

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis dan Lokasi Penelitian

##### 1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan *true eksperimental post-test only control group*, dengan menggunakan tikus jantan *Rattus norvegicus*, sebagai hewan coba.

##### 2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tiga tempat, yaitu Balai Besar Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor, pusat hewan coba Pusat Studi Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

#### B. Subjek Penelitian dan Besar Sampel

Subjek penelitian adalah tikus jantan *Rattus norvegicus*, yang berumur antara 3 - 4 bulan dengan berat badan antara 180 sampai 200 g. Pemilihan hewan coba berdasarkan pertimbangan bahwa tikus jenis ini sering dipakai dalam penelitian biomedik, karena secara genetik mempunyai kemiripan dengan manusia dan dapat beradaptasi dengan baik di lingkungan laboratorium (Carson et al., 2005).

Pada penelitian eksperimental ini, untuk menentukan jumlah sampel (n), dengan menggunakan Rumus Federer, yaitu :  $(n-1)(t-1) \geq 15$ , n adalah jumlah pengulangan dan t adalah jumlah kelompok. Pada penelitian ini menggunakan lima kelompok perlakuan, maka diperlukan  $(n-1) \geq 15/(5-1)$ , sehingga  $n \geq 7$ , dengan arti minimal 7 ekor hewan uji dalam tiap kelompok dan ditambah 10% sebagai cadangan, sehingga menjadi delapan ekor tikus pada setiap kelompok. Hewan coba pada masing-masing perlakuan dalam penelitian homogen dilakukan secara random untuk dapat mempertahankan validitas internal, sehingga setiap tikus mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel kontrol maupun perlakuan.

**a. Kriteria Inklusi :**

- 1) Tikus dalam kondisi sehat, dengan tanda : kondisi kedua mata terbuka, bersinar, tidak kusam pada bulu, Gerakan aktif dan nafsu makan baik.
- 2) Umur tikus antara 3 sampai 4 bulan.
- 3) Berat badan tikus antara 180 sampai 200 g.

**b. Kriteria Eksklusi :**

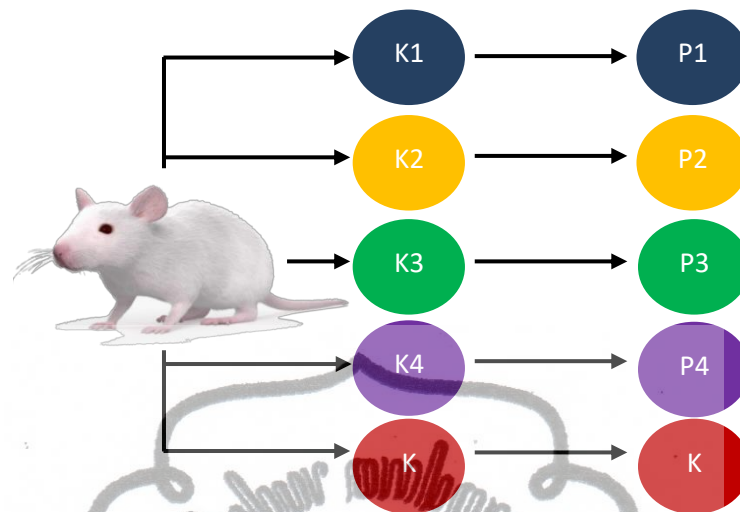
Tikus dengan tanda-tanda sakit seperti : (Koolhaas, JM 2010)

- 1) Bulu kusam, kasar, berminyak dan rontok
- 2) Kulit tampak longgar serta berat badan menurun  $> 10\%$
- 3) Kelopak mata sedikit menutup, mata cekung, sekret berwarna merah di sekitar mata
- 4) Feses lembek, cair, dan berbau
- 5) Lebih agresif kemudian menjadi pasif, tidak mau makan, tidak mau minum, sering tidur di kandang
- 6) Sering mencicit saat dipegang
- 7) Bersin – bersin, tampak pucat, napas berbunyi

**C. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap, *post-test only control group*, yang terbagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

1. Kelompok K : tikus yang di induksi spora *B. anthracis*.
2. Kelompok P1 : tikus diberikan EEP Gunung Lawu 200 mg/kgBB 7 hari sebelum induksi spora *B. anthracis* dan dilanjutkan EEP hingga 14 hari.
3. Kelompok P2 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan EEP Gunung lawu 200 mg/kgBB selama 7 hari.
4. Kelompok P3 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan EEP Gunung lawu 200 mg/kgBB selama 14 hari.
5. Kelompok P4 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan Amoksisilin 9 mg/ 8 jam dan EEP Gunung lawu 200 mg/kg BB selama 14 hari.



**Gambar 4.1** Rancangan Penelitian

Keterangan :

K = Kelompok Penelitian,

P2 = Kelompok Perlakuan 2,

P4 = Kelompok Perlakuan 4,

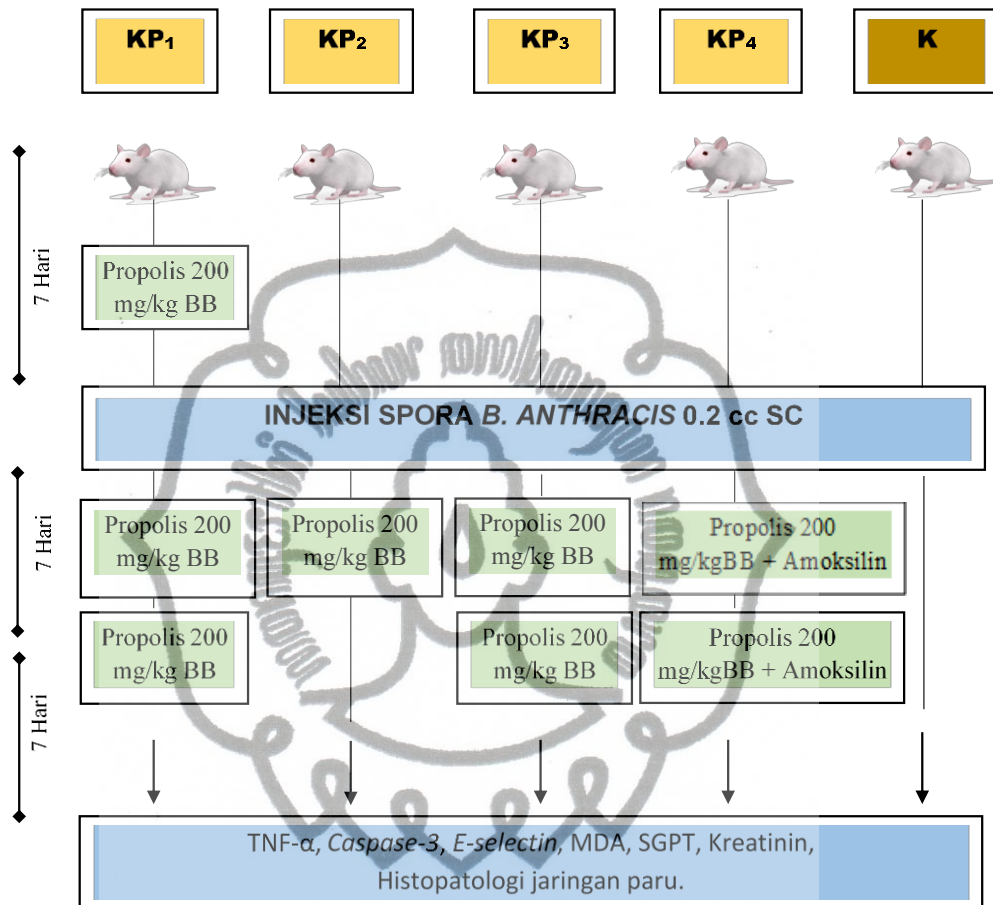
P1 = Kelompok Perlakuan 1,

P3 = Kelompok Perlakuan 3,

K = Kelompok Kontrol

Sebanyak 40 ekor tikus *Rattus Norvegicus*, yang berumur 3-4 bulan dengan berat badan 180-200 g, terbagi menjadi lima kelompok, masing-masing berjumlah delapan ekor. Tikus putih dikorbankan 14 hari setelah dilakukan injeksi spora *B. anthracis* secara SC dengan dosis 0,2 cc, setara dengan  $2 \times 10^{11}$  CFU spora, dengan cara diberikan injeksi ketamin. Jaringan paru diambil dan dibuat preparat histopatologi menurut metode standar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Setiap sampel dibuat untuk pemeriksaan imunohistokimia dan pemeriksaan histopatologi yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Koleksi serum untuk pemeriksaan kadar serum TNF- $\alpha$ , *caspase-3*, *e-selectin* dan MDA dilakukan pada akhir penelitian, selanjutnya pemeriksaan kadar MDA dengan metode TBARS di Laboratorium PAU, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Perlakuan terhadap hewan coba pada penelitian ini sudah memenuhi prinsip 3R sesuai ketentuan *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) dan mendapatkan persetujuan dari komite etik penelitian Universitas Sebelas Maret Surakarta.

#### D. Alur Penelitian



**Gambar 4.2** Kerangka Operasional EEP Gunung Lawu pada Tikus Model Antraks

#### E. Variabel Penelitian.

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terbagi menjadi dua, yaitu:

##### 1. Variabel bebas (*independent*)

Variabel yang digunakan adalah EEP Gunung Lawu dengan dosis 200 mg/kgBB (Prasetyo D *et al.*, 2013; Curti *et al.*, 2019).

##### 2. Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat pada penelitian ini terbagi menjadi tiga kategori, yaitu marker inflamasi, antioksidan, apoptosis, disfungsi endotel dan MODs.

Kategori tersebut terdiri dari :

- a. Variabel yang digunakan sebagai penanda inflamasi, yaitu TNF- $\alpha$  serum dan jaringan.
- b. Variabel yang digunakan sebagai penanda antioksidan, yaitu MDA serum.
- c. Variabel yang digunakan sebagai penanda apoptosis, yaitu *Caspase-3* serum.
- d. Variabel yang digunakan sebagai penanda disfungsi endotel, yaitu *E-selectin* serum dan jaringan.
- e. Variabel yang digunakan sebagai penanda disfungsi organ, yaitu kadar SGPT, kreatinin serum dan tingkat inflamasi pada jaringan paru.

### 3. Definisi Definisi Operasional Variabel Luar

Variabel luar meliputi : galur, jenis kelamin, umur, berat badan, jenis makanan dan minuman, serta suhu kandang tikus putih. Variabel ini dikendalikan dengan cara homogenisasi.

- a. Galur : menggunakan tikus galur Wistar.
- b. Jenis kelamin : tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan.
- c. Umur : tikus yang digunakan berumur antara 3 – 4 bulan.
- d. Berat badan: menggunakan tikus dengan berat 180 – 200 g.
- e. Jenis makanan dan minuman : tikus mendapatkan diet berupa makanan standart yaitu BR 1 dan minuman berupa air ad libitum.
- f. Suhu kandang : tikus ditempatkan pada kandang yang ditempatkan dalam satu ruangan yang sama dengan suhu kamar yang sama antara 25 - 28 °C.
- g. Kelembaban : lokasi kandang ada di dalam ruangan yang dijaga dalam kelembaban antara 45% - 64%.
- h. Pencahayaan : dengan pengaturan 12 jam terang dan 12 jam gelap.

#### 4. Definisi Operasional

**Tabel 4.1** Definisi Operasional Penelitian

VARIABEL	DEFINISI	METODE	SATUAN	SKALA
Ekstrak Etanol Propolis	Propolis mentah dari Gunung Lawu, yang dibuat dalam bentuk ekstrak, dengan pelarut etanol 70%	Teknik Maserasi	mg/kg BB	Ordinal
TNF $\alpha$	Sitokin pro inflamasi yang diekspresikan saat terjadi infeksi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA serum, diukur dari darah vena yang disentrifugasi 3000 rpm, selama 10 menit, dan diambil plasma nya.</li> <li>• Imunohistokimia jaringan paru</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pg/ml ( pada ELISA serum )</li> <li>• Skor ( pada pemeriksaan IHK jaringan paru )</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rasio</li> <li>• Ordinal</li> </ul>
Caspase-3	Protein <i>eksekutor</i> yang diaktifkan oleh <i>caspase-8</i> dan <i>9</i> , yang menjadi penanda proses apoptosis.	ELISA serum, diukur dari darah vena yang disentrifugasi 3000 rpm, selama 10 menit, dan diambil plasma nya.	ng/ml	Rasio
<i>E-selectin</i>	Penanda yang digunakan dalam menilai terjadi nya disfungsi endotel akibat infeksi antraks.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA serum, diukur dari darah vena yang disentrifugasi 3000 rpm, selama 10 menit, dan diambil plasma nya.</li> <li>• Imunohistokimia jaringan paru</li> </ul>	ELISA: pg/ml IHK: skor	Rasio Ordinal



VARIABEL	DEFINISI	METODE	SATUAN	SKALA
MDA	Senyawa <i>dialdehyde</i> yang dihasilkan oleh oksidasi lipid serum, sebagai penanda stress oksidatif.	Metode TBARS serum, diukur dari darah vena yang disentrifugasi 3000 rpm, selama 10 menit, diambil serum, ditambah 1 ml asam <i>thiobarbituric</i> , dipanaskan 45 menit dalam air 100 C, yang dibaca dengan panjang gelombang 532 nm.	pg/ml	Rasio
SGPT	Enzim transaminase yang digunakan dalam menilai fungsi hati.	Analisis kimia dengan menggunakan serum darah.	u/l	Rasio
Kreatinin	Senyawa kimia yang digunakan dalam menilai fungsi ginjal.	Analisis kimia dengan menggunakan serum darah.	u/l	Rasio
Tingkat inflamasi paru	Reaksi peradangan yang terjadi pada jaringan paru akibat infeksi antraks.	Pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan HE pada jaringan paru	Skor, yaitu: skor 0 : negatif skor 1: radang ringan skor 2 : radang sedang skor 3 : radang berat + nekrotik & radang granulosomatosus supuratif.	Ordinal

## B. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Persiapan

- a. Diawali dengan mencari dan mengumpulkan bahan referensi.
- b. Berdiskusi dengan promotor dan co promotor.
- c. Menyusun agenda kegiatan dan proposal penelitian.

### 2. Pelaksanaan

Penelitian ini akan dilakukan dalam dua tahap, yaitu :

Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan dan tahap 2 : Penelitian utama

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan untuk menentukan dosis spora *B. anthracis* yang akan digunakan pada induksi tikus. Hewan coba sebanyak 9 ekor tikus jantan, yang berumur antara 3 - 4 bulan dengan berat badan antara 180 – 200 g.

Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari di dalam kandang, dengan diet berupa makanan standart dan minuman berupa air ad libitum. Selanjutnya tikus dibagi 3 kelompok, yaitu :

- a) Kelompok 1 : terdiri dari 3 ekor tikus yang diberikan induksi spora *B. anthracis* cair sebanyak 0.1 cc.
- b) Kelompok 2 : terdiri dari 3 ekor tikus yang diberikan induksi spora *B. anthracis* cair sebanyak 0.2 cc.
- c) Kelompok 3 : terdiri dari 3 ekor tikus yang diberikan induksi spora *B. anthracis* cair sebanyak 0.4 cc.

Semua kelompok dievaluasi setiap hari dan dievaluasi hingga 14 hari. Kelompok dengan tikus yang masih hidup, dilakukan terminasi dengan injeksi ketamin dan dilakukan pembedahan untuk mengambil organ paru, untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi.



## 2. Penelitian Utama

Pada penelitian ini menggunakan tikus sebanyak 40 ekor, yang telah diadaptasikan selama 7 hari, sebelum perlakuan. Kemudian tikus dibagi 5 kelompok, dengan 8 ekor pada setiap kelompok, yaitu :

- K : tikus yang di induksi spora *B. anthracis*.
- P1 : tikus yang diberikan EEP Gunung Lawu 200 mg/kgBB 7 hari sebelum induksi spora *B. anthracis* dan dilanjutkan EEP Gunung Lawu hingga 14 hari.
- P2 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan EEP Gunung Lawu 200 mg/kgBB selama 7 hari.
- P3 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan EEP Gunung Lawu 200 mg/kgBB selama 14 hari.
- P4 : tikus yang di induksi spora *B. anthracis* dan diberikan amoksisilin 9 mg/8 jam + EEP Gunung Lawu 200 mg/kgBB selama 14 hari.

## 3. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Kandang tikus
- b. Makanan dan minuman tikus
- c. Tabung *inoculum*
- d. S spuit inokulasi 1 cc ujung tumpul
- e. Propolis mentah 3 Kg
- f. Amoksisilin tablet 500 mg
- g. Bahan untuk pemeriksaan MDA serum
- h. Isolat *B. anthracis* dalam bentuk kering beku
- i. *Phosphat buffer saline* (PBS) steril pH 7.4.
- j. *NaCl* 100 cc fisiologis steril.
- k. Media agar darah 5-10% (500 ml *Blood agar base*, 25-50 ml *defebrinated sheep blood*).
- l. Media spora (50 g *tryptic digest of casein*, 10 g *yeast extract*, 0.1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.03 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 g agar, bahan dilarutkan menggunakan *aquadest* sampai 1000 ml, pH dijadikan 7.4, kemudian dimasukkan *autoclave*. Media kemudian dituang 20 ml-50 ml untuk tiap *cell culture flask* atau 120 ml untuk botol *roux*, diamkan sampai membeku, dan cek sterilitasnya)

m. Inkubator

n. *Biosafety Cabinet Class II*

#### 4. Preparasi Spora *B. anthracis*

- 1) Cara persiapan spora *B. anthracis*:
  - a. Spora *B. anthracis* digoreskan pada piring agar darah, kemudian diinkubasi dalam waktu satu malam pada suhu 37 ° C.
  - b. Selanjutnya diinokulasi dengan satu koloni dari kultur plat semalaman dan diinkubasi pada 37 ° C pada pengocok. Sampel dari *pre cultur* ini (1,25 ml) adalah ditambahkan ke 50 ml medium 2 SG (sebelum dihangatkan) dalam labu plastik filter-top 500 ml dan dikocok selama 24 jam.
  - c. Pada akhir 24 jam, 200 ml suling steril ganda H<sub>2</sub>O ditambahkan ke dalam kultur.
  - d. Inkubasi dilanjutkan selama 40 jam lagi, kemudian sporulasi kultur dievaluasi dan tidak ada sel vegetatif yang diamati dengan kontras fase mikroskopi.
  - e. Kultur kemudian dipindahkan ke tabung *Oakridge* steril dan diputar dalam sentrifus *Sorvall Superspeed* menggunakan rotor SS-34 pada 4.000 rpm dan 4 hingga 10 ° C selama 20 menit, dicuci satu kali dengan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril, dan disuspensi kembali dalam 50 ml PBS steril.
  - f. Kultur dipanaskan hingga 68 ° C selama 40 menit sebelum persiapan lebih lanjut untuk menghilangkan vegetatif yang berpotensi mencemari sel.
  - g. *Aliquot* dari larutan akhir dipindahkan ke dalam botol dan dibekukan

80° C. Titer dari stok baru ditentukan dengan melapisi pengenceran serial ke pelat agar darah menggunakan pelat spiral (Spiral Biotech, Bethesda, Md.).

2) Cara pembuatan spora antraks (Doung *et al.*, 2006):

- a. Persiapan bakteri yang akan diinjeksikan dari stok beku ke kedelai *trypticase agar* dengan 5% darah domba *defibrinated* dan tumbuh pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 18 jam sebelum percobaan.
- b. Sebelum induksi, koloni bakteri di suspensikan dalam larutan PBS steril (Cellgro, Herndon, VA, AS).
- c. Konsentrasi bakteri diperkirakan dengan *Optical Density* dengan satuan CFU, bakteri suspensi kemudian diencerkan dalam PBS steril untuk mendapatkan inokulum yang diinginkan.
- d. Setelah anestesi dengan 2,2,2-tribromoethanol 50 ml, suspensi bakteri 10<sup>2</sup> hingga 10<sup>6</sup> CFU diinjeksikan secara SC.

