

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris yang bersifat kualitatif dengan memberikan pembahasan hasil secara deskriptif. Pada penelitian ini menggunakan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan uji coba demam tifoid. Penelitian dilakukan dengan menginfeksi bakteri *Salmonella typhi* ke dalam tubuh tikus putih (*Rattus norvegicus*) hal tersebut dimaksudkan untuk dapat mewakili keadaan patologis demam tifoid pada manusia yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 14 ekor. Tikus putih dibagi menjadi 4 kelompok yaitu, 2 kelompok terdiri dari kelompok kontrol negatif (tanpa infeksi Bakteri *Salmonella typhi*) dan kelompok kontrol positif (Pemberian infeksi Bakteri *Salmonella typhi*). 2 kelompok sebagai perlakuan terdiri dari perlakuan I (infeksi bakteri *Salmonella typhi* dan pemberian serbuk cacing tanah) dan perlakuan II (infeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan pemberian serbuk cacing tanah dan kloramfenikol). Metode pengambilan jaringan usus dilakukan pada hari ke 14 dengan proses nekropsi, untuk dibuat preparat histopatologi usus dan dibaca hasilnya oleh dr. Spesialis Patologi Anatomi.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September-Januari 2024 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan pembacaan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soerarno Gemolong Sragen.

C. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah yaitu 14 ekor tikus putih yang terbagi dalam 4 kelompok dengan 2 kelompok kontrol sebanyak 3 ekor kontrol negatif 3 ekor kontrol positif diinfeksi *Salmonella typhi* dan 2 kelompok perlakuan sebanyak 4 ekor sebagai perlakuan I yang diinfeksi bakteri

Salmonella typhi dengan pemberian serbuk cacing tanah dan 4 ekor sebagai perlakuan II yang diinfeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan pemberian serbuk cacing tanah dan kloramfenikol.

D. Variabel Penelitian

1. Serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan kloramfenikol.
2. Gambaran jaringan usus tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca infeksi *Salmonella typhi*

E. Alat Dan Bahan

1. Alat

- a. Alat yang digunakan dalam pemeliharaan tikus: kandang, tempat makan dan minum
- b. Alat bedah yang digunakan untuk hewan percobaan: Gunting, scalpel, pinset
- c. Alat untuk pembuatan histopatologi: *Tissue processor*, *tissue embedding*, cetakan blok paraffin, mikrotom, *waterbath*, *hotplate*
- d. Alat untuk mengamati histopatologi usus: *deck glass*, *object glass* dan mikroskop cahaya

2. Bahan

- a. Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- b. Makanan dan minuman standar hewan uji
- c. Aquades
- d. Serbuk cacing tanah dalam bentuk kapsul dan tiap kapsul mengandung ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*)
- e. Kloramfenikol
- f. Larutan pembuatan preparat histopatologi: cairan NBF 10%, alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, 100%), xylol, aquades, paraffin, pewarna hematoxylin eosin dan entelan

F. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Serbuk Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)
Serbuk cacing tanah dari (*Lumbricus rubellus*) yang akan digunakan dalam penelitian ini dibeli dalam bentuk sediaan kapsul.

2. Penentuan Dosis Serbuk Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Penentuan dosis serbuk cacing tanah yang akan diinduksikan ke dalam tubuh cacing tanah menggunakan dosis 29,7 g/0,2 Kg/BB yang akan dilarutkan menggunakan aquades hingga volume 2 ml. Pengujian ini menggunakan 2 kelompok perlakuan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang masing-masing kelompok perlakuan terdiri 4 tikus dan masing-masing diberikan serbuk cacing tanah sesuai dengan dosis dari berat badan.

