

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

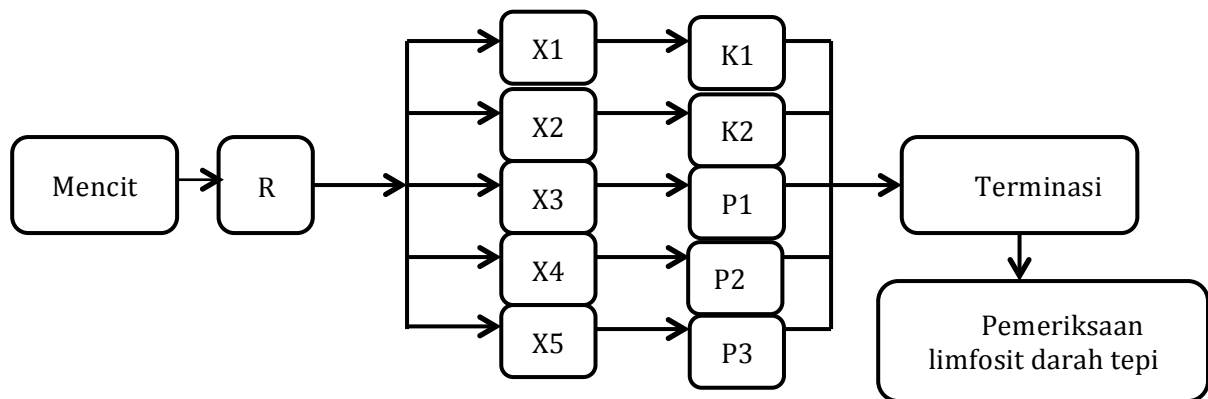
Penelitian ini meliputi bidang Histologi, Patologi Klinik, Mikrobiologi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Diponegoro dan Laboratorium Pemeliharaan Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 21 hari. Waktu pemberian perlakuan terhadap hewan coba adalah selama 14 hari.

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 10. Skema penelitian

R: Randomisasi

X1: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari.

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

X2: Mencit diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10.

K2: Kelompok mencit yang diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10.

X3: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

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

- X4: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- P2: Kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- X5: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- P3: Kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi

3.4.1.1 Populasi target

Mencit Balb/c jantan.

3.4.1.2 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

3.4.2.1 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.

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- a. Selama diberi 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. Besar sampel ditentukan berdasarkan pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, yakni jumlah sampel minimal 5 ekor tiap kelompok.³⁵ Sehingga 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 ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis bertingkat peroral.

3.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran limfosit darah tepi.

3.6 Definisi operasional

Tabel 3. Definisi operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>) dosis bertingkat peroral.	Ekstrak daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>) dalam bentuk gel yang didapatkan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol.	Ordinal
Tergantung	Gambaran limfosit darah tepi.	Presentase limfosit darah tepi yang didapatkan melalui preparat hapus darah tepi yang dilakukan hitung jenis menggunakan mikroskop cahaya. Presentase limfosit darah tepi didapat dari hitung jenis leukosit per 100 sel pada preparat darah hapus zona 4, 5, dan 6 dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x.	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. Eter
5. Bahan untuk melakukan pengecatan Giemsa pada pembuatan hapusan darah tepi (Lampiran III)
6. Bahan untuk pembacaan hitung jenis preparat
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 melakukan pengecatan Giemsa pada pembuatan hapusan darah tepi (Lampiran III)
6. Alat untuk pembacaan hitung jenis preparat

3.7.3 Jenis data

Data yang diambil adalah data primer yang didapat dari presentase hitung jenis leukosit darah tepi 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 dilakukan randomisasi dan dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan dilakukan adaptasi selama 7 hari di Laboratorium Pemeliharaan Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Selama penelitian, mencit mendapat pakan dan minum standar yang sama *ad libitum*.

Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut:

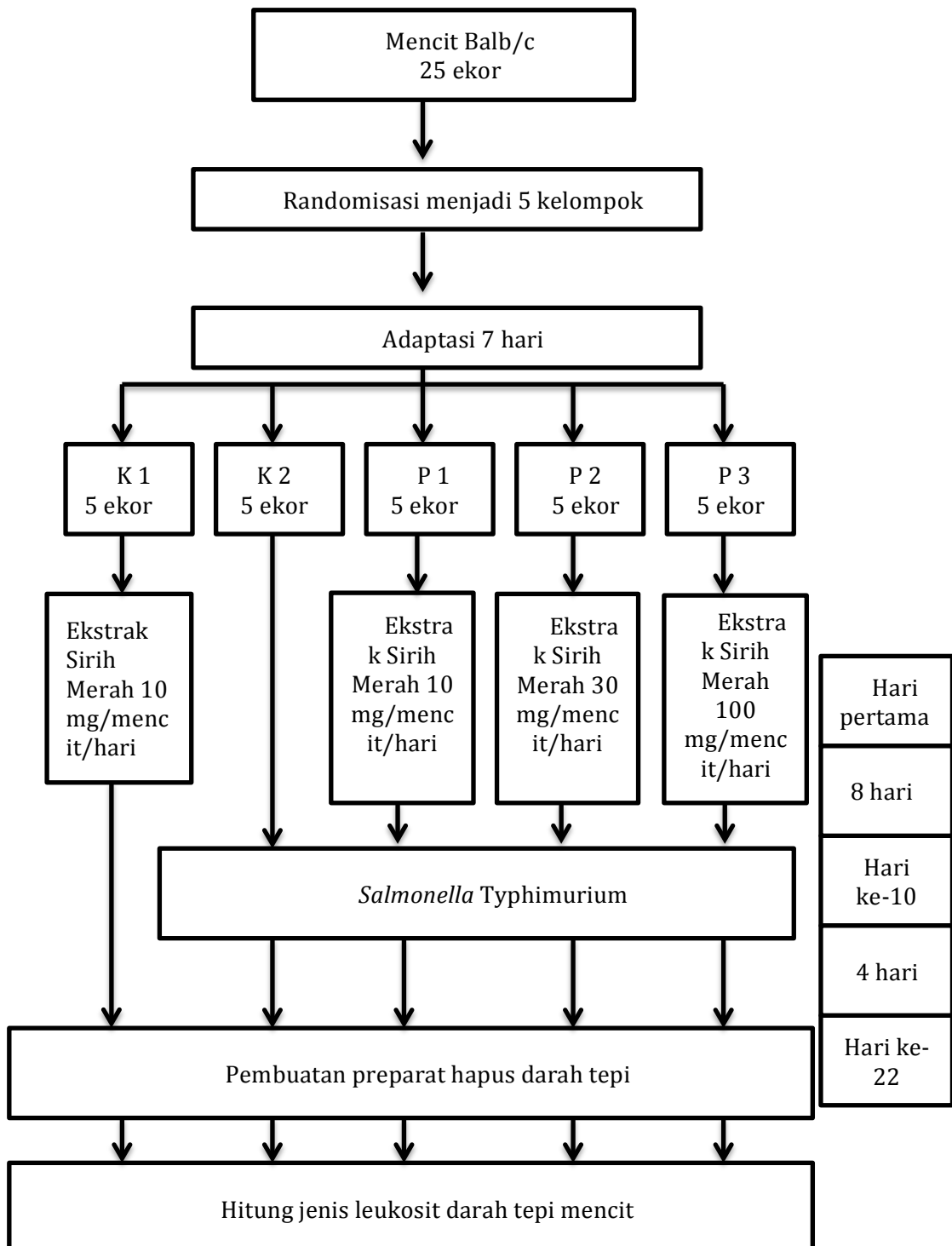
- X1: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/hari/mencit dengan cara disonde selama 14 hari.
- X2: Mencit diinfeksi *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10.
- X3: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/hari/mencit dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.
- X4: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 30 mg/hari/mencit dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari

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

X5: Mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/hari/mencit dengan cara disonde selama 14 hari, kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal.

Pemberian ekstrak daun sirih merah dilakukan setiap hari sekali selama 14 hari. Dosis dan cara pembuatan ekstrak yang digunakan bersumber dari penelitian terdahulu yang disesuaikan dan dibuat bertingkat. Bakteri *Salmonella* Typhimurium yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *Salmonella* virulen (*phage type* 510) dengan LD^{50} 10^6 CFU. Sehingga 10^5 CFU *Salmonella* dapat hidup dan menginduksi imunitas seluler. Setelah perlakuan selesai, mencit dianestesi dengan eter. Setelah itu dilakukan pengambilan darah tepi mencit dengan cara memotong ekor mencit dan kemudian dilakukan hapusan darah tepi menggunakan *object glass* dan *deck glass*. Mencit kemudian diterminasi dengan cara dilakukan disklokasi servikal. Jumlah limfosit darah tepi didapat dari hitung jenis leukosit per 100 sel pada preparat darah hapus zona 4, 5, dan 6 dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x.

3.8 Alur penelitian



Gambar 11. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer *IBM SPSS Statistics v3 for Mac*. Data yang telah diperoleh dari semua kelompok dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk.*. Kemudian dilakukan uji *Levene's Test* untuk menilai homogenitas dan dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok dinilai dengan uji *Post Hoc Tukey*.

3.10 Etika penelitian

Penelitian ini sudah dimintakan *ethical clearance* dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang dengan nomor 826/EC/FK-RSDK/2016. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Pemeliharaan Hewan 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 disklokasi servikal. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku patologi klinis untuk pembuatan preparat hapus darah tepi dengan metode pengecatan Giemsa. Seluruh biaya ditanggung oleh peneliti.