

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

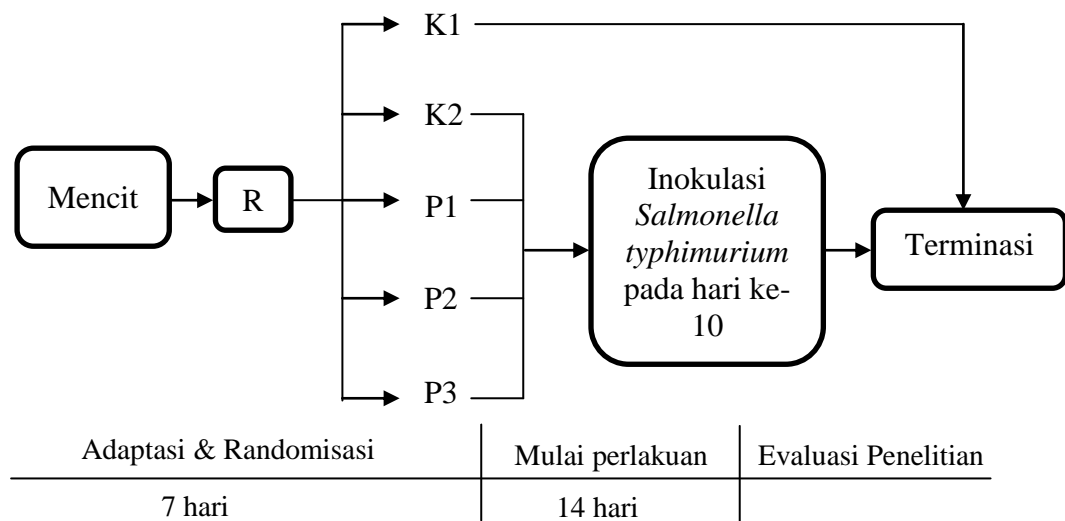
Penelitian ini meliputi bidang Histologi, Mikrobiologi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 2 bulan. Waktu pemberian perlakuan terhadap hewan coba selama 14 hari.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *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 7. Skema penelitian

R: Randomisasi

K1: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari.

K2: Mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10.

P1: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

P2: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

P3: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari 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 jantan.

Populasi Terjangkau

Mencit jantan Balb/c, umur 8-12 minggu, berat badan 20-25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomis, 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. Tidak ada kecacatan anatomis

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 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 Federer,³⁶

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

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.³⁷ 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 *Piper crocatum* dosis bertingkat peroral.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah respon proliferasi limfosit limpa.

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun <i>Piper crocatum</i> dosis bertingkat	Ekstrak daun <i>Piper crocatum</i> dosis bertingkat (10, 30, dan 100 mg/mencit/hari) dalam bentuk gel yang dilarutkan dengan aquadest	Ordinal
Tergantung	Respon proliferasi limfosit limpa	Aktivitas proliferasi limfosit limpa dengan metode MTT Assay setelah pembacaan dengan ELISA reader	Rasio

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

1. Mencit jantan strain Balb/c

2. Ekstrak daun sirih merah (Lampiran I)
3. Alkohol 70%
4. Ether
5. Bahan untuk mengisolasi dan mengkultur limfosit limpa mencit (Lampiran III)
6. Bahan untuk uji proliferasi limfosit limpa dengan metode MTT Assay (Lampiran IV)
7. Bakteri *Salmonella typhimurium*
8. 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 (Lampiran I)
5. Alat untuk mengisolasi dan mengkultur limfosit limpa mencit (Lampiran III)
6. Alat untuk uji proliferasi limfosit limpa dengan metode MTT Assay (Lampiran IV)

3.7.3 Jenis data

Data yang diambil adalah data primer yang didapat dari persen proliferasi limfosit limpa tiap 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 Universitas Diponegoro. Selama 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:

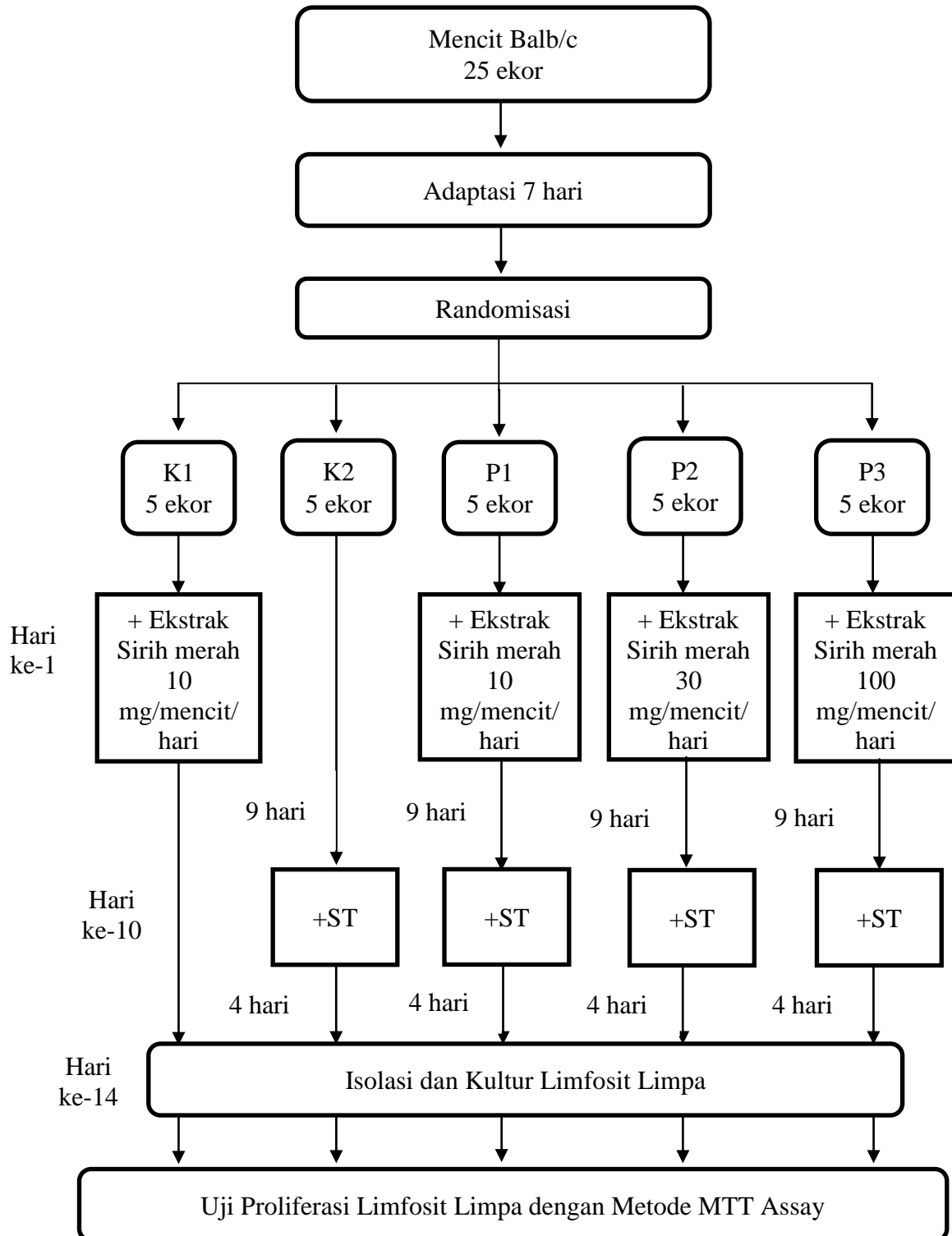
- K1: mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari dengan cara disonde selama 14 hari.
- K2: mencit diberi makan ad libitum dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intraperitoneal sebanyak 10^5 pada hari ke-10.
- P1: mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal.
- P2: mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari

ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal.

P3: mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal.

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. Setelah perlakuan selesai, mencit dianestesia dengan ether, selanjutnya mencit diterminasi dengan disklokasi cervical. Kemudian masing-masing mencit dilakukan isolasi jaringan limpa dan kultur limfosit limpa. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan uji proliferasi limfosit limpa dengan metode MTT Assay.

3.8 Alur penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dalam bentuk tabel dan grafik. 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 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.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah dimintakan *ethical clearance* dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor 574/EC/FK-RSDK/2016. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Unit Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan perobaan diberi makan dan minum *ad libitum*. Perlakuan dosis bertingkat ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) dicampur dengan aquadest kemudian disondekan. Mencit Balb/c diterminasi dengan cara dislokasi cervical. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologi pemeriksaan jaringan dan dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Seluruh biaya ditanggung oleh peneliti.

