

## **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 Mikrobiologi.

#### **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**

Populasi target penelitian ini adalah DENV-1.

#### **3.4.2 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah virus koleksi Laboratorium Dengue Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.

#### **3.4.3 Besar Sampel**

Pada penelitian ini pengulangan akan dilakukan tiga kali sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.<sup>12</sup>

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah multidosis *[6]-gingerol*.

#### **3.5.2 Variabel tergantung**

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

### 3.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala
[6]-gingerol	<p>[6]-gingerol (<i>5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone</i>) merupakan senyawa yang banyak terkandung pada jahe (<i>Zingiber officinale</i>). Konsentrasi diukur dalam mM.</p> <p>[6]-gingerol pada penelitian ini diperoleh dari <i>Sigma-Aldrich (Seelze, Germany)</i>.</p>	Nominal
Viabilitas sel	<p>Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati. Viabilitas sel dinyatakan dalam %.</p> <p>Viabilitas sel diukur dengan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) <i>assay</i>.</p>	Rasio
Titer virus	<p>Titer virus merupakan jumlah partikel infeksius virus. Titer virus dapat dinyatakan dalam <i>plaque forming unit/ml</i> (pfu/ml). <i>Plaque forming unit</i> diukur dengan <i>plaque assay</i>.</p>	Rasio

**Tabel 2 Definisi Operasional**

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

1. *Biological safety cabinet class II (BSC II)* [esco]
2. *37°C waterbath* [memmert]
3. Inkubator 28<sup>0</sup>c [memmert]

4. Inkubator CO<sub>2</sub> suhu 37°C [sanyo]
5. Motorized pipetor [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. Repetitif 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. Mesin sentrifuge sorvall<sup>®</sup> pico [thermo]
24. Timer
25. Waste container

26. Rak tabung
27. Kotak es
28. Sarung tangan [ansell]
29. Parafilm [whatman]
30. Gunting
31. Plastic wrap [kinpak, bagus]
32. Improved Neubauer hemacytometer (superior marienfeld, germany)
33. Oven

### **3.7.2 Bahan**

1. DENV serotipe 1 strain Indonesia
2. *[6]-gingerol* [sigma-aldrich]
3. *RPMI 1640 medium supplemented with 10% of FBS, 2 mmol/l of l-glutamine, 100 u/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin [gibco-life technologies]*
4. *Trypsin-0.25% EDTA* [gibco-life technologies]
5. *Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) tanpa CaCl<sub>2</sub> dan MgCl<sub>2</sub> [gibco]*
6. Dimetil sulfoksida (DMSO) [applichem]
7. 3,7% formalin [applichem]
8. 1% *crystal violet* [sigma]
9. 1% *methyl-cellulose-2% FBS*
10. 70% etanol

11. 10% *bleach*

### **3.8 Cara Pengumpulan Data**

#### **3.8.1 Kultur Sel A549**

##### **3.8.1.1 Resusitasi Sel A549**

1. Mengeluarkan satu *vial* stok sel beku A549 dari *liquid nitrogen tank* atau *freezer -80° C*.
2. Meletakkannya ke dalam *37°C water bath* dan secara perlahan memutarnya sampai cair secara sempurna.
3. Secara cepat, memindahkan sel ke *falcon tubes* yang sudah berisi medium 10 ml RPMI 1640 dan mengendapkan sel dengan centrifuge 500 x 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° C*, 5 % CO<sub>2</sub> 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° C.

### **3.8.2 Persiapan Virus Dengue**

#### **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 kontrol non infeksi. 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 (yang berisi virus) (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 panen virus 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. Memberi label pada supernatan.
8. Menyimpan pada -80<sup>0</sup> C bila belum akan digunakan.

### **3.8.2.2 Pengukuran Titer Awal Virus (*Plaque Forming Unit*) 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 1X RPMI-2% FBS.
6. Membuang medium secara hati-hati agar sel tidak kering.
7. Menambahkan 0,2 ml dilusi sampel virus ke *well* yang dituju.
8. Menginkubasi *plate* pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam, dengan digoyangkan setiap 20 menit.
9. Pada akhir dari inkubasi, melepaskan sampel virus dari *well* dengan menggunakan *vacuum pump* secara hati-hati 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 6 hari (4-7 hari), tergantung jenis virus.
12. Pada akhir inkubasi, memasukkan sel ke dalam tangki berisi 3.7% *formaldehyde* selama 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* dalam *well*.
17. Menghitung titer virus dengan persamaan Mahy dan Kangro (1996) :

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

### 3.8.3 Persiapan [6]-gingerol

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

1. Membuat suspensi sel 1x10<sup>6</sup> per mL.
2. Mendilusi sel dari 1x10<sup>6</sup> menjadi 1x10<sup>4</sup> sel per mL agar dapat menaruh sel pada *plate* dengan konsentrasi 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> sel setiap *well*.
3. Mendistribusikan 100 µL dilusi sel setiap *well*.

4. Mendistribusikan [*6*]-gingerol dengan konsentrasi 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mM pada masing masing *well*.
5. Menginkubasi sel selama 6-48 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 detergent reagen ketika presipitat ungu terlihat pada mikroskop, jangan dikocok.
9. Meletakkan *plate* yang telah ditutupi 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.

#### **3.8.4 Uji Aktivitas Antiviral [*6*]-gingerol 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<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam
3. Menginfeksi sel dengan *Multiplicity of Infection* = 1 ( $10^5$  PFU) dan menambahkan [*6*]-gingerol dengan berbagai konsentrasi subtoksik
4. Menginkubasi sel pada 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub> 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°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam
3. Menginfeksi sel dengan *Multiplicity of Infection* = 1 ( $10^5$  PFU)
4. Menginkubasi sel pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam
5. Membuang supernatan masing masing well dan menambahkan [6]-gingerol dengan berbagai konsentrasi subtoksik
6. Menginkubasi sel pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 48 jam
7. Mengambil supernatan untuk dilakukan *plaque assay*

#### **3.8.5 Pengukuran Titer Awal Virus (*Plaque Forming Unit*) 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 [6]-gingerol.
6. Membuat dilusi serial  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$  kali dari sampel virus dalam 1X RPMI-2% FBS.

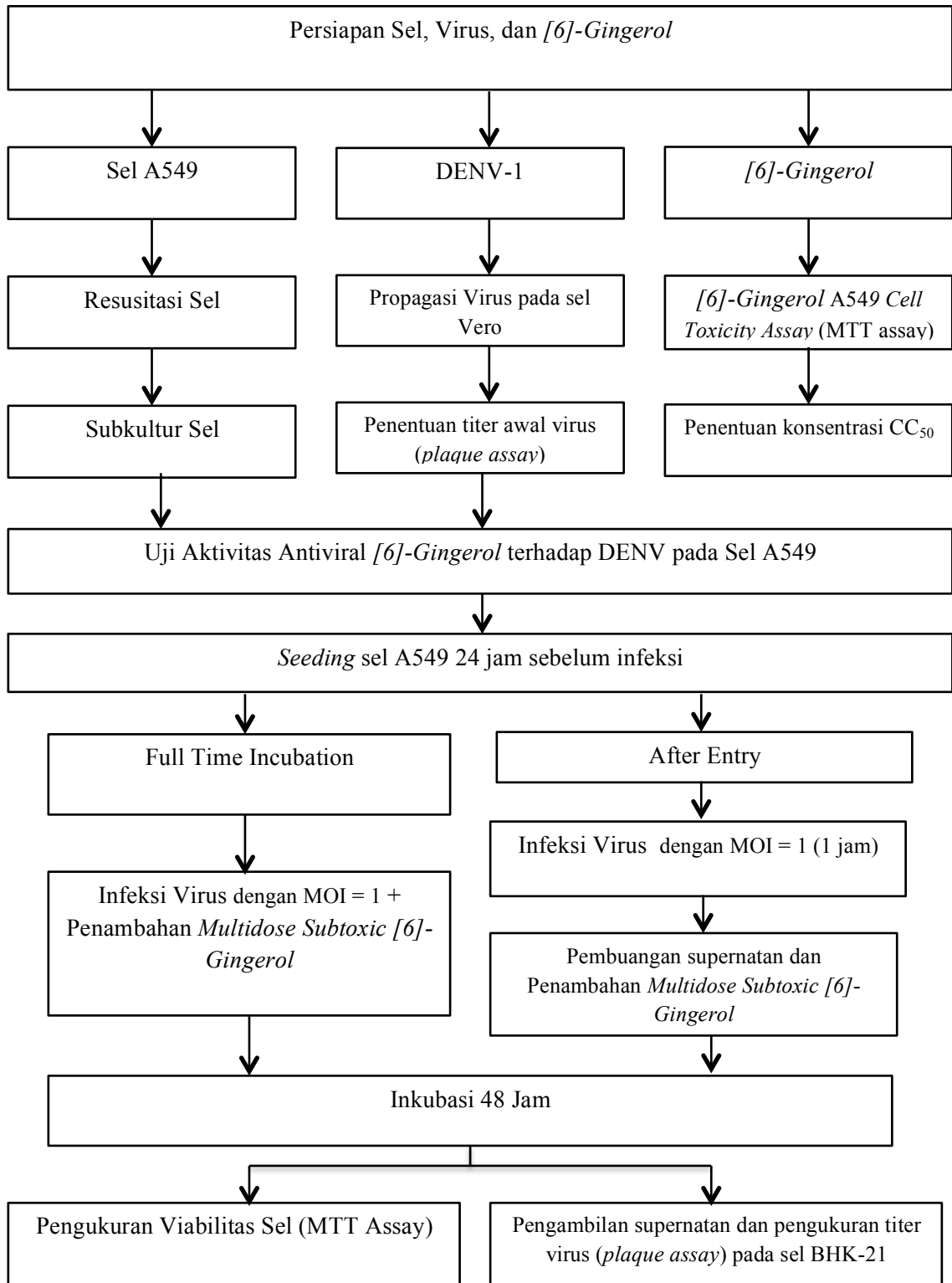
7. Membuang medium secara hati-hati agar sel tidak kering.
8. Menambahkan dilusi sampel virus 0.2 ml ke *well* yang dituju.
9. Menginkubasi *plate* pada 37° C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam, dengan digoyangkan setiap 20 menit.
10. Pada akhir dari inkubasi, melepaskan sampel virus dari *well* dengan menggunakan *vacuum pump* secara hati-hati 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 6 hari (4-7 hari), tergantung jenis virus.
13. Pada akhir inkubasi, memasukkan sel ke dalam tangki berisi 3.7% *formaldehyde* selama 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* dalam *well*.
18. Menghitung titer virus dengan persamaan Mahy dan Kangro (1996) :

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

### 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  $10^5$  sel setiap *well*.
3. Mendistribusikan 100  $\mu$ L dilusi setiap *well*. Termasuk tiga medium kontrol.
4. Menginkubasi sel pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam, dengan menambahkan 10  $\mu$ L reagen MTT pada setiap *well* (berisi 100  $\mu$ L).
5. Menginkubasi kembali selama 2 sampai 4 jam sampai warna ungu terlihat.
6. Menambahkan 100  $\mu$ L detergent reagen ketika presipitat ungu terlihat pada mikroskop, jangan dikocok.
7. Meletakkan *plate* yang telah ditutupi pada tempat yang gelap selama lebih kurang 16 jam atau semalaman pada suhu ruang.
8. Melepaskan tutup *plate* dan mengukur absorbansi setiap *well* pada panjang gelombang 570 nm dengan alat *Multiskan plate reader (Thermo Scientific)*.
9. Menentukan nilai rata-rata absorbansi.

### 3.9 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.

### **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. Selain itu, karena keterbatasan waktu, penelitian ini hanya mencakup pengaruh *[6]-gingerol* pada kemampuan infeksi virus dan tidak melihat pengaruhnya pada replikasi virus.

### **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.

## Jadwal Penelitian

	Januari				Februari				Maret				April			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pembuatan proposal	■	■														
Ujian proposal			■													
Persiapan sel, virus, [6]-gingerol				■	■	■										
Uji aktivitas antiviral [6]-gingerol				■	■	■	■									
Mengumpulkan data					■	■	■	■								
Analisis data									■	■	■	■				
Menulis laporan													■	■	■	
Menulis artikel													■	■	■	



