

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan studi *true experimental-post test only control group design* untuk mengetahui peran ketela rambat dalam menurunkan jumlah neutrofil limpa pada hewan model lupus eritematosus sistemik yang diinduksi pristan.

Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit. Setelah melewati masa aklimatisasi selama satu pekan, mencit dibagi secara acak menjadi 4 kelompok yaitu A, B, C, D, dan E. Mencit B, C, D dan E menerima injeksi pristan dengan dosis 0,5ml sekali injeksi melalui intraperitoneal sedangkan mencit A dan B diinjeksi dengan *phosphate buffered saline* (PBS) pada waktu yang sama. Dalam waktu 3 bulan setelah injeksi pristan dan PBS, mencit C, D, dan E mendapat asupan ketela rambat dengan berbagai dosis secara oral yang diberikan selama 4 minggu sedangkan mencit A dan B diberi H₂O dalam periode yang sama (Daniel, 2010)

4.2 Populasi dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit putih betina jenis BALB/c berusia 8 minggu dalam kondisi sehat yang dibuktikan dengan sertifikat bebas penyakit. Selanjutnya jumlah mencit yang dibutuhkan dihitung dengan rumus (Supranto, 2004):

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

Dimana: n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

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

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 4 ekor mencit sehingga jumlah total mencit yang dibutuhkan sejumlah 20 mencit. Untuk menghomogenkan sampel maka ditentukan kriteria subjek penelitian. Adapun kriteria inklusi, meliputi:

- a. Jenis mencit adalah BALB/ c berat badan 25- 30 gram dan berusia 8-10 minggu
- b. Berjenis kelamin betina
- c. Kondisi sehat ditandai dengan pergerakan aktif, berbulu bersih, dan tidak ada luka

Kriteria eksklusi:

- a. Mencit jantan
- b. Mencit tidak mau makan dan minum
- c. Mencit dalam keadaan hamil
- d. Mencit mengalami luka yang lama sembuh

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pristan dengan dosis 0,5ml dan ekstrak ketela rambat dengan berbagai dosis; variabel terikat adalah jumlah neutrofil.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam waktu lima bulan.

4.5 Definisi Operasional Penelitian

- Ketela rambat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ketela rambat varietas gunung kawi yang berwarna ungu.
- Pembuatan mencit model LES dengan menggunakan pristan yang diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 0,5 ml dilakukan menurut penelitian Feng (2012) dan berdasarkan uji eksplorasi dosis pada pra penelitian.
- Pristan adalah zat yang digunakan untuk menginduksi penyakit lupus erithematosus sistemik, pristan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat pristan yang diproduksi oleh Sigma.
- Ekstrak ketela rambat ubi ungu diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 90% yang dilanjutkan dengan evaporasi. Proses ekstraksi dilakukan di Politeknik Negeri Malang.
- Dosis ekstrak ethanol ketela rambat digunakan adalah 175 mg/kgBB, 350 mg/kgBB dan 700 mg/kgBB berdasarkan penelitian akan memberikan efek anti-inflamasi (Wang, *et al*, 2009).
- Neutrofil merupakan sel berdiameter 12–15 μm memiliki inti yang khas padat terdiri atas sitoplasma pucat di antara 2 hingga 5 lobus dengan rangka tidak teratur dan mengandung banyak granula

- Sel neutrofil yang tercatat dengan pewarnaan HE secara mikroskopis tampak berinti dan berlobus dengan granula-granula yang berwarna biru (Zukesti, 2003).
- Perhitungan jumlah sel neutrofil pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya secara histologi dengan pewarnaan HE, menggunakan mikroskop cahaya, 10 kali lapang pandang dengan perbesaran 400x per lapang pandang. (Dwi Oktavia, 2013).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Ketela rambat

Serbuk ketela rambat, Aquades, Etanol 90%, Set ekstraksi, meliputi: *hot plate*, labu bundar (RBF), tabung soxlet (tempat sampel), pendingin, pipa CaCl, Set destilator, meliputi: *hot plate*, RBF, termometer, pendingin, adapter.

4.6.2 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit

Kandang pemeliharaan hewan coba, Tutup kandang dari anyaman kawat, Timbangan digital, Sekam, Botol minum, Alat semprot, Tempat makan, Pakan comfeed (makanan standar mencit).

