

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2017. Proses ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Perawatan, perlakuan, dan eutanasi dilakukan di Laboratorium Epidemiologi FAPET UB. Pelaksanaan kultur darah tikus sepsis (**Lampiran 1**) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Pengukuran kadar SOD plasma dilakukan di Laboratorium Faal FK UB. Pembuatan preparat histopatologi aorta dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB. Pengamatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus putih (*Rattus norvegicus*) beserta tempat pakan dan air minum, lampu, dan sonde lambung. Persiapan *Escherichia coli* yang akan diinjeksikan *intra-peritoneal* menggunakan alat berupa tabung reaksi dan *disposable syringe*. Uji konfirmasi kultur menggunakan alat yang terdiri dari cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, *strirrer*, *aluminium foil*, kapas, bunsen, ose, masker, sarung tangan, sprayer alkohol, dan autoklaf. Pengambilan darah menggunakan alat berupa *disposable syringe*, *vacutainer* tutup ungu (EDTA), *sprayer* alkohol, *icebox*, dan

icepack. Alat untuk mengukur kadar SOD plasma yaitu, *disposable syringe*, tabung vacutainer EDTA, mikropipet, sentrifus, vortex, dan spektrofotometer. Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi aorta adalah mikrotom, *object glass* dan *cover glass*, mikrotom potong beku, dan mikroskop cahaya.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) berupa ragi roti kering, NaOH, HCL, H₂O₂, *acetone*, dan *aquadest*. Bakteri *Escherichia coli* (ATCC 25922) standar Mc-Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) untuk induksi sepsis diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UB. Pelaksanaan kultur darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis menggunakan bahan berupa media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan *aquadest*. Bahan yang dibutuhkan untuk mengukur kadar SOD plasma terdiri dari plasma darah, xantin, xantin oksidase, (NBT), dan (PBS). Bahan yang diperlukan untuk pembuatan sediaan histopatologi aorta adalah *buffer formalin* 4%, alkohol bertingkat, alkohol absolut, polilisin, larutan xilol, paraffin cair, pewarna HE, dan balsam *canada*.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan, yaitu:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan sediaan dan penentuan dosis terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)

3. Perlakuan pada tikus putih (*Rattus novergicus*)
4. Pengukuran kadar SOD plasma
5. Isolasi aorta abdominal
6. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi aorta abdominal

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan *Post Test Control Only Design* dan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)-Non Faktorial. Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kontrol negatif yang terdiri dari tikus putih sehat yang tidak diberi induksi dan terapi, kontrol positif yang diberi induksi tetapi tidak diberi terapi, dan kelompok terapi yang diberi induksi dan diberi terapi dengan dosis terapi bertingkat 10, 20, 30 mg/kg BB yang dapat dilihat di **Tabel 4.1**. Tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini berjenis kelamin jantan, strain *Wistar*, berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*) rata-rata 200 g. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan

P: Jumlah kelompok

n: Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, hewan coba dibagi menjadi lima kelompok dan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan untuk menyesuaikan kondisi laboratorium selama tujuh hari. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dikandangkan pada kandang lengkap dengan pakan dan air minum *ad libitum*, berlokasi pada tempat yang bebas polusi, serta bersuhu 27°C. Pakan standar merk Broiler 1 (BR 1) (kandungan: protein kasar 20-22%, lemak kasar 5-7%, serat kasar 3-5%, abu 5-7%, kalsium 9-11%, dan fosfor 0,6-0,8%).

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dan dosis induksi *Escherichia coli*.

Variabel bergantung : Kadar SOD plasma dan gambaran histopatologi aorta

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, strain, suhu ruang, pemberian pakan, dan air minum.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol negatif (A)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang tidak diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan tidak diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).
Kontrol positif (B)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> tetapi tidak diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).
Dosis terapi 10 mg/kg BB (C)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 10 mg/kg BB.
Dosis terapi 20 mg/kg BB (D)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 20 mg/kg BB.
Dosis terapi 30 mg/kg BB (E)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 30 mg/kg BB.

4.4.2 Pembuatan Sediaan dan Penentuan Dosis Terapi Ekstrak Ragi Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam penelitian ini menggunakan metode Hunter *et al.*, (2002) yang dimodifikasi. Ragi roti kering 100 g ditambahkan dengan 600 ml NaOH konsentrasi 1 M/l, kedua campuran dihomogenkan hingga rata. Campuran dipanaskan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 115°C tekanan 0,6 kg/cm² selama 45 menit dan dibiarkan selama tiga jam, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 3300 rpm selama 15 menit. Endapan pelet yang terbentuk dari proses tersebut diambil dan disuspensikan dalam 600 ml *aquadest* dan dicuci sebanyak tiga kali. Endapan pelet ditambahkan dengan 500 HCl (3%), disentrifus selama 15 menit dan dicuci kembali menggunakan *aquadest* sebanyak tiga kali. Endapan pelet kemudian dicuci dengan 120 ml H₂O₂ (3%) sebanyak tiga kali, dan disentrifus. Endapan pelet dicuci kembali menggunakan acetone 100% sebanyak dua kali. Endapan yang terakhir dikeringkan pada suhu 60 °C. Sebelum digunakan, hasil ekstraksi terlebih dahulu disuspensikan kedalam larutan PBS.

Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Sandvik *et al.*, (2006) tentang efek pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kondisi syok sepsis, dosis terapi ekstrak ragi yang digunakan adalah sebesar 20 mg/kg BB. Dosis terapi bertingkat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 10, 20, dan 30 mg/kg BB. Penggunaan dosis bertingkat tersebut bertujuan untuk mengetahui efek optimal pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kondisi sepsis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.4.3 Perlakuan pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 20 ekor dengan berat rata-rata 200 g diaklimatisasi selama tujuh hari. Setelah 1 minggu proses adaptasi, dilakukan induksi *Escherichia coli* standar Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) secara intraperitoneal pada 16 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari 4 kelompok perlakuan (kelompok B, C, D, dan E) (Budak *et. al.*, 2009). Injeksi *E. coli* dilakukan pada hari ke-8 penelitian. Pada 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari kelompok A tidak diinduksi *Escherichia coli* sebagai kontrol negatif. Untuk mengetahui keberhasilan induksi sepsis, dilakukan pengamatan gejala klinis dan kultur darah (Garna, 2012).

Pemberian terapi dilakukan enam jam pasca induksi, dan dilanjutkan setiap 24 jam sekali selama 5 hari (Yamanel *et. al.*, 2011). Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) diberikan *per-oral* menggunakan sonde lambung. Dosis ekstrak ragi (*Rattus norvegicus*) yang diberikan berbeda untuk masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok C diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan dosis 10 mg/kg BB, kelompok D diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dosis terapi 20 mg/kg BB, dan kelompok E diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dosis terapi 30 mg/kg BB.

4.4.4 Pengukuran Kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) Plasma

Semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasi pada hari ke-13 perlakuan penelitian. Eutanasi hewan coba dilakukan dengan dislokasi os *cervicalis*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diposisikan rebah ventral. Dilakukan pengambilan darah dengan rute intra-vena menggunakan *disposable syringe*

ukuran 5 ml. Sampel darah dimasukkan ke dalam vacutainer EDTA. Sampel darah yang telah terkumpul disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Dari proses sentrifugasi, akan terpisah antara plasma dan korpuskula, plasma dan korpuskula yang terbentuk dipisahkan pada tabung mikrosentrifus yang berbeda. Pengukuran SOD dilakukan dengan cara sebanyak 100 ul plasma direaksikan dengan campuran yang terdiri atas 100 ul xantin, 100 ul xantin oksidase, 100 ul NBT, dan 1,6 ml PBS. Dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C Absorbansi yang dihasilkan setelah 30 menit diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. (Kotan *et. al.*, 2011, Wrasianti, 2011).

4.4.5 Isolasi Aorta Abdominalis

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasi dan diposisikan rebah dorsal. Dilakukan pembedahan untuk mengisolasi aorta abdominalis. Aorta abdominalis terletak di bagian dorsal dari organ *viscera* dan menempel di bagian ventral dari *vertebrae lumbalis*.

4.4.6 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Aorta Abdominal

Pembuatan preparat histopatologi (**Lampiran 7**) menggunakan pewarnaan HE berdasarkan studi yang dilakukan oleh Muntiha (2001). Jaringan aorta abdominalis dengan panjang 5 cm dicuci dengan NaCl fisiologis, dilanjutkan fiksasi dengan menggunakan buffer formalin 4% selama 18-24 jam. Dilanjutkan dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, 80%, dan 90%. Jaringan dimasukkan kedalam alkohol xilol selama 1 jam

untuk proses impregnasi, kemudian dimasukkan kedalam larutan xilol murni selama 2 x 2 jam. Proses selanjutnya adalah *embedding*, yaitu memasukkan jaringan kedalam paraffin cair selama 2 x 2 jam. Dilanjutkan ke proses pemotongan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom setebal 4 mikron, secara *cross section* atau melintang. Irisan diletakkan *object glass* yang telah diolesi dengan polilisin. Diinkubasi untuk pembuangan paraffin. Preparat diwarnai dengan menggunakan pewarna HE. Oleskan *canada balsam* setelah preparat kering. Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran lensa objekif 40 kali.

4.5 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *OneWay Analysis of Varians* ANOVA (ANOVA) terhadap kadar SOD plasma. Analisa *OneWay* ANOVA didahului dengan uji distribusi data menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel <50 (Dahlan, 2011). Analisa data dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan untuk mengetahui varians data *Levene Test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji *OneWay* ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan $\alpha = 5\%$. Gambaran histopatologi aorta abdominalis dianalisa secara deskriptif dengan membandingkan nekrosis sel endotel aorta abdominalis dari masing-masing kelompok.