

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

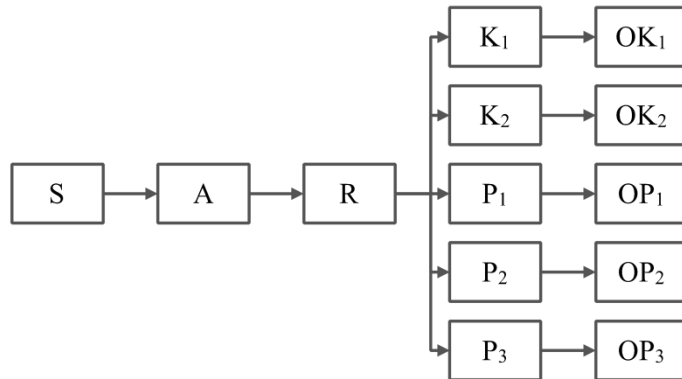
Ruang lingkup penelitian ini adalah ilmu farmakologi dan imunologi.

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 darah tepi dan pemeriksaan mikroskopis dilakukan di Laboratorium Basah dan Kering FK UNDIP Semarang. Penelitian dilakukan selama 10 hari terhitung setelah adaptasi.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ialah penelitian eksperimental laboratorium murni dengan rancangan *post test only control group design*. Subyek penelitian ini ialah tikus wistar jantan. Dalam penelitian ini digunakan 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 *Cinnamomum burmanii* untuk tiga kelompok perlakuan. Tikus diinjeksi *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal pada hari ke-8.



Gambar 4. 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 = Hitung jenis leukosit darah tepi kelompok kontrol negatif

OK₂ = Hitung jenis leukosit darah tepi kelompok kontrol positif

OP₁ = Hitung jenis leukosit darah tepi kelompok perlakuan 1

OP₂ = Hitung jenis leukosit darah tepi kelompok perlakuan 2

OP₃ = Hitung jenis leukosit darah tepi 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 tidak mau makan dan minum
- 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.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

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

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hitung jenis leukosit tikus wistar jantan.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	Konsentrasi ekstrak <i>Cinnamomum burmanii</i> adalah <i>Cinnamomum burmanii</i> yang diekstraksi menggunakan metode distilasi dengan pelarut ethanol. Terdapat tiga konsentrasi yaitu 100mg/kgBB, 200mg/kgBB dan 400 mg/kgBB	mg/kgBB	Numerik
2.	Hitung jenis leukosit adalah perhitungan dan pengelompokan sesuai jenis leukosit yang tampak pada hapusan darah per 100 sel leukosit yang dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x	Sel	Numerik

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

Bahan yang diperlukan untuk penelitian ini diantaranya, tikus wistar jantan, ransum pakan standar, serbuk kulit batang *Cinnamomum burmanii*, ethanol, CMC, *Staphylococcus aureus*, cat giemsa, EDTA 10%, dan minyak emersi.

3.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, kandang hewan, timbangan hewan, sonde lambung dan *srynge*, alat gelas, botol penampung darah, seperangkat alat bedah steril, *sputit disposable*, *object* dan *deck glass*, *Spreader*, *cell counter*, 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 yang cukup luas agar tikus dapat bergerak bebas dan tidak stres. Tikus diberi pakan standar setiap hari selama 1 minggu.

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 (K_2), Kelompok Perlakuan 1 (P_1), Kelompok Perlakuan 2 (P_2), dan Kelompok Perlakuan 3 (P_3).

3.7.4.3 Ekstraksi Kulit Batang *Cinnamomum burmanii*

Ekstrak kayu manis dibuat dari kulit batang *Cinnamomum burmanii* menggunakan metode maserasi dan distilasi. Serbuk kulit batang kayu manis dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Satu bagian serbuk kering kulit kayu manis dimasukan 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 kayu manis (*Cinnamomum 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 standard dan CMC selama tujuh hari. K₂ diberi pakan standard dan levamisol dosis 2,5 mg selama tujuh hari. P₁ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang kayu manis dosis 100 mg/kg BB selama tujuh hari.³⁴ P₂ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang kayu manis dosis 200 mg/kg BB selama tujuh hari. P₃ diberi pakan standard dan ekstrak kulit batang kayu manis dosis 400 mg/kg BB

selama tujuh hari. Dosis diperoleh dari penelitian sebelumnya yang memberikan hasil positif yang paling bermakna yaitu 200mg/kgBB.¹³ Dari dosis tersebut, dipilih dua dosis lainnya dengan membagi dua dan mengalikan dua sehingga didapat 100mg/kgBB dan 400mg/kgBB.

3.7.4.5 Injeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP. Sebelumnya, *Staphylococcus 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 CFU/ml sebanyak 0,2 ml intraperitoneal.

3.7.4.6 Pengambilan sampel darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-9 melalui vena lateralis ekor tikus sebanyak 0,5cc. Kemudian darah tersebut ditampung dalam botol tempat penampung darah yang diberi bahan antikoagulan (EDTA) dengan perbandingan setiap 1 ml darah membutuhkan 1 mg EDTA lalu segera darah dicampur pelan dengan gerakan melingkar di atas meja supaya darah dan bahan antikoagulan tercampur merata.

3.7.4.7 Pembuatan sediaan hapusan darah

1. Ambil object glass yang bersih, letakkan 1 tetes darah di sisi kanan
2. Sentuh tetesan darah dengan spreader, darah akan melebar sepanjang *spreader*
3. Dorong spreader ke arah kiri pada sudut kemiringan 45°
4. Biarkan sediaan hingga kering
5. Amati preparat, baik jika : tipis, rata, tidak terputus putus, ekor tidak robek, bentuk seperti peluru
6. Fiksasi dengan methanol 90% selama 10 menit (beberapa referensi menyebutkan cukup 2-3 menit)
7. Buat pengenceran antara Giemsa stock dan Buffer Sorensen dengan perbandingan 1 : 9
8. Kemudian sediaan diletakkan diatas rak pengecatan, tuangi dengan cat Giemsa (yang sudah diencerkan) selama 15 menit
9. Cuci sediaan dengan air mengalir, hingga bersih
10. Keringkan, setelah kering dapat diolesi lacquer
11. Pembacaan dilakukan pada perbesaran 100x

3.7.4.8. Pengukuran hitung jenis leukosit

Penghitungan jenis leukosit dilakukan dengan mengadakan identifikasi jenis leukosit per 100 leukosit. Jenis sel leukosit pada hitung jenis yaitu eosinofil,

basofil, stab neutrofil, segmen neutrofil, limfosit dan monosit. Penghitungan ini dilakukan pada daerah penghitung. Dimulai dari satu sisi dan bergerak menuju sisi yang lain. Untuk memudahkan penghitungan dapat digunakan kolom-kolom untuk macam- macam leukosit dan masing-masing dibagi 10. Leukosit yang kita lihat mula-mula dicatat pada kolom no.1. Bila jumlahnya sudah sepuluh, pindah mengisi kolom kedua dan seterusnya. Jadi tiap-tiap kolom mengandung 10 leukosit. Untuk mengurangi bias subjektivitas dilakukan uji lanjutan berupa uji kappa.

Tabel 3. Kolom hitung jenis leukosit

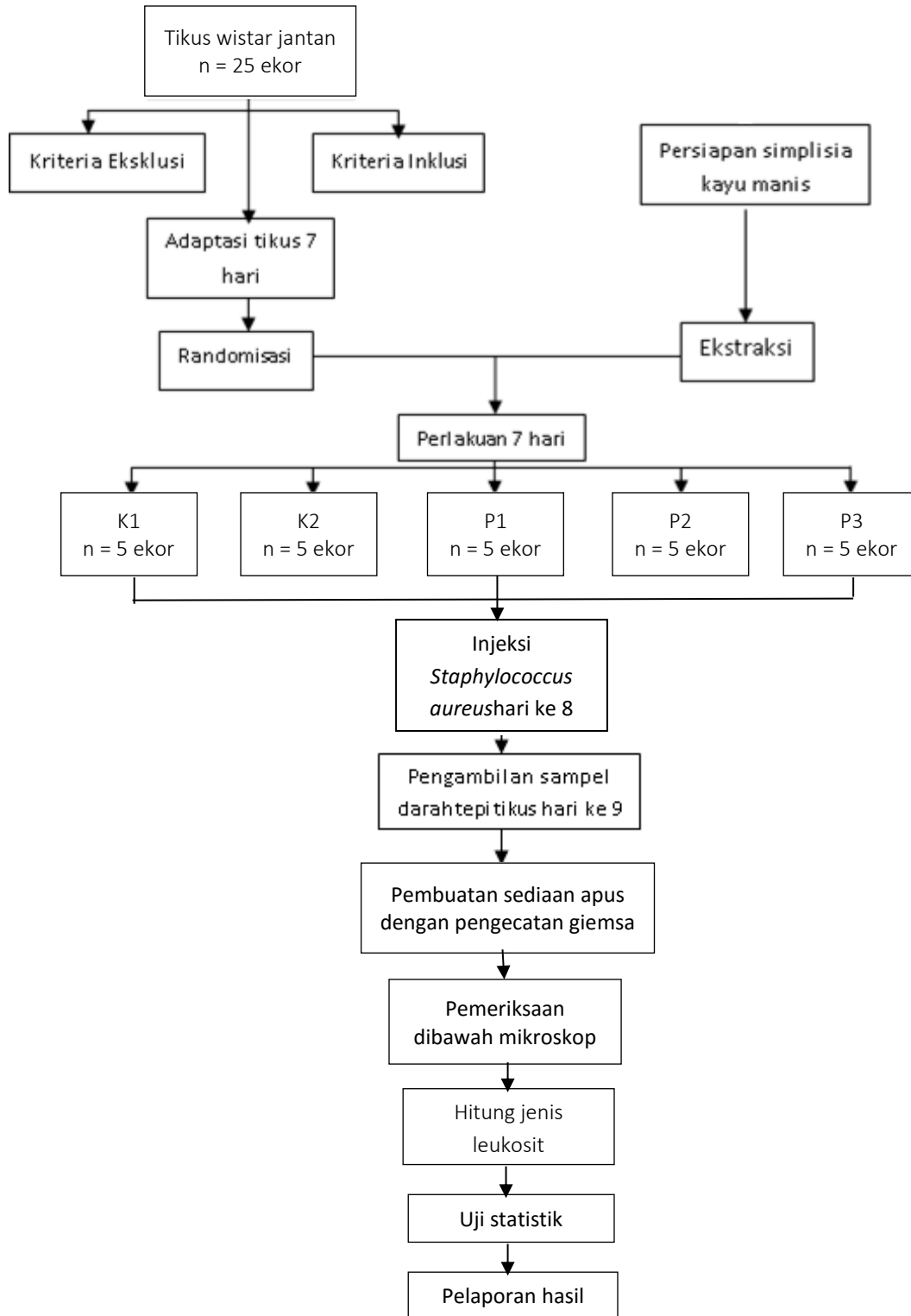
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
Eosinofil											
Basofil											
Stab											
Segmen											
Limfosit											
Monosit											
Jumlah	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100

Hasil yang didapat dapat ditulis sebagai berikut:

Eos/Bas/Stab/Seg/Limfo/Mono

.... / / /..... / /.....

3.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul telah dilakukan *cleaning*, *coding*, dan tabulasi. Data dikumpulkan dan diolah menggunakan program komputer. Data penelitian ini, yang menggunakan skala rasio, dilakukan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Data dengan sebaran normal dilanjutkan uji *One Way Anova* dan data dengan sebaran tidak normal setelah dilakukan transformasi data dilanjutkan dengan uji alternatif *Kruskal-Wallis*.

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi dengan nomor 513/EC/FK-RSDK/2016.