

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 2 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 hepar dilakukan pada hari ke 14 dengan proses nekropsi, untuk dibuat preparat histopatologi hepar dan dibaca hasilnya oleh dr. Spesialis Patologi Anatomi.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan September 2023 – April 2024. Adapun tempat pemeliharaan hewan uji dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta sedangkan untuk pembuatan preparat di laksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan pembacaan preparat dilakukan di RSUD 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 (*Lumbricus rubellus*) dan Kloramfenikol.

D. Variabel Penelitian

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

E. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Alat yang digunakan untuk pemeliharaan tikus: kandang, tempat makan dan minum
- b. Alat bedah hewan percobaan: skalpel, pinset, gunting.
- c. Alat yang digunakan untuk pembuatan histopatologi: *tissue processor*, *tissue embedding*, cetakan blok parafin, mikrotom, *waterbath*, dan *hotplate*.
- d. Alat untuk melihat histopatologi hepar: deck glass, object glass, mikroskop cahaya.

2. Bahan

- a. Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- b. Makanan dan minuman standar hewan uji
- c. Aquades
- d. Serbuk cacing dalam bentuk kapsul
- e. Kloramfenikol
- f. Larutan pembuatan preparat histopatologi: cairan *Neutral Buffered Formaldehyde* 10%, alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, 100%), xylol, aquades, parafin, pewarna hematoksilin eosin, dan entelan.

F. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Serbuk Cacing Tanah

Serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang akan digunakan dalam penelitian ini berupa serbuk cacing tanah dalam bentuk kapsul yang di dapatkan dari toko obat Cina.

2. Penentuan Dosis Serbuk Cacing Tanah

Serbuk cacing tanah dalam bentuk kapsul kemudian dibuat dalam bentuk larutan, penentuan dosis serbuk cacing tanah yang akan diinduksikan ke dalam tubuh cacing tanah pada penelitian ini menggunakan dosis 29,7g/0,2 KgBB yang akan dilarutkan menggunakan aquades hingga volume 2 ml. Pengujian menggunakan 8 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang masing-masing diberikan serbuk cacing dosis sesuai dengan berat badan masing-masing.

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

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

$$\text{Tikus 3 perlakuan I : } 193 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 28,66 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Tikus 4 perlakuan I : } 192 \text{ gr} = \frac{216}{200} \times 29,7 = 28,51 \text{ mg/kgBB}$$

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

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

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

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

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.

$$\text{Tikus 1 perlakuan II : } 202 \text{ gr} = 202 \times \frac{13,5}{200} = 13,632 \text{ mg/kgBB}$$

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

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

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

4. Pemeliharaan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

a. Persiapan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian sebagai hewan coba ini adalah tikus yang telah memenuhi syarat sampel penelitian.

b. Perawatan dan pemeliharaan

Pemeliharaan dan perawatan tikus putih akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

5. Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland*

Larutan *Mc Farland* digunakan untuk pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam media cair dengan kepadatan 1×10^7 sel/ml - 1×10^8 sel/ml.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi*

Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang akan diinduksikan ke dalam tubuh tikus putih dibuat dengan menyiapkan larutan NaCl 0,9% steril ke dalam tabung reaksi. Bakteri *Salmonella typhi* diambil sebanyak 1 ose kemudian dipindahkan dari media NB ke dalam larutan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya sama dengan suspensi standart 0,5 *Mc Farland*. Bakteri yang akan diinduksikan ke dalam tubuh tikus putih akan masuk ke lambung dan sebagian besar akan mati akibat adanya asam lambung, sehingga infeksi bakteri *Salmonella typhi* yang diinduksikan ke dalam tubuh cacing tanah harus dalam jumlah banyak untuk bisa mencapai usus dan menimbulkan gejala klinis penyakit demam tifoid sehingga standar 0,5 *Mc Farland* dipilih sebagai dosis infeksi. Infeksi standar 0,5 *Mc Farland* yaitu 10^8 CFU/ml.

