

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemberian polisakarida krestin dan perawatan mencit dilakukan di Rumah Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Pemaparan *Mycobacterium tuberculosis*, pengambilan darah melalui *intracardiac*, dan pengkoleksian organ paru dilakukan di area terbuka sekitar Rumah Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Laboratorium Mikrobiologi RS. Dr. Soetomo Surabaya sebagai tempat isolasi dan perbanyak *M. tuberculosis*. Pengukuran konsentrasi IL-10 dan isolasi serum dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, pembuatan dan pengamatan preparat histologis paru dilaksanakan di Laboratorium Histologi Hewan, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Ekstraksi polisakarida krestin *C. versicolor* dilakukan di *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

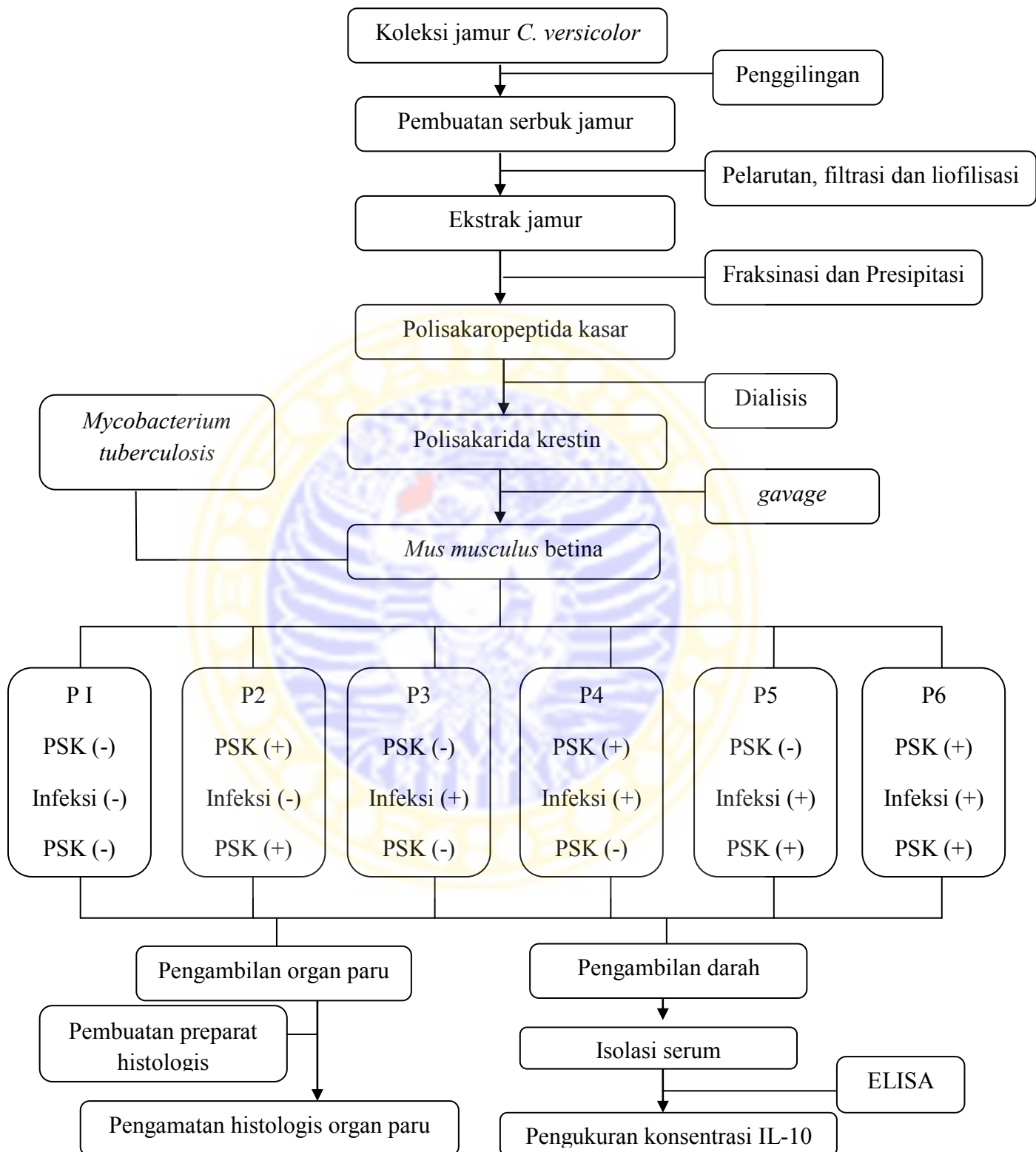
3.2.1 Alat penelitian

Alat yang di butuhkan dalam penelitian ini antara lain bak plastik dengan tutup dari kawat kasa, botol minum, tempat pakan, serut kayu, *petridish*, Erlenmeyer, gelas tabung, penggojok, botol larutan, pengaduk, *sentrifuge*,

magnetic stirrer, autoclave, shaker, timbangan analitik dengan ketelitian 4 angka di belakang koma, tabung *microcentrifuge*, alat bedah, meja bedah, jarum injeksi ukuran 20G yang ujungnya telah ditumpulkan dengan tembaga, *hot plate, thermometer*, corong *Buchner*, *rotatory vacuum evaporator*, saringan, kaset untuk tempat organ, *object glass, cover glass*, panci, *cutter, holder, microtom*, aspirator, tabung anastesi, mikroskop *inverted*, botol fiksatif, *staining jar*, oven, bunsen, jarum injeksi ukuran 23G untuk memapar *Mycobacterium tuberculosis* melalui intraperitoneal, jarum injeksi 1 mL dengan ukuran 23G untuk mengambil sampel darah, ELISA *plate* sumuran 40, ELISA *reader*, mikro pipet, satu set tip, *camera* digital, dan alat tulis.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tiga puluh mencit (*Mus musculus*) betina dewasa strain Balb/C, berumur 8-10 minggu, berat badan berkisar 25-30 g, polisakarida krestin dari ekstrak jamur *Coriolus versicolor* yang diperoleh dari wilayah kampus Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Tuban, Surabaya dan Tulung Agung. Bakteri *M. tuberculosis* di dapatkan dari bagian Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya, Kit untuk pengukuran konsentrasi IL-10, makanan mencit, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, *xylol*, parafin, aquades, *buffered formalin*, kertas label, kantong plastik, kertas saring, albumin, *etellan*, kertas saring *Whatman* no. 41, *hematoxylin, eosin*, spidol marker, *aluminium foil*, kertas tisu, air garam fisiologis, kapas dan kloroform.



Gambar 3.1 Kerangka operasional penelitian

3.3 Rancangan Penelitian dan Definisi Operasional

Polisakarida krestin yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari ekstrak jamur *Coriolus versicolor* sebanyak 0,2 mL dengan dosis 50 mg/kgBB diberikan selama seminggu berturut-turut pada mencit betina dewasa strain Balb/C, berumur 8-10 minggu, dan berat badan berkisar 25-30 g. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* didapatkan dari bagian Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya. Pemaparan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan sebanyak 2 kali dengan jarak 2 minggu dari pemaparan pertama melalui intraperitoneal. Konsentrasi IL-10 ditentukan berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi IL-10 dalam serum darah pada 6 kelompok perlakuan. Pengukuran konsentrasi sitokin yaitu IL-10 dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm kemudian ditentukan nilai konsentrasinya (pg/mL) dengan rumus regresi. Visualisasi hasil pemeriksaan kerusakan paru berupa peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma berdasarkan skor Dormans *et al.* (2004) dalam Koendhori (2008) diperoleh melalui pembuatan preparat histologis organ paru yang dilakukan sepanjang daerah terluas dari tiap lobus pada tiap kelompok perlakuan.

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yaitu perlakuan dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan masing-masing dengan 6 kali ulangan.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dibagi menjadi beberapa tahapan, yaitu tahap persiapan, pemberian perlakuan, pengambilan organ paru, isolasi serum, pembuatan preparat gambaran histologis organ paru, pengamatan histologis organ paru, pengukuran konsentrasi IL-10, dan analisis data. Tiap prosedur dapat dijelaskan sebagai berikut.

3.4.1 Persiapan penelitian

3.4.1.1 Penyediaan kandang mencit

Kandang mencit yang digunakan yaitu dari bak plastik dengan penutup dari kawat kasa. Beralaskan serut kayu, tempat minum mencit yang dimasukkan ke lubang penutup, dan pakan di letakkan di atas penutup dari kawat kasa. Kondisi rumah hewan berventilasi dengan sistem penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap.

3.4.1.2 Isolasi dan perbanyakan *Mycobacterium tuberculosis*

Isolasi dan perbanyakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan cara yaitu pertama mengisolasi bakteri dari dahak penderita penyakit TB dari pasien Bagian Penyakit Paru, R. S Dr. Soetomo Surabaya. Menumbuhkan bakteri pada media padat agar, pada suhu ruang, selama 4-6 minggu. Setelah itu, memindah bakteri yang tumbuh ke media cair sebanyak 20 mL, selama 2 hari. Pemanenan bakteri dengan cara media cair yang mengandung bakteri di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang

sedangkan pellet bakteri digunakan untuk menginfeksi hewan coba. Tahap terakhir yaitu melarutkan pellet bakteri dalam garam fisiologis.

3.4.1.3 Koleksi dan pembuatan serbuk *Coriolus versicolor*

Jamur *Coriolus versicolor* diperoleh dari area kampus C Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Tuban, Surabaya dan Tulung Agung. Jamur yang telah dikoleksi, kemudian diidentifikasi. Setelah itu, jamur dibersihkan dari kotoran dan tanah yang menempel. Jamur dikeringkan untuk menghilangkan kandungan airnya. Setelah kering, jamur dipotong-potong kecil dan dihaluskan dengan mesin penggiling sehingga terbentuk serbuk kasar jamur.

3.4.1.4 Pembuatan polisakarida krestin (PSK)

Pembuatan polisakarida krestin dilakukan menurut metode Cui dan Chisti (2003) yaitu dengan cara:

Serbuk kasar jamur sebanyak 200 g ditimbang. Akuades sebanyak 3 L ditambahkan pada serbuk kasar jamur dan dipanaskan pada suhu 80-98°C selama 2-3 jam. Selanjutnya menyaring hingga mendapatkan larutan jamur, sedangkan ampas jamur yang tidak terpakai diekstraksi kembali sebanyak dua kali dengan menambahkan akuades sebanyak 1 L dan dipanaskan pada suhu 80-98°C. Larutan jamur disimpan dalam suhu 4°C. Larutan jamur disaring menggunakan kertas saring dan dilanjutkan penyaringan menggunakan membran *Whatman* no 41 dengan corong *Buchner* dan *rotatory vacuum evaporator* dan diambil supernatannya. Supernatan diliofilisasi menggunakan *freeze drying* sehingga dihasilkan serbuk jamur kering.

Serbuk jamur kering sebanyak 2 g dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 90% dengan menimbang 65,7 g ammonium sulfat yang dilarutkan dalam akuades 100 ml dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer* pada suhu 4°C selama \pm 1 jam. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada kondisi suhu 4°C, kecepatan 9000 rpm selama 20 menit dan kemudian diambil endapannya. Endapan yang ada diambil lalu dilarutkan dalam akuabides dan didialisis menggunakan membran nitroselulosa selama 24 jam.

3.4.1.5 Tahap penentuan kadar polisakarida krestin (PSK)

Penentuan konsentrasi polisakarida krestin dengan *phenol-sulphuric acid* menurut Wahyuningsih *et al.*, (2009) berikut adalah pemaparannya:

Larutan standar glukosa sebanyak 1mg dicampurkan pada 1 mL akuades. Kurva baku glukosa dibuat dengan mencampurkan 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l larutan standar glukosa yang ditambahkan akuades sampai volume total 100 μ l, kemudian dimasukkan ke tabung *microtube*. Blanko berisi 100 μ l akuades disiapkan. Sebanyak 50 μ l sampel (ekstrak *Coriolus versicolor*) ditambah akuades hingga volume mencapai 100 μ l. Pada tiap larutan ditambahkan 50 μ l larutan *phenol* 80% dan menghomogenkannya menggunakan *vortex*. Setelah homogen asam sulfat ditambahkan sebanyak 2 ml dan mendiampkannya selama 10 menit pada suhu ruang. Nilai OD diperoleh menggunakan panjang gelombang 490 nm.

Hasilnya yaitu kurva baku standar glukosa dengan regresi linear $y=0,008x + 0,003$ dimana y = nilai OD, dan x = kadar polisakarida krestin. Larutan sampel yang akan diukur kadar polisakarida krestinnya dibuat dengan mencampurkan 50

μl sampel PSK yang ditambahkan 50 μl akuades. Setelah nilai OD didapatkan, dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear yang menjadi $y=0,008x + 0,003/50 \mu\text{l}$.

3.4.2 Pemberian polisakarida krestin dan pemaparan *M. tuberculosis* pada hewan coba

Pemberian polisakarida krestin sebanyak 0,2 mL dilakukan selama tujuh hari berturut-turut melalui perlakuan *gavage*. Sedangkan pemaparan *M. tuberculosis* 0,1 mL dilakukan sebanyak dua kali dengan jarak dua minggu dari pemaparan pertama melalui intraperitoneal. Mencit yang telah dipersiapkan diaklimatisasi selama seminggu, lalu dikelompokkan menjadi 6 kelompok, tertera pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Pembagian kelompok dalam penelitian

Kelompok Perlakuan	Pemberian Polisakarida Krestin (hari ke 1-7)	Pemaparan <i>M. tuberculosis</i> (hari ke 8 dan 22)	Pemberian Polisakarida Krestin (hari ke 22-30)
K	-	-	-
K+	+	-	+
K-	-	+	-
P1	+	+	-
P2	-	+	+
P3	+	+	+

Keterangan:

+ menunjukkan dilakukannya perlakuan

- menunjukkan tidak ada perlakuan, penggantinya yaitu akuades

Kelompok perlakuan:

K : sebagai kontrol normal, tanpa pemberian polisakarida krestin dan tanpa dipapar *M. tuberculosis*

K+ : sebagai kontrol positif, pemberian polisakarida krestin saja

K- : sebagai kontrol negatif, terpapar *M. tuberculosis* saja

P1 : pemberian polisakarida krestin sebelum terpapar *M. tuberculosis*

P2 : pemberian polisakarida krestin sesudah terpapar *M. tuberculosis*

P3 : pemberian polisakarida krestin sebelum dan sesudah paparan *M. tuberculosis*

3.4.3 Isolasi serum dan pengambilan organ paru

3.4.3.1 Isolasi serum

Isolasi serum dilakukan selang waktu seminggu dari perlakuan terakhir, dengan cara hewan coba dibedah dan diambil darah dari jantung menggunakan jarum injeksi. Darah dibiarkan suhu kamar selama dua jam dalam tabung *microcentrifuge* dengan posisi miring. Selanjutnya, isolasi serum dilakukan dengan cara sentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, memisahkan serum dari pellet (Komorowski, 2001).

3.4.3.2 Pengambilan organ paru

Koleksi organ paru yaitu dengan cara mengambil organ paru, kemudian mencucinya pada air garam fisiologis sebanyak dua kali dan disimpan dalam botol kaca yang berisi *buffered formalin*.

3.4.4 Pembuatan preparat histologis organ paru

3.4.4.1 *Processing* preparat histologis organ paru

Pembuatan preparat histologis organ paru didasarkan pada metode Sagita (2012) yaitu dipaparkan sebagai berikut:

Organ paru yang telah dikoleksi dipotong, lalu memasukkan potongan ke dalam kaset dan diberi label. Melakukan *washing* dengan air mengalir minimal selama 2 jam. Melakukan dehidrasi dengan alkohol 70% sebanyak 3 kali masing-masing membutuhkan waktu 30 menit. Aspirasi dilakukan selama 30 menit. Dilanjutkan dehidrasi dengan alkohol 80% sebanyak 2 kali masing-masing selama waktu 30 menit. Melakukan aspirasi kembali selama 30 menit. Dehidrasi

dilanjutkan kembali dengan alkohol 90% sekali selama 30 menit. Aspirasi dilakukan kembali selama 30 menit. Selanjutnya melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sekali dengan waktu 30 menit. Melakukan aspirasi selama 30 menit.

Tahap selanjutnya yaitu melakukan penjernihan dengan memasukkan ke dalam *xylol* selama 15 menit. Merendam ke dalam *xylol* murni semalam. Infiltrasi pada organ paru secara berturut-turut di masukkan kedalam *xylol*:paraffin = 1:1 selama 30 menit, parafin I, parafin II dan parafin III masing-masing membutuhkan waktu 60 menit. Melakukan penanaman (*embedding*) organ paru ke dalam blok-blok, kemudian menuangkan parafin hingga memenuhi isi blok, diberi label dan didiamkan selama 24 jam hingga cetakan parafin yang terbentuk mengeras. Penempelan (*trimming*) hasil *embedding* dilakukan pada *holder* balok kayu dengan parafin cair. Tahap *processing* diakhiri dengan pemotongan (*sectioning*) dengan ketebalan 4μ dan hasil potongan ditempelkan pada *object glass* dengan albumin.

3.4.4.2 Pewarnaan preparat histologis organ paru

Metode yang digunakan berdasarkan Sagita (2012), yaitu sebagai berikut:

Irisan organ paru yang sudah menempel di atas gelas obyek dideparafinasi dalam *xylol* sebanyak 2 kali masing-masing membutuhkan waktu 10 menit. Melakukan hidrasi dengan alkohol bertingkat mulai dari absolut hingga alkohol 70% masing-masing selama 5 menit. Preparat organ paru diwarnai dengan *hematoxylin* selama 10 menit. Mencucinya dengan air. Setelah itu, melakukan deferensiasi dengan etanol asam (1% HCl dan 70% etanol) dan dicuci

menggunakan air. Selanjutnya pewarnaan dengan *eosin* selama 10 menit dan mencucinya kembali dengan akuades. Dehidrasi dilakukan dengan alkohol bertingkat dari alkohol 70% hingga alkohol absolut masing-masing membutuhkan waktu 5 menit setelah itu *xylol* sebanyak 2 kali. Sediaan yang telah terwarnai ditutup dengan *cover glass* menggunakan perekat *entellan*.

3.4.4.3 Pengamatan histologis organ paru

Pengamatan histologis organ paru pada masing-masing kelompok dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Pemeriksaan kerusakan paru berupa peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma berdasarkan skor dari Dormans *et al.* (2004) dalam Koendhori (2008). Pada kerusakan peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma skor 1 menunjukkan tidak terjadi adanya perdangan dan tidak ada granuloma. Skor 2 pada peribronkiolitis dan perivaskulitis menunjukkan terdapat 1-2 lapis sel radang, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya 2-3 lapis sel radang pada tepi alveoli, dan untuk granuloma yaitu berdiameter 1 cm dengan perbesaran 1000x. Skor 3 menyatakan bahwa terjadi perdangan 3-5 lapis sel radang pada bronkiolitis dan pembuluh darah, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya 3-5 lapis sel radang pada dinding alveoli dan keberadaan granuloma dengan diameter 1-2 cm pada perbesaran 1000x. Skor 4 menunjukkan bahwa terjadi perdangan >5 lapis sel radang pada bronkiolus dan pembuluh darah, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya >2-3 lapis sel radang pada dinding alveoli dan keberadaan granuloma dengan diameter >2-4 cm pada perbesaran 1000x. Skor 5 diberikan jika sama dengan skor 4 namun juga terjadi kerusakan pada

dinding bronkiolus, pembuluh darah dan alveoli, sedangkan untuk granuloma yaitu berdiameter > 4 cm pada perbesaran 1000x.

3.4.5 Pengukuran konsentrasi IL-10 dengan ELISA

Pengukuran konsentrasi IL-10 dengan cara menilai absorbansi cahayanya melalui nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan ELISA, berikut adalah pemaparannya:

Prinsip kerjanya yaitu antibodi yang diperoleh dari serum sebanyak 100 μ l (konsentrasi 1:10 dalam larutan *buffer assay*) dimasukkan pada sumuran *plate* ELISA yang telah *dicoating* dengan anti IL-10, dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. *Plate* dikosongkan dan dicuci dengan *washing buffer*. Selanjutnya, menambahkan 50 μ l *Biotin Conjugate* pada tiap sumuran. *Plate* ditutup dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar (18-25°C) selama 2 jam. Jika memungkinkan *dishaker* pada 200 rpm. Mikroplate dicuci sebanyak 3 kali dengan *washing buffer*. Kemudian ditambahkan larutan *Streptavidin-HRP* pada tiap sumuran, terkecuali untuk blanko. *Plate* ditutup dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar (18-25°C) selama 1 jam. Mikroplate dicuci sebanyak 3 kali dengan *washing buffer*. Mikroplate ditambahkan 100 μ l *TMB substrat solution*. *Plate* diinkubasikan pada temperatur kamar (18-25°C) selama 10 menit. Respon positif ditampakkan dengan warna biru gelap, kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l *stop solution* ke dalam tiap sumuran. Pembacaan nilai OD (*Optical Density*) menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi IL-10 dapat ditentukan berdasarkan kurva standar.

Interleukin-10 diukur menggunakan 30 *microwell*, 9 *microwell* untuk larutan standar dan 1 *microwell* digunakan untuk blanko, keterangan lebih jelas dapat dilihat pada Tabel 3.3 berikut.

Tabel 3.2 Posisi *microwell* yang akan digunakan untuk mengukur IL-10

Blanko	Standar 1	Standar 2	Standar 3	Standar 4
Standar 5	Standar 6	Standar 7	Standar 8	Standar 9
P I	P I	P I	P I	P I
P II	P II	P II	P II	P II
P III	P III	P III	P III	P III
P IV	P IV	P IV	P IV	P IV
P V	P V	P V	P V	P V
P VI	P VI	P VI	P VI	P VI

3.5 Cara Pengambilan Data

Data IL-10 yang diperoleh dari ELISA dilakukan dengan pembuatan kurva standar terlebih dahulu. Data nilai *Optical Density* (OD) yang diperoleh, kemudian dikonversi menjadi nilai konsentrasi dengan satuan pg/mL dengan menggunakan persamaan regresi eksponensial $\ln y = a + \ln b$ dimana y adalah nilai OD dan x adalah konsentrasi IL-10 yang akan diperoleh pada tiap perlakuan. Gambaran kerusakan paru berupa peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma didapat dengan mengamati preparat histologis organ paru sepanjang daerah terluas dari tiap lobus di bawah mikroskop *inverted*. Kerusakan paru

mencit ini dinilai dengan menggunakan skor dari Dormans *et al.* (2004) dalam Koendhori (2008) yaitu kerusakan peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma skor 1 menunjukkan tidak terjadi adanya peradangan dan tidak ada granuloma. Skor 2 pada peribronkiolitis dan perivaskulitis menunjukkan terdapat 1-2 lapis sel radang, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya 2-3 lapis sel radang pada tepi alveoli, dan untuk granuloma yaitu berdiameter 1 cm dengan perbesaran 1000x. Skor 3 menyatakan bahwa terjadi peradangan 3-5 lapis sel radang pada bronkiolitis dan pembuluh darah, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya 3-5 lapis sel radang pada dinding alveoli dan keberadaan granuloma dengan diameter 1-2 cm pada perbesaran 1000x. Skor 4 menunjukkan bahwa terjadi peradangan >5 lapis sel radang pada bronkiolus dan pembuluh darah, sedangkan pada alveolitis menunjukkan adanya >2-3 lapis sel radang pada dinding alveoli dan keberadaan granuloma dengan diameter >2-4 cm pada perbesaran 1000x. Skor 5 diberikan jika sama dengan skor 4 namun juga terjadi kerusakan pada dinding bronkiolus, pembuluh darah dan alveoli, sedangkan untuk granuloma yaitu berdiameter > 4 cm pada perbesaran 1000x.

3.6 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas yaitu waktu pemberian polisakarida krestin.
2. Variabel terikat yaitu konsentrasi IL-10 dan gambaran histologis organ paru.

3. Variabel kendali yaitu volume *Mycobacterium tuberculosis* yang dipaparkan, dosis polisakarida krestin, umur, dan berat badan mencit.

3.7 Analisis Data

Setelah memperoleh data konsentrasi IL-10 dari penelitian dilakukan uji normalitas distribusi data menggunakan *Kolmogorof-Smirnov Test* dan uji homogenitas variansi menggunakan *Levene Test*. Jika data menunjukkan normal dan homogen dilanjutkan menggunakan Analisis variansi (Anava) satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok perlakuan. Dilanjutkan dengan uji Duncan apabila terdapat perbedaan nyata untuk mengetahui adanya signifikansi antar kelompok perlakuan dengan menggunakan taraf $\alpha=0,05$. Jika data menunjukkan normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji Brown-Forsythe. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Games-Howell atau uji t untuk mengetahui adanya signifikansi antar kelompok perlakuan dengan menggunakan taraf $\alpha=0,05$.

Analisis statistik kerusakan paru, setelah memperoleh data skor pemeriksaan histologis organ paru, kemudian dianalisis secara non parametrik yaitu menggunakan *Kruskall Wallis Test*. Jika terdapat beda signifikan antar perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji *Mean Whitney*.