

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan di Rumah Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat pemeliharaan awal (*aklimasi*) dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat penyiapan suspensi *Escherichia coli* dan penghitungan jumlah *E. coli* pada hepar. Laboratorium Biokimia Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat pembuatan ekstrak teripang. Laboratorium Histologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat pembuatan sediaan hepar. Tempat Praktikum Bersama (TPB) bagian Biologi Dasar sebagai tempat pengamatan sediaan hepar (penghitungan luasan area radang).

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Hewan coba

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain Swiss Webster umur 2,5 – 3 bulan dengan berat badan rata-rata 20 – 40 gram. Hewan coba tersebut didapatkan dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2.2. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak teripang lokal *Paracaudina australis*, *Phyllophorus sp.* dan *Colochirus quadrangularis*, CMC (Carboxy Methyl Cellulose) 0,5%, akuades, NaCl 0,9%, suspensi *E. coli*; buffered formalin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut; xylol, paraffin, Mayer's albumin, entellan, hematoxylin, eosin, EMB (Eosin Methylene Blue), NB (Natrium Broth).

Berikut adalah deskripsi untuk masing-masing jenis teripang yang didapatkan dari Pantai Timur Surabaya. *Paracaudina australis* memiliki bentuk tubuh silindris, permukaannya licin dan tipis. Panjang tubuh 10 – 15 cm dengan tentakel pada salah satu ujungnya dan anus pada ujung lainnya. *Phyllophorus sp.* memiliki bentuk tubuh membulat dengan ukuran tubuh kira-kira 7 cm, berwarna krem kecoklatan. Kulit tubuh keras dan tebal, serta kasar karena terdapat papulae (filamen kecil) di seluruh bagian tubuhnya. *Colochirus quadrangularis* memiliki tubuh berwarna jingga kemerahan dengan panjang tubuh 8 – 11 cm. Kulitnya keras dan terdapat tonjolan-tonjolan kaki tabung, serta tampak garis gelap sepanjang tubuhnya.

3.2.3. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *disposable syringe* 1cc, jarum berpelindung logam, botol-botol vial, bak dan alat bedah, kapas, timbangan analitik, timbangan digital, tabung reaksi dan raknya, mortar dan penggerusnya, cawan *Petri*, *autoclave*, *freeze dryer*, blender, tabung *erlenmeyer*, gelas ukur, *beaker*

glass, rotary vacuum evaporator, jarum pentul, pengaduk, mikroskop, object glass, cover glass, paraffin bath, mikrotom, vortex, staining jar, colony counter, mikroskop yang dilengkapi dengan Graticulae.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap aklimasi hewan coba

Hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan strain *Swiss Webster* sebanyak 12 ekor dibagi menjadi 4 kelompok, diaklimasi terlebih dahulu selama 2 minggu. Setiap 3 ekor mencit ditempatkan dalam sebuah bak plastik beralaskan sekam dilengkapi dengan kawat kasa penutup, botol minum berisi air bersih dari PDAM dan diberi pakan berupa pelet. Pengelompokkan mencit seperti pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kelompok perlakuan hewan coba

Kelompok Perlakuan	Jenis Perlakuan
Kontrol	Akuades + CMC (<i>gavage</i>); injeksi Intra Peritoneal <i>E. Coli</i>
T1	Akuades + CMC + Sp1 (<i>gavage</i>); injeksi IP <i>E. Coli</i>
T2	Akuades + CMC + Sp2 (<i>gavage</i>); injeksi IP <i>E. Coli</i>
T3	Akuades + CMC + Sp3 (<i>gavage</i>); injeksi IP <i>E. Coli</i>

Keterangan: Sp1 = Ekstrak teripang spesies 1 (*Paracaudina australis*)
 Sp2 = Ekstrak teripang spesies 2 (*Phyllophorus sp.*)
 Sp3 = Ekstrak teripang spesies 3 (*Colochirus quadrangularis*)
 CMC = Carboxy Methyl Cellulosa

