

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Bahan dasar yang digunakan adalah daun jelatang (*Urtica dioica* L.) kering yang disuplai oleh Pythagoras BV Plant Science, Belanda. Hewan percobaan yaitu tikus jenis *Sprague Dawley* diperoleh dari SEAFast Center, IPB. Bahan untuk pemeliharaan tikus, meliputi air minum dalam kemasan dan ransum yang mengikuti standar *American Institute of Nutrition* (AIN) 1976. Komposisi ransum standar AIN 1976 tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi ransum standar AIN 1976

Bahan Penyusun	Jumlah (%)
Protein ^a	20
Lemak ^b	5
Selulosa ^c	5
Campuran vitamin	1
Campuran mineral	3,5
Pati ^d	Untuk membuat 100%

^aSebagai sumber protein digunakan tepung kasein

^bsebagai sumber lemak digunakan minyak jagung

^csebagai sumber selulosa digunakan carboxymethylcellulose

^dsebagai sumber pati digunakan tepung maizena

Ransum standar AIN 1976 menggunakan campuran vitamin dan mineral. Komposisi campuran vitamin dapat dilihat pada Tabel 3 sedangkan komposisi campuran mineralnya pada Tabel 4.

Tabel 3. Komposisi campuran vitamin

Vitamin	Jumlah	Unit
Vitamin A	1000	IU
Vitamin B1	1,4	mg
Vitamin B2	1,6	mg
Vitamin B6	2	mg
Vitamin B12	3	mg
Vitamin C	60	mg
Vitamin D3	100	IU
Vitamin E	5	mg
Nikotinamida	9	mg
Kalsium pantetonat	5	mg

Sumber: Puspawati (2009)

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Tabel 4. Komposisi campuran mineral

Nama senyawa	Jumlah (g/kg campuran)
NaCl (39,3% Na, 60,7% Cl)	74,0
KI (40,7% K, 59,3% I)	0,790
KH ₂ PO ₄ (22,8% P, 28,7% K)	389,000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	57,300
CaCO ₃ (40% Ca)	381,400
FeSO ₄ . 7H ₂ O (20,1% Fe)	27,000
MnSO ₄ . 7H ₂ O	4,010
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,548
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,477
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,023

Sumber: Puspawati (2009)

Bahan untuk euthanasia tikus, yaitu eter. Bahan-bahan kimia yang digunakan pada pengujian proliferasi sel limfosit meliputi bubuk Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 sebagai medium pertumbuhan sel limfosit, antibiotik penisilin-streptomisin, mitogen lipopolisakarida (LPS) *Salmonella typhii*, larutan rhodamin B (0.04 mg/ml, 0.08 mg/ml, dan 0.12 mg/ml), larutan karmoisin (0.16 mg/ml, 0.32 mg/ml, 0.48 mg/ml), NH₄Cl, *tryphan blue*, NaHCO₃, aquabides, *phosfat buffer saline* (PBS), *fetal bovine serum* (FBS), MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), HCl, isopropanol.

1.2. Alat

Peralatan yang digunakan selama perlakuan dan penanganan tikus percobaan antara lain wadah plastik, botol minum, wadah ransum, timbangan, dan peralatan cekok. Peralatan untuk pembuatan larutan cekok meliputi blender, kain kasa, botol, gelas piala dan tabung reaksi. Peralatan untuk anastesi tikus serta pengambilan organ, yaitu *syringe*, tabung sentrifuse, gunting, dan pinset.

Adapun peralatan yang digunakan untuk pengujian proliferasi sel limfosit antara lain sentrifuse, lemari steril, inkubator, mikroskop, mikroskop inversi, hemasitometer, membran steril 0.2 µm, tabung sentrifuse steril, botol steril, cawan petri steril, tabung reaksi steril, *multiplate microwell* 96, pipet Pasteur, mikropipet, mikrotip, *ELISA Reader*.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Pembuatan ekstrak daun jelatang (mengacu Afrah 2010)

Daun jelatang kering dihaluskan dengan blender kering untuk memperoleh bubuk daun jelatang. Untuk pembuatan ekstrak dengan dosis 0.1 g/kg BB/hari, tiap 1 g bubuk daun ditambahkan 10 ml aquades kemudian diblender. Sementara untuk dosis 1 g/kg BB/hari, tiap 1 g bubuk daun ditambahkan 5 ml aquades dan diblender. Selanjutnya, campuran tersebut disaring dengan kain kasa untuk mendapatkan ekstrak daun jelatang.

3.2.2. Pemeliharaan tikus (mengacu Afrah 2010)

Sebanyak 30 tikus *Sprague Dawley* dibagi menjadi tiga kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus yang berumur ±2 bulan dengan berat badan berkisar antara 180-195 g. Selisih berat rata-rata masing-masing kelompok tidak lebih dari 5 g. Kelompok 1 merupakan kontrol negatif; kelompok

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

2 diberikan ekstrak daun jelatang sebanyak 0,1 g/kg BB/hari; sedangkan kelompok 3 diberikan ekstrak daun jelatang sebanyak 1 g/kg BB/hari.

Ekstrak daun jelatang diberikan melalui proses pencekokan. Tikus kelompok kontrol juga dicekok, namun dengan air minum dalam kemasan (AMDK), sehingga mengalami stress yang serupa dengan tikus yang dicekok ekstrak daun jelatang. Ransum yang digunakan sesuai dengan standar AIN 1976 dan diberikan secara *ad libitum*. Air juga diberikan dengan cara yang sama. Tikus diadaptasi selama 3 hari. Setelah masa adaptasi selesai, tiap harinya tikus dicekok sesuai perlakuan dan dosis masing-masing. Perlakuan tersebut berlangsung hingga 90 hari. Untuk memantau pertumbuhan tikus, selama masa percobaan dilakukan penimbangan berat badan dua hari sekali.

2.3. Pengujian Proliferasi Sel Limfosit

2.3.1. Persiapan pereaksi dan media kultur (Puspawati 2009)

Untuk pembuatan larutan media RPMI sebagai medium kultur sel limfosit, RPMI bubuk dalam sachet (16.2 g) dilarutkan dengan air bebas pirogen (aquabides) sehingga diperoleh 1 L larutan medium RPMI 1640. Kemudian ditambahkan 2 g NaHCO_3 dan 1% penisilin-streptomisin. Untuk pembuatan larutan NH_4Cl , sebanyak 0.85 mg bubuk NH_4Cl dilarutkan dalam 100 ml aquabides dan diaduk hingga homogen. Pembuatan *phosphate buffer saline* (PBS) dilakukan dengan melarutkan satu tablet PBS dalam 200 ml aquabidest. Indikator *tryphane blue* 0.20% dibuat dengan melarutkan bubuk *tryphane blue* sebanyak 0.02 mg dalam 10 ml PBS dan diaduk hingga homogen.

Persiapan *fetal bovine serum* (FBS) dilakukan dengan memanaskan 15 ml FBS pada suhu 56°C selama 45 menit. Setelah dingin, larutan disterilisasi dingin dengan membran filter steril $0.20\ \mu\text{m}$. Pembuatan larutan LPS, sebanyak 0.417 mg bubuk LPS dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml dan ditambahkan PBS sampai tanda tera. Pembuatan MTT 0.5% dilakukan dengan melarutkan 0.25 mg bubuk MTT dalam 50 ml PBS dan diaduk hingga homogen. Untuk pembuatan HCl-isopropanol, HCl 37% (pekat) dipipet sebanyak 33.1 μl dan ditambahkan 9.669 ml isopropanol dan diaduk hingga homogen sehingga didapat larutan HCl-isopropanol 0.04 N. Larutan ini harus dibuat segar tiap akan digunakan. Larutan-larutan (pereaksi dan media) yang telah dibuat kemudian disterilisasi dingin dengan membran filter steril $0.20\ \mu\text{m}$.

2.3.2. Pengambilan organ

Pengambilan organ tikus dilakukan dalam keadaan steril. Tikus dimasukkan dalam wadah kaca bertutup yang sebelumnya telah diisi dengan kapas dan eter. Saat tikus terlihat tidak mampu lagi bergerak dan matanya mulai tertutup, tikus diangkat, disemprot dengan alkohol dan diletakkan di atas meja. Kulit perut digunting (mengikuti pola seperti huruf V) hingga mendekati rongga dada. Limfa tikus diambil menggunakan gunting dan pinset steril dan segera dicuci dengan larutan PBS steril di dalam botol steril.

2.3.3. Isolasi sel limfosit limfa (Prangdimurti 1999)

Limfa tikus dalam larutan PBS selanjutnya dipindahkan ke cawan petri steril yang berisi 5 ml RPMI-1640. Limfa tersebut digerus hingga homogen dan selanjutnya dimasukkan dengan pipet steril ke dalam tabung sentrifuse 15 ml. Suspensi limfa disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dijentik-jentikkan dan ditambah 2 ml NH_4Cl 0.85 % steril. Larutan didiamkan selama tepat 2 menit kemudian ditambahkan 3 ml RPMI-1640 dan disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang berisi sel darah merah yang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

telah lisis dibuang. Pelet dijentik-jentikkan dan ditambahkan 5 ml RPMI kemudian disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Endapan disuspensikan dengan 3 ml RPMI.

3.2.3.4. Penghitungan sel limfosit limfa

Sebanyak 50 µl suspensi sel limfosit ditempatkan dalam sumur microplate dan ditambahkan dengan 50 µl tryphan blue (1:1). Sebanyak 50 µl campuran kemudian ditempatkan pada hemasitometer. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Sel yang hidup tampak terang, jernih dan berbentuk bulat sedangkan sel yang mati akan berwarna biru dan mengkerut.

Berdasarkan hasil perhitungan pada area 2 kotak besar hemasitometer (@ 16 kotak kecil) dapat ditentukan jumlah sel yang hidup per mililiter suspensi dengan rumus :

$$N = \frac{V}{2} \times F \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

Keterangan :

N= jumlah sel/ml

V/2 = rata-rata jumlah sel terhitung dari dua bidang pandang

F = faktor pengenceran (2)

10⁴ = jumlah sel per luas bidang pandang (1.0 mm x 1.0 mm x 0.1 mm)

Suspensi sel limfosit kemudian ditepatkan 2x10⁶ sel/ml melalui pengenceran dengan RPMI-40.

3.2.3.5. Pengujian proliferasi sel limfosit limfa (Puspaningrum 2003; Keller *et al.* 2005)

Suspensi sel dikultur dalam microplate 96 sumur dengan volume total masing-masing sumur adalah 100 µl. Bahan-bahan yang ditambahkan pada setiap sumur disesuaikan dengan perlakuan yang akan diberikan seperti ditunjukkan Tabel 5.

Tabel 5. Bahan-bahan yang ditanam ke dalam kultur sel

Perlakuan	RPMI (µl)	Suspensi sel (µl)	Mitogen (µl)	Senyawa toksik (µl)	FBS (µl)
Kontrol	30	60	-	-	10
Perlakuan mitogen (LPS)	-	60	30	-	10
Perlakuan senyawa toksik*	-	60	-	30	10

*senyawa toksik yang digunakan adalah rhodamin B dan karmoisin

Konsentrasi LPS yang ditambahkan ke dalam kultur adalah 41,7 µg/ml sehingga konsentrasi S dalam kultur adalah 12,5 µg/ml kultur. Konsentrasi senyawa toksik karmoisin yang ditambahkan dalam kultur adalah 160 µg/ml, 320 µg/ml dan 480 µg/ml sehingga konsentrasi senyawa toksik karmoisin dalam kultur masing-masing adalah 48 µg/ml, 96 µg/ml dan 144 µg/ml kultur. Konsentrasi senyawa toksik rhodamin B yang ditambahkan ke dalam kultur adalah 40 µg/ml, 80 µg/ml dan 120 µg/ml sehingga konsentrasi senyawa toksik rhodamin B dalam kultur masing-masing adalah 12 µg/ml, 24 µg/ml dan 36 µg/ml kultur.

Kultur sel diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan atmosfer 5% CO₂, 95% udara dan RH 96% selama 72 jam. Empat jam sebelum masa inkubasi berakhir, ditambahkan 10 µl larutan MTT 0.5% ke dalam masing-masing sumur. Dan setelah masa inkubasi berakhir, ke dalam tiap sumur ditambahkan 80 µl HCl-isopropanol 0.04 N. Kemudian absorbansi masing-masing sumur diukur dengan menggunakan microplate reader (ELISA reader) pada panjang gelombang 570 nm. Nilai Optical Density (OD) hasil pembacaan ELISA reader bersifat proporsional terhadap jumlah sel hidup. Indeks stimulasi (IS) sebagai dasar penentuan aktivitas proliferasi dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut.

$$IS = \frac{OD \text{ sel perlakuan (dengan mitogen atau senyawa toksik)}}{OD \text{ sel kontrol (tanpa mitogen atau senyawa toksik)}}$$

Nilai rata-rata indeks stimulasi dengan perlakuan mitogen atau senyawa toksik kemudian dibandingkan dengan nilai rata-rata indeks stimulasi spontan dan secara statistic dianalisis menggunakan uji T berpasangan (*paired-sample T-test*) pada taraf kepercayaan 95%. Besar peningkatan atau penurunan aktivitas proliferasi limfosit akibat penambahan mitogen atau senyawa toksik ditentukan dengan perhitungan % aktivitas sebagai berikut.

$$\% \text{ Aktivitas} = \frac{(IS \text{ perlakuan (dengan mitogen atau senyawa toksik)} - IS \text{ spontan})}{IS \text{ spontan}} \times 100\%$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.