

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental pada mencit (*Mus musculus*) jenis *wild type* untuk membandingkan antara kelompok mencit yang mengalami perlakuan infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Dipilih penelitian pada mencit karena dengan mencit dapat diteliti pengaruh infeksi sekuensial TB dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu. Selain itu dengan mencit dapat dilakukan pemeriksaan histologi jaringan otak untuk melihat pengaruh infeksi TB terhadap ekspresi Erythropoietin (EPO).

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c* yang terpilih secara *random* sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.1 Kriteria Inklusi :

- Mencit jantan
- Berusia antara 8-12 minggu
- Berat badan 16-20 gram

Mencit yang terpilih selanjutnya akan ditempatkan dalam kandang di kondisi lingkungan yang sesuai agar mencit dapat melakukan adaptasi dan dilakukan evaluasi klinis selama 7 x 24 jam.

4.2.2 Kriteria Eksklusi :

- Mencit dinyatakan oleh Dokter Hewan konsultan terbukti berpenyakit atau cedera fisik dalam kurun waktu evaluasi klinis dalam kondisi lingkungan yang sesuai (selama 7 x 24 jam).

- Mencit berperilaku agresif / dalam kurun waktu evaluasi klinis sering menyerang anggota kelompok mencit yang lain.

4.2.3 Kriteria *Drop Out* :

- Mencit dinyatakan oleh dokter hewan konsultan terbukti mengalami cedera fisik atau menderita penyakit dan / atau mati dalam kurun waktu setelah penelitian dimulai yang bukan disebabkan oleh perlakuan penelitian.

4.3 Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1 Besar Sampel

Karena jumlah populasi mencit *Mus musculus* di dunia tidak diketahui, maka besar sampel dihitung berdasarkan rumus replikasi Federrer. Replikasi adalah banyaknya suatu perlakuan (k) dalam suatu penelitian. Replikasi mempengaruhi jumlah ulangan (r) dari suatu penelitian.

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

r = jumlah ulangan (besar sampel per kelompok perlakuan)

k = jumlah perlakuan (jumlah kelompok perlakuan)

Perlakuan pada penelitian kami meliputi:

- infeksi *Mycobacterium tuberculosis* 8 minggu
- infeksi *Mycobacterium tuberculosis* 16 minggu
- tanpa infeksi (kelompok kontrol)

Dengan demikian jumlah perlakuan (k) = 3

Berdasarkan rumus Federrer diperoleh perhitungan besar sampel sbb:

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

$$(r - 1) (3 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) 2 \geq 15$$

$$r \geq 9$$

Dengan demikian dibutuhkan minimal 9 sampel (dibulatkan) untuk masing-masing kelompok sehingga besar sampel total adalah $3 \times 9 = 27$ mencit. Untuk mengantisipasi terjadi *drop out* / kematian kami tambah sebanyak 10% (2,7) sehingga total sampel (dibulatkan) menjadi = 30 mencit.

4.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c* yang terpilih secara *random* dari populasi mencit *Mus musculus Balb/c* yang homogen di institusi penyedia hewan coba yang memiliki standar dan reputasi baik yaitu PN Bio Farma (Persero) Bandung, sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu.

4.4.2 Variabel terikat

Ekspresi Erythropoietin (EPO) yang dikuantifikasi pada jaringan otak mencit dengan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu, dengan menggunakan teknik imunohistokimia.

4.5 Definisi Operasional Variabel

- **Infeksi tuberkulosis :**
Infeksi yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, yang dicapai dengan memberikan perlakuan infeksi aerogenik pada mencit *Mus musculus* (Balb/c) menggunakan nebulizer dengan dosis paparan standar sebesar 100 cfu (*colony forming units*).
- **Ekspresi *Erythropoietin* (EPO) :** Pengamatan jumlah ekspresi Erythropoietin (EPO) pada infeksi tuberkulosis di CNS yang ditentukan berdasarkan hasil pemeriksaan patologi pada jaringan otak mencit dengan pewarnaan imunohistokimia yang berwarna kecoklatan dan diukur secara kuantitatif.

4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian

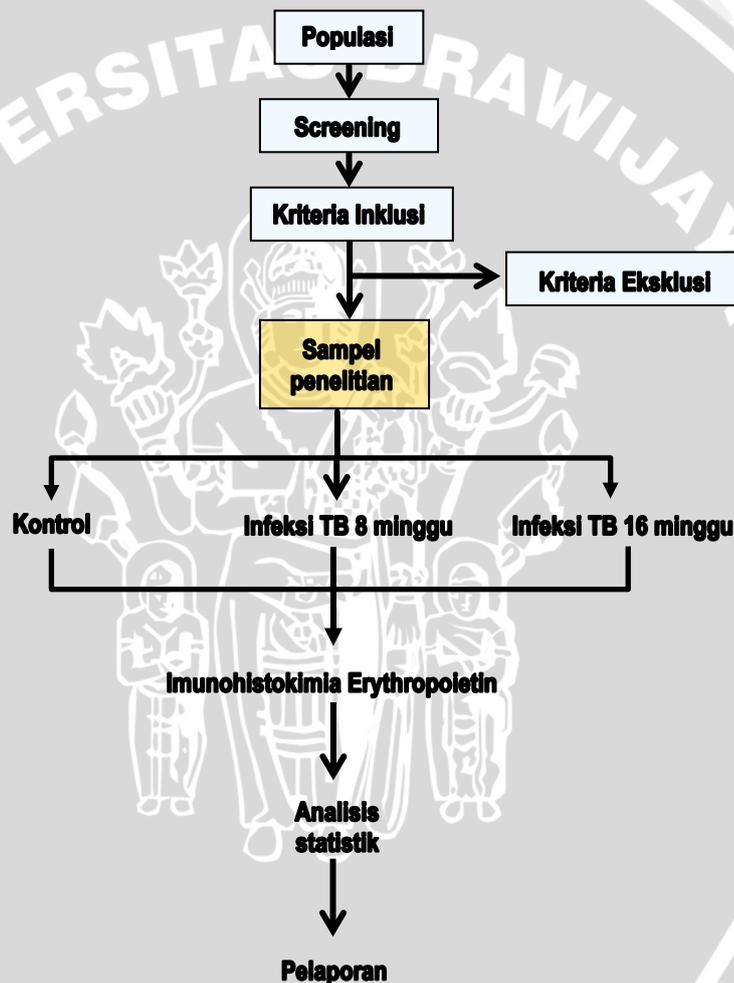
Waktu penelitian direncanakan selama 6 (enam) bulan, tercatat mulai bulan September 2013. Lokasi penelitian adalah pada Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Bakteriologi Kelompok Studi Infeksi Tuberkulosis Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya.

4.7 Protokol Penelitian

Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahap yaitu tahap penyaringan (*screening*) untuk mendapatkan subyek penelitian yang termasuk dalam sampel penelitian sesuai kriteria inklusi. Mencit *Mus musculus* (Balb/c) kemudian ditempatkan pada kandang hewan coba dan dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan yang sesuai selama 1 minggu dan dievaluasi secara klinis. Subyek penelitian yang memenuhi kriteria eksklusi akan dikeluarkan dari sampel

penelitian. Setelah subyek penelitian beradaptasi selanjutnya dilakukan alokasi subyek penelitian kedalam kelompok-kelompok perlakuan secara *random*. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan yaitu :

1. Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 8 minggu
2. Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 16 minggu
3. Tanpa infeksi (kelompok kontrol)



Delapan minggu setelah perlakuan infeksi terakhir, subyek penelitian dari semua kelompok perlakuan akan dievaluasi berupa pengambilan spesimen

jaringan otak dan kemudian diperiksa ekspresi Erythropoietin (EPO) menggunakan teknik imunohistokimia serta pemeriksaan patologi anatomi.

4.8 Bahan Penelitian

4.8.1 Hewan Coba

Mus musculus Balb/c berumur 8-12 minggu, berat badan antara 17-20 gram diperoleh dari PN Bio Farma (Persero) Bandung. Selama proses penelitian mencit diperlakukan dalam lingkungan khusus yang bebas patogen sesuai anjuran the *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) (Nicklas *et al.*, 2002) yang telah disetujui dan mendapat sertifikat kelaikan etik dari Komisi Etik (*Animal Care and Use Committee*) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Selama proses percobaan dilakukan :

1. Pengawasan dan pengamatan hewan :
 - a. Perilaku hewan (makan/minum, kondisi mental dan psikis, kewaspadaan dan sebagainya) dan tanda-tanda klinis penting (berat badan, suhu tubuh, pola nafas, perdarahan, diare, mual, muntah, paralisis, kejang, dan sebagainya) untuk memantau kesehatan mencit.
 - b. Kondisi lingkungan (suhu, kelembaban) dan kondisi kandang (ventilasi, kebisingan, polusi, banjir dan sebagainya).
 - c. Persediaan makanan (kecukupan makanan sesuai standar untuk mencit) dengan komposisi protein 20-25%, lemak 5-12%, serat kasar 2,5%, dan karbohidrat 45-60%.

- d. Efek samping dan komplikasi setelah pemberian materi penelitian pada mencit meliputi: perilaku hewan dan tanda-tanda klinis penting setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.
 - e. Pengamatan respon imun melalui pemeriksaan laboratorium dilakukan setelah mencit dianestesi dan diambil spesimen darahnya dan setelah dilakukan pengorbanan untuk kepentingan pemeriksaan jaringan dan imunohistokimia.
2. Pengamanan hewan :
- a. Kandang ditempatkan pada lokasi yang tidak mengganggu kehidupan hewan maupun masyarakat di sekitarnya.
 - b. Limbah hewan (sisa makanan, kotoran, jasad hewan setelah dilakukan pengorbanan, dan sisa-sisa jaringan) dikelola sesuai standar yang berlaku (dilakukan dekontaminasi dan insinerasi) agar tidak menimbulkan polusi.
 - c. Pengelolaan kandang dan limbah hewan dilakukan oleh tenaga terlatih dibawah supervisi Dokter Hewan konsultan.

4.8.2 Bahan Perlakuan

1. *Mycobacterium tuberculosis*
Larutan stok kuman *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv diperoleh dari Kelompok Studi Infeksi Tuberkulosis Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya.

4.8.3. Bahan Pemeriksaan Laboratorium

1. Antibody monoclonal terhadap Erythropoietin (EPO)
2. Immunostaining kit, Novo-Link (novocastra) – dari leica USA, yang didalamnya terdapat : 3%H₂O₂ blocking, Serum Bloking,

Sekunder antibody berlabel biotin, Exzim SA-HRP berlabel polymer, Substrat DAB.

3. *Counterstaining* pada pemeriksaan patologi anatomi Mayer Hematoxilen, dari LabVision, Amerika Serikat (nomor katalog TA-060-Mh).
4. *Mounting* pada pemeriksaan patologi anatomi Entelan dari Merck, Jerman (nomor katalog Un-1866).

4.9 Instrumen Penelitian

1. Oven Memmert type U 30, Schwabach, West Germany.
2. Rotary microtome Leica tipe RM 2235, West Germany.
3. Microscope slide, premium polysine coated Biogear®.
4. Microcpe cahaya merk Nikon E100, Japan.
5. Digital camera for microscope NEX-7, Japan.
6. Mini MACS Magnetic Cell Separator, Miltenyi-Biotec, Germany.
7. Laboratory vortex shaker Stuart® tipe SA8, USA
8. Spectrophotometer Nanodrop ND-1000, USA.
9. Sentrifuge Hettich Zentrifugen™ tipe R22, West Germany.

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Prosedur infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Mencit Balb/c yang berasal dari satu kelompok yang sama diambil dari kandangnya dan dipaparkan pada *Mycobacterium tuberculosis* secara inhalasi (Beamer *et al.*, 2005) menggunakan modifikasi *nose only inhalation system* atau *Middlebrook Inhalation Exposure System* (Glas-Col) (Smith *et al.*, 2000; Denkers *et al.*, 2010). Masing-masing mencit dimasukkan ke dalam tabung konikal yang

ujung moncongnya menghadap (berhubungan) ke dalam ruangan inhalasi yang terhubung dengan pipa nebulizer ultrasonik (Omron® tipe NE-C28, Japan). Stok *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dilarutkan dalam medium PBS yang mengandung 0,01% Tween 80. Mencit dipaparkan terhadap 10mL larutan PBS-Tween 80 yang mengandung 10^6 bacilli secara nebulisasi aerosol selama 30 menit dalam inhalation chamber yang ditempatkan dalam kotak besar berfilter HEPA. Semua prosedur tersebut dilakukan pada fasilitas laboratorium yang setara dengan *Biosafety Level 3* (Orme *et al.*, 1999).

4.10.2 Prosedur Pengorbanan Hewan Penelitian

Pada hari ke-113 (setelah 16 minggu perlakuan) dilakukan pengorbanan mencit dengan cara pembiusan menggunakan injeksi intramuskuler campuran Ketamine (100 mg/ kg BB) dan Xylazine (10 mg/kg BB) pada otot paha. Setelah mencit terbius sempurna selanjutnya mencit dibaringkan dalam posisi telentang di atas papan diseksi dan keempat ekstremitasnya difiksasi dengan jarum. Dilakukan pembedahan dan setelah rongga dada dibuka, dilakukan drainase darah dari jantung kanan mencit menggunakan spuit dengan jarum 25G. Selanjutnya pembuluh darah paru diperfusi dengan Saline-EDTA untuk menyingkirkan semua sel-sel darah yang ada di intravaskuler paru (Moerloose *et al.*, 2006).

4.10.3 Prosedur Pengambilan Sampel Jaringan Otak

Segera setelah mencit terbius dengan sempurna selanjutnya mencit dibaringkan dalam posisi tertelungkup di atas papan diseksi dan keempat ekstremitasnya difiksasi dengan jarum. Setelah itu dilakukan pembedahan kepala untuk mengambil otak. Setelah pengambilan sampel jaringan otak, dimasukkan dalam 10% formalin untuk pemeriksaan histopatologis atau immunohistokimiawi (Smith *et al.*, 2007; Herbert *et al.*, 2009)

4.10.4 Pemeriksaan Immunohistokimia.

Imunohistokimia merupakan suatu cara pemeriksaan untuk mengukur derajat imunitas atau kadar antibodi atau antigen dalam sediaan jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari nama *immune* yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibodi dan *histo* menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Dengan kata lain, imunohistokimia adalah media untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag) pada jaringan hidup. Pemeriksaan ini membutuhkan jaringan dengan jumlah dan ketebalan yang bervariasi tergantung dari tujuan pemeriksaan.

4.10.4.1 Pembuatan blok parafin

Jaringan yang diambil pada saat operasi difiksasi dengan bufer formalin 4%. Untuk pemeriksaan analisa histopatologik jaringan tumor ovarium dilakukan pengamatan makroskopik untuk menentukan ukuran tumor, dilanjutkan dengan prosesing jaringan untuk pembuatan preparat. Pembuatan sediaan parafin blok dilakukan sebagai berikut : Jaringan dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6µm dengan rotary microtome. Kemudian dilekatkan pada objek glas ber polylisin (PDL). Dari tiap blok paraffin yang dipotong, satu sediaan diwarnai dengan hematoksilin eosin untuk pemeriksaan histopatologi, sementara satu sediaan lainnya digunakan untuk pewarnaan imunohistokimia. Preparat kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan lapangan besar (400x)

untuk menentukan jenis dan tipe kanker serta penentuan grading/derajat diffrensiasi histopatologi.

4.10.4.2 Pembuatan Imunohistokimia.

Metode Imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode *streptavidin-biotin-peroksidase* yang dilabel dengan *streptavidin biotin* (novocastra,USA). Sebelum proses pewarnaan, setiap sediaan preparat didefaraffinisasi dengan xylene selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol 100% dan 70% selama masing masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan dH₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan PBS selama 5 menit.

Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam glass box yang berisi citrate buffer kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit untuk dioptimalkan antigenicity-nya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan sebentar, jaringan diberi batas dengan menggunakan pap pen. Sediaan dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit.

Setelah endogenous peroksidasenya diblok, sediaan diinkubasi dengan blocking solution selama 30 menit untuk memblok avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi overnight pada suhu -4⁰C dengan primer antibodi (monoclonal anti-arginase sc-20150) dan monoclonal anti-iNOS neomarker RB-1605-P0, yang diencerkan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH₂O sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing masing selama 30 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride kurang lebih 10 menit sampai didapatkan reaksi pewarnaan yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan mikroskopis.

Setelah itu diwarnai lagi dengan hematoksilin untuk memperjelas inti sel selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Sediaan didehidrasi dengan menggunakan alkohol yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap dari 70%, 80%, 90% sampai 100% selama masing masing 2 menit. Setelah itu sediaan dicelupkan kedalam xylene selama 5 menit.

Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan deg glass. Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarna dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat imunostaining sitoplasma dan dikuantifikasi berdasarkan teknik yang dikembangkan oleh Soini et al, 1998; Pizem and Cor, 2003. Evaluasi immunohistokimia ini akan dilakukan secara individual oleh konsulen Patologi dan peneliti untuk mendapatkan hasil yang akurat.

4.10.4.3 Interpretasi hasil Immunohistokimia.

Metode Perhitungan terhadap hasil pewarnaan immunohistokimia dan histokimia. Penelitian ini menggunakan jaringan otak mencit. Dengan nilai konfiden interfal 90% dan kekuatan uji 80% maka dengan desain eksperimental, bahwa subjek penelitian harus terdiri dari 27 sampel. Setiap sample jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μ m, kemudian dideteksi immunohistokimia terhadap ekspresi Erythropoietin. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak, sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sample kelompok apa (Blind). Pemeriksa terdiri dari 2 orang, dengan pemeriksaan dan perhitungan sample dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa. Pemeriksaan dan perhitungan ekspresi protein Erythropoietin diamati ekspresinya dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel, yang dihitung menurut Soini et al, (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi

untuk kepentingan sel neuron otak. Masing-masing slide pada setiap bidang pandang dengan perbesaran 1000x dengan lapang pandang sebanyak 20. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang. Dilakukan juga pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai pembanding struktural. Analisis statistik, dilakukan bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Soini et al, 1998; Pizem and Cor, 2003).

4.11 Pengolahan dan Analisis Data

Data diperoleh dengan menghitung jumlah ekspresi Erythropoietin yang kemudian dianalisis normalitas dan Homogenitas. Kemudian dilakukan analisis beda nyata terkecil (ANOVA) menggunakan SPSS ver.17. Semua perhitungan statistik dilakukan menggunakan program komputer SPSS-17.0 untuk Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Perbedaan dinyatakan bermakna bila nilai $p \leq 0.05$.