

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian desain eksperimen laboratoris. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai model infeksi dengue. Penelitian dilakukan dengan diinfeksi virus ke tubuh tikus kemudian dilihat keberadaan protein virusnya pada beberapa perlakuan.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian dan pengolahan analisis data dilakukan pada november 2023 – januari 2024.
2. Tempat penelitian di Laboratorium Parasitologi FKMK Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Imunoserologi Universitas Setia Budi.

C. Subyek dan Sampel Penelitian

1. Subyek

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FKMK Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 2 bulan berjumlah 20. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 3 kelompok perlakuan 1 diberi 0,8 g/0,2 KgBB, perlakuan 2 diberi 1,6 g/0,2 KgBB, perlakuan 3 diberi 3,2 g/0,2 KgBB dan 2 kelompok sebagai kontrol negatif hanya dengan akuades dan kontrol positif diinfeksi virus dengue 3 (DEN-3). Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel independet (variabel bebas) adalah dosis ekstrak *Ganoderma lucidum* yaitu 0,8 g; 1,6 g; 3,2 g/0,2 KgBB.
2. Variabel dependent (Variabel terikat) adalah keberadaan protein virus dengue pada sel leukosit dari sampel darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca infeksi dengue 3.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur
1	Keberadaan protein virus DEN-3 pada sel leukosit	Protein-protein utama yang terkait dengan virus dengue 3 termasuk protein struktural dan non struktural.	Manual sediaan apusan darah tipis
2	Dosis ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i>	Jumlah tertentu zat aktif triterpenoid yang diberikan dalam bentuk cairan secara intravena pada ekor tikus putih dengan variasi dosis tertentu.	S spuit tuberculin ukuran 1 mL

F. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan elektrik, tabung batang pengaduk, beaker glass, botol kaca 100 mL, tabung mikropipiler, *object glass*, *deck glass*, pipet tetes, label, mikroskop, *syringe*, *staining rack*, termometer rektal.
2. Bahan yang diperlukan adalah darah tikus putih, Ekstrak: *Ganoderma lucidum*, Virus DEN-3, akuades, *Phosphate buffere saline (PBS)*, *absolute methanol*, *hydrogen peroxyde*, antibodi monoklonal DSSE10, *Star Trek Universal HRP Detection System KIT* yang terdiri dari *Background Sniper*, *Trekkie Universal Link*, *Trekavidin-HRP Label*, *Betazoid Diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromgen* dan *Betazoid DAB Substrate Buffer*, pewarna *Mayer Hematoxylin*, alkohol, entelan.

G. Prosedur Penelitian

Pengurusan surat izin penelitian diajukan ke FKKMK Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan pengajuan *Ethical Clearance (EC)* ke Komite Etik Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

1. Tahap Pra-analitik

- a. Pengambilan bahan.

Ganoderma lucidum didapat di daerah Purworejo, Jawa Tengah dan daerah Gunung Kidul, DIY Yogyakarta.

- b. Pembuatan ekstrak *Ganoderma lucidum* dengan metode maserasi.

Jamur *Ganoderma lucidum* alami sebanyak 5 kg dijemur dan dikeringkan dan didapatkan 1.5 kg jamur kering, kemudian dilakukan proses penyerbukan menggunakan blender sehingga didapatkan 80 gram serbuk jamur. Serbuk *Ganoderma lucidum* sebanyak 80 gram dimasukkan kedalam botol maserasi yang berwarna gelap direndam dengan etanol 70% sebanyak 200 mL dan disimpan ditempat yang gelap sambil sesekali diaduk, setelah 5 hari dilakukan penyaringan menggunakan kain flanel. Hasil maserasi dilakukan evaporasi dengan alat rotari evaporator (40°C dengan kecepatan 50 rpm) dengan tujuan untuk menguapkan pelarutnya hingga berupa ekstrak kental.

- c. Perhitungan dosis ekstrak *Ganoderma lucidum*.

Dosis ekstrak *Ganoderma lucidum* yang digunakan pada penelitian yaitu konversi dosis manusia ke tikus 0,8 gr; 1,6 gr; 3,2 gr/0,2 KgBB terdapat pada lampiran 3.

- d. Persiapan dan aklimatisasi tikus putih (*Rattus novergicus*).

Tikus putih yang digunakan dengan berat 200-250 gram dan diaklimatisasi selama 7 hari.

- e. Perawatan dan pemeliharaan.

Pemeliharaan dan perawatan tikus putih meliputi pemilihan kandang, suhu, kelembapan, pemberian pakan dan air serta pemeriksaan rutin kesehatan dan kebersihan kandang.

- f. Infeksi virus dengue.

Supernatan virus DEN-3 yang berasal dari kultur sel C6/36 yang telah diinfeksi virus DEN-3 dengan masa inkubasi 4 hari, digunakan sebagai sumber isolat virus DEN-3. Virus DEN-3 diambil dengan *syringe* sebanyak 50 µl dan diinjeksikan ke dalam vena tikus putih perlahan-lahan. Tikus putih yang sudah diinfeksi, dikeluarkan dari tabung dan dimasukkan dalam kandang pemeliharaan.

