

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuantitatif eksperimental laboratorik dengan penelitian yang akan dilakukan secara in vitro menggunakan sel makrofag dengan perlakuan MBJH serta induktor benzopiren.

### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel makrofag yang diisolasi dari 1 ekor mencit. Sampel yang digunakan pada penelitian dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan. Kelompok I sebagai kelompok kontrol negatif, kelompok II s.d. dan VII sebagai kelompok eksperimental dan kelompok VIII sebagai kontrol media.

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **1. Lokasi**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### **2. Waktu**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2018.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel terikat : Aktifitas fagositosis makrofag yang diinduksi benzopiren
2. Variabel bebas : Minyak Biji Jintan Hitam dengan konsentrasi 100, 50, 25, 12.5 , 6.5 , 3.25  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **E. Definisi Operasional**

1. Minyak Biji Jintan Hitam adalah Minyak yang berasal dari biji jintan hitam yang dikempa dengan tekanan tinggi. MBJH diberikan dengan 5 peringkat konsentrasi yaitu 100, 50, 25, 12.5, 6.5 ,dan 3.25  $\mu\text{g/ml}$  yang dilarutkan dengan DMSO dan diberikan selama 1x24 jam kepada kultur sel makrofag yang sudah diinduksi benzopiren.
2. Aktivitas fagositosis makrofag yang diteliti diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Prosentase makrofag yang memfagosit partikel latek yang dihitung pada 100 sel makrofag dikali jumlah rata-rata partikel lateks pada sel makrofag yang positif.

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat
  - a. Coverslip
  - b. Mikropipet
  - c. Sput

d. Inkubator CO2 5 %, 37 C

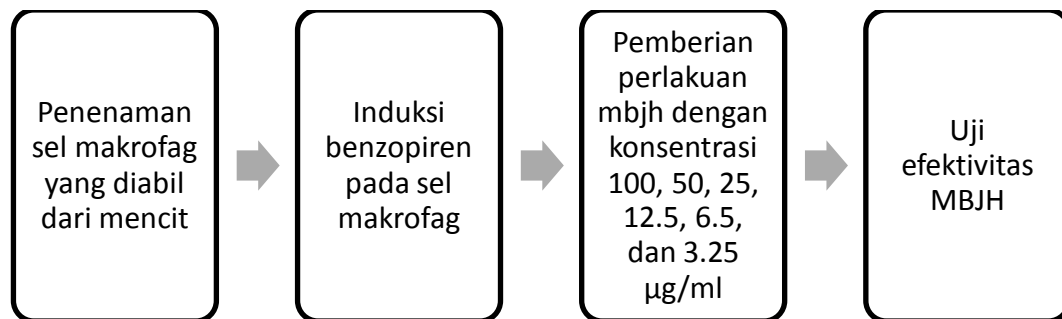
e. Mikroskop

f. Plate/Mikrokultur

2. Bahan

Minyak Biji Jintan Hitam, Alkohol 70%, 10ml medium RPMI, Aspirat, RPMI mengandung FCS 10%, Larutan trypan blue, Medium komplet, PBS, Giemsa20%.

**G. Jalannya Penelitian**



1. Persiapan makrofag mencit dan induksi benzopyrene

- a. Sel makrofag diisolasi secara aseptis dari seekor mencit. Seekor mencit dikorbankan dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70 %, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama 3 menit sambil digoyang - goyang secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan rongga dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit

injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifuse pada 1200 rpm, 4 C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, pellet diresuspensi dengan RPMI yang mengandung FCS 10 %. Pellet yang diresuspensi dalam RPMI mengandung sel makrofag yang telah diisolasi dan siap diamati viabilitasnya.

- b. Makrofag yang sudah diisolasi dari peritoneal mencit kemudian di kultur. Prosedur persiapan dan kultur makrofag sbb: Jumlah sel makrofag dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan larutan trypan blue (dihitung jumlah sel yang viabel atau hidup), kemudian ditambahkan dengan medium komplet sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$ / ml. Suspensi sel ditumbuhkan dalam mikrokultur 24 sumuran yang telah diberi coverslips bulat. Setiap sumuran diisi 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel). Sel kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5 % dengan suhu 37° C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplet sebanyak 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan 2 jam. Sel dicuci 2X dan ditambahkan dengan RPMI 1 ml tiap sumuran dan diinkubasi dalam medium komplet dilanjutkan sampai 24 jam. Kultur sel makrofag yang viabel yang kemudian digunakan untuk pengujian efek MBJH terhadap aktifitas fagositosis makrofag in vitro.

