

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test-only control group* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak daun pegagan yang dibuat di Laboratorium Farmasi FK UGM, pada mencit Balb/c yang diinfeksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium*. Parameter pengukuran variabel berupa jumlah angka kuman hepar.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/c. Strain yang dipilih adalah Balb/c sebab strain ini dapat menimbulkan imunitas seluler apabila diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup. Mencit Balb/c juga *susceptible* terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.

2. Sampel

a. Jumlah Sampel

Penelitian ini menggunakan 3 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 21 ekor mencit, untuk mengantisipasi *drop out* digunakan 5 ekor mencit per kelompok. Rumus sample yang digunakan adalah Rumus Federer: $(t-1)(r-1) > 15$, dimana t = jumlah kelompok perlakuan dan r = jumlah ulangan tiap perlakuan (replikasi)

b. Cara pengambilan sampel

Kriteria inklusi meliputi: galur murni Balb/c, jenis kelamin jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-30 gram, dan aktif sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel adalah mencit yang mati sebelum tiba waktu observasi.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei - Juni 2012 dengan jadwal sebagai berikut:

Tabel 1. Jadwal pelaksanaan kegiatan

Kegiatan	Waktu Pelaksanaan				
	Mei		Juni		
	Minggu III	Minggu IV	Minggu I	Minggu II	Minggu III
Persiapan alat dan bahan	■				
Adaptasi mencit	■				
Masa perlakuan		■	■	■	
Pengumpulan dan analisis data					■

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Dosis ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, kloramfenikol 1 mg, dan kombinasi

kloramfenikol 0,975 mg dan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) 125 mg/kgBB.

2. Variabel tergantung

Angka kuman hepar yang dihitung dengan menggunakan metode *streak plate count* pada media MacConkey.

3. Variabel terkontrol

Salmonella typhimurium sebagai imunogen. *Salmonella typhimurium* yang digunakan adalah strain *Salmonella* virulen (Phage type 510) dengan LD50 10^6 CFU, sehingga dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas seluler adalah 10^5 CFU, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UGM. Strain ini dipilih karena merupakan organisme ideal dan banyak dijadikan model untuk mempelajari respon imun nonspesifik maupun spesifik terhadap infeksi bakteri intraseluler.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) adalah larutan yang dibuat dari daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) yang diberikan kepada kelompok perlakuan mencit Balb/c (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) melalui sonde lambung dengan dosis 3×125 mg/hr/kgBB, 3×250 mg/hr/kgBB, dan 3×500 mg/hr/kgBB.
2. Angka kuman hepar adalah jumlah kuman hepar mencit yang dihitung dengan mengambil 1 gram organ hepar pada mencit dan dihomogenisasi dengan 10 ml NaCl fisiologis. Hasil homogenisasi dibuat pengenceran $10^{-1} - 10^{-4}$ dengan diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran. Setelah

itu suspensi dengan konsentrasi 10^{-3} dan 10^{-4} ditanam pada media MacConkey dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung kemudian dikonversikan dalam satuan *colony forming unit* (CFU) (WHO, 2003).

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Pemeliharaan mencit: kandang mencit, ram kawat, alas kandang, tempat makanan, tempat minuman, sikat.
- b. Perlakuan pada mencit: 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, ose.
- c. Pengambilan data: sarung tangan, pinset, spuit 3 ml.

2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan pakan ternak standar untuk mencit Balb/c, bakteri *Salmonella typhimurium* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UGM, larutan ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) yang dibuat di Laboratorium Farmasi UGM. Sampel berupa hepar mencit yang diambil melalui proses pembedahan. Reagen yang digunakan alkohol 70%, media MacConkey, NaCl fisiologis steril, eter, heparin.

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhimurium* adalah

Salmonella typhimurium dikultur didalam media TSA (Trypticase Soy Agar)

kemudian diinkubasi dalam suhu 37° selama 24 jam. *Salmonella typhimurium* (larutan warna kuning) diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 90% menjadi 10⁵ dan siap diberikan pada mencit kelompok kontrol positif dan kontrol perlakuan 1-5.

Pembuatan ekstrak daun pegagan yaitu dengan cara daun pegagan kering dibuat serbuk dengan menggunakan mesin penyerbuk, kemudian sejumlah daun pegagan yang telah ditimbang sesuai dosis dimaserasi dengan menggunakan pelarut ethanol 70% selama 30 menit sambil sesekali diaduk. Kemudian ekstrak disaring dengan corong Buchner untuk mendapat filtratnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

G. Jalannya Penelitian

1. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Mencit diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- b. Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 35 ekor mencit dibagi dalam 7 kelompok.
- c. Kelompok P1-5 diberi pakan standar dan larutan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dengan dosis (P1) 3x125 mg/hr, (P2) 3x250 mg/hr, (P3) 3x500 mg/hr, (P4) larutan kloramfenikol 1,3 mg, dan (P5) kombinasi larutan kloramfenikol 0,975 mg dan 125 mg/kgBB larutan

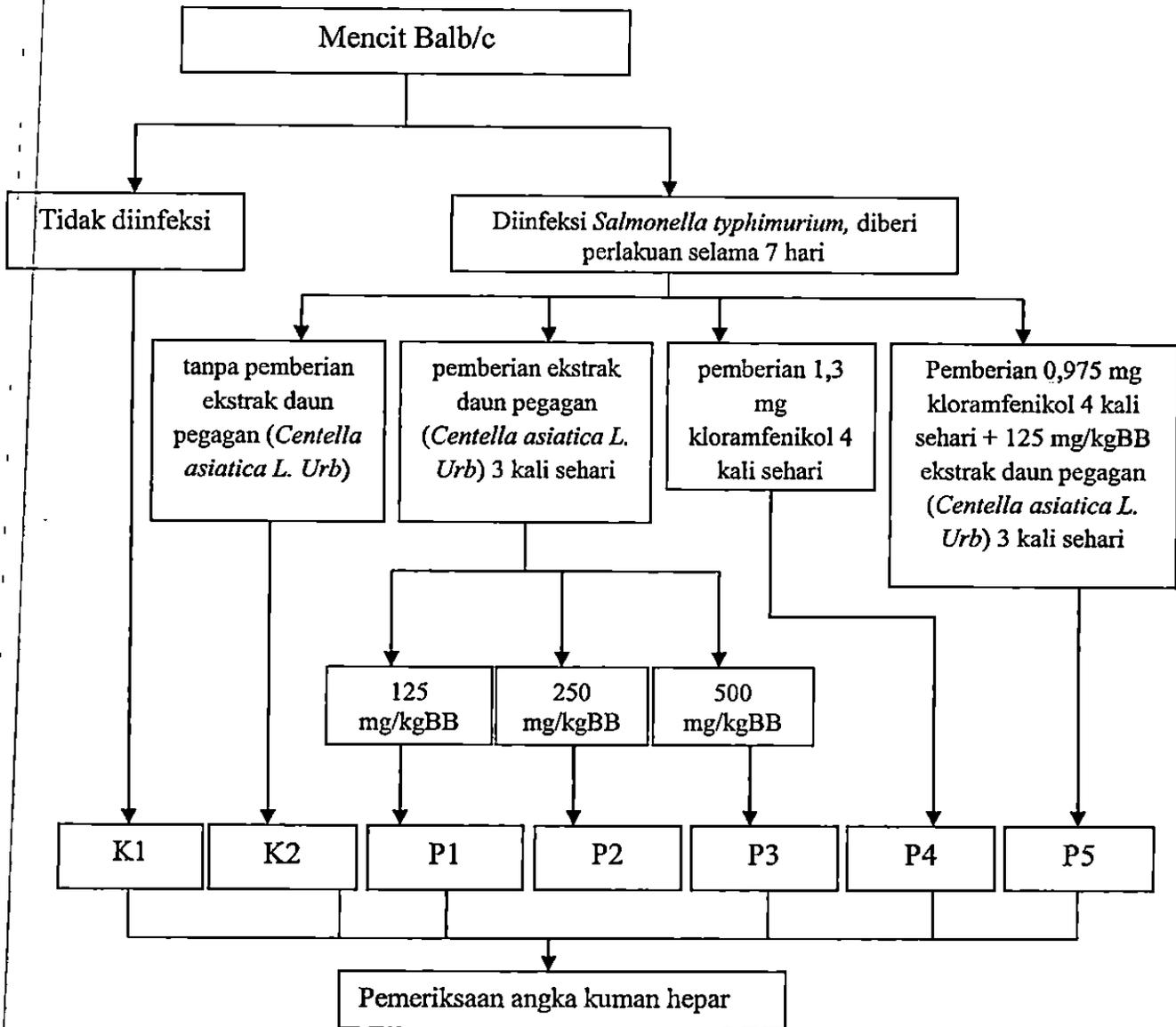
ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) setelah 12 jam injeksi

Salmonella typhimurium secara intraperitoneal pada hari ke-1, dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 7 hari. Pada hari ke-7 semua mencit Balb/c diambil heparnya untuk pemeriksaan angka kuman hepar.

- d. Kelompok K2 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal namun tidak diberi larutan ekstrak pegagan dan kelompok K1 merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

2. Prosedur pemeriksaan

- a. Diambil 1 gram hepar mencit Balb/c dan dihomogenisasi dengan 10 ml NaCl fisiologis. Hasil homogenisasi dibuat pengenceran $10^{-1} - 10^{-4}$ dengan diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran. Setelah itu suspensi dengan konsentrasi 10^{-3} dan 10^{-4} ditanam pada media agar MacConkey untuk mendeteksi jumlah angka kuman *Salmonella typhimurium*.
- b. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c. Dihitung koloni kuman yang tumbuh dan selanjutnya koloni ditanam pada media KIA, LIA, SSS, dan MIO.
- d. Diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam untuk memastikan bahwa yang



Gambar 8. Skema Alur Pengambilan Data

H. 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.

I. Analisis Data

Skala pengukuran data penelitian tentang angka kuman hepar ini adalah rasio. Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dengan uji *one-way*

ANOVA dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* untuk membandingkan *mean* antar kelompok menggunakan program SPSS 16.0. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.5.