

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret hingga April 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 2**) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Pengukuran kadar MDA organ pulmo dilakukan di Laboratorium Faal FK UB. Pembuatan preparat histopatologi pulmo 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 minum, lampu, dan sonde lambung. Persiapan bakteri *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, *sprayer* alkohol, *ice box*, dan *ice pack*. Alat yang

digunakan untuk mengukur kadar MDA pulmo yaitu, mortar, vortex, mikropipet, sentrifuse, inkubator, dan spektrofotometer. Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi pulmo 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *acetone*, dan *aquades*. Bakteri *Escherichia coli* (ATCC 25922) standar Mc-Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  cfu/ml) dalam bentuk suspensi saline untuk induksi sepsis diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pelaksanaan kultur darah tikus model sepsis menggunakan bahan berupa media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan *aquades*. Bahan yang dibutuhkan untuk mengukur kadar MDA pulmo terdiri dari organ pulmo, *aquades*, TCA 1%, TCA 10%, TBA 1%, dan HCL 1N. Bahan yang diperlukan untuk pembuatan sediaan histopatologi pulmo adalah buffer formalin 10%, 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. Isolasi organ pulmo
5. Pengukuran kadar MDA pulmo

Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi pulmo

#### 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-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 yaitu tikus putih yang diberi induksi tetapi tidak diberi terapi, dan kelompok terapi yang terdiri dari tikus putih yang diberi induksi dan diberi terapi dengan dosis terapi bertingkat 10, 20, 30 mg/kg BB yang bisa dilihat di Tabel 4.1. Tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus rata-rata 200 g. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

**Commented [RWK1]:** Montgomery, D., S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Willey and Sains Inc.

#### 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 air minum dan pakan *ad libitum*, berlokasi pada tempat yang bebas polusi, bersuhu 27°C, diberi 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 bakteri *Escherichia coli*.
- Variabel bergantung : Kadar MDA pulmo dan gambaran histopatologi pulmo
- Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, bobot badan, galur, suhu ruang, pemberian pakan, dan air minum.

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

Pembuatan ekstraksi ragi dalam penelitian ini menggunakan modifikasi metode dari Hunter et al., (2002) dengan proses pengolahan serbuk ragi roti menjadi ekstrak yang tertera pada **lampiran 3**. Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Sandvik et al., (2007) tentang efek pemberian ekstrak ragi 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 terhadap kondisi sepsis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

**Commented [RWK2]:** Sandvik, A., Y. Y. Wang, H. C. Morton, A. O. Aasen, J. E. Wang, F. E. Johansen. 2007. *Oral and Systemic Administration of B-Glucan Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Shock and Organ Injury in Rats*. Norway: University of Oslo.

#### 4.4.3 Perlakuan pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

Kelompok	Aklimatisasi 7 hari	Induksi intraperitoneal hari ke-8 <i>Escherichia coli</i> 1 ml standar Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$ cfu/ml)	Terapi Ekstrak Ragi (mg/kgBB)		
			10	20	30
Kontrol negatif (A)	√	-	-	-	-
Kontrol positif (B)	√	√	-	-	-
Terapi 1 (C)	√	√	√	-	-
Terapi 2 (D)	√	√	-	√	-
Terapi 3 (E)	√	√	-	-	√

**Variabel yang diamati :** Kadar MDA pulmo dan Histopatologi pulmo

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 20 ekor dengan berat rata-rata 200 g diaklimatisasi selama tujuh hari. Setelah 1 minggu proses adaptasi, dilakukan injeksi *Escherichia coli* standar Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  cfu/ml)

sebanyak 1 ml secara intraperitoneal pada 16 ekor tikus dari 4 kelompok perlakuan (kelompok B, C, D, dan E). Injeksi *E. coli* dilakukan pada hari kedelapan penelitian. Empat tikus dari kelompok A tidak diinjeksi *Escherichia coli* sebagai kontrol negatif. Untuk mengetahui keberhasilan induksi sepsis, dilakukan pengamatan gejala klinis dan kultur darah (Budak *et al.*, 2009).

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

#### 4.4.4 Isolasi Organ Pulmo

Proses eutanasi hingga isolasi organ pulmo (**Lampiran 5**) dari tikus dilakukan secara kesrawan. Tikus dieutanasi dan diposisikan rebah dorsal. Pembedahan thorax-abdomen dilakukan untuk mengisolasi organ pulmo. Pulmo terletak pada rongga dada dibagian dorsal dari organ jantung. Pemeriksaan hematologi darah dan kultur darah dilakukan dengan mengambil sampel darah secara infraorbital.

#### 4.4.5 Pengukuran kadar MDA pulmo

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan menggunakan sampel berupa pulmo tikus. Semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasi pada hari ke-13 perlakuan penelitian. Eutanasi hewan coba dilakukan dengan dislokasi *os cervic*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diposisikan rebah ventral. Dilakukan pembedahan

**Commented [RWK3]:** Budak, E. T., Husyein S., Gunalp U., Ertan T., Osman M. I., Senol Y., Kamer D., Guner D. 2009. *The Effects and Timing of Hyperbaric Oxygen Treatment in Gram Negative Sepsis in Rats*. Turkey: ResearchGate.

**Commented [RWK4]:** Yamanel, L., Umit K., Yesim O., Omer C., Yavuz P., Murat D., Tuncer C., Ahmet O., Seref D., Mehmet Y., Orhan C., Salim K. T., Yusuf E. E., Bulent U., Turgut T., Sukru O., Ahmet K. 2011. *Ozone Therapy and Hyperbaric Oxygen Treatment in Lung Injury in Septic Rats*. Turkey: Ivyspring International Publisher

rongga dada untuk mengambil organ pulmo yang kemudian dicuci dengan PBS steril dan dikoleksi dalam wadah steril. Organ pulmo yang dikoleksi dihancurkan dan dihomogenisasi, larutan supernatan yang didapatkan hasil sentrifugasi kemudian digunakan untuk mengukur kadar MDA menggunakan TBARs (lampiran 5) (Aulanni'am *et al.*, 2012).

#### 4.4.6 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Pulmo

Pembuatan preparat histopatologi pulmo menggunakan pewarnaan HE berdasarkan studi yang dilakukan oleh Muntiha (2001). Jaringan pulmo dicuci dengan NaCl fisiologis, dilanjutkan fiksasi menggunakan *buffer* formalin 10% selama 18-24 jam. Proses dalam pembuatan preparat histopatologi pulmo tertera pada lampiran 6.

#### 4.5 Analisis data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *OneWay* ANOVA (*Analysis of Varians*) terhadap kadar MDA pulmo. 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's Test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji *OneWay* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan  $\alpha = 5\%$ . Gambaran histopatologi pulmo dianalisa secara kualitatif deskriptif dengan mengamati ketebalan septum interalveolar dan infiltrasi sel radang dari masing-masing kelompok.

**Commented [RWK5]:** Aulanni'am, A. Roosdiana, and N. L. Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6: 144-154

**Commented [RWK6]:** Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari jaringan hewan dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE). Bogor: balai penelitian veteriner

**Commented [RWK7]:** Dahlan, M. S. 2011. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba MEDika.