

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true eksperimental post-test only control group design* dengan tikus putih jantan *Rattus norvegicus* sebagai hewan coba.

#### B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di tiga lokasi, yaitu Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor, Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada (UGM), Yogyakarta dan laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

#### C. Subjek Penelitian dan Besar Sampel

Subjek penelitian ini adalah tikus putih jantan jenis *Rattus norvegicus*, yang berumur 3 - 4 bulan dengan berat badan 180–200 g, dengan makanan berupa pakan tikus standar BR I. Pemilihan hewan coba berdasarkan pertimbangan bahwa tikus putih jantan *Rattus norvegicus* secara genetik mempunyai kemiripan dengan manusia dan mampu beradaptasi dalam lingkungan laboratorium (Ellenbroek dan Youn, 2016).

Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah Rumus Federer, yaitu :  $(n-1)(t-1) \geq 15$ , dimana n = jumlah pengulangan, t = jumlah pengelompokkan. Penelitian ini dengan lima kelompok perlakuan, maka diperlukan minimal hewan coba sebanyak  $(n-1) \geq 15/(5-1)$ , sehingga  $n \geq 7$ , sehingga dibutuhkan minimal 7 tikus dalam setiap kelompok. Berdasar rumus tersebut didapatkan jumlah sampel minimal adalah tujuh di tambah 10% sebagai cadangan sehingga didapatkan delapan ekor tikus putih jantan *Rattus norvegicus*, sehingga didapatkan total sampel adalah 40 ekor. Setiap sampel mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel kontrol maupun perlakuan, dengan kriteria :

*commit to user*

**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 drastis setelah adaptasi.
- 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) Bersin – bersin, tampak pucat, napas berbunyi.

**D. Rancangan Penelitian**

Kelompok penelitian terbagi menjadi :

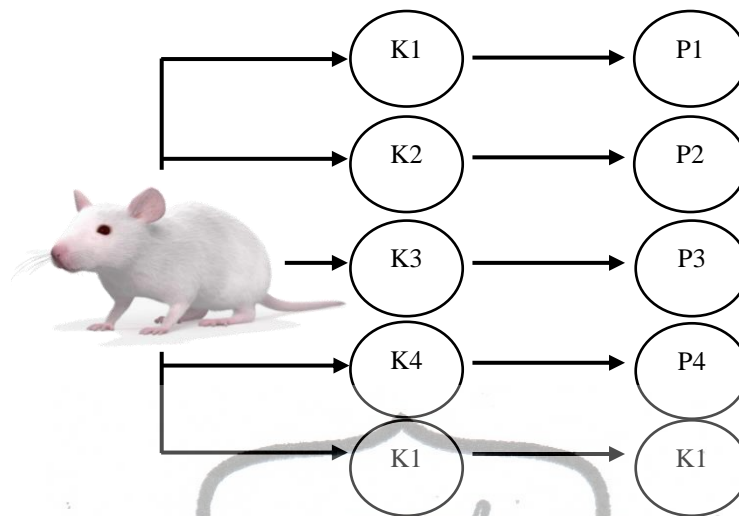
K = Model *cutaneous anthrax*

P1 = Model *cutaneous anthrax* + EEP 200 mg/ KgBB 7 hari sebelum induksi

P2 = Model *cutaneous anthrax* + EEP 200 mg/ Kg BB selama 14 hari

P3 = Model *cutaneous anthrax* + EEP 200 mg/ Kg BB selama 7 hari

P4 = Model *cutaneous anthrax* + EEP 200 mg/KgBB + Amoksisilin 9 mg/ 8 jam



**Gambar 4.1** Rancangan penelitian

Keterangan :

