

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 terlihat sakit sebelum perlakuan
 - 2) Mencit mati dalam masa penelitian

3. Besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

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 untuk setiap kelompok. Total sampel yang digunakan adalah 24 ekor.

C. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas

Muhammdiyah Yogyakarta. Penelitian 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*) dengan konsentrasi 50% dan 25%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah angka bakteri isolat hepar pada mencit 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 serta waktu dan suhu inkubasi.

4. Variable tak terkendali

Variabel tak terkendali pada penelitian ini adalah jarak penempatan antar kandang mencit dan bakteri kontaminan.

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 Shigella konsentrasi standar 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 standar diare.
5. Nodiar adalah obat fitofarmaka yang sudah lulus uji menjadi obat standar diare.
6. Angka bakteri adalah jumlah bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditemukan pada 1 gram hepar mecit yang dikultur pada media TSA 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
- b. Sonde lambung
- c. Blender
- d. Panci infus
- e. Kertas saring

- f. Kompor
- g. Sduit injeksi
- h. Tabung reaksi
- i. Vortex
- j. Ose steril

2. Bahan

- a. Mencit
- b. Buah belimbing wuluh
- c. Aquadest
- d. NaCl
- e. Pakan mencit
- f. Bakteri *Shigella dysenteriae* konsentrasi standar
- g. Media agar TSA
- h. Nodiar

G. Prosedur Pengumpulan Data

1. Pembuatan infusa belimbing wuluh konsentrasi 50% dan 25%

Ambil buah belimbing wuluh seberat 50 gram 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° panaskan selama 15 menit. Saring selagi panas dengan kertas saring (Farmakope Indonesia, 2014). Lakukan cara yang sama menggunakan buah belimbing wuluh seberat 25 gram untuk membuat infusa dengan konsentrasi 25%.

2. Pembuatan suspensi fitofarmaka Nodiar

Dosis yang digunakan adalah 2 tablet sesudah buang air besar, maksimal 3x sehari (Lari, 2017).

Jika dosis sebanyak 2 tablet 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

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

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

$$\text{Tablet yang dibutuhkan} = 0,007583 \times 24 \text{ mencit} = 0,1819$$
 tablet (Lari, 2017). Tablet nodiar tersebut kemudian digerus dan disuspensikan dalam CMC Na 1% sehingga tercapai konsentrasi

nodiar dalam suspensi sesuai dosis yang dibutuhkan (Setiawati, 2017).

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 diinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae* 0,5 ml pada hari ke 8 dan hari ke 12 secara peroral (Wulandari, 2015).

4. Perlakuan pada mencit

- a. Mencit diadaptasi selama 1 minggu di kandang dan diberi pakan standar.
- b. Dilakukan pengelompokan secara acak, 24 ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok.
- c. Setiap mencit pada kelompok perlakuan 2-4 (K2-K4) diinfeksi dengan bakteri *Shigella dysenteriae* 0,5 ml secara peroral.

- d. Selama seminggu setiap kelompok diberi pakan standar dan perlakuan berbeda-beda, yaitu:

K1: hanya diberi pakan standar (kontrol negatif)

K2: mencit diinfeksi *Shigelladysenteriae* + obat Nodiar (kontrol standar)

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

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

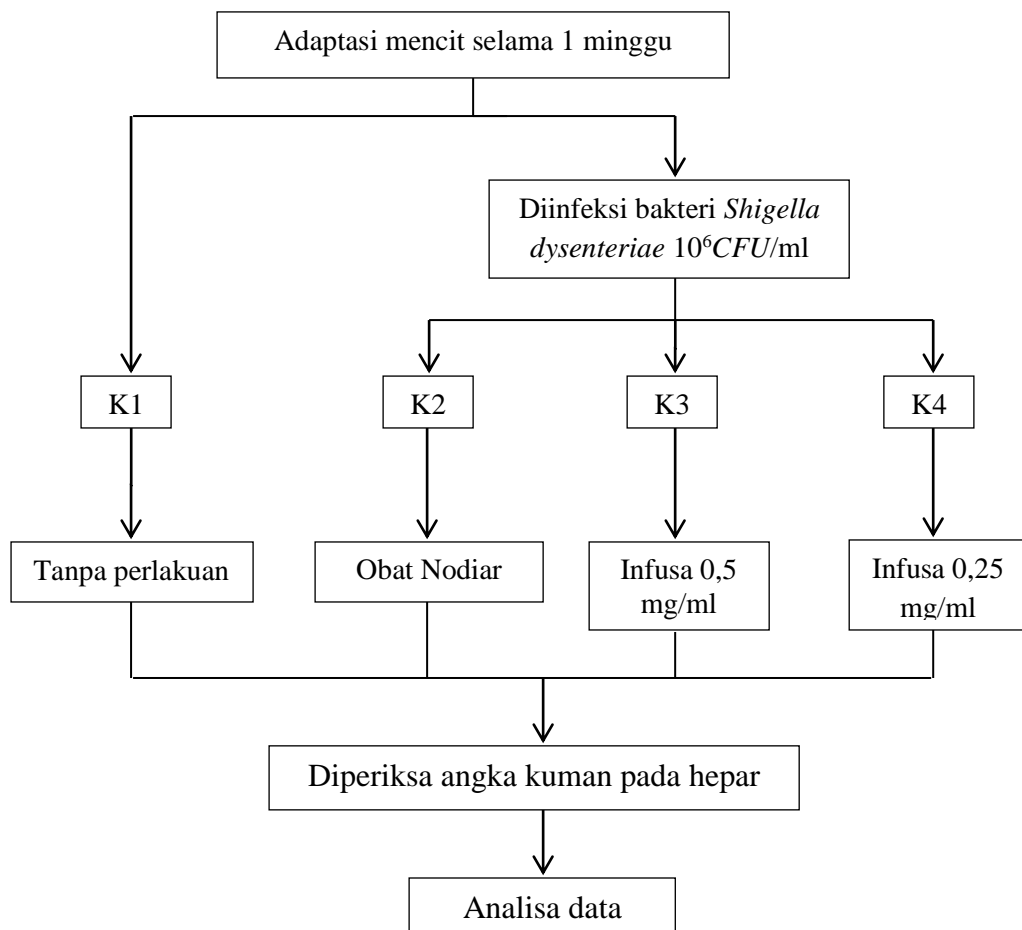
Pemberian perlakuan infusa buah belimbing wuluh dilakukan selama 4 hari lalu mencit dibunuh (Damayanti, 2005).

5. Prosedur pemeriksaan angka bakteri pada hepar

- a. Siapkan 3 tabung reaksi yang telah diisi oleh NaCl fisiologis dengan volume 10 ml pada tabung ke-1 dan 9 ml dalam tabung ke 2 dan ke 3.
- b. Hepar mencit ditumbuk hingga halus.
- c. Ambil 1 gram dari hepar mencit yang telah ditumbuk lalu dimasukkan ke dalam tabung 1, kemudian dihomogenisasi.
- d. Ambil 1 ml larutan yang telah dihomogenisasi dari tabung 1, lalu masukkan ke tabung 2 dan homogenisasi kembali. (Faktor pengenceran = 10^{-1})

- e. Ambil 1 ml larutan yang telah dihomogenisasi dari tabung 2, lalu masukkan ke tabung 3 dan homogenisasi kembali. (Faktor pengenceran = 10^{-2})
- f. Dari tabung 2 dan 3 diambil larutan sebanyak masing-masing 1 ose atau setara dengan 1 ml lalu ditanam pada media agar TSA.
- g. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h. Dihitung koloni bakteri menggunakan *colony forming unit*.

H. Alur Penelitian



Keterangan:

K1: hanya diberi pakan standar (kontrol negatif)

K2: mencit diinfeksi *Shigella dysenteriae* + obat Nodiar + pakan standar (kontrol standar)

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

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

Gambar 6. Alur penelitian

I. Analisa Data

Untuk mengetahui efek pemberian infusa buah belimbing wuluh pada angka bakteri isolat hepar mencit yang diinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae*, uji statistik hasil pemeriksaana angka kuman akan dilakukan menggunakan uji One Way ANOVA dengan software *SPSS*.

J. Etika Penelitian

Proposal penelitian ini diajukan untuk mendapatkan *ethical clearance* kepada komisi etika penelitian FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.