengeringkan *plate* pada suhu 55° C dengan oven selama 30 menit.
17. Menghitung *plaque* (area yang tidak tercatat) dalam *well*.
18. Berdasarkan Mahy dan Kangro (1996)<sup>45</sup>, titer virus dapat dihitung dengan persamaan :

$$\text{Titer virus (pfu/ml)} = \frac{\text{Jumlah plaque (pfu)}}{\text{Faktor dilusi} \times \text{Volume inokulum(ml)}}$$

### 3.8.6 Mengukur Viabilitas Sel dengan MTT assay

1. Membuat suspensi sel  $1 \times 10^6$  per mL.
2. Mendilusi sel dari  $1 \times 10^6$  menjadi  $1 \times 10^4$  sel per mL agar dapat menaruh sel pada *plate* dengan konsentrasi  $10^3$ - $10^5$  sel setiap *well*.
3. Mendistribusikan 100  $\mu\text{L}$  dilusi setiap *well*. Termasuk tiga medium kontrol.
4. Menginkubasi sel selama 6-48 jam.
5. Menambahkan 10  $\mu\text{L}$  MTT reagent ke setiap *well*.
6. Menginkubasi kembali selama 2 sampai 4 jam sampai warna ungu terlihat.
7. Menambahkan *detergent raegen* ketika presipitat ungu terlihat pada mikroskop, jangan dikocok.
8. Meletakkan *plate* yang telah ditutupi pada tempat yang gelap selama 2 sampai 4 jam atau semalaman pada suhu ruang.
9. Melepaskan tutup *plate* dan mengukur absorbansi setiap *well* pada panjang gelombang 570 nm.
10. Menentukan nilai rata rata absorbansi.

### 3.9 Alur Penelitian

Curcumin diperoleh dari Sigma-Aldrich dalam bentuk bubuk, sehingga untuk mendapatkan konsentrasi 10, 20, 40, 50, 100 dan 200  $\mu M$ , Curcumin didilusi dengan pelarut *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

Curcumin memiliki berat Molekul 368,38. Untuk menentukan banyak atau berat curcumin yang diperlukan dalam pembuatan dilusi, digunakan rumus  $M = \frac{gr \times 1000}{Mr \times volume(ml)}$  yang mana M merupakan Molaritas yang dituju, gr adalah berat/banyaknya curcumin yang dibutuhkan untuk tiap Molar, Mr merupakan berat molekul curcumin dan volume adalah volume dilusi yang ditentukan.

Curcumin, yang telah ditentukan konsentrasinya, kemudian diinkubasikan ke dalam kultur sel A549 pada 96 *well plate* selama 24 dan 48 jam. Setelah 24 dan 48 jam, MTT assay dilakukan pada setiap well plate dan diukur absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm.

Viabilitas sel kemudian dihitung dengan membandingkan antara rata-rata absorbansi masing-masing sampel yang dikurangi rata-rata absorbansi blank dengan rata-rata absorbansi medium yang dikurangi rata-rata absorbansi blank.

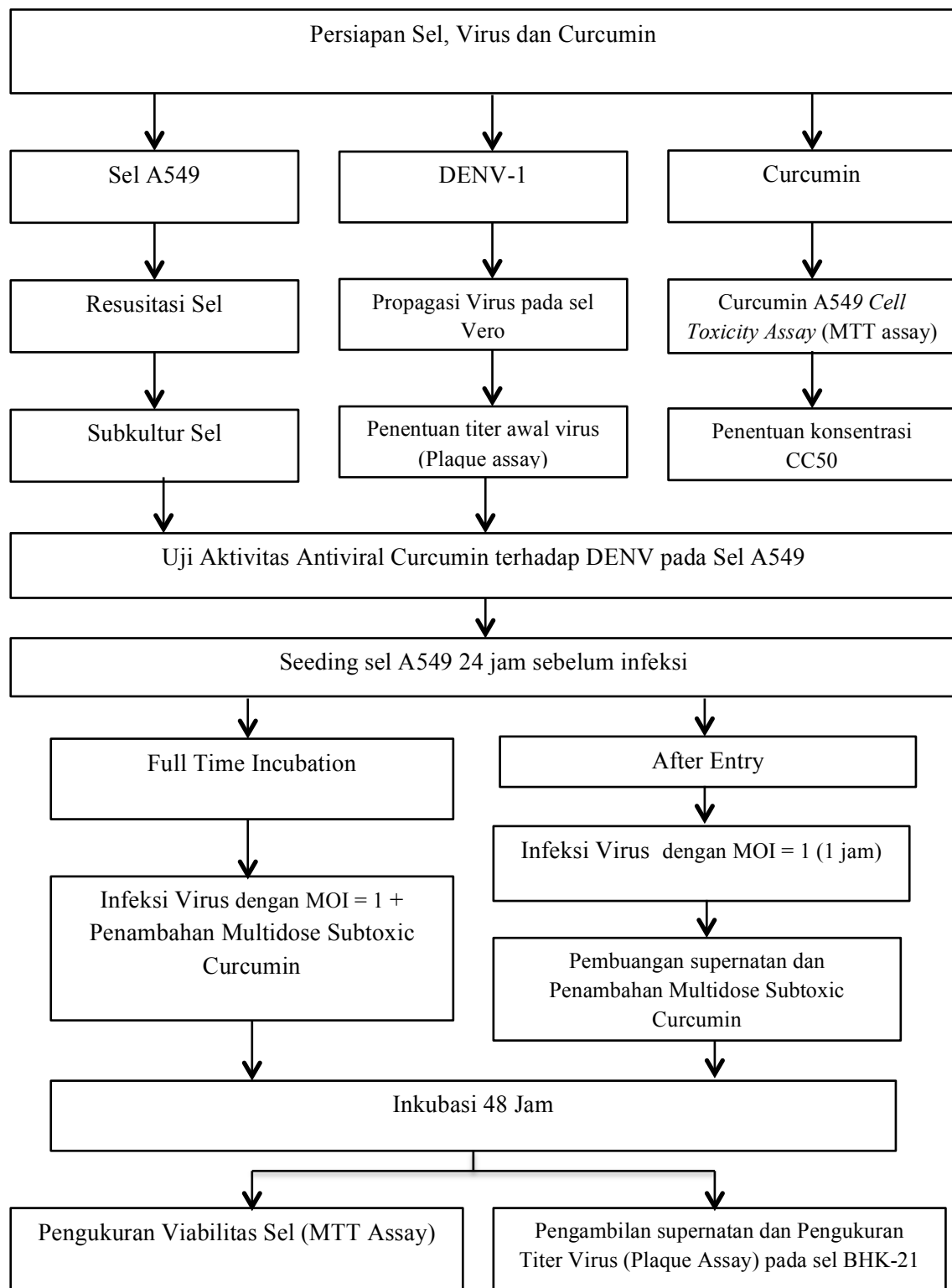
CC50 kemudian ditentukan berdasarkan regresi linear. Konsentrasi curcumin yang digunakan dalam uji antiviral ini menggunakan konsentrasi dibawah CC50 yang mana pada konsentrasi tersebut viabilitas sel masih tinggi.