Perlakuan I

$$\text{Tikus 1 : } 216 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 32,076 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 2 : } 240 \text{ gr} = \frac{240}{200} \times 29,7 = 35,64 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 3 : } 201 \text{ gr} = \frac{201}{200} \times 29,7 = 29,84 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 4 : } 200 \text{ gr} = \frac{200}{200} \times 29,7 = 29,7 \text{ mg/kgBB}$$

Perlakuan 2

$$\text{Tikus 1 : } 202 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 29,99 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 2 : } 235 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 34,8975 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 3 : } 210 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 31,185 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 4 : } 234 \text{ gr} = \frac{234}{200} \times 29,7 = 34,749 \text{ mg/kgBB}$$

3. Penentuan Dosis Antibiotik Kloramfenikol

Antibiotik kloramfenikol dalam bentuk kapsul kemudian dibuat dalam bentuk larutan, Penentuan dosis antibiotik kloramfenikol yang akan diinduksikan ke dalam tubuh Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pada penelitian ini menggunakan dosis 13,5 KgBB yang akan dilarutkan menggunakan aquades hingga volume 2 ml. Pengujian menggunakan 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang masing-masing diberikan antibiotik kloramfenikol dosis sesuai dengan berat badan masing-masing dan antibiotik ini diberikan dengan bersamaan serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*).

$$\text{Tikus 1 perlakuan II : } 202 \text{ gr} = \frac{202}{200} \times 13,5 = 13,635 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 2 perlakuan II : } 235 \text{ gr} = \frac{235}{200} \times 13,5 = 15,862 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 3 perlakuan II : } 210 \text{ gr} = \frac{210}{200} \times 13,5 = 14,175 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 4 perlakuan II : } 234 \text{ gr} = \frac{234}{200} \times 13,5 = 15,795 \text{ mg/kgBB}$$

4. Pemeliharaan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

a. Persiapan

Tikus yang memenuhi kriteria sampel penelitian ialah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dimanfaatkan sebagai hewan coba dalam penelitian ini.

b. Perawatan dan pemeliharaan

Tikus putih akan dipelihara dan dirawat di Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

5. Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland*

Larutan *Mc Farland* dilakukan guna membandingkan kekeruhan biakan bakteri dalam media cair dengan `kepadatan 1×10^7 sel/ml - 1×10^8 sel/ml.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi*

Larutan NaCl 0,9% steril dalam tabung reaksi dibuat untuk membuat suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang akan disuntikkan ke tubuh tikus putih. Bakteri *Salmonella typhi* diberikan satu dosis sebelum dipindahkan dari media NB ke dalam larutan NaCl 0,9% steril hingga kekeruhannya sesuai dengan suspensi referensi 0,5 *Mc Farland*. Agar infeksi bakteri *Salmonella typhi* yang dimasukkan ke dalam tubuh cacing tanah dapat mencapai usus, maka bakteri yang akan dimasukkan ke dalam tubuh tikus putih akan masuk ke lambung dan sebagian besar akan mati karena asam lambung serta menimbulkan gejala klinis penyakit demam tifoid sehingga standar 0,5 *Mc Farland* ditunjuk untuk dosis infeksi standar 0,5 *Mc Farland* yaitu 10^8 CFU/ml.

7. Perlakuan Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

a. Aklimatisasi (Hari ke 1-7)

Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari.

b. Pengukuran Suhu Tubuh Awal (Hari ke-8)

- c. Infeksi Bakteri *Salmonella typhi* (Hari Ke-8)
Dengan menggunakan spuit 2 ml, infeksi bakteri *Salmonella typhi* oral dilakukan pada tikus putih di masing-masing kelompok.
- d. Pengukuran Suhu Tubuh Kedua (Hari Ke-9 dan Ke-14)
Apabila tikus putih menunjukkan gejala klinis demam (yaitu kenaikan suhu tubuh di atas 37°C), maka diduga ia tertular bakteri *Salmonella typhi*. Hal ini dapat diketahui dengan memeriksa suhu tubuh tikus secara berkala menggunakan termometer rektal.
- e. Induksi Serbuk Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) pada hari ke 14-21 perlakuan selanjutnya yaitu induksi serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan dosis 1,6 g /0,2 KgBB pada kelompok perlakuan salah satu kelompok kontrol menggunakan kloramfenikol dosis 0,0018 gr dan kelompok kontrol satunya tanpa induksi serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*).
- f. Pengukuran Suhu Tubuh Ketiga (Pasca Induksi bakteri *Salmonella typhi* pada hari ke-21. Dengan menggunakan termometer rektal, suhu tubuh mencit akan dipantau setiap 14 hari setelah induksi bubuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Tujuan dari pengukuran suhu tubuh tikus secara berkala hingga setelah pemberian bubuk cacing tanah adalah untuk memastikan apakah suhu tubuh tikus mengalami penurunan setelah perlakuan.

8. Nekropsi

Sebelum dilakukan nekropsi, tikus dieuthanasia terlebih dahulu menggunakan kloroform 10%. Nekropsi dilakukan pada hari ke-21 penelitian untuk mengambil organ usus tikus guna dilakukan pembuatan preparat histopatologi nekropsi dilakukan pada abdomen dengan posisi rebah di atas papan bedah kemudian diambil organ usus 2-3 cm setelah lambung hingga 10 cm kemudian dimasukkan kedalam larutan fiksasi NBF 10%. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi.

9. Pembuatan Preparat Histopatologi Usus

Preparat histopatologi usus akan dibuat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta dengan menggunakan pengecatan Hematoxylin

eosin dan pembacaan akan dilakukan dengan bantuan dokter spesialis Patologi Anatomi. Langkah-langkah yang dilakukan dalam pembuatan preparat histopatologi :

a. Proses Fiksasi

Fiksasi berfungsi untuk mempertahankan sktruktur sel sehingga menjadi stabil secara fisik dan kimiawi, mempertahankan jaringan usus setelah dipindahkan dari tikus untuk menghambat pembusukan. Organ yang telah diambil dimasukkan dalam botol cup kemudian difiksasi dengan *Neutral Buffer Formaldehyde* 10% dan ditutup rapat selama 24 jam.

b. Pemotongan makroskopis

Usus tikus dipotong secara makroskopis sekitar 1x1x1 cm kemudian dimasukkan dimasukkan kedalam *cassette tissue*. Untuk kelompok perlakuan, jaringan usus dipilih pada bagian yang mengalami kelainan seperti adanya nodul pada permukaan usus yang kemudian dimasukkan kedalam casset untuk dilakukan prosesing jaringan,

c. Proses Dehidrasi

Dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan/menarik kadar air dalam jaringan. Jaringan yang sudah diiris (*trimming*) agar dapat dimasukkan dalam kotak untuk diproses dalam *tissue prosessor* dimasukkan kedalam larutan alkohol konsentrasi bertingkat.

- 1) Alkohol 70% selama 1,5 jam
- 2) Alkohol 80% selama 1,5 jam
- 3) Alkohol 95% selama 1,5 jam
- 4) Alkohol absolut I selama 1 jam
- 5) Alkohol absolut II selama 1,5 jam
- 6) Alkohol absolut III selama 2 jam

d. Proses *clearing*

Clearing berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan dan memberikan warna yang bening pada jaringan dengan menggunakan xylol.

- 1)Xylol 1 selama 1 jam
- 2)Xylol selama 1,5 jam
- 3)Xylol selama 1,5 jam

e. Proses infiltrasi paraffin

Selanjutnya jaringan dimasukkan dalam paraffin cair I dengan suhu 56-59°C selama 1,5 dan paraffin cair II selama 2 jam. Hal ini bertujuan untuk mengisi rongga-rongga yang ada pada jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan sebelumnya (xylol) agar mudah dipotong.

f. Proses pengeblokan/*embedding*

Jaringan yang sudah selesai di processing dikeluarkan dan segera dimasukkan kedalam tissue *embedding* yang sebelumnya sudah diisi dengan paraffin cair. Setelah itu *base mould* diisi dengan paraffin cair kemudian jaringan dimasukkan kedalam *base mould* yang berisi paraffin cair tersebut lalu ditutup dengan kaset beserta label di atasnya. Biarkan mengeras kemudian masukkan kedalam kulkas untuk *cooling* kurang lebih 15 menit. Selanjutnya blok dipisahkan dari basemould kemudian sisa paraffin pada pinggir blok dibersihkan menggunakan *cutter*.

g. Proses pemotongan mikrotom

Pemotongan jaringan dilakukan menggunakan mikrotom yang sudah diatur kemiringannya 30° dengan ketebalan 3-5 µm. hasil potongan berupa pita dipindahkan ke dalam waterbath pada suhu 15°C kemudian diambil dengan objek glass dan diberi identitas sampel. Preparat jaringan kemudian diinkubasi dengan diletakkan diatas *hotplate* atau dimasukkan kedalam oven selama 10 menit dengan suhu 58-60°C. Inkubasi ini bertujuan untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan pita sehingga jaringan bisa menempel kuat pada objek glass.

h. Proses Pewarnaan

Pewarnaan melalui beberapa tahapan berikut:

- 1) Deparafinisasi dilakukan dengan mencelupkan slide preparat kedalam xylol I & II, masing-masing selama 5 menit.
- 2) Redehidrasi dilakukan dengan mencelupkan slide preparat kedalam alkohol 100%, 95%, 70% masing-masing 3 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.

- 3) Pewarnaan inti dilakukan dengan cara mencelupkan slide preparat ke dalam hematoxylin selama 20 menit kemudian bilas dengan air mengalir.
- 4) Pewarnaan Eosin dilakukan dengan mencelupkan slide preparat kedalam eosin selama 30 detik kemudian bilas dengan air mengalir.
- 5) Dehidrasi dilakukan dengan cara mencelupkan slide preparat kedalam alkohol 70%, alkohol 96%, dan alkohol 100% masingmasing 10x *deep* (celup).
- 6) *Clearing* dilakukan dengan mencelupkan preparat kedalam xylol guna untuk membersihkan sisa-sisa pewarnaan disekitar preparat.
- 7) Perlekatan (*Mounting*) dilakukan dengan cara objek glass yang sudah berisi pita preparat ditetesi dengan entelan kemudian ditutup dengan deck glass.
- 8) Pembacaan Hasil
Pembacaan preparat didasarkan pada tingkat kerusakan pada jaringan usus tikus galur wistar kemudian dikonsultasikan dengan dokter spesialis patologi anatomi.

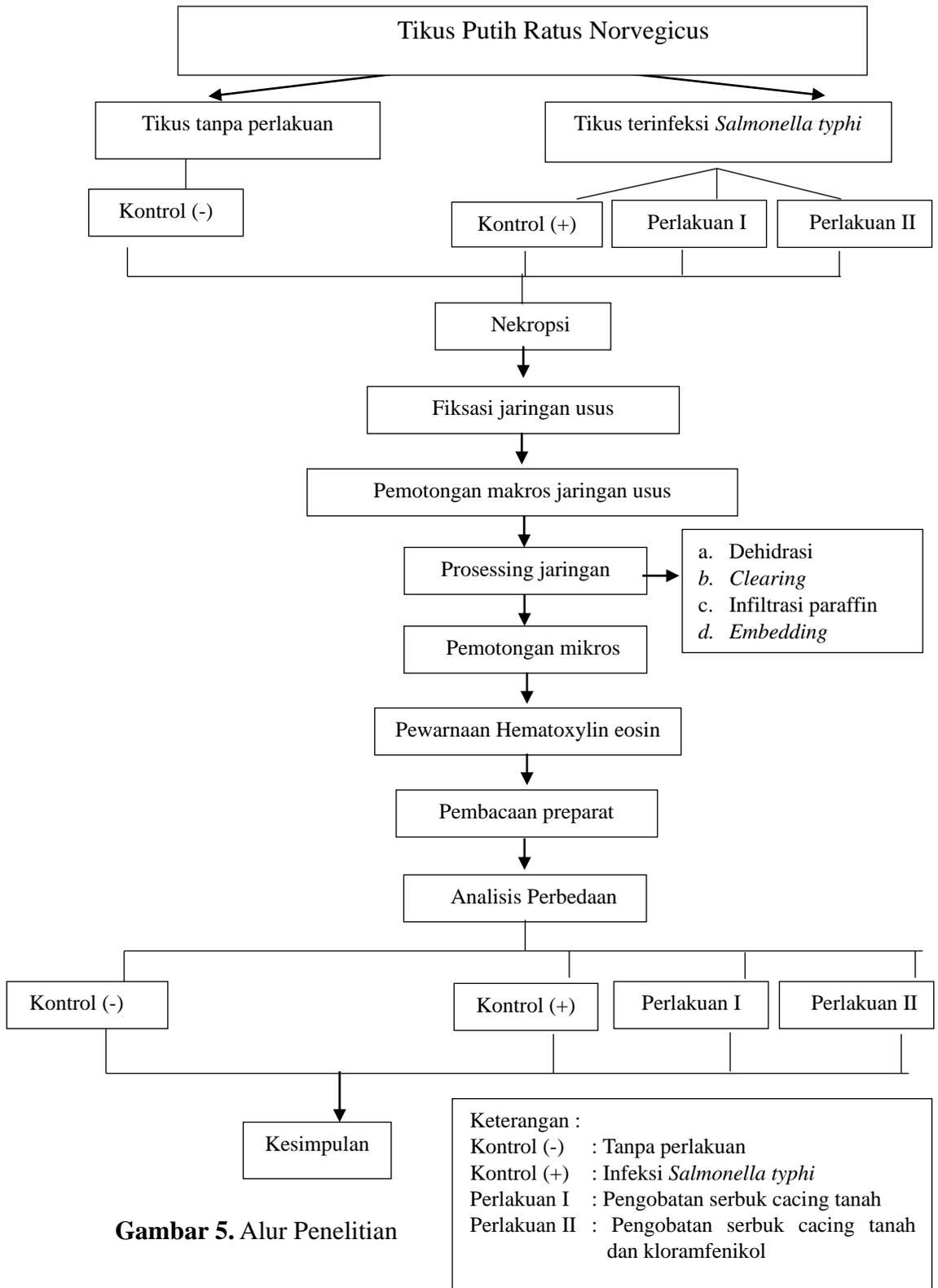
G. Teknik Pengambilan data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari pemeriksaan langsung dengan membandingkan gambaran histopatologi usus tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebelum dan pasca pemberian infeksi *Salmonella typhi* dan diberi perlakuan serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan kloramfenikol. Hasil preparat dibacakan dengan membandingkan gambaran histopatologi usus tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan jumlah kontrol negatif (Tikus putih tanpa perlakuan) 1 slide, kontrol positif (Tikus putih dengan pemberian bakteri *Salmonella typhi*) 1 slide , kelompok perlakuan I (Tikus putih dengan pemberian bakteri *Salmonella typhi* dan pengobatan dengan Serbuk Cacing Tanah) 2 slide, kelompok perlakuan II (Tikus putih dengan pemberian Bakteri *Salmonella typhi* dan pengobatan dengan Serbuk Cacing Tanah dan Kloramfenikol) 2 slide. Dibaca dibawah mikroskop dengan perbesaran 40X .

H. Teknik Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif dimana penilaian didasarkan pada perbedaan tingkat kerusakan yang dinilai oleh Dokter Spesialis Patologi Anatomi. Setiap tikus dibuat dalam satu preparat dan tiap preparat diamati perlapang pandang mikroskopis dengan perbesaran 40x. Usus yang diperiksa secara histopatologi berdasarkan iregularitas, pemendekan dan pendataran rugae usus, proliferasi sel-sel epitel permukaan dan penambahan sel goblet. Selanjutnya diskoring berdasarkan metode dari (Arya et al., 2012) yang telah dimodifikasi yaitu ; skor 0 berarti normal atau tidak ada kerusakan, skor 1 kerusakan *irregularitas*, skor 2 kerusakan pemendekan dan pendataran rugae usus, skor 3 penambahan sel goblet, skor 4 kerusakan proliferasi sel-sel epitel permukaan, skor 5 kerusakan iregularitas, pemendekan dan pendataran rugae usus, proliferasi sel-sel epitel permukaan dan penambahan sel goblet, skor 6 kerusakan *irregularitas*, pemendekan rugae usus dan penambahan sel goblet.

I. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian