

BAB 4

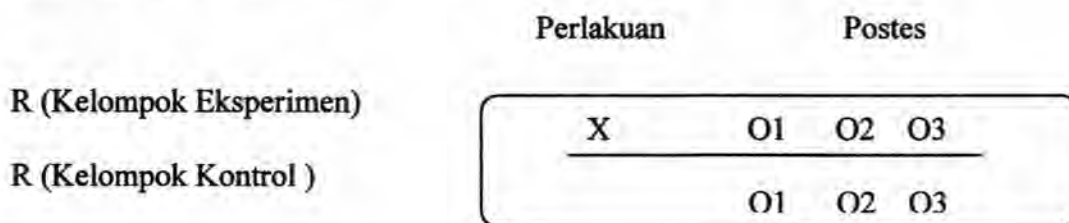
METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *True Experimental Randomized Postest Only Control Group Design* (Notoatmojo, 2002).



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

R = Randomisasi

Kelompok eksperimen adalah makrofag yang telah diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan diberi Andrographolide 100 μ g/ml.

Kelompok kontrol adalah makrofag yang telah diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan tanpa diberi Andrographolide 100 μ g/ml.

X = Pemberian Andrographolide 100 μ g/ml.

O1 = Hasil pengamatan pengecatan Akridine Orange dan kultur *Mycobacterium tuberculosis* pasca ingesti.

O2 = Hasil pengamatan pengecatan Akridine Orange dan kultur *Mycobacterium tuberculosis* setelah 24 jam pembunuhan intraseluler

- 03 = Hasil pengamatan pengecatan Akridine Orange dan kultur *Mycobacterium tuberculosis* setelah 72 jam pembunuhan intraseluler

4.2 Kriteria dan Ukuran Sampel

4.2.1 Kriteria Sampel

Sampel adalah makrofag manusia yang diperoleh dengan melakukan kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) dari darah individu sehat relawan yang bekerja sebagai *cleaning service* di *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya.

Makrofag yang telah dikultur dari PBMC dibagi secara acak menjadi dua kelompok, yaitu :

- a. RKK = makrofag yang digunakan sebagai kontrol uji daya bunuh intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis* tanpa perlakuan pemberian Andrographolide
- b. RKE = makrofag yang mendapat perlakuan pemberian Andrographolide 10 µg/ml dan kemudian dilakukan uji daya bunuh intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

4.2.2 Ukuran Sampel

Jumlah makrofag yang digunakan untuk tiap pengulangan atau replikasi adalah 10^5 sel/ml (Zhang *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002). Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer

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

$$(8 - 1) (u - 1) \geq 15$$

$$7(u - 1) \geq 15$$

$$7u - 7 \geq 15$$

$$7u \geq 15 + 7$$

$$u \geq 22/7$$

$$u \geq 3$$

$$u = 3$$

Keterangan : p = perlakuan = 8 perlakuan

u = ulangan

Jadi ulangan untuk tiap perlakuan adalah tiga kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

- a. Variabel bebas terdiri dari (1) pemberian Andrographolide 100 µg/ml dan (2) waktu pembunuhan intraseluler pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam 72 jam.
- b. Variabel tergantung adalah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh pada media Middlebrook 7H10 dan rerata % makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada pengecatan dengan Acridine Orange.
- c. Variabel kendali terdiri dari jumlah *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv yang dipaparkan ($1,5 \times 10^5$ CFU/ml), jumlah sel makrofag yang digunakan (10^5 sel/ml).

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

- a. Andrographolide adalah senyawa diterpen laktone yang diperoleh dari tanaman *andrographis paniculata* yang diberikan pada tiap sumuran sebanyak 100 µg/ml.
- b. CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* adalah rerata koloni karakteristik yang masih dapat tumbuh pada media Middlebrook 7H10 dari lisis makrofag pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.
- d. Rerata % makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada pengecatan dengan Acridine Orange dengan pengamatan pada mikroskop fluorescein dan tampak berwarna orange.
- c. Waktu pembunuhan intraseluler adalah waktu yang diperlukan oleh makrofag untuk melakukan pembunuhan intraseluler setelah diaktifasi dengan Andrographolide pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan dan alat untuk persiapan Andrographolide

Bahan dalam persiapan Andrographolide adalah ethanol, DMSO, PBS, dan kristal Andrographolide yang diperoleh dari Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK. Sedangkan alat yang diperlukan adalah, mikropipet, tabung eppendorf, filter milipore, dan vortex.

4.4.2 Bahan dan alat untuk persiapan makrofag

Bahan dalam persiapan makrofag adalah gelas beads, Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 (Sigma), media Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

1640 (Merck), *heat inactivated human serum* 10%, Penisilin, kapas dan alkohol 70% untuk desinfeksi, larutan Giemsa untuk pengecatan pada hitung makrofag, larutan tripan biru untuk menghitung viabilitas sel, Ficoll-Histopaque (Sigma). Sedangkan alat yang digunakan adalah spuit 20 cc, size filter, jarum 21 G, tabung sentrifus conical polipropilen 15 dan 50 ml, pipet Pasteur, mikropipet, bilik hitung Neubauer dan pipet lekosit, 24 *Well tissue culture plate* (Nunc Ltd), Coverslip, sentrifus, dan labu erlenmeyer steril, inkubator CO₂, mikroskop *inferted*.

4.4.3 Bahan dan alat untuk persiapan kuman *Mycobacterium tuberculosis*

Bahan dalam persiapan kuman *Mycobacterium tuberculosis* adalah, media Lowenstein-Jensen (LJ) (Merck), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma), kuman *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (ATCC 27294^T) yang diperoleh dari Laboratorium Tuberculosis *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Surabaya, *Fresh Pooled human serum* 10%, dan medium cair Middlebrook 7H9. Sedangkan alat yang digunakan adalah tabung screw cap steril, *glass bead*, ose platina, jarum tuberkulin 26G, mikropipet, sentrifus, *refrigerator*, dan bunsen.

4.4.4 Bahan dan alat untuk Uji Kemampuan Daya bunuh Intraseluler

Bahan yang digunakan untuk uji kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag adalah Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma), *heat inactivated human serum* 10%, aquabides steril, media Middlebrook 7H10 (Merck), larutan cat Acridine Orange. Sedangkan alat yang digunakan adalah tabung polypropylene 15 ml, sentrifus, mikropipet, tabung screw cap, tabung endorf 2 ml, refrigerator, vortex, inkubator CO₂, dan mikroskop fluorescein.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Tropical Disease Center (TDC)* Universitas Airlangga Surabaya.

4.5.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2007 hingga bulan Januari 2008

4.6 Metode Penelitian

4.6.1 Persiapan larutan Andrographolide

- a. 10 mg Andrographolide dilarutkan dalam 1 ml DMSO kemudian diencerkan dengan PBS sampai diperoleh konsentrasi 100 µg tiap 50 µl larutan.

4.6.2 Persiapan Makrofag

- a. PBMC diperoleh dari individu sehat yang bekerja sebagai *cleaning service* di *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya masing-masing diambil 20 ml dari vena cubiti dengan cara *venapuncture* secara aseptik menggunakan syringe.
- b. Darah yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang berisi gelas beads dan sudah di steril sambil digoyang perlahan selama 15 menit.
- c. Darah setelah defibrinasi kemudian dicampur dengan PBS steril (1 : 1) di dalam tabung sentrifus polipropilen 50 ml, digoyang perlahan hingga

