

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu eksperimental karena dengan melakukan manipulasi variabel penyebabnya (Berlian, 2018). Teknik pengumpulan data dengan mencatat hasil-hasil data dari eksperimen yang dilakukan oleh tim peneliti yang kompeten terhadap penanganan tikus model *Accute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) berupa parameter IL-18 dan IL-1 β dari sampel serum darah dan jaringan paru-paru dengan menggunakan metode ELISA untuk mengukur kadar beberapa jenis sitokin.

Desain dalam penelitian ini adalah rancangan acak langkap (RAL), digunakan karena dilakukan di lingkungan dengan keadaan yang relative *homogeny* sehingga tidak memberikan pengaruh berarti pada respons yang diamati (Ahmadi *et al.*, 2021). Instrumen yang digunakan adalah ELISA *kit Sandwich for Rat* IL-18 dan IL-1 β dari Elabscience terhadap sampel yang dikoleksi dari tikus yang diberikan perlakuan sebelumnya oleh tim peneliti kompeten berupa hewan tikus jantan galur *Sparague Dawley* berumur 56 hari yang di induksi dengan lipopolisakarida (LPS) melalui diinjeksi intratrakea dengan dosis 5 μ g/g bobot badan tikus (Vernooy *et al.*, 2001). Pemberian ekstrak teh hijau dilakukan selama 28 hari sebelum induksi LPS dan 14 hari setelahnya oleh tim peneliti sebelumnya. Kelompok perlakuan diberi ETH dengan dosis 50, 400, 800 mg/kg BB. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif dan negatif. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok tikus yang diinduksi LPS saja untuk melihat status inflamasi dengan mengukur kadar sitokinya, dalam penelitian ini parameternya adalah sitokin IL-1 β dan IL-18, sedangkan kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tikus tanpa perlakuan.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tikus jantan galur *Sparague Dawley* berumur 56 hari yang diberi lipopolisakarida (LPS) sebagai bentuk model yang mengalami ARDS yang telah diberikan perlakuan ekstrak teh

hijau sebelum dan setelah induksi dengan LPS. Sampel yang akan dianalisis kandungan sitokinnya pada penelitian ini adalah serum darah dan jaringan paru-paru dari tikus ARDS. Parameter yang diamati adalah kadar IL-18 dan IL-1 β pada serum darah dan jaringan paru-paru tikus setelah diberi ekstrak daun teh. Tikus tikus tersebut telah dikelompokkan secara acak menjadi 5 (lima) kelompok yaitu:

- a. Kelompok K1 : kelompok kontrol negatif terdiri atas lima ekor tikus
- b. Kelompok K2 : kelompok kontrol positif yang diinduksi LPS 5 μ g/g BB terdiri atas lima ekor tikus
- c. Kelompok K3 : kelompok perlakuan yang diberi dosis ETH 50 mg/kg BB selama 28 hari dan sesudah induksi LPS 5 μ g/g BB selama 14 hari terdiri atas lima ekor tikus
- d. Kelompok K4 : kelompok perlakuan yang diberi dosis ETH 400 mg/kg BB selama 28 hari dan sesudah induksi LPS 5 μ g/g BB selama 14 hari terdiri atas lima ekor tikus
- e. Kelompok K5 : kelompok perlakuan yang diberi dosis ETH 800 mg/kg BB selama 28 hari dan sesudah induksi LPS 5 μ g/g BB selama 14 hari terdiri atas lima ekor tikus

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilaksanakan dalam waktu kurang lebih 6 bulan (November 2021–April 2022). Lokasi penelitian berada di Laboratorium Biomolecular and Biomedical Research Center, PT. Aretha Medika Utama, Bandung. Kegiatan yang dilakukan di lokasi tersebut meliputi uji ELISA untuk mengukur kadar sitokin pada sampel serta analisisnya.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 sebagai berikut:

Tabel 3.1 Daftar nama Alat

No	Nama Alat	Jumlah
1.	<i>Centrifuge</i>	1 unit
2.	<i>ELISA reader</i>	1 unit
3.	Mikropipet 0.5-10 μL	1 unit
4.	Mikropipet 20-200 μL	1 unit
5.	Mikropipet 100-1000 μL	1 unit
6.	<i>Microplate</i>	2 unit
7.	<i>Rotary Evaporator</i>	1 unit
8.	Tips biru	1 pak
9.	Tips kuning	1 pak
10.	Tips putih	1 pak
11.	<i>Vial Tube</i>	1 pak

Tabel 3.2 Daftar nama Bahan

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	ELISA kit IL-18	1 kit
2.	ELISA kit IL-1 β	1 kit

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dilakukan dari beberapa tahapan sebagai berikut:

3.5.1 Ekstraksi Teh Hijau dan Perlakuan Hewan

Daun teh diekstraksi menggunakan etanol 70% dilakukan di PT. FAST (Fatanah, Amanah, Shidiq, dan Tablig) Depok, Jawa Barat. Penggunaan etanol didasarkan pada sifat polarnya yang akan melarutkan senyawa polifenol dalam teh hijau yang juga bersifat polar sehingga senyawa polifenol dapat tersari dengan optimal (Sari, 2010). Etanol 70% dapat melarutkan metabolit sekunder pada tanaman teh lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak methanol, butanol, dan air (Cho *et al.*, 2017). Perlakuan tikus dilakukan oleh tim ahli peneliti dimana tikus diadaptasikan lalu diberikan perlakuan terhadap tikus, pada kelompok K1 sebagai

kontrol negatif tidak diperlakukan apa-apa. Kelompok K2 sebagai kontrol positif diinduksi dengan LPS dengan dosis 5 µg/g BB. Kelompok K3, K4, dan K5 sebagai kelompok perlakuan dengan memberikan ekstrak teh hijau sesuai dengan dosis yang ditentukan secara *gavage* menggunakan jarum *gavage*, satu kali sehari selama 28 hari setiap hari. Setelah itu, pada hari ke-29 injeksi LPS 5 µg/g BB dilakukan dengan cara intratrakea satu kali. Pemberian ETH tetap dilanjutkan selama 14 hari setiap hari.

Setelah itu tikus dianestesi secara intraperitoneal menggunakan uretana 20% dengan dosis 1 g/kg lalu dimatikan dengan cara didislokasi leher. Setelah tikus mati tikus dibedah pada bagian dada kemudian pengambilan sampel. Terdapat dua sampel yang diteliti yaitu sampel serum darah dan jaringan paru-paru. Sampel darah diambil dari aorta abdominalis sebanyak 0,5-1,0 mL lalu dimasukkan kedalam tabung Eppendorf. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 10 menit. Tikus yang telah dimatikan selanjutnya dilakukan pembedahan untuk pengambilan paru-paru. Paru-paru dicuci dengan akuades kemudian dimasukkan ke dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Sebanyak 50 mg sampel paru-paru ditimbang dan digerus menggunakan mikropastel dan PBS.

3.5.2 Penentuan Dosis

Pada penelitian ini, Tikus diberi ekstrak teh hijau (ETH) dengan dosis 50, 400, atau 800 mg/kg BB. Dosis paling rendah 50 mg/kg BB merujuk pada penelitian dari Chen *et al.* (2004), menurutnya dosis tersebut tidak menyebabkan morbiditas namun dapat mempengaruhi regulasi sistem imun. Dosis lainnya ditentukan berdasarkan penelitian Mishra *et al.* (2014). Volume ETH yang diberikan disesuaikan dengan kapasitas maksimal volume lambung tikus yaitu 5 mL. Perhitungan dosis ekstrak teh hijau untuk perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.3 dibawah ini:

Tabel 3.3 Perhitungan Dosis Ekstrak ETH

K3 (50 mg/kg BB)	K4 (400 mg/kg BB)	K5 (800 mg/kg BB)
= 50 mg x 100 g/1000 g	= 400 mg x 100 g/1000 g	= 800 mg x 100 g/1000 g
= 5 mg / 5 mL	= 40 mg / 5 mL	= 80 mg / 5 mL
= 1 mg/mL x 6 ekor	= 8 mg/ mL x 6 ekor	= 16 mg/mL x 6 ekor
= 6 mg/L	= 48 mg/mL	= 96 mg/mL

Kemudian diencerkan ekstrak rendaman daun teh hijau yang dihitung sesuai takaran yang diberikan dengan 1 mL akuades steril. Solusi ETH yang diperoleh dikeluarkan dengan jarum suntik 1 mL dan diberikan secara oral melalui tabung lambung (Wijayanti *et al.*, 2019).

3.5.3 Uji ELISA

Uji ELISA berdasarkan *manual kit* ELISA dari Elabscience, uji dilakukan dengan mempersiapkan terlebih dahulu reagen yang akan digunakan pada masing-masing kit. Dalam uji ELISA terlebih dahulu dilakukan pembuatan seri larutan kerja dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 $\mu\text{g/mL}$ seperti pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Pembuatan Larutan Kerja Uji ELISA

Larutan tersebut dibuat dengan melakukan serial *dilution* dari larutan standar. Larutan standar (disentrifugasi: 10.000 x g) yang telah ditambahkan 1 mL *referenced standard sample diluent* dimasukkan ke

dalam vial yang telah berisi 500 μL *referenced standard sample diluent* lalu dihomogenkan (konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$) dan diambil sebanyak 500 μL untuk dimasukkan ke dalam vial selanjutnya sehingga menghasilkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Langkah tersebut dilanjutkan hingga konsentrasi terakhir. *Wash buffer* sebanyak 750 mL dibuat dengan melarutkan 30 mL *concentrated wash buffer* dengan 720 mL air deionisasi. *Biotinylated Detection AB Working Solution* dibuat dengan melarutkan 100 \times *Concentrated Biotinylated Detection Ab* yang telah disentrifugasi dengan *Biotinylated Detection Ab Diluent* sesuai dengan kebutuhan total dengan masing-masing *well* sebanyak 100 μL . *Concentrated HRP conjugate working solution* dibuat dengan cara yang sama seperti *Biotinylated Detection AB Working Solution*.