2. Pemeriksaan Aktifitas imunomodulator MBJH pada kultur sel makrofag terpapar benzopiren
  - a. Aktivitas imunomodulator MBJH diamati dengan uji ingesti partikel latek (uji fagositosis). Uji fagositosis dilakukan in vitro menggunakan latex beads diameter 3 mikrometer. Partikel lateks diresuspensikan dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml.
  - b. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2X dengan medium RPMI kemudian dibagi menjadi 8 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok benzopiren, kelompok II s.d. VII sebagai kelompok eksperimental dan kelompok VIII sebagai kelompok kontrol media. Masing-masing kelompok dimasukkan larutan benzopiren dengan konsentrasi 50  $\mu\text{g/ml}$  kecuali kelompok VIII. Kelompok VIII sebagai kontrol media tidak ditambahkan benzopiren. Masing-masing sumuran yang telah mendapatkan larutan benzopiren kemudian ditambahkan larutan MBJH sesuai dengan masing-masing konsentrasi pada kelompok II s.d. VII ( dengan konsentrasi 100 , 50 , 25 , 12.5 , 6.5 , 3.25 ). Kultur sel yang sudah diberikan perlakuan tersebut kemudian diinkubasi selama 4-6 jam. Setelah selesai diinkubasi kemudian pada masing-masing sumuran ditambahkan suspensi lateks 200  $\mu\text{L}$ /sumuran, diinkubasikan dalam incubator  $\text{CO}_2$  5 % dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan

PBS 3X, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan Giemsa 20 %. Persentase sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan banyaknya partikel lateks yang difagositosis dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Perhitungan prosentase sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan jumlah partikel lateks intrasel yang diingesti oleh makrofag diulang sebanyak 3 kali.

Aktivitas fagositosis Makrofag :  $\frac{\text{Jumlah makrofag yang memfagositosis}}{\text{Jumlah makrofag yang dihitung}} \times 100\%$

Indeks fagositosis :  $\frac{\text{Jumlah partikel yang terfagositosis}}{\text{Jumlah makrofag yang aktif (100)}}$

## H. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada dengan didampingi laboran ahli. Penelitian ini menggunakan alat yang semestinya dan dengan metode yang sesuai dengan penelitian sehingga hasil pengukuran tepat

## I. Analisis Data

Data indeks fagositosis (IF) dan kapasitas fagositosis hasil penelitian pengaruh minyak biji jintan hitam dianalisis dengan menggunakan program pengolah data SPSS untuk melihat apakah ada perbedaan efektifitas yang signifikan terhadap kelompok kontrol dan kelompok eksperimental. Program SPSS yang digunakan yaitu uji ANOVA satu jalan ( one way

ANOVA) karena penelitian ini mempunyai beberapa sampel yang mendapatkan beberapa perlakuan.

## **J. Etik Penelitian**

Penelitian ini tidak menggunakan subjek manusia. Sebelum melakukan penelitian, peneliti mengajukan surat Permohonan kepada Komisi Etik untuk melakukan penelitian dengan hewan dan sel makrofag secara in vitro. Dan melakukan penelitian dengan berdasarkan 3 prinsip penelitian kultur sel di laboratorium, yaitu sebagai berikut :

- a. Replacement
  - i. Relatif : mengganti hewan coba dengan organ atau jaringan hewan dari rumah potong, atau dari orde yang lebih rendah.
  - ii. Absolut : mengganti hewan percobaan dengan memakia kultur sel jaringan/tissu culture,
- b. Reduction : menggunakan jumlah hewan dengan jumlah yang kecil tetapi masih tetap memberikan hasil yang sah.
- c. Refinement : mengurangi rasa nyeri atau stress pada hewan coba dengan melakukan prosedur penelitian yang benar dan orang yang terlatih, serta bila memungkinkan menggunakan metoda noninvasif (Perka-LPPI , 2013).