

BAB IV
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB IV

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik in vivo dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (Zainuddin, 2000). Secara skematis rancangan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Faktor Terapi (T)	Faktor Respon Inflamasi (I)				
	I1	I2	I3	I4	I5
T1	T1I1	T1I2	T1I3	T1I4	T1I5
T2	T2I1	T2I2	T2I3	T2I4	T2I5
T3	Kontrol Negatif				

Keterangan:

T1 : Diinfeksi dan diterapi dengan bawang putih

T2 : Diinfeksi dan tidak diterapi dengan bawang putih

T3 : Kontrol negatif (tidak diinfeksi dan tidak diterapi)

I (1 -5) : Respon inflamasi pada hari ke-1 s/d 5

4.2. Sampel Penelitian

4.2.1. Jumlah Sampel

Besarnya sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer (1963): $\{(t - 1) (n - 1)\} \geq 15$

Dimana:

n = besar sampel dalam kelompok perlakuan

t = banyaknya kelompok perlakuan

Banyak sampel yang dibutuhkan dalam kelompok: $\{(11 - 1) (n - 1)\} \geq 15$

$$10 (n - 1) \geq 15$$

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 25 \rightarrow n \geq 2,5$$

Besar sampel (n) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5, sehingga besar sampel untuk 11 kelompok adalah 55.

4.2.2. Cara Pengambilan Sampel

Kriteria inklusi meliputi jenis kelamin mencit, umur mencit, berat badan mencit, dan breed/strain mencit. Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel penelitian ini meliputi, manajemen pemeliharaan mencit, anestesi topikal, panjang dan kedalaman insisi, dosis infeksi bakteri *S. aureus*, dosis perasan bawang putih, dan keseragaman masa inkubasi.

4.3. Materi Penelitian

4.3.1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah 55 ekor mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB-C, dengan umur rata-rata dua bulan yang diperoleh dari Pusat Veterineria Farma (PUSVETMA) Surabaya. Sebelum diberikan perlakuan, semua hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu selama kurang lebih satu minggu pada kondisi kandang individu, pakan, minum, dan lingkungan yang sama dengan pemberian pakan dan minum *ad libitum*.



Gambar 4.1. Mencit (*Mus musculus*) Betina Strain BALB-C



Gambar 4.2. Mencit Dipelihara Dalam Kandang Individu

4.3.2. Bakteri *S. aureus* ATCC 25923

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* isolat murni dengan strain ATCC (*American Type Culture Collection*) nomor 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Sebelum bakteri tersebut digunakan untuk penelitian dilakukan uji konfirmasi ulang dengan uji isolasi dan identifikasi bakteri menggunakan media *Mannitol Salt Agar* (MSA), uji koagulase, uji katalase dan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram.

4.3.3. Perasan Bawang Putih (*Allium sativum* Linn.)

Bawang putih yang digunakan diperoleh dari pasar Bratang Surabaya. Sebelum digunakan dilakukan pembuatan perasan bawang putih.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis perasan bawang putih.

4.4.2. Variabel Interfering

Variabel interfering pada penelitian ini adalah dosis infeksi buatan oleh bakteri *S. aureus*.

4.4.3. Variabel Tergantung

Jumlah sel radang neutrofil, jumlah sel makrofag yang memproduksi TNF- α dan IL-1 α pada mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus* kemudian diterapi dengan perasan bawang putih.

4.4.4. Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini antara lain, jenis hewan coba, jenis kelamin, umur, pakan, jenis bakteri, dan jenis bahan terapi.

4.4.5. Definisi Operasional Variabel

- a. Dosis perasan bawang putih: dosis perasan bawang putih sebesar 0,05 ml
- b. Imunomodulator: suatu agen (bawang putih) yang memodulasi sistem kekebalan tubuh, dapat bersifat menguatkan sistem imun (*immunostimulant*) atau menekan sistem imun (*immunosuppressant*).
- c. Respon inflamasi: respon tubuh terhadap adanya *S. aureus*, yang ditandai dengan perubahan jumlah sel radang neutrofil, jumlah sel makrofag yang memproduksi TNF- α dan IL-1 α pada kulit di sekitar tempat infeksi.
- d. Infeksi *S. aureus*: bakteri *S. aureus* yang diinfeksi secara buatan pada mencit dengan dosis infeksi yang telah ditentukan sebelumnya (pengenceran bakteri terendah yang dapat menginfeksi 100% hewan coba, yaitu 10^{-8}). Berarti bahwa kulit sudah terinfeksi, setelah 1 hari infeksi pada luka ditemukan bakteri *S. aureus*.
- e. Sel radang: sel radang neutrofil yang dihitung jumlahnya dari tiap lapang pandang, dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin tampak bahwa intisel berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah.
- f. Jumlah sel makrofag yang memproduksi TNF- α dan IL-1 α : sel makrofag dihitung jumlahnya dari tiap lapang pandang, dengan pewarnaan imunohistokimia tampak bahwa sitoplasma sel yang positif menunjukkan warna coklat kehitaman (*dark brown*), sedangkan sitoplasma sel yang negatif menunjukkan warna kebiruan.

4.5. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain media *Mannitol Salt Agar* (MSA), media *Nutrient Agar*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Muller Hinton Broth* (MHB), alkohol 70%, gentian violet, safranin, alkohol aseton, lugol, minyak emersi, aquades steril, *xylol*, PBS, *buffer formalin* 10%, antibodi monoclonal anti TNF- α dan anti IL-1 α , *streptavidin peroxidase*, *diaminobenzidine*, hematoksin, eosin, dan chlorofom.

4.6. Instrumen Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi 5 ml, rak tabung, pipet pasteur 0,05 ml, pipet pasteur 1 ml, gunting bedah, *scalpel*, pinset anatomis, api bunsen, *cotton bud* steril, kapas, ose, *autoclave*, vortex, inkubator, mikrotom, *counter*, *becker glass*, *cover glass*, *object glass*, *object glass* berlapis poly-L-lysine, mikroskop *Olympus model BX50f-3*, *Pentax optio Digital camera 2 mega pixel*.

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, sebagai tempat pemeliharaan hewan coba. Pengujian bakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan. Pembuatan preparat jaringan kulit sekaligus pewarnaan Hematoksin-Eosin dan imunohistokimia dilakukan di Gramik Fakultas Kedokteran. Penghitungan sel radang neutrofil, TNF- α dan IL-1 α dilakukan di

Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan. Penelitian dilaksanakan dalam waktu satu bulan, yaitu bulan Juli 2010.

4.8. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.8.1. Pembuatan Perasan Bawang Putih

Umbi bawang putih dipisahkan satu persatu, dikupas bersih termasuk kulit arinya, selanjutnya dihaluskan dengan mortir, untuk mendapatkan bentuk gerusan bawang putih, kemudian diperas.

4.8.2. Pembuatan Suspensi *S. aureus*

Koloni bakteri diambil dan dibiakkan dalam media *Muller Hinton Broth* (MHB) steril, diaduk hingga merata dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Kekeruhan bakteri dalam pengujian ini sebanding dengan dengan 3. 10⁸ per mililiter sesuai dengan standar McFarland no. 1.

4.8.3. Pemberian Infeksi Buatan Pada Mencit

Infeksi buatan diberikan pada 50 ekor mencit dan 5 ekor mencit tidak diinfeksi buatan sebagai kontrol negatif. Sebelum dilakukan infeksi buatan pada mencit, terlebih dahulu ditentukan dosis infeksi bakteri *S. aureus*. Penentuan dosis infeksi ini dilakukan untuk menentukan pengenceran bakteri terendah yang dapat menginfeksi 100% hewan coba. Cara yang dilakukan adalah dengan pengenceran suspensi *S. aureus* secara seri 10⁻¹ – 10⁻⁸. Menurut penelitian Widyaningsih (2002), pengenceran terendah yang masih dapat menginfeksi 100%

hewan coba adalah 10^{-2} (dosis bakteri = $3 \cdot 10^6$ /ml). Akan tetapi, setelah dilakukan trial terlebih dahulu, ditunjukkan bahwa pengenceran terendah adalah 10^{-8} . Hal tersebut dapat disebabkan adanya penurunan virulensi dari bakteri *S. aureus* pada saat ini.

Infeksi luka buatan dilakukan dengan cara menginsisi 50 ekor mencit pada bagian punggung $\pm 1,5$ cm dan kedalaman mencapai lapisan kulit hipodermis (tidak sampai mencapai *musculus*). Sebelum dilakukan insisi, bulunya dicukur terlebih dahulu dan diberikan anastesi topikal pada punggung untuk menghindari rasa nyeri. Selanjutnya luka insisi diinfeksi dengan suspensi bakteri sebanyak 0,05 ml. Luka infeksi buatan dibiarkan terbuka untuk memberikan suasana aerob sesuai dengan sifat aerobik bakteri *S. aureus*.

4.8.4. Pemberian Terapi dengan Perasan Bawang Putih

Terapi atau pengobatan dengan perasan bawang putih dilakukan secara topikal setelah terjadi luka pada 24 jam post infeksi dengan gejala klinis yang positif berupa peradangan akut dan nanah berwarna putih kekuningan. Selain dengan pemeriksaan makroskopis, pemeriksaan terhadap luka infeksi akibat *S. aureus* dapat juga dilakukan dengan pemeriksaan laboratorium, meliputi isolasi dan identifikasi, salah satunya dengan *Gram Staining*. Hal tersebut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Widyaningsih (2002). Perasan bawang putih diberikan secara topikal dengan dosis 0,05 ml dua kali sehari pada 25 ekor mencit.

4.8.5. Pengamatan Sel Radang Neutrofil dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Sel radang neutrofil diamati dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Untuk membedakan ikatan terhadap warna dilakukan dengan menggunakan zat warna alam dan zat warna sintetis. Zat warna alam yang digunakan adalah hematoksilin dan zat warna sintetis yang digunakan adalah eosin. Hematoksilin mewarnai inti sel menjadi biru sedangkan eosin mewarnai sitoplasma menjadi merah.

Pembuatan sediaan histologis berdasarkan metode Luna (1968) dan Culling and Dunn (1974) yaitu sampel berupa kulit yang telah difiksasi dengan buffer formalin 10%, didehidrasi dan berturut-turut dibersihkan dengan satu sesi larutan (formalin 10% I, formalin 10% II, formalin 10% III, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol absolut III, xylol I, xylol II, xylol III, parafin cair I, parafin cair II) dalam waktu 23 jam. Lalu dibloking dengan paraffin cair, setelah didinginkan selama 30 menit dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 4 – 5 μm . Sebelum dilakukan *mounting* terlebih dahulu dilakukan pewarnaan dengan metode *Harris-hematoxylin eosin*, dengan cara: direndam dalam xylol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam alkohol absolut I dan II selama 5 menit.

Sebelum direndam dalam *Harris-haematoxylin* / HE (15 menit), dilakukan perendaman dalam aquadest selama 1 menit. Sampel kembali direndam dalam aquadest (1 menit), kemudian 5-7 menit dalam acid alkohol 10%, dua kali dalam aquadest selama 1 menit dan 15 menit. Setelah itu diwarnai dengan eosin. Preparat yang telah diwarnai kemudian direndam dalam alkohol 96% I dan

alkohol 96% II masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya direndam kembali dalam alkohol absolut III yang dilanjutkan lagi kedalam alkohol absolut IV masing-masing 3 menit. Selanjutnya dibersihkan dalam xylol I dan xylol II selama 5 menit.

Setelah pembuatan preparat histologi selesai dilakukan, maka dilakukan penghitungan jumlah sel radang neutrofil dengan mikroskop menggunakan perbesaran 400x. Data pada setiap sampel merupakan hasil rata-rata skor dari lima lapangan pandang yang berbeda. Cara skoring yang digunakan dalam penilaian ini merupakan modifikasi dari penentuan tingkat infeksi menurut Fiedler, *et al.* (1996) yang dikutip dari Rahayu, dkk. (2010). Menurut Fiedler, *et al.* (1996), skoring untuk inflamasi akut, dikategorikan dalam 4 (empat) skala point:

0 (nol) : Jumlah neutrofil 0 dari lapangan pandang (LP)

1 (satu) : Jumlah neutrofil < 10 dari lapangan pandang (LP)

2 (dua) : Jumlah neutrofil 10-100 dari lapangan pandang (LP)

3 (tiga) : Jumlah neutrofil > 100 dari lapangan pandang (LP)

4.8.6. Pengamatan Ekspresi TNF- α dan IL-1 α Pada Jaringan Luka dengan Pewarnaan Imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode BS-A (*Biotin Streptavidin Amplified*). Metode tersebut lebih sensitif daripada metode *Avidin Biotin Complex*. Apabila bahan berupa sayatan yang diperoleh dari penyayatan dingin, maka segera dapat dilakukan pewarnaan. Bila bahan berasal dari sayatan yang diproses melalui paraffin, maka harus dilakukan deparaffinasi.

Deparaffinasi preparat (blok parafin) dilakukan dengan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95 % dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan aquabides selama satu menit. Selanjutnya, Preparat ditetesi dengan proteinase K 5 menit, dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dua kali, selanjutnya ditetesi *hydrogen peroxidase* (H_2O_2) 3% selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali.

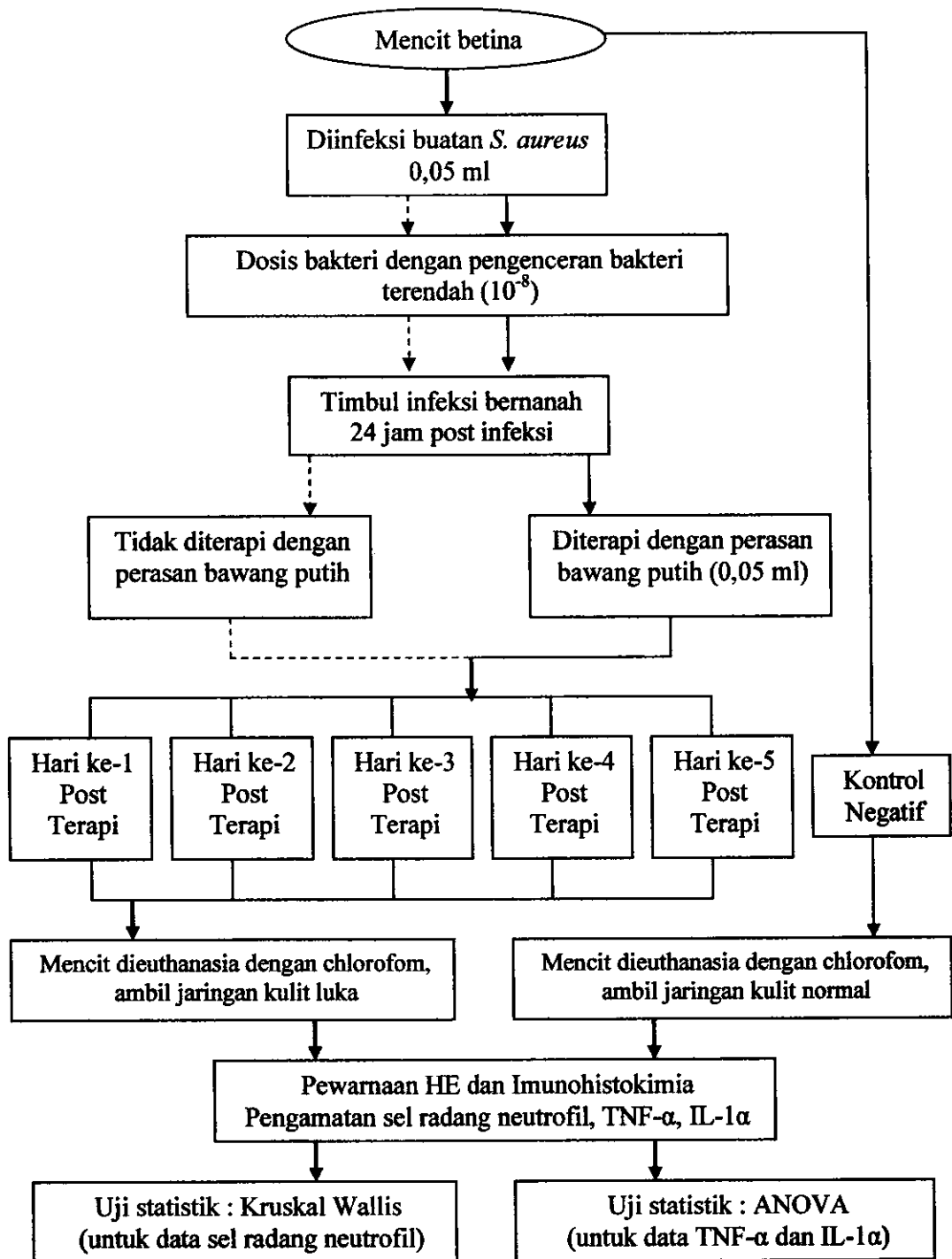
Setiap sayatan diinkubasi dalam antibodi monoclonal terhadap TNF- α dan IL-1 α *anti-mouse* 30 menit. Selanjutnya sayatan diinkubasi dalam antibodi sekunder yang dilabel dengan biotin selama 30 menit, dicuci dengan PBS dua kali. Kemudian preparat ditetesi *streptavidin peroxidase* selama 15 - 30 menit, dicuci dengan PBS dua kali dan dimasukkan dalam larutan substrat Diaminobenzidine selama 5 -10 menit. *Counterstain* digunakan hematoksin, diinkubasi 30 detik pada suhu kamar kemudian dicuci 3 kali dengan aquades. Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dan perhitungan jumlah sel makrofag yang memproduksi TNF- α dan IL-1 α dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya biasa dengan perbesaran 1000x (Ramos, 2005; Thomas, 2005; Lucia, 2006).

4.8.7. Analisis Data

Data jumlah sel radang dari hasil penelitian ini dianalisis dengan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis*, oleh karena data yang diperoleh dalam bentuk skoring. Sedangkan data jumlah sel yang memproduksi TNF- α dan jumlah

sel yang memproduksi IL-1 α dianalisis dengan uji statistik anova (*Analysis of Variance*), kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*. Analisis statistik tersebut dilakukan dengan bantuan program *SPSS for windows 17*.

4.8.8. Kerangka Operasional



Gambar 4.3. Kerangka Operasional Penelitian