

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian ini berupa perlakuan atau intervensi terhadap suatu variabel dengan menggunakan rancangan *the post test-only control group*, yaitu dengan melakukan pengukuran atau observasi setelah perlakuan diberikan. (Notoatmojo, 2005). Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian ekstrak daun sirih *Piper betle Linn* yang dibuat di Laboratorium Farmasi FKIK UMY pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Parameter pengukuran variabel pada penelitian ini berupa jumlah neutrofil.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit jenis *Balb/c*. Hal ini dikarenakan mencit strain ini rentan dan memperlihatkan respon imun terhadap perkembangan infeksi *Klebsiella pneumoniae*. Salah satu mekanisme yang mendasari ini adalah respon spesifik strain ini terhadap lipopolisakarida, yang merupakan komponen dinding sel bakteri gram negatif (Mehrad & Standiford, 1999).

2. Sampel

a. Jumlah sampel

Penentuan jumlah sampel menggunakan rumus Federrerr, yaitu :

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

r = jumlah sampel per kelompok

t = jumlah perlakuan

Jumlah sampel per kelompok (r) dihitung berdasarkan rumus tersebut, dengan jumlah perlakuan (t) sebanyak enam kelompok.

$$(r - 1) (t - 1) \geq 15 ; r = 6$$

$$(5) (t - 1) \geq 15$$

$$5t - 5 \geq 15$$

$$5t \geq 20$$

$$t \geq 4$$

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa jumlah sampel minimal yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah empat. Namun, untuk mengantisipasi adanya *drop out*, ditetapkan jumlah sampel per kelompok sebanyak 5 sampel. Ada enam kelompok sampel, sehingga jumlah total sampel yang digunakan sebanyak tiga puluh mencit.

b. Cara Pengambilan Sampel

Obyek dari penelitian ini adalah mencit yang telah diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* sehingga terjangkit penyakit pneumonia, dengan kriteria inklusi sebagai berikut :

- 1) Mencit berasal dari galur murni Balb/c.
- 2) Mencit berjenis kelamin jantan.
- 3) Mencit sehat dan tidak memiliki kelainan anatomis.
- 4) Mencit berumur 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan 20 sampai 25 gram.
- 5) Mencit aktif sebelum terkena infeksi *Klebsiella pneumoniae*.

Kriteria eksklusi penelitian ini antara lain jika saat pengambilan sampel, mencit mati sebelum tiba waktu observasi.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, pada bulan Maret hingga bulan Juli 2015.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Dosis ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB, dan dosis amoksisillin 1,3mg/kgBB.

2. Variabel terikat

Jumlah neutrofil darah mencit dapat dihitung dengan *hematology analyzer*.

3. Variabel terkendali

a. Dapat dikendalikan

- 1) Mencit dari strain Balb/c jantan, berumur 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan 20 sampai 25 gram.
- 2) Kondisi pakan, minum, dan kandang sama.
- 3) Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang diinfeksi sebanyak 10^8 CFU. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan berasal dari isolat klinis yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM.

b. Tidak dapat dikendalikan

- 1) Variasi genetik mencit.
- 2) Metabolisme mencit.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak sirih merupakan larutan yang terbuat dari daun sirih yang diberikan pada kelompok perlakuan mencit Balb/c (yang telah diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*) peroral dengan dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB.
2. Jumlah neutrofil darah merupakan hitung jumlah neutrofil dalam persentase yang terdapat pada darah mencit Balb/c yang telah maupun tidak diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberikan perlakuan berbeda pada setiap kelompok sampel terkait pemberian jenis dan dosis ekstrak daun sirih maupun amoksisillin. Jumlah neutrofil darah dapat dihitung menggunakan *hematology analyzer*.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

- a. Pemeliharaan mencit : kandang mencit, alas kandang, ram kawat, tempat pakan, tempat minum, sikat.
- b. Perlakuan pada mencit : mikro pipet, pipet *pasteur*, pipet *ependorf*, gelas kaca, spuit 1 cc steril.
- c. Pengambilan data : sarung tangan, spuit 3 ml, *hematology analyzer*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain pakan ternak standar untuk mencit Balb/c, larutan ekstrak sirih yang dibuat di Laboratorium Farmasi FKIK UMY. Sampel berupa darah mencit yang diambil dari mencit yang telah diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya, bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM. Reagen yang digunakan adalah EDTA.

- a. Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah dengan menanam bakteri *Klebsiella pneumoniae* dalam media TSA (*Trypticase Soy Agar*), kemudian melakukan inkubasi dalam suhu 37⁰ selama 24 jam. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, kemudian dicuci sebanyak dua kali dalam NaCl 0,85%. Bakteri

Klebsiella pneumoniae kemudian diencerkan dengan larutan NaCl 0,85% menjadi 10^8 CFU dan siap diberikan pada mencit kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan (Hilliard,*et al.*, 2011).

b. Pembuatan ekstrak daun sirih *Piper betle* Linn

Prosedur pembuatan ekstrak daun sirih yaitu dengan mengeringkan daun sirih, kemudian membuatnya menjadi bentuk serbuk. Serbuk tersebut kemudian ditimbang sesuai kebutuhan dosis dan dimaserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 selama tiga hari untuk tujuh bagian pertama. Suhu distabilkan pada 65 derajat *celcius*. Ekstrak tersebut kemudian disaring dengan menggunakan corong Buchner untuk mendapat filtrat pertama. Remaserasi dilakukan dengan menggunakan tiga bagian metanol yang tersisa selama dua hari. Penyaringan lalu kembali dilakukan sehingga didapatkan filtrat kedua. Filtrat kemudian dicampur dan disaring dengan kertas saring. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporate* sampai akhirnya diperoleh ekstrak kental (Chakraborty & Shah, 2011). Dosis yang diberikan pada hewan coba harus disesuaikan dengan HED (*Human Equivalent Dose*) dengan menggunakan konversi sederhana berdasarkan berat badan (Reagan-Shaw,*et al.*, 2007).

G. Cara Pengumpulan Data

1. Mengadaptasi mencit Balb/c selama 1 minggu di laboratorium dandiberi pakan standar.
2. Melakukan pengelompokan dengan randomisasi sederhana, yaitu membagi 30 ekor mencit dalam 6 kelompok.
3. Menginfeksi setiap mencit Balb/c dalam kelompok (E1-E5 dan C2) dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* intranasal (Chibber, *et al.*, 2008).
4. Memberikan perlakuan berbeda selama seminggu pada setiap kelompok:

Kelompok kontrol (C1 dan C2 tidak diberi perlakuan, kelompok perlakuan E1, E2, dan E3 diberi ekstrak daun sirih dengan dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB, kemudian dibandingkan dengan kelompok E4 yang diberi dosis amoksisilin sebanyak 1,3mg/kgBB. Setelah 12 jam infeksi *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal, mencit diberi perlakuan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan selama 7 hari. Pada hari ke tujuh, semua mencit diambil darahnya untuk dijadikan sebagai sampel.

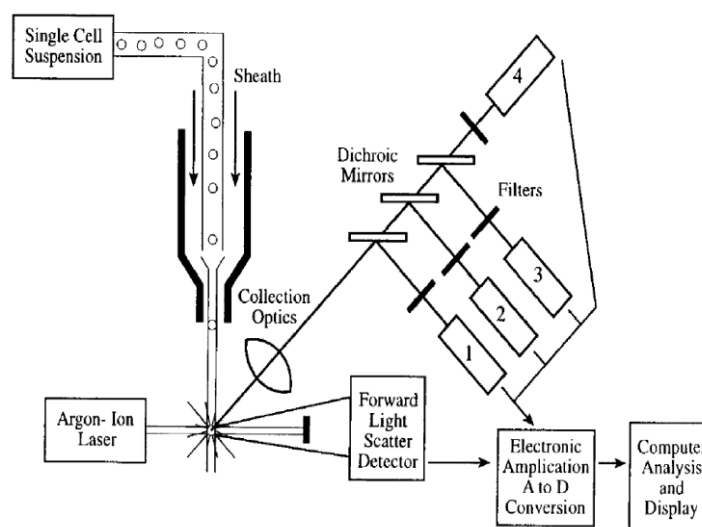
Prosedur penghitungan jumlah neutrofil darah

1. Pengambilan darah

Sampel darah diambil dari pembuluh darah mencit sebanyak 250 μ L dengan menggunakan tabung *microcentrifuge* dan penambahan EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid). Sampel kemudian dicampur perlahan (Skrajnar,*et al.*, 2009).

2. Penghitungan neutrofil darah mencit

Perhitungan jumlah neutrofil darah mencit menggunakan penganalisis hematologi atau *hematology analyzer* yang melibatkan prinsip impedansi, *flow cytometry* dan *fluorescent*. Pada prinsip impedansi, sampel darah dimasukkan ke dalam ruang dan diencerkan dengan larutan salin isotonik. Larutan yang encer akan memudahkan sampel darah mengalir melalui celah yang sangat kecil. Arus listrik dihasilkan di setiap celah oleh dua elektroda. Larutan salin berfungsi untuk menginduksi arus di antara elektroda. Sel-sel darah akan melewati celah dan akan berperan sebagai penghambat listrik sehingga mengimpedansikan aliran listrik. Hal ini akan menghasilkan voltase yang besarnya sesuai dengan ukuran sel. Instrumen listrik akan disesuaikan untuk membedakan voltase yang dihasilkan tiap sel (Zandecki, *et al.*, 2007).



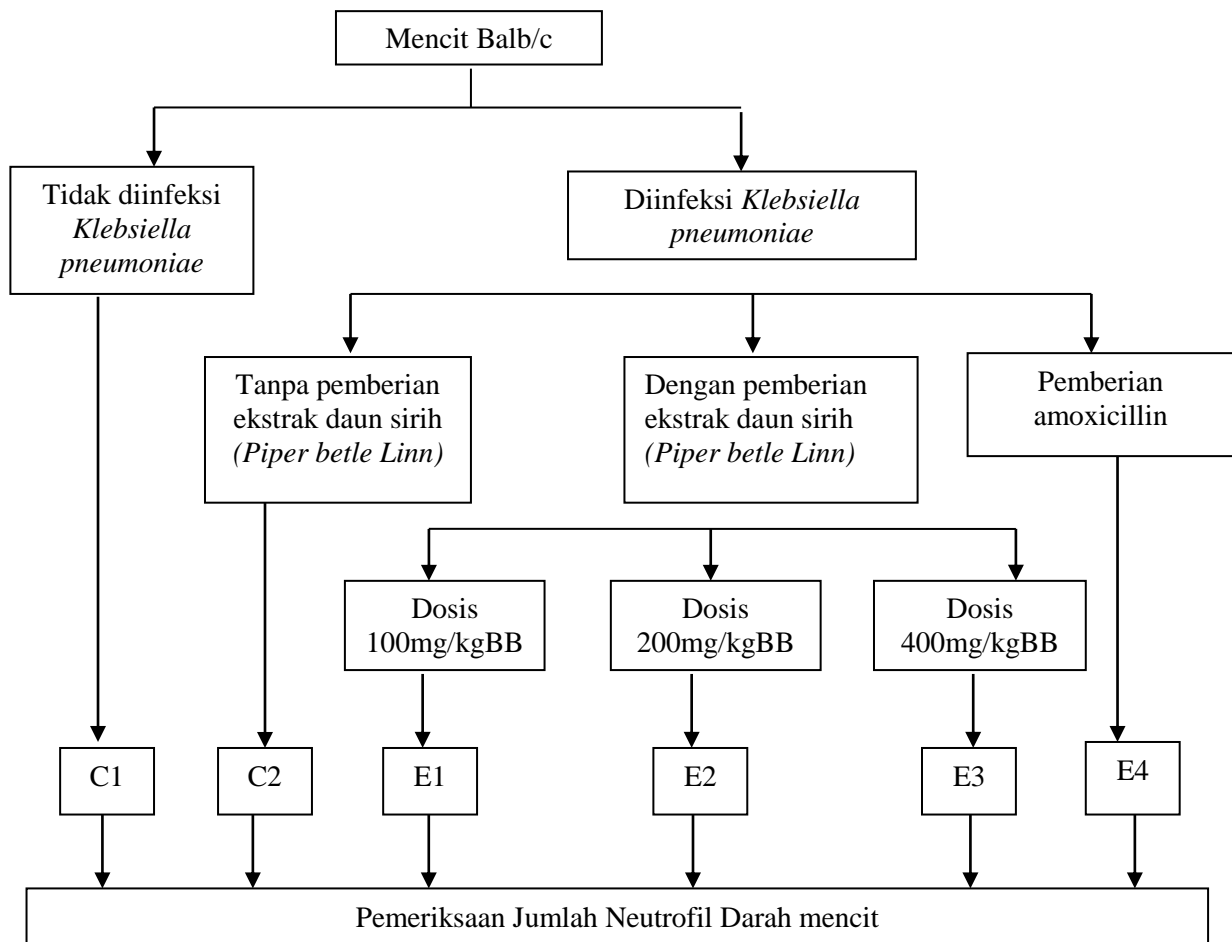
Gambar 3.1 Skema *Flow Cytometry* (Brown & Wittwer, 2000)

Prinsip *flow cytometry* adalah menilai karakteristik optik dan fluoresensi (pijaran) setiap sel atau partikel (Watson, 1999). Komponen fisik seperti ukuran maupun kompleksitas sel dapat mengklasifikasikannya ke dalam populasi tertentu. Pewarnaan fluoresens dapat diikat oleh bermacam komponen sel seperti DNA atau RNA. Beberapa pewarnaan yang sering digunakan adalah propidium iodide, *phycoerythrin*, dan fluorescein. Antibodi yang terkonjugasi ke dalamnya akan mengikat protein spesifik pada membran atau bagian dalam sel. Ketika sel-sel ini melewati sumber cahaya, molekul fluoresens akan memiliki tingkat energi yang lebih tinggi. Ketika proses kembali ke tingkat energi sebelumnya, fluorochrome akan memancarkan energi cahaya pada panjang gelombang yang lebih panjang. Penggunaan fluorochrome, dengan eksitasi panjang gelombang dan emisi panjang gelombang atau warna yang berbeda akan membedakan sel berdasarkan beberapa komponen selnya (Brown & Wittwer, 2000).

Alat *hematology analyzer* merupakan alat analisis sel darah otomatis yang mampu menganalisis multi parameter secara kuantitatif. Selain untuk menghitung neutrofil, alat ini juga bisa menghitung komponen darah lain seperti limfosit, leukosit, RBC (*Red Blood Cell*), MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), dan lain-lain. Cara pemakaiannya adalah dimulai dengan menghidupkan alat *hematology analyzer* dengan menyambungkan kabel

power pada stabilisator. Nyalakan alat dengan menekan tombol on/off yang berada pada sisi kanan atas alat. Lalu pastikan sampel darah sudah homogen dengan menggunakan antikoagulan. Tekan tombol Whole Blood “WB” pada monitor. Tekan tombol ID dan masukkan nomor sampel, lalu tekan enter. Tekan bagian atas tempat sampel dan letakkan sampel di adaptor. Tutup rapat kemudian tekan “RUN”. Alat akan running dan hasil akan otomatis keluar (Gandasoebrata, R., 2007)

H. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

Keterangan

- C1 : Mencit tidak diinfeksi dan tidak diberi perlakuan (kontrolnegatif)
- C2` : Mencit diinfeksi dan tidak diberi perlakuan (kontrol positif)
- E1 : Mencit diinfeksi dan diberi ekstrak daun sirih 100mg/kgBB.
- E2 : Mencit diinfeksi dan diberi ekstrak daun sirih 200mg/kgBB.
- E3 : Mencit diinfeksi dan diberi ekstrak daun sirih 400mg/kgBB.
- E4 : Mencit diinfeksi dan diberi amoxicillin 1,3mg/kgBB.

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Kesahihan (validitas) dan keterandalan (reliabilitas) pada penelitian ini ditentukan oleh alat ukur yang digunakan, ketepatan alat ukur, cara pengukuran dan dosis bahan uji.

J. Analisis Data

Untuk mengetahui potensi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dalam menurunkan jumlah neutrofil darah mencit yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*, pengujian statistiknya dilakukan dalam dua tahap menggunakan *software* SPSS. Pertama, dilakukan pengujian distribusi data. Apabila didapatkan distribusi datanya normal, uji statistik yang dilakukan selanjutnya adalah uji ANOVA. Namun, apabila didapatkan distribusi datanya tidak normal, uji statistik yang dilakukan adalah uji *Kruskal Wallis*.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhamadiyah Yogyakarta.