

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan rancangan *post test only control group design*. Penelitian dilakukan dengan beberapa perlakuan yang disusun secara random untuk seluruh unit percobaan.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek dan subyek yang memiliki kualitas dan karakteristik sesuai dengan yang ditentukan oleh peneliti untuk dipelajari dan diambil kesimpulannya (Sugiyono, 2013). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur swiss jantan.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang dianggap mewakili populasinya (Notoatmojo, 2012). Sampel penelitian ini adalah subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi yang sudah ditetapkan oleh peneliti.

a. Kriteria inklusi:

1. Mencit (*Mus musculus*) swiss
2. Umur 2-3 bulan
3. Jenis kelamin jantan
4. Berat badan 20-25 gram

5. Kondisi sehat aktivitas dan tingkah laku normal

b. Kriteria eksklusi:

1. Mencit (*Mus musculus*) terlihat sakit sebelum perlakuan dilihat dari warna bulunya.
2. Mencit (*Mus musculus*) mati dalam masa penelitian

3. Besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan menggunakan rumus

Federer yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$
$$(4-1)(r-1) \geq 15$$
$$3(r-1) \geq 15$$
$$3r-3 \geq 15$$
$$3r \geq 18$$
$$r \geq 6$$

Keterangan: t: jumlah perlakuan, r: jumlah sampel

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Jadi jumlah sampel yang digunakan sesuai rumus Federer adalah 6 sampel mencit (*Mus musculus*) untuk setiap kelompok. Total sampel yang digunakan adalah 24 ekor.

C. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium farmasi dan laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 sampai Januari 2016.

D. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah senyawa aktif dari infusa buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) dengan konsentrasi 50% dan 25%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah angka bakteri isolat darah pada mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae*.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* dengan dosis infeksi 10^6 organisme, media kultur bakteri, suhu inkubator, dan waktu inkubasi.

4. Variabel tak terkendali

Variabel tak terkendali pada penelitian ini adalah jarak kandang, bakteri kontaminan dan kontaminasi.

E. Definisi operasional

1. Infusa buah belimbing wuluh adalah sediaan cair yang dibuat dari buah belimbing wuluh dengan aquadest pada suhu 90°C selama 15 menit lalu sekali-kali diaduk kemudian disaring menggunakan kertas saring. Konsentrasi yang diberikan mengikuti konsentrasi pada penelitian in vitro yaitu 50% dan 25%.

2. *Shigella dysenteriae* adalah bakteri gram negatif genus *Shigella* yang didapatkan dari laboratorium mikrobiologi FKIK UMY.
3. Kontrol negatif adalah kelompok kontrol yang tidak diinfeksi oleh bakteri *Shigella dysenteriae*.
4. Kontrol standar adalah kelompok kontrol yang diberikan terapi menggunakan obat fitofarmaka standar diare (Lari, 2017).
5. Nodiar adalah obat fitofarmaka yang sudah lulus uji menjadi obat standar diare (Lari, 2107).
6. Angka bakteri isolat darah adalah jumlah bakteri isolat *Shigella dysenteriae* yang ditemukan pada 1 ml darah mecit yang dikultur pada media agar dengan metode streak plate dalam satuan *Colony forming unit* (CFU/gr) dengan ciri-ciri antara lain koloni berbentuk konveks, bulat, transparan dengan tepi yang utuh dan mencapai diameter sekitar 2 mm dalam 24 jam.

F. Alat dan bahan penelitian

1. Alat

- a. Kandang mencit (*Mus musculus*)
- b. Sonde lambung
- c. Blender
- d. Panci infus
- e. Kertas saring
- f. Kompor
- g. Spuit injeksi

- h. Ose steril
- i. Gunting
- j. Pinset
- k. Inkubator

2. Bahan

- a. Mencit (*Mus musculus*)
- b. Buah belimbing wuluh
- c. Aquadest
- d. Pakan mencit (*Mus musculus*)
- e. Bakteri *Shigella dysenteriae*
- f. Media agar TSA
- g. Nodiar

G. Prosedur Pengumpulan Data

1. Pembuatan infusa belimbing wuluh konsentrasi 50%

50 gram buah belimbing wuluh dicuci bersih kemudian dipotong-potong lalu dikeringkan. Selanjutnya buah di blender sampai halus. Campurkan belimbing wuluh dengan pelarut 100 ml aquades ditambah aquades dua kali berat simplisia dalam panci infusa. Penambahan aquades tersebut bertujuan untuk melembabkan simplisia kering yang digunakan. Penambahan air ini juga sebagai cara untuk mendapatkan volume yang sesuai karena pada saat pembuatan air mungkin akan menguap karena perebusan. Panaskan diatas pemanas air hingga suhu

90° C. Setelah mencapai suhu 90°C panaskan selama 15 menit. Saring selagi panas dengan menggunakan kertas saring (Farmakope V, 2014).

2. Pembuatan infusa belimbing wuluh konsentrasi 25%

25 gram buah belimbing wuluh dicuci bersih kemudian dipotong-potong lalu dikeringkan. Selanjutnya buah di blender sampai halus. Campurkan belimbing wuluh dengan pelarut 100 ml aquades ditambah aquades dua kali berat simplisia dalam panci infusa. Penambahan aquades tersebut bertujuan untuk melembabkan simplisia kering yang digunakan. Penambahan air ini juga sebagai cara untuk mendapatkan volume yang sesuai karena pada saat pembuatan air mungkin akan menguap karena perebusan. Panaskan diatas pemanas air hingga suhu 90° C. Setelah mencapai suhu 90°C panaskan selama 15 menit. Saring selagi panas dengan menggunakan kertas saring (Farmakope V, 2014).

3. Pembuatan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*

Suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml. Pembuatan suspensi bakteri tersebut distandarisasi dengan menggunakan metode McFarland 1 yaitu setara dengan kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml (Sutton, 2011). Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil 4-10 ose bakteri dari media *Nutrient agar* yang telah diinkubasi selama 24 jam dimasukkan ke dalam tabung yang berisi NaCl fisiologis, kemudian dihomogenkan. Suspensi bakteri tersebut disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar McFarland 1. Suspensi bakteri uji yang telah

dibuat dilakukan pengenceran secara berseri untuk mendapatkan kepadatan 10^6 CFU/ml. Mencit (*Mus musculus*) diinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae* pada hari ke 8 dan hari ke 12 secara peroral.

4. Dosis nodiar

Dosis nodiar yang digunakan pada orang dewasa sekali minum sebanyak 2 kapsul. Jika dosis sebanyak 2 kapsul dikonversikan ke dosis hewan uji berupa mencit dengan berat 20 g, maka:

$$\text{Dosis} = (70 \text{ kg}) / (60 \text{ kg}) \times 715 \text{ mg} \times 0,0026 = 2,168 \text{ mg}/20\text{g mencit}.$$

Jika diketahui berat mencit mencapai 25 g, maka dosisnya menjadi:

$$\text{dosis} = 25/20 \text{ g} \times 2,168 \text{ mg} = 2,71\text{mg}/25\text{g mencit}$$

$$\text{Kapsul} = (2,71\text{mg}) / (357,5 \text{ mg}) \times 1 \text{ kapsul} = 0,007583 \text{ kapsul}$$

Jadi, dosis 2,71 mg setara dengan 0,007583 kapsul. Maka, mencit dengan berat 20-25 g memerlukan 0,007583 kapsul. Pada penelitian digunakan 24 mencit untuk semua kelompok maka jumlah kapsul yang dibutuhkan untuk sekali perlakuan :

$$\text{Kapsul yang dibutuhkan} = 0,007583 \times 24 \text{ mencit} = 0,1819 \text{ kapsul}/24 \text{ mencit (Lari, 2017)}.$$

5. Perlakuan pada mencit (*Mus musculus*)

- 1) Mencit (*Mus musculus*) diadaptasi selama 1 minggu di kandang dan diberi pakan standar.
- 2) Dilakukan pengelompokkan secara acak, 24 ekor mencit (*Mus musculus*) dibagi menjadi 4 kelompok.

- 3) Setiap mencit (*Mus musculus*) pada kelompok perlakuan 2-4 (K2-K4) diinfeksi dengan bakteri *Shigella dysenteriae* 0,5 ml secara peroral.
- 4) Selama seminggu setiap kelompok diberi pakan standar dan perlakuan berbeda-beda, yaitu:

K1: hanya diberi pakan standar (kontrol negatif)

K2: mencit (*Mus musculus*) diinfeksi *Shigella dysenteriae* + obat Nodiar

K3: mencit (*Mus musculus*) diinfeksi *Shigella dysenteriae* + infusa belimbing wuluh konsentrasi 50% + pakan standar

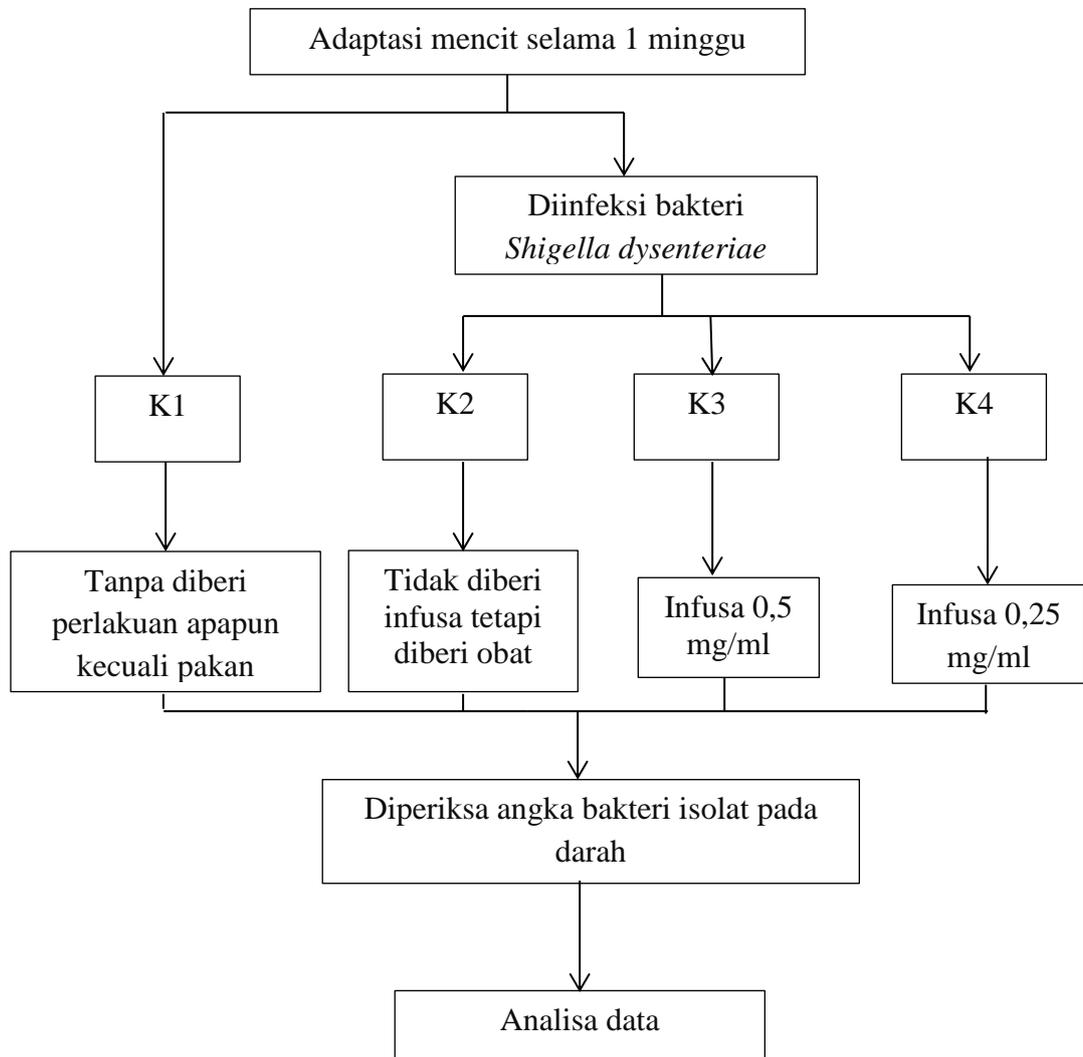
K4: mencit (*Mus musculus*) diinfeksi *Shigella dysenteriae* + infusa belimbing wuluh konsentrasi 25% + pakan standar

Pemberian perlakuan infusa buah belimbing wuluh dilakukan selama 4 hari lalu mencit (*Mus musculus*) dibunuh (Damayanti, 2005).

H. Prosedur pemeriksaan angka bakteri pada darah

- 1) Siapkan spluit untuk pengambilan darah mencit (*Mus musculus*)
- 2) Ambil darah vena sebanyak 1 ml
- 3) Darah kemudian ditanam pada media agar TSA dengan cara digores (streak plate)
- 4) Media TSA tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 5) Setelah dilakukan inkubasi, hitung jumlah koloni bakteri menggunakan *colony forming unit*.

I. Alur Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

J. Analisa Data

Untuk mengetahui efek pemberian infusa buah belimbing wuluh pada angka bakteri isolat darah mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae*, pertama-tama dilakukan uji normalitas menggunakan uji shapiro-wilk dengan hasil didapatkan distribusi data normal maka selanjutnya dilakukan analisis data dengan menggunakan uji statistik yaitu *Oneway*

Analysis Of Varian (ANOVA) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih dari 2 kelompok dan uji *Posthoc Test* dengan software *SPSS* untuk mengetahui perbedaan antar 2 kelompok.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan ethical clearance dari komisi etika penelitian FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