3.3.2. Tahap pembuatan ekstrak teripang

Paracaudina australis, *Phyllophorus sp.* dan *Colochirus quadrangularis* didapatkan dari daerah Kenjeran Surabaya. Teripang-teripang tersebut dicuci dengan air hingga bersih serta dibersihkan juga bagian-bagian dalamnya. Setelah itu, diiris-iris tipis kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* (suhu -46°C dan tekanan 5 mTorr) agar menjadi benar-benar kering. Setelah kering, irisan-irisan teripang dihaluskan dengan menggunakan *blender*, kemudian serbuk teripang tersebut diekstraksi di dalam etanol 70% dengan metode maserasi selama 1-2 hari pada *shaker*, selanjutnya difiltrasi dan dievaporasi menggunakan *rotary vacum evaporator*.

3.3.3. Tahap penyiapan larutan ekstrak teripang

Ekstrak teripang masing-masing dilarutkan ke dalam pelarut CMC 0,5%. Dosis ekstrak diperoleh dengan mempertimbangkan faktor konversi berat kering ke berat ekstrak yang dihasilkan yaitu 0,0548 g berat kering/ 20 g BB mencit. Penentuan dosis ini berdasarkan dari Aminin *et al.* (2008) dan Dong *et al.* (2008) sehingga diperoleh dosis pemberian untuk ekstrak teripang *Paracaudina australis* adalah 0,00235 g/ 20 g BB mencit, ekstrak *Phyllophorus sp.* 0,00176078 g/ 20 g BB mencit dan ekstrak *Colochirus quadrangularis* adalah 0,0020334 g/ 20 g BB mencit.

3.3.4. Tahap penyiapan suspensi *Escherichia coli*

Biakan *Escherichia coli* dari agar miring diambil satu ose dan dilarutkan dalam media NB (*Natrium Broth*) sebanyak 25 ml, kemudian diinkubasi pada suhu

37⁰C selama 24 jam. Setelah itu, biakan ditanam pada media agar EMB (*Eosin Methylene Blue*) dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (koloni *E. coli* berwarna hijau metalik pada media EMB). Kemudian diambil satu ose dari isolat, dimasukkan ke dalam larutan fisiologis dan kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* untuk mendapatkan suspensi yang benar-benar homogen. Selanjutnya diukur dan diencerkan sampai mendapatkan OD yang setara dengan jumlah bakteri 3×10^8 *E. coli*/ml.

3.3.5. Tahap perlakuan pada hewan coba

Hewan coba mulai diberi perlakuan pada umur 2,5 – 3 bulan yaitu dengan memberi ekstrak teripang dalam 10 ml larutan CMC 5% setiap hari selama 14 hari sekitar pukul 15.00 – 18.00. Banyaknya komposisi masing-masing teripang adalah *Paracaudina australis* sebanyak 0,094 g, *Phyllophorus sp.* sebanyak 0,0704 g dan *Colochirus quadrangularis* sebanyak 0,0814 g. Pemberian ekstrak dilakukan secara *gavage* sebanyak 0,5 ml untuk setiap hewan coba. Selama 14 hari tersebut juga dilakukan pengukuran berat badan mencit pada hari ke-1, hari ke-4, hari ke-7, hari ke-10, hari ke-13 dengan menggunakan timbangan *digital*.

3.3.6. Tahap injeksi *Escherichia coli* pada hewan coba dan penentuan jumlah *Escherichia coli* yang bermigrasi ke hepar

Injeksi bakteri *Escherichia coli* pada hewan coba dilakukan pada hari ke-15 secara intraperitoneal. Hewan coba tersebut kemudian dikorbankan pada hari ke-18.

Penentuan jumlah *E. coli* yang bermigrasi ke hepar dilakukan dengan cara menggerus organ hepar, yang kemudian melakukan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-3} . Setelah itu, menuangkannya 1 ml ke dalam media EMB dalam cawan *Petri*, menghomogenkan dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian menghitungnya dengan metode TPC (*Total Plate Count*) menggunakan *colony counter*, kemudian jumlah koloni terhitung dikalikan dengan faktor pengencerannya. Satuan yang digunakan dari hasil perhitungan adalah jumlah organisme per mg biakan atau sampel (cfu/mg)

3.3.7. Tahap pembuatan sediaan hepar

Pembuatan sediaan hepatosit mencit melalui beberapa tahap, yaitu:

1. Tahap pencucian (*washing*) dan *processing*

Organ *hepar* yang telah difiksasi dimasukkan ke dalam wadah (kaset) untuk dicuci dengan air mengalir selama semalam (*over night*). Kemudian esoknya dilakukan *processing* yaitu mula-mula dilakukan dehidrasi dengan cara merendam organ *hepar* pada alkohol bertingkat yaitu 4 x alkohol 70%, 2 x alkohol 80%, 1 x alkohol 96% yang masing-masing selama 30 menit. Selanjutnya melakukan proses pembedahan dengan merendam ke dalam xylol I selama 15 menit dan pada xylol II sebagai *stopping point* selama *over night*.

2. Tahap infiltrasi dan penanaman (*embedding*)

Tahap infiltrasi ini dilakukan dengan menggunakan *paraffin bath* yaitu dengan organ *hepar* ke dalam *paraffin bath* yang berisi parafin, yaitu parafin:xylol

(1:1) selama 30 menit, kemudian parafin I; parafin II; parafin III masing-masing selama 60 menit. Setelah dari tahap parafin III, organ hepar ditanam (*embedding*) dalam blok-blok parafin.

3. Tahap pemotongan (*sectioning*) dan penempelan (*afixing*)

Tahap *sectioning* ini dilakukan dengan merekatkan blok parafin pada balok kayu kemudian memasangkannya pada *mikrotom* bagian *holder* dan men-*setting* irisan potongan setebal 4 μ m. Selanjutnya memotongnya secara teratur hingga terbentuk pita-pita yang siap untuk direkatkan pada *object glass*. Kemudian, sebelum ditempelkan pada *object glass*, memasukkan potongan pita parafin tersebut dalam *waterbath* dan mengolesi *object glass* dengan *Mayer's albumin* pada permukaan yang akan ditempeli pita parafin. Kemudian mengambil pita-pita parafin yang ada di dalam *waterbath* langsung dengan *object glass*.

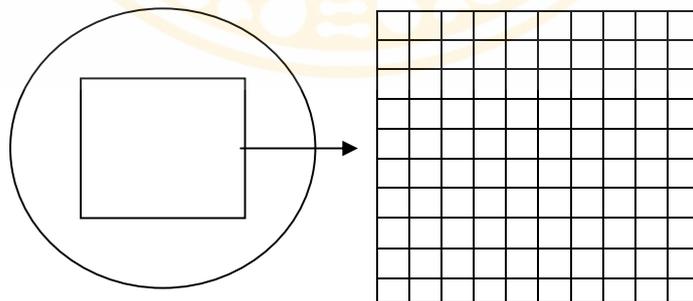
4. Tahap pewarnaan (*staining*)

Tahap pewarnaan ini dilakukan dengan tahap sebagai berikut. Pada mulanya dimasukkan ke dalam xylol I kemudian xylol II dengan masing-masing selama 10 menit. Setelah itu, melakukan proses hidrasi dengan alkohol bertahap yaitu alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%, alkohol 50% masing-masing dengan waktu 5 menit. Memasukkan ke dalam hematoxylin selama 10 menit, kemudian bilas dengan air, selanjutnya masuk ke dalam etanol asam (HCl 1% dan etanol 70%) selama 2 menit kemudian bilas dengan air, masuk ke pewarna eosin

selama 10 menit. Kemudian melalui alkohol bertahap lagi dimulai alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, masing-masing dengan waktu 5 menit. Langkah terakhir adalah masuk ke dalam xylol:alkohol (1:1) dan xylol murni, masing-masing selama 10 menit, setelah itu memberi entelan dan menutupnya dengan *cover glass*.

