

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

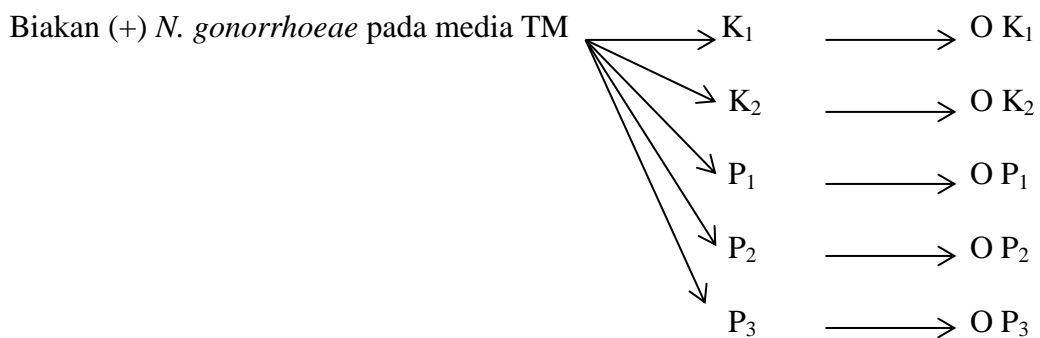
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

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 kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) 60%)

P₂ = Perlakuan (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) 80%)

P₃ = Perlakuan (Biakan (+) *N. gonorrhoeae* + ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) 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 Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah pasien dengan duh tubuh yang mengandung bakteri *Neisseria gonorrhoeae*, 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 dan hasil kultur menunjukkan morfologi *Neisseria gonorrhoeae*.
- Bersedia mengikuti penelitian ini.

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah:

- Hasil tes oksidase negatif
- Pasien dengan kecurigaan keganasan serviks atau vagina.
- Mengonsumsi antibiotik 7 hari sebelum pemeriksaan.

3.4.4 Cara Sampling

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

3.4.5 Besar Sampel

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

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

$$\begin{aligned} \text{Besar sampel} = (t-1)(n-1) &\geq 15 \\ (3-1)(n-1) &\geq 15 \\ 2n-2 &\geq 15 \\ 2n &\geq 17 \\ n &\geq 8,5 \end{aligned}$$

Dari perhitungan di atas, maka besar sampel tiap kelompok minimal 8,5 sampel, yang dibulatkan menjadi 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 kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah total bakteri *Neisseria gonorrhoeae*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Unit	Skala
1.	Konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana L</i>)	Ekstrak kulit buah manggis yang telah dilarutkan dengan etanol 96% dengan berbagai konsentrasi dalam bentuk cair.	% (v/V)	Ordinal
2.	Pertumbuhan Bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tumbuhnya koloni bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i> pada media pertumbuhan. Konsentrasi 60%, 80% dan 100%	Koloni Keterangan: • Nilai : 1 = ≥ 1 koloni • Nilai : 0 = 0 koloni.	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

- Lidi kapas
- Spekulum
- Osse
- Lampu spiritus
- *Object glass*
- Mikroskop
- Pinset
- Cawan petri

- Blender
- Timbangan
- Gelas erlenmeyer 1 liter
- Oven
- Gelas ekstraksi
- *Roratory evaporator*
- Tabung reaksi
- Mikropipet

3.7.2 Bahan

- Duh tubuh penderita yang ditemukan bakteri diplokokus Gram negatif intraseluler pada pemeriksaan pengecatan Gram dan hasil kultur menunjukkan morfologi *Neisseria gonorrhoeae*.
- Media transport *Thayer-Martin* cair.
- Reagen pengecatan Gram yang terdiri dari:
 - Gram A (Kربول 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 fisisologis

- Etanol 96%
- Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dengan konsentrasi 60%, 80% dan 100%.
- Media *Thayer-Martin* yang dicampur ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dengan konsentrasi masing-masing 0%, 60%, 80%, dan 100%.

Susunan media *Thayer-Martin*:

- GC Agar Base
- Antibiotik selektif LCAT
- Suplemen *Vitox*
- Darah domba.

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 akan diamati dari ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada media pertumbuhan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*).

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Cara Pembuatan Media

1. Penelitian ini menggunakan dua kelompok kontrol (K_1 dan K_2) dan lima kelompok pengamatan (P_1 , P_2 dan P_3)

2. Ambil GC *Agar Base* dan timbang sesuai kebutuhan
3. Campurkan dengan antibiotik selektif LCAT (linkomisin, kolistin, amfoterisin, trimetoprim)
4. Campurkan dengan ekstrak kulit buah manggis sesuai konsentrasi yang dibutuhkan (60%, 80% dan 100%) *
5. Masukkan kedalam autoklaf
6. Campurkan dengan darah domba
7. Campurkan dengan suplemen *Vitox*
8. Tuangkan kedalam cawan petri
9. Diamkan hingga membentuk agar
10. Masukkan formalin **

* penambahan ekstrak digunakan untuk kelompok perlakuan (P₁, P₂, dan P₃)

** penambahan formalin digunakan untuk kelompok kontrol K₂

3.7.4.2 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. Ambil spekulum cocor bebek steril dengan tangan kanan, tangan kiri membuka labia mayora kemudian memasukkan speculum 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, kemudian oleskan pada *object glass*.
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.

3.7.4.3 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. Lanjutkan dengan pemberian 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.

3.7.4.4 Cara Tes Oksidase

1. Letakkan beberapa tetes reagen tes oksidase di atas *object glass*.
2. Ambil koloni bakteri yang sudah tumbuh dengan menggunakan osse, lalu letakkan ke reagen kertas yang telah tersedia.
3. Tunggu beberapa menit. Hasil tes oksidase positif jika timbul warna ungu tua pada reagen yang telah ditambahkan bakteri. Hasil tes oksidase negatif jika telah ditambahkan reagen tetap bening setelah ditambah bakteri.

3.7.4.5 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 (37⁰C)

2. Pembuatan media kontrol positif dilakukan dengan cara membuat media *Thayer-Martin* seperti pada umumnya tanpa ditambah ekstrak kulit buah manggis (konsentrasi ekstrak 0%).
3. Pembuatan media kontrol negatif adalah 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 kulit buah manggis. Jumlah atau komposisi *Thayer-Martin* yang digunakan disesuaikan dengan perbandingan masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (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 standart McFarland 0,5.
6. Setelah itu ambil lautan 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 lakukan pembacaan hasil.

3.7.4.6 Cara Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis

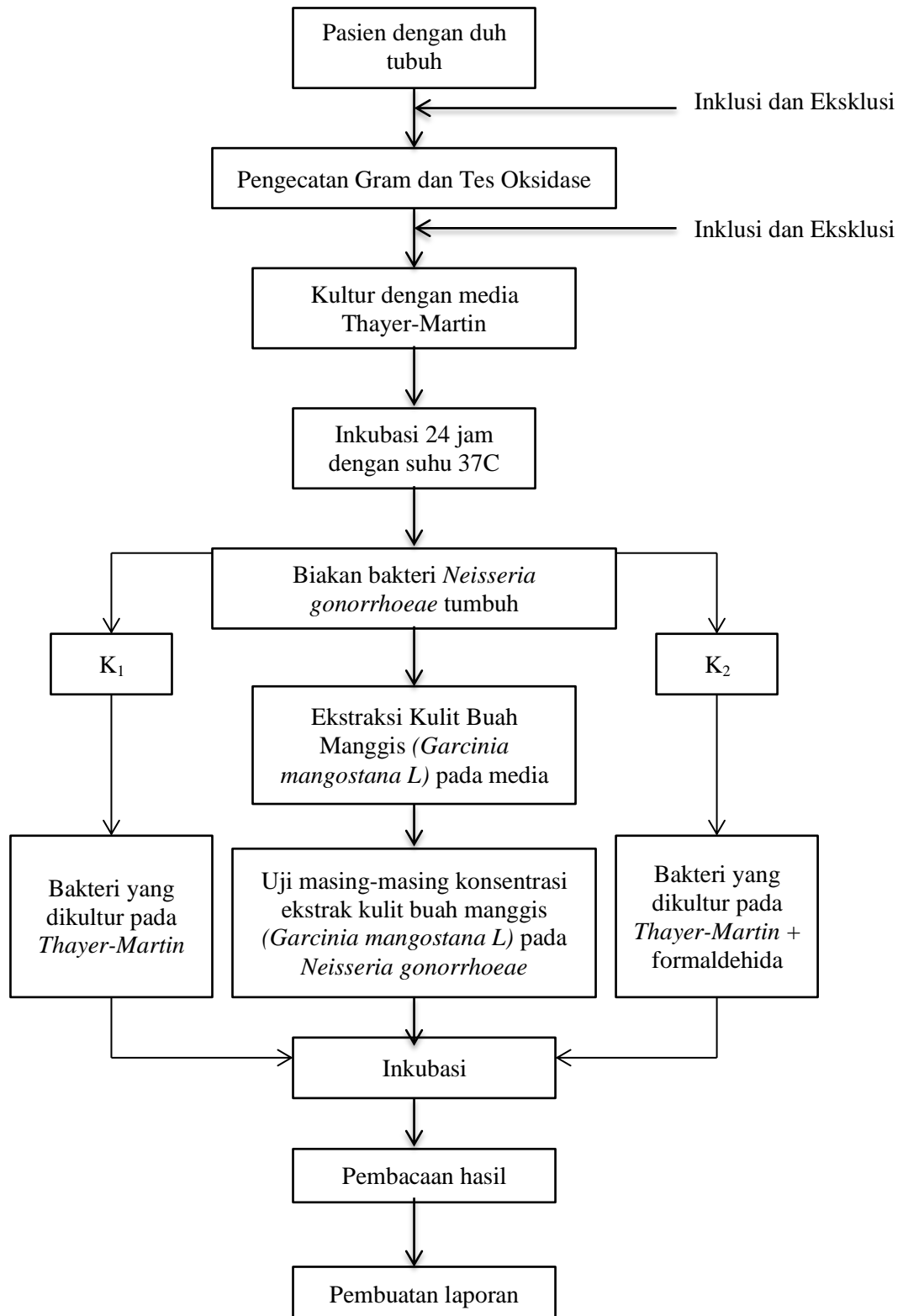
Metode Maserasi

1. Kulit buah manggis 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% (atau pelarut yang lainnya) sampai volume 1000cc.
6. Kocok/aduk sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan diamkan sampai mengendap.
7. Kemudian tutuplah. 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 digunakan.
11. Jika ekstrak yang digunakan dalam bentuk cair maka dari hasil evaporasi dapat langsung digunakan.

*Berat dan volume yang digunakan tergantung kebutuhan yang digunakan.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk*. Sebaran data dianggap normal jika $p > 0,05$. Data diolah dengan menggunakan program komputer.

- a. Bila didapatkan distribusi data normal dilakukan uji hipotesis dengan menggunakan statistik parametrik uji *One Way Anova*. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$. Lalu dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.
- b. Bila didapatkan distribusi tidak normal dilakukan uji hipotesis dengan menggunakan statistik nonparametrik uji *Kruskal Wallis*. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$. Lalu dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atau RS Nasional Diponegoro Semarang. Persetujuan penelitian telah diberikan dalam bentuk *informed consent* tertulis. Subyek penderita atau calon subyek penelitian telah diberi penjelasan tentang tujuan, manfaat, dan prosedur penelitian. Penderita berhak menolak untuk diikuti sertakan pada penelitian. Penderita yang menolak tetap mendapat pengelolaan dan penanganan sesuai dengan protap gonore. Identitas subyek penelitian telah dirahasiakan dan tidak dipublikasikan tanpa

seijin subyek penelitian. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian telah ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5				Bulan 6			
	1	2	3	4	1	1	2	3	4	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literatur dan penyusunan proposal penelitian	■																							
Seminar proposal						■																		
Ethical clearance							■	■																
Perizinan ke instansi terkait									■	■														
Penelitian												■	■	■	■									
Analisis data dan penulisan laporan																■	■	■	■					
Seminar hasil																						■	■	