

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial atau *Completely Random Design* pola faktorial. Pada penelitian ini digunakan 2 faktor dan 4 kali ulangan. Faktor pertama adalah dosis tepung cacing dari jenis *Lumbricus rubellus* yang terdiri atas 3 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah lama pemberian tepung cacing yang terdiri atas 2 taraf perlakuan. Perlakuan dalam penelitian adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu terdiri atas 6 perlakuan dan 2 kontrol (kontrol positif dan negatif) masing-masing terdiri atas 4 ulangan.

Faktor I adalah dosis tepung cacing, yaitu:

A= dosis 32%

B= dosis 48%

C= dosis 60%

Faktor II adalah lama pemberian tepung cacing, yaitu:

1 = selama 7 hari

2 = selama 14 hari

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan antara Dosis dan Lama Pemberian Tepung Cacing

Dosis(%)	Lama pemberian (hari)
32	7
48	
60	
32	14
48	
60	

### 3.2 Variabel Penelitian

#### 3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ada 2 variabel yaitu variabel A dan variabel B. Variabel A adalah dosis pemberian tepung cacing yang terdiri atas 3 dosis yaitu 32%; 48% dan 60% Variabel B adalah lama pemberian tepung cacing, yaitu 7 dan 14 hari.

#### 3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histologis hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan aktivitas antioksidan yang terinfeksi bakteri *Salmonella typhi*.

#### 3.2.3 Variabel Kontrol / Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague-Dawley jantan umur 2,5 bulan dengan berat badan  $\pm 300$  gram berjumlah 32 ekor.

### 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari sampai dengan Maret 2011.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

Bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella typhi* dengan kepadatan  $8,57 \times 10^5$  dalam 0,5 ml suspensi. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague-Dawley jantan umur 2,5 bulan dengan berat badan  $\pm 300$  gram sebanyak 32 ekor.

### **3.5 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.5.1 Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, *beaker glass*, *micropippet*, pembakar spiritus / bunsen, *incubator*, *autoclave*, oven, *hot plate magnetic stirrer*, jangka sorong, timbangan analitik, jarum *ose*, pinset, spatula, karet gelang, kertas HVS bekas, kapas, kain kasa, gelas ukur, kertas label, gunting, aluminium foil, tissue, spidol permanen, corong kaca, *waterbath*, *mortar*, spatel, kandang hewan coba (bak plastik), kawat, tempat makan dan minum tikus putih, erlenmeyer, gelas ukur, *beacker glass*, kaca pengaduk, kertas saring, timbangan analitik, ayakan tepung, corong kaca, silet, alat pencekok oral (*gavage*), *objek glass*, *deck glass*, *microtome*.

#### **3.5.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Salmonella typhi*, tepung cacing *Lumbricus rubellus*, tikus putih (*Rattus norvegicus*), medium SSA, medium NB,  $\text{BaCl}_2$  1%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, larutan DMSO 10%, aquades steril, alkohol 70%, NaCl fisiologis, spiritus, pakan tikus putih

(pellet), serutan kayu, air PAM, alkohol 70%, aquades, etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 96%), xylene, xilol, seperangkat bahan uji DPPH.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Pembuatan Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*)**

Pembuatan tepung cacing dilakukan dengan menggunakan metode Rukmana (1999) dan Julendra dan Sofyan (2007) yang diadopsi dari Mihara *et al.* (1991) dengan modifikasi. Adapun langkahnya sebagai berikut. Pertama kali dilakukan cacing tanah *Lumbricus rubellus* dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel, kemudian dicuci dengan air mengalir. Sebagian cacing tanah dioven dalam suhu 50°C, selama 8 jam. Cacing tanah dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi tepung cacing kemudian diayak.

#### **3.6.2. Sterilisasi Alat**

Metode sterilisasi adalah sebagai berikut:

##### **a. Sterilisasi Kering**

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas.

- 1) Sterilisasi dengan api langsung, sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk. Sesudah disterilkan peralatan tersebut didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
- 2) Sterilisasi dengan oven pemanas, oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung

reaksi dan pipet. Alat-alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam.

b. Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya sterilisasi medium, gelas ukur, erlenmeyer dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

### **3.6.3. Pembuatan Media dan Pembuatan Biakan Bakteri *Salmonella Typhi***

#### **3.6.3.1 Pembuatan Media NB (*Nutrien Broth*)**

Media NB dibuat berdasarkan aturan yang tertera pada kemasan yaitu sebagai berikut. Sebanyak 18 gram NB dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan dipanaskan dan diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga homogen. Dituang dalam tabung reaksi dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

#### **3.6.3.2 Pembuatan Media SS Agar (*Salmonella-Sigella Agar*) Plate**

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pembuatan medium SS agar plate berdasarkan peraturan pada kemasannya adalah sebagai berikut. Bubuk SSA ditimbang seberat 63 gram dan dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan SSA dipanaskan dan diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga homogen dan didinginkan dalam *waterbath* pada suhu 45-47°C. Diletakkan dalam tabung reaksi masing-masing diisi 10 ml dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

### 3.6.3.3 Pembuatan Larutan Standart McFarland 0,5

Larutan McFarland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara  $1 \times 10^7$  sel/ml -  $1 \times 10^8$  sel/ml (Quelab, 2005). Urutan kerja pembuatan larutan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007) adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,05 ml *Barium Clorida* ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml *Asam Sulfat* ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung.

### 3.6.3.4 Pembuatan Kultur

#### 3.6.3.4.1 Pembuatan Kultur Stok

Bakteri *Salmonella typhi* yang telah diidentifikasi dibiakkan lagi pada medium SSA miring. Diinkubasi dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 x 24 jam. Kultur ini tahan disimpan hingga 3 bulan dalam suhu  $4^\circ\text{C}$  (dalam media NA) (Benson, 2001). Metode ini dapat diulang untuk peremajaan.

#### 3.6.3.4.2 Pembuatan Kultur Kerja (*Suspensi Bakteri Salmonella typhi*)

*Salmonella typhi* dari kultur stok dibiakkan lagi pada medium cair NB (*Nutrien Broth*) dan disimpan dalam inkubator selama 2 x 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah 2 hari dibiakkan, kekeruhan antara *Salmonella typhi* yang dikultur dalam medium cair dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5. Berdasarkan Quelab (2005), 0,5 Mc Farland setara dengan  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  sel/ml). *Salmonella typhi* yang dikultur pada NB diusahakan lebih keruh dibanding larutan standar McFarland 0,5 kemudian dosis dihitung dengan spektrofotometer sampai kepadatan menjadi  $8,57 \times 10^5$  sel/ml) (Fauzia dan Larasati, 2008).

### 3.6.3.4.3 Penentuan Kepadatan Bakteri *Salmonella typhi* serta Lama Penginfeksi yang Diberikan secara Per Oral

Penentuan kepadatan bakteri *Salmonella typhi* adalah dengan membandingkan berat badan tikus putih rata-rata 300 gram dengan berat badan manusia rata-rata 70 kg, kemudian dikalikan kepadatan rata-rata bakteri yang sudah bisa menginfeksi manusia. Maka didapat dihitung dengan  $\frac{300}{70000} \times 10^9 = 4,2 \times 10^5$  bakteri per mililiter. Dengan mempertimbangan kapasitas lambung tikus putih, maka volume diperkecil menjadi 1/2 ml dan kepadatan dikalikan 2 menjadi  $8,57 \times 10^5$  dalam 1/2 ml suspensi bakteri.

Penentuan lama inkubasi bakteri *Salmonella typhi* hingga menimbulkan demam pada tikus putih juga dikalibrasikan dengan masa inkubasi bakteri *Salmonella typhi* pada manusia dengan membandingkan umur tikus putih dengan manusia (diperkirakan umur maksimal manusia 100 tahun, dan tikus putih 3 tahun, masa inkubasi bakteri *Salmonella typhi* hingga menimbulkan demam pada manusia adalah 7 hari ). Maka dihitung dengan hari atau sekitar 34 jam.

### 3.6.3.5 Pengenceran Tepung Cacing (*Lumbricus rubellus*)

Dosis yang digunakan sebesar 32%, 48% dan 60% (w/v) Tepung Cacing dalam larutan DMSO 10%. Dosis ini didasarkan pada penelitian Ratriyani (2000), dimana dosis Tepung Cacing yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro* adalah 32%. Sedangkan pada penelitian yang menggunakan hewan coba (*in vivo*) mungkin potensi antimikroba yang terkandung di dalam tepung cacing akan termodifikasi oleh metabolisme tubuh sehingga dalam penelitian ini dosis dinaikkan dan dibuat variasi seperti yang



tersebut di atas. Pembuatan masing-masing dosis tersebut dilakukan dengan cara pengenceran Tepung Cacing dari dosis 100%.

### **3.6.5 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.6.5.1 Persiapan Hewan Coba**

Tikus putih diaklimatisasi di laboratorium selama 2 minggu, diberi makan dan minum secara ad libitum. kemudian di ambil darahnya untuk dilakukan tes serologis yang pertama (tes widal). Tes tersebut untuk mengetahui status kenormalan tikus (tidak terinfeksi *Salmonella typhi*).

Selanjutnya 24 ekor tikus kelompok perlakuan dan 4 ekor tikus kontrol positif diinfeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan cara dicekoki bakteri dengan kepadatan  $8,57 \times 10^5$  sel/ ml sebanyak 0,5 ml. Setelah 34 jam kemudian tikus diambil darahnya untuk dilakukan tes serologis ke dua (tes widal) untuk mengetahui status antibodi akibat infeksi bakteri *Salmonella typhi*.

#### **3.6.5.2 Penentuan Perlakuan**

Penelitian ini terdiri atas 2 kelompok kontrol (kontrol positif dan negatif) serta 6 kombinasi perlakuan masing-masing 4 kali ulangan. Kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus putih yang terinfeksi *Salmonella typhi* tanpa perlakuan pemberian tepung cacing. Kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus putih yang tidak terinfeksi *Salmonella typhi* dan tanpa perlakuan pemberian tepung cacing. Kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus putih terinfeksi *Salmonella typhi* yang diberi perlakuan pemberian tepung cacing dengan dosis (32%, 48% dan 60%) dan lama pemberian (7 dan 14 hari).



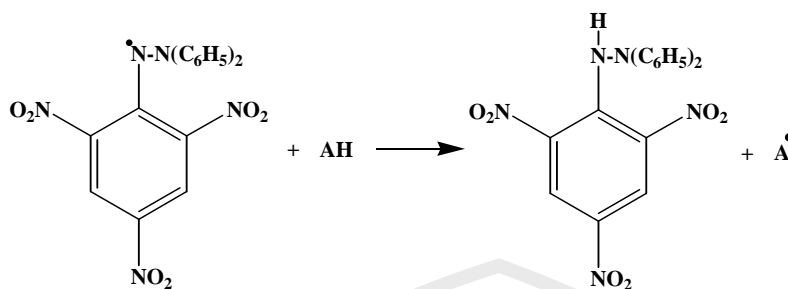
Setelah perlakuan tersebut dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ hepar untuk pembuatan preparat histologis.

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan Tikus putih Percobaan

<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan Lama Pemberian</b>
<b>1</b>	Tikus putih kontrol negatif (tanpa perlakuan)
<b>2</b>	Tikus putih kontrol positif (terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> tanpa pemberian tepung cacing)
<b>3</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 32% selama 7 hari
<b>4</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 48% selama 7 hari
<b>5</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 60% selama 7 hari
<b>6</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 32% selama 14 hari
<b>7</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 48% selama 14 hari
<b>8</b>	Tikus putih terinfeksi <i>Salmonella typhi</i> dengan pemberian tepung cacing dosis 60% selama 14 hari

### 3.6.5.3 Pengujian aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (Hatano, 1988 dan Yeh-Cen 1995) yang mendasarkan prinsip kerjanya pada sampel (mengandung senyawa bersifat antioksidan) yang dapat meredam radikal bebas (DPPH). Mekanisme reaksi metode DPPH adalah sebagai berikut :



### Antioksidan

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil      1,1-Difenil-2-picrilhidrazin

Sampel (serum) dilarutkan dalam pelarut methanol, dengan dosis tertentu (larutan stok). Dibuat dosis pengujian dari larutan stok dengan pengenceran oleh methanol. Ditambahkan larutan DPPH (sebagai sumber radikal bebas) 1mM dalam methanol sebanyak 1 ml, dimasukkan dalam vial kocok (divorteks) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian dibaca serapan aktivitasnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 317 nm. Aktivitas peredaman dinyatakan sebagai IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration / dosis sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50 % DPPH). Dari nilai absorbansi sampel pada dosis diperoleh persentase penghambatan (inhibisi).

#### 3.6.5.4 Pembuatan Preparat Organ

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai *objec glass* yang akan digunakan dengan kikir kaca pada bagian tepi, kemudian direndam dalam alkohol 70% minimal semalam. Kemudian *objec glass* dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatine 0,5% selama

30-40 detik/slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan hingga gelatine yang melapisi kaca dapat merata.

2. Tahap kedua, organ yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu alkohol 90%, 95%, ethanol absolut (100%) 3 kali, xylol 3 kali, masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga, adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan parafin sebanyak 3 kali selama 30 menit.
4. Tahap keempat, *embedding*. Bahan beserta parafin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap di dekat bahan. Blok parafin dibiarkan semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga blok benar-benar keras.
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipasang dan ditempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Organ hepar dipotong dengan ukuran  $\mu\text{m}$ , kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan *objec glass* yang sudah dicoating kemudian dikeringkan di atas *hotplate*.

6. Tahap diparafisasi, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak dua kali lima menit.
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan ethanol bertingkat mulai dari ethanol absolut (2 kali), ethanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hemathoxylin* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit, setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama lima menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam ethanol bertingkat 80%, 90%, 95%, dan ethanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing*, dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit kemudian dikeringkan. Tahap *mounting*, dengan etilen.
11. Hasil akhir diamati dibawah mikroskop. Untuk organ hepar setiap ekor tikus dibuat 1 preparat dengan 3 bidang pandang pengamatan, dipotret kemudian dicatat data skor kerusakan masing-masing organ.

### 3.7 Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung cacing *Lumbricus rubellus*, terhadap gambaran histologis organ hepar *Rattus novergicus* yang terinfeksi *Salmonella typhi*, dilakukan melalui penghitungan tingkat kerusakan organ. Dari setiap tikus dibuat 1 preparat jaringan hepar. Preparat dibaca di bawah

mikroskop dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang, tiap lapang pandang diamati sisi kiri, bagian atas, bagian bawah, bagian samping kiri dan kanan dan bagian tengah (vena sentralis), kemudian dihitung sebanyak 20 sel hepatosit di sekitar vena sentralis, serta kondisi vena sentralis maupun sinusoid di sekitar vena sentralis.

Dalam setiap preparat diambil data dari 5 lapang pandang sesuai tingkat kerusakan pada setiap ulangan, kemudian dijumlah data tersebut dan diakumulasikan dengan skor tingkat kerusakan sesuai kategorinya menggunakan kriteria *Manja Roenigk* yang dapat dilihat pada tabel 1. Data yang sudah diakumulasikan dengan skor penilaian kemudian dijumlah dan dihitung reratanya, sehingga didapatkan nilai untuk 1 ulangan dalam setiap perlakuan.

Tabel 3.3 Skor penilaian tingkat kerusakan hepatosit kriteria *Manja Roenigk*

Tingkat Kerusakan	Skor
➤ Normal	1
➤ Degenerasi Parenkimatosa	2
➤ Degenerasi Hidropik	3
➤ Nekrosis (sel piknotik, karioeksis, kariolisis)	4
Peradangan Vena Sentralis dan Pelebaran sinusoid	

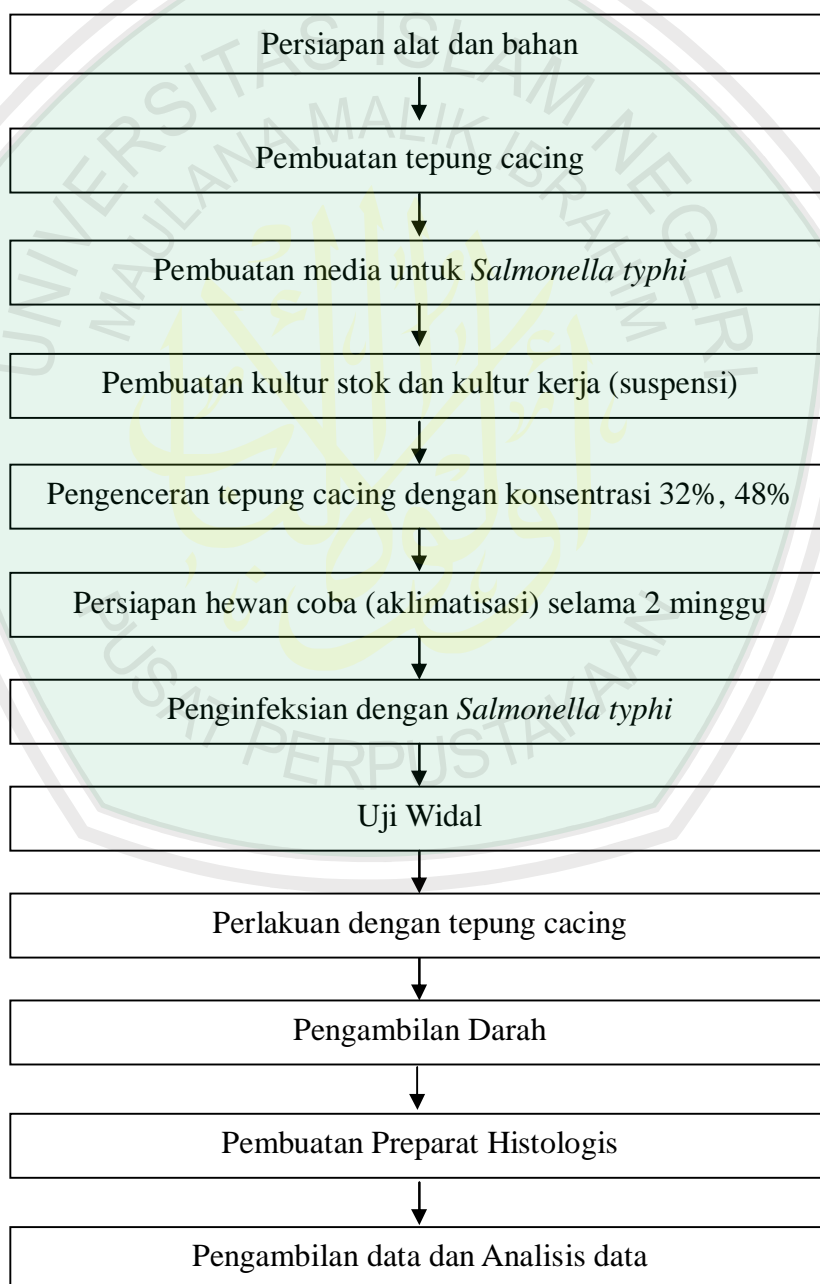
Nilai yang diperoleh dari 4 ulangan pada semua perlakuan dijumlah dan dihitung reratanya (ditabulasi). Kemudian data yang diperoleh, dianalisis menggunakan Uji ANOVA (*Analysis Of Variance*) dua arah. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan Uji BNT dengan taraf signifikansi 1%.

Sedangkan untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung *Lumbricus rubellus* terhadap aktivitas antioksidan *Rattus norvegicus* yang terinfeksi

*Salmonella typhi*, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan Uji ANOVA (*Analysis Of Variance*) dua arah. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan uji lanjut BNJ 1%.

### 3.8 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

Diagram alir pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian