

BAB IV METODELOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus - September 2016 di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang untuk pemeliharaan, pemeriksaan kadar MDA di Laboratorium Biomedik, pemeriksaan histopatologi jaringan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, cawan petri, labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), pengaduk kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, corong gelas, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), mikro tube, eppendorf, penangas air, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, pisau mitokrom, neraca analitik, tabung polipropilen, oven, seperangkat alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), spektrofotometri UV-VIS, mikroskop cahaya (Nikon), *autoclave*, obyek glass, *cover glass*, timbangan, alat sonde, plastik klip, pot organ, binder *clips*, kertas label, spidol marker, spuit tuberculin, botol larutan, masker, *tissue*, glove.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), makanan dan minuman hewan coba, daun sawo manila, bakteri *E.coli*, ethanol absolut 96%, aquades steril, Alkohol 96%, PBS-azida pH 7,4, Buffer Formalin 10%, TCA100%, HCL, Na-Thio 1%, NaCl 0,9%, minyak emersi, *Hematoxylen-Eosin*, Alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%), etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, parafin.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) 5-6 minggu, berjenis kelamin jantan dan berat badan antara 120 - 130 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Hewan coba harus memiliki kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh Komisi Etik Penelitian No: 599-KEP-UB, dan belum pernah digunakan penelitian. Daun sawo manila (*Manilkara zapotta*) yang diberikan untuk terapi diperoleh dari Desa Rogojampi, Kecamatan Rogojampi, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. Diambil daun yang tua agar tidak mengurangi kadar flavonoid dan tanin yang akan digunakan sebagai bahan aktif terapi.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan *post test control only* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (sehat) tanpa perlakuan, kelompok positif dengan induksi *E. coli*, kelompok terapi ekstrak etanol daun sawo dengan dosis 200 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB (Tabel 4.1). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri atas 5 pengulangan.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut, didapatkan bahwa jika perlakuan sebanyak 5 kelompok perlakuan dan jumlah pengulangan minimal sebanyak 4 kali, maka jumlah hewan coba yang dibutuhkan adalah 20 tikus putih.

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
P1 (Kontrol negatif)	Kelompok tikus tanpa diberi perlakuan induksi <i>E. coli</i> dan terapi ekstrak etanol daun sawo sebagai control negatif.
P2 (Kontrol positif)	Kelompok tikus yang diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml per ekor per hari selama 7 hari dengan cara sonde lambung dan tanpa diberi ekstrak etanol daun sawo.
P3	Perlakuan tikus yang diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml per ekor per hari selama 7 hari dan diberi ekstrak etanol daun sawo dosis 200 mg/kg BB selama 8 hari dengan cara sonde lambung.
P4	Perlakuan tikus yang diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml per ekor per hari selama 7 hari dan diberi ekstrak etanol daun sawo dosis 300 mg/kg BB selama 8 hari dengan cara sonde lambung.
P5	Perlakuan tikus yang diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml per ekor per hari selama 7 hari dan diberi ekstrak etanol daun sawo dosis 400 mg/kg BB selama 8 hari dengan cara sonde lambung.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis ekstrak daun Sawo manila dan *E. coli*

Variabel tergantung : Kadar MDA dan histopatologi kolon

Variabel kendali : Homogenitas tikus (berat badan, umur dan jenis kelamin), pakan dan kondisi kandang

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih *Rattus norvegicus* jantan sehat umur 5-6 minggu dengan berat badan berkisar 120-130 gram (Astawan dkk, 2011). Tikus diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Kemudian tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok perlakuan terdiri atas 4 ekor tikus.

Tikus ditempatkan dalam bak plastik bertutup kawat dengan ukuran 30x50x10 cm, alas berupa sekam padi agar kandang tidak terlalu lembab. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri maupun polutan lainnya. Semua tikus diberi pakan secara teratur dan minum secara *ad libitum*.

4.6.2 Pembuatan Model Hewan Coba Gastroenteritis

A) Isolasi dan Identifikasi *E. coli*

E. coli selektif didapatkan dari pasien FK UB yang mengalami diare, diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi. Uji keberadaan bakteri *E. coli*, yaitu dengan menyiapkan suspensi, cawan petri dan media EMBA, suspensi ditanamkan pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) secara aseptik dengan menggunakan jarum inokulasi. Koloni bakteri *E. coli* tumbuh berwarna kehijauan dengan kilat metalik atau koloni berwarna merah muda dengan lendir untuk kelompok koliform lain seperti *Staphylococcus sp.*

B) Pembuatan Suspensi Bakteri (10^6 CFU/ml)

Koloni dengan karakteristik sama diambil dari lempeng medium NAP, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*. Tabung reaksi lalu diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Perbenihan bakteri dari *Nutrient Broth* dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 610 nm. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5 atau 150×10^8 CFU/ml) maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = Optical Density (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Suspensi bakteri diencerkan 10^{-2} untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml, caranya:

Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl

sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

C) Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis

Suspensi *E. coli* 10^6 CFU/ml (1 ml/hari dosis tunggal) diberikan pada masing-masing tikus kelompok P2, P3, P4 dan P5 setiap hari selama 7 hari dengan cara sonde lambung (Astawan dkk., 2011).

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun Sawo Manila (*Manilkara zapotta*)

A. Persiapan Tanaman

Daun sawo dicuci bersih dan dihilangkan kotorannya. Kemudian dijemur dibawah sinar matahari dan ditutupi kain hitam. Tujuan dari pengeringan yaitu untuk menghilangkan kandungan air yang ada di dalam daun untuk mencegah terjadinya pertumbuhan bakteri atau jamur. Penutupan dengan kain hitam dilakukan dengan tujuan melindungi zat aktif yang ada di dalam daun (Hermawan, 2014).

Selanjutnya dilakukan proses penyerbukan yaitu membuat daun sawo menjadi partikel yang lebih kecil, dengan cara diblender. Tujuan penyerbukan ini adalah untuk memperluas permukaan sehingga memudahkan masuknya cairan penyari ke dalam sel-sel daun dan terjadi perpindahan zat aktif dari serbuk ke dalam cairan penyari (Hermawan, 2014).

B. Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan etanol 96%. Metode maserasi ini dipilih karena cara pengerjaan yang digunakan sederhana dan alat yang digunakan mudah, serta tidak perlu pengawasan intensif. Sedangkan etanol 96% dipilih karena etanol berfungsi memperbaiki stabilitas zat aktif yang terlarut serta membuat zat aktif yang tersari menjadi lebih banyak. Etanol merupakan salah satu pelarut senyawa polar yang biasa digunakan untuk melarutkan flavonoid. Etanol dapat mencegah terjadinya oksidasi enzim atau hidrolisis pada tanaman. Etanol tidak beracun, netral, absorbansinya baik dan membutuhkan panas yang relatif sedikit untuk pemekatan (Hermawan, 2014).

Maserasi merupakan cara penyari yang sederhana dimana bahan yang sudah halus kemudian direndam dalam cairan penyari hingga masuk ke dalam sel dan melunakkan susunan sel, sehingga zat aktif akan terlarut. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk daun sawo manila dalam etanol 96%. Etanol 96% akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena ada perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Peristiwa tersebut terjadi secara berulang-ulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Wijaya, 2009).

Serbuk sebanyak 500 gram direndam dengan menggunakan 2 L etanol 96% selama 24 jam. Hasil maserasi menghasilkan filtrat dan residu

berwarna hijau kehitaman selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring. Pada saat proses maserasi, sesekali dilakukan pengadukan. Pengadukan bertujuan untuk meratakan larutan di luar serbuk sampel sehingga derajat perbedaan kadar antara zat dalam sel dan di luar sel dapat dibuat sekecil mungkin. Ekstrak yang diperoleh akan turun ke dasar bejana karena meningkatnya gaya berat cairan yang disebabkan banyaknya ekstrak. Proses ini berulang secara siklis sampai semua ekstrak dipisahkan dari ampas oleh etanol 96%. Residu yang dihasilkan dari maserasi pertama kemudian dimaserasi lagi selama 24 jam dengan etanol 96% sebanyak 1 L, selanjutnya disaring. Residu terakhir yang dihasilkan direndam kembali dengan 1 L etanol 96% selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan dari ketiga proses maserasi kemudian dikumpulkan menjadi satu. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 90⁰C, penguapan dilakukan sampai larutan menjadi kental (Wijaya, 2009). Ekstrak kental bebas pelarut yang diperoleh sebanyak 70 ml.

4.6.4 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sawo pada Tikus yang Telah Diinduksi *E. coli*

Pemberian ekstrak etanol daun sawo pada tikus yang telah diinduksi *E. coli* patogen selama 7 hari (Modifikasi Islam dkk., 2012; Astawan dkk., 2011). Ekstrak etanol daun sawo diberikan pada kelompok P3 dengan dosis 200 mg/kg BB, kelompok P4 dengan dosis 300 mg/kg BB dan kelompok P5 dengan dosis

400 mg/kg BB. Ekstrak etanol daun sawo diberikan satu kali sehari sebanyak 1 ml setiap pagi dengan cara sonde lambung.

4.6.5 Isolasi Kolon

Pengambilan organ kolon pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-24 setelah seluruh proses adaptasi tikus, induksi *E. coli*, dan pemberian terapi ekstrak etanol daun sawo selesai. Pada pengambilan organ proses pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher. Kemudian tikus ditelentangkan pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut. Bagian organ kolon diambil dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%. Selanjutnya kolon dimasukkan ke dalam larutan Buffer formalin 10% (Permata, 2015).

4.7 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji Thiobarbituric Acid (TBA)

Organ kolon dari masing-masing kelompok diambil sebanyak 0,5 gram dipotong kecil-kecil lalu digerus dengan menggunakan mortar dingin. Kemudian ditambahkan 1 mL NaCl 0,9%. Homogenat yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung microtube dan disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 8000 rpm, setelah itu diambil supernatannya sebanyak 100 μ L. Supernatan kolon ditambah 550 μ L akuades dan dihomogenkan dengan vortex. Lalu ditambahkan 100 μ L TCA dan dihomogenkan dengan vortex. Ditambahkan 250 μ L HCl 1N dan dihomogenkan dengan vortex. Ditambahkan 100 μ L Na-Thio dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan dipindahkan pada microtube baru. Selanjutnya larutan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 100°C selama 30

menit kemudian dibiarkan pada suhu ruang. Sampel diukur absorbansinya pada λ max untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar MDA yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Shofia, 2012).

4.8 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Kolon

Proses pembuatan preparat histologi kolon terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, deparafinasi, rehidrasi, pewarnaan, dehidrasi, *clearing* dan *mounting* (Junquiera and Carnerio, 2005). Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ kolon dalam Buffer formalin 10% agar struktur jaringan tidak rusak. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai.

Langkah selanjutnya adalah dehidrasi, dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90% dan 90% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya adalah tahap penjernihan organ (*clearing*) dilakukan dengan mulai pemindahan jaringan ke larutan penjernihan, yaitu xylol (1 jam), xylol II, dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Tahap selanjutnya adalah *embedding*, dimana organ dimasukkan ke dalam perafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan pemblokkan dengan parafin blok yang berukuran sesuai dengan

tempat blok *microtome*. *Embedding* berfungsi agar organ lebih padat. Blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 μm dan direndam pada *water bath* dengan suhu 38 - 40°C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Kemudian irisan yang didapat diletakan pada *object glass*. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37 - 38°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk, 2013).

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan tahapan deparanifasi yaitu dengan memasukan preparat ke dalam xylol bertingkat I – III masing-masing selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk menghilangkan atau melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, dilakukan tahapan rehidrasi, yaitu preparat dimasukan dalam alkohol, mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan pewarnaan yang dimasukan dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna pada inti sel atau nukleus. Selanjutnya dicuci dengan aquades selama 5 menit, dibilas dengan aquades dan dimasukan ke dalam pewarna eosin selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya, preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna eosin yang masih menempel.

Tahapan selanjutnya adalah dilakukan dehidrasi dengan memasukan preparat ke dalam alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90%, dan 95% yang

bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Kemudian dilakukan *clearing* dengan memasukan preparat pada xylol I – II dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan *mounting* dengan menggunakan *entellan* (Jusuf, 2009).

4.8.1 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi kolon dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi kolon yang diamati adalah lapisan mukosa serta tanda-tanda terjadinya inflamasi seperti edema, adanya infiltrasi sel radang dan kerusakan mukosa serta epitel (Wresdiyati dkk, 2013).

4.9 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi organ kolon dan analisa kuantitatif untuk MDA yang dilakukan dengan uji ANOVA *one way* dan apabila terdapat pengaruh perlakuan nyata, maka perbedaan nilai tengah diuji dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 0.05$.