

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

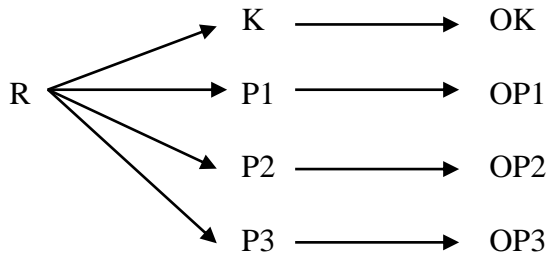
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

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

Penelitian dan pengumpulan data akan 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*. Objek yang digunakan dalam penelitian adalah mencit BALB/c jenis kelamin jantan. 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. Semua kelompok diberi injeksi kuman MRSA dengan jumlah yang sama. Terdapat tiga perlakuan yaitu dengan pemberian kombinasi seftriakson dan minyak *Nigella sativa*, seftriakson, serta minyak *Nigella sativa*. Sedangkan kelompok kontrol diberi injeksi kuman MRSA saja sebagai pembanding. Jumlah kuman dihitung dalam cfu/ml.



Gambar 4. Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Randomisasi

K : Kontrol

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA ATCC 43300 dengan dosis 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ dan diberi aquabides 0,03 ml secara intraperitoneal.

P1 : Perlakuan 1

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA ATCC 43300 dengan dosis 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal dan diberi seftriakson dengan dosis 0,03 ml¹³ secara intraperitoneal.

P2 : Perlakuan 2

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA ATCC 43300 dengan dosis 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal dan diberi minyak *Nigella sativa* dengan dosis 0,3 ml¹⁵ secara oral.

P3 : Perlakuan 3

Kelompok mencit yang diinfeksi MRSA ATCC 43300 dengan dosis 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal dan diberi terapi kombinasi seftriakson

dengan dosis 0,03 ml¹³ secara intraperitoneal dan minyak *Nigella sativa* dengan dosis 0,3 ml¹⁵ secara oral.

- 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 Centre* 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 sebelum dilakukan observasi.

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. 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 sehingga jumlah sampel seluruhnya 24 ekor mencit.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian minyak *Nigella sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson.

4.5.2 Variabel Terikat

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

4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Unit	Skala
1.	Seftriakson Antibiotik golongan betalaktam yang lebih stabil terhadap betalaktamase. Seftriakson didapatkan dari RS Telogorejo. Diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 0,03 ml.	ml	Nominal
2.	Minyak <i>Nigella sativa</i> Minyak didapatkan dari <i>Al – Ahlam Seed Oil Production</i> . Pemberian secara oral dengan dosis 0,3 ml.	ml	Nominal
3.	Jumlah kuman MRSA Perhitungan jumlah kuman yang diambil dari hati mencit BALB/c yang telah diinjeksikan MRSA strain ATCC 43300 secara intraperitoneal. Hitung kuman menggunakan metode <i>plate count</i> dengan cara <i>streak plate</i> dan dibiakkan pada media <i>nutrient agar</i> .	cfu/ml	Numerik

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Alat dan Bahan pada Pemilihan Antibiotik

4.7.1.1 Alat

1. Pemanas spirtus
2. Ose
3. Inkubator

4.7.1.2 Bahan

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

4.7.2 Alat dan Bahan pada Persiapan dan Perlakuan

4.7.2.1 Alat

4. Kandang hewan coba
5. Sonde lambung
6. Timbangan
7. Pemanas spirtus
8. Spuit 1 ml
9. Swab alkohol

4.7.2.2 Bahan

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

4.7.3 Alat dan Bahan pada Pengambilan Preparat Hati

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 Hitung Kuman MRSA

4.7.4.1 Alat

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

4.7.4.2 Bahan

1. Media *nutrient agar*

2. Kuman MRSA ATCC 43300
3. Spesimen hati yang akan dikultur

4.7.5 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer.

4.7.6 Cara Kerja

4.7.6.1 Prosedur Pemilihan Antibiotik

1. Mempersiapkan alat dan bahan.
2. Menanamkan kuman MRSA ATCC 43300 pada media *Mueller Hinton* dengan *streak* penuh.
3. Meletakkan disk antibiotik pada permukaan media tersebut.
4. Media di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Setelah 24 jam, mengukur luas zona hambat dari masing – masing antibiotik.

4.7.6.2 Prosedur Persiapan Sampel Penelitian

1. Mempersiapkan alat dan bahan
2. Adaptasi pada hewan coba
24 ekor mencit BALB/c diadaptasikan selama 7 hari di laboratorium. 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. 24 ekor mencit BALB/c dikelompokkan ke dalam empat kelompok

yaitu Kontrol, P1, P2, dan P3. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit.

4. Perlakuan tiap kelompok

a. Kelompok kontrol

Mencit diinfeksi MRSA ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal kemudian diberikan aquabides dengan dosis 0,03 ml secara intraperitoneal setelah diinkubasi selama 16 jam.

b. Kelompok P1

Mencit diinfeksi MRSA ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal kemudian diberikan terapi seftriakson dengan dosis 0,03 ml¹³ secara intraperitoneal setelah diinkubasi selama 16 jam.

c. Kelompok P2

Mencit diinfeksi MRSA ATCC 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal kemudian diberikan terapi minyak *Nigella sativa* dengan dosis 0,3 ml¹⁵ secara oral setelah diinkubasi selama 16 jam.

d. Kelompok P3

Mencit diinfeksi MRSA 0,2 ml (10^7 cfu/ml)³⁹ secara intraperitoneal kemudian diberikan terapi kombinasi seftriakson dengan dosis 0,03 ml¹⁴ secara intraperitoneal dan minyak *Nigella sativa* dengan dosis 0,3 ml¹⁵ secara oral setelah diinkubasi selama 16 jam.

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

Pada jam ke-24 mencit diterminasi dan dilakukan hitung koloni kuman pada media *nutrient agar*.

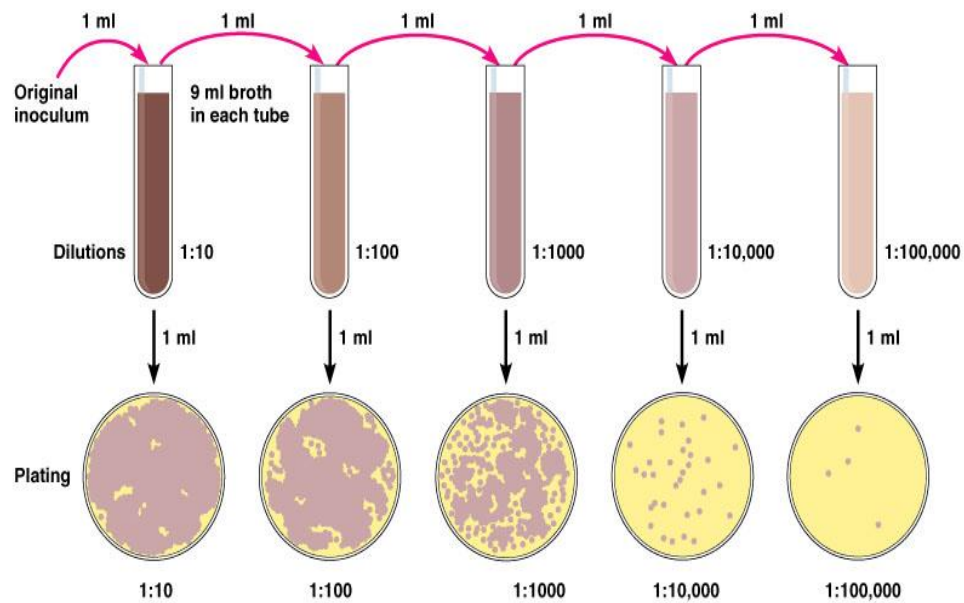
4.7.6.3 Prosedur Pengambilan Preparat Hati

1. Melakukan terminasi setelah 24 jam dengan dislokasi leher setelah dibius dengan kloroform. Meletakkan mencit pada posisi terlentang dan seluruh permukaan ventral disemprot dengan alkohol 70%.
2. Mengiris kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan pinset ke arah kepala dan ekor sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70% untuk menyingkirkan bulu – bulu yang rontok.
3. Membuka peitoneum, hati diambil secara aseptis untuk dilakukan kultur hitung koloni kuman MRSA.
4. Memasukkan sampel hati ke dalam vial.

4.7.6.4 Prosedur Hitung Kuman MRSA⁴⁰

1. Menimbang sampel hati untuk mengetahui beratnya dalam gram.
2. Pembuatan sampel dengan pengenceran dimulai dari pengenceran 10^{-1} kemudian dilanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} .
3. Pengenceran 10^{-1} dilakukan dengan cara mengambil sampel hati dan ditambahkan NaCl steril 90% dengan perbandingan 1:9, kemudian dihomogenkan dengan rotator.

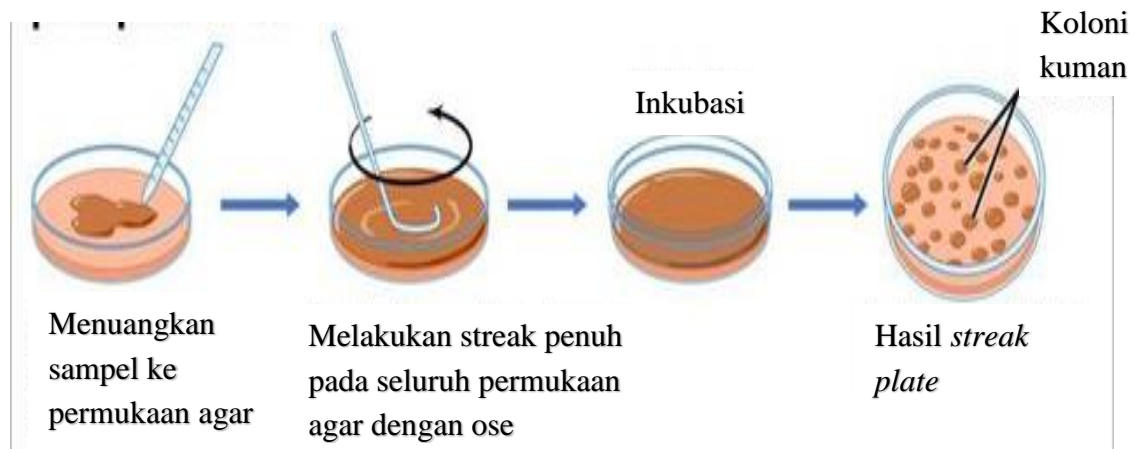
4. Pengenceran 10^{-2} dilakukan dengan cara mengambil 1 ml sampel dari hasil pengenceran 10^{-1} menggunakan mikropipet ditambahkan dengan 9 ml NaCl steril 90%.
5. Pengenceran 10^{-3} dilakukan dengan cara mengambil 1 ml sampel dari hasil pengenceran 10^{-2} menggunakan mikropipet ditambahkan dengan 9 ml NaCl steril 90%.



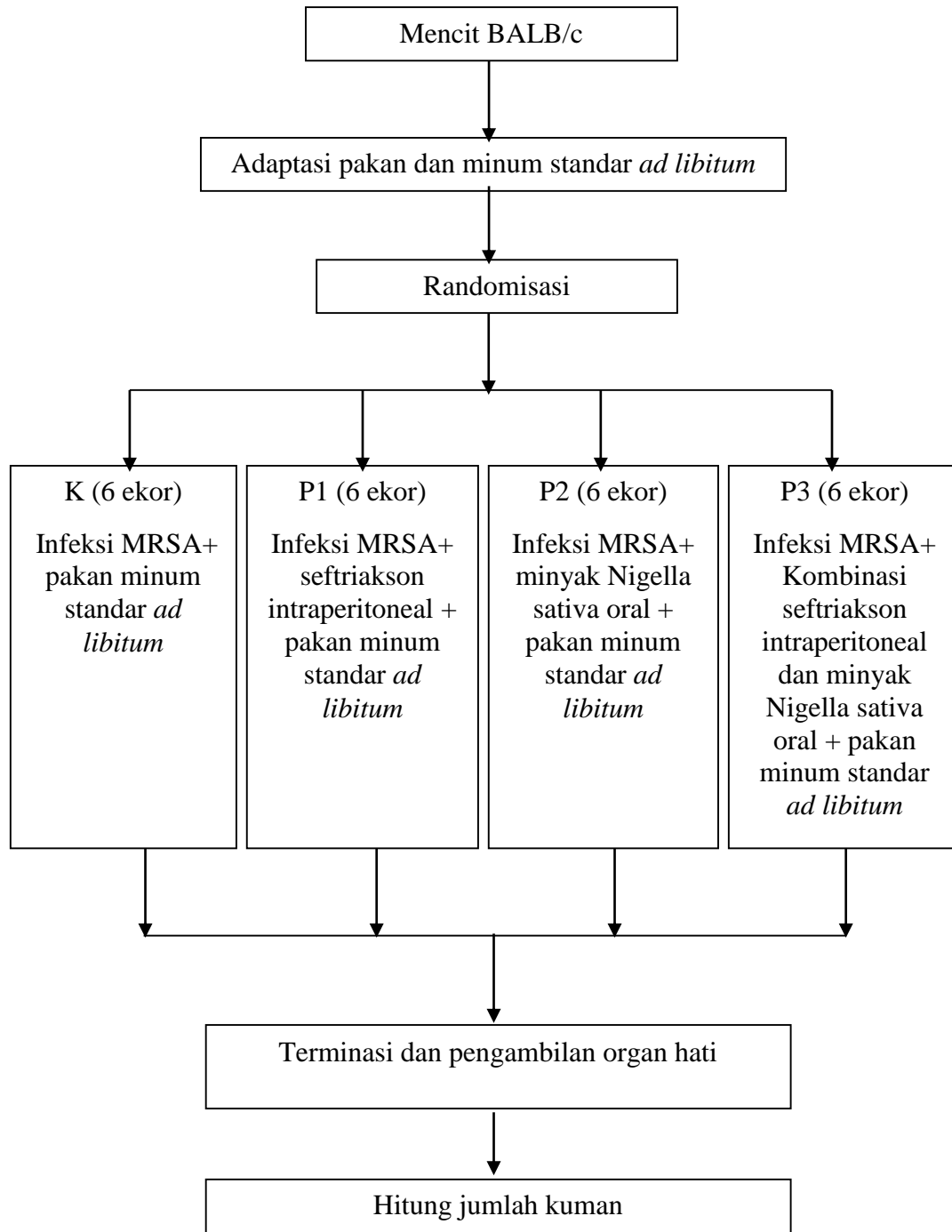
Gambar 5. Pengenceran pada metode *plate count*⁴¹

6. Sampel dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} masing – masing di ambil 100 μ l menggunakan mikropipet ke dalam media *nutrient agar* untuk di tanam dengan *streak* penuh pada seluruh permukaan media menggunakan ose yang telah disterilkan.
7. Media di inkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C sebelum dilakukan penghitungan jumlah kuman.

8. Penghitungan jumlah kuman dengan metode cfu/ml dimana jumlah kuman yang tumbuh dikalikan dengan pengencerannya.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

4.9.1 Pengolahan Data

4.9.1.1 Cleaning

Dilakukan pembersihan data penelitian agar tidak terdapat data yang tidak 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

Memasukkan data dalam komputer untuk proses analisis data.

4.9.2 Analisis Data

Data dianalisis secara statistik dengan program komputer. Analisis deskriptif menampilkan nilai mean, median, modus, simpangan baku. Hasil ditampilkan dalam bentuk table dan grafik bar. Dilakukan 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 dilakukan dengan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP dr Kariadi Semarang.