Uji aktivitas antiviral dilakukan dengan dua cara, yaitu pemberian curcumin pada keseluruhan waktu inkubasi (*Full Time*) dan infeksi serta pemberian curcumin setelah infeksi 1 jam (*After Entry*). Curcumin diberikan ke sel A549 selama 48 jam. Infeksi dilakukan dengan *Multiplicity of Infection* (MOI) = 1

Setelah uji antiviral curcumin terhadap DENV dilakukan, viabilitas sel A549 yang digunakan dalam percobaan ditentukan kembali dengan menggunakan MTT assay. Hal ini dilakukan untuk memastikan tidak ada pengaruh curcumin yang berarti terhadap sel A549

Titer Virus setelah perlakuan ditentukan dengan metode plaque assay. Plaque assay dilakukan sebanyak dua kali untuk masing masing sampel. Setelah plaque divisualisasi, jumlah plaque dihitung pada well dilusi yang jumlah plaquanya terlihat dengan baik dan dapat dihitung dengan baik. Jumlah plaque yang terlihat pada masing masing well kemudian dirata rata dan titer virus kemudian dinilai dengan persamaan<sup>45</sup>

$$\text{: Titer virus (pfu/ml)} = \frac{\text{Jumlah plaque (pfu)}}{\text{Faktor dilusi} \times \text{Volume inokulum(ml)}}$$



Gambar 1. Alur Penelitian

### **3.10 Pengolahan dan Analisis Data**

Hasil penelitian dideskripsikan dalam tabel atau grafik, analisis beda rerata antar kelompok perlakuan dilakukan menggunakan uji parametrik *One-way* ANOVA jika distribusi data normal atau Kruskal-Wallis jika distribusi data tidak normal walaupun telah dilakukan transformasi data. Analisis data dilakukan dengan program IBM SPSS Statistics ver. 23 dan Graphpad Prism 7.

### **3.11 Keterbatasan Penelitian**

Dalam penelitian ini titer virus diukur dengan plaque assay sehingga titer virus yang diukur hanyalah virus-virus yang telah keluar dari sel sedangkan virus yang masih di dalam sel tidak dapat diukur. Penelitian ini hanya mencakup pengaruh curcumin pada DENV-1, selain itu aktivitas antiviral yang dinilai hanya mencakup kemampuan menghambat replikasi.

### **3.12 Etika Penelitian**

Penelitian ini tidak melibatkan subjek maupun hewan coba sehingga tidak memerlukan adanya *ethical clearance*. Namun penelitian ini akan tetap ditinjau oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang.



**Tabel 2. Jadwal Penelitian**

	Januari				Februari				Maret				April				Mei				Juni			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pembuatan proposal	■	■	■	■																				
Ujian proposal					■																			
Persiapan Sel, Virus, Curcumin					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
Uji Aktivitas Ativiral Curcumin																	■	■	■	■				
Mengumpulkan data																		■	■	■				
Analisis data																			■	■	■	■	■	■
Menulis laporan																						■	■	■
Menulis artikel																						■	■	■