

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu**

Adapun tempat dan waktu pelaksanaan penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Kampus B Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang dan Laboratorium Patologi Dyatnitalis Kota Palembang, waktu pelaksanaannya dimulai pada bulan Mei – September.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, hotplate stirrer, neraca digital, autoklaf, Laminar Air flow, gelas erlemeyer, Mikropipet, Pipet Tetes , Spatula, gelas beaker, Pot urine 20ml, tisu, Tabung Centrifuge, Jarum Inoculum, jarum sonde, jarum syringe 1 ml ,Sarung tangan Lateks, kandang mencit, botol vial, gunting dan pinset.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan yang di gunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak bonggol nanas,stimuno, aquades,ketamin-xylazine (KX), alkohol 70%, Bakteri Staphylococcus aureus, Nutrien Agar (NA) dan Nutrien Broth (NB) sebagai media,Larutan PBS (Phosphale Buffer Saline),Formalin 10% ,dan mencit putih jantan sebagai objek pengujian.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal, yaitu terdiri dari 6 perlakuan. Perlakuan 1 (K-Normal), yaitu kontrol normal diberi makan dan minum seperti biasa. Perlakuan 2 (K-Positif), yaitu Stimuno (50 mg/Kgbb). Perlakuan 3 (K-Negatif), Aquadest, Perlakuan 4 (P1), yaitu Dosis ekstrak bonggol nanas 10 mg/Kgbb. Perlakuan 5 (P2), dosis ekstrak bonggol nanas 50 mg/Kgbb, dan Perlakuan 6 (P3) dosis bonggol nanas 100 mg/Kgbb.

Pemilihan Stimuno sebagai kontrol positif sesuai penelitian yang dilakukan oleh Yusuf et. al (2019), dimana Stimuno terbukti sebagai imunomodulator, dengan cara memberikan rangsangan kepada reseptor sel

imun serta mengirimkan sinyal intra seluler pada reseptor sel sehingga dapat meningkatkan kerja sel imun lebih baik untuk menyerang bakteri asing termasuk bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah Aquadest. Pemilihan Aquadest sebagai kontrol negatif karena tidak mengandung zat aktif sehingga tidak dapat memberikan efek farmakologi apapun pada hewan uji. Aquadest pada penelitian ini juga digunakan sebagai suspensi dalam sediaan yang dibuat, karena mempunyai sifat yang inert serta menghasilkan suspensi yang stabil.

**Tabel 2.** Rancangan Penelitian Pengaruh Ekstrak Jamur Endofitik dari bonggol *Ananas comosus* (L) merr terhadap Otak Mencit (*Mus musculus*).

No.	Perlakuan	Dosis	Ulangan
1.	Kontrol Normal	Makan dan Minum	4
2.	Kontrol Positif	Stimuno 50 mg/kgbb	4
3.	Kontrol Negatif	Aquadest	4
4.	Dosis I (P1)	10 mg/kgbb	4
5.	Dosis II (P2)	50 mg/kgbb	4
6.	Dosis III (P3)	100 mg/kgbb	4

Keterangan:

K-No = Makan dan minum seperti biasa

K-Po = Stimuno

K-Ne = Aquadest

P1 = Ekstrak bonggol *Ananas comosus* (L) merr

P2 = Ekstrak bonggol *Ananas comosus* (L) merr

P3 = Ekstrak bonggol *Ananas comosus* (L) merr

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali sehingga diperoleh 24 unit percobaan. Nomor letak perlakuan ditentukan dengan cara pengacakan. Penelitian ini menggunakan pola pengacakan dengan cara mengundi, pola pengacakannya sebagai berikut.

**Tabel 3. Rancangan Acak Lengkap**

P0U1	P1U1	P2U1	P3U1	P0U4	P3U4
P2U3	P0U2	P1U3	P1U4	P1U2	P4U4
P2U2	P1U2	P0U3	P2U4	P4U2	P3U2
P4U3	P5U2	P5U3	P5U1	P4U1	P2U1

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Bebas**

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan yaitu ekstrak jamur endofit yang diisolat dari bonggol nanas prabumulih (*Ananas comosus* (L.) Merr).

#### **3.4.2 Variabel Terikat**

Pada penelitian ini variabel terikat yang digunakan yaitu berupa aktivitas ekstrak jamur endofit yang diisolat dari bonggol nanas prabumulih (*Ananas comosus* (L.) Merr) pengaruhnya terhadap histologi otak mencit

### **3.5 Populasi dan Sampel**

#### **3.5.1 Populasi**

Populasi yaitu generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2019). Populasi dari penelitian ini adalah mencit putih jantan sebanyak 24 ekor.

#### **3.5.2 Sampel**

Sampel yaitu bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut yang dianggap bisa mewakili seluruh populasi, intinya sampel merupakan bagian dari populasi (Sugiyono, 2019). Sampel dari penelitian ini adalah otak mencit putih jantan.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Ekstrak jamur endofit**

Dalam hal ini penggunaan ekstrak tidaklah bersumber dari pembuatan awal melainkan menggunakan ekstrak yang sudah jadi hasil

dari penelitian sebelumnya yang di koleksi oleh laboratorium biologi, jadi tahapan yang saya lakukan yaitu tinggal pembuatan takaran konsentrasi ekstrak mulai dari 10 mg/kgbb, 50 mg/kgbb, dan 100 mg/kgbb,

### **3.6.2 Penyediaan dan Pemeliharaan Mencit (*Mus musculus*)**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor mencit putih jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 15-25 gr. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu, di dalam kandang yang dibuat dari nampan plastik dan diberi alas dari sekam padi agar tidak lembab dan ditutup dengan kawat ram. Tujuan mengadaptasikan mencit dengan lingkungan yang baru adalah meminimalisir efek stres pada mencit (Afriwardi dkk, 2021).

Mencit jantan dipilih karena mencit jantan tidak mempunyai hormon estrogen, jika ada jumlahnya pun relatif sedikit serta kondisi hormonal pada mencit jantan lebih stabil jika dibandingkan dengan mencit betina karena pada mencit betina mengalami perubahan hormonal pada masa-masa estrus, masa menyusui, dan kehamilan dimana kondisi tersebut dapat mempengaruhi kondisi psikologis hewan uji tersebut. Tingkat stress pada mencit betina lebih tinggi dibandingkan dengan mencit jantan yang mungkin dapat mengganggu penelitian (Muhtadi et al, 2014).

Mencit yang diikutsertakan dalam percobaan adalah mencit yang sehat dengan ciri-ciri mata merah jernih, bulu lebat, dan mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk mengontrol berat badan (Muhtadi et al, 2014).

### **3.6.3 Kultur bakteri**

*Staphylococcus aureus* (SA) diinokulasi ke dalam Nutrient Broth (NB) menggunakan jarum inokulasi. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit sampai terbentuk pelet dan disuspensikan dengan PBS (Afriwardi dkk, 2021). *Staphylococcus aureus* digunakan

karena merupakan bakteri gram positif. Jenis bakteri gram positif ini mampu mengikat warna giemsa dengan jelas sehingga memudahkan dalam perhitungan di bawah mikroskop. Bakteri ini juga tidak mengandung protein A, yaitu protein yang bersifat antifagositik sehingga *S. aureus* tidak dapat menghindari fagositosis makrofag peritoneum (Hariyanti et al., 2015).

Menurut Stevani (2016), penyuntikan bakteri pada mencit secara Intraperitoneal yaitu metode ini bakteri atau racun langsung ke daerah rongga perut yang banyak jaringan ikat dipenuhi oleh pembuluh darah. Sehingga langsung masuk ke jantung dan disebarkan keseluruh tubuh agar efeknya langsung terjadi pada hewan percobaan.

Pada hari ke-1 setiap mencit diinfeksi dengan suspensi bakteri *S.aureus* sebanyak 0,1 ml secara intraperitoneal. Setelah diinjeksikan dengan suspensi bakteri, seluruh kelompok perlakuan didiamkan selama 1 jam. Hal ini bertujuan untuk membuat sistem non spesifik dapat bekerja, karena sistem imun non spesifik dapat bekerja sekitar 0-12 jam setelah infeksi terjadi (Abbas et al, 2017). Makrofag dan neutrofil, termasuk ke dalam pertahanan di lini pertama dalam sistem imunitas. Walaupun biasanya tidak berada dalam jumlah cukup untuk menghadapi serangan bakteri. Makrofag mampu menahan infeksi selama periode sekitar 1 jam pertama sebelum mekanisme imunitas lain dapat dimobilisasi. Atas dasar inilah maka pengambilan makrofag dilakukan sekitar 1 jam setelah induksi bakteri, sehingga akan diketahui sejauh mana kemampuan makrofag dalam mengatasi invasi bakteri (Sriningsih & Wibawa, 2006).

Bakteri *Staphylococcus aureus* ialah bakteri mampu membuat biofilm di jaringan inang maupun di permukaan alat prostetik serta dapat membentuk small-variant colony (SVCs) yang dapat bersembunyi dalam sel inang tanpa menyebabkan kerusakan signifikan pada sel. Hal tersebut dapat membuatnya terlindung dari efek antibiotik dan mekanisme pertahanan tubuh. Keberadaan faktor-faktor tersebut menimbulkan manifestasi klinis dari infeksi *Staphylococcus aureus*

menjadi sangat luas mulai dari keracunan makanan, toxic shock syndrome infeksi dari darah yang dapat menjalar ke otak, infeksi kulit ringan sampai dengan infeksi berat yang mengancam jiwa bila terjadi bakterimia, dan bermetastasis ke berbagai organ, pada otak dapat mengakibatkan meningitis, abses otak dan serebritis (Utaminingsih, 2015).

#### 3.6.4. Perhitungan Jumlah Ekstra (Food and Drug Administration, 2005)

- Volume Pemberian = 0,2 ml (Selama 7 hari, 1 hari 1 x)
- Volume suspense yang dibuat = 10 ml
- Berat badan mencit rata-rata = 20 gr (0,02 kg).
- $$VAO \text{ (Volume Administrasi Obat)} = \frac{\text{Dosis } \left(\frac{mg}{kg}\right)}{\text{Konsentrasi}} \times \text{BB mencit (kg)}$$
- 1. Ekstrak dengan dosis tertinggi (100 mg/kg bb) VAO (0,2 ml)
  - $$= \frac{100 \text{ mg/kg}}{\text{Konsentrasi}} \times 0,02 \text{ kg}$$
  - Konsentrasi =  $\frac{2}{0,2}$
  - Konsentrasi = 10 mg/ml
  - $$VAO = \frac{100 \text{ mg/kg}}{\text{Konsentrasi}} \times 0,02 \text{ kg} \quad VAO = 0,2 \text{ ml}$$
- Untuk membuat dosis 100 mg/kg bb diperlukan 0,1 ml larutan induk. Jadi , 0,2 ml (Larutan Induk) + 9,80 ml (Aquadest) = 10 ml
- Untuk membuat dosis 10 mg/kg bb diperlukan 0,01 ml larutan induk. Jadi, 0,02 ml (Larutan Induk) + 9,98 ml (Aquadest) = 10 ml.
- Untuk membuat dosis 50 mg/kg bb, diperlukan 0,05 ml larutan induk. Jadi, 0,01 ml (Larutan Induk) + 9,9 ml (Aquadest) = 10 ml.
- Jadi, ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 mg/ml.

#### 3.6.5 Pengambilan sampel otak mencit (*Mus musculus*) dan pembuatan Preparat.

Pada hari ke 7 mencit dikorbankan, mencit didislokasi pada bagian leher, kemudian dilakukan pembedahan pada bagian kepala dan organ otak diangkat. Otak yang telah diisolasi direndam kedalam larutan fiksatif Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%, pembuatan preparat Organ otak dibuat blok parafin. Kemudian blok diiris dengan ketebalan

3-5  $\mu\text{m}$  dengan menggunakan mikrotom sehingga diperoleh bagian hipokampus untuk analisis histopatologi dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (Kristianingrum et al.,2016) .

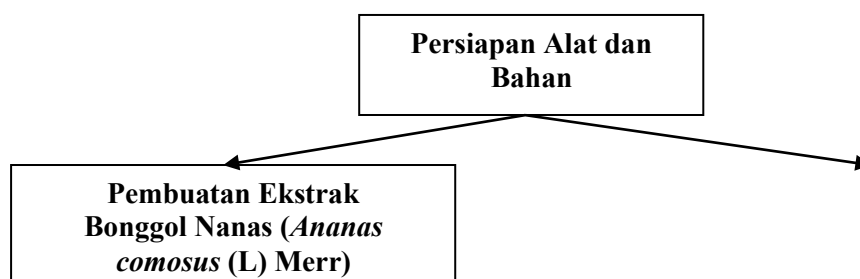
Pembuatan Preparat Semua hewan coba dipingsankan pada hari ke-7 dengan menggunakan ketamin-xylazine (KX), kemudian nyawanya dikorbankan, selanjutnya dinekropsi sesuai prosedur, kemudian dibuat preparat lalu diberi pewarnaan dengan metode Harris Hematoksilin-Eosin (HE). Sampel otak yang diambil dipotong dengan ukuran 1x1x1 cm, kemudian dimasukkan ke dalam pot kecil berisi Neutral Buffered Formalin (NBF) 10%, selanjutnya setelah fiksasi dilakukan proses dehidrasi dan clearing dengan satu sesi larutan yang terdiri dari: alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol 96%, alkohol absolut, toluena, dan parafin secara bertahap dalam satu hari. Sampel otak kemudian di-blocking dengan menggunakan embedding set kemudian dituang parafin cair dan ditunggu hingga dingin. Blok parafin yang sudah dingin dipotong menggunakan microtome dengan ketebalan 4–5 mikron. Proses yang terakhir adalah pewarnaan dengan metode Harris Hematoxylin–Eosin dan mounting media. Preparat histologi diamati di bawah mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran 400 kali dan perubahan mikroskopik yang ditemukan pada lima lapang pandang mikroskopik dicatat(Yustisia et al. 2020).

### **3.7 Analisis Data**

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah neuron (Sel Saraf) yang mati, sel saraf yang mati ditandai dengan tidak adanya inti sel dan warnanya gelap. Jumlah sel yang mati pada mencit perlu dianalisis secara statistik dengan one way ANOVA, untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan yang dilakukan. Apabila signifikan <5% berarti memiliki pengaruh nyata terhadap variabel perlakuan pengamatan, maka dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) yaitu merupakan perbandingan antara dua rata-rata dari seluruh nilai rata-rata yang ada. Oleh karena itu, uji ini digunakan untuk perbandingan yang tidak berencana, menggunakan Taraf

5% dengan menggunakan SPSS (Afriwardi dkk, 2021).

### 3.8 Alur Penelitian





**Pengenceran Bakteri  
(*Staphylococcus aureus*)**

**Bakteri diinjeksikan ke mencit (*Mus musculus*) secara intraperitoneal/bagian atas paha dekat perut sebanyak 0,1 ml**

**Selang 1 jam diberikan ekstrak ke mencit (*Mus musculus*)  
Dilakukan pemberian ekstrak secara oral melalui saluran tenggorokan sebanyak 0,15 ml selama 7 hari secara oral**

**Dihari ke-8 diambil sampel otak melalui proses pembedahan**

**Setelah sampel otak diambil selanjutnya dilakukan pembuatan preparat untuk melihat histologi otak mencit dan apakah ada sel saraf yang rusak**

**Analisis hasil Uji Pengaruh Ekstrak Bonggol Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) terhadap otak mencit**