K = Kelompok Penelitian,

P2 = Kelompok Perlakuan 2,

P4 = Kelompok Perlakuan 4,

P1 = Kelompok Perlakuan 1,

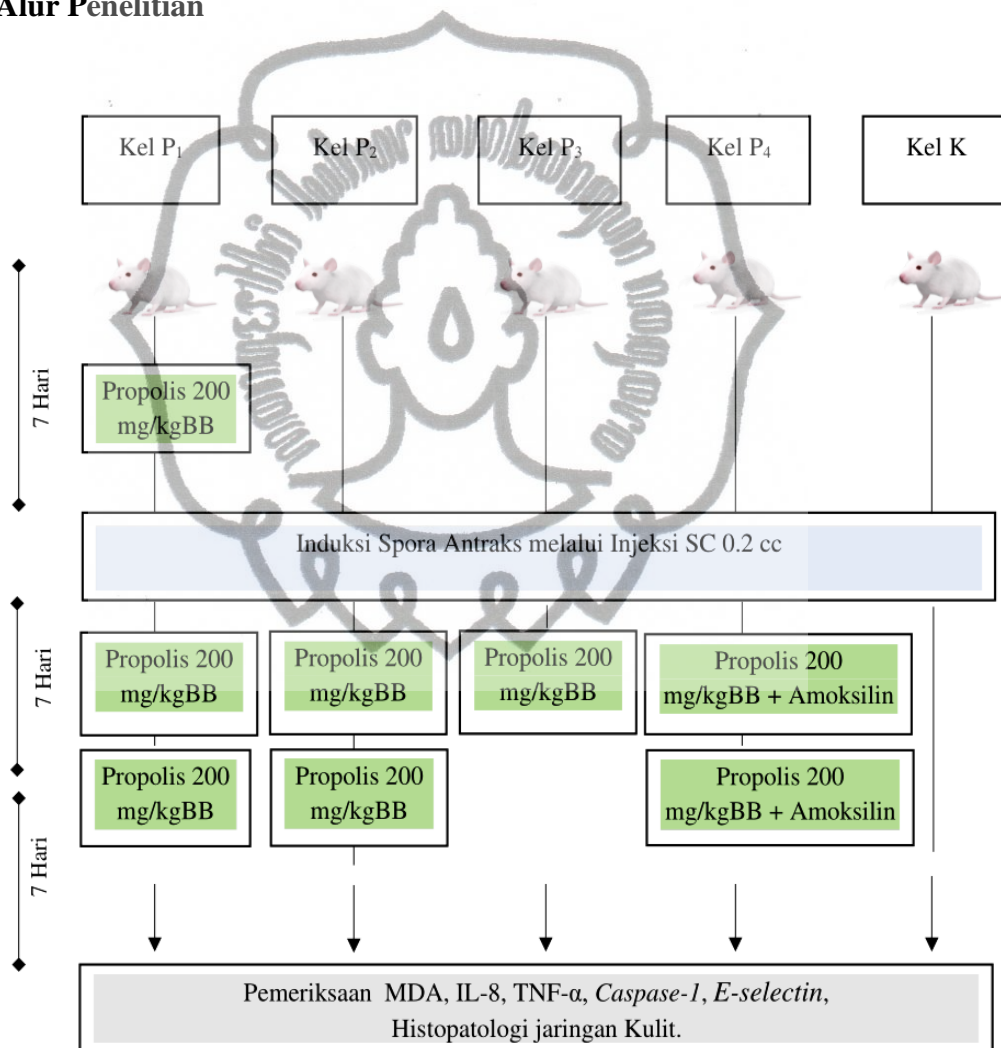
P3 = Kelompok Perlakuan 3,

K1 = 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 dengan injeksi ketamin pada hari ke 14, setelah dilakukan injeksi spora *B. anthracis* melalui *Subcutan* (SC) dosis 0.20 cc, yang setara dengan  $2 \times 10^{11}$  CFU spora, dengan cara diberikan injeksi ketamin. Jaringan kulit diambil dan dibuat preparat histopatologi menurut metode standar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, masing-masing perlakuan sebanyak delapan ekor tikus. Setiap sampel dibuat sebagai preparat histologi, untuk pemeriksaan imunohistokimiawi dan pemeriksaan histopatologi pada jaringan kulit dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, yaitu *caspase-1* dan IL-8. Sampel serum digunakan pada pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  dan *E-selectin*, dilakukan pada akhir penelitian, selanjutnya pemeriksaan kadar MDA dengan metode TBARS di Laboratorium PAU, Universitas Gajah 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 kesehatan Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### E. Alur Penelitian



**Gambar 4.2** Rancangan Operasional Propolis Terhadap Tikus Model *Cutaneous Anthrax*

## F. Variabel Penelitian.

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

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

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

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

Variabel ini terbagi dalam 3 kategori, yaitu marker anti-inflamasi, antioksidan dan ujud kelainan kulit (UKK) pada jaringan kulit tikus model *cutaneous anthrax*. Marker anti-inflamasi adalah TNF  $\alpha$ , *caspase-1* dan *E-selectin*, marker antioksidan adalah MDA serum serta histopatologi jaringan kulit.

## G. Definisi Operasional

**Tabel 4.1.** Definisi Operasional

VARIABEL	DEFINISI KONSEPTUAL	OPERASIONAL	SATUAN	SKALA
Ekstrak Etanol Propolis	Ekstrak yang dibuat dari propolis dari Gunung Lawu.	Maserasi	mg/ kg BB	Ordinal
TNF- $\alpha$	Salah satu marker anti-inflamasi pada infeksi antraks.	ELISA	pg/ml	Rasio
<i>Caspase-1</i>	Salah satu sitokin yang muncul karena infeksi antraks.	Imuno-histokimia	skor	Ordinal
IL-8	Salah satu marker inflamasi karena adanya infeksi atau toksin antraks.	Imuno-histokimia	Skor	Ordinal
<i>E-selectin</i>	Salah satu marker dalam menilai adanya disfungsi endotel karena infeksi antraks	ELISA	pg/ml	Rasio
MDA	Salah satu marker yang digunakan dalam menilai stress oksidatif	Secara kuantitatif dengan metode TBARS	pg/ml	Rasio

VARIABEL	DEFINISI KONSEPTUAL	OPERASIONAL	SATUAN	SKALA
Nekrosis jaringan kulit	Kematian sel akibat proses inflamasi berat akibat infeksi antraks.	Histopatologi	skor	Ordinal
Manifestasi kulit	Ujud kelainan kulit yang muncul karena infeksi antraks	Fisik	skor	Ordinal

## H. Prosedur penelitian

### 1. Penelitian pendahuluan

Tikus putih sebanyak 9 ekor sebelum diberi perlakuan diadaptasikan dahulu selama 7 hari, kemudian tikus diinduksi dengan spora *B. anthracis* melalui *subcutan* dan dievaluasi hingga 14 hari.

### 2. Pengelompokan Tikus

Tikus putih sebanyak 40 ekor sebelum diberi perlakuan, diadaptasikan selama 7 hari. Sesudah itu tikus dibagi 5 kelompok setiap kelompok ada 8 ekor, yaitu:

K : kelompok hewan model *cutaneous anthrax*

P1: kelompok hewan model *cutaneous anthrax* yang diberikan EEP dengan dosis 200 mg/Kg BB selama 7 hari sebelum induksi dan dilanjutkan selama 14 hari.

P2: kelompok hewan model *cutaneous anthrax* dengan induksi spora *B. anthracis* yang diberikan EEP dengan dosis 200 mg/Kg BB selama 14 hari.

P3: kelompok hewan model *cutaneous anthrax* dengan induks spora *B. anthracis* diberikan EEP dengan dosis 200 mg/Kg BB selama 7 hari.

P4: kelompok hewan model *cutaneous anthrax* dengan induks spora *B. anthracis* diberikan EEP dengan dosis 200 mg/Kg BB dan amoksilin 9 mg/ 8 jam selama 14 hari.



### 3. Preparasi Spora *Bacillus anthracis*

Alat dan bahan meliputi:

- Isolat *B. anthracis* dalam bentuk kering beku (*ampoule*)
- Phosphat buffer saline* (PBS) steril pH 7.4
- NaCl fisiologis steril
- Media agar darah 5-10% (500 ml *Blood agar base*, 25-50 ml *defebrinated sheep blood*)
- 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  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 22 g agar, bahan dilarutkan menggunakan *aquadest* sampai 1000 ml, pH dijadikan 7.4, kemudian di*autoclave*. Media kemudian dituang 20-50 ml untuk tiap *cell culture flask* atau 120 ml untuk botol *roux*, diamkan sampai membeku, dan cek sterilitasnya)
- Inkubator
- Biosafety Cabinet Class II*

#### Cara Pembuatan Spora antraks

- Isolat *B. anthracis* dalam bentuk kering beku dilarutkan menggunakan *phosphate buffer saline* atau NaCl fisiologis steril.
- Selanjutnya diinokulasikan pada media agar darah.
- Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Kultur selanjutnya di panen menggunakan NaCl fisiologis, disuspensikan, dan diuji kemurniannya.
- Suspensi *B. anthracis* sebanyak 0,2 ml diinokulasikan pada media spora, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 72 jam (umumnya 90% sudah terbentuk spora) diinkubasikan kembali di suhu ruang selama 3 hari.
- Untuk memanen spora, ditambahkan 10 ml NaCl fisiologis dan ditampung di dalam *tube*.

- g. Ditambahkan 10 ml NaCl fisiologis dan ditampung di dalam *tube* untuk memanen spora.
- h. Suspensi spora selanjutnya dicek kemurniaanya dan dipanaskan 65°C selama 1 jam untuk membunuh sel vegetatif.
- i. Suspensi spora dihitung konsentrasinya sampai mencapai 10<sup>8</sup> CFU/ml (*culturable spora*).

#### 4. Pembuatan Model *Cutaneous Anthrax*

Saat ini adanya ulkus dan *eschar* pada permukaan kulit hewan coba sebagai manifestasi klinis *cutaneous anthrax* belum pernah, karena belum adanya model yang tepat untuk infeksi ini (Timothy *et al.*, 2007). Tikus digunakan sebagai hewan model antraks dengan beberapa alasan, diantaranya adalah faktor kemiripan dengan manusia, ukuran, pemeliharaan lebih mudah dan lebih murah dibanding dengan hewan coba lainnya (Fink *et al.*, 2008). Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar, sesuai dengan kepustakaan, meskipun wistar resisten terhadap induksi parenteral dengan spora, tikus *strain* Fisher 344 sensitif terhadap efek lethal atau injeksi toksin (Welkos *et al.*, 2015).

Penelitian ini menggunakan inokulasi *subcutan* sesuai dengan langkah-langkah penelitian yang dilakukan oleh Timothy *et al.* (2007), yaitu langkah pertama, satu hari sebelum inokulasi, tikus secara hati-hati dilakukan pencukuran pada punggung dengan pencukur elektrik, kemudian di hari berikutnya lokasi yang dicukur sebelumnya di periksa apakah ada kelainan atau defek, dan hanya tikus dengan kulit yang tidak ada defek, yang dilakukan inokulasi. Penelitian oleh Beth dalam Hahn *et al.* (2005) dikatakan bahwa spora *B. anthracis* mempunyai kemampuan untuk menyebar ke epidermis non-lesi setelah dilakukan inokulasi, tetapi infeksi akan lebih intens apabila epidermis mengalami kerusakan sebelum inokulasi. Invasi dan proliferasi organisme di epidermis dan folikel rambut tampaknya menjadi jalur utama ke infeksi yang lebih dalam, meskipun invasi dermal secara langsung juga dapat terjadi. Kerusakan epidermis interfolikular menyebabkan kerusakan komponen folikel rambut yang



lebih rentan terhadap infeksi organisme tersebut (Hahn *et al.*, 2005). Inokulasi dilakukan pada punggung tikus yang telah dicukur dengan cara injeksi subkutan dengan spora *B. anthracis*  $10^{11}$  CFU yang sebelumnya diencerkan dengan NaCl fisiologis sebanyak 10 ml, dosis 0,2 cc. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Doung *et al.* (2006) yang melakukan penelitian dengan menginduksi infeksi antraks dengan, injeksi *subcutan* pada mencit C57Bl/5 menggunakan *sterne* (Doung *et al.*, 2006). Penelitian melalui injeksi spora secara intradermal sama dengan yang dilakukan dengan injeksi subkutan (Hahn *et al.*, 2005).

Cara pembuatan model *cutaneous anthrax* :

- a. Tikus putih winstar diadaptasikan dulu selama 7 hari.
- b. Sehari sebelum induksi dilakukan pencukuran punggung tikus dengan pencukur elektrik. Sehari setelah pencukuran dilakukan pemeriksaan apakah terdapat defek pada area yang telah dicukur tersebut, apabila tidak ada defek atau lesi dapat dilakukan induksi.
- c. Induksi inokulasi diberikan pada punggung tikus dengan cara injeksi subkutan dengan spora yang sudah diencerkan dengan NaCl fisiologis 10 cc, induksi dilakukan dengan injeksi spora antraks cair 0,2 cc.

## 5. Cara Pembuatan EEP

Cara pembuatan EEP adalah (Hastuti *et al.*, 2013) :pasu

- a. Sebanyak 0,1 g propolis kering dan ditambah dengan 30 ml air, proses maserasi dimulai selama 12 jam.
- b. Sampel dimasukkan ke dalam *shaker* dan disentrifugasi dengan kecepatan 50 rpm selama 30 menit pada suhu 30°C. Supernatan yang didapat, difiltrasi 5 jam.
- c. Prosedur yang sama diulang sebanyak 5 kali.
- d. Modifikasi yang dilakukan adalah dengan memperpanjang lama perendaman menjadi 24 jam dan tidak menggunakan *shaker* pada proses pengadukan.

## 6. Prosedur pemeriksaan histopatologi dan immunohistokimia

### a. Alat dan Bahan

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

Alat: *Tissue cassette*, *beaker glass*, *mikrotom*, *gelas objek*, *Deck glass*, *Humidity chamber vertical*.

### b. Prosessing jaringan:

- 1) Jaringan pada mukosa kulit yang telah mengalami inflamasi pada mencit model antraks difiksasi terlebih dahulu 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 dalam rendaman alkohol 70% selama 1 jam.
- 4) Kemudian diangkat dan direndam lagi dalam alkohol 80 % 1 jam.
- 5) Dipindahkan dan direndam dalam alkohol 95 % selama 1 jam.
- 6) Diangkat dan direndam dalam *xylol* I selama 1 jam, dilanjutkan ke dalam *xylol* II selama 1 jam.
- 7) Ditiriskan kemudian dilakukan proses *embedding*, yaitu direndam dalam *paraffin* cair pada suhu 58°C dalam inkubator selama semalam, kemudian dibuat blok *paraffin*.

### c. Prosessing blok *paraffin*:

- 1) Jaringan diletakkan pada gelas objek.
- 2) Dimasukkan dalam inkubator suhu 58°C selama 20 menit.
- 3) 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 dalam alkohol 95 % selama 5 menit, dan dalam alkohol 70 % selama 5 menit.

- 5) Cuci dengan *aquadest* selama 5 menit, dan preparat masuk dalam tahap pengecatan.



**d. Prosedur pengecatan *Hematoxylin-Eosin***

- 1) Setelah proses deparafinisasi dengan *xylene*, kemudian slide irisan jaringan dibawa ke medium *aquosa*, kemudian dicuci dengan air mengalir.
- 2) Dimasukkan ke dalam cat *hematoxylin* selama 7 – 10 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- 3) Kemudian dimasukkan dalam cat *eosin* selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- 4) Dibilas dalam alkohol 90%, dan keringkan di udara, setelah itu teteskan *xylene* dan ditutup dengan kaca penutup.

**e. Cara penentuan kesesuaian penilaian pembacaan preparat**

Jaringan kulit yang telah dilakukan pengecatan *Hematoxylin-Eosin* (HE), dianalisis dengan menggunakan skor, yaitu:

- 0 : Normal
- 1 : Sebukan sel limfosit, histiosit, sel plasma dan lekosit PMN tanpa gambaran radang *granulomatosa*
- 2 : Gambaran radang *granulomatosa* supuratif
- 3 : Gambaran radang *garnulomatosa* supuratif dengan area nekrosis

Pemeriksaan histopatologi ini dilakukan oleh dua ahli patologi anatomi, dengan penilaian skoring seperti di atas, dihitung *Koefisien Kappa*, yaitu uji reliabilitas untuk menentukan konsistensi pengukuran yang dilakukan oleh dua orang penilai, yaitu dengan nilai kekuatan *Koefisien Kappa* (Tang *et al.*, 2015) :

**Tabel 4.2.** Kekuatan *Koeffisien Kappa*

Nilai <i>Kappa</i>	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

## 7. Pelaksanaan Penelitian

### a. Teknik Pemeriksaan MDA serum

Serum *Rattus norvegicus* diambil dari vena *retroorbital*, kemudian disentrifus 1.500 rpm selama 15 menit untuk kemudian disimpan dalam suhu - 60° C. Pengukuran kadar MDA serum dikerjakan dengan metode spektrofotometri. Prinsip kerjanya adalah dengan menggunakan reaksi NWK-MDA01 *assay*, berdasarkan reaksi MDA dengan *Thiobarbituric Acid* (TBA) absorpsi yang dibaca dengan panjang gelombang 532 nm. *Malondialdehyde* diukur menggunakan konsentrasi *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Asam fosfat 750 µl dimasukkan kedalam *tube polyproene* 13 ml.
- 2) Ditambahkan 50 µl standart/sampel/blanko.
- 3) Dicampur dengan 250 µl 40 mM larutan TBA.
- 4) Ditambahkan *Aquabides* 450 µl pada masing-masing *tube*.
- 5) Kemudian dicampur dan dimasukkan ke dalam penangas air suhu 60°C selama 1 jam.
- 6) Standar (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*)/ sampel/ blanko *tube* dikeluarkan dari penangas air dan dimasukkan ke dalam es batu.
- 7) Disiapkan kolom *Sep-Pak C18* : cuci dan masukkan metanol 5 ml, kemudian dibuang.
- 8) Dimasukkan *aquabides* 5 ml, kemudian dibuang lagi.
- 9) Sampel dimasukkan, dan dibuang, kemudian *aquabides* 4 ml dimasukkan dan dibuang.
- 10) Metanol 4 ml dimasukkan dan ditampung.
- 11) Kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

### b. Teknik Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Jaringan kulit yang telah diambil kemudian ditimbang, untuk menghitung bobot relatif organ dihitung (%) sebagai g/100g berat badan. Spesimen dari kulit difiksasi segera dalam 10% *buffered*

*formalin* untuk uji imunohistokimiawi TNF- $\alpha$ , *caspase-1* dan *E-selectin*. Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan *imunoperoxidase indirect* metode *avidin biotin complex* yaitu :

- 1) Pertama kali dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu preparat dimasukkan kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.
- 2) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4.
- 3) Jaringan diinkubasi dengan tripsin 0,125 % pada temperatur 37°C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
- 4) Kemudian jaringan diinkubasikan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen dan dibiarkan pada temperatur ruangan.
- 5) Dicuci dengan air mengalir selama 1 menit yang diikuti pencucian dengan *aquadestilata*.
- 6) Jaringan ditandai dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
- 7) Dinkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam BSA 1% selama 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* pada TNF- $\alpha$ , *caspase-1* 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 antibodi *anti murine* yang telah dibiotinilisasi (Dako Kit). Lama inkubasi 30 menit.
- 12) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing 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 masing-masing selama 3 menit.
- 15) Dilakukan inkubasi jaringan dengan substrat (Dako Kit) sampai timbul warna coklat pada jaringan, selama  $\pm 15$  menit.
- 16) Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- 17) Jaringan diwarnai dengan Hematoksin, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditutup dengan kaca penutup (*deck glass*).
- 18) Ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat dibawah mikroskop cahaya. Sel yang positif dihitung dalam persentase. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.
- 19) Dilakukan pembacaan preparat IHK oleh ahli patologi anatomi, serta di hitung nilai *koeffisien kappa*.

## I. Analisis Data

Data yang diperoleh meliputi kadar MDA, IL-8, TNF- $\alpha$ , *Caspase-1*, *e-selectin* dan jaringan kulit, dianalisis dengan menggunakan program *SPSS for Windows Release 22*. Data kategorikal di uji dengan *non parametrik* dan hasil pengujian dianggap signifikan bila hasil  $p < 0,05$ . Dengan rancangan analisis statistik, yaitu :

1. Uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui uji beda akibat paparan spora antraks pada lima kelompok.

2. Uji *Mann whitney* untuk mengetahui perbedaan *mean rank* antar kelompok.

Data numerik yang diperoleh setelah memenuhi kriteria diuji menggunakan uji *Anova*. Hasil pengujian dianggap signifikan bila nilai  $p < 0,05$ . Dengan rancangan analisis statistik, yaitu:

1. Uji *Shapiro-Wilk*, digunakan dalam uji normalitas distribusi data.
2. Uji homogenitas menggunakan *Levene's test*.
3. Uji *Anova*, digunakan untuk uji rata-rata antar kelompok.
4. Uji *post-hoc Tuckey*, digunakan untuk uji beda antar kelompok.

