

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/ Objek/ Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah organ hepar yang didapatkan dari bahan baku tersimpan (BBT) pada mencit jantan (*Mus musculus*) yang sebelumnya telah diberikan ekstrak etanol akar alang-alang kemudian diinduksikan LPS sehingga mencit ada dalam keadaan sepsis.

3.1.2 Penentuan Besar Sample

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

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. 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 BBT organ hepar yang digunakan tiap kelompok percobaan yang diambil dari 6 ekor mencit, lalu ditambahkan 1 sampel BBT organ hepar mencit dari setiap kelompok untuk cadangan, jumlah BBT organ hepar mencit yang digunakan adalah 4 kelompok, sehingga penelitian ini menggunakan BBT organ hepar dari 28 ekor mencit.

3.1.3 Alat Penelitian

1. kit ekstraksi RNA,
2. RTPCR kit,
3. Real time PCR kit
4. Template DNA yang berfungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama, dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid yang semuanya mengandung fragmen DNA target yang dituju.
5. Primer yang berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan dilakukan amplifikasi.
6. dNTP (deoxynucleotide triphosphates) yang bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi.
7. Buffer PCR untuk menjamin PH medium.
8. Enzim polimerasi DNA yang berfungsi sebagai katalis untuk reaksi polimerasi DNA³⁰

3.1.4 Bahan Penelitian

1. DNA cetakan yaitu fragmen DNA yang akan diperbanyak dengan memperhatikan kemurnian dan kualitasnya;
2. Enzim DNA *polymerase* yang tahan panas;
3. satu pasang primer oligonukleotida yang terdiri atas 18–28 basa nukleotida;
4. Larutan penyangga yaitu *buffer* yang mengandung 10–50 Mm tris-HCL pH 8,3–8,8, 50 Mm KCL, 0,1% gelatin, triton x-100 0,1%, 1,5 Mm Mgcl₂, dan air;
5. *Deoxyribonucleotida trifosfat* (dNTP) yang dibutuhkan untuk reaksi *polymerase*.³⁰

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium *in vivo* dengan menggunakan desain penelitian *randomized post test only controlled group*. Dilakukan pada 4 kelompok BBT hepar dari mencit jantan (*Mus musculus*) galur DDY untuk menguji efek pemberian ekstrak etanol akar alang-alang (*Imperata cylindrica L.*) terhadap ekspresi gen Interleukin-1 dalam keadaan sepsis.

3.2.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.2.2.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak ethanol akar alang-alang (*Imperata Cylindrica L.*)

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah gambaran PCR pada mencit (*Mus musculus*)

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah usia, jenis kelamin, berat badan, kandang, dan perawatan mencit

3.2.2.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Gen IL-1	Ekspresi gen IL-1 yang diperiksa pada jaringan hepar	Peralatan Lab	Ekspresi gen	Rasio

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Pemeriksaan Gen IL-1B dengan Metode PCR.

Tahapan PCR meliputi tiga siklus yang berulang dalam 30–40 siklus untuk memperoleh DNA rantai ganda yang baru. Berikut tahapan PCR.

1. *Denaturasi*: Denaturasi DNA adalah proses pemecahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal pada suhu 94–95°C.
2. *Annealing*: *Annealing* adalah penempelan primer pada DNA untai tunggal hasil dari proses denaturasi pada suhu 36–72°C dengan waktu 30–45 detik.
3. *Extension*: *Extension* merupakan pemanjangan primer dengan bantuan taq *polymerase* pada suhu 72°C dengan waktu satu sampai lima menit untuk mendapat salinan DNA yang baru³¹

