

### **BAB III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian ini berupa perlakuan atau intervensi terhadap suatu variabel sehingga diharapkan terjadi pengaruh terhadap variabel yang lain dengan rancangan penelitian *the post test-only control group design*, yaitu dengan melakukan pengukuran atau observasi setelah perlakuan diberikan (Notoatmojo, 2005). Pada penelitian ini menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak daun sirih yang dibuat di Laboratorium Farmasi FKIK UMY, pada mencit *Balb/C* yang diinfeksi dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Parameter pengukuran variabel berupa jumlah leukosit dan limfosit.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Maret – Juni 2015.

#### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### 1. Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit *Balb/C*. Strain yang dipilih adalah *Balb/C* dikarenakan strain ini dapat menimbulkan imunitas selular apabila diinokulasikan dengan *Klebsiella pneumoniae* hidup. Mencit *Balb/C* juga *susceptible* terhadap infeksi *Klebsiella pneumoniae* serta memiliki kemiripan histologis dengan saluran pernafasan manusia.

##### 2. Sampel Penelitian

###### a. Besar sampel

Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federrerr, yaitu :

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

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

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

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

$$r = 4$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah sampel per kelompok

Jumlah sampel per kelompok dihitung berdasarkan rumus tersebut dengan jumlah perlakuan sebanyak enam kelompok. Dari hasil perhitungan didapatkan jumlah sampel minimal adalah empat. Untuk menghindari *drop out* maka ditetapkan jumlah sampel per kelompok sebanyak lima. Sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah tiga puluh mencit.

b. Cara pengambilan sampel

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

- 1) Mencit yang berumur 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan 20 sampai 25 gram.
- 2) Mencit dari galur murni *Balb/C*.
- 3) Mencit dengan jenis kelamin jantan.
- 4) Mencit aktif sebelum diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*.
- 5) Mencit sehat dan tidak ada kelainan anatomis.

Sedangkan untuk kriteria eksklusi antara lain, dalam pengambilan sampel mencit mati sebelum tiba waktu observasi.

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel tergantung: Status imunologi, dalam penelitian ini diukur dengan parameter sebagai berikut :
  - a. Jumlah leukosit diperiksa dengan hemositometer.
  - b. Persentase limfosit dari sediaan apus darah tepi diperiksa dengan melihat dibawah mikroskop cahaya dan dihitung persentasenya dalam 100 leukosit.
2. Variabel bebas: Pemberian larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dengan dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan pemberian obat standar eritromisin 3,25mg.
3. Variabel terkendali:
  - a. Dapat dikendalikan:
    - 1) Mencit *Balb/C* umur 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan rata-rata 20– 25 gram,
    - 2) Kondisi kandang, pakan, dan minum sama.
    - 3) *Klebsiella penumoniae* sebagai imunogen, yang diinfeksi sebanyak  $10^8$  CFU. *Klebsiella penumoniae* yang digunakan yaitu dari isolat klinis yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FK UGM.
  - b. Tidak dapat dikendalikan: Variasi genetik dan metabolisme mencit.

#### E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) adalah larutan yang dibuat dari daun sirih (*Piper betle Linn*) yang diberikan kepada kelompok perlakuan mencit *Balb/C* (yang diinfeksi *Klebsiella penumoniae*) melalui sonde lambung dengan dosis 100mg/kg BB/hari, 200mg/kg BB/hari dan 400mg/kg BB/hari.

2. Jumlah leukosit adalah leukosit dalam darah mencit *Balb/C* yang dihitung dengan menggunakan alat hemositometer dan dilihat di bawah mikroskop cahaya, sel-sel leukosit yang dihitung adalah yang mengendap pada 4 kotak besar bilik hitung *Improved Neubaur* dengan rumus, hitung leukosit/mm<sup>3</sup>= jumlah sel yang dihitung dalam 4 kotak besar x pengenceran (20) dibagi volume kotak besar (0,4mm<sup>3</sup>) dengan satuan jumlah leukosit/mm<sup>3</sup>.
3. Persentase limfosit adalah persentase jumlah limfosit dalam 100 leukosit yang dihitung dengan cara membaca di bawah mikroskop, dari zona baca pada sediaan apus darah tepi dengan ciri-ciri inti bulat atau oval yang dikelilingi oleh pinggiran sitoplasma sempit berwarna biru yang mengandung sedikit sedikit granula, dengan satuan persentase limfosit dalam persen (%).

