

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2016 – Juni 2016 di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB, Laboratorium Mikrobiologi FKH UB, dan Laboratorium Farmakologi FK UMM, Laboratorium Fisiologi Anatomi FK UB, dan Laboratorium Kesima Medika Malang.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat *True Experimental* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang telah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 508-KEP-UB (Lampiran 1). Berat badan tikus antara 150-250 gram dan berumur 8-12 minggu. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer dalam Prasetyo, dkk (2006), sebagai berikut:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan, untuk 5 macam kelompok perlakuan dibutuhkan jumlah ulangan minimal empat kali setiap kelompok, sehingga dalam penelitian ini tikus putih yang diperlukan sejumlah 20 ekor. Tikus putih dibagi menjadi lima kelompok yang mendapat perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1: Tikus putih sehat tanpa perlakuan. (Kontrol negatif).
2. Kelompok 2: Tikus putih diinfeksi *Salmonella enteritidis* 1 kali pemberian per oral pada hari ke 15 dosis 1 mL x 10^8 cfu/mL/ekor (Kontrol positif).
3. Kelompok 3: Tikus putih diberi VCO fermentasi *L. casei* dengan dosis 3,4 ml/Kg BB selama 7 hari dan diinfeksi *Salmonella enteritidis* 1 kali pemberian per oral dengan dosis 1 mL x 10^8 cfu/mL/ekor.
4. Kelompok 4: Tikus putih diberi VCO fermentasi *L. casei* dengan dosis 6,7 ml/Kg BB selama 7 hari dan diinfeksi *Salmonella enteritidis* 1 kali pemberian per oral dengan dosis 1 mL x 10^8 cfu/mL/ekor.
5. Kelompok 5: Tikus putih diberi VCO fermentasi *L. casei* dengan dosis 10 ml/Kg BB selama 7 hari dan diinfeksi *Salmonella enteritidis* 1 kali pemberian per oral dengan dosis 1 mL x 10^8 cfu/mL/ekor.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas: Dosis VCO fermentasi *L. casei* dan dosis infeksi *Salmonella enteritidis*
2. Variabel tergantung: Ekspresi TNF- α dan histopatologi jejunum.

3. Variabel kontrol: Homogenitas tikus putih (*Rattus novergicus*) yang meliputi strain, jenis kelamin, umur, berat badan, pemberian pakan, kondisi kandang, cara pemberian VCO, dan cara infeksi bakteri.

4.4 Instrumen Penelitian

4.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus, tempat pakan, tempat minum, *disposable syringe* (1 mL dan 5 mL), timbangan tikus, termometer, sonde, *autoclave*, *object glass*, inkubator, mikropipet, ose bulat, ose lurus, pembakar bunsen, *petri dish*, korek api, tabung reaksi, tabung *erlenmeyer*, *hand glove*, masker, *Laminar Air Flow* (LAF), gelas ukur, *rotary evaporator*, seperangkat alat bedah, gunting, *coverglass*, objek glass, *beaker glass*, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), dan lemari pendingin.

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar, desinfektan, pakan pellet, air, *Nutrient Broth* (NB), standar Mc. Farland 0,5 dan bakteri *Salmonella enteritidis*, organ jejunum, NaCl fisiologis 0,9%, *Paraformaldehyde* (PFA) 10%, *Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4, *antibodi primer* (Rat Anti TNF- α), *Antibodi sekunder* berlabel *biotin* (*goat anti rat biotin labeled*), SA-HRP (*Strepta avidin-Horseradish Peroxidase*), *xylol*, *paraffin*, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, pewarna histologi *Hematoksilin-Eosin* (HE) dan pakan SP(standar).

4.5 Tahapan penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari bertujuan agar hewan coba dapat menyesuaikan dengan lingkungannya yang baru. Tikus putih dikandangkan dalam kandang berukuran 17,5 x 23,75 cm yang terbuat dari bahan plastik dengan alas menggunakan sekam. Tikus putih diletakkan pada lingkungan yang tenang bebas dari polutan dan suara yang bising. Lingkungan kandang dilengkapi dengan ventilasi udara yang baik. Temperatur ruangan optimum untuk tikus adalah 22-24°C dengan kelembaban udara 50-60%. Pemberian pakan berupa pelet dan air minum *adlibitum*. Pakan tikus yang diberikan berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2005), yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%.

4.5.2 Pembuatan Sediaan VCO Fermentasi *L. casei*

Berdasarkan teknik pembuatan VCO fermentasi oleh Rahmadi dkk. (2013), dibutuhkan kelapa tua sebanyak empat buah. Kelapa dikupas dan diambil daging buahnya. Selanjutnya kelapa diparut dan direndam dalam air matang (1:2, b/v) bersuhu hangat (50°C), kemudian dicampur selama 30 menit sebelum disaring. Santan yang diperoleh dari hasil saringan didiamkan selama 1 jam, sehingga santan (di bagian atas campuran) terpisah dengan air (di bagian bawah). Kelapa santan (250 ml) dimasukkan di dalam gelas baker selanjutnya kelapa santan ditambahkan 2% *Lactobacillus casei* yang telah disiapkan pada medium susu skim 11%. Bakteri *Lactobacillus casei* didapatkan dari koleksi Fakultas

Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. *Lactobacillus casei* dengan konsentrasi 10^8 cfu/ml dibuat dengan menginokulasikan *Lactobacillus casei* dari media *De Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) sebanyak kurang lebih 2 ose kedalam susu skim 11%, kemudian di fermentasi selama 2 hari pada suhu 37°C . Gelas Baker ditutup dengan aluminium foil hingga rapat dan didiamkan pada suhu 25°C selama 24 jam. Hasil fermentasi akan membentuk tiga lapisan, lapisan pertama adalah blondo, lapisan kedua adalah VCO dan lapisan ketiga adalah air. Virgin Coconut Oil (VCO) yang berada di lapisan tengah dari campuran dipisahkan dengan menggunakan selang secara perlahan. Minyak kelapa fermentasi yang didapatkan diambil sesuai dosis perlakuan untuk diberikan kepada tikus secara per oral dengan cara disonde.

4.5.3 Preparasi Bakteri *Salmonella enteritidis*

Preparasi bakteri *Salmonella enteritidis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Bakteri *Salmonella sp* didapatkan dari UPT Laboratorium Kesehatan Hewan Malang berupa biakan murni, yang memiliki sertifikat dari Thermo Scientific dengan nama produk: *S. enterica sv Enteritidis ATCC13076 PK/5* (lampiran 2). Bakteri selanjutnya ditanam pada media *Xylose lysine deoxycholate (XLD)* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri *Salmonella enteritidis* yang hidup pada media XLD di inokulasikan di media *Nutrient Broth (NB)* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Perhitungan jumlah koloni disesuaikan kekeruhannya dengan media standar Mc Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) (Korber *et al.*, 2008).

4.5.4 Preparasi Organ Jejunum

Pengambilan organ jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) semua kelompok dilakukan pada hari ke 19. Tikus putih didislokasi pada bagian servikal, selanjutnya tikus dilakukan pembedahan. Tikus diposisikan diatas papan bedah dengan posisi terlentang, rambut dibagian perut dicukur dan dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen menggunakan gunting bengkok. Jejunum diambil, diisolasi dan dipotong, kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam larutan *Paraformaldehyd* (PFA) 10% untuk pembuatan preparat.

4.5.5 Pengukuran Ekspresi TNF- α Organ Jejunum

Pengukuran ekspresi TNF- α menggunakan uji Imunohistokimia. Pertama dilakukan pembuatan preparat histologi, tahapan pembuatan preparat histologi meliputi fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan pada gelas objek. Langkah-langkah uji Imunohistokimia pertama diawali dengan persiapan alat dan bahan serta mempersiapkan organ yang akan diamati, direndam dalam *xylol* I, *xylol* II lalu di *alkhohol* bertingkat 100%, 90%, 80%, 70%, selanjutnya direndam dalam *akuades* selama 1x5 menit, Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan 3% hidrogen peroksida (dalam *dionize water*) selama 20 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit dan diblok dengan menggunakan BSA 1% dalam PBS pH 7,4 selama 30 menit dengan suhu ruang. Proses selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan *antibodi primer* (*Rat Anti TNF- α*) perbandingan 1:100, selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan

pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Berikutnya ditambahkan *Antibodi sekunder* berlabel *biotin (goat anti rat biotin labeled)* dengan perbandingan 2497,5: 2,5 selama 1 jam suhu ruang, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

Preparat kemudian ditambahkan SA-HRP (*Strepta avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 40 menit suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit, selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Hematoxylen* selama 5 menit dalam suhu ruang, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir *dimounting* dengan *entellan*, dilanjutkan pengamatan dengan mikroskop pembesaran 400 kali (Calnek, 1997). Untuk ekspresi TNF- α dilakukan pengamatan 5 bidang pandang menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Pada preparat hasil uji IHK akan terlihat reaksi warna histokimia, berupa warna cokelat yang menunjukkan ekspresi TNF- α . Kemudian dilakukan penilaian rata-rata presentase area dengan menggunakan program *Immunoratio*.

4.5.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum

Tahapan pembuatan preparat histologi meliputi fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan pada gelas objek. Pewarnaan Hematoksilin – Eosin diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II, dan III masing – masing selama 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing – masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan

dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing – masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I, II, dan III masing – masing 2 menit. Setelah itu dilakukan proses clearing dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup.

Preparat yang telah diwarnai selanjutnya diamati dibawah mikroskop Olympus BX 51. Pengamatan ini dilakukan mulai dari perbesaran 400x untuk mengetahui kerusakan epitel pada vili.

4.5.7 Analisis Data

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan histopatologi jejunum. Analisa data dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif yang digunakan yaitu analisis ekspresi TNF- α menggunakan uji *one way* ANOVA dengan taraf kepercayaan $\alpha = 0,05$. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan uji *Tukey* $\alpha = 5\%$. Data kualitatif yang digunakan yaitu gambaran histopatologi jejunum yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif untuk melihat perubahan epitel pada vili menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x.