

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner (Kesmavet) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan April 2016- Juli 2016.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat pendukung yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: kandang tikus, botol minum tikus, *animal restrain*, alat sonde lambung, timbangan, gelas ukur, labu ukur, corong kaca, tabung *erlenmeyer*, pipet ukur, *bulb*, *aluminium foil*, *scalpel*, *pinset*, cawan *petri*, bunsen, *spatula*, auto mikro pipet, gunting, alat *sentrifuge*. Alat utama yang digunakan antara lain pH meter (*Eutech Instrument Cyberscan pH 310*), *pH indicator*, *objek glass*, *cover glass*, *bekker glass*, mesin *freeze dry (Christ Beta 1-8 K)*, *thermometer*, spektrofotometer (*Genesys 20*), inkubator, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*) dan kamera (*Sony ILCE A6000*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) *strain wistar jantan* (usia 8-12 minggu berat 150-200 gram) diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) D'Wistar Bandung-Jawa Barat, susu

sapi yang diperoleh dari Koperasi Unit Desa (KUD) Mitra Bakti Makmur, PBS, PFA, starter *yogurtmet*, alkohol, spiritus, aquades dan NaCl fisiologis 0,9%, PFA, *xylol*, *paraffin*, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, *Novocastra peroxidase block*, antibodi primer (*Rat Anti TNF- α*), *Novocastra post primary*, SH-ARP (*Strep-Avidin-Horseradish Peroxidase*) (Polimer), *steril water*, *Chromagen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)*, *entellan*, pewarna *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE) dan pakan SP (standar).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana yang mana subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus. Kelompok 1 adalah tikus yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus yang diinduksi indometasin (kontrol positif), kelompok 3 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan *yogurt* dosis 300 mg/kg/BB, kelompok 4 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan *yogurt* dosis 600 mg/kg/BB dan kelompok 5 adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan *yogurt* dosis 900 mg/kg/BB.

Table 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
A	Tikus normal (kontrol negatif)
B	Tikus IBD (kontrol positif)
C	Tikus IBD dan diterapi <i>yogurt</i> dosis 300 mg/kg BB
D	Tikus IBD dan diterapi <i>yogurt</i> dosis 600 mg/kg BB
E	Tikus IBD dan diterapi <i>yogurt</i> dosis 900 mg/kg BB

4.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan model berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *strain* wistar berumur 8-12 minggu. Bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery & Nowalsky, 2011):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variable yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Induksi indometasin dan dosis terapi yogurt 300 mg/kg/BB, 600 mg/kg/BB dan 900 mg/kg/BB

Variabel terikat : Ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi ileum

Variabel kontrol : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu, pakan dan kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba Tikus

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan diberi minum *ad libitum* dan pakan. Pakan yang diberikan berupa konsentrat (air maks 12%, protein kasar min 16%, lemak kasar 3-7%, serat kasar maks 8%, abu maks 10%, kalsium 0,9-1,2%, dan fosfor 0,6-1,0%). Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari *stainless steel*. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup (AOAC,2005).

4.6.2 Tatalaksana Pembuatan Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan induksi Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan pada tikus adalah 15 mg/kg BB tikus (Aulani'am, 2012) yang diberikan per oral. Berat badan tikus yang digunakan rata-rata ± 200 gram. Sehingga diperlukan 3 mg/tikus indometasin. Sebelum diberikan pada tikus, indometasin dilarutkan terlebih dahulu dengan minyak jagung. Menurut Bures (2011), untuk membuat larutan stok indometasin 45 mg diperlukan 4 ml minyak jagung sebagai pelarutnya. Banyaknya indometasin dan minyak jagung yang diperlukan untuk pemberian peroral adalah sebagai berikut :

$$\text{Kebutuhan indometasin} : 15 \text{ mg/kg BB} \times 0,20 \text{ kg} = 3 \text{ mg/tikus}$$

$$\text{Kebutuhan minyak jagung} : \frac{3 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ ml} = 0,27 \text{ ml/tikus}$$

Indometasin dan minyak jagung sudah dihitung maka akan dihomogenkan menggunakan alat getar vorteks, yang berguna untuk homogenisasi larutan indometasin. Kemudian indometasin diberikan ke tikus secara per oral melalui sonde lambung. Untuk menyamakan perlakuan, maka tikus kontrol juga diberi minyak jagung sebanyak 0,27 ml/tikus. Induksi indometasin pada tikus dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada usus. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung secara lengkap terdapat pada **lampiran 3**.

4.6.3 Preparasi *Yogurt* dan Penentuan Dosis

1. Pembuatan Starter

Susu sapi sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditutup *aluminium foil* kemudian dipasteurisasi selama ± 5 menit pada suhu 72°C , kemudian susu didinginkan hingga suhu menjadi 45°C ditunggu selama 3 menit. Susu sapi diinokulasikan dengan starter *yogurtmet* sebanyak 0,25 gram untuk 50 ml susu kemudian dilakukan homogenisasi, selanjutnya hasil inokulasi starter diinkubasi pada suhu 45°C selama ± 4 jam maka akan terbentuk starter *yogurt*. Tahap selanjutnya *mother culture* didiamkan selama 4-5 menit, kemudian diukur pH hingga mencapai 4,5-5 dan disimpan dalam *refrigerator* (lampiran 4).

2. Pembuatan *Yogurt*

Jumlah *yogurt* yang dibuat untuk memenuhi kebutuhan terapi adalah sebanyak 2 liter susu sapi. Jumlah starter yang digunakan yaitu 2% dari volume susu. Langkah pertama yang dilakukan yaitu 2 liter susu sapi yang telah dipasteurisasi dimasukkan kedalam tabung penyimpanan dan ditutup menggunakan *aluminium foil*. Starter sebanyak 10 ml dari sediaan *mother culture* ditambahkan ke dalam 500 ml susu, starter yang telah dicampur ke dalam susu diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 45°C selama 4 jam. Setelah 4 jam, tabung penyimpanan diambil dari inkubator dan diletakkan pada suhu ruang, ditunggu 4 sampai 5 menit kemudian dilanjutkan pengukuran pH *yogurt* dengan menggunakan pH meter hingga mencapai pH 4,5 sampai 5. Selama proses fermentasi susu akan terjadi perubahan pH, menurut Nitema (2006) susu yang

difermentasi dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* dapat mengalami penurunan pH yang berkisar antara 3,7-4,5. Langkah-langkah pembuatan yogurt dapat dilihat pada lampiran 4.

3. Pembuatan *Freeze dried Yogurt*

Pada penelitian ini, untuk memudahkan perlakuan terapi pada hewan coba, yogurt susu sapi yang telah terbentuk diubah menjadi bentuk serbuk dengan menggunakan mesin *freezdry. yogurt* sebanyak 2 liter dimasukkan ke dalam 32 botol kaca dengan volume masing-masing botol 62,5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* untuk dibekukan. Setelah yogurt di dalam botol kaca beku, selanjutnya botol dipasangkan pada alat *freeze dryer*. Kemudian dilakukan penyubliman dimana udara hangat dialirkan ke dalam tabung yang berisi yogurt beku sampai menimbulkan uap. Uap yang dihasilkan ditangkap oleh mesin spiral sehingga air pada yogurt akan terserap keluar dan yang tertinggal sari-sari dari yogurt. Yogurt akan berubah menjadi serbuk dalam waktu 24 jam dan 30 jam. Penguapan diatur oleh sensor di alat, dan proses pembuatan yogurt *freeze dried* selesai *freeze dried* disimpan di dalam refrigerator dengan suhu sekitar 4°C sampai dibutuhkan kembali. Langkah-langkah pembuatan *freeze dried yogurt* dapat dilihat pada lampiran 4.

4. Penghitungan dosis

Dosis terapi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan yogurt susu sapi menggunakan tiga dosis yakni dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kg BB dan

dosis 900 mg/kg BB. Diagram alir pembuatan *yogurt* dan penghitungan dosis *yogurt* dapat dilihat pada **lampiran 4**.

4.6.4 Pemberian Terapi *Yogurt* pada Hewan Model IBD

Metode pemberian terapi *yogurt* pada hewan model IBD dilakukan per oral. Setiap ekor tikus pada kelompok tikus (C) diterapi *yogurt* dosis 300 mg/kg BB, kelompok tikus (D) diterapi *yogurt* dosis 600 mg/kg BB dan kelompok tikus (E) diterapi *yogurt* dengan dosis 900 mg/kg BB. Terapi *yogurt* diberikan 24 jam setelah induksi indometasin dengan dicampur 1,5 ml aquades dan diberikan selama 14 hari berturut-turut.

4.6.5 Preparasi Ileum Tikus untuk Pembuatan Preparat Histopatologi dan Preparat Imunohistokimia

Pengambilan organ ileum tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-23 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Langkah awal yang harus dilakukan adalah euthanasi hewan coba dengan cara dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan pada posisi rebah dorsal dan dilakukan pembedahan pada bagian abdomen. Kemudian diambil organ ileumnya, diisolasi dan dipotong pada bagian terminal. Organ ileum mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Kemudian organ ileum dimasukkan dalam larutan paraformaldehide (PFA) 4 % sebagai cairan fiksasi untuk mengeluarkan cairan dalam organ ileum agar bisa disimpan dalam jangka waktu yang lama. Selanjutnya dilanjutkan pembuatan preparat histopatologi ileum dan pengukuran ekspresi TNF- α dengan imunohistokimia.

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan *Hematoksilin-Eosin (HE)*

Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan pada gelas objek serta pewarnaan. Fiksasi untuk inaktivasi enzim degradasi dan mencegah kerusakan jaringan serta menjaga kontinuitas jaringan. Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan PFA 4%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 70 % selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut masing-masing membutuhkan waktu 20 menit. Proses dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan sisa air yang ada di dalam jaringan.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut kedalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Tahap penjernihan berfungsi untuk menghilangkan sisa etanol. Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60⁰ C dan membiarkan parafin memasuki sela-sela jaringan.

Proses *embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat parafin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). *Sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan irisan

dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat $38-40^{\circ}\text{C}$ untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* $38-40^{\circ}\text{C}$ sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu $38-40^{\circ}\text{C}$ lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) terdiri dari zat warna *hematoxylin* dan *eosin*. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan. Kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama tiga menit, bertujuan untuk mengembalikan kandungan air jaringan. Selanjutnya preparat dicuci dengan aquades. Setelah dilakukan pencucian, preparat diwarnai dengan pewarna *hematoxylin* selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *eosin* selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70 %, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses clearing dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass* yang selanjutnya

diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 400x dan 1000x (Talley et al., 2011). Pengamatan histopatologi organ ileum dengan melihat kerusakan sel epitel dan infiltrasi sel radang yang disajikan dan dianalisis secara deskriptif. Langkah-langkah pembuatan preparat histopatologi ileum dengan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE) dapat dilihat pada **lampiran 5**.

4.6.7 Penentuan Ekspresi TNF- α dengan Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk mengidentifikasi komponen jaringan yang memiliki ciri tertentu dengan menggunakan interaksi antigen target dan antibodi spesifik yang diberi label. Langkah awal dimulai dari deparafinisasi untuk melarutkan parafin dari jaringan dengan larutan xylol. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat dan aquades. Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4. Penghilangan peroksidase endogen dengan 3% H₂O₂ dan dicuci PBS pH 7,4. *Blocking* dengan 1% BSA selama 45 menit pada suhu 27⁰C dan dicuci PBS pH 7,4. Preparat direaksikan dengan antibodi primer, *anti-rat* TNF- α selama 24 jam dengan suhu 4⁰C dan dicuci PBS pH 7,4. Selanjutnya preparat direaksikan dengan antibodi sekunder, *anti rabbit labelled biotin* dalam *blocks buffer* selama 1 jam dengan suhu 27⁰C dan dicuci PBS pH 7,4. Selanjutnya ditambahkan SA-HRP selama 40 menit pada suhu 27⁰C dan dicuci PBS pH 7,4. Reaksi positif divisualisasikan dengan penambahan substrat Kromagen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Selanjutnya dilakukan *Counterstain* dengan pewarna *mayer hematoxylen* hingga warna biru terlihat lalu dibilas dengan air kran (2x5 menit) dan aquades steril 1x5 menit lalu dikering anginkan dan

dibiarkan semalam pada suhu 27⁰C. Langkah selanjutnya dilakukan mounting dengan etellan dan ditutup dengan *cover glass* (Ramos, 2005).

Langkah- langkah dalam metode pewarnaan imunohistokimia dapat dilihat pada **lampiran 6**. Ekspresi TNF- α ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma. Keberadaan TNF- α pada organ ileum dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan distribusi TNF- α pada sediaan histologi ileum kontrol dengan perlakuan, selain itu juga dianalisa secara kuantitatif dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α . Hasil diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 400x, dengan pengamatan dua puluh bidang pandang setiap kelompok.

4.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan histopatologi organ ileum dengan melihat kerusakan epitel dan infiltrasi sel radang yang disajikan dan dianalisis secara deskriptif serta pengamatan terhadap keberadaan TNF- α dengan cara membandingkan distribusi TNF- α pada sediaan histologi ileum kontrol dengan perlakuan. Data kuantitatif berupa jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α yang ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* kemudian dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan *software SPSS 16 for Windows* dengan tujuan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Apabila terdapat perbedaan nyata, uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 0.05$ untuk mengetahui presentasi perlakuan yang paling efektif (Kusriningrum, 2010).