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

- a. Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari.
- b. Pengukuran Suhu Tubuh Awal (Hari ke-8)
- c. Infeksi Bakteri *Salmonella typhi* (Hari Ke-8)
 Infeksi Bakteri *Salmonella typhi* pada tikus putih dilakukan secara oral menggunakan spuit sebanyak 2 ml pada masing-masing kelompok.
- d. Pengukuran Suhu Tubuh Kedua (Hari Ke-12)
 Suhu tubuh dicek secara berkala dengan menggunakan termometer rektal untuk mengindikasikan bahwa tikus tersebut telah terinfeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan menunjukkan gejala klinis berupa demam ditandai dengan adanya kenaikan suhu tubuh tikus ($>37^{\circ}\text{C}$).
- e. Induksi Serbuk Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) pada hari ke 7-14. Perlakuan selanjutnya yaitu induksi serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan dosis 29,7 g/0,2 KgBB pada kelompok perlakuan. Penggunaan dosis yang sama untuk penyembuhan demam tifoid pada tikus putih.
- f. Salah satu kelompok perlakuan menggunakan kloramfenikol dosis 13,5 gr dan kelompok kontrol satunya tanpa induksi serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*).
- g. Pengukuran Suhu Tubuh Ketiga (Pasca Induksi bakteri *Salmonella typhi*) pada hari ke 7-14.
 Suhu tubuh tikus akan dicek secara berkala selama 14 hari setelah penginduksian serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan menggunakan termometer rektal. Pengecekan suhu tubuh secara berkala hingga pasca induksi serbuk cacing tanah bertujuan agar dapat mengetahui penurunan suhu tubuh tikus setelah diberi perlakuan.

8. Nekropsi

Sebelum dilakukan nekropsi, tikus dieuthanasia terlebih dahulu menggunakan kloroform 10%. Nekropsi dilakukan pada hari ke-14 penelitian untuk mengambil organ hepar tikus guna dilakukan pembuatan preparat histopatologi nekropsi dilakukan pada abdomen dengan posisi rebah di atas papan bedah kemudian diambil organ hepar kemudian dimasukkan kedalam larutan fiksasi *Neutral Buffered Formaldehyde* (NBF) 10%. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi.

9. Proses Pembuatan Preparat Histopatologi

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pembuatan preparat histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

a. Fiksasi

Tujuannya untuk menyempurnakan fiksasi organ hepar setelah dipisahkan dari tubuh tikus (Rupang, 2018). Fiksasi dilakukan dengan cara organ hepar yang telah dipotong dimasukkan ke dalam *cassette tissue* lalu direndam dalam larutan *Neutral Buffered Formaldehyde* 10% selama 24 jam. Pembuatan larutan fiksatif *Neutral Buffered Formaldehyde* dilakukan dengan cara mencampurkan formalin 40% dengan natrium dihidrogen fosfat kemudian dilarutkan dalam aquades. Fiksasi dilakukan dengan cara organ hepar yang telah dipotong dimasukkan ke dalam *cassette tissue* lalu direndam dalam larutan *Neutral Buffered Formaldehyde* 10% selama 24 jam.

b. Pemoangan Makroskopis

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

c. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan alkohol 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. *Clearing*

Bertujuan untuk membuat jaringan hepar menjadi transparan *Clearing* dilakukan dengan menggunakan xylol bertingkat.

