

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan menggunakan metode eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *the post test-only control group* yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian.

#### B. Populasi dan Sampel Penelitian

##### 1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Strain yang dipilih adalah Spraque-Dawley 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 Sempel

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 perhitungan jumlah sampel, yaitu :

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

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

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

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

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

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

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

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

#### b. Cara Memperoleh Sempel

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 usus halus.

##### 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 sonde lambung dengan dosis Ekstrak Teh 50% - Madu 50% ; Ekstrak Teh 25% - Madu 75% ; Ekstrak Teh 75% - Madu 25%.
2. Angka Kuman usus halus adalah jumlah usus halus bagian ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dihitung dengan mengambil 1 gram organ usus halus bagian ileum 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  $37^{\circ}$  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, tempat makanan dan 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 usus halus 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 37<sup>0</sup> C selama 24 jam. *Escherichia coli* diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 90% menjadi 10<sup>6</sup> 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 disaring, 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 difilter 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

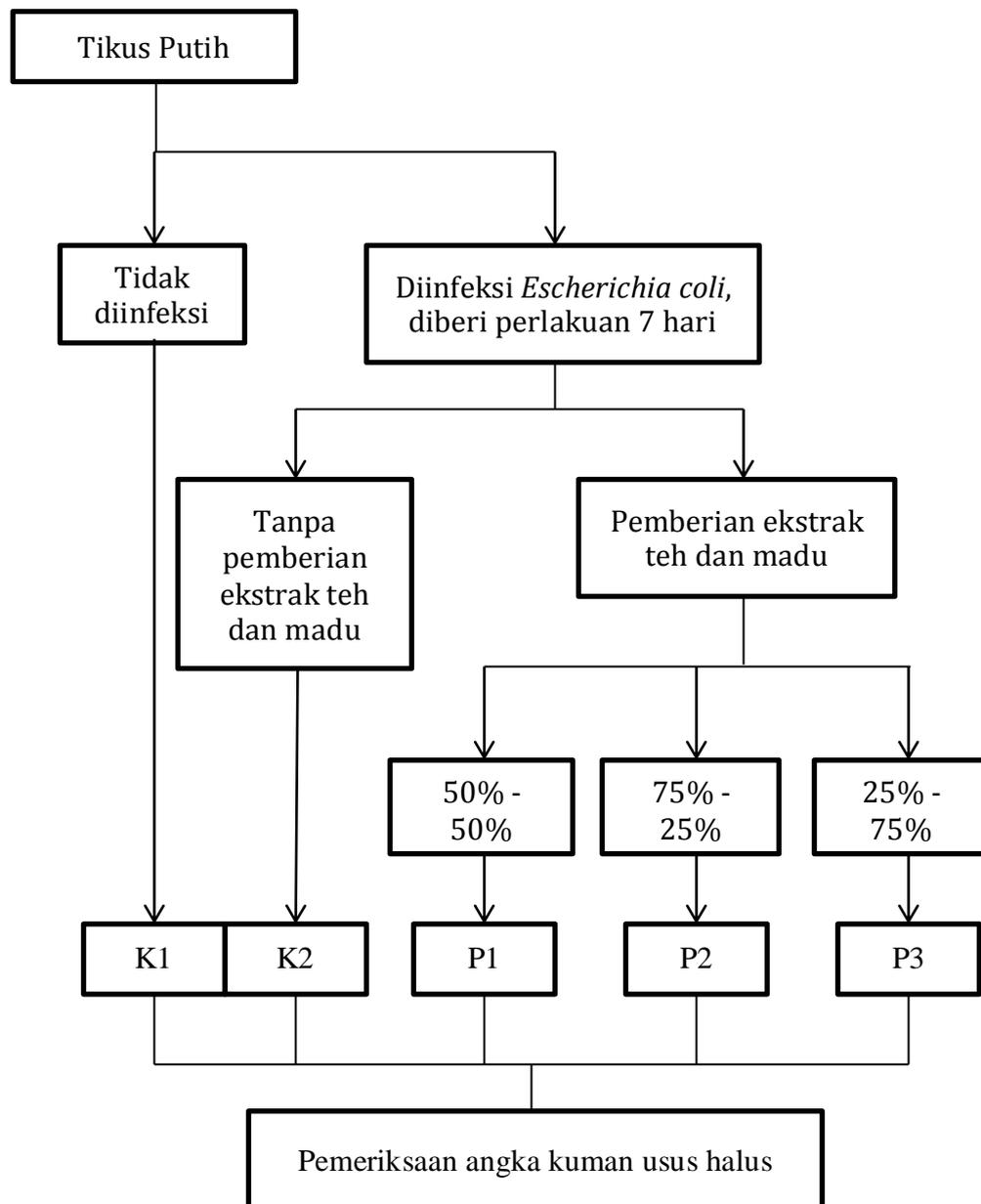
perlakuan berdasarkan komposisinya : komposisi Ekstrak Teh 50% - Madu 50% ; Ekstrak Teh 25% - Madu 75%; Ekstrak Teh 75%- Madu 25%.

1. Jalannya penelitian :

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) di adaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dengan diberikan pakan standard.
- b. Di lakukan pengelompokan dengan acak sedarhana, 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) di bagi dalam 5 kelompok.
- c. . Kelompok P1-P3 diberi *Escherichia coli* secara peroral dengan dosis yang sudah di tentukan, setelah 24 jam kelompok P1 -P3 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*) di anastesi terlebih dahulu dan setelah itu di lakukan euthanasia dengan cara dislokasi leher untuk mengurangi rasa penderitaan hewan coba sebelum pengambilan usus halus untuk pemeriksaan angka kuman usus halus.
- 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 larutan ekstrak teh dan madu. Kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama pada usus halusnya.

## 2. Prosedur Pemeriksaan

- a. Diambil usus halus 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 media Brilliance *E.coli*
- d. Cara pemeriksaan angka kuman *Escherichia coli* pada usus halus dapat dilihat pada lampiran 1-7.



Gambar 3. Skema Alur Pengambilan Data

Keterangan :

K1 : Kontrol sehat tanpa perlakuan

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

P1 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan ekstrak teh 50% - madu 50%

P2 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan ekstrak teh 75% - madu 25%

P3 : Diinfeksi *E. coli* diberi larutan 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 peneliti ini berupa angka kuman usus halus ini adalah rasio. Data yang akan di analisis secara statistik 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 157/EP-FKIK-UMY/III/2018 (Lampiran 9).