Microplate yang telah tersedia pada kit sudah dilapisi dengan antibodi spesifik untuk Rat IL-1 β dan Rat IL-18. Larutan standar dan sampel ditambahkan ke *microplate* sesuai dengan pemetaan yang telah dibuat masing-masing sebanyak 100 μL lalu ditutup dengan *sealer* dan diinkubasi selama 90 menit pada 37°C seperti pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Penambahan Larutan Standar dan Sampel

Larutan kemudian dibuang lalu ditambahkan 100 μL *Biotinylated Detection AB Working Solution* pada masing-masing *well*. *Microplate* ditutup kembali dan diinkubasi selama satu jam pada 37°C. *Microplate* diaspirasi dengan menepuk-nepuk plate pada tisu hingga plate kering. *Wash buffer* ditambahkan sebanyak 350 μL lalu didiamkan selama 1–2 menit dan dilanjutkan dengan aspirasi kembali. Langkah tersebut diulangi

sebanyak tiga kali. *HRP conjugate working solution* ditambahkan sebanyak 100 μL lalu diinkubasi selama 30 menit pada 37°C. *Microplate* diaspirasi dan dicuci dengan wash buffer sebanyak lima kali. Reagen substrat ditambahkan sebanyak 90 μL tanpa terkena cahaya dan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C. *Stop solution* ditambahkan ke dalam microplate sebanyak 50 μL . *Optical Density* (OD) diukur pada 450 nm menggunakan ELISA microplate reader seperti pada Gambar 3.3



Gambar 3.3 Pembacaan Hasil Menggunakan ELISA Reader

Hasil dibaca menggunakan ELISA reader untuk mengetahui absorbansi dari sampel, setelah mengetahui absorbansinya dimasukkan pada persamaan kurva standar untuk mendapatkan konsentrasi dari sampel sitokin interleukin (IL). Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan software SPSS.

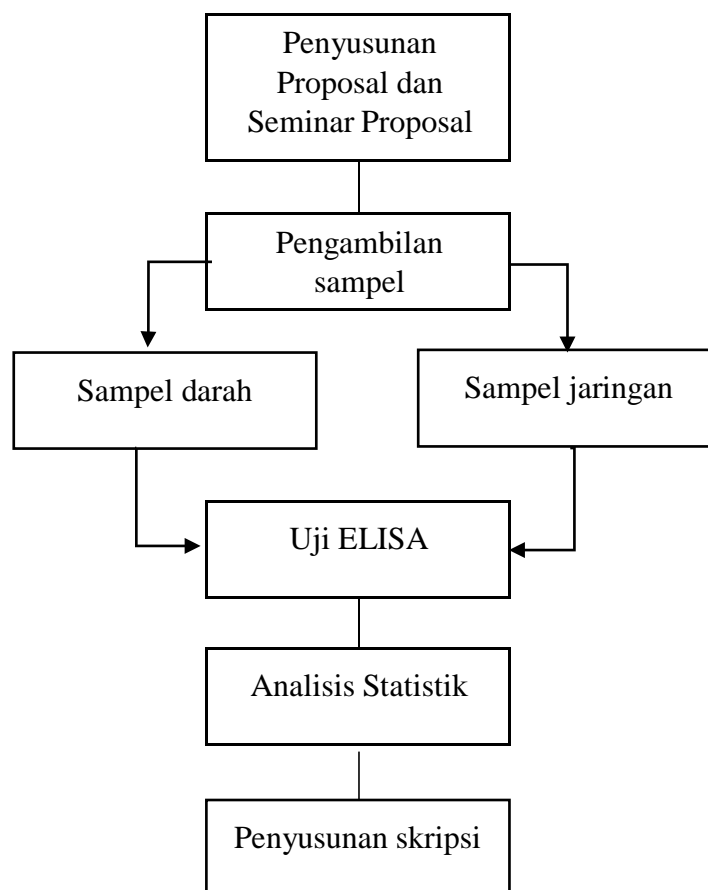
3.5.4 Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak yang digunakan untuk menganalisis data adalah SPSS for windows ver 16. Langkah pertama dari analisis data ini adalah uji normalitas *Shapiro Wilk* dengan tujuan mengetahui apakah data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Data yang tidak terdistribusi normal kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskall Wallis* untuk mengetahui perbedaan signifikan secara statistik. Selanjutnya dilakukan uji *Firedmann*. Data yang terdistribusi normal dan homogeny kemudian dianalisis menggunakan uji *One-Way Analysis of Variance* (*One-Way Anova*) untuk mengetahui nilai signifikansi dari masing-masing

perlakuan data lalu dilanjutkan dengan uji *Post-hoc Tukey HSD* untuk melihat kelompok mana diantara data yang berbeda.

3.6 Alur Penelitian

Awal mula penelitian ini dimulai dari penyusunan proposal lalu dilanjutkan dengan seminar proposal. Setelah itu dilanjutkan dengan tahap persiapan alat dan bahan, pengambilan sampel uji, uji ELISA, dan analisis statistik yang dilanjutkan dengan pengolahan serta penyusunan skripsi. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4 di bawah ini.



Gambar 3.4 Alur penelitian