- campuran homogen, lalu dilakukan pemisahan sel mononuklear dengan mengalirkan campuran darah tersebut menggunakan pipet Pasteur secara perlahan-lahan pada dinding tabung yang terisi 20 ml Ficoll- Histopaque 1077 (Sigma) pada temperatur kamar .
- d. Campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit pada temperatur kamar.
 - e. Setelah sentrifugasi, dengan menggunakan pipet Pasteur, lapisan atas dipindahkan sampai sekitar 5 mm dari lapisan opaque (*buffy coat*) yang mengandung sel mononuklear. Lapisan atas dibuang.
 - f. Dengan hati-hati lapisan *opaque* tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifus conical 15 ml dengan menggunakan pipet Pasteur.
 - g. Membilas sel-sel tersebut sebanyak tiga kali dengan menggunakan phosphate buffer saline (1 : 1) pH 7,4 dan disentrifus pada 1500 rpm selama 10 menit temperatur kamar. Pellet yang dihasilkan kemudian diresuspensikan pada PBS.
 - h. Kemudian dilakukan pengujian dan penghitungan viabilitas sel-sel pada suspensi tersebut dengan metode eksklusi tripan biru . Sel-sel yang melekat pada tabung ini 90 – 95% adalah mononuklear (dilihat dengan pengecatan Giemsa).
 - i. Cara menghitung persentase monosit dalam mononuklear dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000 x dengan melihat 100 lapang pandang secara beraturan. Hasil persentase monosit yang didapatkan kemudian dikalikan dengan hasil pengujian viabilitas menggunakan tripan biru, sehingga didapatkan angka konsentrasi monosit/ml *buffy coat*.

Konsentrasi monosit yang dimasukkan ke dalam masing-masing *well* adalah 10^5 sel/ml.

- j. Monosit dikultur pada 24 *well tissue culture plate* yang dasarnya telah dilapisi coverslip diameter 15 mm. Resuspensi sel yang telah dibilas ditetaskan 200 μ l pada masing-masing *well* tepatnya pada coverslip (nunc, Inc), kemudian diinkubasikan selama 30 - 60 menit pada inkubator CO₂ 5%.
- k. Masing-masing *well* kemudian diisi media RPMI 1000 μ l yang disuplementasi dengan 10% *heat inactivated human serum* dan 100 IU/ml Penisilin.
- l. 24 *well tissue culture plate* dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5%. Setiap hari diganti medianya.
- m. Kultur PBMC ini diinkubasi sampai 7 hari untuk memungkinkan diferensiasi monosit menjadi makrofag. Tiap-tiap *well* mengandung 10^5 sel makrofag
- n. Pada kelompok makrofag yang mendapat perlakuan, saat hari ke enam dimana monosit telah berdiferensiasi menjadi makrofag (maturasi telah tercapai), ke dalam medium ditambahkan 100 μ g/ml Andrographolide .
- o. Setelah 24 jam pemberian Andrographolide, kultur dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali, dan yang terakhir diberi media RPMI yang mengandung 10% *inactivated human serum*.

4.6.3 Persiapan Kuman

- a. Kuman *Mycobacterium tuberculosis* ditanam dalam media Lowenstein-Jensen dan diinkubasi selama 2 – 3 minggu (fase logaritmik).
- b. Siapkan tabung *screw cap* steril yang diisi 6 buah *glass beads* dan 5 ml Middlebrook 7H9.

- c. Ose (diameter 3 mm) dipijarkan, dinginkan sesaat, kemudian diambil koloni *Mycobacterium tuberculosis* dalam media Lowenstein-Jensen sebanyak satu ose dengan cara menekan ose ke dinding tabung sehingga koloni yang diambil tepat satu lubang ose. Koloni yang terambil tersebut dimasukkan ke dalam 5 ml Middlebrook 7H9 yang telah disiapkan.
- d. Vortex sampai homogen. Kekeruhan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* ini disetarakan dengan Standar Mc.Farland 0,5 dan didapatkan estimasi konsentrasi *Mycobacterium tuberculosis* $1,5 \times 10^7$ CFU/ml. Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* divortex kembali, diamkan satu menit sehingga *clump* ke bawah dan bagian atas suspensi tampak homogen.
- e. Dilakukan pengenceran *Mycobacterium tuberculosis* satu kali dengan mengambil suspensi 500 μ l dan ditambahkan ke dalam 4500 μ l Middlebrook 7H9. Vortex hingga homogen dan lewatkan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* tersebut pada jarum tuberkulin 26G sebanyak 10 – 15 kali.
- f. Suspensi tersebut disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm, selama 10 menit pada temperatur 4⁰C.
- g. Pellet dibilas dengan PBS hangat (37⁰C), vortex, lalu sentrifus 3500 rpm, selama 10 menit, temperatur 4⁰C.
- h. Pellet yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* diopsonisasi dengan *fresh pooled human serum* 10% dan PBS (50% : 50% v/v) selama 20 menit pada 37⁰C, kocok perlahan dan inkubasi ke dalam inkubator CO₂ 5%
- i. Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* kemudian disentrifus lagi, pellet dibilas dengan PBS dua kali dan terakhir *tuberculosis* diresuspensikan ke dalam 5 ml medium RPMI.

4.6.4 Pengujian Daya bunuh Intraseluler oleh Makrofag

- a. Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* dipipet 200 μ l dan ditambahkan pada tiap well yang sudah terisi 1800 μ l media RPMI yang disuplementasi dengan 10% *heat inactivated human serum*. Konsentrasi *Mycobacterium tuberculosis* yang diinfeksi adalah $1,5 \times 10^5$ CFU/ml. Inkubasi 1 jam pada 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Tiap well kemudian dicuci dengan RPMI dua kali untuk memisahkan *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak diingesti.
- b. Sel-sel yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* teringesti diinkubasi selama 24 jam dan 72 jam dalam RPMI yang mengandung 10% *heat inactivated human serum* dan penisilin 100 IU/ml pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% untuk memberi kesempatan daya bunuh intraseluler.
- c. Setelah pasca ingesti, media disedot kemudian dicuci dengan PBS, coverslip dikerok agar makrofag yang menempel lepas, kemudian ditambah aquabidest dingin 1000 μ l (dilakukan 2 x), pindahkan dalam tabung steril.
- d. Sentrifus 1000 rpm selama 6 menit, 4°C. Supernatan dibuang, diganti aquabidest dingin 1000 μ l.
- e. Inkubasi 30 menit dalam suhu 4°C, lalu dikocok kuat (vortex) agar makrofag lisis. *Mycobacterium tuberculosis* yang terbebas dari makrofag yang telah lisis kemudian dikultur pada medium Middlebrook 7H10 masing-masing 200 μ l, serta diinkubasi selama 1 minggu untuk mengetahui jumlah kuman yang masih hidup.
- f. Diamati pertumbuhan koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* setiap minggu. Bila ada koloni karakteristik tumbuh dilakukan identifikasi lebih

lanjut dengan pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen dan uji akumulasi Niasin. Tes akumulasi niasin dilakukan untuk identifikasi spesifik strain *Mycobacterium tuberculosis* dan pewarnaan Ziehl-Neelsen untuk identifikasi bakteri tahan asam.

- g. Pertumbuhan koloni karakteristik dinyatakan dengan *Colony Forming Unit* (CFU)/ml.
- h. Pada *well* yang lain pelet diwarnai menggunakan akridin orange 0,5 % kemudian dilihat di bawah mikroskop fluorescein. Jumlah makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (berwarna orange) dihitung dan dinyatakan dalam prosen.
- i. Pada poin c dan h dilakukan juga pada *well* yang diinkubasi selama 24 jam dan 72 jam.
- j. Perlakuan pada poin c dan h dilakukan juga pada *well* sebelum pasca ingesti.

4.7 Teknik Analisis Data

Data hasil pengamatan dicatat dan ditabulasikan, kemudian dianalisis menggunakan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5% (Sudjana, 1996). Selanjutnya dilanjutkan dengan uji HSD menggunakan SPSS for *Windows rel 13* (Santoso, 2000).