4.6.3 Alat dan Bahan Pembuatan Mencit Model LES

Sprit intraperitoneal (sprit 1 ml), Kassa, Alkohol, Isolat pristan yang diproduksi oleh Sigma

4.6.4 Alat dan Bahan Pembedahan

Set bedah (papan bedah, pisau bedah, pinset), Sarung tangan, Eter, Alat cukur, *Aluminium foil*, *Stereofoam*, Petridis, Label, Kamera, Sabun cuci tangan

4.6.5 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Jaringan Limpa

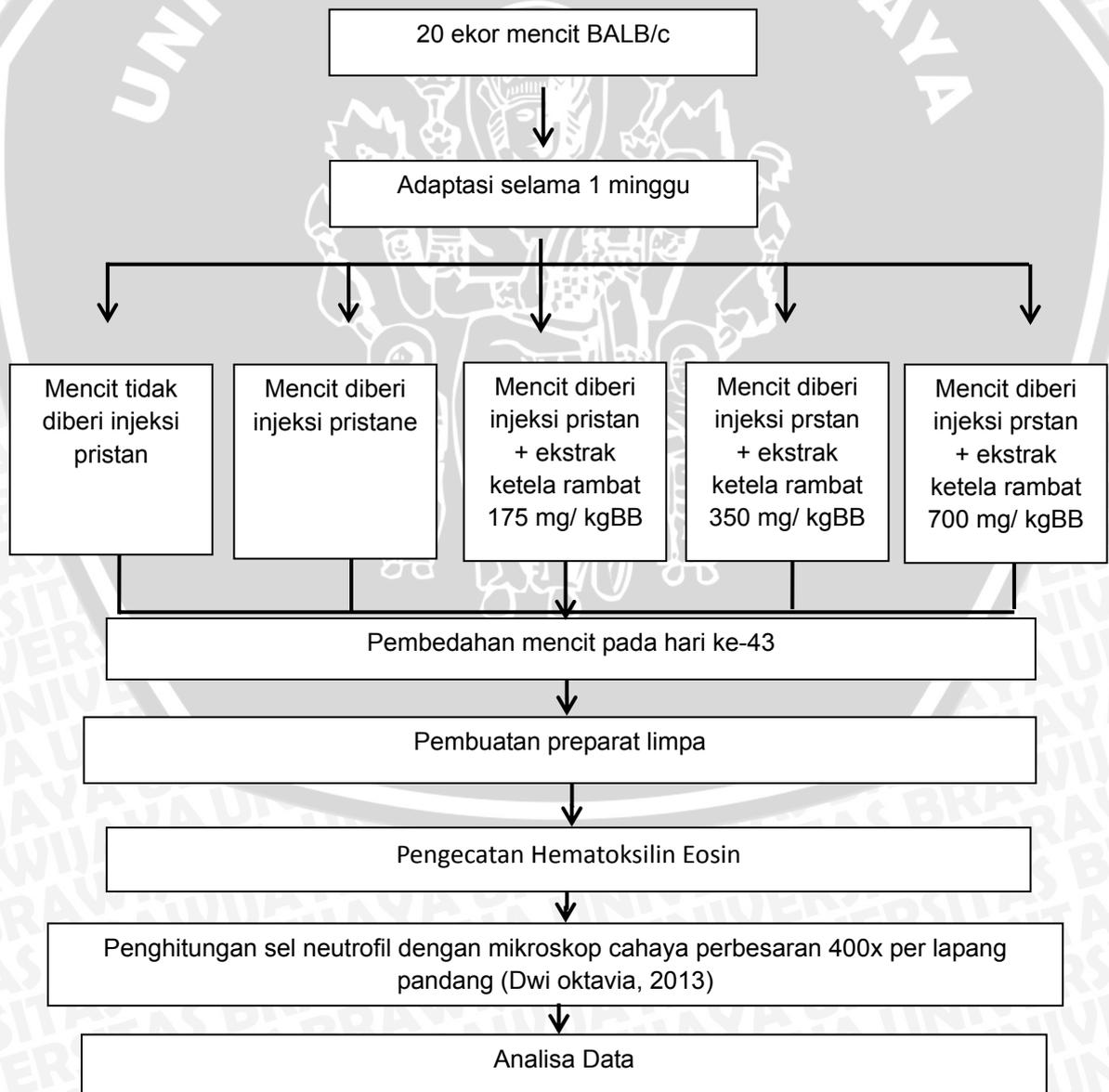
Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%, *Object glass*, Label, Spidol, *tissue cassette*, skalpel, parafin, keranjang, mesin prosesor otomatis, *freezer*, inkubator

4.6.6 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Hematoksilin-eosin

Hematoksilin eosin, Rak untuk pewarnaan, Pipet, *Cover glass*, Xylol, Ethanol 80%, Ethanol absolut, Ethanol 90%

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Bagan Alur Penelitian



4.7.2 Pembuatan Ekstrak Ketela Rambat

Umbi ketela rambat (*Ipomoea batatas*) dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang 100 gr menggunakan timbangan analitik. Kemudian dimasukkan kedalam beaker glass dan ditambah dengan pelarut etanol 95 % kemudian direndam (maserasi) selama 3 hari. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja. Kemudian hasil maserasi dimasukkan dalam labu ekstraksi. Satu set alas evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada water bath. Water bath dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70° C (sesuai dengan titik didih etanol). Kemudian ditunggu proses berjalan (pengembunan dan pemisahan di pendingin) sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100% (Uma, 2000).

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji mencit galur Balb/C, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan).Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium parasitologi selama tujuh hari.

4.7.4 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Mencit BALB/c dibagi menjadi 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan, yang masing- masing terdiri dari 4 ekor mencit dengan pembagian secara acak. Adapun pembagian kelompok mencit tersebut sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif (A) adalah kelompok mencit yang diberi PBS dan H₂O
2. Kelompok kontrol positif (B) adalah kelompok mencit yang diberi pristan dan H₂O
3. Kelompok perlakuan satu (C) adalah kelompok mencit yang diberi pristan dan ekstrak ketela rambat dengan dosis 175 mg/ kgBB.
4. Kelompok perlakuan dua (D) adalah kelompok mencit yang diberi PBS dan ekstrak ketela rambat dengan dosis 350 mg/ kgBB.
5. Kelompok perlakuan tiga (D) adalah kelompok mencit yang diberi PBS dan ekstrak ketela rambat dengan dosis 700 mg/kgBB.

4.7.5 Pemberian Pristan

Pristan dalam dosis 0,5ml diinjeksikan secara intraperitoneal pada kelompok mencit B, C, D, dan E sebanyak satu kali selama penelitian.

4.7.6 Pemberian Ekstrak Ketela Rambat (*Ipomoea batatas*)

Ekstrak ketela rambat dalam berbagai dosis diberikan pada kelompok mencit C, D, dan E setelah melewati masa 3 bulan pasca injeksi pristan secara intraperitoneal dan diberikan selama 4 minggu secara oral menggunakan sonde.

4.8.1 Isolasi Organ Limpa Mencit

1. Alat

Gunting kecil, pinset, *culture plate*, botol plastik, spidol, sarung tangan, Masker.

2. Bahan

Mencit yang sudah diinduksi pristan, Eter, Tri Reagent, PBS, formalin 10%

3. Cara Kerja

- a. Mencit dianastesi menggunakan eter.
- b. Mencit dibaringkan pada *stereofom* yang dilapisi *aluminium foil* dan disemprot dengan alkohol.
- c. Mencit dibedah menggunakan gunting mulai dengan menggunting bagian abdomennya.
- d. Bagian limpa diambil.
- e. Memotong limpa sebagai sampel dan meletakkan pada masing-masing *culture plate* yang sudah dilabeli.
- f. Organ limpa ditetesi PBS menggunakan mikro pipet untuk membersihkan organ tersebut dari darah.
- g. Organ limpa dimasukkan ke dalam botol plastik yang sudah diberi label penanda dan larutan formalin 10% di dalamnya.

4.8.2 Teknik Pembuatan Preparat Limpa

Limpa diambil melalui pembedahan kemudian difiksasi dengan merendam limpa mencit dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan kedalam *meltd* paraffin : xylen = 1:1 selama 1 jam dan paraffin selama 2x1 jam. Kemudian dipotong dengan ketebalan 6µm. Hasil pemotongan diletakkan di gelas objek dilapisi dengan putih telur dan gliserol, dengan perbandingan,1:1. Gelas objek diletakkan di atas steamer hangat (agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan) kemudian dibiarkan kering dan

sediaan melekat erat (1 hari). Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan kedalam xylol selama 3x5 menit, dan dikeringkan (Fanet *al*, 2012).

4.8.3 Proses Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan kedalam larutan xylol (3 menit), etanol absolute (3 menit), etanol 90% (3 menit), etanol 80% (3 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit, larutan hematoksilin (6-7 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit, larutan pembiru (1 menit), air keran (1 menit), larutan eosin (1-5 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit, Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, beri entelan, tutup dengan *cover glass* dengan hati-hati agar tidak terdapat gelembung. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop. (Lab Patologi Anatomi FKUB, 2013).

4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diharapkan adalah jumlah neutrofil dari sel limpa. Semua pengamatan terhadap jumlah neutrofil limpa tersebut dilakukan secara manual dibawah mikroskop cahaya, 10x lapangan pandang dengan perbesaran 400x. Kemudian jumlah neutrofil, dianalisa menggunakan program SPSS 17.0 for Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dengan langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut: Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test* (*uji Least Significant Difference*).