

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Ruang lingkup penelitian

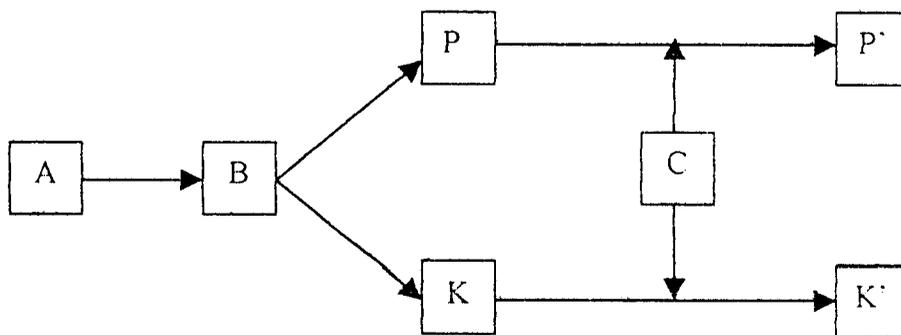
Lingkup keilmuan : Mikrobiologi dan Imunologi serta histologi

Tempat : Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Bioteknologi
Universitas Diponegoro

Waktu : ± 6 bulan

B. Jenis penelitian

Metode experimental dengan desain *POST TEST ONLY CONTROL GROUP*, yaitu dengan hanya melakukan pengamatan terhadap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah diberikan suatu tindakan dengan mengabaikan atau tidak memperhatikan faktor-faktor sebelum diberikan tindakan tersebut. Rancangan penelitiannya adalah sebagai berikut :



Keterangan:

A → B : masa adaptasi / penyesuaian (satu minggu)

- B : mencit yang dibagi atas dua kelompok
- P : kelompok perlakuan yang diberi siklofosamid subkutan
- K : kelompok kontrol
- C : pemberian *C.albicans* pada mencit secara intravena
- P' : kelompok perlakuan setelah diinfeksi *C.albicans*
- K' : kelompok kontrol setelah diinfeksi *C.albicans*

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Mencit swiss betina usia 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gr yang diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan di Jakarta. Kemudian dari mencit tersebut dipisahkan netrofil dari darah tepi untuk dilakukan pemeriksaan fungsi fagositosis.

2. Sampel

a. Besar sampel

Jumlah sampel yang digunakan sebanyak 32 ekor, terdiri dari 16 mencit untuk kelompok perlakuan, dan 16 mencit untuk kelompok kontrol. Jumlah sampel diperoleh dari rumus Federer $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana n = besar sampel, dan t = besar kelompok.

b. Cara pengambilan sampel

Karena sampel diambil dari mencit yang secara genetis sama sifatnya, maka pengambilan secara random atau tidak, tidak menjadi masalah. Tetapi untuk menghindari bias Karena faktor variasi umur dan berat

badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*).

D. Alat dan bahan

1. Jamur *Candida albicans*
2. Siklofosfamid injeksi
3. Alat dan bahan selama pemberian perlakuan
 - a. Kandang mencit berupa kotak plastik yang terbuka bagian atasnya dan ditutup dengan anyaman kawat, ukuran kurang lebih 40 x 25 x 15 cm.
 - b. Makanan mencit, sesuai anjuran Pusvetma Surabaya, makanan yang diberikan pada mencit adlah makanan ternak ayam dengan kandungan gizi standar, yaitu Cp 511. Minuman mencit adalah aquadest yang ditempatkan pada botol terbalik yang menggantung pada tutup kandang mencit. Air dalam botol dapat keluar apabila disedot oleh mencit.
 - c. Spuit tuberculin, jarum no 26
4. Alat dan bahan pembuatan suspensi sel netrofil (PMN) untuk melihat fungsi aktivitas fagositosis netrofil
 - a. Darah heparin / EDTA
 - b. Tabung steril
 - c. NH_4Cl dingin
 - d. Tabung sentrifuge
 - e. Inkubator

- f. Serum AB
 - g. Ficoll hepague
 - h. NaCl dingin
 - i. Sentrifuge
 - j. HBSS-gelatin
 - k. Giemsa 20%
 - l. Es
5. Alat dan bahan pengumpulan data
- a. Mikroskop, dengan sumber cahaya listrik, pembesaran 1000 kali
 - b. Minyak emersi

E. Data Yang Dikumpulkan

Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil pemeriksaan mikroskopik dari sel-sel netrofil yang memfagosit, dibedakan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

F. Cara kerja dan pengumpulan data

- **Cara Kerja**

- 1. **Pemberian perlakuan**

- a. Mencit dipelihara selama 1 minggu dalam masa adaptasi. Selama masa ini mencit diberikan makanan dan minuman.
 - b. Mencit dibagi dalam dua kelompok, 10 ekor sebagai kelompok perlakuan, dan 10 ekor sebagai kelompok kontrol.

- d. Dilakukan pencucian tiga kali dengan NaCl dingin dan kemudian granulosit dimasukkan ke dalam tabung berisi HBSS-gelatin dengan konsentrasi 1×10^7 sel/ml ditambah serum AB (untuk opsonisasi / mempermudah fagosit).
- e. Masukkan sel suspensi granulosit 5×10^6 ke dalam tabung sentrifuge dan lakukan proses fagositosis dengan cara rotasi 4 rpm selama 15 menit pada suhu 37°C .
- f. Proses fagositosis kemudian dihentikan dengan memasukkan tabung sentrifuge pada es yang telah dihancurkan.
- g. Kuman dicuci dengan HBSS-gelatin dingin dengan sentrifuge 3 kali (800 rpm 6 menit) untuk membuang kuman yang tidak difagosit netrofil.
- h. Sediman yang didapat kemudian diambil satu tetes lalu ditetaskan pada kaca benda (*object glass*) dan diperiksa dibawah mikroskop.
- i. Hitung jumlah netrofil yang memfagosit minimal satu *C.albicans* dalam 100 netrofil.

- **Cara Pengumpulan Data**

Pengumpulan data didapat dari pemeriksaan secara mikroskopik terhadap preparat-preparat percobaan yang didapat. Setiap preparat dihitung jumlah netrofil yang memfagosit minimal satu *C.albicans* dalam 100 netrofil dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali.

G. CARA ANALISA DATA

Pada penelitian ini pengolahan data dan analisa data menggunakan program SPSS 10.0 for windows dengan uji kemaknaan *Mann-Whitney Test*, $p < 0.05$.

H. DEFENISI OPERASIONAL

1. Infeksi *C.albicans*

Infeksi *C.albicans* adalah dengan injeksi *C.albicans* pada mencit swiss secara intravena dengan dosis $4 \cdot 10^5$ CFU.

Skala : numerik

2. Siklofosfamid

Pemberian siklofosfamid dilakukan dua kali. Empat hari sebelum infeksi dengan dosis 150 mg/kgbb dan satu hari sebelum infeksi *C.albicans* dengan dosis 100 mg/kgbb secara injeksi subcutan.

Skala : nominal

3. Fungsi fagosit netrofil

Salah satu bentuk respon imun non spesifik dari sel netrofil yang bertujuan untuk membunuh *C.albicans* sesuai dengan tahapan-tahapan fagosit, dimana fungsi fagositnya dilihat dari kemampuan sel netrofil menelan dan membunuh *C.albicans*. Dihitung dengan rumus:

Jumlah netrofil yang memfagosit *C.albicans* =

$$\frac{\text{Jumlah netrofil yang memfagosit minimal } 1 \text{ } C.albicans}{100 \text{ netrofil}}$$

Skala : numerik