

BAB 4

METODE PENELITIAN

4. 1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental in vitro* dengan *pre-post test controlled group design*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh Ekstrak kulit manggis terhadap kadar NO HUVECs yang dipapar LPS.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel HUVECs

Pemilihan sampel penelitian ini adalah kultur jaringan HUVECs. Umbilikus diperoleh dari persalinan melalui operasi caesar di Rumah Sakit Melati Husada. umbilikus yang telah dikultur dipapar lipopolisakarida dan kemudian diberikan perlakuan.

4.2.2 Pemilihan Sampel HUVECs

4.2.2.1 Kriteria inklusi

1. Didapatkan dari kelahiran Sectio Caesaria (SC)
2. Kehamilan fisiologis (normal)
3. Kondisi sehat (tidak cacat)

4.2.2.2 Kriteria eksklusi

1. Kehamilan disertai infeksi
2. Kehamilan disertai hipertensi atau diabetes
3. Kehamilan disertai kondisi ketuban pecah dini

4.2.3 Jumlah Sampel

Besarnya sampel yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

P= jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan)

n= jumlah ulangan yang diperlukan

Jadi, minimal dilakukan empat kali pengulangan. Karena eksperimen *in vitro*, dalam hal ini eksperimen dengan metode HUVECs memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, dalam penelitian ini dilakukan tiga kali pengulangan untuk setiap perlakuan.

Jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah 15, yang dibagi ke dalam 5 kelompok, yaitu:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok dan Perlakuan HUVECs

Kelompok	Perlakuan	Ekstrak kulit manggis
Kontrol (-) / Normal	-	-
Kontrol (+)	LPS 20 ng/ml	-
EKM 1	LPS 20 ng/ml	1 µg/ml
EKM 2	LPS 20 ng/ml	2 µg/ml
EKM 3	LPS 20 ng/ml	4 µg/ml

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (*Independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan LPS dan ekstrak kulit manggis.

4.3.2 Variabel tergantung (*dependent*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar NO dari HUVECs.

4.3.3 Variabel luar

Faktor lingkungan laboratorium tempat HUVECs dikultur.

4.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk melakukan kultur dan pemberian paparan terhadap HUVECs. Pembuatan dan pengukuran dosis ekstrak kulit manggis dan LPS dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kultur HUVECs dan pengamatan kadar NO pada HUVECs dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Kulit manggis yang digunakan berwarna merah coklat, permukaan dalam licin, berbau khas, berasa sepat dan pahit. Berasal dari famili *Guttiferae* yang didapatkan dari perkebunan manggis di Kabupaten Lumajang dengan diameter buah 5,5-6,5 cm, berat buah 70-140 gram dan ketebalan kulit buah 6-9 mm.
- b. Ekstrak kulit manggis diperoleh dari kulit manggis yang dikeringkan, kemudian di larutkan dengan etanol 96%, dibiarkan selama satu malam, disaring dan dilakukan proses evaporasi.
- c. Kultur sel endotel HUVECs berasal dari vena umbilikus neonatus dengan persalinan Sectio Cesarea, yang kemudian diproses seperti pada prosedur penelitian. Kultur sel

yang sudah siap diberi perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif/normal, 1 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

- d. NO ialah suatu EDRF (*Endothelium- derived relaxing factor*) yaitu faktor perelaksasi vaskuler yang berasal dari sel endotel. NO dapat mengindikasikan keadaan suatu vaskuler terhadap aterosklerosis. Pemeriksaan konsentrasi NO ini berdasarkan konversi enzimatik dari nitrat menjadi nitrit oleh nitrat reductase. Reaksi ini diikuti dengan deteksi kolorimetri dari nitrat sebagai *dye product* dari reaksi Greiss.(Miles et al, 1996) . NO diukur menggunakan ELISA, dengan satuan Conc (pg/ml).
- e. LPS atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negatif. LPS diencerkan hingga mencapai konsentrasi 20 ng/ml lalu dilarutkan dengan media lengkap dan dipaparkan ke HUVECs.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan: Kulit manggis yang telah diekstraksi, bahan untuk media *Kord solution* (HEPES, air, Sodium Hydrogen Bicarbonate, Phenol red, gentamicin), bahan untuk merontokan sel endotel (*Collagenase*), bahan untuk kultur HUVECs (larutan PBS A, umbilikus, serum free media)

4.6.2 Alat/instrumen penelitian

Alat untuk membuat ekstrak kulit manggis yaitu oven, timbangan (1), Gelas Erlemeyer (2), Corong Gelas (1), Labu Evaporator (1), Labu penampung etanol (1), Evaporator (1), Pendingin spiral/rotary evaporator (1), Selang *water pump* (1), *Water pump*, *Water bath*, *Vakum pump* (1).

Alat untuk pemberian ekstrak kulit manggis: Sonde

Alat untuk mengkultur HUVECs yaitu *laminar air flow biohazard type 2*, Timbangan magnetik, Lampu ultraviolet, Sentrifus, Inkubator CO₂, Mikroskop *inverted*, Tabung CO₂, Mikropipet, Plate 48-Well, Klem Tali Pusat dan Pinset, Kanul, Sarung tangan, Spuit 10 cc

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur ekstraksi kulit manggis

Cara pembuatan ekstrak bahan alam (kulit manggis):

1. Proses pengeringan

Bahan alam dicuci bersih (sampel basah) yang akan dikeringkan, dipotong kecil-kecil, lalu dikeringkan sampai kering (bebas kandungan air).

2. Proses ekstraksi

Setelah kering, bahan alam dihaluskan dengan blender sampai halus, ditimbang sebanyak 100 gr (sample kering). Bahan alam dimasukkan 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter, kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000ml. Lalu dikocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit).

Didiamkan 1 malam sampai mengendap.

3. Proses evaporasi

Lapisan atas campuran etanol diambil dengan zat aktif yang sudah terambil, dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter. labu evaporasi dipasang pada evaporator. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas *water bath* (atur sampai 90⁰ C), disambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira seperempat dari

bahan alam kering. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastic atau kaca, disimpan dalam freezer.

4.7.2 Penentuan dosis ekstrak kulit manggis

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian yang pernah dilakukan Husnul (2010). Pada penelitian itu, Husnul menguji potensi ekstrak metanol kulit manggis terhadap distribusi *asymmetryc dimethylarginine* (ADMA) pada HUVECs dalam kondisi glukosa tinggi. Konsentrasi ekstrak kulit manggis yang digunakan Husnul adalah 1 µg/ml, 2 µg/ml dan 4 µg/ml. Oleh karena itu, dalam penelitian ini peneliti menggunakan dosis 1 µg/ml, 2 µg/ml dan 4 µg/ml ekstrak kulit manggis.

4.7.3 Prosedur kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs)

Pembuatan medium *Cord Solution*:

1. Pembuatan larutan HEPES

Di larutkan 47,5 gram HEPES ke dalam 200 ml *deionized water*. Disterilisasi secara filtrasi melalui filter 0,2 µm. Disimpan dalam *freezer* suhu -20 °C.

2. Pembuatan larutan *bicarbonate phenol red*

Dilarutkan 44 gram *sodium hydrogen bicarbonate* dan 30 mg *phenol red* ke dalam 1000 ml *deionized water* (pH 7,60). Disterilisasi secara filtrasi melalui filter 0,2 µm. Disimpan dalam *freezer* suhu -20 °C.

3. Pembuatan larutan gentamicin

Dilarutkan 75 mg gentamicin sulfat ke dalam 10 ml *deionized water*. Disterilisasi secara filtrasi melalui filter 0,2 µm. Disimpan dalam *freezer* suhu -20 °C.

4. Pembuatan medium *cord solution*

Diambil 8 ml HBSS dan ditambahkan *deionized water* hingga volume 80 ml. Dimasukkan 3,75 ml *sodium hydrogen bicarbonate*. Ditambahkan 2,5 ml HEPES.

Ditambahkan 1,25 ml gentamycin (pH 7,4 – 7,8). Lalu dibungkus *aluminium foil* untuk mencegah penguapan dan oksidasi pada medium. Medium *cord solution* lalu disimpan dalam *refrigerator* suhu 4 °C.

4.7.4 Prosedur Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diperoleh dari persalinan melalui operasi caesar di Rumah Sakit Melati Husada. Pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran. Disiapkan botol berisi *cord solution* dari refrigerator (suhu 4 °C). Segera setelah kelahiran, umbilicus dipotong sepanjang ± 20 cm dan langsung dimasukkan larutan *cord solution*.