## **F. Instrumen Penelitian**

### 1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Untuk pemeliharaan mencit : kandang mencit, ram kawat, alas kandang, tempat makanan, tempat minuman, sikat.
- b. Untuk perlakuan pada mencit : neraca analitik, mikropipet, vortex, kaca objek, sonde lambung, spuit 1 cc steril, pipet volume, pipet pasteur, pipet eppendorf, petridish, inkubator, ose.
- c. Untuk pengambilan data : sarung tangan, pinset, spuit 3 ml, seperangkat alat bedah steril, alat homogenisasi, mikroskop cahaya, alat hemositometer yang terdiri dari bilik hitung *Improved Neubaur* dan pipet leukosit.

### 2. Bahan dan Reagen Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan yaitu : pakan ternak standar untuk mencit *Balb/C*, bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FK UGM, larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) yang dibuat di Laboratorium Farmasi FKIK UMY, sampel berupa darah mencit yang diambil dari pembuluh darah retroorbital mencit dengan menggunakan kapiler hematokrit dan darah dari ekor mencit.

Reagen yang digunakan adalah alkohol 70%, dan larutan Giemsa, antikoagulasi EDTA, larutan pengencer Turk dan minyak imersi, kemudian media McConkey, NaCl fisiologis steril, eter, dan heparin.

#### 1) Pembuatan ekstrak daun sirih

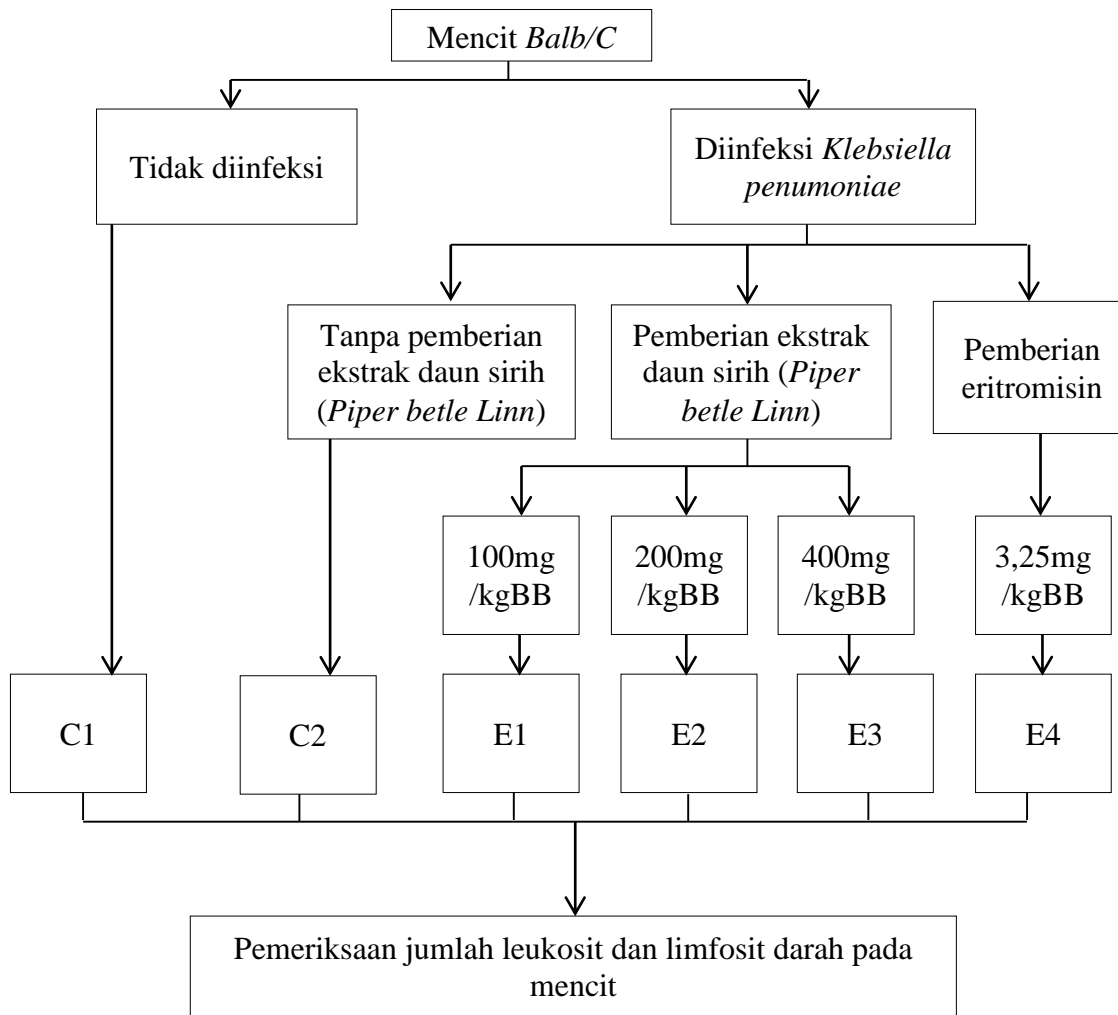
Pembuatan ekstrak daun sirih yaitu dengan mengeringkan daun sirih kemudian dibuat dalam bentuk serbuk, kemudian serbuk ditimbang sesuai kebutuhan dosis dan dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol, selama 3 jam dan sebanyak 10 siklus, suhu dijaga pada 65 derajat *celcius*. Kemudian ekstrak disaring dengan menggunakan corong buchner untuk mendapatkan filtratnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporat sampai diperoleh ekstrak kental (Chakraborty and Shah, 2011).

#### 2) Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella penumoniae*

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella penumoniae* adalah *Klebsiella penumoniae* ditanam dalam kaldu brain heart indusion (BHI) yang mengandung 100µg/ml ampisilin dan diinkubasikan dalam 37 derajat *celcius* selama 18 jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dalam 15 menit. Dicuci sebanyak dua kali dalam larutan NaCl 0,85%. Setelah pencucian kedua, diencerkan dengan NaCl 0,85% hingga mendapatkan volume 1/10 dari volume awal, sehingga menghasilkan inokulum yang dapat diinfeksi. Jumlah

koloni dikonfirmasi dengan menggunakan metode *spiral plated* dalam *tryptic soy agar* (TSA)  
(Hilliard, *et al.*, 2011)

## G. Alur Penelitian



## H. Cara Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

1. Sampel diadaptasi selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
2. Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor mencit dibagi dalam 6 kelompok.
3. Kelompok E1-E4 diberi pakan standar dan larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dengan dosis 100 mg/kg BB/hari untuk E1, 200 mg/kg BB/hari untuk E2, 400 mg/kg BB/hari untuk E3, dan larutan eritromisin 3,25 mg. Setelah 12 jam infeksi *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal pada hari ke-1, kemudian diberi perlakuan dengan dosis yang sudah ditetapkan

selama 7 hari. Pada hari ke-7 semua mencit diambil darahnya melalui pembuluh darah retroorbital untuk pemeriksaan jumlah leukosit dan darah dari ekor mencit untuk dihitung persentase limfositnya.

4. Kelompok C2 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal namun tidak diberi larutan ekstrak daun sirih maupun larutan eritromisin dan kelompok C1 merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

## I. Prosedur Pemeriksaan

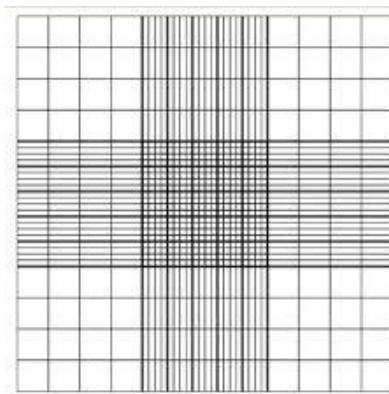
1. Prosedur pemeriksaan jumlah leukosit (Suryanto, 2006)

Pemeriksaan jumlah leukosit dilakukan dengan cara:

- a. Darah mencit yang diambil dari retroorbital diberi antikoagulasi EDTA,
- b. Dilakukan pemeriksaan jumlah leukosit dengan menggunakan hemositometer yang terdiri dari bilik hitung Improved Neubaur.
- c. Bilik hitung dicari dengan mikroskop dalam posisi rata, dengan menggunakan pembesaran kecil 10 x 10.
- d. Cari 4 bidang kotak besar yang masing-masing luasnya 1 mm<sup>3</sup> yaitu bidang pojok kanan atas, kanan bawah, kiri atas dan kiri bawah (lihat gambar).
- e. Hisap darah dengan pipet leukosit sampai tanda 0,5, bila lebih letakkan ujung pipet pada bahan yang tidak meresap, misal kuku atau plastik, sampai darah tepat pada tanda 0,5,
- f. Bersihkan ujung luar pipet tersebut dengan tissue,
- g. Kemudian hisaplah larutan pengencer sampai tanda 11 (pengenceran 1:20),
- h. Peganglah pipet leukosit tersebut sedemikian rupa sehingga kedua ujung pipet terletak diantara ibu jari dan telunjuk tangan kanan,



- i. Kocoklah selama 3 menit, agar semua eritrosit lisis,
- j. Pengisian bilik hitung : buanglah 4 tetes pertama dan letakkan ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup. Isikan ke dalam bilik hitung tersebut dan biarkan selama 3 menit agar leukosit mengendap
- k. Cara menghitung : hitunglah sel-sel leukosit pada ke-4 kotak besar bilik hitung. Pada setiap kotak sel-sel yang menempel pada sisi kiri/bawah ikut dihitung sedangkan yang menempel di sisi kanan/atas tidak dihitung.
- l. Hitung leukosit  $\text{mm}^3$  = jumlah sel yang dihitung dalam 4 kotak besar x pengenceran (20) dibagi volume kotak besar ( $0,4 \text{ mm}^3$ ) dengan satuan jumlah leukosit/ $\text{mm}^3$ .



Gambar 9. Bilik hitung *Improved Neubaur* (sumber: Kurniawan, 2012)

2. Prosedur pemeriksaan persentase dan gambaran morfologi limfosit (Suryanto, 2006)  
Langkah-langkah dalam pemeriksaan hitung jenis leukosit pada sediaan apus darah tepi dengan prosedur pembuatan preparat sebagai berikut :
  - a. Meneteskan darah pada garis tengah kaca objek kira-kira 1 cm dari ujung.
  - b. Dengan tangan kanan diletakkan kaca objek lain di sebelah kiri tetesan dan gerakkan ke kanan sampai menyentuh tetes darah.
  - c. Darah akan menyebar pada sisi penggeser.
  - d. Menggeserkan kaca ke kiri dengan memegangnya miring 45 derajat.

- e. Preparat dibiarkan kering di udara dan beri label.
- f. Preparat yang telah kering difiksasi dengan methanol 90%, dikeringkan kembali.
- g. Preparat diberi pewarnaan dengan larutan Giemsa dan didiamkan selama 20-25 menit.
- h. Mencuci preparat dengan air mengalir dan preparat dikeringkan.
- i. Preparat sediaan apus darah tepi yang sudah kering dibaca di bawah mikroskop cahaya untuk dihitung persentase limfositnya dan hitung jenis leukosit lainnya.

## **J. Uji Validitas dan Reliabilitas**

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

## **K. Analisis Data**

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle*Linn) terhadap jumlah leukosit dan persentase limfosit pada mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* menggunakan analisis data statistik dengan bantuan *software SPSS* versi 15. Untuk uji normalitas dan uji homogenitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel yang digunakan sedikit (<50) kemudian data tersebut diuji dengan uji parametrik *One Way ANOVA* karena distribusi data normal, untuk mengetahui perbedaan dari tiap-tiap kelompok tersebut dilakukan uji *Tukey HSD* untuk jumlah leukosit dan diberikan uji *Kruskal Wallis* serta uji *Mann Whitney* untuk persentase limfosit karena distribusi data tidak normal.

## **L. Etika Penelitian**

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