

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian eksperimen Laboratoris

4.2 SAMPEL PENELITIAN DAN BESAR SAMPLE

Hewan percobaan yang dipakai adalah 42 ekor mencit (*Mus musculus*) Balb/c dan *Helicobacter pylori* Cag A+ yang diperoleh dari laboratorium Unit Riset Biomedik Rumah Sakit Mataram. NTB.

Besar sample dalam tiap kelompok perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus M. Syarkani Musa dan Andi Hakim. N (1998), dengan perhitungan sebagai berikut:

Pesyaratan dimana derajat bebas (db) > 16 , sehingga,

$$P(n - 1) > 16$$

P = perlakuan \longrightarrow 3

n = pengulangan \longrightarrow 7

Adapun sample dalam penelitian ini yang diambil dalam mencit adalah darah dan aringan pembuluh aorta.

3 VARIABEL PENELITIAN

3.1 Bvariabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah infeksi *Helicobacter pylori Cag A+* dengan peningkatan dosisnya.

3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya peningkatan kadar fibrinogen, jumlah leukosit dan hitung jenis leukosit darah.

3.3 Variabel kendali (*control variable*)

Yang menjadi variable kendali dalam penelitian ini untuk mencit adalah: galur, umur dan jenis kelamin, makanan dan minuman mencit. Sedang untuk kuman *Helicobacter pylori Cag A+* adalah : galur, cara infeksi.

3.4 Definisi operasional variabel

Kuman *Helicobacter pylori Cag A+* adalah kuman yang berbentuk batang bengkok yang diperoleh dengan cara membiakan mukosa lambung penderita gastritis kronis yang diambil dengan biopsy endoskopik di RSUD Mataram dan dideteksi dengan melalui PRC untuk menentukan strain Cag A+ serta dapat ditumbuhkan pada mencit Balb/c.

penentuan mencit yang terinfeksi ditentukan dengan kultur feces dari mencit yang telah dilakukan infeksi.

Preparasi mencit bebas kuman *Helicobacter pylori* Cag A+ diperoleh dengan claritromycin ke dalam botol minuman mencit. Penentuan ada tidaknya kuman dilakukan kultur feces ataupun secara acak untuk kultur lambung.

5.5 Bahan – Bahan

1. Hewan percobaan mencit bebas kuman *Helicobacter pylori* Cag A+ dengan jenis kelamin jantan 2 bulan dengan galur Balb/c yang didapat dari unit Riset biomedik RSUD Mataram

2. Kuaman *Helicobacter pylori* Cag A+ didapat dari pembiakan mukosa lambung penderita kronis di RSUD mataram yang dapat dikolonisasi dilambung mencit.

3. Larutan salin steril

4. Colombia agar

5. Darah domba

6. Aquadest

7. Skirrow supplement

8. KIT Fibrikquik

9. Antibiotic Clarimocylin

Makanan mencit

Minuman mencit (air PDAM) yang disterilkan

Bahan ekstraksi DNA

Bahan PCR

Jaringan aorta

Formalin 10%

6 ALAT PENELITIAN

Alat alat penelitian yang digunakan dalam penelitian

Cawan patri

Pembakar spirtus

Tabung Eppendorf

Stop watch 0,1 detik (sunflek)

Tabung rak reaksi

Alat bedah mencit

Tabung reaksi

Mikroskop

Anaerobic

Mikrotum, lempengan logam pencetak

Mesin PCR

Tissue prosesor, pemanas paraffin

4.7 ANALISIS STATISTIK

Untuk data-data yang diperoleh hubungan infeksi *Helicobacter pylori* Cag A+ dengan peningkatan fibrinogen, jumlah leukosit di lakukan Analisis Sidik Ragam dilanjutkan Uji BNT dan korelasi –regresi dengan program SX. Untuk analisis perubahan pembuluh darah aorta dilakukan dengan Chi-Square.

