

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 TB (*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 apoptosis sel neuron.

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 :

1. 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).
2. 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 Tehnik 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

Apoptosis sel neuron yang dikuantifikasi pada jaringan otak mencit dengan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu, dengan menggunakan teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*).

4.5 Definisi Operasional Variabel

- **Infeksi tuberkulosis** : Infeksi yang disebabkan oleh *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*).
- **Apoptosis Sel Neuron** : Pengamatan jumlah apoptosis sel neuron pada jaringan otak mencit yang telah diinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv dengan metode TUNEL (*Terminal*

Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling) yang ditandai dengan warna coklat pada inti sel dengan perbesaran 1000x per 20 lapang pandang.

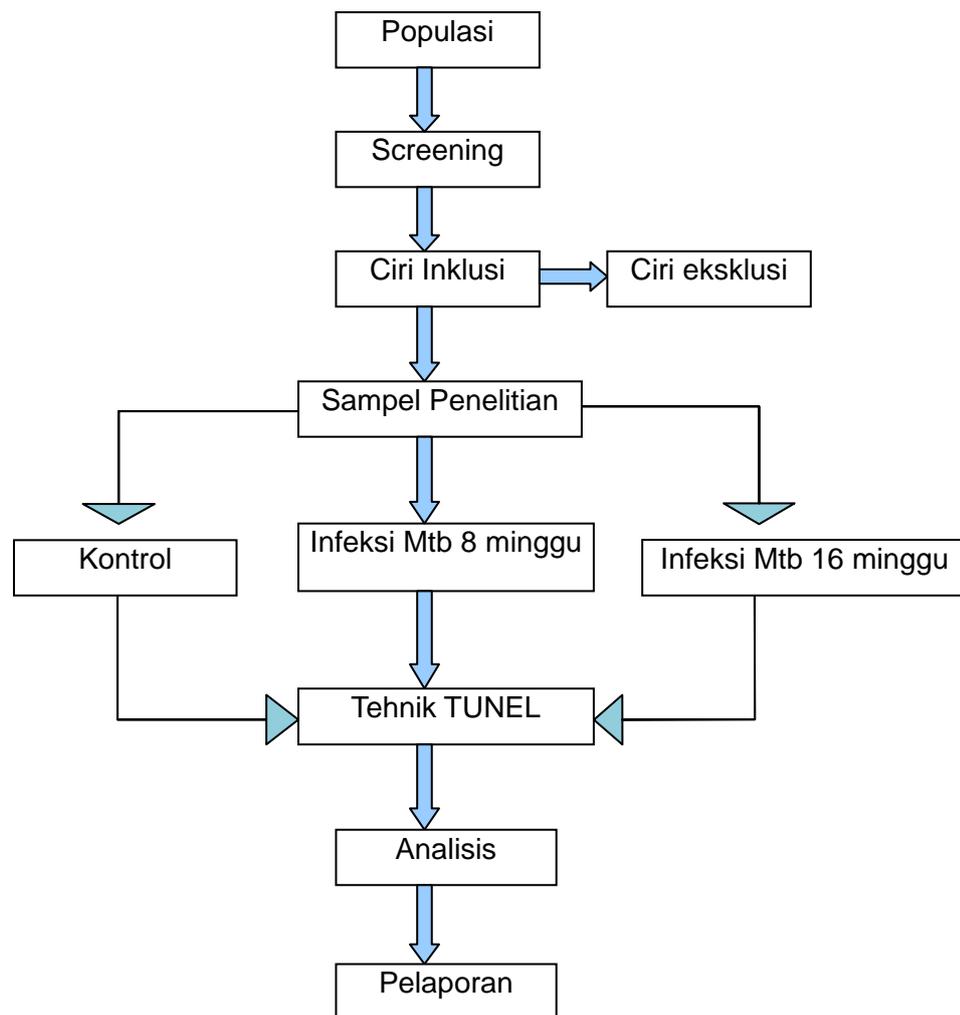
4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian direncanakan selama 6 (enam) bulan. 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 *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu
2. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 16 minggu
3. Tanpa infeksi (kelompok kontrol)



Gambar 4.1 Skema Protokol Penelitian

Delapan minggu setelah perlakuan infeksi terakhir, subyek penelitian dari semua kelompok perlakuan akan dievaluasi berupa pengambilan spesimen jaringan otak dan kemudian diperiksa apoptosis sel neuron dengan menggunakan teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*) 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 dianastesi 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 *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 apoptosis sel neuron.

2. TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*) *In Situ*.
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. Microcope 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) (McFarland, 1983; 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 *M. 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).

