

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini meliputi bidang keilmuan imunologi, pengobatan tradisional dan farmakologi.

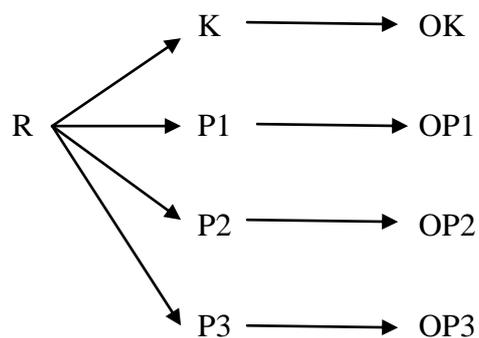
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Laboratorium Cebior.

Penelitian dan pengumpulan data dilaksanakan pada bulan Maret-April tahun 2013.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dengan menggunakan desain *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian yang dilakukan menggunakan hewan percobaan mencit BALB/c sebagai subjek penelitian, yaitu dengan cara membanding hasil observasi kelompok kontrol dan perlakuan. Terdapat tiga perlakuan yang dilakukan yaitu dengan pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa*, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* serta pemberian gabungan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan *Phyllanthus niruri*.



Keterangan :

R : Randomisasi

K : Kontrol

Kelompok mencit yang diberi aquades 0,5 cc / hari

P1 : Perlakuan 1

Kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,14 mg/ 0,5 cc/ hari melalui sonde selama 7 hari

P2 : Perlakuan 2

Kelompok mencit yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri* dengan dosis 0,4 mg/ 0,5 cc/ hari melalui sonde selama 7 hari

P3 : Perlakuan 3

Kelompok mencit yang diberi ekstrak gabungan *Phaleria macrocarpa* dan *Phyllanthus niruri* melalui sonde selama 7 hari

OK : Pengamatan pada kelompok Kontrol

OP1 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 1

OP2 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 2

OP3 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 3

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi target

Populasi target penelitian ini adalah mencit BALB/c

4.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah mencit BALB/c yang didapatkan dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.

4.4.3 Sampel

4.4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi dari penelitian ini adalah :

- a. Mencit BALB/c jantan
- b. Dewasa (usia 4-6 minggu)
- c. Berat badan 20-40 gram
- d. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)
- e. Struktur anatomi normal

4.4.3.2 Kriteria Drop out

Kriteria Drop out dari penelitian ini adalah :

Mencit mati atau sakit saat penelitian berlangsung.

4.4.4 Cara sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara randomisasi sederhana (*simple random sampling*), dimana semua objek atau elemen populasi memiliki kesempatan yang sama sebagai sampel.

4.4.5 Besar Sampel

Penentuan besar sampel menggunakan ketentuan WHO yaitu jumlah sampel minimal lima ekor tikus tiap kelompok yang diambil secara acak.²⁶ Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah enam ekor mencit jantan tiap kelompok. Terdapat empat kelompok terdiri dari satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Jumlah sampel seluruhnya adalah 24 ekor mencit BALB/c jantan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian gabungan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan *Phyllanthus niruri*.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase limfoblas yang berasal dari limpa mencit BALB/c.

4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Unit	Skala
1.	<i>Phaleria macrocarpa</i> <i>Phaleria macrocarpa</i> yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak dari buah <i>Phaleria macrocarpa</i> yang disediakan oleh PT. Sidomuncul, Ungaran. Proses ekstraksinya dengan cara sokletasi. Dosis yang digunakan adalah 0,14 mg/0,5cc/hari.	mg/0,5 cc/hari	Nominal
2.	<i>Phyllanthus niruri</i> <i>Phyllanthus niruri</i> yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak air dari herbal <i>Phyllanthus niruri</i> yang disediakan oleh PT. Sidomuncul, Ungaran. Proses ekstraksinya dengan cara sokletasi. Dosis yang digunakan adalah 0,4 mg /0,5 cc/hari.	mg/0,5 cc/hari	Nominal
3.	Persentase limfoblas Persentase limfoblas dihitung dari jumlah limfoblas minimal 200 sel limpa (limfosit + limfoblas) yang diamati melalui mikroskop cahaya sesuai dengan standart prosedur yang ditentukan.	%	Numerik

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Alat dan Bahan pada Persiapan dan Perlakuan

4.7.1.1 Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan
3. Sonde Lambung
4. Pipet ukur
5. Tabung reaksi

6. Batang Pengaduk
7. Spatula
8. Inkubator

4.7.1.2 Bahan

1. Ekstrak *Phyllanthus niruri*
2. Ekstrak buah *Phaleria macrocarpa*
3. Mencit strain BALB/c jantan yang didapat dari laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang
4. Aquades
5. Pakan dan minum standar

4.7.2 Alat dan Bahan pada Proses Isolasi Splenosit dan Pengukuran Persentase Limfoblas

4.7.2.1 Alat

1. Petri dishes plastic
2. Refrigerated centrifuge
3. Pipet Pasteur
4. *Laminar flow hood*
5. Mikroskop cahaya
6. Object glass
7. Pinset
8. Gunting

4.7.2.2 Bahan

1. Sodium pentobarbital, 50 mg / ml
2. Ethanol 70% (v/v)
3. Free Hank's balanced salt solution (CMF-HBSS), mengandung Ca^{2+} dan Mg^{2+} (GIBCO)
4. Lysing buffer (NH_4Cl 0,17 M)
5. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (GIBCO)
6. Fetal Bovine Serum (FBS)
7. Larutan Giemsa

4.7.3 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer.

4.7.4 Cara kerja

Prosedur penelitian ini meliputi beberapa langkah:

1. Persiapan alat dan bahan
2. Pembuatan ekstrak
3. Perlakuan pada hewan coba
 - a. Dua puluh empat mencit BALB/c diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar. Mencit dikandangkan secara memadai pada suhu lingkungan normal dengan siklus 12 jam siang dan 12 jam malam dan diberikan pakan serta minum secara *ad libitum*.
 - b. Sampel kemudian dilakukan pengelompokan secara acak sehari setelah masa adaptasi selesai. Mencit BALB/c yang berjumlah 24 ekor dibagi

dalam 4 kelompok, yaitu kelompok Kontrol, P1, P2, dan P3, masing-masing kelompok 6 ekor mencit.

c. Masing-masing kelompok diberi perlakuan tertentu:

1) Kelompok Kontrol

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan plasebo berupa aquadest melalui sonde.

2) Kelompok P1

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,14 mg/ 0,5 cc / hari melalui sonde.

3) Kelompok P2

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* dengan dosis 0,4mg/ 0,5 cc / hari melalui sonde.

4) Kelompok P3

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,14 mg/ 0,5 cc /hari dan ekstrak *Phyllanthus niruri* dengan dosis 0,4 mg/ 0,5 cc /hari melalui sonde

Selama perlakuan, semua mencit diberikan pakan dan minum standar *ad libitum*.

d. Pada hari ke-8, mencit di terminasi dan dilakukan isolasi splenosit.

Prosedur Isolasi Splenosit ²⁷:

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi cervix atau inhalasi dengan sodium pentobarbital, di baringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset kearah kepala dan ekor mencit, sehingga

kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan ethanol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok

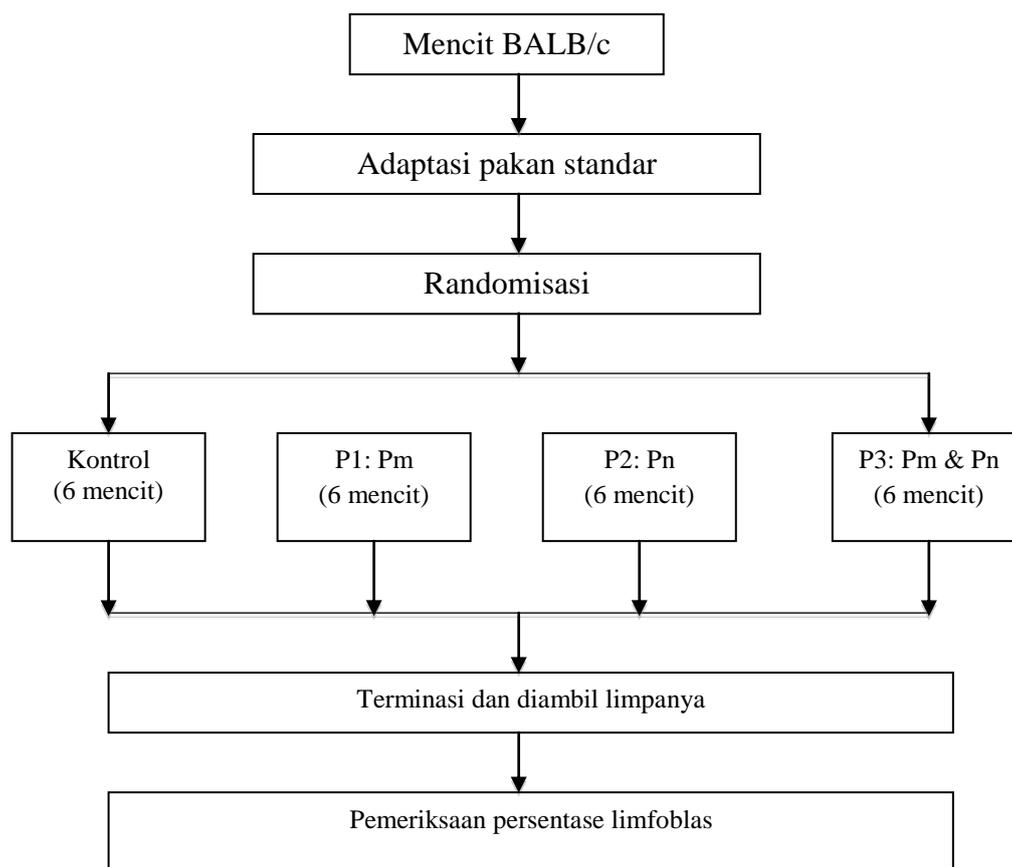
3. Rendam gunting dan pinset dalam ethanol 95%. Gunting peritoneum dengan irisan berbentuk huruf U mengelilingi limpa. Peritoneum dilipat ke atas, angkat limpa dengan menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya menggunakan gunting. Letakkan limpa pada petri dish berisi 1,5 ml HBSS
4. Hancurkan limpa menggunakan pinset
5. Dengan menggunakan pipet Pasteur, pindahkan suspensi sel ke tabung pemusing. Biarkan sel-sel yang menggumpal mengendap selama 5 atau 6 menit
6. Pindahkan suspensi sel ke tabung yang lain dan pusingkan sel pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml *lysing buffer* pada suhu ruang (25°C) untuk melisis eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C
7. Buang supernatan dan pellet dicuci 2x dengan RPMI dengan cara dipipet berulang-ulang dan dipusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C
8. Hitung sel-sel menggunakan *hematocytometer*

Prosedur Pemeriksaan Persentase Limfoblas

1. Siapkan splenosit yang telah dihitung kepadatannya 3×10^7 sel/ml

2. Teteskan 1 tetes pada object glass, untuk dibuat sediaan hapus, keringkan di udara
3. Fiksasi dengan methanol
4. Cat dengan Giemsa
5. Baca dengan mikroskop cahaya, hitung jumlah limfoblas dari 200 sel (limfosit + limfoblas) pada area homogen sesuai standar prosedur pemeriksaan

4.8 Alur Penelitian



Keterangan:

Kelompok Kontrol : Kelompok mencit BALB/c yang diberi aquadest

- Kelompok P1 : Kelompok mencit BALB/c yang diberi ekstrak *Phaleria macrocarpa* saja
- Kelompok P2 : Kelompok mencit BALB/c yang diberi ekstrak *Phyllanthus niruri* saja
- Kelompok P3 : Kelompok mencit BALB/c yang diberi gabungan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan *Phyllanthus niruri*

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

4.9.1 Pengolahan data

4.9.1.1 Cleaning

Dilakukan pembersihan data pada data penelitian. Diteliti dahulu agar tidak terdapat yang diperlukan.

4.9.1.2 Editing

Dilakukan editing untuk meneliti kelengkapan data, kesinambungan data dan keseragaman data sehingga validitas data terjamin.

4.9.1.3 Coding

Dilakukan untuk memudahkan dalam pengolahan data termasuk pemberian skor.

4.9.1.4 Entry

Memasukan data dalam komputer untuk proses analisa data.

4.9.2 Analisa Data

Data dianalisa secara statistik dengan program *SPSS 15.00 for Windows*. Analisa deskriptif menampilkan nilai mean, median, modus, simpangan baku. Hasil ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik *box-plot*. Jumlah sampel kurang

dari 50 buah, maka dilakukan uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk*. Data dengan sebaran abnormal menggunakan uji *Kruskall-Wallis*, lalu dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data dengan sebaran normal dilakukan uji *one way anova* :

- 1) Jika nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan bermakna,
- 2) Jika nilai $p > 0,05$ berarti tidak terdapat perbedaan bermakna.

Data dilanjutkan dengan uji *post hoc* yaitu uji t tidak berpasangan jika uji *one way anova* terdapat perbedaan bermakna.

4.10 Etika Penelitian

Pelaksanaan penelitian akan dilakukan dengan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP dr Kariadi Semarang.

4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 6. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Februari 2013		Maret 2013				April 2013			Juli 2013	
	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	
Menyusun proposal											
Persiapan penelitian											
Penelitian											
Analisis Data											
Menyusun laporan penelitian											
Presentasi laporan penelitian											