

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang lingkup penelitian**

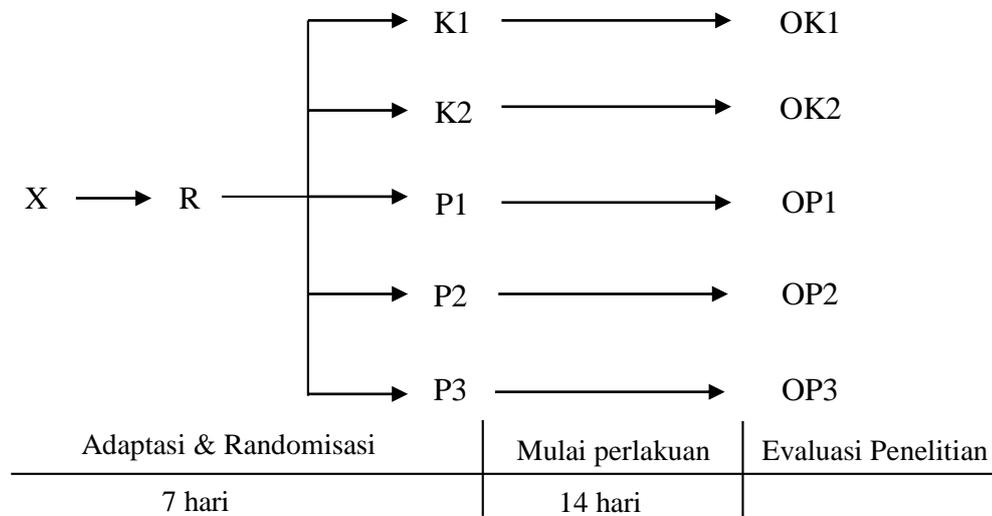
Penelitian ini meliputi bidang Histologi, Biokimia, Mikrobiologi, dan Farmakologi.

#### **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-Juni 2016.

#### **3.3 Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental 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 5. 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  $10^4$  pada hari ke 9.

P1: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari, kemudian pada hari ke-9 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak  $10^4$  intraperitoneal.

P2: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari, kemudian pada hari ke-9 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak  $10^4$  intraperitoneal.

P3: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 hari, kemudian pada hari ke-9 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak  $10^4$  intraperitoneal.

OK1: Pengamatan pada mencit kelompok kontrol 1

OK2: Pengamatan pada mencit kelompok kontrol 2

OP1: Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1

OP2: Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2

OP3: Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

### **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
- f. Tidak sakit selama adaptasi

#### **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,<sup>36</sup>

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

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  $\geq 5$  ekor. Besar sampel juga ditentukan berdasarkan pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, yakni jumlah sampel minimal 5 ekor tiap kelompok.<sup>37</sup> Penelitian ini menggunakan jumlah sampel 6 ekor tiap kelompok. Maka, besar sampel yang dibutuhkan adalah 25 ekor mencit C3H.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis bertingkat peroral.

#### 3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag.

### 3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
<b>Bebas</b>	Ekstrak daun sirih merah ( <i>Piper crocatum</i> )	Ekstrak daun sirih merah ( <i>Piper crocatum</i> ) dalam bentuk gel	Ordinal
<b>Tergantung</b>	Produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag	Jumlah NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag <i>peritoneum</i> yang diukur dengan Metode Griess dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer konvensional pada panjang gelombang 550nm (540-550 nm)	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 makrofag peritoneal mencit (Lampiran III)
6. Bahan untuk uji produksi NO (Nitrit Oksida) makrofag dengan metode Griess (Lampiran IV)
7. Bakteri *Salmonella thypimurium*
8. Makanan dan minuman mencit standar

#### **3.7.2 Alat**

1. Kandang mencit
2. Sonde
3. S spuit untuk injeksi *Salmonella thypimurium*
4. Alat untuk membuat ekstrak sirih merah (Lampiran I)
5. Alat untuk mengisolasi makrofag peritoneal mencit (Lampiran III)
6. Alat untuk uji produksi NO (Nitrit Oksida) makrofag dengan metode Griess (Lampiran IV)

#### **3.7.3 Jenis data**

Data yang diambil adalah data primer yang didapat dari produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag tiap kelompok perlakuan dengan dosis pemberian ekstrak daun sirih merah yang berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### 3.7.4 Cara kerja

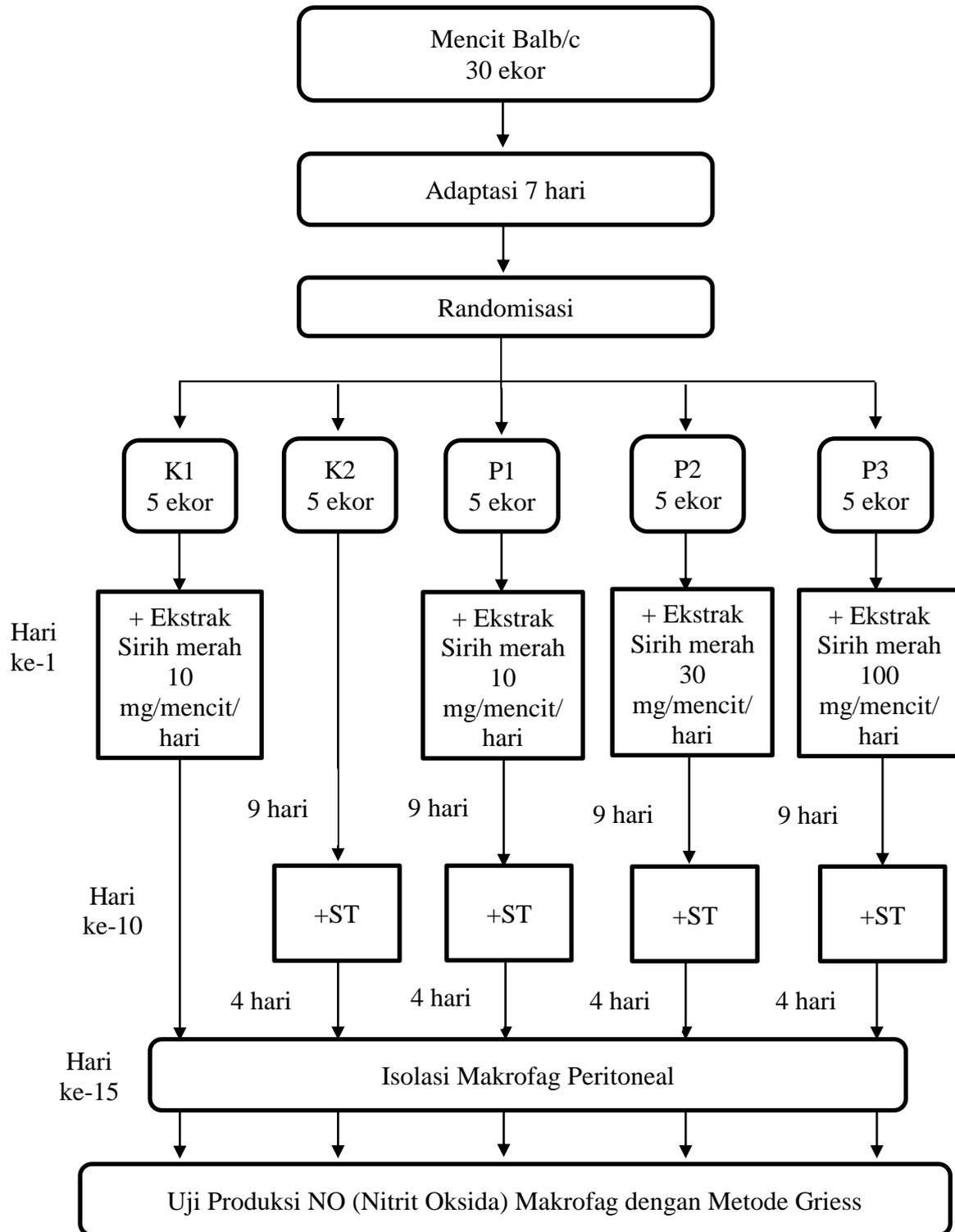
Dua puluh lima ekor mencit jantan strain Balb/c dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual di Laboratorium Sentral Universitas Diponegoro. Selama penelitian, mencit mendapat pakan dan minum standar 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 thypimurium* intraperitoneal sebanyak  $10^4$  pada hari ke-9.
- 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-9 diinfeksi dengan *Salmonella thypimurium* sebanyak  $10^4$  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-9 diinfeksi dengan *Salmonella thypimurium* sebanyak  $10^4$  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-9 diinfeksi dengan *Salmonella thypimurium* sebanyak  $10^4$  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 makrofag peritoneum. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan produksi NO (Nitrit Oksida) makrofag dengan metode Griess.

### 3.8 Alur penelitian



Gambar 6. 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 yang berdistribusi tidak normal dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis*. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok kemudian dianalisis dengan uji *Mann-Whitney U*. Data yang berdistribusi normal maka dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Kemudian dilakukan analisis lebih lanjut dengan metode *Post Hoc Tukey* untuk melihat besarnya perbedaan masing-masing kelompok.

### 3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah dimintakan *ethical clearance* dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 827/EC/FK-RSDK/2016. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium 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 diberi anestesi ether terlebih dahulu kemudian dilakukan dislokasi cervical. Pembuatan preparat sesuai dengan metode Metode Griess dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer konvensional pada panjang gelombang 550nm (540-550 nm). Seluruh biaya akan ditanggung oleh peneliti.