

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

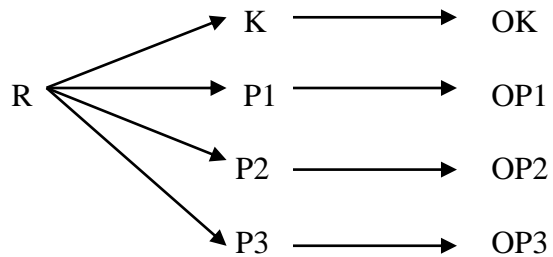
Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Penelitian dan pengumpulan data telah dilaksanakan pada bulan Mei-Juni tahun 2015.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dengan menggunakan desain *post test only control group design*. Obyek yang digunakan dalam penelitian adalah mencit BALB/c jenis kelamin jantan.¹⁴ Penelitian dilakukan dengan menganalisis hasil pengamatan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Mencit diadaptasi selama 7 hari, kemudian dibagi dalam 4 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Terdapat tiga perlakuan yaitu dengan pemberian seftriakson, minyak *N.sativa*, dan kombinasi seftriakson dengan *N.sativa*, setelah menginfeksi mencit dengan kuman MRSA strain ATCC 43300. Kelompok kontrol hanya diinfeksi dengan kuman MRSA strain ATCC 43300 dan hanya diberikan *aquabidest* sebagai plasebo, hasilnya digunakan sebagai pembanding dari kelompok

perlakuan. Prosedur pemeriksaan jumlah kuman dengan menggunakan *plate count method* dengan teknik *streak-plate* penuh pada media *nutrient agar*.



Gambar 5. Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Randomisasi

K : Kontrol

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml)⁵³ intraperitoneal dan diberi *aquabidest* 0,03 ml secara intraperitoneal.

P1 : Perlakuan 1

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) intraperitoneal dan diberi seftriakson dengan dosis 0,03 ml secara intraperitoneal.

P2 : Perlakuan 2

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) intraperitoneal dan diberi minyak *N.sativa* dengan dosis 0,3 ml²² dengan sonde lambung.

P3 : Perlakuan 3

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) dan diberi kombinasi minyak *N.sativa* dengan dosis 0,3 ml menggunakan sonde lambung dengan seftriakson 0,03 ml secara intraperitoneal.

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 yang memenuhi kriteria inklusi.

4.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah mencit BALB/c yang didapatkan dari *Rattus Breeding Center* Malang.

4.4. 3 Sampel

4.4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi dari penelitian ini adalah :

- a. Mencit BALB/c jantan
- b. Usia 7-9 minggu
- c. Berat badan 25 gram

d. Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

4.4.3.2 Kriteria Drop out

Kriteria drop out dari penelitian ini adalah mencit mati selama dilakukan observasi.

4.4.4 Cara Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara randomisasi sederhana (*simple random sampling*), yaitu semua obyek atau elemen populasi memiliki kesempatan yang sama sebagai sampel. Pengelompokan dilakukan secara acak setelah tujuh hari diadaptasikan di kandang mencit Laboratorium Parasitologi FK UNDIP.

4.4.5 Besar Sampel

Berdasarkan ketentuan WHO untuk penelitian menggunakan herbal, besar sampel minimal tiap kelompok adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 10%. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Besar sampel yang digunakan adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 1 ekor mencit untuk setiap kelompok sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 24 ekor mencit

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian minyak *N.sativa* 0,3 ml, kombinasi minyak *N.sativa* 0,3 ml dan seftriakson 0,03 ml.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah kuman MRSA yang berasal dari kultur otak mencit BALB/c.

4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Unit	Skala
1.	Seftriakson Antibiotik golongan sefalosporin generasi III yang stabil terhadap enzim betalaktamase, yang telah didapatkan dari Rumah Sakit Telogorejo Semarang dengan sediaan 1 gram per vial injeksi. Seftriakson diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 0,03 ml.	ml	Nominal
2.	Minyak <i>N.sativa</i> Minyak <i>N.sativa</i> didapatkan dari <i>Al-ahlam Seed Oil Production</i> , Jeddah. Diberikan per oral dengan dosis 0,3 ml. ²²	ml	Nominal
3.	Jumlah kuman MRSA strain ATCC 43300 yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fk Undip, dilakukan dengan cara <i>plate count method</i> menggunakan teknik <i>streak-plate</i> pada media <i>nutrient agar</i> .	cfu/ml	Numerik

1.7 Cara Pengumpulan Data

1.7.1 Alat dan Bahan Pemilihan Antibiotik

1.7.1.1 Alat

1. Ose
2. Pemanas spiritus

3. Inkubator

1.7.1.2 Bahan

1. Kuman MRSA ATCC 43300
2. Media *Mueller- Hinton*
3. Disk antibiotik (amikasin, amoksisilin, ampisilin, oksasilin, seftriakson, sefotaksim, kotrimoksazol, gentamisin)

4.7.2 Alat dan Bahan pada Persiapan dan Perlakuan

4.7.2.1 Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan digital
3. Sonde lambung
4. Pemanas spiritus
5. Sduit injeksi 1 ml
6. Swab alkohol

4.7.2.2 Bahan

1. Seftriakson
2. Minyak *N.sativa*
3. Kuman MRSA strain ATCC 43300
4. Mencit jantan strain BALB/c
5. Pakan dan minum standar

4.7.3 Alat dan Bahan pada Isolasi Kuman pada Otak

4.7.3.1 Alat :

1. Gunting steril
2. Pinset steril
3. Gelas steril
4. Kotak kaca steril
5. Papan busa
6. Swab alkohol
7. Vial steril

4.7.3.2 Bahan :

1. Kloroform
2. Alkohol 70%

4.7.4 Alat dan Bahan pada Penghitungan Jumlah Kuman MRSA

4.7.4.1 Alat :

1. Timbangan digital
2. Mikropipet
3. *Blue tip*
4. *Yellow tip*
5. Mortar dan alu
6. *Vortex mixer*
7. Tabung reaksi
8. Pemanas spiritus
9. Ose

4.7.4.2 Bahan :

1. Media *nutrient agar*
2. NaCl 0,9% steril
3. Spesimen otak yang akan dikultur

4.7.4 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer.

1.7.5 Cara Kerja

1.7.5.1 Prosedur Pemilihan Antibiotik

1. Melakukan persiapan alat dan bahan.
2. Melakukan *streak* kuman MRSA pada permukaan media *Mueller-Hinton*.
3. Melakukan penanaman disk antibiotik amikasin, amoksisilin, ampisilin, oksasilin, seftriakson, sefotaksim, kotrimoksazol, gentamisin pada media *Mueller- Hinton*.
4. Menilai zona hambat yang terbentuk dari masing-masing antibiotik, setelah diinkubasi selama 24 jam pada inkubator.

4.7.5.2 Prosedur Persiapan Sampel Penelitian

1. Mempersiapkan alat dan bahan.
2. Adaptasi pada hewan coba:

Dua puluh empat ekor mencit BALB/c diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Parasitologi FK Undip. Mencit dikandangkan pada suhu lingkungan normal dan diberi pakan standar serta diberi minum secara *ad libitum*.

3. Pengelompokan sampel:

Sehari setelah masa adaptasi selesai, dilakukan pengelompokan secara acak. Dua puluh empat ekor mencit BALB/c dikelompokkan ke dalam 4 kelompok yaitu kontrol, P1, P2, dan P3. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit.

4. Perlakuan tiap kelompok

a. Kelompok Kontrol

Menginfeksi mencit dengan MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) secara intraperitoneal, kemudian diinkubasi selama 16 jam dan setelahnya diberikan *aquabidest* 0,03 ml secara intraperitoneal.

b. Kelompok P1

Menginfeksi mencit dengan MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) secara intraperitoneal, kemudian diinkubasi selama 16 jam dan setelahnya diberikan terapi seftriakson dengan dosis 0,03 ml secara intraperitoneal.

c. Kelompok P2

Menginfeksi mencit dengan MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) secara intraperitoneal, kemudian diinkubasi selama 16 jam dan setelahnya diberikan minyak *N.sativa* dengan dosis 0,3 ml menggunakan sonde lambung.

d. Kelompok P3

Menginfeksi mencit dengan MRSA strain ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) secara intraperitoneal, kemudian diinkubasi selama 16 jam dan setelahnya diberikan terapi kombinasi seftriakson 0,03 ml secara intraperitoneal dengan minyak *N.sativa* 0,3 ml menggunakan sonde lambung.

Semua mencit diberikan pakan dan minum standar *ad libitum*.

Delapan jam setelah dilakukan terapi, mencit diterminasi dan dilakukan penghitungan jumlah kuman pada kultur otak yang ditanam pada media *nutrient agar*.

4.7.5.3 Prosedur Isolasi Kuman pada Otak

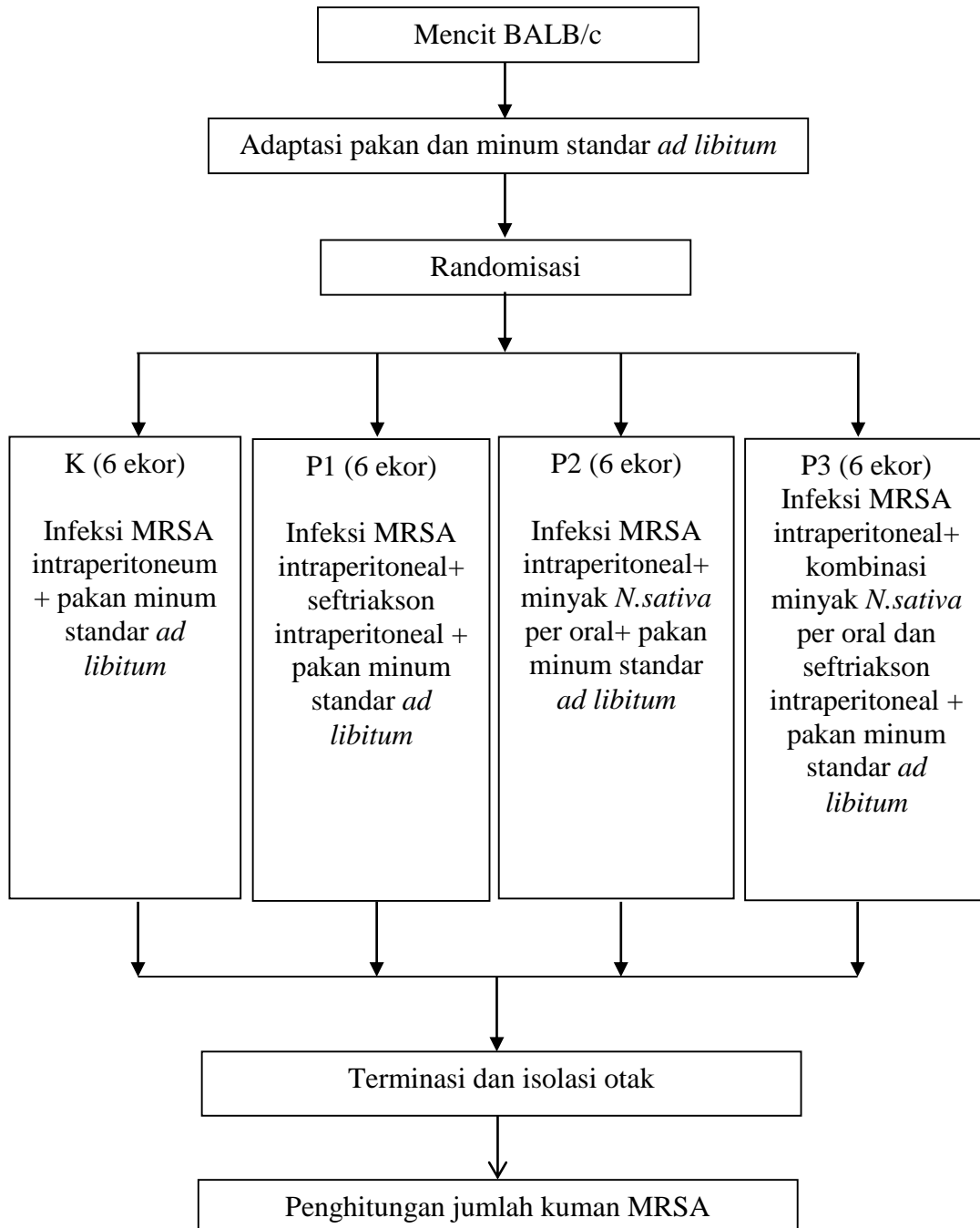
1. Melakukan persiapan alat dan bahan.
2. Membunuh mencit dengan dislokasi leher setelah diberi kloroform.
Memposisikan mencit tengkurap sehingga kepalanya mudah dijangkau, kemudian mengusapkan alkohol 70% di seluruh bagian kepala leher, lalu memotong leher mencit menggunakan gunting.
3. Menyisihkan kulit pada bagian kepala, kemudian menggunting tengkorak mencit dan mengambil seluruh bagian otak.
4. Memasukkan otak ke dalam vial steril, untuk mencegah kontaminasi.

4.7.5.4 Prosedur Penghitungan Jumlah Kuman MRSA^{54, 55}

1. Melakukan persiapan alat dan bahan.
2. Menimbang otak untuk mengetahui pengenceran yang dibutuhkan.
3. Menghancurkan otak hingga halus.

4. Membuat pengenceran 10^{-1} , dengan cara menambahkan mililiter NaCl 0,9% steril sesuai berat gram otak, dengan perbandingan 1:9. Satu bagian otak dan 9 bagian NaCl 0,9% steril, kemudian membuat suspensi menjadi homogen dengan *vortex mixer*.
5. Membuat pengenceran 10^{-2} dengan cara mengambil 1 ml suspensi otak dari pengenceran 10^{-1} , kemudian menambahkan 9 ml NaCl 0,9% steril. Membuat suspensi homogen dengan menggunakan *vortex mixer*.
6. Membuat pengenceran 10^{-3} dengan cara mengambil 1 ml suspensi otak dari pengenceran 10^{-2} , kemudian menambahkan 9 ml NaCl 0,9% steril. Membuat suspensi homogen dengan menggunakan *vortex mixer*.
7. Sampel dengan pengenceran berbeda-beda $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ditanam pada media *nutrient agar*, dengan cara mengambil 0,1 ml suspensi otak kemudian mensterilkan ose dan melakukan *streak* penuh di seluruh permukaan *nutrient agar*.
8. Penghitungan jumlah kuman dilakukan setelah agar diinkubasi selama 24 jam pada inkubator. Jumlah kuman dihitung dengan mengamati bentuk koloni bulat berwarna abu-abu atau kekuningan dan setelah koloni yang tumbuh dipastikan dengan pengecatan gram. Hasil penghitungan dicatat dalam cfu/ml.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

4.9.1 Pengolahan Data

4.9.1.1 Cleaning

Melakukan pembersihan data penelitian agar tidak terdapat data yang tidak diperlukan.

4.9.1.2 Editing

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

4.9.1.3 Coding

Melakukan coding untuk memudahkan dalam pengolahan data termasuk pemberian skor.

4.9.1.4 Entry

Memasukkan data dalam komputer untuk proses analisis data.

4.9.2 Analisis Data

Data dianalisis secara statistik dengan program komputer *SPSS for windows v.21*. Analisis deskriptif menampilkan nilai mean, median, maksimal, minimal, dan simpangan baku. Hasil ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik *box-plot*. Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Data dengan sebaran abnormal menggunakan uji *Kruskall-Wallis*, lalu dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

4.10 Etika Penelitian

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