4.8 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium unit riset Biomedik RSUD Mataram dan dilakukan pada bulan Maret s/d april 2001. Pembuatan preparat histology dilakukan di laboratorium Patologi Balai Penyelidikan Penyakit Hewan (BPPH) sesetan Denpasar tanggal 16 Juni s/d 2 juli 2001.

4.9 PROSEDUR PENGIMPULAN DATA

4.9.1 Tahapan untuk memperoleh data

- a. Mendapatkan mencit jantan berumur 2-3 bulan bebas dari kuman
- b. Mendapatkan biakan murni *Helicobacter pylori* Cag A+

- c. Melakukan deteksi *Helicobacter pylori Cag A+*
- d. Melakukan inokulasi mencit masing-masing perlakuan dengan kuman *Helicobacter pylori Cag A+* kecuali control
- e. Melakukan pembiakan tinja dari mencit setelah satu minggu untuk menentukan positif tidaknya terinfeksi

4.9.2 Cara kerja

4.9.2.1 Prosedur tetap kultur *Helicobacter pylori Cag A+* untuk infeksi mencit

a. Media

Media yang digunakan columbia agar ditambah 10% darah domba skirrow supplement dan iso-vitaleks.

b. Inokulum

Isolate kultur murni *Helicobacter pylori Cag A+* segar (sebelum disubkultur berkali-kali). Isolate *Helicobacter pylori Cag A+* diperoleh dari kultur biopsy pasien dengan ulkus lambung. Selain itu isolate harus menunjukkan Cag A+ berdasarkan gen Cag A (PCR).

c. Penanaman

Suspensi *Helicobacter pylori* Cag A+ dari cryo-tube atau koloni *Helicobacter pylori* Cag A+ dari biakan primer digoreskan merata pada permukaan media agar skirrow. Kemudian di inkubasikan pada suhu 37⁰C selama semalam dengan kondisi mikroaerofatik (10% CO₂, 5% O₂ dan 85%% N₂).

d. Pembuatan suspensi bakteri

Setelah diinkubasikan semalam, koloni *Helicobacter pylori* Cag A+ disuspensikan ke dalam larutan standar Mc Farland/ Larutan Barium Sulfat. Diperkirakan 1 plate koloni jika disuspensikan pada 1 ml saline akan diperoleh kepekatan 10⁹.

4.9.2.2 Penyiapan dan karakterisasi *Helicobacter pylori* Cag A+

Isolate *Helicobacter-pylori* Cag A+ yang diperoleh dari lambung penderita gastritis diidentifikasi dengan deteksi gen Cag A dengan metode PCR. Pertama-tama melakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan larutan DNA-zol (GIBCO BRL USA). Mula-mula dibuat suspensi sel bakteri sesuai dengan standar Mc. Farland 0,5 unit . Kemudian pada setiap 100 µl.

Pertama tama melakukan ekstrasi DNA dengan menggunakan larutan DNA-zol . mula-mula dibuat suspensi sel bakteri sesuai dengan standart Mc. Farland 0,5

unit. Kemudian pada setiap 100 μ l. Sample ditambahkan 300 μ l laruta DNA-zol dokocok kuat-kuat, dan didiamkan selama 5 ,menit dilakukan pemutaran pada 14 000rpm selama 2 menit. Supernatant dipindahkan ke tabung baru dan ditambah 200 μ l etanol absolute. Setelah didiamkan selama 1 jam dan diputar 14 000 rpm 15 menit, presipitat 2X dengan etanol 70 % DNA yang diperoleh dikering anginkan dan dilarutkan kembali menggunakan 50 μ l aquadest.

Selanjutnya deteksi Cag A dengan menggunakan reagen PRC core system (Promega USA). Reaksi amplikasi dilakukan pada volume 50 μ l yang terdiri dari 5 μ l buffer PCR, 1 μ l DNTP (200 μ M) 50 p mol masing-masing primer 0,25 μ l Taq DNA polymerase, 1-2 μ l DNA template (<0,5 μ g) dan aquadest hingga 50 μ l.