4.7.5 Prosedur isolasi dan kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Prosedur isolasi sel endotel merujuk metode Jones 1996 sebagai berikut: Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan *clot* yang ada dengan kertas tissue yang disemprot dengan alkohol 70 %. Masing-masing ujung umbilicus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena. Vena akan terlihat mempunyai dinding yang lebih tebal, lebih besar dan elastis. Kanul dimasukkan pada salah satu ujung vena (± 1 cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena dibersihkan / dibilas dengan 10 ml larutan PBSA melalui kanul yang telah terpasang dengan spuit 10 cc. Setelah bersih, ikat ujung umbilicus yang lain dengan ikatan yang kuat (atau diklem). Larutan *Collagenase* dimasukkan ke dalam vena. Selanjutnya umbilicus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua belah tangan dan didekatkan dengan Bunsen (agar mencapai suhu 37 °C) selama 7 menit. *Collagenase* (yang telah mengandung endotel) dikeluarkan dari umbilikus dengan cara menyedot melalui spun yang masih terpasang pada ujung cannule. Kemudian *Collagenase* tersebut dimasukkan pada tabung centrifuge steril 15 cc. Umbilikus dibilas dengan 8 ml larutan PBS A untuk membilas sel endotel yang masih tersisa. Kemudian larutan ditambahkan ke dalam tabung sentrifus yang berisi larutan *collagenase*. Larutan yang telah mengandung sel endotel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000

rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 4 ml medium kultur pada pellet dan diresuspensi dengan cara *pipetting* sehingga sel-sel endotel terpisah.

Larutan dipindahkan ke dalam *well* pada *plate 48-well* yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2%, kemudian dimasukkan pada incubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 20 menit. Plate diambil dan sel endotel diamati dengan mikroskop *inverted* perbesaran 400x. Jika sel sudah menempel pada dasar *well*, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan larutan *serum free* 3 ml melalui filter 0,2 µm. *Serum free* diambil dengan spuit steril dan digantikan dengan medium kultur 4 ml melalui filter 0,2 µm. *Plate* dimasukkan ke dalam inkubator sampai *monolayer* (membentuk *cobblestone*) kurang lebih 3-4 hari dan medium diganti setiap 2 hari sekali.

4.7.6 Proses pemberian perlakuan pada HUVECs

Kultur sel yang telah *confluent* diganti medium baru. Kemudian, diberi Lipopolisakarida (LPS) dengan konsentrasi 20 ng/ml. LPS yang tersedia dilarutkan dengan media lengkap dan dipaparkan ke HUVECs, lalu diinkubasi 24 jam (CO 5%, 37°C). Setelah 24 jam inkubasi LPS, HUVECs dicuci dengan *serum free media*. Serum diambil dan disimpan untuk dilakukan pengukuran konsentrasi NO.

4.7.7 Pengamatan kadar NO pada HUVECs setelah dipapar ekstrak kulit manggis.

Kadar NO dihitung dengan menggunakan sampel medium kultur HUVECs. sampel diambil sebelum dan sesudah paparan ekstrak kulit manggis. Sebelum dilakukan pengukuran, sampel dan reagent harus dalam keadaan suhu ruangan. Analisis NO dilakukan menggunakan Griess reaction kit secara kolorimetri sesuai prosedur R&D system. Hasil densitas optik dibaca pada 570 nm dengan *microplate – reader*. Pengamatan NO dipilih pada jam ke 6 dan jam ke 24 untuk melihat apakah ada hubungan waktu dengan peningkatan konsentrasi NO.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Prosentase migrasi HUVECs setiap kelompok dihitung rata-ratanya. Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik yang kemudian dianalisis secara deskriptif. Selanjutnya dengan bantuan software SPSS, dilakukan uji statistik berikut:

- Uji homogenitas varian untuk menilai apakah data yang dihasilkan dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$). Jika varians data sama, maka hasil dapat dilanjutkan untuk dianalisis dengan uji One Way ANOVA.
- Uji One Way ANOVA digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbandingan prosentase migrasi HUVECs antara masing-masing kelompok.
- Uji *Post Hoc Tukey* digunakan untuk menilai manakah kelompok yang berbeda bermakna dari hasil tes ANOVA.
- Uji T Berpasangan digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan antara perlakuan jam ke – 6 dan jam ke – 24.