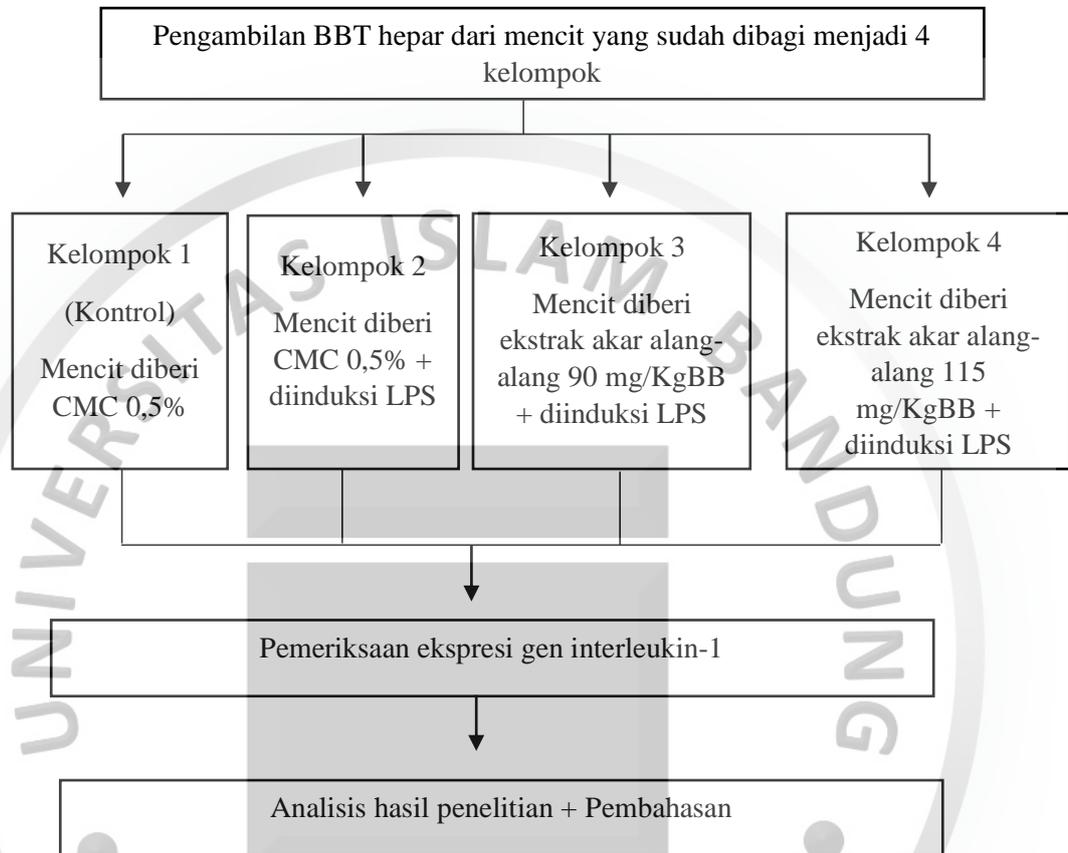
3.2.3.2 Pemeriksaan Gen IL-1 Pada Hewan Uji

Total RNA diisolasi dari hepar menggunakan kit ekstraksi. Semi-kuantitatif RT-PCR dilakukan dengan kit RT-PCR sesuai dengan protokol kit. RNA disiapkan dengan retranskripsi 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, dan kemudian dievaluasi menggunakan LightCycler 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 3.3

Tabel 3.3 Primer PCR Gen IL-1B

	Forward	Reverse
mIL-1	5'-AACCTGCTGGTGTGTGACGTTTC	5'-CAGCACGAGCTTTTTTGTGTTGT
mGAPDH	AGCCCCAGTCTGTATCCTT	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

3.2.3.4 Alur Penelitian



3.2.4 Analisis Data

Data yang akan didapat pada penelitian ini berupa perbandingan ekspresi gen dalam setiap kelompok mencit yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna dari jumlah ekspresi gen ini maka data akan dianalisis secara statistik dengan metode *one-way* ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk menguji perbedaan rata-rata jumlah ekspresi gen diantara 4 kelompok perlakuan.

3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Dalam penelitian yang menggunakan binatang coba terdapat beberapa aspek penting yang perlu diperhatikan dalam etika penggunaan binatang coba dengan memperhatikan konsep 3R (Replacement, Reduction, Refinement) yang dikombinasikan dengan prinsip 5F (Freedom from hunger and thirst, freedom from discomfort, freedom from pain, injury and disease, freedom from fear and distress, freedom to express natural behaviour).

1. Refinement : Refinement adalah memberikan perlakuan dengan baik pada hewan coba, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisir perlakuan yang bersifat menyakitkan. Kesejahteraan hewan coba harus dijamin sampai akhir penelitian terdapat 3 prinsip dalam refinement:

- A. Hewan uji dipastikan tidak merasa lapar atau haus, memastikan bahwa akses makanan dan minuman sesuai dengan jumlah yang memadai, pastikan bahwa komposisi nutrisi untuk kesehatan hewan uji.
- B. Berikan lingkungan yang bersih dan pastikan kondisi lingkungan sesuai dengan factor biologi hewan uji yang dipilih seperti; siklus cahaya, suhu, kelembaban, dan fasilitas fisik seperti ukuran kandang
- C. Hewan uji bebas dari rasa nyeri dan penyakit. Jika hewan uji mengalami suatu penyakit makan dapat dilakukan pengobatan jika diperlukan. Pengobatan dipastikan tidak mengganggu jalannya penelitian. Pada penelitian ini hewan uji akan dibuat sepsis sehingga tidak dapat terus-

menerus terbebas dari rasa sakit, setelah itu hewan uji dilakukan euthanasia dengan cara dislokasi servikal, namun terlebih dahulu diberikan obat bius dengan *dietyl ether secara* inhalasi untuk mengurangi rasa sakit.

2. Replacement : Replacement terbagi menjadi dua bagian, yaitu:

- A. Relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ atau jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah)
- B. Absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel atau jaringan)

Namun prinsip ini tidak memungkinkan untuk dilakukan dalam penelitian ini, karena keperluan memanfaatkan mencit sebagai hewan percobaan sudah diperhitungkan untuk memperoleh tujuan penelitian.

3. Reduction: Meminimalisasikan jumlah subjek penelitian untuk mendapatkan hasil penelitian seoptimal mungkin. Rumus Federer merupakan perhitungan yang umumnya digunakan pada penelitian eksperimental.³²