4.11 Pemeriksaan Teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*)

4.11.1 Pembuatan Blok Parafin

Jaringan yang diambil pada saat operasi difiksasi dengan bufer formalin 10% dan didiamkan selama semalam. Untuk pemeriksaan analisa histopatologik jaringan otak dapat dilakukan pengamatan makroskopik untuk menentukan ukuran, 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 4-6um dengan *rotary microtome*. Kemudian dilekatkan pada objek glas berpollyisin (PDL). Dari tiap blok paraffin yang dipotong, satu sediaan diwarnai dengan hematoxilin eosin untuk pemeriksaan histopatologi, sementara satu sediaan lainnya digunakan untuk pewarnaan teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*).

4.11.2 Pembuatan Teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*)

Pengamatan sel neuron yang apoptosis menggunakan teknik TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) untuk melihat fragmentasi DNA. Pewarnaan dilakukan sesuai dengan petunjuk kit. Tahap

pertama adalah deparafinisasi jaringan, yaitu preparat slide dicuci menggunakan *Xylene* sebanyak tiga kali, masing-masing didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, rendam dua kali dalam etanol absolut masing-masing 5 menit. Kemudian pindahkan satu kali dalam etanol 95% dan pindahkan lagi dalam etanol 70% masing-masing 3 menit. Selanjutnya cuci dengan PBS selama 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah *Antigen retrieval*, yaitu dengan memberikan proteinase K selama 15 menit. Setelah itu, dicuci dua kali dengan H₂O dalam *coplin jar* masing-masing 2 menit. Kemudian hilangkan *endogenous peroxidase* dengan meneteskan 3% H₂O₂ PBS dan biarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian cuci dua kali dengan PBS masing-masing 2 menit dalam *coplin jar*. Singkirkan kelebihan cairan dengan kertas pengering. Selanjutnya tetesi jaringan dengan 75 µl *equibration buffer* dan diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Kembali singkirkan cairan di sekitar jaringan dengan kertas pengering. Teteskan 55µl/5cm² *working strength TdT enzyme* pada jaringan, lalu diinkubasi pada 37°C dalam wadah yang lembab selama 1 jam. Kemudian letakkan sediaan dalam *coplin jar* yang berisi *working strength stop/wash buffer*, inkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar. Cuci sediaan empat kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing dua menit pada suhu kamar. Cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering.

Teteskan *anti-digoxigenin conjugate* (yang sebelumnya telah dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan dihangatkan sampai pada suhu kamar) pada permukaan jaringan sebanyak 65µl/5cm², lalu inkubasikan selama 30 menit pada suhu kamar dalam tempat yang lembab. Cuci sediaan 4 kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing 2 menit pada suhu kamar. Keringkan cairan di sekitar potongan jaringan dengan kertas pengering. Berikan warna dengan meneteskan peroksidase substrat 75µl/5cm² pada permukaan jaringan dan biarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Cuci 3 kali sediaan dengan dH₂O dalam *coplin jar*

masing-masing 1 menit, lalu diinkubasi dengan dH₂O dalam *coplin jar* 5 menit pada suhu kamar. Counterstain dengan *methyl green* selama 30 detik pada suhu kamar. Cuci 3 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing 1 menit. Bersihkan dengan *xylene* lalu cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering. Kemudian sediaan slide dapat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali.

4.11.3 Interpretasi Hasil TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*)

Metode Perhitungan terhadap hasil pewarnaan tehnik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Tansferase dUTP Nick end Labeling*). Penelitian ini menggunakan jaringan otak mencit (*Mus musculus*). Dengan nilai konfiden interfal 90% dan kekuatan uji 80% maka dengan desain eksperimental, bahwa subjek penelitian harus terdiri dari 27 sampel dan dikelompokkan menjadi tiga kelompok pemeriksaan. Setiap sample jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4um, kemudian dilakukan tehnik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*) untuk mengamati fragmentasi DNA sehingga dapat menentukan jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis. 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. Masing-masing slide pada setiap bidang pandang dengan perbesaran 1000x dengan lapang pandang sebanyak 20. Selain itu, dilakukan pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai pembanding struktural. Pemeriksaan dan perhitungan sel neuron yang apoptosis dengan

melihat warna coklat pada inti sel neuron. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang. 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).

4.12 Pengolahan dan Analisis Data

Data diperoleh dengan menghitung jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis, kemudian dianalisis normalitas dan Homogenitas. Kemudian dilakukan analisis beda nyata terkecil (ANOVA) menggunakan SPSS versi 16. Semua perhitungan statistik dilakukan menggunakan program komputer SPSS-16.0 untuk Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Perbedaan dinyatakan bermakna bila nilai $p \leq 0.05$.