

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

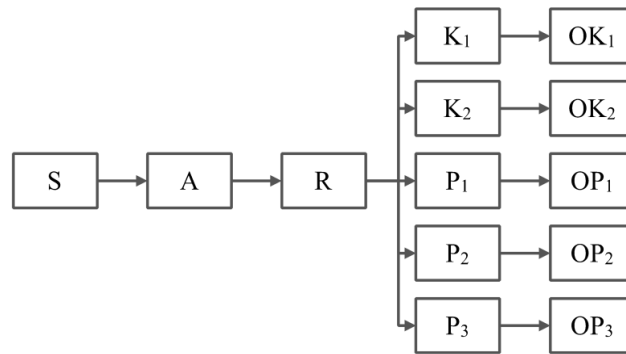
Ruang lingkup penelitian ini adalah ilmu farmakologi dan imunologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Perawatan tikus dan pemberian perlakuan dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (FK UNDIP). Pembuatan ekstrak dilakukan di laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Matematika UNDIP. Pengambilan sampel cairan intraperitoneal dan pemeriksaan mikroskopis dilakukan di Laboratorium Basah dan Kering FK UNDIP Semarang. Penelitian dilakukan selama 10 hari setelah adaptasi.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini ialah penelitian eksperimental laboratorium murni dengan rancangan *post test only control group design*. Subyek penelitian ialah tikus wistar jantan yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan. Seluruh kelompok mendapatkan pakan standar serta tambahan levamisol untuk kontrol positif dan sejumlah dosis ekstrak kulit batang *C. burmanii* untuk tiga kelompok perlakuan. Tikus diinjeksi *S. aureus* intraperitoneal pada hari ke-8.



Gambar 5 Desain penelitian

S = Sampel tikus wistar jantan

A = Masa adaptasi selama tujuh hari

R = Randomisasi sederhana

K₁ = Kelompok kontrol negatif

K₂ = Kelompok kontrol positif

P₁ = Kelompok perlakuan 1

P₂ = Kelompok perlakuan 2

P₃ = Kelompok perlakuan 3

OK₁ = Aktivitas dan kapasitas fagositosis kelompok kontrol negatif

OK₂ = Aktivitas dan kapasitas fagositosis kelompok kontrol positif

OP₁ = Aktivitas dan kapasitas fagositosis kelompok perlakuan 1

OP₂ = Aktivitas dan kapasitas fagositosis kelompok perlakuan 2

OP₃ = Aktivitas dan kapasitas fagositosis kelompok perlakuan 3

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi target

Populasi target adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus wistar jantan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.4.3 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) UGM dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.3.1 Kriteria inklusi

Kriteria inklusi untuk penelitian ini diantaranya

- Jenis tikus wistar jantan
- Tikus memiliki berat badan 150-220 g setelah adaptasi
- Tikus berusia 7 minggu sebelum adaptasi
- Tikus tidak memiliki kelainan secara anatomis
- Tikus aktif sebelum dan selama masa adaptasi

3.4.3.2 Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi untuk penelitian ini diantaranya

- Tikus sakit selama adaptasi
- Tikus mati selama perlakuan berlangsung

3.4.4 Cara sampling

Sampel diperoleh dengan metode randomisasi sederhana.

3.4.5 Besar sampel

Berdasarkan *Research Guidelines For Evaluating The safety and Efficacy of Herbal Medicine* dari WHO, tiap kelompok perlakuan terdiri dari minimal 5 ekor tikus. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok dengan 5 ekor pada setiap kelompok.²⁸

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak kulit batang kayu manis (*C. burmanii*).

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas fagositosis dan kapasitas fagositosis tikus wistar jantan.

3.6 Definisi operasional

Tabel 4 Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	Konsentrasiekstrak <i>C. burmanii</i> adalah <i>C. burmanii</i> yang diekstraksi menggunakan metode distilasi dengan pelarut ethanol. Terdapat tiga konsentrasi yaitu 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400mg/kgBB.	mg/kgBB	Numerik
2.	Aktivitas fagositosis adalah jumlah makrofag yang aktif melakukan fagositosis dalam 100 makrofag pada sediaan apus cairan intraperitoneal tikus wistar	Sel	Numerik
3.	Kapasitas fagositosis adalah jumlah <i>S. aureus</i> yang difagosit oleh 50 makrofag aktif pada sediaan apus cairan intraperitoneal tikus wistar	Sel	Numerik

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

Bahan yang diperlukan untuk penelitian ini diantaranya tikus wistar jantan, ransum pakan standard, serbuk kulit batang *C. burmanii*, ethanol, CMC, *S. aureus*, cat giemsa, alcohol, dan minyak emersi.

3.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, kandang tikus, timbangan hewan, sonde lambung, srynge, alat gelas, cawan petri, pipet Pasteur, pipet Eppendorf, seperangkat alat bedah steril, *sput disposable*, *object* dan *deck glass*, mikroskop cahaya, timbangan, maserator, dan distilator

3.7.3 Jenis data

Penelitian ini menghasilkan data primer yang diambil dari hasil pemeriksaan laboratorium pada tikus wistar jantan.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Adaptasi tikus wistar jantan

Tikus wistar jantan diadaptasi selama 1 minggu dalam kandang individu yang cukup luas agar tikus dapat bergerak bebas dan tidak stres. Tikus diberi pakan standar secara *ad libitum*.

3.7.4.2 Pengelompokkan

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dikelompokkan dengan metode randomisasi sederhana menjadi lima kelompok dengan 5 ekor tikus pada tiap kelompok. Lima kelompok tersebut yaitu Kelompok Kontrol Negatif (K_1),

Kelompok Kontrol Positif (K₂), Kelompok Perlakuan 1 (P₁), Kelompok Perlakuan 2 (P₂), dan Kelompok Perlakuan 3 (P₃).

3.7.4.3 Ekstraksi kulit batang *C. burmanii*

Ekstrak *C. burmanii* dibuat dari kulit batang *C. burmanii* menggunakan metode maserasi dan distilasi. Serbuk kulit batang *C. burmanii* dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Satu bagian serbuk kering kulit *C. burmanii* dimasukkan kedalam maserator, kemudian ditambahkan 9 bagian etanol 70%. Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara disentrifuse. Proses penyarian diulangi sekurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan penguap tekanan rendah sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang kemudian ditambahkan bahan pengisi 5% aerosil dan 65% amylum, setelah itu diaduk hingga merata dan siap untuk dikeringkan selama 10 jam dengan metode freeze drying. Ekstrak kering etanol *C. burmanii* yang didapatkan ditimbang sesuai dosis perlakuan untuk diberikan kepada tikus wistar jantan secara per oral.

3.7.4.4 Pemberian Perlakuan

Setelah adaptasi dan pengelompokan, tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya. K₁ diberi pakan standar dan aquades selama tujuh hari. K₂ diberi pakan standard dan levamisol dosis 2,5 mg/kgBB selama tujuh hari.¹⁸ P₁ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang *C. burmanii* dosis 100 mg/kg BB selama tujuh hari. P₂ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang *C. burmanii* dosis 200 mg/kg BB selama tujuh hari. P₃ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang *C.*

burmanii dosis 400 mg/kg BB selama tujuh hari. Dosis diperoleh dari penelitian sebelumnya yang memberikan hasil positif paling bermakna yaitu 200mg/kgBB.¹⁷ Dari dosis tersebut, dipilih dua dosis lainnya dengan membagi dua dan mengalikan dua sehingga didapat 100 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB.

3.7.4.5 Injeksi *S. aureus*

S. aureus diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP. Sebelumnya, *S. aureus* dikultur dalam media *blood agar plate* kemudian diambil 1-2 koloni menggunakan ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan sesuai standard larutan 0,5 *Mac Farland*. Suspensi kemudian disuntikkan pada tikus sebanyak 10^8 sebanyak 0,2 mL intraperitoneal.²⁹

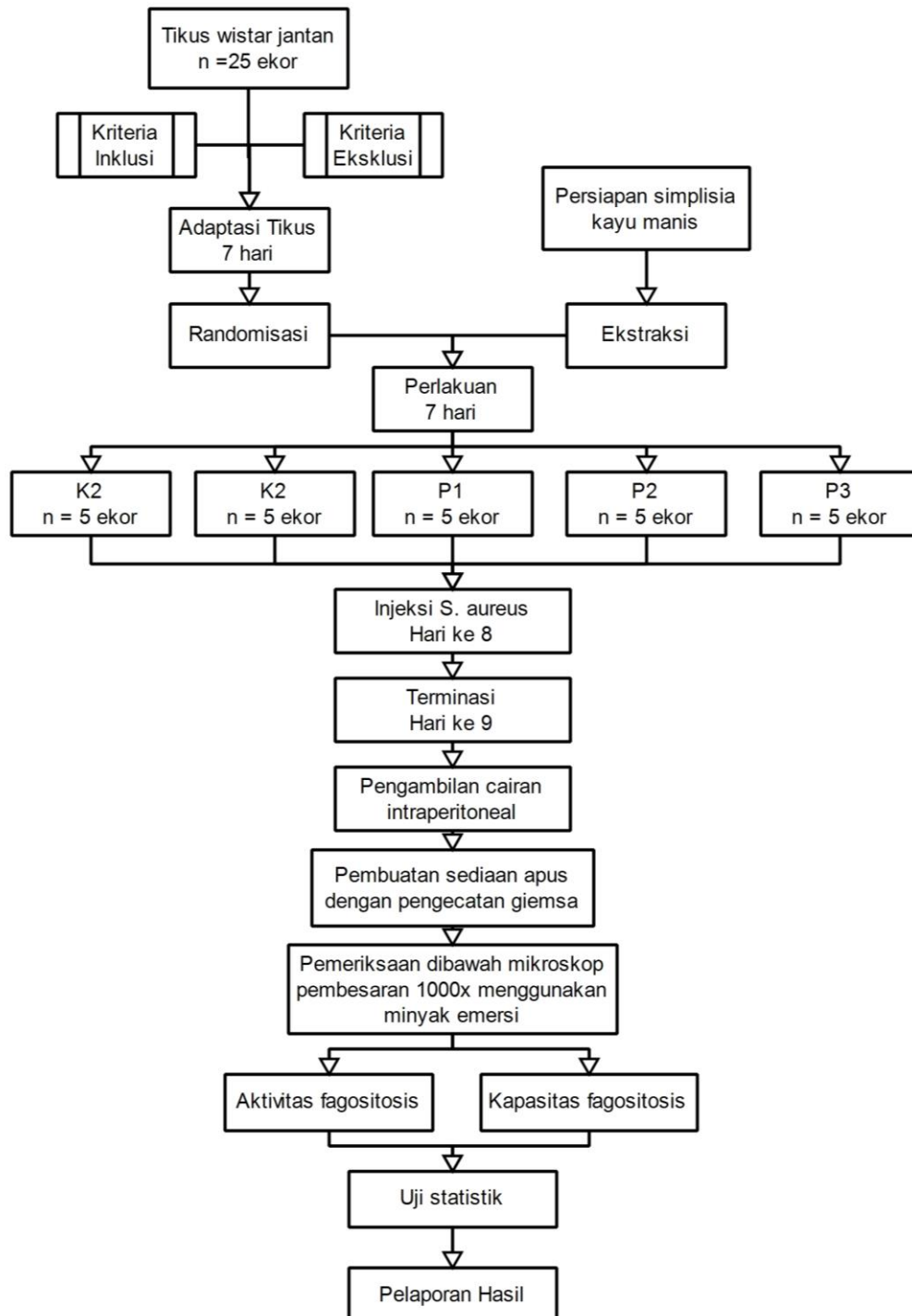
3.7.4.6 Pembedahan dan pengambilan cairan intraperitoneal

Tikus di terminasi sehari setelah hari terakhir perlakuan yaitu hari ke delapan dengan cara overdosis ether. Tikus diletakan pada meja operasi dalam posisi terlentang dan difiksasi pada telapak kaki depan dan belakang. Fiksasi dilakukan dengan menyematkan jarum pentul. Kulit abdomen di insisi dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70% (v/v). Cairan peritoneal ditampung dalam cawan petri kemudian diteteskan pada objek *glass* sebanyak satu tetes untuk dibuat preparat apus tipis. Preparat dibiarkan hingga mengering lalu diberi cairan methanol dan dibiarkan selama lima menit. Kemudian diberi cairan Giemsa 10% dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tisu.

3.7.4.7 Pemeriksaan dibawah mikroskop

Preparat diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dan menggunakan minyak emersi. Pemeriksaan dilakukan oleh dua orang pengukur kemudian dilakukan uji realibilitas antar pengukur menggunakan uji kappa.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 6 Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul telah dilakukan *cleaning*, *coding*, dan tabulasi. Data dikumpulkan dan diolah menggunakan program komputer. Jika distribusi data normal dilakukan analisis data menggunakan *one wayANOVA*. Bila hasil uji *one wayANOVA* menunjukan hasil yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *post hoc test* untuk mengetahui kebermaknaan antar kelompok perlakuan dengan $p \leq 0.05$. Jika distribusi data tidak normal, maka analisis data dilakukan menggunakan *Kruskal Wallis*.

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor 402/EC/FK-RSDK/2016.