1. Xylol I selama 1 jam
 2. Xylol 2 selama 1,5 jam
 3. Xylol 3 selama 1,5 jam
- e. Infiltrasi Parafin
- Parafin cair dilakukan dengan suhu 57-59°C yang berfungsi mengisi rongga-rongga yang terdapat pada jaringan setelah ditinggalkan oleh xylol.
1. Parafin cair I selama 1,5 jam
 2. Parafin cair II selama 2 jam
- f. *Embedding*
- Jaringan yang sudah selesai di *tissue processing* dikeluarkan dan segera dimasukkan ke dalam *tissue embedding* yang sebelumnya sudah diisi dengan parafin cair. Setelah itu *basemould* diisi dengan parafin cair kemudian jaringan dimasukkan ke dalam *basemould* yang berisi parafin cair tersebut lalu ditutup dengan kaset beserta label di atasnya. Biarkan mengeras kemudian masukkan ke dalam kulkas untuk *cooling* kurang lebih 15 menit. Selanjutnya blok dipisahkan dari *basemould* kemudian sisa parafin pada pinggir blok dibersihkan menggunakan *cutter*.
- g. Pemotongan *Microtome*
1. Pemotongan kasar *trimming* dilakukan dengan memotong sampel organ hepar menjadi ukuran yang lebih kecil sampai pada batas jaringan organnya untuk menghilangkan kelebihan sisa paraffin.
 2. Pemotongan halus dilakukan dengan cara blok dijepitkan pada mikrotom kemudian dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan 30° terhadap blok parafin dengan ketebalan 3-5 mikron, hasil potongan yang berupa pita dimasukkan ke dalam *waterbath* yang sudah diisi air yang dihangatkan 150°C, kemudian diambil dengan objek glass dan diberi identitas sampel. kemudian diinkubasi menggunakan oven.
- h. Inkubasi
- Inkubasi bertujuan untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan/pita sehingga jaringan dapat menempel kuat pada objek glass. Inkubasi dilakukan menggunakan oven selama 10 menit dengan suhu 58-60°C.

i. Pewarnaan (*Staining*)

Pewarnaan melalui beberapa tahapan berikut:

1. Deparafinisasi dilakukan dengan mencelupkan slide preparat ke dalam xylol I & II, masing-masing selama 5 menit.
2. Rehidrasi dilakukan dengan mencelupkan slide preparat ke dalam 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 ke dalam eosin selama 30 menit kemudian bilas dengan air mengalir.
5. Dehidrasi dilakukan dengan cara mencelupkan slide preparat ke dalam alkohol 70%, alkohol 80%, dan alkohol 100% masing-masing 10x celup.
6. Perekatan (*Mounting*) dilakukan dengan cara objek glass yang sudah berisi pita preparat ditetesi dengan entelan kemudian ditutup dengan *deck glass*.
7. Pembacaan Hasil
Pembacaan preparat didasarkan pada tingkat kerusakan pada jaringan hepar tikus galur wistar kemudian dikonsultasikan dengan dokter spesialis patologi anatomi.