- g. Pemberian ekstrak *Ganoderma lucidum* dengan 3 variasi dosis 0,8 gr; 1,6 gr; 3,2 gr/0,2 KgBB yaitu pemberian 2

kali sehari sebanyak 2 mL setelah infeksi virus dengue 3 hari ke-4 sampai dengan hari ke-10.

2. Tahap Analitik

a. Pengambilan darah tikus putih.

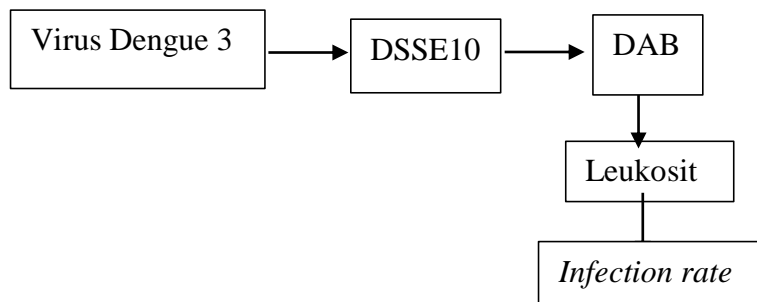
Darah tikus diambil melalui mata (sinus orbital) menggunakan tabung hematokrit. Darah diambil pada hari ke-10 pasca infeksi.

b. Pembuatan apusan darah tipis.

Darah ditetaskan pada bagian tengah obyek glass yang bersih. Sediaan darah tipis dibuat dengan cara menempelkan ujung obyek glass yang lain pada tetes darah kecil sampai darah menyebar sepanjang ujung obyek glass dengan membentuk sudut 45° . Obyek glass digeser dengan cepat ke arah yang berlawanan, sehingga didapatkan sediaan apusan diamkan pada suhu kamar selama 1 jam kemudian di hemolisis dengan cara dicuci menggunakan akuades dan ditiriskan. Preparat kemudian difiksasi menggunakan metanol dingin selama 3 sampai 5 menit. Preparat selanjutnya didiamkan pada suhu kamar dan dilanjutkan dengan pewarnaan imunohistokimia. Preparat di simpan pada freezer dengan suhu -80°C bila pewarnaan tidak langsung dikerjakan.

c. Deteksi protein NS3 dengan metode pewarnaan imunohistokimia :

Hubungan antara DAB - DSSE10 – Leukosit - *Infection Rate*



Gambar 3.1 Hubungan antara DAB - DSSE10 – Leukosit - *Infection Rate*

Diagram ini menggambarkan proses deteksi protein virus dengue 3 menggunakan metode imunohistokimia. Protein virus dengue 3 sebagai target protein diidentifikasi menggunakan antibodi spesifik DSSE10 yang dikembangkan untuk mengikat protein virus dengue 3. Reagen pewarna DAB ditambahkan untuk visualisasi bertujuan untuk memberikan warna pada sel leukosit yang mengandung virus dengue. Antibodi DSSE10 setelah berikatan dengan protein virus dengue menunjukkan sel leukosit berwarna coklat dari reagen DAB yang menunjukkan keberadaan protein virus dengue 3 dan digunakan untuk melihat gambaran keberadaan virus dengue. Gambaran sel leukosit digunakan untuk mengevaluasi efek dari perlakuan *Ganoderma lucidum* berpengaruh pada penurunan atau perubahan ekspresi protein virus dengue 3 sehingga mempengaruhi tingkat infeksi virus.

Pewarnaan imunositokimia/ imunohistokimia menggunakan metode yang dikembangkan oleh Umniyati, 2009 dalam Wahono & Umniyati, 20018. Preparat yang sudah difiksasi dicuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit kemudian dicuci dengan air kran. Preparat diinkubasi dalam *Background Sniper Solution* (protein blocker) selama 10-15 menit pada suhu kamar. Preparat kemudian ditetesi antibodi monoklonal DSSE 10 sebanyak 20 µl kemudian diinkubasi selama 60 menit. Untuk kontrol negatif, antibodi monoklonal diganti dengan PBS. Preparat dicuci dengan PBS selama 2 menit sebanyak 2 kali kemudian ditambahkan 20 µl antibodi sekunder *biotinylated universal* (*Trekkie Universal Link*) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15-20 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS selama 2 menit sebanyak 2 kali. Preparat diinkubasi dalam *streptavidin peroxidase complex* (*TrekAvidinHRP reagent*) selama 10 menit kemudian dicuci lagi sebanyak 2 kali masing-masing selama 2 menit. *DAB chromogen substrate* disiapkan dengan melarutkan 1 µl *Betazoid DAB Chromogen*

dengan 600 µl *Betazoid DAB Substrate Buffer* segera sebelum dipakai. Preparat diinkubasi dalam 20 µl *Chromogen DAB Substrate* selama 10 menit kemudian dicuci dengan akuades. Preparat diinkubasi dengan pewarna *Mayer hematoxylin* selama 1-3 menit kemudian dicuci dengan air kran dilanjutkan pencucian dengan PBS. Preparat dicuci lagi dengan air kran kemudian dicuci dengan H₂O₂. Preparat didehidrasi dengan alkohol absolut dan *xylene* masing-masing sebanyak 3 kali kemudian dikering anginkan. Preparat di beri mounting media (entellan) kemudian ditutup dengan *deck glass*. Preparat siap diamati dengan mikroskop.

