

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek, Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini yaitu mencit jantan (*Mus muscularis*) galur DDY.

Kriteria inklusi dan eksklusi subjek pada penelitian ini yaitu :

Kriteria inklusi:

- 1) Mencit jantan
- 2) Mencit sehat dengan ciri-ciri rambut bersih, tidak luka dan bergerak aktif
- 3) Usia 8-12 minggu
- 4) Berat badan sekitar 20-35 gram

Kriteria eksklusi:

- 1) Mencit pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
- 2) Mencit mengalami penurunan berat badan >10% selama masa adaptasi.

##### 3.1.2 Besar Sampel

Penentuan banyaknya jumlah sampel tiap kelompok perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer, yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

T : jumlah kelompok percobaan

N : jumlah pengulangan

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor, dan ditambahkan 1 ekor untuk menghindari dropout pada setiap kelompok, sehingga total mencit yang digunakan adalah 28 ekor mencit.

### 3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

- 1) Timbangan miligram
- 2) Kertas saring,
- 3) Rotary Evaporator,
- 4) Gelas kimia,
- 5) Gelas ukur
- 6) Disposablesyringe,
- 7) Mikropipet,
- 8) Tabung eppendorfdan
- 9) Mikrotip.
- 10) Frezeer -80°C

### 3.1.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

- 1) Akar alang-alang (*Imperata cylindrica L.*),
- 2) Mencit jantan galur DDY, pakan standar mencit dalam bentuk pelet (55% tepung jagung, 15% dedak padi, 15% bungkil kedelai, 10% tepung ikan, 4% minyak sayur dan 1% premix) dan air yang diberikan *ad-libitum*,
- 3) LPS,
- 4) Etanol,
- 5) Kit ekstraksi RNA,
- 6) RTPCR kit,
- 7) Real time PCR kit.

## 3.1 Metode Penelitian

### 3.2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental murni *in vivo* yang dilakukan pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY yang diinduksi LPS untuk membuat mencit dalam keadaan sepsis. Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu *randomized post test only controlled group*. Penelitian ini menguji efek ekstrak etanol akar alang-alang (*Imperata cylindrica L.*) pada mencit dalam keadaan sepsis.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel Bebas ( Independen)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol akar alang alang.

## 2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah gambaran PCR yang mengekspresikan TNF  $\alpha$  pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY.

## 3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah usia, jenis kelamin, berat badan, dosis LPS dan perawatan mencit.

### 3.2.3 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	TNF $\alpha$	Ekspresi TNF $\alpha$ yang diperiksa pada jaringan hepar	Peralatan lab	Ekspresi TNF $\alpha$	Rasio
2.	Konsentrasi ekstrak etanol akar alang-alang	Kadar ekstrak etanol akar alang-alang yang diberikan pada dua kelompok mencit. Kelompok 3: 90 mg/KgBB Kelompok 4: 115 mg/KgBB	Timbangan	Dosis ekstrak etanol akar alang-alang	Numerik

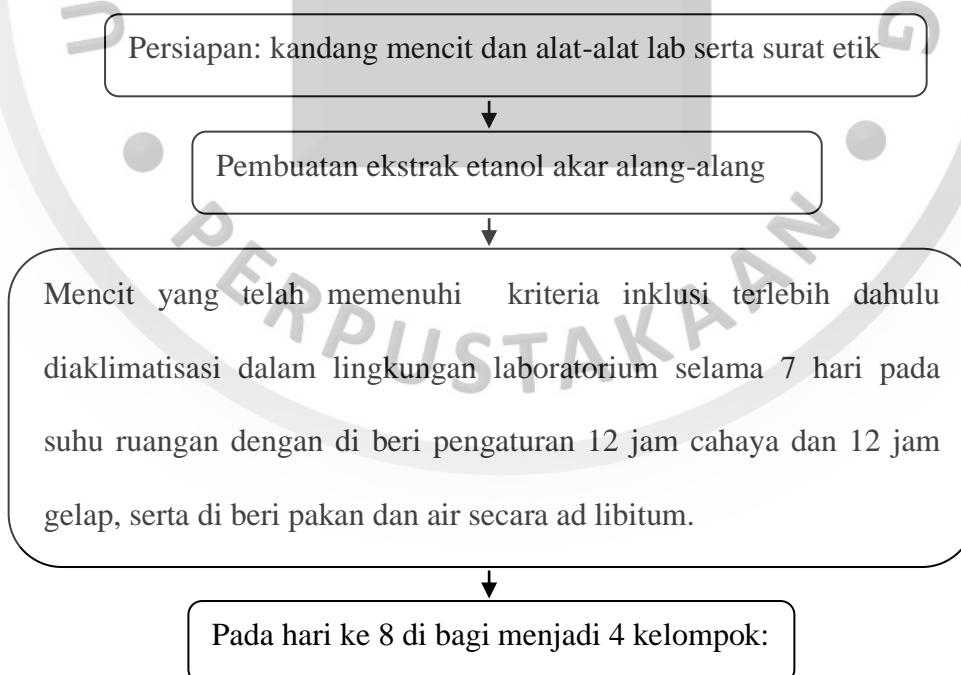
### 3.2.1 Prosedur Penelitian

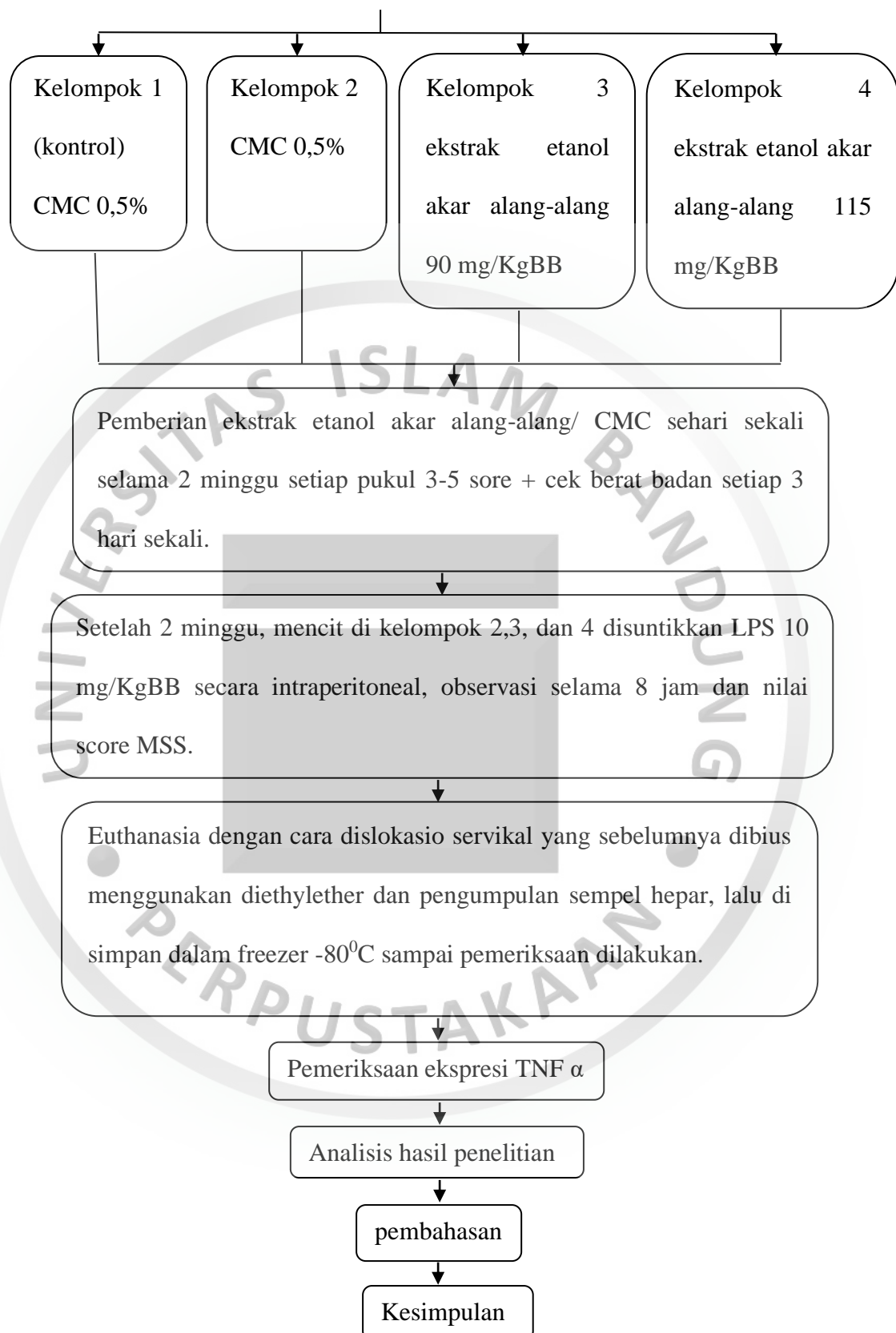
#### 3.2.4.1 Pembuatan Ekstrak akar Alang-alang (*Imperata Cylindrica L.*)

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode dasar maserasi, prosedur sebagai berikut:

- 1) Bahan baku akar alang-alang (*Imperata cylindrica L.*) yang sudah dikeringkan dan dihaluskan, kemudian dimaserasi dengan etanol 95% selama 3 x 24 jam pada suhu ruangan.
- 2) Setelah itu disaring dengan kertas saring dan dievaporasi dengan *vacuumrotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali.
- 3) Ekstrak kasar yang didapat disimpan dalam botol tertutup pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.4.2 Alur dan Prosedur Penelitian





### 3.1 Gambar Alur dan prosedur penelitian

**Tabel 3. 2 Murine Sepsis Score<sup>25</sup>**

<b>Variabel</b>	<b>Score and Description</b>
Appearance	0- Coat is smooth
	1- Patches of hair piloerected
	2- Majority of back is piloerected
	3-Piloerection may or may not be present, mouse appears “puffy”
Level of consciousness	4- Piloerection may or may not be present, mouse appears emaciated
	0- Mouse is active
	1- Mouse is active but avoids standing upright
	2- Mouse activity is noticeably slowed. The mouse is still ambulant
	3- Activity is impaired. Mouse only moves when provoked, movements have a tremor
	4- Activity severely impaired. Mouse remains stationary when provoked, with possible tremor

Activity	<p>0- Normal amount of activity. Mouse is any of: eating, drinking, climbing, running, fighting</p> <p>1- Slightly suppressed activity. Mouse is moving around bottom of cage</p> <p>2- Suppressed activity. Mouse is stationary with occasional investigative movements</p> <p>3- No activity. Mouse is stationary</p> <p>4- No activity. Mouse experiencing tremors, particularly in the hind legs</p>
Response to stimulus	<p>0- Mouse responds immediately to auditory stimulus or touch</p> <p>1- Slow or no response to auditory stimulus; strong response to touch (moves to escape)</p> <p>2- No response to auditory stimulus; moderate response to touch (moves a few steps)</p> <p>3- No response to auditory stimulus; mild response to touch (no locomotion)</p> <p>4- No response to auditory stimulus. Little or no response to touch. Cannot right it self if pushed over</p>
Eyes	<p>0- Open</p> <p>1- Eyes not fully open, possibly with secretions</p> <p>2- Eyes at least half closed, possibly with secretions</p> <p>3- Eyes half closed or more, possibly with secretions</p> <p>4- Eyes closed or milky</p>



Respiration rate	0- Normal, rapid mouse respiration
	1- Slightly decreased respiration (rate not quantifiable by eye)
	2- Moderately reduced respiration (rate at the upper range of quantifying by eye)
	3- Severely reduced respiration (rate easily countable by eye, 0.5 s between breaths)
	4- Extremely reduced respiration (>1 s between breaths)
Respiration quality	0- Normal
	1- Brief periods of laboured breathing
	2- Laboured, no gasping
	3- Laboured with intermittent gasps
	4- Gasping

### 3.2.4.3 Ekstraksi RNA

1. Potong sampel organ hepar kemudian dicacah dan letakkan pada cawan petri.
2. Hasil tumbukan organ diambil menggunakan mikropipet sebanyak satu kali sedotan dan masukkan kedalam tabung appendorf. Kemudian tambahkan reagen trizol 500  $\mu$ L dan vortex lalu diamkan.
3. Tambahkan cloroform 100  $\mu$ L dan vortex. Selanjutnya inkubasi selama 2-3 menit, dan setelahnya sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C kemudian ambil fasa aqua (supernatan) sebanyak 250  $\mu$ L dan pindahkan ke tabung baru.