G. Teknik Pengambilan Data

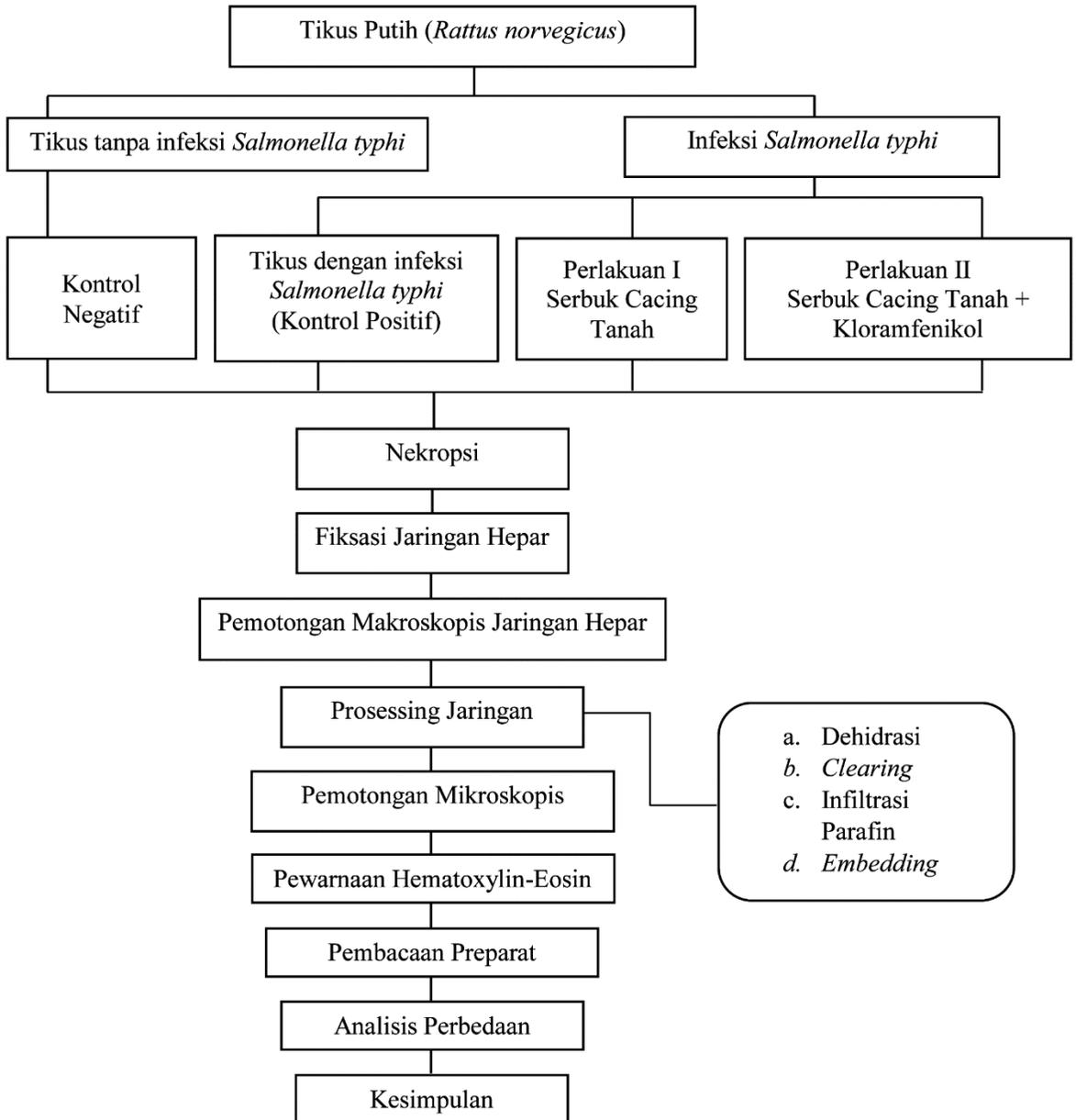
Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari pemeriksaan langsung dengan membandingkan gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebelum dan pasca pemberian infeksi *Salmonella typhi* dan diberi perlakuan serbuk cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan kloramfenikol. Hasil preparat dibacakan dengan membandingkan gambaran histopatologi hepar 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 terapi pemberian serbuk cacing tanah) 2 slide, kelompok perlakuan II (tikus putih dengan pemberian bakteri *Salmonella typhi* dan terapi pemberian serbuk cacing tanah dan kloramfenikol) 2 slide. Preparat dibaca di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x, dengan membaca kerusakan yang ada pada slide preparat seperti kerusakan degenerasi dan kerusakan nekrosis. Kerusakan degenerasi atau pembengkakan sel merupakan manifestasi pertama yang ada hampir pada semua bentuk jejas sel sebagai akibat pergeseran air ekstraseluler ke dalam sel, akibat gangguan pengaturan ion dan volume. Secara umum terdapat tiga macam degenerasi, yaitu degenerasi parenkim, degenerasi hidropi dan degenerasi meleak. Kemudian ada nekrosis, nekrosis merupakan kematian sel atau jaringan pada organisme hidup, ditandai dengan perubahan morfologi sebagai tindakan degradasi progresif oleh enzim-enzim pada sel yang terjejas (Fadhilla, 2015).

H. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode penilaian didasarkan pada tingkat kerusakan yang akan dinilai oleh dokter Spesialis Patologi Anatomi. Setiap tikus dibuat dalam satu preparat dan tiap preparat diamati perlapang pandang mikroskopis dengan perbesaran 40x. Hati yang diperiksa secara histopatologi berdasarkan degenerasi dan nekrosis atau apoptosis. Selanjutnya diskoring berdasarkan metode dari I Wayan Mudiana et al., (2023) yang telah dimodifikasi yaitu : skor 0 berarti normal atau tidak ada kerusakan, skor 1 berarti kerusakan degenerasi hidropik, skor 2 berarti kerusakan nekrosis, dan skor 3 berarti kerusakan degenerasi hidropik dan nekrosis atau apoptosis. Hasil skoring kemudian dianalisis menggunakan program Jamovi dengan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*, apabila terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

I. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian