

BAB IV

METODE PENELITIAN

4. 1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test control group design*. Metode yang digunakan adalah *Mice Ligated Ileal Loop (MLIL)*, yaitu dengan menggantung usus mencit yang diberi paparan *S. flexneri* dan kemudian menghitung beratnya sebelum dan sesudah direndam pada cairan *Roswell Pack Medium Institute (RPMI)*. Usus mencit dibagi menjadi dua bagian, yaitu ileum dan colon, kemudian diikat kedua ujung lumennya. Pengaruh dari pemberian bakteri tersebut dilihat dengan perubahan berat pada penimbangan setiap 5 menit. Perendaman usus mencit dalam cairan RPMI dilakukan selama 30 menit. Setelah pengukuran selisih berat usus sebelum dan sesudah perlakuan, usus akan dilihat gambaran histopatologinya.

4. 2 Sampel Penelitian

Jumlah sampel usus yang digunakan pada penelitian ini dihitung berdasarkan rumus: $p(n-1) \geq 15$ dengan n merupakan jumlah pengulangan/sampel dan p merupakan jumlah perlakuan (Solimun, 2001). Penelitian ini menggunakan empat kelompok perlakuan ($t=4$), sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah:

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Penelitian ini menggunakan empat sampel usus untuk empat perlakuan yang berbeda, dan masing-masing perlakuan diperlukan pengulangan sebanyak lima kali. Potongan usus yang digunakan sebagai sampel adalah potongan ileum dan colon sehingga dibutuhkan 10 potong ileum dan 10 colon.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ileum dan colon terligasi mencit yang dipapar BHI dan *S. flexneri*.

4.3.2 Variabel Tergantung

Berat ileum dan colon terligasi mencit yang dipapar BHI dan *S. flexneri*, gambaran patologi ileum dan colon mencit yang dipapar BHI dan *S. flexneri*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan waktu penelitian pada bulan Desember 2014.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Vortex, sentrifugator, spektrofotometer, benang, Mice Ligated Ileal Loop (MLIL): *mice ileal loop* dan *mice colonic loop*, pemanas (Cimarec[®], Thermolyne), neraca analitik Ohaus (Adventurer[™]), *object glass*, mikroskop cahaya.

4.5.2 Bahan Penelitian

Mencit balb/c jantan usia 8-12 minggu, cairan RPMI, bakteri *S. flexneri*, BHI, formalin 10%, cat Haematoxylin-Eosin (HE).

4.6 Definisi Operasional

Pada penelitian ini yang dimaksud dengan:

- a. Usus mencit adalah dari mencit jantan yang berusia 8-12 minggu. Mencit dimatikan dengan pemberian ketamin lalu dibedah dan diambil ileum dan colonnya, lalu dipotong setiap 10 cm dan diikat dengan benang di kedua ujungnya. Jumlah usus yang digunakan adalah 40 cm, 10 cm untuk masing-masing perlakuan.
- b. *S. flexneri* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. *Mice Ligated Ileal Loop* merupakan suatu alat yang digunakan untuk menggantungkan usus mencit dengan cara mengikatkan kedua ujung lumennya pada masing-masing tempat yang disediakan. Dalam penelitian ini dipisah antara ileum dengan colon. Pengikatan kedua ujung lumen digunakan untuk menahan cairan usus agar tidak keluar dari lumen sehingga dapat digunakan sebagai uji diare.
- d. Cairan RPMI adalah cairan yang biasa digunakan untuk kultur sel dan jaringan. Cairan RPMI dijaga suhunya agar tetap seperti suhu tubuh, yaitu sekitar 37°C dengan menggunakan alat pengatur suhu (Cimarec® 2, Thermolyne). Suhu diatur dengan tombol pengatur 1 dan tombol stir pada 4 untuk mengondisikan suhu sesuai dengan suhu fisiologis dalam usus.

4.7 Alur Kerangka Kerja Penelitian

4.7.1 Persiapan Bakteri Uji

4.7.1.1 Kultur *S. flexneri*

Bakteri yang digunakan adalah derivat dari *Shigella flexneri* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. *S. flexneri* dibiakkan pada cawan petri yang mengandung media

MacConkey, kemudian dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil biakan dipanen dengan menggunakan kerokan dimana sebelumnya telah dituangi dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) steril pada pH 7,4 sebanyak 10 ml. Suspensi bakteri hasil kerokan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol yang mengandung 1000 ml larutan *Brain Heart Infusion broth* (BHI). Setelah itu, botol dikocok kuat selama 30 menit pada pemanas air pada suhu 37°C. Selanjutnya suspensi bakteri sebanyak 10 ml dari botol tersebut dimasukkan ke dalam masing-masing botol yang telah mengandung medium TCG dan kemudian dilakukan penggeraman pada suhu 37°C selama 24 jam. Medium TCG digunakan untuk mempercepat pertumbuhan pili shigella *flexneri*.

4.7.1.2 Preparasi Kuman Uji

- Satu biakan kuman uji, 2 tabung berisi 1 ml larutan MH broth, dan standar *Mc Farland* 0,5 disiapkan.
- Tiap isolat kuman uji dimasukkan ke dalam tabung MH broth secara bertahap dengan menggunakan ose yang telah dipanaskan hingga kekeruhannya sama dengan Standar *Mc Farland* 0,5 (setara dengan $1-1.5 \times 10^8$ organisme/ml).
- 1 ml pada tiap suspensi tersebut di atas diambil, dimasukkan konsentrasi kuman ke dalam 1 tabung yang berisi 9 ml MH broth, sehingga konsentrasi kuman uji menjadi $1-1.5 \times 10^7$ organisme/ml.
- 1 tabung yang berisi 9 ml MH broth disiapkan, dan dimasukkan suspensi isolat kuman uji yang mengandung $1-1.5 \times 10^7$ ke dalam tabung.
- Inokulum 1 isolat kuman uji dengan konsentrasi $1-1.5 \times 10^6$ organisme/ml telah didapat.

4.8 Preparasi Uji Sekresi Cairan Oleh Enterosit Pada Lumen Usus Mencit

4.8.1 Preparasi Usus Mencit

Mencit yang digunakan adalah mencit balb/c, jantan, berumur 8-12 minggu. Mencit dimatikan dengan menggunakan cara diberikan ketamin, lalu dibedah di bagian abdomen dan diambil ususnya. Usus kemudian dibagi antara ileum dengan colon masing-masing sepanjang 10 cm. Tiap potongan masing-masing ileum dan colon diikat dengan benang pada ujung lumennya.

4.8.2 Preparasi Bakteri

S. flexneri yang ditumbuhkan dalam BHI kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang didapat dibuang, endapan (pelet) ditambahkan dengan BHI baru sebanyak 1,5 ml. Dilakukan penyamaan OD=1. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama empat jam, diharapkan bakteri telah beradaptasi dan telah mengeluarkan toksinnya dengan optimal pada kondisi tersebut.

4.8.3 Uji Sekresi Cairan Pada Lumen Usus Mencit

Dilakukan penimbangan masing-masing berat ileum maupun colon yang belum disuntikkan bakteri. Setelah itu ileum pertama disuntik BHI sebagai kontrol, ileum kedua disuntik *S. flexneri* OD 1, colon pertama disuntik BHI sebagai kontrol, dan colon kedua disuntik *S. flexneri* OD 1, masing-masing sebanyak 100 µL, kemudian ditimbang. Usus digantungkan pada alat *Mice Ligated Ileal Loop* (Desain Sumarno, 2007). Setelah itu dimasukkan kedalam media *Roswell Park Medium Institute* (RPMI) dan diputar perlahan pada Pemanas (Cimarec®, Thermolyne) kemudian ditimbang kembali. Penimbangan dilakukan setiap 5 menit. Usus diputar pada Pemanas (Cimarec®, Thermolyne) selama 30 menit. RPMI dijaga agar suhunya tetap 37°C. Hasil yang diamati adalah berat usus awal dan berat usus akhir, serta dilihat selisih berat akhir dan

berat awalnya. Hasil ini secara tidak langsung menggambarkan jumlah cairan yang disekresi dalam lumen usus.

4.9 Pengumpulan dan Analisa Data

4.9.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Pada menit ke 0 sebelum perendaman dan setiap 5 menit setelah perendaman dilakukan penimbangan dan pencatatan hasil masing-masing berat usus.
- Setelah penghitungan 5 menit terakhir, yaitu pada menit ke 30, dilakukan evaluasi hasil pengamatan dan perhitungan, dan mencatat hasil dari evaluasi.

4.9.2 Analisa Data

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh perlakuan dengan kelompok kontrol digunakan uji statistik *t-test* tidak berpasangan. Hasil pengujian yang diperoleh digunakan untuk menilai pengaruh paparan *S. flexneri* terhadap ileum dan colon mencit. Penelitian bermakna bila $p < 0,05$, yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok yang dibandingkan.

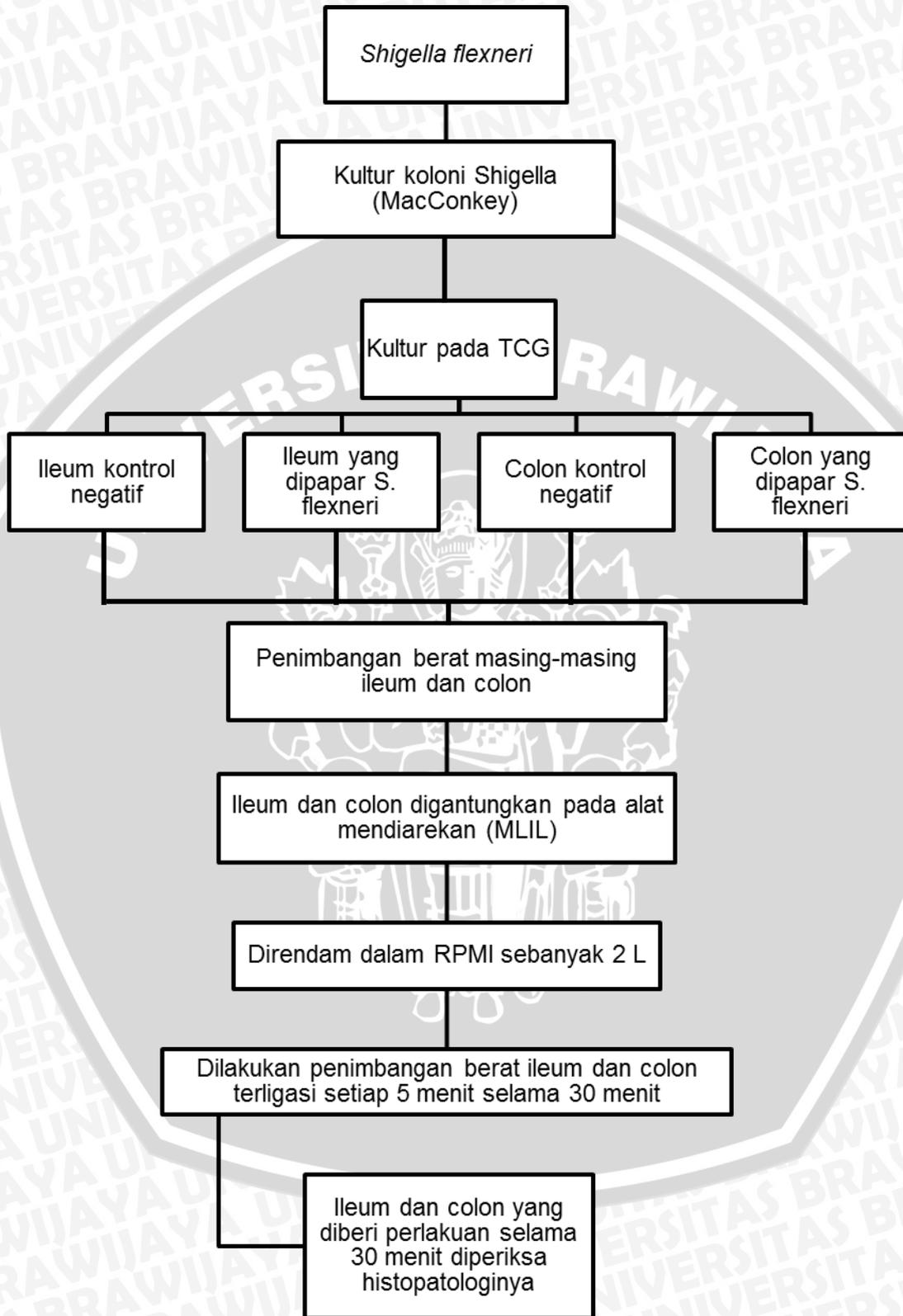
4.10 Gambaran Histopatologi

Masing-masing potongan usus mencit yang telah ditimbang beratnya selama 30 menit paparan bakteri difiksasi dengan formalin 10% selama semalam. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti, lalu dipotong dengan ketebalan kurang lebih 2-3mm. Jaringan dimasukkan ke kaset dan diberi kode sampel, kemudian dimasukkan ke larutan formalin 10% dan diproses menggunakan alat *Automatic Tissue Tex Processor* selama 90 menit.

Setelah jaringan diangkat dari alat *Tissue Tex Processor*, jaringan diblok dengan paraffin, lalu dipotong dengan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron.

Penelitian menggunakan pewarnaan HE (Hematoxylin Eosin) menurut buku *Theory and Practice of Histological Techniques* (Bancroft, 2008). Jaringan yang telah dipotong kemudian dideparafinisasi dengan memasukkannya ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C. Setelah itu, jaringan dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 2 menit, dihidrasi dengan 4 tabung alkohol bertingkat masing-masing 3 menit, dan dimasukkan air mengalir selama 15 menit. Pewarnaan dilakukan dengan cat Harris Hematoksilin selama 10-15 menit, kemudian dicuci dengan air hingga biru selama 5 menit. Setelah itu, jaringan dicelupkan pada alkohol asam 1% (1% HCl pada 70% alkohol) selama 5-10 detik dan dicuci lagi dengan air mengalir hingga biru lagi selama 10-15 menit. Jaringan kemudian dicelupkan ke larutan ammonia air 3-5 kali dan dicuci lagi dengan air mengalir selama 5 menit. Cat pembanding dilakukan dengan Eosin 1% selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1-5 menit. Langkah akhir, jaringan didehidrasi dengan alkohol, dijernihkan dengan xylol, dan dilakukan *mounting* dengan entelan dan *coverglass*. *Slide* diletakkan di tempat kering pada suhu ruangan, kemudian diobservasi dengan mikroskop untuk diamati apakah ada perubahan gambaran histologi pada ileum dan colon.

4.11 Skema Diagram Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian