

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Ruang lingkup penelitian

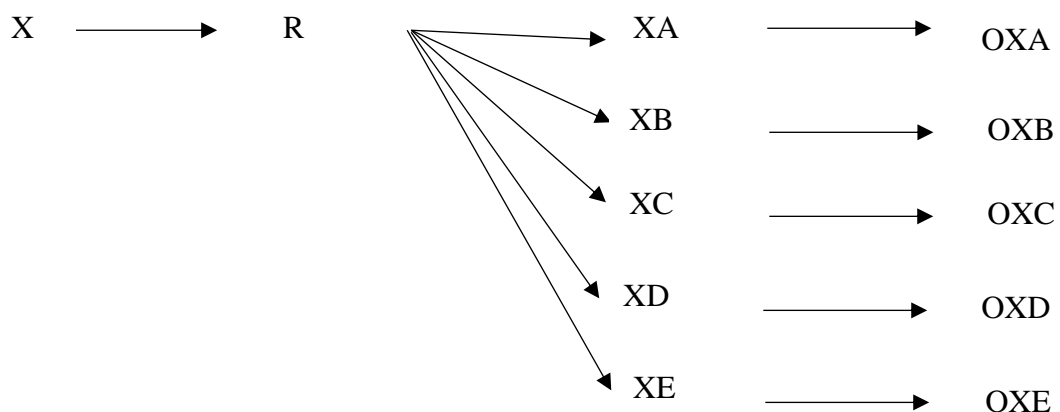
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Kimia dan Imunologi.

#### 3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Parasitologi Rumah Sakit Dokter Kariadi dan Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro selama tiga minggu.

#### 3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian *post-test only controlled group design* dan memakai binatang percobaan sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*) dan metode randomisasi sederhana yang dilakukan dengan komputer. Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Keterangan:

X→ : Masa adaptasi 1 minggu

R : Randomisasi cara undian

XA : Perlakuan A, dimana mencit tidak disuntik dengan *Salmonella* Typhimurium tidak diberi ekstrak kurma varietas Ajwa

XB : Perlakuan B, dimana mencit disuntik dengan *Salmonella* Typhimurium tidak diberi ekstrak kurma varietas Ajwa

XC : Perlakuan C, dimana mencit disuntik dengan *Salmonella* Typhimurium dan diberi ekstrak buah kurma dosis setengah dari dosis rujukan varietas Ajwa

XD : Perlakuan D, dimana mencit disuntik dengan *Salmonella* Typhimurium dan diberi ekstrak buah kurma sesuai dosis rujukan<sup>9,23,24</sup> varietas Ajwa

XE : Perlakuan E, dimana mencit disuntik dengan *Salmonella* Typhimurium dan diberi ekstrak buah kurma dengan dosis dua kali dari dosis rujukan varietas Ajwa

OXA : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan A

OXB : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan B

OXC : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan C

OXD : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan D

OXE : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan E

### **3.4 Populasi, teknik sampling, perhitungan sampel, dan cara pengumpulan data**

#### **3.4.1 Populasi**

Populasi penelitian adalah mencit strain Balb/C jantan, *Salmonella* Typhimurium

#### **3.4.2 Sampel penelitian**

##### **3.4.2.1 Kriteria inklusi**

1. Berjenis kelamin jantan
2. Berusia 8–10 minggu
3. Berat badan 25–30 gram
4. Sehat, lincah, tidak ada kelainan anatomis

##### **3.4.2.2 Kriteria eksklusi**

1. Hewan coba mati selama proses penelitian.
2. Hewan coba sakit selama proses penelitian.

Dipilih mencit strain Balb/C karena sensitif terhadap infeksi *Salmonella* Typhimurium dan pada umur 8–10 minggu dilaporkan dapat menimbulkan respon imun seluler apabila diinfeksi dengan kuman *Salmonella* Typhimurium. Pemilihan kuman *Salmonella* Typhimurium disebabkan dalam eksperimen akan dipelajari respon imun seluler pada umumnya, dan respon imun terhadap kuman *Salmonella* Typhimurium pada khususnya.

Beberapa hal yang harus menjadi perhatian adalah:

1. Ditematkannya kandang pada ruangan dengan penghawaan dan pencahayaan yang baik

2. Kebersihan kandang selalu dijaga
3. Cara dan waktu pemberian makan sama pada semua kelompok perlakuan
4. Masa adaptasi mencit sebelum dilakukan perlakuan diperkirakan selama satu minggu
5. Untuk menghindari bias karena perbedaan umur dan berat badan dilakukan pengelompokan sampel secara acak

### **3.4.3 Cara sampling**

Penelitian ini menggunakan teknik randomisasi sederhana.

### **3.4.4 Besar sampel**

Penentuan jumlah sampel berdasarkan kriteria WHO, yakni dengan jumlah tiap kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit. Untuk mengantisipasi adanya *drop out*, maka peneliti menggunakan sebanyak 7 ekor mencit pada setiap kelompok perlakuan.

Dengan jumlah perlakuan sebanyak 3, satu kontrol positif, dan satu kontrol negatif, maka akan didapatkan jumlah sampel yang dibutuhkan secara keseluruhan sebanyak 35 ekor mencit.

## **3.5 Variabel penelitian**

### **3.5.1 Variabel bebas**

Sebagai variabel bebas dalam penelitian adalah pemberian ekstrak buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa.

### **3.5.2 Variabel terikat**

Sebagai variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar NO makrofag, yang diukur dari jumlah NO yang dihasilkan makrofag dengan menggunakan metode Griess.

### 3.6 Definisi operasional

**Tabel 9.** Definisi operasional

Jenis Variabel	Variabel	Definisi Operasional	Skala	Nilai
Bebas	Dosis buah kurma varietas Ajwa	Buah kurma yang cenderung berbentuk bulat bukan lonjong, berwarna hitam, rasanya manis dan sedikit sepat, mempunyai bobot rata-rata 25-30 gram	Ordinal	1. 19,25 mg 2. 38,5 mg 3. 77 mg
Bebas	Bakteri <i>Salmonella</i> Typhimurium	Bakteri patogen gram negatif yang biasa ditemukan di lumen usus penderita demam tifoid. Mempunyai toksisitas yang berasal dari dinding sel bakteri, yakni pada membran lipopolisakaridanya.	Numerik	1. CFU/mL
Terikat	Kadar NO makrofag	Salahsatu indikator imunitas. Kadar NO meningkat akibat dari respon tubuh terhadap antigen yang terkandung dalam dinding sel bakteri <i>Salmonella</i> Typhimurium	Interval	1. $\mu\text{mol/L}$

### **3.7 Cara pengumpulan data**

#### **3.7.1 Bahan**

Buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa didapatkan dari toko Al-Manshuroh Tembalang Semarang. Kuman *Salmonella* Typhimurium strain *Salmonella* virulen (Phage type 510) dari bagian Mikrobiologi FK Undip Semarang.

##### **3.7.1.1 Cara ekstraksi buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa**

Buah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) varietas Ajwa dilepaskan dari bijinya secara manual. Percobaan kali ini menggunakan solven air destilat. Kemudian buah kurma yang telah diambil bijinya tadi direndam menggunakan air destilasi dengan perbandingan buah kurma dengan air destilasi sebanyak 1:3 sambil disimpan dalam kulkas pada 4°C selama 48 jam<sup>9</sup>. Setelah itu, seluruh rendaman tadi diblender dan dilakukan sentrifugasi pada 4°C dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada 4°C. Ekstrak tersebut dapat dipakai selama 14 hari berturut-turut dengan disimpan dalam kulkas<sup>25</sup>.

#### **3.7.2 Alat**

Seluruh peralatan hewan coba dan seluruh peralatan ekstraksi.

#### **3.7.3 Cara kerja**

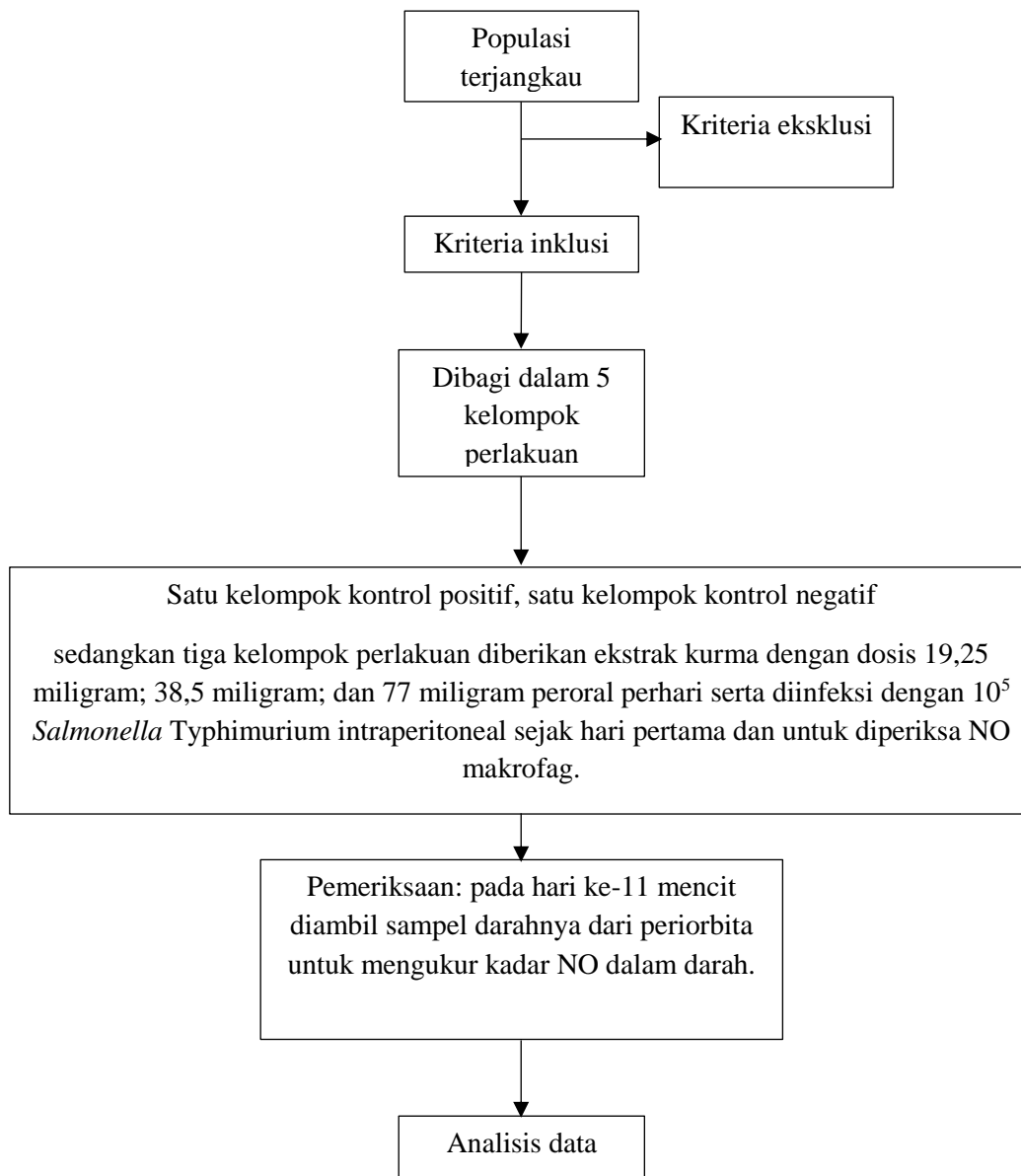
1. Mencit strain Balb/C sejumlah 35 ekor, umur 8–10 minggu diaklimitasi di laboratorium selama satu minggu dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standart dan minum *ad libitum*.

2. Mencit tersebut dibagi dalam 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 7 ekor mencit
  - a. Kelompok pertama, yaitu X1, sebagai kontrol dan pada hari ke-11 mencit didislokasi leher dengan sebelumnya diberikan anastesi lalu mencit diambil cairan peritoneum untuk diperiksa kadar NO makrofag.
  - b. Kelompok kedua, yaitu X2, diinfeksi dengan  $10^5$  *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sejak hari pertama dan pada hari ke-11 mencit didislokasi leher dengan sebelumnya diberikan anastesi lalu mencit diambil cairan peritoneum untuk diperiksa kadar NO makrofag.
  - c. Kelompok ketiga, yaitu X3, diberi ekstrak buah kurma dengan dosis sebesar setengah dosis rujukan, yakni 19,25 miligram, diberikan peroral perhari serta diinfeksi dengan  $10^5$  *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sejak hari pertama dan pada hari ke-11 mencit didislokasi leher dengan sebelumnya diberikan anastesi lalu mencit diambil cairan peritoneum untuk diperiksa kadar NO makrofag.
  - d. Kelompok keempat, yaitu X4, diberi ekstrak buah kurma dengan dosis sesuai dosis rujukan, yakni 38,5 miligram diberikan peroral perhari serta diinfeksi dengan  $10^5$  *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sejak hari pertama dan pada hari ke-11 mencit didislokasi leher dengan sebelumnya diberikan anastesi lalu mencit diambil cairan peritoneum untuk diperiksa kadar NO makrofag.



- e. Kelompok kelima, yaitu X5, diberi ekstrak buah kurma dengan dosis sebesar dua kali dosis rujukan, yakni 77 miligram, diberikan peroral perhari serta diinfeksi dengan  $10^5$  *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sejak hari pertama dan pada hari ke-11 mencit didislokasi leher dengan sebelumnya diberikan anastesi lalu mencit diambil cairan peritoneum untuk diperiksa kadar NO makrofag.

### 3.8 Alur penelitian



**Gambar 4.** Alur penelitian

### 3.9 Analisis data

Data yang terkumpul diolah dan disusun dalam bentuk tabel. Data yang diperoleh diolah, dianalisis secara statistik dengan bantuan program komputer.

Data variabel dari lima kelompok perlakuan berupa numerik dan numerik. Uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk dikarenakan besar sampel  $< 50$ . Bila persebaran normal, maka dilakukan uji statistik *one-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *posthoc* Bonferroni. Bila persebaran data tidak normal, dilakukan uji statistik Kruskal–Wallis dan dilanjutkan dengan *posthoc* Mann-Whitney.

### 3.10 Etika penelitian

*Ethical clearence* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RS Dokter Kariadi.

### 3.11 Pelaksanaan penelitian

**Tabel 9.** Pelaksanaan penelitian

Kegiatan	April				Mei				Juni				Juli				Agustus			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi Literatur	■	■	■	■	■	■	■	■												
Penyusunan proposal	■	■	■	■	■	■	■	■												
Seminar Proposal				■																
Persiapan peminjaman laboratorium				■	■	■	■	■												
Persiapan alat dan bahan					■	■	■	■												
Penelitian									■	■	■	■	■	■	■	■				
Analisis data dan Evaluasi													■	■	■	■	■	■	■	■
Penulisan Laporan													■	■	■	■	■	■	■	■
Seminar Hasil																				■