Pasangan primer yang digunakan untuk gen Cag A:

Cag A1 : 5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACC TGA GCGA 3'

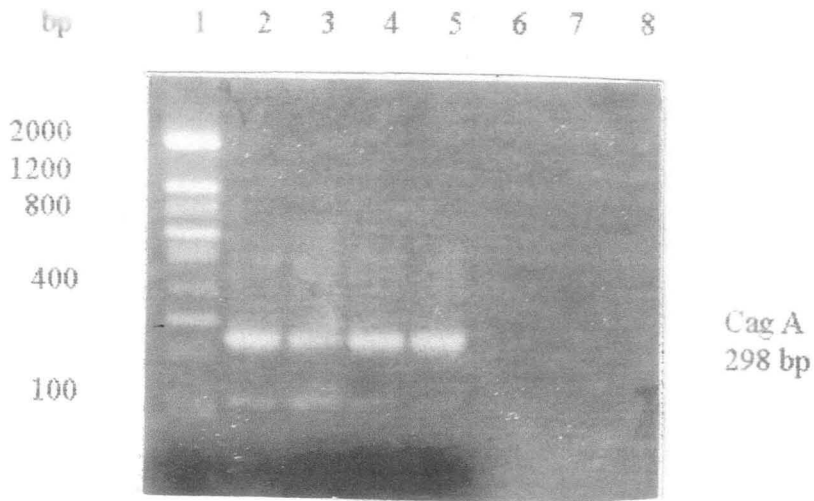
Cag A2 : 5' TTA GAA TTA TCA ACA AAC ATC ACG CCAT 3'

Dengan kondisi implikasi sebagai berikut:

Gen Cag A	: - denaturasi 95 ⁰ C	30 detik	
	- annealing 45 ⁰ C	60 detik	
	-extension 72 ⁰ C	60detik	
			38 siklus

menggunakan mesin amplitor 1 (thermolin, USA) product PCR dianalisis pada 2% agarose dengan pewarnaan Ethidium bromide dan penyinaran UV, hasil detek karakter *Helicobacter pylori* Cag A+

Gambar bibawah ini dengan metode PCR



Gambar 4.1 I hasil PCR deteksi karakter *Helicobacter pylori* Cag A+

- Line I : low DNA mass ladder (GIBCO, USA)
- Line 2-5 : Isolate *Helicobacter pylori* dengan gen Cag A+
- Line 6-8 : isolate *Helicobacter pylori* dengan gen Cag A-

4.9.2.3 Prosedur pemberian infeksi

Pereparasi mencit bebas kuman *Helicobacter pylori* Cag A+

Mencit bebas kuman *Helicobacter pylori* diperoleh dengan cara melakukan pemberian clarytomicin pada minuman mencit. Penentuan ada tidak adanya kuman tersebut dilakukan dengan kultur feses ataupun diambil secara acak kultur lambung.

4.9.2.4 Melakukan inokulasi pada mencit bebas kuaman

Mencit sehat yang akan di inokulasikan dengan *Helicobacter pylori* Cag A+ sebelumnya diberikan 0,25 ml larutan NaHCO₃ secara oral guna menetralkan asal lambung. Selanjutnya mencit diberikan 10¹⁰ CFU kuman dalam 330 µl saline steril. Pembiakan kuman pada mencit dilakukan 3 kali yang diberikan selama 2 hari . Mencit yang akan diinfeksi tidak diberikan makan selama 24 jam, demikian juga bila akan dilakukan pembedahan guna pengambilan darah dan pengambilan jaringan aorta. Adanya kolonisasi kuman dapat dideteksi selama 1 – 2 minggu diinfeksi (Marcheheti m. et al., 1995). Cara mendeteksi dengan membiakkan tinja. Pembiakan tinja ini dilakukan bersama dengan perhitungan jumlah koloni dalam suspensi.

4.9.2.5 Pemeriksaan Kadar Fibrinogen Plasma

Kadar fibrongen plasma ditentukan dengan reagen kemersial fibrikuik, yang prinsipnya sesuai dengan metode yang dijabarkan oleh Cluse. Dalam hal ini penambahan trombin ke dalam sample plasma, secara enzimatis akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Fibrin kemudian mengalami polimerisasi untuk membentuk jala-jala fibrin. Factor XIII yang diaktifkan oleh trombin akan membentuk gumpalan stabil. Waktu yang diperlukan dari saat penambahan trombin sampai terbentuknya gumpalan berbanding terbalik dengan kadar fibrinogen. Oleh karena itu, jika lama waktu pembentukan gumpalan diketahui, maka kadar fibrinogen dapat diketahui. Prosedurnya sebagai berikut.

Kadar fibrinogen dalam serum diukur dengan menggunakan kit fibrikuik (organon teknik corp. USA) mula-mula diambil darah mencit 180 μ l di campur dengan 20 μ l Natrium Sitrat 3,8% setelah itu disentrifuge 2000rpm selama 10 menit. Diambil 100 μ l plasma dan dicampur dengan 900 μ l owens veronal. Kemudian 200 μ l sample plasma direaksikan dengan 100 μ l reagen trombin dalam gelas tabung kaca. Selanjutnya diamati dan dicatat waktu terjadinya penggumpalan (clotting time) dengan menggunakan stopwatch. kadar fibrinogen ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi atau dengan menggunakan persamaan matematik tertentu berdasarkan

serum control yang telah disediakan dalam KIT fibrikuik adadup persamaan sebagai berikut.

$$\text{Log clotting time} = 3,757 - 1,22 \text{ Log fibrinogen}$$

4.9.2.6 Pemeriksaan Jumlah Leukosit

Pemeriksaan leukosit dilakukan dengan hemotostimeter setelah sel darah merah dilisiskan dengan larutan Turk . perhitungan dilakukan dengan hematositometer. Jumlah leukosit yang ditemukan dikalikan factor pengencer (20X) dan kalibrasi dari mm^3 ke cm^3 dengan factor 100 X

4.9.2.7 Pemeriksaan Hitung Jenis Leukosit

Darah asal mencil dibuat sediaan usap darah diatas gelas obyek menurut prosedur rutin. Setelah pewarnaan fiksasi dengan methanol selama 5 menit. Sediaan dimasukkan usap darah diwarnai dengan warna giemsa. Pemeriksaan terhadap jumlah masing-masing leukosit dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Pepmeriksaan dilakukan dengan perhitungan masing-masing leukosit sampai diperoleh 100 leukosit. Untuk mendapatkan data yang akurat, pemeriksaan masing-masing sample diulang sebanyak 5 kali.

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksdperimental laboratories . rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola *splite time* . sebagai factor utama adalah infeksi *Helicobacter pylori Cag A+* dengan berbagai tingkatan

dosis sedang factor tambahannya adalah perbedaan waktu pengamatan . tingkat dosis yang dipakai dalam penelitian adalah 0 CFU, 10^9 CFU dan 10^{10} CFU. Perlakuan infeksi dengan dosis standart 10^9 CFU adalah merupakan dosis infeksi yang direkomendasikan oleh Marchetti M. et al., (1995). Sedangkan dosis pembanding infeksinya adalah dalam penelitian ini 10^{10} CFU. Adapun pengamatan dilakukan 2 kali, sehingga rancangan pengamatan dapat dijabarkan seperti table berikut.

4.9.2.8 Prosedur pengamatan

PENGAMATAN BULAN Ke-1

	Tanpa infeksi	Dengan infeksi	
	H pylori Cag A+	H pylori Cag A+	
Diet	0 CFU	10^9 CFU	10^{10} CFU
Srtandart	To ¹ ,To ² ,To ³ ,To ⁴	T ₁ ¹ ,T ₁ ² ,T ₁ ³ ,T ₁ ⁴	T ₂ ¹ ,T ₂ ² ,T ₂ ³ ,T ₂ ⁴
	To ⁵ ,To ⁶ ,To ⁷	T ₁ ⁵ ,T ₁ ⁶ ,T ₁ ⁷	T ₂ ⁵ ,T ₂ ⁶ ,T ₂ ⁷

PENGAMATAN BULAN KE-2

	Tanpa infeksi	Dengan infeksi	
	H pylori Cag A+	H pylori Cag A+	
Diet	0 CFU	10^9 CFU	10^{10} CFU
Srtandart	To ¹ ,To ² ,To ³ ,To ⁴	T ₁ ¹ ,T ₁ ² ,T ₁ ³ ,T ₁ ⁴	T ₂ ¹ ,T ₂ ² ,T ₂ ³ ,T ₂ ⁴
	To ⁵ ,To ⁶ ,To ⁷	T ₁ ⁵ ,T ₁ ⁶ ,T ₁ ⁷	T ₂ ⁵ ,T ₂ ⁶ ,T ₂ ⁷

Tabel 4.1 Bagan Cara Pengamatan Penelitian

Dalam rancangan tersebut 42 ekor tikus dibagi menjadi 6 kelompok. Tiga kelompok pertama untuk pengamatan pertama dan 3 kelompok lain dipakai untuk pengamatan ke dua. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus sebagai ulangan, hal ini dengan menggunakan asumsi normalitas data bias menggunakan minimal 7 untuk ulangan. Adapun model perlakuannya sebagai berikut:

- a. Kelompok tikus 1 (control), tanpa diberi perlakuan.
- b. Kelompok tikus 2 yang diinfeksi *Helicobacter pylori* Cag A+ dosis I (dengan dosis 10⁹ CFU).
- c. Kelompok 3 kelompok yang diinfeksi *Helicobacter pylori* Cag A+ dosis II (dengan dosis 10¹⁰ CFU)

Pengamatan dilakukan 2 kali, pengamatan pertama dilakukan dsatu bulan setelah perlakuan, selanjutnya pengamatan berikutnya dilakukan sebulan dari pengamatan selanjutnya.

4.9.2.9 Pemeriksaan Histopatologis Jaringan Aorta

Pemeriksaan histologis dilakukan pada dinding pembuluh darah aorta sediaan histologis pada pembuluh darah dilakukan dengan metode standar menggunakan jaringan yang di fiksasi dengan formalin fosfat 10% diproses secara histologis dan diwarnai dengan hematoksilin dan eosin (metode standart). Tolok ukur untuk menentukan kalainan pembuluh darah aorta dengan melihat adanya infiltrasi sel radang (monosit, limposit dll) pada tunika intima .

6. Jaringan yang telah melewati proses dalam tissue prosesor diblok didalam lempengan logam dengan paraffin cair dan diberi kode.
9. Biarkan paraffin sampai padat.
10. Blok paraffin disimpan dan siap untuk dipotong

Proses Pemotongan

Prosedur :

1. Mikrotom diatur untuk memotong dengan ketebalan 4-6 mikron
2. Pisau mikrotom kasar difiksasi pada mikrotom
3. Ambil blok paraffin berisi jaringan sesuai dengan kodenya. Dinginkan permukaan yang akan dipotong dengan es. Kemudian difiksasi pada mikrotom.
4. Blok paraffin dipotong dengan pisau mikrotom kasar sehingga didapat permukaan rata
5. Pisau mikrotom diganti dengan pisau mikrotom yang halus
6. Blok paraffin dipotong lagi, dipilih potongan yang baik dan diapungkan dalam waterbath. (sebelumnya sudah dihidupkan dan diisi larutan pengapung) pada suhu 40°C (38-42°C)
7. Potongan dibiarkan mengapung, permukaan yang melipat dibenahi sehingga rata dan tidak ada lipatan. Lalu seksion disalut slide glass yang berlabel.
8. Slide glass yang berisi seksion jaringan dimasukkan ke dalam incubator 38-42 °C dan dibiarkan semalam.
9. Potongan siap untuk diwarnai
10. interpretasi hasil dengan melihat adanya infiltrasi sel di daerah tunika intima.