

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan eksperimental laboratorium *in vivo*. Dengan rancangan penelitian *the post test-only control group* yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian.

B. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Strain Sparaque-Dawiley yang dipilih adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena strain ini dapat menimbulkan imunitas seluler apabila diinokulasi dengan *Escherichia coli* hidup. Tikus putih juga *susceptible* terhadap infeksi *Escherichia coli*.

2. Sampel

a. Jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan 5 ekor tikus putih per kelompok, karena untuk mengantisipasi *drop out* digunakan 6 ekor tikus putih per kelompok. sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus putih, Rumus penelitian eksperimental, yaitu :

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

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

$$= (5-1)(r-1) \geq 15$$

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

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

$$= (r-1) \geq 3,75$$

$$= r \geq 3,75 + 1$$

$$= r \geq 4,75 \approx 5$$

a. Cara Memperoleh Sampel

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM. Kriteria inklusi meliputi : galur Spraque-Dawley, jenis kelamin jantan, umur 3 bulan, berat badan 200 gram, dan aktif sebelum diinfeksi *Escherichia coli*. Kriteria eksklusi meliputi : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mati sebelum tiba waktu observasi.

C. Variabel dan Definisi Operasional

a. Variabel

1. Variabel bebas

Campuran Ekstrak teh dan madu dengan komposisi Teh 50 %- Madu 50%; Teh 25%- Madu 75%; Teh 75%- Madu 25%.

2. Variabel terikat

Jumlah angka kuman *Escherichia coli* pada hepar.

2. Variabel pengganggu

Kontaminasi Bakteri dan Sterilisasi alat-alat yang digunakan pada saat penelitian.

b. Definisi Operasional

1. Ekstrak teh (*Camellia sinensis*) adalah larutan yang dibuat dari daun teh (*Camellia sinensis*) dan di kombinasikan dengan madu yang diberikan kepada kelompok perlakuan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Escherichia coli* melalui per oral dengan dosis Ekstrak Teh 50 %-Madu 50%; Ekstrak Teh 25%-Madu 75%; Ekstrak Teh 75%- Madu 25%.
2. Angka kuman hepar adalah jumlah hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dihitung dengan mengambil 1 gram organ hepar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan dihomogenisasi dengan 10 ml NaCl fisiologis. Hasil homogenisasi dibuat pengenceran $10^{-1} - 10^{-4}$ dengan diambil 0,5 ml dari masing-masing pengenceran. Setelah itu suspensi dengan konsentrasi $10^{-1} - 10^{-4}$ ditanam pada media Brilliance *E.coli* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung kemudian dikonversikan dalam satuan *colony forming unit* (CFU) (WHO, 2017).

D. Instrumen Penelitian

1. Alat

- a. Pemeliharaan tikus putih : kandang tikus putih, individu dan tempat makanan, tempat minuman.
- b. Perlakuan pada tikus putih : neraca analitik, alat homogenisasi, sonde lambung, tabung, sonde, mikropipet, vortex, gelas kaca, spuit 1 cc steril, seperangkat alat bedah steril, pipet pasteur, pipet eppendorf, petridish, inkubator, toples.
- c. Pengambilan data : sarung tangan, pinset, spuit 3 ml.

2. Bahan

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- b. Bakteri *Escheriachia coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- c. Larutan ekstrak teh (*Camellia sinensis*) yang dibuat di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan proses pencampuran dengan madu murni dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- d. Sampel berupa hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diambil melalui proses pembedahan.
- e. Reagen yang digunakan alkohol 70%, media Brilliance *E.coli*, NaCl, fisiologis steril.

E. Cara Pengumpulan Data

Bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* adalah *Escherichia coli* dikultur didalam media TSA (*Trypticase Soy Agar*), kemudian diinkubasi dalam suhu 37⁰ C selama 24 jam. *Escherichia coli* diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 90% menjadi 10⁶ dan siap diberikan pada tikus putih kelompok kontrol dan perlakuan 1-3.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM, dengan jenis kelamin jantan, berat badan 150-300 gram dan jumlah yang dibutuhkan 30 ekor tikus putih .

Pembuatan ekstrak daun teh yaitu dengan cara daun teh kering dibuat serbuk teh (*simplisia*) dengan menggunakan mesin penyebuk (*grinder*) lalu saring, kemudian serbuk daun teh ditambah pelarut etanol 70%, dengan perbandingan antara etanol 70% : *simplisia* (1:10), selanjutnya di maserasi selama 24 jam dan sesekali diaduk. Lalu di filter yang kemudian akan menghasilkan maserat, dan selanjutnya maserat akan di uapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* sampai akhirnya diperoleh ekstrak kental yang siap digunakan. Residu (ampas) yang dihasilkan dari maserat akan di remaserasi kembali dengan penambahan etanol 70% sampai diperoleh ekstrak kental.

Pencampuran Ekstrak teh dengan madu murni dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan dibagi menjadi tiga macam

perlakuan berdasarkan komposisinya : komposisi Ekstrak Teh 50% - Madu 50%; Ekstrak Teh 25% - Madu 75%; Ekstrak Teh 75% - Madu 25%.

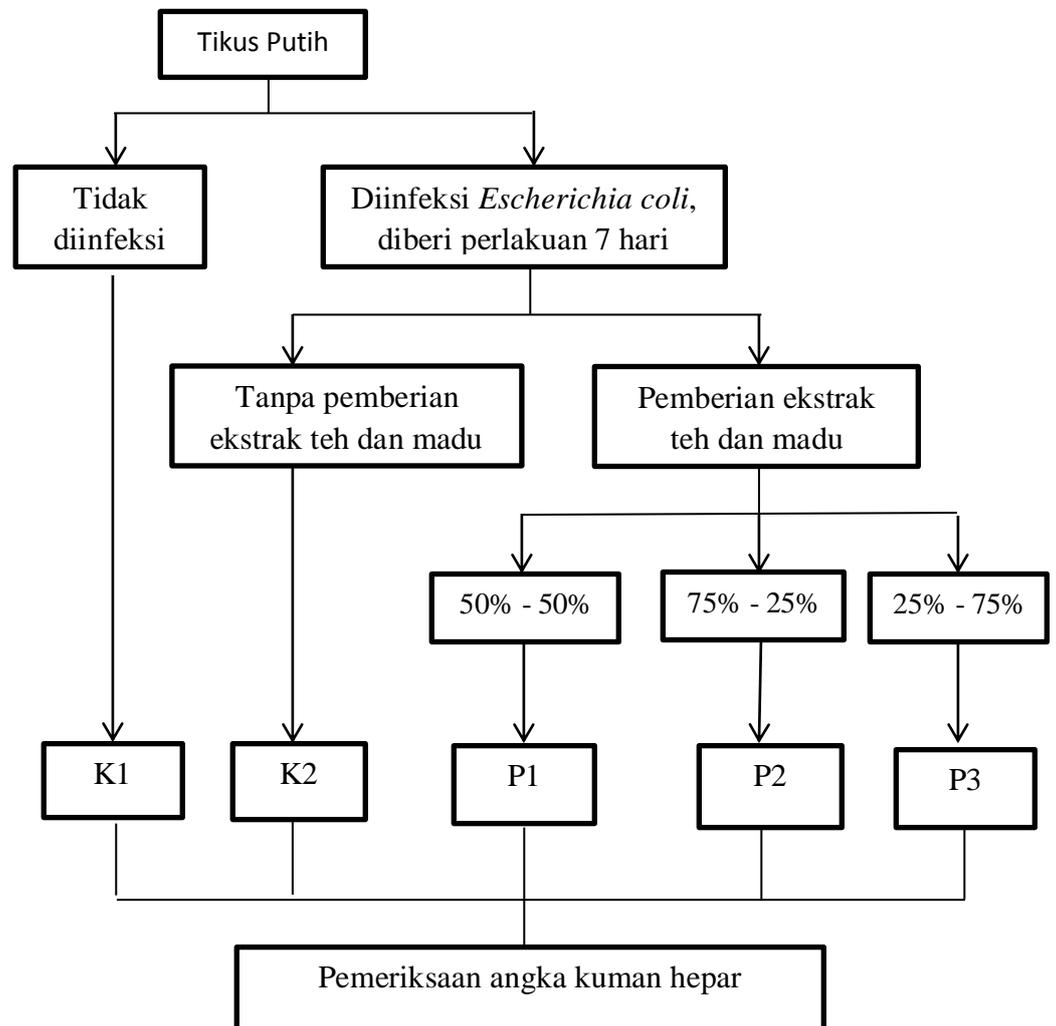
1. Jalannya penelitian :

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) di adaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dengan diberikan pakan standard.
- b. Dilakukan pengelompokan dengan acak sedarhana, 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi dalam 5 kelompok.
- c. Kelompok P1-P3 diberi *Escherichia coli* secara peroral dengan dosis yang sudah ditentukan, setelah 24 jam kelompok P1-3 kemudian diberi pakan standar dan larutan ekstrak teh dan madu dengan dosis (P1) ekstrak larutan teh 50%-madu 50% 3 kali sehari, (P2) ekstrak larutan teh 75%-madu 25% 3 kali sehari, (P3) ekstrak larutan teh 25%-madu 75% 3 kali sehari, ekstrak teh dan madu diberikan selama 7 hari pada tikus yang terinfeksi *E.coli*. Pada hari ke-7 semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianastesi terlebih dahulu dan setelah itu dilakukan euthanasia dengan cara dislokasi leher untuk mengurangi rasa penderitaan hewan coba sebelum pengambilan heparnya untuk pemeriksaan angka kuman hepar.
- d. Kelompok K1 merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan. Kelompok K2 di beri pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Escherichia*

coli secara peroral namun tidak diberi larutan ekstrak teh dan madu. Kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama pada hepar.

2. Prosedur Pemeriksaan

- a. Diambil hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan dihomogenisasi dengan 10 ml NaCl fisiologis. Hasil homogenisasi dibuat pengenceran $10^{-1} - 10^{-4}$ dengan diambil 0,5 ml dari masing-masing pengenceran. Setelah itu suspensi dengan konsentrasi $10^{-1} - 10^{-4}$ ditanam pada media Brilliance *E.coli* untuk mendeteksi jumlah angka kuman *Escherichia coli*.
- b. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c. Dihitung koloni kuman yang tumbuh pada media Brilliance *E.coli*
- d. Cara pemeriksaan angka kuman *Escherichia coli* pada hepar dapat dilihat pada Lampiran 1-7.



Gambar 3.1 Skema alur pengambilan data

Keterangan :

K1 : Kontrol sehat tanpa perlakuan

K2 : Diinfeksi *E. coli* tanpa diberi larutan ekstrak teh dan madu

K3 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan teh ekstrak teh 50 % - madu 50 %

K4 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan teh ekstrak teh 75 % - madu 25 %

K5 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan teh ekstrak teh 25 % - madu 75 %

F. Uji validitas dan Reliabilitas

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

G. Analisis Data

Skala pengukuran data penelitian ini berupa angka kuman hepar ini adalah rasio. Data yang akan di analisis secara statistic dengan menggunakan uji one-way ANOVA dilanjut dengan *LSD Post Hoc Test* untuk membandingkan perbedaan mean antar kelompok dengan menggunakan software *SPSS for windows Release 15.0*.

H. Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik FKIK UMY dengan Nomor 158/EP-FKIK-UMY/III/2018 (Lampiran 9).