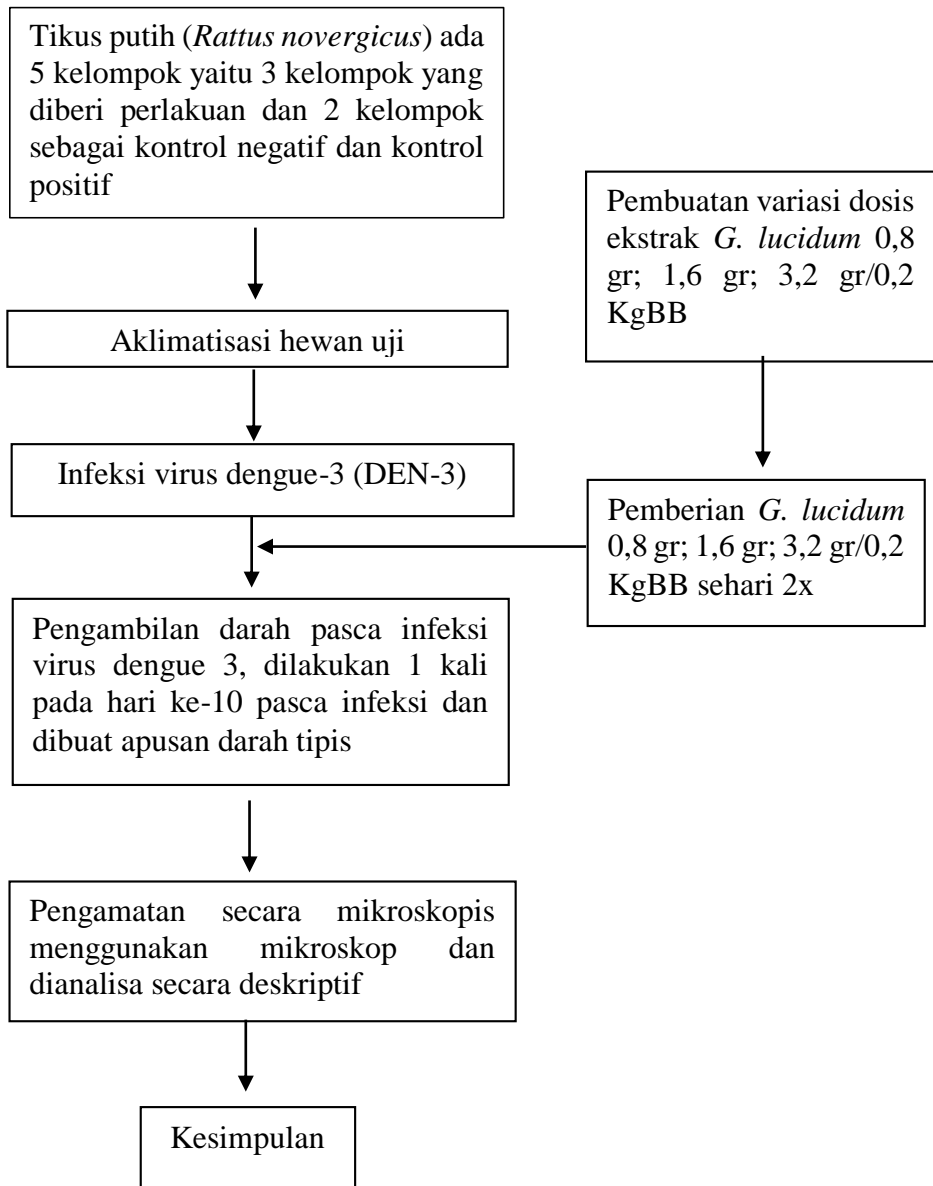
3. Tahap Pasca Analitik

Hasil imunositokimia dinilai positif untuk antigen virus Dengue apabila sitoplasma leukosit (limfosit dan monosit) berwarna kecoklatan, sedangkan warna biru menunjukkan hasil negatif.

H. Teknik Pengumpulan Data

Preparat apusan darah tipis dianalisa secara deskriptif untuk melihat keberadaan virus dengue 3 (DEN-3) dengan melihat warna sel leukosit dari berwarna coklat (hasil positif yang menunjukkan terdapat protein virus Dengue 3) dan warna biru (hasil negatif yang menunjukkan tidak terdapatnya protein virus Dengue 3). Sel leukosit yang positif dengue (warna coklat) dibandingkan dengan sel leukosit yang negatif (warna biru). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan pada 10 bidang pandang dengan perbesaran 1000 X. Pengamatan diulangi sebanyak 3 kali.

I. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian