

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 tikus putih sebagai obyek penelitian.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Galur *Sparaque-Dawiley* dipilih karena galur ini dapat menimbulkan imunitas seluler apabila diinokulasi dengan *Escherichia coli* hidup. Selain itu, 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

$$(t-1)(r-1) > 15$$

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

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

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

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

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

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

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

b. Cara Memperoleh Sampel

Tikus putih diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM.

c. Kriteria inklusi

Tikus putih galur *Sprague-Dawley*, jenis kelamin jantan, umur 3 bulan, berat badan 200 gram, dan aktif sebelum diinfeksi *Escherichia coli*.

d. Kriteria eksklusi

Tikus putih yang mati sebelum tiba waktu observasi.

C. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

a. Variabel Bebas

Campuran ekstrak teh dan madu dengan komposisi:

1) Teh 50% - madu 50%

2) Teh 25% - madu 75%

3) Teh 75% - madu 25%.

b. Variabel Terikat

Jumlah angka kuman *Escherichia coli* dalam lambung tikus putih.

c. Variabel Terganggu

Kontaminasi bakteri dan sterilisasi alat-alat yang digunakan pada saat penelitian.

2. Definisi Operasional

a. Ekstrak teh dan madu adalah larutan yang dibuat dari daun teh (*Camellia sinensis*) dan dikombinasikan dengan madu yang diberikan kepada kelompok perlakuan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Escherichia coli* melalui per oral dengan dosis teh 50% - madu 50%, teh 25% - madu 75%, teh 75% - madu 25%.

b. Angka kuman dalam lambung adalah jumlah kuman *Escherichia coli* pada tikus putih. Sampel lambung diambil 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 derajat C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung kemudian dikonversikan dalam satuan colony forming unit atau CFU (WHO, 2003).

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, ose.
- c. Pengambilan data: gunting medis, sarung tangan, pinset, spuit 3 ml.

2. Bahan

- a. Tikus putih.
- b. Bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi UGM.
- c. Larutan ekstrak teh (*Camellia sinensis*) yang dibuat di LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta dan proses pencampuran dengan madu murni dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- d. Sampel berupa lambung pada tikus putih
- e. Reagen yang digunakan alkohol 70%, media MacConkey, larutan NaCl fisiologis steril.

E. Cara Pengumpulan Data

Bakteri *Escherichia coli* diperoleh dari laboratorium mikrobiologi UGM dan suspensi bakteri *Escherichia coli* dibuat dengan dikultur di dalam media *Trypticase Soy Agar* (TSA), kemudian diinkubasi dalam suhu 37⁰ C selama 24 jam. *Escherichia coli* selanjutnya diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 90% menjadi 10⁶ dan siap diberikan pada tikus putih kelompok control dan perlakuan 1-3.

Tikus putih diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM, dengan jenis kelamin jantan, umur 3 bulan, berat badan 200-250 gram, dan sebanyak 30 ekor tikus putih .

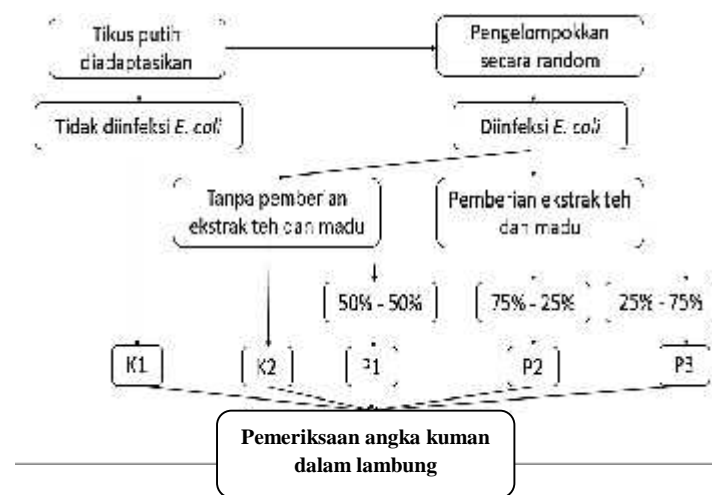
Pembuatan ekstrak daun teh yaitu dengan cara daun teh kering dibuat serbuk teh (simplisia) dengan menggunakan mesin penyebuk (*grinder*) lalu disaring, kemudian serbuk daun teh ditambah pelarut etanol 70%, dengan perbandingan antara etanol 70% : simplisia (1:10), selanjutnya dimaserasi selama 24 jam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

Pencampuran ekstrak teh dengan madu murni dilakukan di LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta dan dibagi menjadi tiga macam perlakuan berdasarkan komposisinya : teh 50% - madu 50%, teh 25% - madu 75%, teh 75% - madu 25%.

F. Jalannya penelitian

1. Tikus putih diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dengan diberikan pakan standar.
2. Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor tikus putih dibagi dalam 5 kelompok.
3. Kelompok P1-3 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 *Escherichia coli*.

4. Kelompok K1 merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan. Kelompok K2 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Escherichia coli* secara peroral namun tidak diberi larutan ekstrak teh dan madu.
5. Pada hari ke-7 semua tikus putih dianestesi terlebih dahulu dan setelah itu dilakukan euthanasia dengan cara dislokasi leher untuk mengurangi rasa penderitaan hewan coba sebelum pemotongan badan tikus guna mengambil lambung dengan gunting medis untuk pemeriksaan angka kuman dalam lambung.

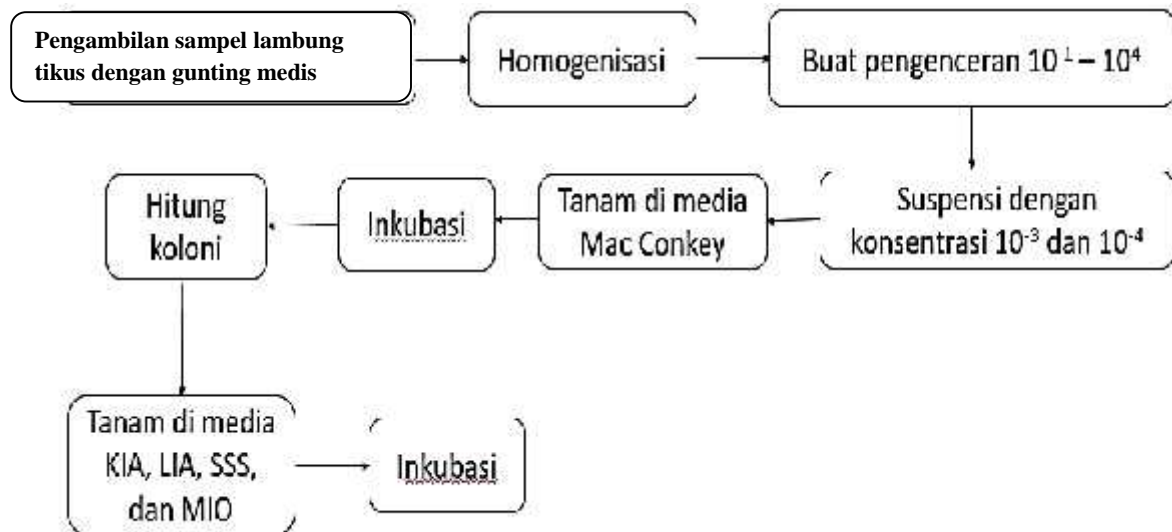


Gambar 3. Skema Jalannya Penelitian

G. Prosedur Pemeriksaan

1. Lambung tikus putih diambil menggunakan gunting medis dan dihomogenisasi dengan 10 ml larutan NaCl fisiologis. Hasil homogenisasi dibuat pengenceran 10^{-1} – 10^{-4} dengan diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran. Setelah itu disuspensi dengan konsentrasi 10^{-3} dan 10^{-4} ditanam pada media agar MacConkey untuk mendeteksi jumlah angka kuman *Escherichia coli*.
2. Media selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Dihitung koloni kuman yang tumbuh dan selanjutnya koloni ditanam pada media KIA, LIA, SSS, dan MIO.

4. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan bahwa yang tumbuh adalah bakteri *Escherichia coli*.



Gambar 4. Skema Prosedur Pemeriksaan Angka Kuman dalam Lambung

H. 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.

I. Analisis Data

Skala pengukuran data penelitian berupa angka kuman dalam lambung 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*.

J. Etik Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh komite etik FKIK UMY.

