

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test-only control group design*.

##### B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UMY. 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					■

##### C. Populasi dan Sampel

1. Populasi: Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/C. Strain yang dipilih adalah Balb/C sebab strain ini dapat menimbulkan

infeksi pada tikus apabila diinjeksi dengan *Salmonella typhimurium*

hidup. Mencit Balb/C juga *susceptible* terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.

2. 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.
3. Cara pengambilan sampel

Kriteria inklusi meliputi:

- a. Galur murni Balb/C,
- b. Jenis kelamin jantan,
- c. Umur 8-10 minggu,
- d. Berat badan 20-30 gram,
- e. Aktif, sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel adalah mencit mati sebelum tiba waktu observasi.

#### D. Variabel dan Definisi Operasional

##### 1. Variabel Penelitian

- a. 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*) 125 mg/kgBB.
- b. Variabel tergantung : Angka kuman darah yang dihitung dengan

- c. 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 Fakultas Farmasi UGM.
2. Definisi Operasional
- a. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) adalah larutan yang dibuat dari daun pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan kepada kelompok perlakuan mencit Balb/C (yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*) melalui sonde lambung dengan dosis 3x125 mg/hr/kgBB, 3x250 mg/hr/kgBB, dan 3x500 mg/hr/kgBB.
- b. Angka kuman darah adalah jumlah kuman darah mencit yang dihitung dengan cara mengkultur 10  $\mu$ L darah pada media MacConkey dengan cara *streak plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung kemudian dikonversikan dalam satuan *colony forming unit* (CFU) (WHO, 2003).

## E. Instrumen Penelitian

### 1. Alat

- a. Pemeliharaan mencit: kandang mencit, ram kawat, alas kandang,

- 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, petridish, incubator, 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*) yang dibuat di Laboratorium Farmasi UGM. Sampel berupa darah yang diambil dari pembuluh darah retroorbital mencit dengan menggunakan kapiler hematokrit. Reagen yang digunakan alkohol 70%, media MacConkey, NaCl fisiologis steril, eter, heparin, antikoagulan EDTA.

## F. Cara Pengumpulan Data

### 1. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Sampel 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*) dengan dosis (D1) 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*) 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 darahnya untuk pemeriksaan angka kuman darah.

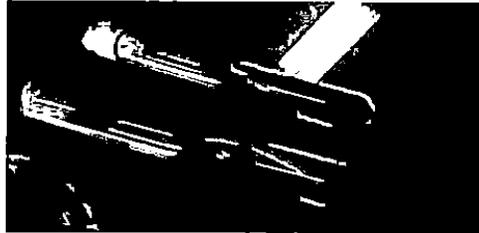
- d. Kelompok K2 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal namun tidak diberi larutan ekstrak pegagan dan kelompok K1, merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

## 2. Prosedur pemeriksaan

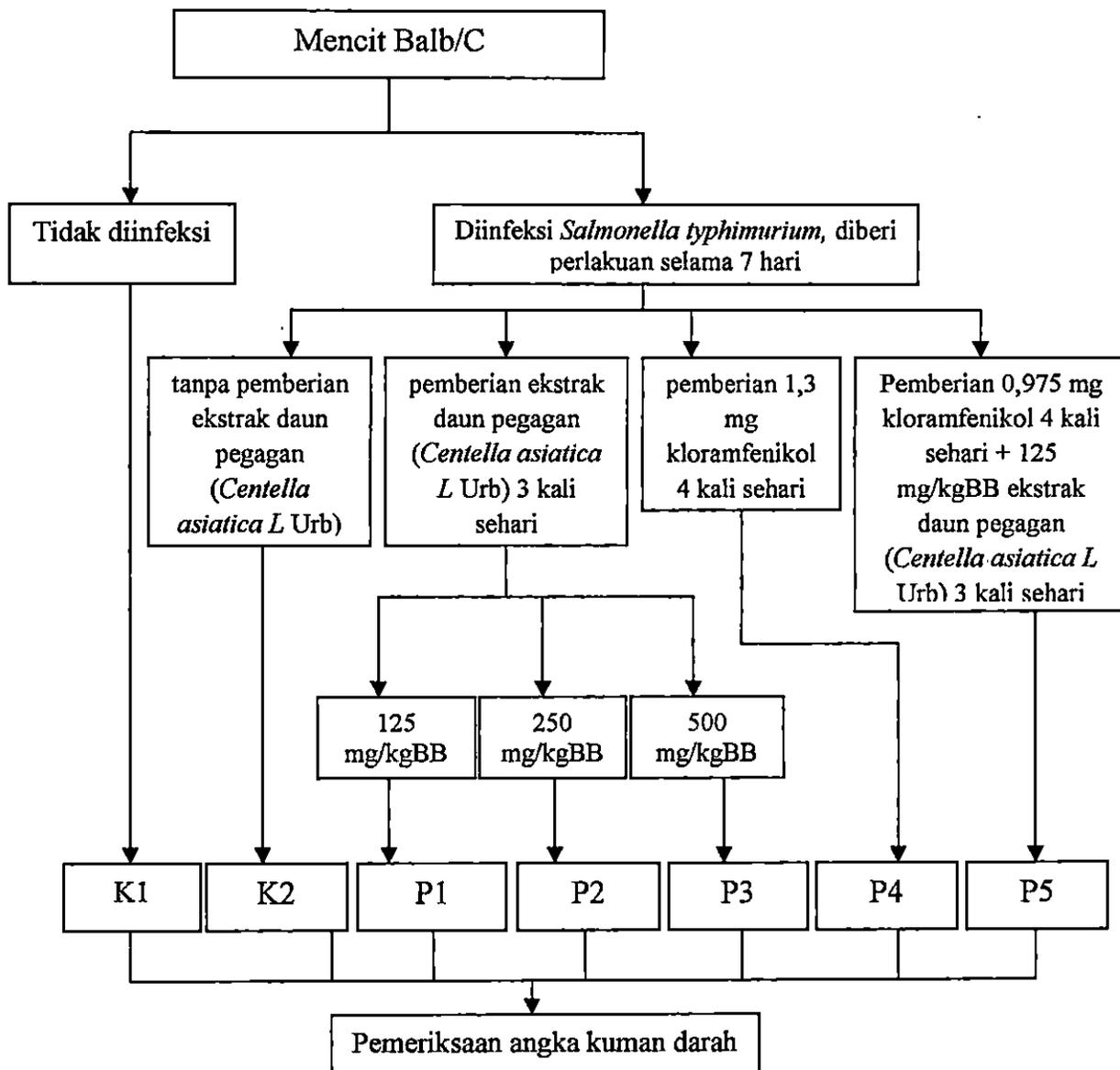
### Prosedur pemeriksaan angka kuman darah

- a. Diambil darah vena mencit Balb/C sebanyak 10 $\mu$ L secara aseptis, lalu 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

- d. Diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam untuk memastikan bahwa yang tumbuh adalah kuman *Salmonella typhimurium*.



Gambar 6. Pada media LIA, kuman *Salmonella typhimurium* menghasilkan gambaran makroskopik berwarna kehitaman.



Gambar 7. Skema Alur Pengambilan Data

reliabilitas) pada penelitian ini

dan cara pengukuran, dan dosis

angka kuman darah ini adalah

alisis secara statistik dengan

an dengan *LSD Post Hoc Test*

entarkelompok menggunakan