

BAB III

METODE PENELITIAN

1. RUANG LINGKUP PENELITIAN

Penelitian ini masuk ke beberapa ruang lingkup yaitu :

1. Lingkup keilmuan penelitian ini adalah Parasitologi, Imunologi, Farmasi, dan Mikrobiologi.
2. Lingkup waktu penelitian ini adalah November 2000 - Februari 2001.
3. Lingkup lokasi penelitian ini adalah Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Imunologi Rumah Sakit Tlogorejo Semarang.

2. JENIS PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain “Post Test Only Control Group “ yaitu jenis penelitian yang hanya melakukan pengamatan terhadap kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberikan suatu tindakan, dengan mengabaikan faktor-faktor sebelum diberikan tindakan tersebut.

3. POPULASI DAN SAMPEL

3.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah semua mencit strain *Balb/C* betina umur 2 – 2 ½ bulan dengan berat badan 25 – 35 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Digunakan

mencit *Balb/C* pada penelitian ini oleh karena mencit strain ini sensitif terhadap *S. typhimurium* (*Ity^s*).

3.2 Sampel

3.3.2.1 Besar sampel

Sampel yang dipakai adalah mencit strain *Balb/C* betina. Sampel tersebut berjumlah 12 ekor, yang terdiri atas :

Group I : 6 ekor sebagai group perlakuan

Group II : 6 ekor sebagai group kontrol

3.3.2.2 Cara pengambilan sampel

Karena sampel diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, maka untuk menghindari bias karena umur dan berat badan, pengelompokan sampel dilakukan secara acak (Simple Random Sampling).

4. ALAT DAN BAHAN

1. Alat dan bahan pembuatan preperat tradisional daun *G. procumbens* :

- a. Daun *G. procumbens* (30 gr)
- b. Aquadest (30 ml)
- c. Mortir dan stamper
- d. Gelas kimia
- e. Gelas ukur
- f. Corong
- g. Kertas saring
- h. Saringan steril mikro

mencit *Balb/C* pada penelitian ini oleh karena mencit strain ini sensitif terhadap *S. typhimurium* (*Ity^s*).

3.2 Sampel

3.2.1 Besar sampel

Sampel yang dipakai adalah mencit strain *Balb/C* betina. Sampel tersebut berjumlah 12 ekor, yang terdiri atas :

Group I : 6 ekor sebagai group perlakuan

Group II : 6 ekor sebagai group kontrol

3.2.2 Cara pengambilan sampel

Karena sampel diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, maka untuk menghindari bias karena umur dan berat badan, pengelompokan sampel dilakukan secara acak (Simple Random Sampling).

4. ALAT DAN BAHAN

1. Alat dan bahan pembuatan preparat tradisional daun *G. procumbens* :

- a. Daun *G. procumbens* (30 gr)
- b. Aquadest (30 ml)
- c. Mortir dan stamper
- d. Gelas kimia
- e. Gelas ukur
- f. Corong
- g. Kertas saring
- h. Saringan steril mikro

- i. *Eppendorf tube*
- j. Timbangan digital , kepekaan 0,1 gr

2. Alat dan bahan selama pemberian perlakuan :

- a. Kandang mencit berupa kotak plastik yang terbuka bagian atasnya dan ditutup oleh anyaman kawat, ukuran $\pm 40 \times 25 \times 15$ cm.
- b. Makanan mencit, sesuai anjuran Pusvetma sebagai makanan yang diberikan kepada mencit adalah makanan ternak ayam dengan kandungan nutrisi standar, yaitu CP 511. Minuman mencit adalah aquades yang ditempatkan pada botol terbalik yang menggantung pada tutup kandang mencit. Air dalam botol dapat keluar bila disedot oleh mencit.
- c. Mikropipet, kepekaan 0,001 ml.
- d. Lampu spirtus.
- e. Preparat tradisional daun *G. procumbens*.

3. Alat dan bahan pengambilan sel makrofag dari cairan peritoneum :

- a. Gunting bedah
- b. Pinset chirurgis
- c. Spuit 5cc
- d. Eter
- e. Tabung kaca
- f. NaCl 0,9 %
- g. Sentrifuse

- h. Tabung gelas lapis silikon
 - i. Kaca benda dan kaca penutup
 - j. Metanol 90 %
 - k. Larutan giemsa dengan buffer Sorensen
 - l. Alkohol 70 %
4. Alat dan bahan untuk melisis eritrosit dalam cairan peritoneum (jika cairan peritoneum bercampur eritrosit oleh karena kesalahan peneliti :
- a. Amonium Klorida dingin (4°C)
 - b. Sentrifuse
 - c. NaCl 0,9 %
 - d. RPMI
 - e. Serum FBS
5. Kuman : *Salmonella typhimurium* strain patogen (phage tipe 501) .
6. Alat dan bahan pemeriksaan sampel :
- a. Mikroskop binokuler, merk Olympus dengan sumber cahaya lampu listrik dan pembesaran 1000 kali.
 - b. Minyak emersi
 - c. Xylol

Alat dan bahan penghitungan jumlah makrofag intraperitoneal :

- a. Mikroskop binokuler, merk Olympus dengan sumber cahaya lampu listrik dengan pembesaran 1000 kali
- b. Bilik hitung *Neubaur Improve*
- c. Kaca penutup
- d. Makrofag yang diambil intraperitoneal
- e. Counter
- f. Pipet

8. Alat dan bahan perhitungan jumlah makrofag yang memfagosit kuman :

- a. mikroskop binokuler, merk Olympus dengan sumber cahaya lampu listrik dengan pembesaran 1000 kali.
- b. Gelas objek
- c. Kaca penutup
- d. Counter
- e. Pipet
- f. Giemsa
- g. Campuran makrofag dengan kuman *S. typhimurium* setelah dibiarkan selama 60 menit.

5. CARA KERJA

1. Pembuatan preparat tradisional daun *G. procumbens* :

- a. Mengambil daun *G. procumbens* yang masih segar, kemudian ditimbang dengan timbangan digital sehingga diperoleh 30 gram (diperkirakan cukup untuk pemberian selama perlakuan).
- b. Daun tersebut kemudian digerus dengan mortir dan stamper. Pada saat menggerus tambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga 30 ml. Penggerusan dilakukan sampai daun benar-benar lumat.
- c. Hasil gerusan kemudian disaring dengan kertas saring yang kemudian disaring lagi dengan saringan steril (mikro) kemudian disimpan dalam gelas kimia steril.
- d. Dari gelas kimia, hasil saring dimasukkan dalam tabung eppendorf. Preparat tradisional daun *G. procumbens* siap diberikan pada mencit. Preparat yang belum diberikan disimpan pada suhu 4 °C .

2. Pemberian perlakuan

- a. Mencit dipelihara selama satu minggu dalam masa penyesuaian. Selama masa penyesuaian ini diberikan makanan dan minuman.
- b. Mencit dibagi dalam dua kelompok, 6 ekor sebagai kelompok kontrol dan 6 ekor sebagai kelompok perlakuan.
- c. Pada kelompok perlakuan diberikan preparat daun *G. procumbens* 25 µl peroral perhari, sedangkan kelompok kontrol diberikan aquades dalam jumlah yang sama. Hal ini dilakukan mulai hari pertama sampai hari ke 28.

d. Selama masa perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tetap mendapat makanan dan minuman.

3. Pengambilan dan penghitungan *makrofag* intraperitoneal mencit dan penginfeksi kuman *S. typhimurium* secara invitro :

a. Mencit dibius dengan eter secara inhalasi, dengan cara dimasukkan kedalam tabung kaca tertutup yang berisi eter.

b. Mencit dimatikan dengan cara dislokasi bagian leher mencit.

c. Mencit yang telah mati difiksasi secara terlentang di atas papan gabus.

d. Perut mencit disemprot alkohol 70 %.

e. Kulit mencit di daerah perut digunting secara horisontal kurang lebih panjangnya 0,5 cm. Pengguntingan tidak sampai mengenai peritoneum. Untuk memperlebar hasil guntingan, kulit di daerah abdomen disobek.

f. Mencit diinjeksi NaCl 0,9 % dingin (4 °C) sebanyak 5 ml intraperitoneal

g. Perut mencit ditekan dan digoyang-goyangkan untuk melepas makrofag dari dinding usus atau peritoneum.

h. Aspirasi cairan peritoneal yang telah bercampur dengan NaCl fisiologis menggunakan spuit yang sama dengan yang digunakan untuk injeksi.

i. Hasil aspirasi dimasukkan kedalam tabung gelas berlapis silikon. Cairan yang didapat dari masing-masing mencit ditampung dalam tabung yang berbeda.

j. Tabung gelas yang berisi cairan peritoneal tersebut disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit dengan tujuan untuk memisahkan sel makrofag dari cairan peritoneum. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali.

- k. Apabila cairan intraperitoneal bercampur dengan eritrosit, maka eritrosit dilisiskan dulu dengan menambah Amonium Klorida dingin (4°C) kemudian disentrifuge 2000 rpm selama 10 menit. Cairan yang terdapat di atas tabung dibuang, sedimen dicuci dengan NaCl fisiologis, cairan yang terdapat di atas tabung dibuang lagi sehingga didapatkan sedimen pada dasar gelas.
- l. Makrofag yang sudah terpisah dari cairan intraperitoneal dihitung di bilik hitung eritrosit
- m. Makrofag yang sudah terpisah dari cairan intraperitoneal ditambahkan kuman *S. typhimurium* yang mati dengan perbandingan antara jumlah makrofag dengan jumlah kuman adalah 1 : 10 yaitu makrofag dengan jumlah $5 \cdot 10^6 / \text{cc}$ dan *S. typhimurium* dengan jumlah $5 \cdot 10^7 / \text{cc}$.
- n. Inkubasi selama 60 menit dengan suhu 37°C dengan maksud agar makrofag memfagosit kuman *S. typhimurium*.
- o. Makrofag dan *S. typhimurium* yang sudah memfagosit kuman tersebut disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- p. Sedimen yang terdapat pada dasar gelas ditambahkan dengan RPMI dan serum FBS kemudian disentrifuse lagi.
- q. Buang cairan bagian atas tabung dan sisakan 0,5 ml.
- r. Campur sedimen dengan cairan yang tersisa dengan cara menggoyang-goyangkan tabung.
- s. Teteskan satu tetes larutan tersebut pada kaca benda (object glass) dan difiksasi dengan metanol 90 %.

- t. Setelah kering dilakukan pengecatan dengan giemsa, tutup dengan kaca pentup (deck glass) dan diperiksa di bawah mikroskop.
- u. Hitung jumlah makrofag yang memfagosit minimal satu kuman *S. typhimurium* dalam 100 makrofag

6. DATA YANG DIKUMPULKAN

Data yang dikumpulkan adalah jenis data primer hasil penelitian eksperimental. Data tersebut berupa jumlah makrofag intraperitoneal, dan jumlah makrofag yang memfagosit kuman dalam 100 makrofag.

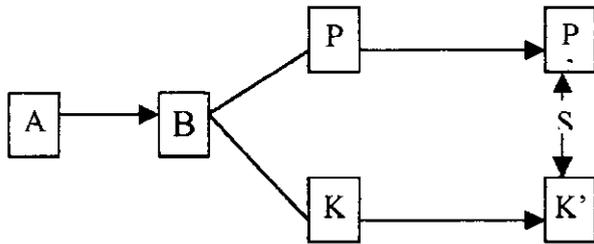
7. CARA PENGUMPULAN DATA

Pengumpulan data didapat dari pemeriksaan secara mikroskopik terhadap preparat-preparat percobaan yang didapat. Setiap preparat dihitung jumlah makrofag intraperitoneal dan jumlah makrofag yang memfagosit kuman dalam 100 makrofag dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali.

8. CARA PENGOLAHAN DAN ANALISA DATA

Pada penelitian ini pengolahan dan analisa data menggunakan program SPSS 10.0 for Windows dengan uji kemaknaan Mann – Whitney Test .

RANCANGAN PENELITIAN



Keterangan :

A→B : Masa adaptasi / penyesuaian (1 minggu)

B : Mencit yang dibagi atas dua kelompok

P : Kelompok perlakuan yang diberikan preparat daun *G. procumbens* peroral

K : Kelompok kontrol yang diberikan aquades peroral

P→P' : Waktu pemberian daun *G. procumbens* pada kelompok perlakuan (28 hari).

P' : Kelompok perlakuan pada hari ke 28

K→K' : Waktu pemberian aquades pada kelompok kontrol (28 hari)

K' : Kelompok kontrol pada hari ke 28

S : Pemberian kuman *S. typhimurium* pada makrofag yang telah dikeluarkan dari tubuh mencit.

0. DEFINISI OPERASIONAL

1. Preparat tradisional daun *G. procumbens*

Adalah suatu bentuk sediaan yang dibuat secara tradisional dari daun segar *G. procumbens* dengan cara menggerusnya memakai mortir dan stamper lalu diambil sarinya dan diberikan dengan dosis 25 µl peroral per hari

Skala : Nominal

2. Makrofag intraperitoneal

Makrofag yang dipisahkan dari cairan intraperitoneal dengan injeksi NaCl 0,9% dingin dan masase ringan , kemudiaan dihitung pada bilik hitung Neubeuer Improve sebelum infeksi *S. typhimurium*.

Skala : Numerik

3. Infeksi *S. typhimurium* secara invitro

Adalah pemberian kuman *S. typhimurium* pada 5.10^6 makrofag mencit Balb/C yang diambil dari intraperitoneal dengan dosis 5.10^7 sel di luar tubuh mencit.

Skala : Numerik

4. Fagositosis makrofag terhadap *S. typhimurium*

Adalah salah satu bentuk respon imun non spesifik dari makrofag yang bertujuan untuk membunuh kuman *S. typhimurium* sesuai dengan tahapan-tahapan fagositosis, dimana fungsi fagositnya dilihat di luar tubuh mencit dengan mencampurkan antara makrofag yang diambil dari intraperitoneal dengan *S. typhimurium* (invitro) dan dihitung dengan rumus :

Persentase jumlah makrofag yang memfagosit kuman =

Jumlah makrofag yang memfagosit minimal satu kuman

100 makrofag.

Adapun fagositosis makrofag dalam hal ini tidak sampai tahap *killing*.

skala : Numerik