3.3.8. Tahap penghitungan luasan area radang

Dari tiap mencit dibuat dua awetan blok hepar mencit. Dari masing-masing awetan tersebut dibuat dua preparat, dengan masing-masing preparat berisi empat irisan sediaan. Penghitungan luasan area radang dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi *graticulae* di lensa okulernya seperti pada Gambar 3.1, dengan perbesaran 40x10. Kalibrasi luasan tiap satuan kotak *graticulae* adalah $625 \mu\text{m}^2$.



Gambar 3.1. *Graticulae* (100 kotak hitung)

3.4. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati adalah:

1. Variabel bebas (*independent variable*), yaitu jenis ekstrak teripang.
2. Variabel terikat (*dependent variable*), yaitu jumlah *Escherichia coli* yang mencapai hepar mencit dan luasan area radang pada jaringan hepar mencit.
3. Variabel terkendali, yaitu jenis hewan coba, umur hewan coba, berat badan hewan coba, dosis perlakuan

3.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan penentuan banyaknya pengulangan berdasarkan rumus Lwanga dan Lameshow (1990) dan kelompok pengulangan dapat dilihat pada Tabel 3.2. Berdasar rumus tersebut, diperoleh besar ulangan minimal adalah 2 ulangan.

$$r \geq \frac{2(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2 \cdot \gamma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan: r = Jumlah ulangan
 $z_{1-\alpha/2}$ untuk $\alpha=0.05 \rightarrow 1,96$
 $z_{1-\beta}$ untuk $\beta=0.01 \rightarrow 1,24$
 γ = standar deviasi kelompok kontrol
 μ_1 = mean kelompok perlakuan
 μ_2 = mean kelompok kontrol

Tabel 3.2. Rancangan penelitian

Ulangan	Perlakuan			
	T0	T1	T2	T3
1	T0.1	T1.1	T2.1	T3.1
2	T0.2	T1.2	T2.2	T3.2
3	T0.3	T1.3	T2.3	T3.3

Keterangan:

T0 = kontrol (diinfeksi *E. coli* tanpa pemberian ekstrak teripang)

T1 = perlakuan 1 (diberi ekstrak *Paracaudina australis*, diinfeksi *E. coli*)

T2 = perlakuan 2 (diberi ekstrak *Phyllophorus sp.*, diinfeksi *E. coli*)

T3 = perlakuan 3 (diberi ekstrak *Colochirus quadrangularis*, diinfeksi *E. coli*)

3.6. Pengambilan Data

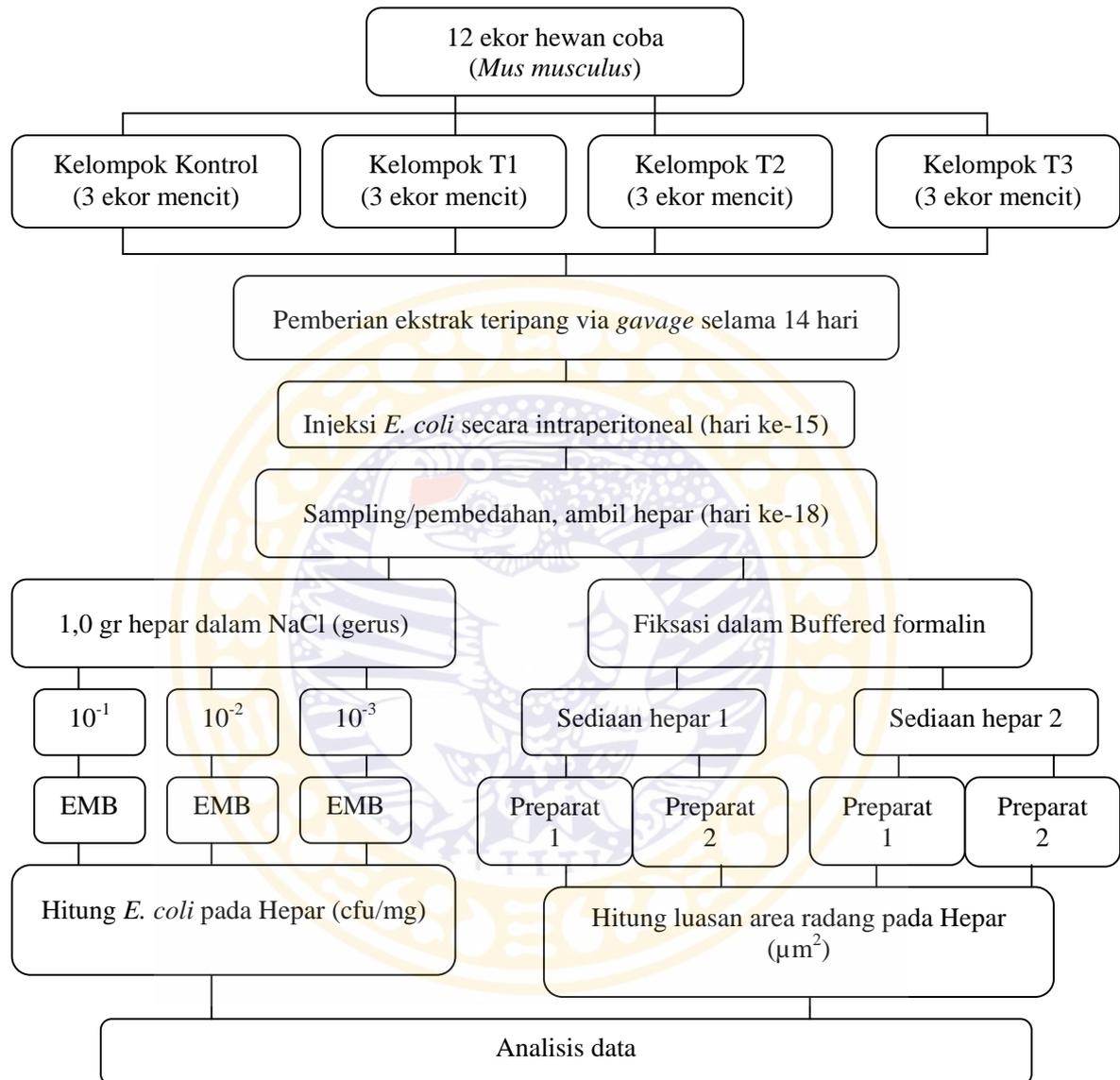
Data yang diambil dari penelitian ini adalah:

1. Jumlah *E. coli* yang mencapai hepar (cfu/mg), pada Lampiran 2.
2. Luasan area radang pada hepar (μm^2), pada Lampiran 2.

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif, kemudian diolah secara statistik untuk dianalisis beda nyata antar kelompok perlakuan. Karena data yang diperoleh merupakan data nonparametrik, maka dilakukan analisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui beda nyata antar kelompok perlakuan, kemudian untuk mengetahui tingkat signifikansi beda nyata tiap dua kelompok perlakuan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

3.8. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.2. Kerangka Operasional Penelitian. Injeksi *E. coli* secara intraperitoneal dilakukan pada hari ke-15. Pada hari ke-18 organ hepar diambil, gerus 1,0 gr hepar dalam NaCl kemudian menuangkannya pada EMB dalam cawan petri untuk menghitung jumlah bakteri pada hepar, sedangkan sisa hepar yang ada disimpan dalam *buffered formalin* untuk kemudian dijadikan preparat histologi.