

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang dikendalikan (Creswell, 2009). Desain penelitian yang digunakan untuk metode eksperimen pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) di mana setiap kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan dirancang dalam kondisi yang relatif homogen (Mattjik dan Sumertajaya, 2006).

Penelitian ini diawali dengan melakukan ekstraksi buah jambu biji. Buah yang telah diekstrak dijadikan sebagai kelompok perlakuan yang diuji untuk mengetahui aktivitas anti inflamasi senyawa yang ada dalam Buah tersebut. Adapun objek penelitian dalam penelitian ini yaitu tikus jantan terinduksi Lipopolisakarida (LPS) sebagai model *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS). Perlakuan yang diberikan kepada tikus yang diinduksi LPS adalah pemberian ekstrak buah jambu biji dalam tiga variasi dosis yaitu 50, 400 atau 800 mg/Kg BB. Terdapat dua kelompok kontrol yaitu kontrol negatif dan kontrol positif. Kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan apa-apa. Kontrol positif yaitu tikus yang diinduksi LPS. Kedua kelompok tersebut dijadikan sebagai pembanding dalam penelitian ini, selain perlakuan tiga variasi dosis, terdapat dua kelompok kontrol sehingga jumlah perlakuan pada tikus uji sebanyak lima perlakuan. Menurut Federer (1977) jumlah pengulangan perlakuan didapatkan berdasarkan perhitungan berikut:

$$(T - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq \sim 4,75 \sim 5$$

Keterangan:

n = jumlah ulangan

T = jumlah perlakuan

Berdasarkan rumus di atas, maka perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam 5 kali ulangan. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah konsentrasi sitokin IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dari serum darah dan paru-paru setelah diberikan ekstrak air jambu biji. Variabel-variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel terikat yaitu konsentrasi sitokin dari setiap sampel dan variabel bebas yaitu variasi dosis ekstrak buah jambu biji dan juga induksi LPS. Pengukuran nilai sitokin menggunakan uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Uji ELISA merupakan metode analisis kuantitatif yang menunjukkan reaksi antigen-antibodi melalui perubahan warna yang diperoleh dengan menggunakan enzim dan substrat enzim yang berfungsi untuk mengidentifikasi keberadaan dan konsentrasi suatu molekul (Hornbeck, 2015). Kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang dihasilkan dari uji ELISA dapat diukur menggunakan teknik spektrofotometri yaitu pengukuran nilai *optical density* (OD). Setelah mendapatkan nilai OD, nilai tersebut dikalikan dengan rumus regresi yang didapat dari kurva standar. Hasil akhir dari penelitian ini diuji menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistik 22 for windows*.

### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Pada penelitian ini, populasi yang digunakan yaitu tikus jantan Sprague Dawley yang telah diberikan perlakuan ekstrak buah jambu biji dan diinduksi LPS sebagai tikus model ARDS. Sampel penelitian yang digunakan adalah jaringan paru-paru dan serum darah dari tikus. Pengamatan dilakukan terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dari tikus yang sudah diberi perlakuan pemberian ekstrak buah jambu biji dan diinduksi LPS .

### **3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan. Pembuatan ekstrak buah jambu biji, *pretreatment*, pemeliharaan dan pembedahan hewan percobaan, dan uji ELISA, dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama *Biomeclular and Biomedical Research Center*, Bandung.

### 3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan terdapat di Laboratorium *Bimolecular and Biomedical Research Center* PT. Aretha Medika Utama, Bandung. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Pada tahap Persiapan semua alat dan bahan yang digunakan disiapkan terlebih dahulu. Alat yang sudah disiapkan, dibersihkan lalu dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas untuk disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C.

#### 3.5.2 Ekstraksi Sampel

Proses Ekstraksi merupakan proses pemisahan satu atau beberapa jenis senyawa aktif dari tumbuhan menggunakan pelarut yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhtarini, 2011). Pengeringan oven adalah metode pra-ekstraksi yang menggunakan energi panas untuk menghilangkan kelembapan dari jambu biji. Preparasi ini dianggap sebagai salah satu proses termal termudah dan cepat yang dapat mengawetkan bahan aktif yang terkandung dalam jambu biji. Maserasi merupakan metode yang paling sederhana untuk dilakukan dalam skala laboratorium. Metode ini berupa perendaman sampel dalam wadah tertutup menggunakan pelarut organik dan didiamkan pada suhu ruangan. Pengolahan tersebut dimaksudkan untuk menghancurkan dinding sel tumbuhan untuk melepaskan fitokimia yang larut (Handa dkk., 2008). Waktu ekstraksi didasarkan pada efisiensi ekstrak. Menurut Kemit dkk. (2016) semakin lama waktu maserasi maka kesempatan kontak antara bahan dan pelarut semakin besar sehingga hasilnya akan terus meningkat sampai pada titik jenuh dari pelarut tersebut. Waktu maserasi yang terlalu singkat dapat mengakibatkan tidak semua senyawa terlarut dalam pelarut yang digunakan. Maserasi selama tiga hari dapat menghasilkan rendemen tertinggi Amelinda dkk. (2018). Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhtarini, 2011). Ekstraksi jambu biji menggunakan air menghasilkan total

senyawa fenol dan flavonoid tertinggi dibanding ekstrak etanol dan metanol (Seo dkk., 2014). Penggunaan pelarut yang sesuai sangat dibutuhkan karena berguna untuk menghindari senyawa lain yang tidak memiliki aktivitas berarti bagi penelitian namun menimbulkan masalah seperti pengendapan (Wijesekera, 2017).

Proses awal ekstraksi dimulai dari buah jambu biji dibersihkan menggunakan air biasa lalu dikeringkan menggunakan oven. Setelah buah benar-benar kering, buah diblender untuk mendapatkan serbuk buah. Serbuk buah disaring menggunakan saringan supaya kotoran buah tidak terdapat pada buah yang diekstraksi dan sebagian serbuk disimpan untuk perlakuan lainnya. Buah diekstrak menggunakan air demineral dengan cara maserasi. Serbuk buah yang sudah kering direndam dalam larutan air selama tiga hari dan ditutup dengan aluminium foil. Setiap hari, ekstrak disaring menggunakan kertas saring agar diperoleh filtrat yang jernih. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Serbuk yang dimasukkan ke dalam maserator seberat 150 g dilarutkan dengan 1500 ml air dihari pertama. Waktu yang dibutuhkan untuk maserasi yaitu tiga hari dan air ditambahkan 1000 ml setiap harinya. Total 150 g serbuk jambu biji dan total pelarut air sebanyak 3.630 ml menghasilkan 3.300 ml filtrat. Filtrat kemudian dievaporasi untuk didapatkan ekstrak dalam bentuk pasta

### 3.5.3 Hewan Penelitian

Percobaan dilakukan pada tikus jantan *Sparague Dawley* berusia 6 minggu dengan berat rata-rata 70-100 g. Selama 7 hari dilakukan proses aklimatisasi, agar hewan uji dapat beradaptasi dengan lingkungan sekitar yang bersifat konstan. Pemilihan tikus jantan didasarkan pada penginduksian LPS yang dapat menyebabkan hipotermia dan inflamasi pada paru yang lebih parah, hiperresponsif saluran napas yang lebih tinggi, juga jumlah sel netrofil, konsentrasi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang lebih tinggi dibandingkan dengan betina (Card dkk., 2006). Pemilihan tikus galur *Sparague Dawley* karena tikus *Sparague Dawley* merupakan hewan model yang memiliki kesamaan struktur sel, komponen biokimia, dan proses metabolisme (glikolisis dan siklus krebs) seperti pada manusia (Hau, 2003). Tikus yang berusia 6 minggu sudah menunjukkan kematangan seksual dimana hipotalamus-hipofisis-adrenal (HDA) yang sudah berfungsi sempurna akan melakukan interaksi dengan sitokin terkait respon imun (Kane & Ismail, 2017; Sengupta, 2013)

Tikus diberi makan secara normal dan ditempatkan di ruangan dengan suhu terkendali 12 jam siang/malam pada suhu 25°C dan kelembaban relatif 50-70% (Chen, 2019). Tikus diberi pakan dan minum secara *ad libitum* (Bai dkk., 2018). Pakan diberikan sebanyak 200g perhari untuk setiap kelompok perlakuan. Pakan standar yang digunakan adalah *brailer-II pellet* (BR-II) dengan kandungan protein kasar 14% dan lemak kasar 5% dengan aquadest sebanyak 12 gram (Riyantie, 2001).

Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing n=5. Kelompok 1 (kontrol negatif) terdiri dari tikus yang tidak diinduksi LPS dan tidak diberikan perlakuan. Kelompok 2 (kontrol positif) terdiri dari tikus yang menerima suntikan LPS dengan dosis 5 µg/g BB. Kelompok 3 terdiri dari tikus yang diberikan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 50 mg/Kg BB + terinduksi LPS 5 µg/g BB. Kelompok 4 terdiri dari tikus yang diberikan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 400 mg/Kg BB + terinduksi LPS 5 µg/g BB. Kelompok 5 terdiri dari tikus yang diberikan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 800 mg/Kg BB + terinduksi LPS 5 µg/g BB. Setiap kelompok perlakuan terdapat masing-masing 1 tikus sebagai cadangan. Selama pemberian perlakuan pada tikus, dilakukan juga penimbangan berat badan tikus.

#### **3.5.4 Pemberian Ekstrak Buah Jambu Biji dan LPS**

*Pretreatment* ekstrak buah jambu biji dilakukan terlebih dahulu selama 28 hari untuk meningkatkan sistem imun. Variasi dosis yang diberikan adalah 50 mg/kg ; 400 mg/kg; dan 800 mg/kg. Variasi dosis ini berdasarkan pada penelitian Ojewole (2006) dan Jang dkk. (2014). Volume dosis yang diberikan pada tikus juga menyesuaikan kapasitas maksimal lambung tikus yaitu 5 ml. Pemberian dosis dilakukan setiap hari melalui oral secara *gavage*. Pemberian ekstrak secara *gavage* memungkinkan tikus untuk menerima substansi ekstrak secara langsung dengan dosis yang akurat dan waktu yang tepat melalui sistem pencernaan sehingga lebih cepat dicerna.

Perhitungan dalam pemberian dosis diadaptasi dari penelitian Ibrahim (2017). Perhitungan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 50, 400 dan 800 mg/kg BB yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

$$\frac{70 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 3,5 \text{ mg/tikus } 70 \text{ g}$$

Perhitungan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 400 mg/kg BB yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

$$\frac{70 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 400 \text{ mg} = 28 \text{ mg/tikus } 70 \text{ g}$$

Perhitungan ekstrak buah jambu biji dengan dosis 800 mg/kg BB yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

$$\frac{70 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 800 \text{ mg} = 56 \text{ mg/tikus } 70 \text{ g}$$

Pemberian LPS diberikan satu kali setelah 28 hari tikus diberi perlakuan ekstrak buah jambu biji. Serbuk LPS sebanyak 5 µg/g BB dilarutkan ke dalam NaCl 0,9% (larutan fisiologis). Menurut Azizoğlu dkk. (2020) dan Chen dkk. (2020) LPS sebanyak 5 µg/g BB dapat meningkatkan TNF-α dan IL-1β dari tikus. Pemberian LPS dilakukan dengan cara disuntikan langsung ke trakea tikus. Induksi secara intratrakea didasarkan pada beberapa hal diantaranya adalah memiliki keuntungan prosedur yang aman, mencegah pertumbuhan koloni bakteri di faring maupun laring, dan telah terbukti menyebabkan peradangan akut dan neutrofilik dari ruang alveolar paru-paru dan menginduksi produksi berbagai mediator proinflamasi, seperti TNF-α dan CXC-kemokin (Bae dkk., 2010; Singhal dkk., 2011). Pemberian ekstrak buah jambu biji dilanjutkan selama 14 hari setelah pemberian LPS hingga sampel akan diambil untuk dianalisis.

### 3.5.5 Isolasi Sampel

Ada dua sampel yang akan dianalisis yaitu jaringan paru-paru dan serum darah. Terlebih dahulu dilakukan dislokasi leher, kemudian dibuat sayatan memanjang dari bagian toraks hingga abdomen tikus. Paru-paru diambil kemudian dimasukkan ke dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Sebanyak 50 mg sampel paru-paru ditimbang dan digerus menggunakan mikropastel dan PBS. Pengambilan sampel paru-paru dikarenakan paru-paru merupakan lokasi sentral terjadinya ARDS, dimana apabila terjadi inflamasi maka sitokin akan diproduksi.

Sampel darah diambil karena sitokin ada dalam darah. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara melukai aorta abdominalis hingga darah menetes ke dalam

tabung yang telah disediakan. Pengambilan sampel darah dari aorta abdominalis dilakukan karena sampel dapat diperoleh bersamaan dengan proses pembedahan tikus yang diawali dengan pengambilan sampel jaringan paru-paru. Sampel darah dapat diperoleh dalam jumlah banyak jika dilakukan sayatan pada aorta abdominalis. Sampel darah yang diambil sebanyak 0,5-1,0 mL. Sampel darah disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit untuk mengekstraksi serum. Sampel serum dan paru-paru dipisahkan dan disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.6 Uji ELISA

Uji ELISA yang akan digunakan yaitu kit *Sandwich* ELISA TNF- $\alpha$  dan kit *Sandwich* ELISA IL-1 $\beta$ . Pemilihan *Sandwich* ELISA didasarkan pada sensitivitasnya yang lebih tinggi dibanding uji ELISA lain dan juga lebih spesifik karena menggunakan dua antibodi. Dalam uji ELISA terlebih dahulu dilakukan pembuatan seri larutan kerja (WS) dengan konsentrasi: 1000, 500, 250, 125, 62.5, dan 31.3 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Sebanyak satu ml *reference standard* dan *sample diluent* ditambahkan ke dalam vial dan disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 10.000 x g. Pembuatan *wash buffer* dilakukan dengan cara melarutkan stok *concentrated wash buffer* dengan akuades. Pembuatan *Assay diluent A* dilakukan dengan melarutkan 6 ml *Assay Diluent A* dalam 24 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Pembuatan *Capture Antibody* dilakukan dengan menambahkan 6 ml *Coating Buffer A* ke dalam 30  $\mu\text{l}$  *Capture Antibody*. Pembuatan *Detection Antibody* dilakukan dengan menambahkan 30  $\mu\text{l}$  *Detection Antibody* dengan 6 ml *Assay Diluent A*. Pembuatan *Avidin HRP conjugate working solution* dilakukan dengan cara melarutkan *Avidin-HRP* 6  $\mu\text{l}$  dengan 6 ml *Assay Diluent A*. Pembuatan *TMB Substrate Solution* dilakukan dengan mencampurkan 3 ml *Substrate Solution A* dan *Substrate Solution B*.

Sehari sebelum melakukan ELISA, 100  $\mu\text{L}$  *Capture Antibody* dimasukkan ke dalam microplate dan diinkubasi selama 18 jam dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Microplate dicuci sebanyak empat kali dengan 200  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer* tiap sumuran, sumuran diketuk secara terbalik di atas kertas penyerap untuk menghilangkan sisanya. *Assay Diluent A* 100  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam tiap sumuran, ditutup lalu inkubasi selama satu jam di atas plate shaker. Proses inkubasi selanjutnya dilakukan dengan cara yang sama. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  larutan standar dan sampel dimasukkan ke setiap

sumuran, kemudian inkubasi selama dua jam. Larutan yang ada dalam microplate dibuang dan dicuci sebanyak empat kali. Sebanyak 100 µl Detection Antibody ditambahkan ke dalam setiap sumuran dan inkubasi selama satu jam. Larutan yang ada dalam microplate dibuang kembali dan dicuci sebanyak empat kali. Sebanyak 100 µl Avidin-HRP di masukan ke dalam setiap sumuran dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan yang ada dalam microplate dibuang kembali dan dicuci dengan 200 µl wash buffer sebanyak lima kali. TMB Substrate Solution 100 µl ditambahkan dan inkubasi selama 15 menit tanpa cahaya. Reaksi dihentikan dengan menambahkan Stop Solution. Nilai Optical Density (OD) diukur pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

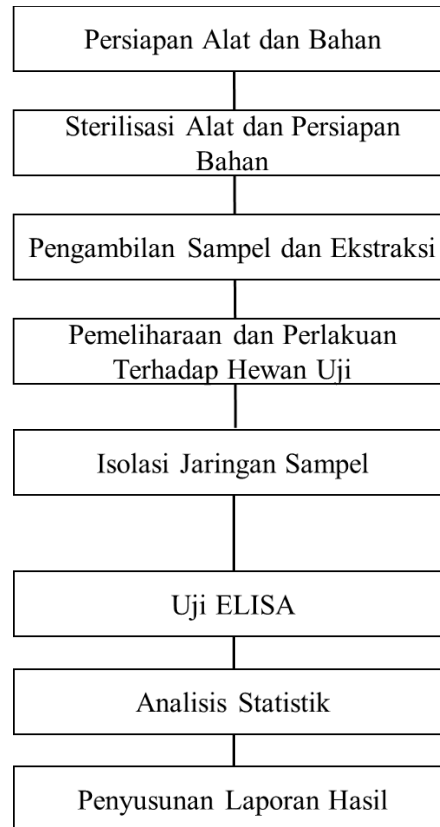
### **3.5.7 Analisis Statistik**

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS Statistic 22 for Windows. Uji normalitas untuk melihat data yang diperoleh terdistribusi normal. Uji normalitas dapat menggunakan uji Kolmogrov Smirnov atau uji Shapiro Wilk, bergantung pada jumlah sampel yang digunakan. Sampel yang digunakan kurang dari 50 maka uji yang digunakan adalah Shapiro-Wilk. Uji homogenitas untuk melihat kehomogenan data yang diperoleh. Data yang diperoleh normal dan homogen, sehingga dilakukan uji parametrik Analysis of Variance (One way ANOVA). Uji lanjutan Post Hoc Tukey HSD kemudian dilakukan untuk melihat perbedaan yang nyata dari tiap perlakuan. Seluruh uji dilakukan dengan taraf signifikansi ( $\alpha$ ) sebesar 0,05 atau 5%.



### 3.6 Alur Penelitian

Kerangka alur penelitian mengenai aktivitas antiinflamasi ekstrak buah jambu biji terhadap tikus yang diinduksi LPS dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini:



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian