

III. MATERI DAN METODE

3.1. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan bertempat di Laboratorium Pacar Surabaya, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2021.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, timbangan torbal (*Thorsion balance*) untuk mengukur berat badan tikus, Bunsen, spuit, alat bedah berupa gunting, pisau dan pinset, tissue dan kapas, gelas ukur, saringan, timbangan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas saring, kontener sampel, sarung tangan, kertas label. Cliper, evaporator, corong Buchner, mikrotom, objek glass, mikroskop.

3.2.2. Bahan Penelitian

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*), belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi*), aquades, bakteri *Escherichia coli*, lidokain, xylol, alkohol 70%, alkohol 76%, alkohol 80%, alkohol 86%, alkohol 96%, pelet, etanol, formalin, aquades. Kloroform, parafin, albumin gliserin.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental, penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan teknik pengambilan sampel secara random/acak dengan menggunakan 6 perlakuan dan 4 kali pengulangan untuk masing-masing perlakuan.

3.3.2. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari tiga jenis variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kendali.

- a) Variabel bebas berupa pemberian belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi*) pada tikus putih.
- b) Variabel terikat berupa ada dan tidaknya nekrosis, infiltrasi sel radang, hemoragi, pada histopatologi usus tikus putih.
- c) Variabel kendali berupa pakan, air minum, umur, jenis kelamin, dan jenis tikus.

3.3.3. Populasi, Sampel dan Besar Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan percobaan yaitu tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*).

2. Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur wistar dengan kondisi sehat fisik berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram karena pada fase tersebut tikus sudah berada pada fase dewasa dan daya imunnya bagus.

3. Besar Sampel

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebanyak 24 ekor dan dibagi menjadi 6 kelompok ulangan dan perlakuan dengan perhitungan rumus frederer :

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

Keterangan :

$$n(6-1) \geq 15$$

n = besar pengulangan

$$6n-6 \geq 15$$

t = jumlah kelompok

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21:6$$

$$n = 3,5 \text{ atau } n = 4$$

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengenceran Isolat Bakteri *Escherichia coli*

Metode yang digunakan pada pembuatan kultur murni bakteri *Escherichia coli* dalam MHA miring selama ± 3 hari, inokulasikan 1 ose, inkubasi selama 24 jam pada suhu $\pm 37^\circ\text{C}$, kultur cair *Escherichia coli* dalam MHB steril kemudian setarakan dengan larutan standart $\frac{1}{2}$ Mc Farland (populasi $\pm 1,5 \times 10^6$ cfu/ml), encerkan 1000x dalam pipet 1 ml, setelah itu tukar sesuai dosis yang dibutuhkan.

3.4.2. Prosedur Penelitian

Tikus berumur dua sampai tiga bulan dan berat badan 150-200 gram sebanyak 26 ekor, yang dikelompokkan dalam 6 kelompok. Macam perlakuan sebagai berikut:

P0 = tidak diinduksi *Escherichia coli* + Tanpa ekstrak belimbing Wuluh (tanpa terapi)

P1 = diinduksi *Escherichia coli* + Tanpa ekstrak Belimbing Wuluh

P2 = diinduksi *Escherichia coli* + ekstrak Belimbing Wuluh konsentrasi 20%.

P3 = diinduksi *Escherichia coli* + ekstrak Belimbing Wuluh konsentrasi 30%.

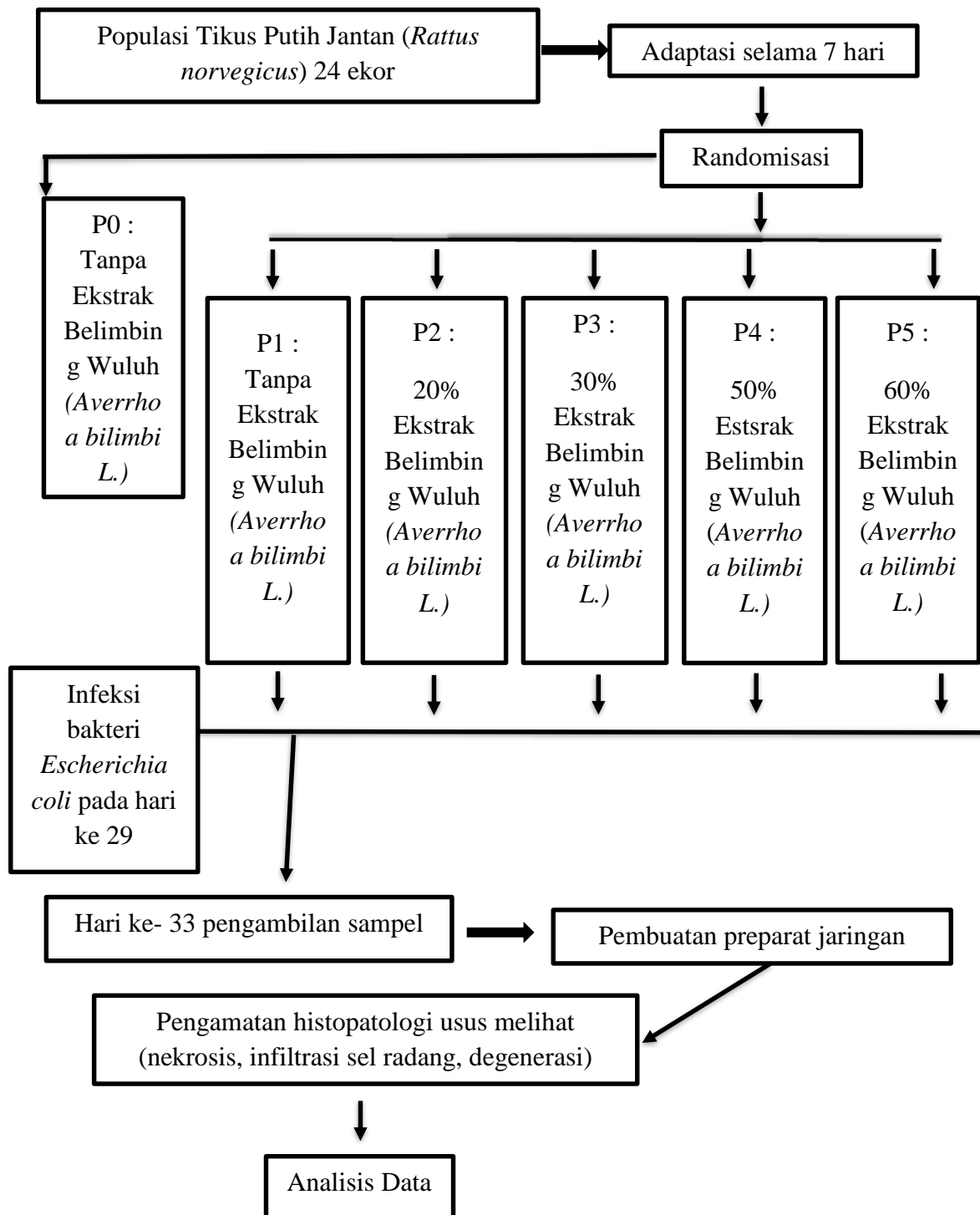
P4 = diinduksi *Escherichia coli* + ekstrak Belimbing Wuluh konsentrasi 50%

P5 = diinduksi *Escherichia coli* + ekstrak Belimbing Wuluh konsentrasi 60%.

3.4.3. Pengambilan Sampel dan Pembuatan Preparat

Pengambilan sampel usus dilakukan pada hari ke- 15. Tikus pada setiap kelompok dieutanasi dengan kloroform. Tikus di bedah dan di ambil ususnya sebagai sampel, dan dimasukkan kedalam tabung organ yang terisi formalin. Setelah itu usus difiksasi selama 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan didehidrasi dalam larutan aseton 2x masing-masing selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan clearing dalam larutan kloroform 2x masing-masing selama 1 jam. Kemudian jaringan di infiltrasi dalam larutan kloroform parafin selama 1,5 jam dan paraffin infiltrasi selama 1,5 jam. Setelah itu jaringan ditanam dalam paraffin block lalu jaringan yang sudah padat dipotong menggunakan mikrotom setebal 5 mikron. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca objek yang sebelumnya telah diolesi albumin gliserin sebagai perekat. Jaringan pada kaca objek diletakan diatas hot plate hingga mengering. Kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan metode Harris-hematoxylin eosin (HE) yaitu dengan cara direndam dalam xylo I, II, III masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam alcohol absolut I dan II selama 5 menit.

3.5. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka operasional penelitian

3.6. Variabel Yang Dimati

Untuk melihat tingkat efektifitas ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap gambaran histopatologi usus halus duodenum Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinfeksi bakteri *Escherichia coli* dilakukan pengamatan adanya hemoragi, nekrosis, dan degenerasi pada lapisan usus halus duodenum dengan kriteria sebagai berikut :

Table 3.1 Skor Parameter Nekrosis

Skor	Keterangan
0 (nol)	Tidak terjadi perubahan nekrotik vili usus
2 (dua)	Jika jumlah sel nekrotik <25% dr seluruh LP didaerah vili usus
4 (empat)	Jika jumlah sel nekrotik antara 26-50% dr seluruh LP didaerah vili usus
6 (enam)	Jika jumlah sel nekrotik antara 51-75% dr seluruh LP didaerah vili usus
8 (delapan)	Jika jumlah sel nekrotik 76%-100% didaerah vili usus

Tabel 3.2 Skor Parameter Infiltrasi Sel Radang

Skor	Keterangan
0 (nol)	Jika tidak ditemukan sel radang pd seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
1 (satu)	Jika sel radang <10% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
2 (dua)	Jika sel radang antara 11 – 50% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
3 (tiga)	Jika sel radang antara 51 – 75% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
4 (empat)	Jika sel radang 76- 100% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa

Tabel 3.3 Skor Parameter Haemorrhagi

Skor	Keterangan
0 (nol)	Jika tidak ditemukan hemoragi pd seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
3 (tiga)	Jika hemoragi <10% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
5 (lima)	Jika hemoragi antara 11 – 50% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa

7	Jika hemoragi antara 51 – 75% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa
10 (sepuluh)	Jika hemoragi 76- 100% pada seluruh LP di daerah mukosa dan sub mukosa

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan akan diubah menjadi data kuantitatif dengan pemberian skoring yang sesuai dengan parameter penelitian. Data tersebut akan dianalisis menggunakan metode Kruskal Wallis Test untuk menentukan perbedaan pada kelompok kontrol dan perlakuan, Hipotesis dianggap bermakna apabila ($P < 0,05$). kemudian dilanjutkan lagi dengan metode Mann-Whitney Test, untuk menentukan perbedaan data masing-masing kelompok perlakuan (Hidayati, dkk., 2018) jika ada perbedaan nyata. Semua analisis menggunakan program SPSS.