Proses pembuatan spora antraks diawali pada isolat *B. anthracis* dalam bentuk kering beku dilarutkan menggunakan *phosphate buffer saline* atau *NaCl* fisiologis steril, kemudian diinokulasikan pada media agar darah, diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur selanjutnya di panen menggunakan *NaCl* fisiologis, disuspensikan, dan di uji kemurniannya. Suspensi *B. anthracis* sebanyak 0.2 ml kemudian diinokulasikan pada media spora dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 72 jam (umumnya 90% sudah terbentuk spora), selanjutnya diinkubasikan kembali di suhu ruang selama 3 hari. Untuk memanen spora, ditambahkan 10 ml *NaCl* fisiologis dan ditampung di dalam *tube*. Suspensi spora selanjutnya dicek kemurniaanya dan dipanaskan 65 °C selama 1 jam untuk membunuh sel vegetatif. Suspensi spora selanjutnya dihitung konsentrasinya sampai mencapai 10<sup>8</sup> CFU/ml.

## 5. Pembuatan Hewan Model Antraks

- a. Tikus putih yang telah dikelompokkan diberikan injeksi anestesi, kemudian ditunggu 2 menit, bulu pada punggung tikus dicukur bentuk persegi empat.

- b. Selanjutnya dilakukan disinfektan dengan alkohol 70% dan ditentukan titik tempat penyuntikan.
- c. Spora *B. anthracis* (BCC 602) kering yang ada dalam media kemudian diencerkan dengan aquabides steril sebanyak 10 ml dan diambil dengan spuit 1 cc, sebanyak 1 cc.
- d. Spora cair diinjeksikan secara SC di titik penyuntikan sebanyak 0.2 cc, yang setara dengan  $2 \times 10^{11}$  CFU spora.
- e. Tikus kemudian dikembalikan ke kandangnya, dan dievaluasi setiap hari hingga 14 hari.

#### 6. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis

Pembuatan EEP Gunung Lawu dimulai dengan 0.1 g propolis kering yang ditambahkan 30 ml air, selanjutnya proses maserasi selama 12 jam. Sampel dimasukkan ke dalam shaker dan disentrifugasi dengan kecepatan 50 rpm selama 30 menit pada suhu 30°C. Hasil yang didapat kemudian difiltrasi 5 jam kemudian. Prosedur ini diulang sebanyak 5 kali. Modifikasi yang dilakukan adalah dengan memperpanjang lama perendaman menjadi 24 jam dan tidak menggunakan shaker pada proses pengadukan.

#### 7. Prosedur Pemeriksaan Histopatologi dan Immunohistokimia

##### a. Alat dan Bahan :

Alat : *Tissue cassette, beaker glas, mikrotom, Obyek glass, Deck glass, Hummidity chamber vertical.*

Bahan : *formalin buffer, alcohol absolut 50%, 70%, 80% dan 95%.*

##### b. Proses Jaringan :

- 1) Jaringan pada mukosa paru yang telah mengalami inflamasi pada mencit model antraks difiksasi dengan menggunakan larutan formalin buffer selama 8 – 48 jam.
- 2) Potongan jaringan dimasukkan ke *cassete tissue* kemudian direndam dalam alkohol 50% dalam semalam.
- 3) Selanjutnya potongan jaringan diangkat dan dipindahkan kedalam rendaman alkohol 70% selama 1 jam.

- 4) Kemudian diangkat dan direndam lagi dalam alkohol 80% selama 1 jam.
- 5) Selanjutnya dipindahkan dan direndam dalam alkohol 95% selama 1 jam.
- 6) Kemudian diangkat dan direndam dalam *xylol* I selama 1 jam, dilanjutkan ke dalam *xylol* II selama 1 jam.
- 7) Ditiriskan kemudian dilakukan proses embedding, dengan merendam dalam *paraffin* cair pada suhu 58°C, dalam inkubator selama 1 malam, kemudian dibuat blok *paraffin*.

**c. Proses Blok *Paraffin* :**

- 1) Jaringan diletakkan pada objek glass.
- 2) Kemudian dimasukkan dalam inkubator suhu 58°C selama 20 menit.
- 3) Selanjutnya direndam dalam *xylol* I selama 5 menit, dilanjutkan dalam *xylol* II selama 5 menit, dan direndam kembali dalam *xylol* III selama 5 menit, kemudian direndam dalam *xylol* IV selama 5 menit.
- 4) Setelah itu direndam dalam alkohol absolut selama 5 menit, kemudian alkohol 95% selama 5 menit, dan dalam alkohol 70% selama 5 menit.
- 5) Setelah selesai, dicuci dengan aquadest selama 5 menit, dan preparat masuk dalam tahap pengecatan.

**d. Prosedur Pengecatan *Hematoxylin and eosin***

- 1) Setelah proses deparafinisasi dengan *xylene*, slide irisan jaringan dibawa ke medium aquosa, kemudian dicuci dengan air mengalir.
- 2) Kemudian dimasukkan ke dalam cat *hematoxylin* selama 7 – 10 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- 3) Selanjutnya dimasukkan dalam cat *eosin* selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- 4) Kemudian dibilas dalam alkohol 90%, dan dikeringkan di udara, yang terakhir meneteskan *xylene* dan ditutup dengan kaca penutup.



## 8. Cara Penentuan Kesesuaian Penilaian Pembacaan Preparat

Hasil pemeriksaan jaringan dilakukan oleh dua ahli patologi anatomi. Pada penilaian skoring pada hasil preparat jaringan, dilakukan penghitungan koefisien *Kappa*, untuk menentukan kesesuaian penilaian pembaca 1 dan pembaca 2. Menurut Tang, Uji *Kappa* adalah uji reliabilitas untuk menentukan konsistensi pengukuran yang dilakukan oleh dua orang penilai (Tang *et al.*, 2015), yaitu :

**Tabel 4.2** Nilai Koefisien *Kappa*

Nilai Kappa	Kekuatan Kesepakatan
$\leq 0,20$	Buruk
0,20 - 0,40	Kurang
0,41 - 0,60	Sedang
0,61 - 0,80	Baik
0,81 - 1,00	Sangat Baik

## 9. Pelaksanaan Penelitian

### a. Teknik Pemeriksaan TBARS

Setelah serum tikus dikumpulkan dan disentrifuge 1.500 rpm selama 15 menit untuk kemudian disimpan pada suhu  $-60^{\circ}\text{C}$ . Pengukuran kadar MDA serum dikerjakan dengan metode spektrofotometri. Prinsip kerjanya adalah dengan menggunakan reaksi NWK-MDA01 *assay* berdasarkan reaksi MDA dengan TBA (*thiobarbituric acid*) absorpsi dibaca dengan panjang gelombang 532 nm. *Malondialdehyd* diukur menggunakan teknik TBARS dengan tahapan sebagai berikut :

- 1) Dimasukkan 750  $\mu\text{l}$  asam fosfat kedalam *tube polyproene* 13 ml.
- 2) Ditambahkan 50  $\mu\text{l}$  standart/ sampel/ blangko.
- 3) Dicampur dengan 250  $\mu\text{l}$  40 mM larutan TBA.
- 4) Ditambahkan 450  $\mu\text{l}$  aquabides pada masing-masing *tube*.
- 5) Dilakukan pencampuran dan dimasukkan ke dalam penangas air suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam.



- 6) Standart (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*)/ sampel/ blangko *tube* dikeluarkan dari penangas air dan dimasukkan ke dalam es *bath*.
- 7) Menyiapkan kolum *Sep-Pak C18* yang dicuci dan dimasukkan metanol 5 ml, kemudian dibuang.
- 8) Dimasukkan aquabides 5 ml, kemudian dibuang.
- 9) Dimasukkan sampel, kemudian dibuang, dimasukkan aquabides 4 ml, kemudian dibuang.
- 10) Dimasukkan metanol 4 ml, kemudian ditampung.
- 11) Dilakukan pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

#### **b. Teknik Pembuatan Preparat Imunohistokimia**

Paru dikeluarkan, dipangkas dan ditimbang. Bobot relatif organ dihitung. Bobot relatif organ (%) dihitung sebagai g/100 kg berat badan. Spesimen dari ginjal difiksasi segera dalam 10% *buffered* formalin untuk uji imunohistokimia  $\text{TNF } \alpha$  dan *E-selectin*. Teknik pewarnaan IHK dengan metode *avidin biotin complex* (ABC), menggunakan *imuno-peroksidase indirek*, yaitu :

- 1) Pertama kali dilakukan deparafinisasi sayatan pada jaringan paru untuk menghilangkan parafin dari jaringan, dengan cara bertahap dalam waktu tertentu, preparat dimasukkan kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.
- 2) Jaringan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4.
- 3) Selanjutnya inkubasi jaringan paru dengan tripsin 0,125 % pada temperature 37°C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
- 4) Inkubasi kembali dengan H2O2 0,5% dalam metanol kurang lebih 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen pada temperatur ruangan.
- 5) Kemudian dicuci dengan air mengalir kurang lebih 1 menit, yang diikuti pencucian dengan *aquadestilata*.
- 6) Jaringan ditandai dan dicuci selama 5 menit, dengan PBS pH 7,4

- 7) Inkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam BSA 1% 20 menit.
- 8) Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit.
- 9) Jaringan di inkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul (TNF- $\alpha$  dan *e-selectin*) untuk *mouse* (Santa Cruz, US). Monoklonal antibodi dilarutkan dengan TRIS-PBS 1:200. Untuk jaringan seluas 1 cm<sup>2</sup> diperlukan 100 L monoklonal antibodi. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dalam ruang lembab.
- 10) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- 11) Dilakukan inkubasi jaringan dengan antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* yang telah dibiotinilisasi, dengan lama inkubasi 30 menit.
- 12) Jaringan dicuci dengan PBS, pH 7,4 dua kali selama 3 menit.
- 13) Dilakukan inkubasi jaringan dengan *streptavidin-biotin peroksidase* (Dako Kit) selama 30 menit.
- 14) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali, selama 3 menit.
- 15) Dilakukan inkubasi jaringan selama kurang lebih 15 menit, dengan substrat (Dako Kit) hingga muncul warna coklat pada jaringan
- 16) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali selama 3 menit.
- 17) Jaringan diberi warna dengan *hematoxylin*.
- 18) Kemudian jaringan dicuci dengan air mengalir.
- 19) Jaringan ditutup dengan *deck glass*.
- 20) Molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan berwarna coklat dibawah mikroskop cahaya. Sel yang positif dihitung dalam persentase. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.
- 21) Dilakukan pembacaan preparat IHC oleh ahlinya serta dihitung nilai koefisien *kappa* dan dinyatakan baik bila nilai *kappa* lebih dari 0,8.

### i. Analisis Data

Data yang diperoleh meliputi kadar TNF- $\alpha$ , *caspase-3*, *e-selectin*, MDA, SGPT, kreatinin dan jaringan paru, dengan menggunakan Program *SPSS for Windows Release 22*. Data kategorikal akan di uji dengan *non parametrik* dan hasil uji dianggap ada perbedaan signifikan bila hasil  $p < 0,05$ . analisis statistik pada penelitian ini adalah :

1. Uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui uji beda akibat paparan spora antraks pada lima kelompok.
2. Uji *Man-Whitney* untuk mengetahui perbedaan *Mean rank* antar kelompok.

Data numerik dianalisis menggunakan uji ANOVA dengan nilai signifikan bila  $p < 0,05$ . Dengan rancangan analisis statistik sebagai berikut :

1. *Shapiro willk test*, digunakan dalam menguji normalitas distribusi data.
2. *Levene's test*, digunakan dalam menguji homogenitas data.
3. *ANOVA test*, digunakan dalam menguji beda pada kelima kelompok.
4. *Post-hoc Tuckey test*, digunakan dalam menguji beda *mean* antar kelompok.