

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian dalam bidang Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin dan Mikrobiologi.

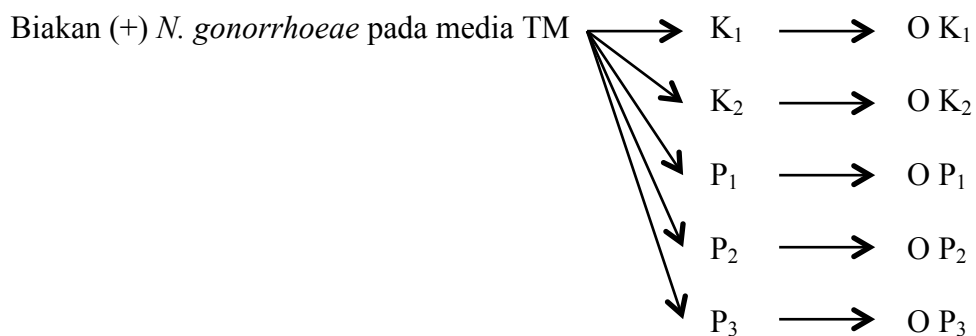
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang, Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang, dan Puskesmas Mangkang Semarang. Waktu penelitian dimulai pada bulan Maret sampai Mei 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *post-test only control group design*.

Berikut adalah tampilan dari skema rancangan penelitian:



Gambar 8. Rancangan penelitian

Keterangan:

K₁ = Kontrol Positif (Biakan (+) *N. gonorrhoeae*)

K₂ = Kontrol Negatif (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + formaldehida)

P₁ = Perlakuan (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + ekstrak daun kemangi 60%)

P₂ = Perlakuan (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + ekstrak daun kemangi 80%)

P₃ = Perlakuan (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + ekstrak daun kemangi 100%)

O K₁ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada K₁

O K₂ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada K₂

O P₁ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₁

O P₂ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₂

O P₃ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₃

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target penelitian ini adalah pasien dengan duh tubuh.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau penelitian ini adalah pasien dengan duh tubuh di Puskesmas Mangkang Semarang.

3.4.3 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah pasien dengan duh tubuh yang mengandung bakteri *Neisseria gonorrhoeae* di Puskesmas Mangkang Semarang, dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

- Penderita perempuan/laki-laki.
- Penderita dengan duh tubuh yang ditemukan bakteri diplokokus Gram negatif intraseluler pada pemeriksaan pengecatan Gram, tes oksidase positif, dan hasil kultur menunjukkan morfologi *Neisseria gonorrhoeae*.
- Bersedia mengikuti penelitian ini.

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah:

- Kultur steril.
- Hasil kultur menunjukkan ada beda morfologi dengan *Neisseria gonorrhoeae*.
- Hasil tes oksidase negatif.
- Pasien menstruasi.
- Pasien dengan kecurigaan keganasan serviks atau vagina.
- Mengonsumsi antibiotik 7 hari sebelum pemeriksaan.

3.4.4 Cara Sampling

Pemilihan subjek penelitian dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yakni berdasarkan kedatangan subjek penelitian di Puskesmas Mangkang Semarang. Pasien yang sesuai dengan kriteria penelitian telah dipakai sebagai subjek penelitian. Pengambilan sampel dihentikan setelah jumlah sampel terpenuhi.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer⁴⁰, yaitu:

$(t-1)(n-1) \geq 15$; dimana (t) adalah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah sampel per kelompok perlakuan.

$$\text{Besar sampel} = (t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Dari hasil perhitungan di atas, maka besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini untuk setiap kelompok perlakuan adalah minimal 9 sampel.

Sampel pada penelitian ini adalah biakan (+) *Neisseria gonorrhoeae* pada media *Thayer-Martin* dari penderita yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum Sanctum* L.).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Neisseria gonorrhoeae*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi	Unit	Skala
1.	Konsentrasi Ekstrak Daun Kemangi (<i>Ocimum sanctum</i> L.)	Ekstrak daun kemangi yang telah dilarutkan dengan etanol 96% dengan berbagai konsentrasi dalam bentuk cair. Dibagi menjadi konsentrasi 60%, 80%, dan 100%	% (v/V)	Nominal
2.	Pertumbuhan Bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tumbuhnya koloni bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i> pada media pertumbuhan. Dikategorikan menjadi: • Nilai 1 = jumlah koloni ≥ 1 • Nilai 0 = jumlah koloni = 0	Koloni	Nominal

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- Duh tubuh penderita yang ditemukan bakteri diplokokus Gram negatif intraseluler pada pemeriksaan pengecatan Gram, tes oksidase positif, dan hasil kultur menunjukkan morfologi *Neisseria gonorrhoeae*.
- Media transport *Thayer-Martin* cair.
- Reagen pengecatan Gram yang terdiri dari:
 - Gram A (Karbolf Gentian Violet)
 - Gram B (Lugol)
 - Gram C (Alkohol 96%)

- Gram D (Air Fuchsin/Safranin)
- Reagen tes oksidase yang terdiri dari:
 - Dimethyl-para-phenyldiamin-hydrochlorid
 - Aquades
- Formaldehida
- NaCl fisiologis
- Etanol 96%
- Ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) dengan konsentrasi 60%, 80%, dan 100%.
- Media *Thayer-Martin* yang dicampur ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) dengan konsentrasi masing-masing 60%, 80%, dan 100%.

Susunan media *Thayer-Martin*:

- Mueller hinton agar.
- 5% Coklat agar dengan darah domba.

3.7.2 Alat

- Lidi kapas
- Spekulum
- Osse
- Lampu spiritus
- *Object glass*
- Mikroskop

- Pipet
- Pinset
- Cawan petri
- Oven
- Blender
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter
- Gelas ekstraksi
- *Rotatory evaporator*
- Tabung reaksi
- Mikropipet

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian merupakan data primer yaitu berupa identitas dan riwayat penyakit dahulu penderita lewat anamnesis. Data lain yaitu pertumbuhan bakteri yang telah diamati dari ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada media pertumbuhan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.).

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Cara Pengambilan Sekret

- 1) Jelaskan kepada pasien tentang tindakan yang akan dilakukan. Pada pasien wanita, dibaringkan di meja ginekologi dalam posisi

litotomi, sedangkan pasien pria dapat diambil dalam posisi berdiri ataupun duduk.

- 2) Cuci tangan dan gunakan sarung tangan serta alat pelindung diri sebelum memulai tindakan.
- 3) Pada pasien wanita, ambil spekulum cocor bebek steril dengan tangan kanan, tangan kiri membuka labia mayora kemudian memasukkan spekulum dalam kondisi tertutup dan tegak ke dalam vagina.
- 4) Masukkan spekulum perlahan dan sampai ujung, putar perlahan sambil membuka spekulum sehingga posisi mendatar.
- 5) Cari portio serviks vagina, setelah ditemukan kunci spekulum sehingga portio serviks terfiksasi.
- 6) Ambil sekret dengan lidi kapas, oleskan sebagian pada *object glass*. Kemudian masukkan lidi kapas tersebut ke dalam tabung yang berisi media transport *Thayer-Martin* cair.
- 7) Setelah selesai, lepaskan kunci spekulum sehingga spekulum dalam posisi tertutup. Putar spekulum sampai dengan posisi tegak lurus, kemudian keluarkan spekulum secara perlahan.
- 8) Pada pasien pria, sekret diambil dari uretra yaitu dengan cara masukkan lidi kapas ke dalam meatus uretra eksterna, lalu usap dengan memutar lidi kapas mengelilingi uretra.

- 9) Oleskan sebagian sekret yang diambil pada *object glass*. Dan sebagian lagi masukkan ke dalam tabung yang berisi media transport *Thayer-Martin* cair.

3.7.4.2 Cara Pengecatan Gram

- 1) Fiksasi sekret yang telah dioleskan pada *object glass*.
- 2) Setelah terfiksasi, genangi *object glass* dengan Gram A, biarkan selama setengah menit.
- 3) Buang Gram A dan alirkan air di atas *object glass*.
- 4) Genangi *object glass* dengan Gram B. Tunggu selama setengah menit.
- 5) Buang Gram B, kemudian aliri dengan Gram C.
- 6) Buang Gram C, kemudian aliri dengan Gram D.
- 7) Cuci dengan air, kemudian keringkan dengan tissue.
- 8) Setelah kering, tetesi dengan minyak emersi pada lapangan pandang yang ingin dilihat, kemudian lihat di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa ukuran 10x100 dengan perbesaran 1000x.
- 9) Apabila positif akan ditemukan diplokokus Gram negatif intrasel dan ekstrasel.

3.7.4.3 Cara Tes Oksidase

- 1) Siapkan reagen tes oksidase cair yang akan digunakan.

- 2) Ambil koloni bakteri yang sudah tumbuh dengan menggunakan osse, lalu letakkan pada *object glass*.
- 3) Tetesi koloni bakteri pada *object glass* tersebut dengan beberapa tetes reagen oksidase.
- 4) Tunggu beberapa menit. Hasil tes oksidase positif jika timbul warna biru/ungu tua pada reagen yang telah ditambahkan bakteri. Hasil tes oksidase negatif jika reagen tetap bening setelah ditambah bakteri.

3.7.4.4 Cara Kultur dan Ekstraksi pada Media

- 1) Sekret vagina yang telah terdiagnosis positif Gram negatif dengan tes oksidase positif diambil kemudian dikultur menggunakan media *Thayer-Martin*, dibiakkan selama 24-48 jam pada suhu kamar (37°C).
- 2) Pembuatan media kontrol positif dilakukan dengan cara membuat media *Thayer-Martin* seperti pada umumnya tanpa ditambahkan ekstrak daun kemangi (konsentrasi ekstrak 0%).
- 3) Pembuatan media kontrol negatif dilakukan dengan cara membuat media *Thayer-Martin* yang ditambahkan dengan formaldehida.
- 4) Pada pembuatan media berikutnya, digunakan campuran dari media *Thayer-Martin* ditambah dengan ekstrak daun kemangi. Jumlah atau komposisi *Thayer-Martin* yang digunakan disesuaikan

dengan perbandingan masing-masing konsentrasi ekstrak daun kemangi (60%, 80%, dan 100%).

- 5) Setelah media kontrol dan perlakuan (media yang ditambah ekstrak) telah tersedia, koloni bakteri yang telah tumbuh dari cara nomor 1, dicampurkan dengan NaCl fisiologis untuk dibandingkan dengan standar McFarland 0,5.
- 6) Setelah itu, ambil larutan yang telah berisi bakteri dengan mikropipet. Teteskan larutan tersebut pada masing-masing media kontrol dan perlakuan yang berada di dalam tabung reaksi.
- 7) Lakukan inkubasi pada seluruh media dan kemudian lakukan pembacaan hasil.

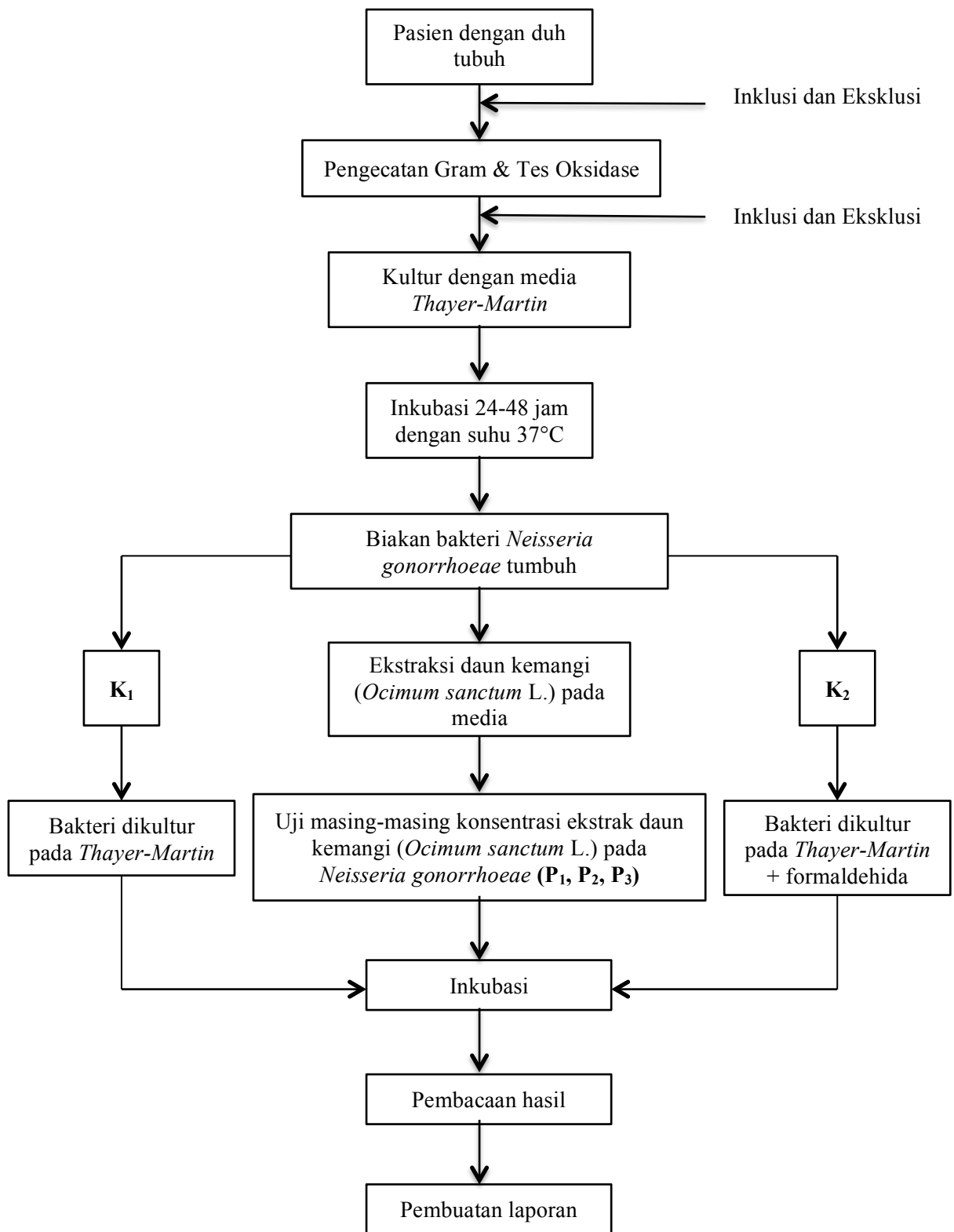
3.7.4.5 Cara Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

- 1) Daun kemangi dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C.
- 2) Kemudian dihaluskan dengan blender (dibuat simplisia).
- 3) Timbang sebanyak 500 gram (sampel kering)*.
- 4) Masukkan 500 gram hasil blenderan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter (wadah tertutup)*.
- 5) Lalu tambahkan dengan hasil etanol 96% sampai volume 1000cc.
- 6) Kocok/aduk sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan diamkan sampai mengendap. Kemudian tutuplah.
- 7) Inkubasi (biarkan) selama 5 x 24 jam dalam suhu ruangan.

- 8) Setiap hari dikocok/diaduk selama 30 menit.
- 9) Setelah itu, lapisan paling atas dari larutan campuran etanol 96% diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan *rotary evaporator*.
- 10) Setelah evaporasi selesai, maka ekstrak dapat langsung digunakan.

* Berat dan volume yang digunakan tergantung kebutuhan yang digunakan.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Sebelum data dianalisis, telah dilakukan pengolahan data terlebih dahulu. Pengolahan data meliputi *cleaning*, *editing*, *coding*, dan *entrying*. Data dianalisis menggunakan program komputer.

Analisis data dalam penelitian ini meliputi analisis deskriptif untuk menggambarkan karakteristik setiap variabel penelitian. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Chi-Square* (X^2) karena semua variabel bebas dan variabel terikat berskala kategorik (nominal). Jika syarat uji *Chi-Square* tidak terpenuhi, maka uji yang digunakan adalah uji *Fisher* dan bermakna bila $p < 0,05$.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance dimintakan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atau RS Nasional Diponegoro Semarang. Persetujuan penelitian diberikan dalam bentuk *informed consent* tertulis. Subjek penderita atau calon subjek penelitian telah diberi penjelasan tentang tujuan, manfaat, dan prosedur penelitian. Penderita berhak menolak untuk diikutsertakan pada penelitian. Penderita yang menolak tetap mendapat pengelolaan dan penanganan sesuai dengan protap gonore. Identitas subjek penelitian dirahasiakan dan tidak dipublikasikan tanpa seijin subjek penelitian. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian telah ditanggung oleh peneliti.

3.11 Pelaksanaan Penelitian

Tabel 3. Pelaksanaan penelitian

Kegiatan	Bulan Januari 2016				Februari 2016				Maret 2016				April 2016				Mei 2016				Juni 2016			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literatur dan penyusunan proposal	■	■	■	■																				
Seminar proposal						■																		
<i>Ethical clearance</i>							■	■																
Perizinan ke instansi terkait									■	■														
Penelitian											■	■	■	■	■	■								
Analisis data dan penulisan laporan																	■	■	■	■	■	■	■	■
Seminar hasil																						■	■	■