4. Tambahkan isopropanol 250  $\mu$ L dan vortex, lalu inkubasi selama 10 menit dan setelahnya sentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada temperatur 4°C kemudian didapatkan prisipitat RNA berwarna putih dan buang supernatan.
5. Tambahkan etanol 70% 500  $\mu$ L dan vortex. Selanjutnya sentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 7.500 rpm 4°C kemudian buang cairan dengan menggunakan mikropipet dan keringkan di udara selama 5 menit.
6. Tambahkan RNA-se free water (OPC free water) 30  $\mu$ L dan pindahkan ke tabung yang lebih kecil lalu di kocok dan setelahnya di inkubasi selama 10 menit pada temperatur 55°C kemudian tingkat konsentrasi dan kemurnian RNA diukur dengan spektrofotometer 260-280 nm.<sup>24</sup>

#### 3.2.4.4 Tahapan PCR

Tabel 3.3 Tahapan PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
<i>Initial denaturation</i>	95°C	1 menit	1
<i>Denaturation</i>	95°C	15 detik	25-35
<i>Annealing</i>	User determined	15 detik	
<i>Extension</i>	72°C	10 detik	

#### 3.2.4.5 Pemeriksaan TNF $\alpha$ Hewan Uji

Total RNA diisolasi dari hepar menggunakan kit ekstraksi. Semi-kuantitatif RT-PCR dilakukan dengan kit RT-PCR sesuai dengan protokol kit. RNA disiapkan dengan re-transkripsi menggunakan oligo-dT dan dNTP, dan setiap sampel diproses dengan kit RT-PCR (TAKARA, Jepang). Realtime-PCR

dilakukan dengan menggunakan kit SYBR (Applied Biosystems, CA, USA) sesuai dengan instruksi kit, setelah itu dievaluasi menggunakan Light Cycler 480 Real-Time PCR (Roche, CA, USA). Tingkat ekspresi gen target dinormalisasi dengan level mRNA *glyceraldehyde – 3 – phosphatase dehydrogenase* (GAPDH). Urutan primer untuk kuantitatif. PCR real-time yang digunakan dalam penelitian ini tercantum dalam tabel 3.4.

**Tabel 3.4 Primers for Quantitative Real-Time PCR<sup>23</sup>**

Gen	Forward	Reverse
TNF $\alpha$	5'- CACAAGATGCTGGGACAGTGA	5'- TCCTTGATGGTGGTGCATGA
Mgapdh	AGCCCCAGTCTGTATCCTT	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

### 3.2 Analisis Data

Data hasil penelitian telah dianalisis secara statistik dengan metode *one-way* ANOVA. Bila hasil analisis varians menunjukkan perbedaan yang signifikan maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95%. Hipotesis diterima bila nilai  $p \leq 0,05$ .

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat dari penelitian ini telah dilakukan di laboratorium biokimia dan biomolekuler fakultas kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung dan laboratorium sentral Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung Sumedang KM. 21 Jatinangor selama 8 bulan, Januari 2019 sampai Agustus 2019.

### 3.4 Aspek Etik

Dalam pelaksanaan penelitian, peneliti dengan menggunakan hewan coba perlu memperhatikan beberapa aspek etika yang penting sebagai subjek penelitian dengan menggunakan prinsip 3R:

1. *Replacement*: sering diartikan sebagai penggunaan sistem tidak-hidup (mati) sebagai alternatif, misalnya, sebuah model manekin. Ini juga mencakup penggunaan kultur sel dan jaringan. Prinsip ini tidak memungkinkan untuk dilakukan dalam penelitian ini, karena mencit diperlukan untuk memperoleh tujuan peneliti.
2. *Reduction*: menurunkan jumlah hewan coba yang digunakan tanpa mengurangi informasi yang berguna. Hal ini mungkin dapat dicapai dengan melalui desain eksperimental yang baik, menggunakan statistik yang tepat yaitu, rumus Federer.
3. *Refinement*: memperlakukan hewan coba secara manusiawi dan memelihara dengan baik sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba hingga akhir studi dengan meminimalisir perlakuan yang menyakiti hewan coba dengan memberikan masa adaptasi, kemudian pemberian makan dan minum yang bernutrisi serta menjaga kebersihan kandang.

### 3.5 Dummy Table

3.5 Tabel Ekspresi TNF  $\alpha$

Kelompok	Mencit	TNF $\alpha$ Pada PCR	Mean	Uji ANOVA
I	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
II	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
III	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
IV	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			