

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

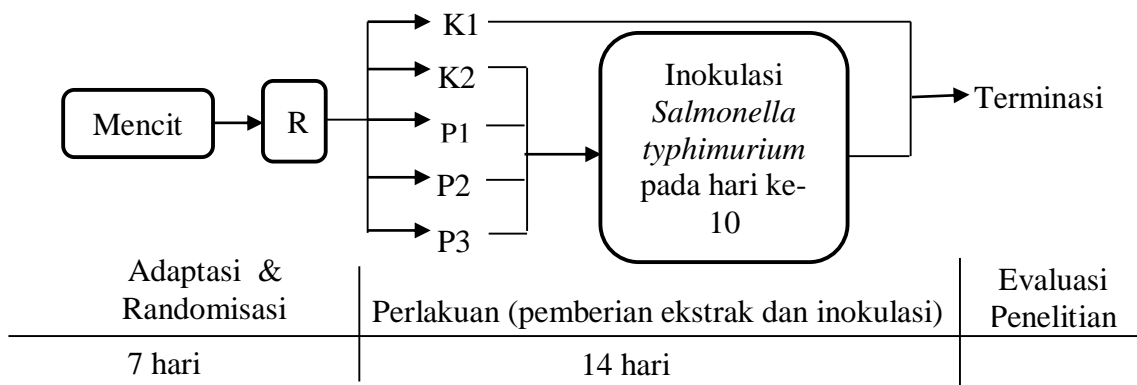
Penelitian ini meliputi bidang Histologi, Mikrobiologi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian, pengumpulan dan analisis data dilakukan dari bulan April-Mei 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari Kontrol 1 (K1) dan Kontrol 2 (K2) serta kelompok perlakuan yang terdiri dari Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3).



Gambar 5. Skema Penelitian

- R: Randomisasi
- K1: Kelompok kontrol 1, mencit hanya diberi 10 mg/mencit ekstrak daun sirih merah per oral dengan cara disonde selama 14 hari.
- K2: Kelompok kontrol 2, mencit hanya diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10.
- P1: Kelompok perlakuan 1, mencit diberi 10 mg/mencit ekstrak daun sirih merah peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- P2: Kelompok perlakuan 2, mencit diberi 30 mg/mencit ekstrak daun sirih merah peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- P3: Kelompok perlakuan 3, mencit diberi 100 mg/mencit ekstrak daun sirih merah peroral dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi

Populasi Target

Mencit Balb/c.

Populasi Terjangkau

Mencit jantan Balb/c, umur 8-12 minggu, berat badan 20-25 gram, sehat, yang diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.4.2 Sampel

Kriteria Inklusi

- a. Mencit jantan Balb/c
- b. Umur 8-12 minggu
- c. Berat badan 20 – 25 gram
- d. Sehat
- e. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit

Kriteria Eksklusi

- a. Selama diinfeksi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- b. Mati selama adaptasi dan perlakuan

3.4.3 Cara sampling

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara randomisasi pada 25 ekor mencit jantan Balb/c yang memenuhi kriteria.

3.4.4 Besar Sampel

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Jumlah minimal hewan coba per kelompok mengikuti rumus Federer²⁴ :

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

dimana t adalah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel per kelompok perlakuan. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan, maka didapatkan jumlah sampel per kelompok perlakuan adalah ≥ 5 ekor. Besar sampel juga ditentukan berdasarkan pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, yakni jumlah sampel minimal 5 ekor tiap kelompok.²⁵ Penelitian ini menggunakan jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok. Maka, besar sampel yang dibutuhkan adalah 25 ekor mencit Balb/c.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun sirih merah secara peroral dengan dosis bertingkat.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas fagositosis makrofag.

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun sirih merah dosis bertingkat	Ekstrak daun sirih merah dosis bertingkat (10, 30, dan 100 mg/hari/mencit) dalam bentuk gel yang dilarutkan dengan aquadest	Ordinal

Tergantung	Aktivitas fagositosis makrofag	Prosentase memfagosit dan indeks fagositosis makrofag	makrofag yang dinyatakan sebagai	Rasio
-------------------	--------------------------------	---	----------------------------------	-------

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

1. Mencit jantan strain Balb/c
2. Ekstrak daun sirih merah [**lihat lampiran 1**]
3. Alkohol 70%
4. Ether
5. Bahan untuk mengisolasi makrofag mencit [**lihat lampiran 3**]
6. Bahan untuk memeriksa fagositosis makrofag dengan Latex Beads [**lihat lampiran 4**]
7. Giemsa 20%
8. Bakteri *Salmonella typhimurium*
9. Makanan dan minuman mencit standar

3.7.2 Alat

1. Kandang mencit
2. Sonde
3. S spuit untuk injeksi *Salmonella typhimurium*
4. Alat untuk membuat ekstrak sirih merah [**lihat lampiran 1**]
5. Alat untuk mengisolasi makrofag mencit [**lihat lampiran 3**]
6. Alat untuk memeriksa fagositosis makrofag dengan Latex Beads [**lihat lampiran 4**]

3.7.3 Jenis data

Data yang diambil adalah data primer yang didapat dari indeks fagositosis makrofag pada kelompok perlakuan dengan dosis pemberian ekstrak daun sirih merah yang berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara kerja

Dua puluh lima ekor mencit jantan strain Balb/c dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Sepanjang penelitian mencit mendapat pakan dan minum standar yang sama *ad libitum*. Dilakukan adaptasi selama 1 minggu sebelum mencit diberi perlakuan.

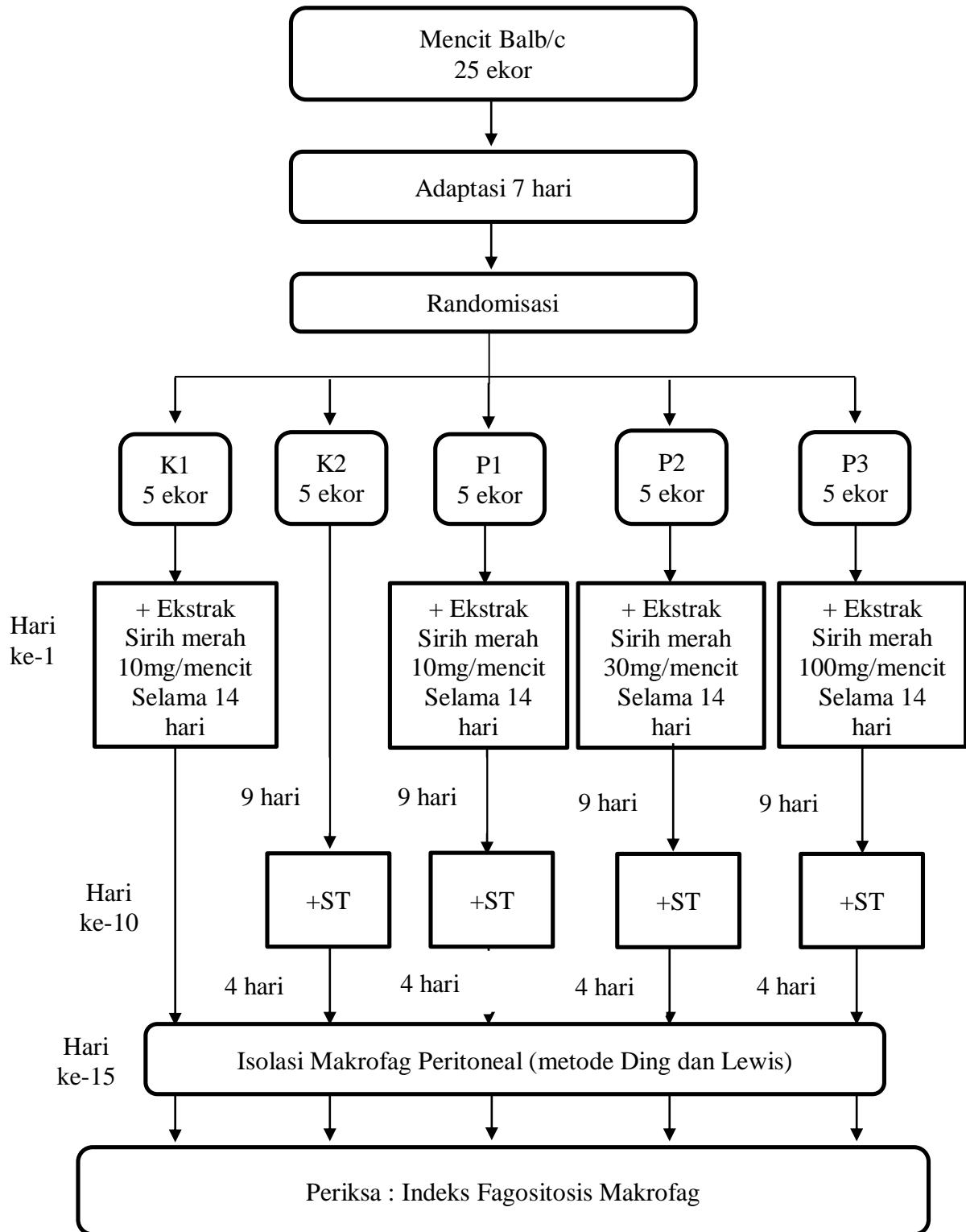
Setelah 1 minggu masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut: kelompok kontrol 1 atau K1 (hanya diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 10mg/hari/mencit selama 14 hari); kelompok kontrol 2 atau K2 (hanya diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10); kelompok perlakuan 1 atau P1 (diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 10mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10); kelompok perlakuan 2 atau P2 (diberikan ekstrak daun sirih merah dosis 30mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10); dan kelompok perlakuan 3 atau P3 (diberikan

ekstrak daun sirih merah dosis 100mg/hari/mencit selama 14 hari dan diinjeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-10).

Pemberian ekstrak daun sirih merah dilakukan setiap hari sekali selama 14 hari. Cara pembuatan dan dosis yang digunakan bersumber dari penelitian sebelumnya yang disesuaikan dan dibuat bertingkat [**Lampiran 1&2**]. Kuman *Salmonella typhimurium* yang digunakan dalam penelitian adalah strain *Salmonella* virulen (*phage type* 510) dengan LD⁵⁰ 10⁶ CFU. Sehingga 10⁵ organisme *Salmonella typhimurium* hidup dapat menginduksi respon imunitas seluler, dipilih karena pathogen ini merupakan organisme ideal dan banyak dijadikan model untuk mempelajari respon imun nonspesifik maupun spesifik terhadap infeksi bakteri intraseluler.²⁶

Setelah perlakuan selesai, mencit dianesthesia dengan ether selanjutnya mencit diterminasi dengan dislokasi cervical mencit. Kemudian masing-masing mencit dilakukan isolasi makrofag dari rongga peritoneumnya dengan metode Ding (1994) dan Lewis (1995)²⁷ [**Lampiran 3**]. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan aktivitas fagositosis makrofag dengan Latex Beads²⁸ [**Lampiran 4**].

3.8 Alur penelitian



3.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS for Windows*. Data yang telah diperoleh dari semua kelompok dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*. Data berdistribusi normal selanjutnya dilakukan *Test homogeneity of variance* untuk mengetahui homogenitas data. Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Kemudian dilakukan analisis lebih lanjut dengan metode *Post Hoc* untuk melihat besarnya perbedaan masing-masing kelompok. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Analisa deskriptif aktivitas fagositosis makrofag disajikan dalam bentuk tabel; *mean*, *standar deviasi*, dan grafik.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 656/EC/FK-RSDK/2016. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan percobaan diberi makan dan minum *ad libitum*. Perlakuan dosis bertingkat ekstrak sirih merah dicampur dengan aquadest kemudian disondekan. Mencit Balb/c diterminasi dengan cara diberi anestesi ether terlebih dahulu kemudian dilakukan dislokasi cervical. Pembuatan preparat sesuai dengan metode latex untuk pemeriksaan indeks fagositosis makrofag yang dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Seluruh biaya ditanggung oleh peneliti.