

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental in vitro* dengan *randomized post test controlled group design*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh Ekstrak kulit manggis terhadap fungsi migrasi HUVECs yang dipapar LPS.

4.2 Sampel

4.2.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah kultur jaringan HUVECs. Umbilikus diperoleh dari persalinan melalui operasi caesar di Rumah Sakit Melati Husada.

4.2.2 Pemilihan Sampel

4.2.2.1 Kriteria inklusi

1. Didapatkan dari umbilikus kelahiran Sectio Caesaria (SC) elektif
2. Kehamilan fisiologis (normal)
3. Ibu dan bayi dalam kondisi sehat (tidak cacat)

4.2.2.2 Kriteria eksklusi

1. Kehamilan disertai infeksi (diperiksa oleh dokter yang bersangkutan di Rumah Sakit Melati Husada)
2. Kehamilan disertai hipertensi atau diabetes (diukur oleh dokter yang bersangkutan di Rumah Sakit Melati Husada)
3. Kehamilan disertai kondisi ketuban pecah dini (diperiksa oleh dokter yang bersangkutan di Rumah Sakit Melati Husada)

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:

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 fungsi migrasi dari HUVECs.

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 fungsi migrasi pada HUVECs dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Manggis yang digunakan 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 yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan cara merendam ekstrak kulit manggis yang telah dikeringkan di dalam metanol 96%, dibiarkan selama satu malam, disaring dan dilakukan proses evaporasi.
- c. Kultur sel endotel berasal dari vena umbilikus neonatus dengan persalinan *Sectio Cesarea*, yang kemudian diproses seperti pada

prosedur penelitian. Sel endotel dikultur dalam *well plate* kemudian diinkubasi. HUVECs siap diberi perlakuan setelah terbentuk *cobblestone* (*monolayer*) (3-4 hari) dengan ciri spesifik sel pada bagian tengah tampak bulat dan terang (menyala), bentuk sel pipih dengan jarak antara sel yang teratur dan rapat, dengan tingkat kerapatan (*confluence*) 70-80%. Jika sel hidup dan tidak terkontaminasi, nampak sel melekat (*adherens*) pada dasar media kultur dengan media jernih dan warna media merah bata.

- d. 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.
- e. Fungsi migrasi pada HUVECs diukur dengan metode *scratch/wound healing assay* pada setiap kelompok. Migrasi HUVECs dinilai dengan mengukur prosentase penyempitan lebar zona bebas sel pada HUVECs setelah 0 jam, 6 jam dan 24 jam setelah HUVECs diberi perlakuan. Migrasi HUVECs dinilai dengan mengukur prosentase penyempitan lebar zona bebas sel, dengan rumus: $\% \text{ migrasi HUVECs} = 100 - ([x/y] \times 100)\%$. Notasi x adalah lebar zona bebas sel setelah perlakuan, dan y adalah lebar zona bebas sel sebelum perlakuan. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop inverted yang terhubung komputer. Migrasi diukur dengan menghitung lebar zona bebas sel dari tepi ke tepi dengan penggaris di komputer. Penampakan migrasi sel dapat dilihat dengan menyempitnya zona bebas sel setelah rentang waktu tertentu. Besaran migrasi HUVECs dinyatakan dalam persen.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah kulit manggis yang telah diekstraksi, bahan untuk media *Cord solution* (HEPES, air, sodium hidrogen

bicarbonat, 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, gelas erlemeyer, corong gelas, labu evaporator, labu penampung metanol, evaporator, pendingin spiral/*rotary evaporator*, selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, *vacuum pump*.

Alat untuk kultur 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 dan pinset untuk menggores HUVECs dalam *scratch/wound healing assay*

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 (sample 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 metanol sampai volume 1000ml. Lalu dikocok sampai benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit). Didiamkan 1 malam sampai mengendap.

3. Proses evaporasi

Lapisan atas campuran metanol 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 90^o C), disambungkan dengan aliran listrik. Larutan metanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Ditunggu sampai aliran metanol 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 dan LPS

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian yang pernah dilakukan Khotimah *et al.* (2010). Pada penelitian itu, peneliti menguji potensi ekstrak metanol kulit manggis terhadap distribusi *asymmetryc dimethylarginine* (ADMA) pada HUVECs dalam kondisi glukosa tinggi. Konsentrasi ekstrak kulit manggis yang digunakan 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.

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi LPS 20 ng/ml berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lyons *et al.* (1992). Pada penelitian tersebut, konsentrasi LPS 20 ng/ml dapat mengakibatkan peningkatan produksi sitokin-sitokin proinflamasi oleh sel makrofag. Sitokin-sitokin proinflamasi ini pada akhirnya akan mengakibatkan stres oksidatif yang dapat menurunkan fungsi migrasi dari HUVECs (Aalst *et al.*, 2004; Corda *et al.*, 2001). Peneliti menggunakan dasar penelitian tersebut dalam penentuan konsentrasi LPS,

sehingga dapat mempresentasikan keadaan stres oksidatif akibat paparan LPS pada sel endotel.

4.7.3 Prosedur pembuatan medium Cord Solution

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 HUVECs

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 (Permatasari *et al.*, 2002; Nugrahenny *et al.*, 2012).

Larutan dipindahkan ke dalam *well* pada *plate 48-well* yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2%, kemudian dimasukkan pada inkubator 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 (Permatasari *et al.*, 2002; Nugrahenny *et al.*, 2012).

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. Lipopolisakarida 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*. HUVECs *monolayer* digores dengan ujung pinset, membentuk zona bebas sel dengan lebar ± 1 mm. Debris seluler dibersihkan kemudian diberi perlakuan ekstrak kulit manggis 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ dan 4 $\mu\text{g/ml}$ lalu diinkubasi selama 6 jam (CO 5%, 37°C).

4.7.7 Pengamatan fungsi migrasi HUVECs secara mikroskopis dengan *scratch/wound healing assay*

Fungsi migrasi HUVECs dinilai dengan mengevaluasi migrasi sel endotel (HUVECs) dengan metode *scratch/wound healing assay*. LPS pada HUVECs dicuci dengan *serum free media*. HUVECs *monolayer* digores dengan ujung pinset, membentuk zona bebas sel dengan lebar ± 1 mm. Debris seluler dibersihkan kemudian diberi perlakuan ekstrak kulit manggis 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ dan 4 $\mu\text{g/ml}$ diinkubasi selama 6 jam (CO 5%, 37°C) dan dilakukan observasi lagi setelah 24 jam (CO 5%, 37°C). Pengamatan migrasi HUVECs dilakukan setelah 6 jam dan 24 jam setelah HUVECs diberi perlakuan. Migrasi HUVECs dinilai

dengan mengukur prosentase penyempitan lebar zona bebas sel, dengan rumus: $\% \text{ migrasi HUVECs} = 100 - ([x/y] \times 100)\%$. Notasi x adalah lebar zona bebas sel setelah perlakuan, dan y adalah lebar zona bebas sel sebelum perlakuan. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop inverted yang terhubung komputer (Nugrahenny *et al.*, 2012).

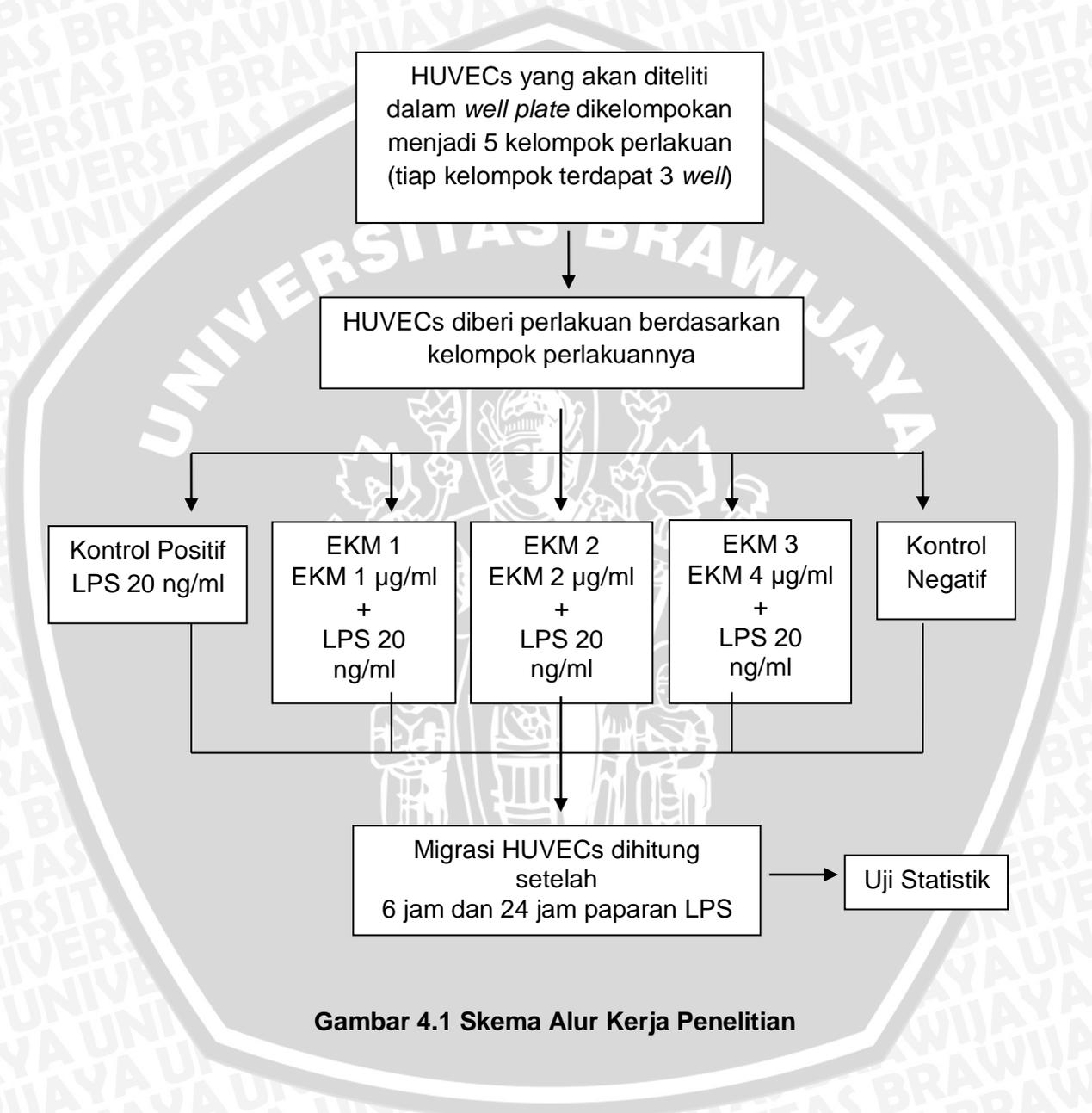
4.8 Pengolahan dan Analisis Data

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 *Paired Sample T Test* untuk mengetahui perbedaan antara migrasi HUVECs 6 jam dengan 24 jam.
- 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*. Apabila dalam pengujian tidak terpenuhi salah satu atau kedua asumsinya, maka alternatif pengujiannya dapat menggunakan pengujian nonparametrik khususnya uji *Kruskall Wallis*.
- Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbandingan prosentase migrasi HUVECs antara masing-masing kelompok.
- Uji *Kruskal-Wallis* sebagai ganti uji *One Way ANOVA* karena salah satu asumsi yang melandasi pengujian *One Way ANOVA* tidak terpenuhi.
- Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk menilai manakah kelompok yang berbeda bermakna dari hasil Uji *Kruskal-Wallis*.
- Uji *Post Hoc Tukey* digunakan untuk menilai manakah kelompok yang berbeda bermakna dari hasil tes ANOVA.

- Uji korelasi Spearman untuk melihat hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak kulit manggis dengan jarak migrasi HUVECs.

4.9 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian

