

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental dengan empat puluh satu ekor mencit Balb/C jantan usia 6-8 minggu dengan diet normal laboratorium, dibagi menjadi 4 kelompok secara *random sampling*, masing-masing 10-11 ekor, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok ekstrak dinding sel *Candida albicans*, dan kelompok antibiotik siprofloksasin. Semua kelompok kecuali kontrol negatif kemudian diinduksi dengan bakteri *Salmonella Typhimurium*  $10^8$  sel/ml (OD = 1, pada  $\lambda = 600$  nm mempunyai kepekatan  $10^9$  sel/mL). Kelompok ekstrak dinding sel *Candida albicans* diberikan ekstrak dinding sel *Candida albicans* per oral dengan dosis 300  $\mu\text{g}/0,1\text{mL}$ , dan pada kelompok antibiotik siprofloksasin diberikan antibiotik siprofloksasin dengan dosis 400  $\mu\text{g}/0,2\text{ml}$  atau 15 mg/kgBB per oral. Pada hari ke-10 dilakukan pembedahan. Pada pembedahan akan diambil lien untuk dianalisa jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dengan flowsitometer yang akan dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.2 Hewan Coba dan Sampel

##### 4.2.1 Hewan Coba

Hewan coba penelitian ini adalah mencit jantan strain BALB/c berusia 6-8 minggu yang dibeli dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya dengan berat 20-30 gram. Bakteri *Salmonella*

Typhimurium yang digunakan dalam penelitian ini dikultur dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan jumlah  $10^3$ - $10^6$  CFU.

#### 4.2.2 Kriteria Eksklusi

Mencit betina, mencit yang belum cukup umur, mencit yang sakit atau cacat dan mati selama masa aklimatisasi.

#### 4.2.3 Kriteria Inklusi

Mencit jantan, *strain* Balb/C, usia 3 minggu, tidak ada kelainan anatomis dan sehat selama masa aklimatisasi 1 minggu.

#### 4.2.4 Sampel

Sampel pada penelitian ini diambil dengan cara *simple random sampling* untuk mengurangi bias dan error. Besar sampel minimal diperoleh dengan rumus  $(t-1)(r-1) \geq 15$  dimana  $t$  = jumlah perlakuan dan  $r$  = jumlah ulangan atau sampel perkelompok. Jumlah perlakuan dalam penelitian ini adalah 4 perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal adalah 6. Pada penelitian ini digunakan 10-11 mencit untuk tiap perlakuan untukantisipasi mencit yang mati selama masa perlakuan (drop out).

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat dilaksanakannya penelitian ini adalah di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu dilaksanakannya penelitian ini adalah pada bulan Maret-Desember 2015.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas penelitian ini adalah satu dosis ekstrak dinding sel *Candida albicans* dan satu dosis antibiotik siprofloksasin

##### 4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah sel T CD4<sup>+</sup> pada lien mencit

#### 4.5 Definisi Operasional

##### 4.5.1 Mencit Balb/C

Mencit yang digunakan adalah mencit galur Balb/C jantan berusia 6-8 minggu yang dibeli dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya.

##### 4.5.2 *Salmonella* Typhimurium

*Salmonella* Typhimurium yang diinduksikan ke mencit dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan jumlah  $10^3$ - $10^6$  CFU.

##### 4.5.3 Ekstrak Dinding Sel *Candida albicans*

Ekstrak dinding sel *Candida albicans* didapatkan dari dinding sel *Candida albicans*. *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian ini dikultur di medium *Saboraud's Dextrose Agar* selama 24 jam di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pemecahan dinding sel ini dicek dengan prosedur pengecatan dinding sel yaitu pengecatan gram dan analisis spektra *Fourier Transform Infrared* (FTIR).

#### 4.5.4 Penghitungan Persentase Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> pada Lien Mencit Model Demam Tifoid menggunakan *Flowcitometry*

Penghitungan persentase jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang terdapat di lien mencit model demam tifoid dilakukan dengan menggunakan *flowcitometry* dengan *Staining Solution* yang terdiri atas campuran antibiotik FITC *anti mouse* CD4 dan PE *anti mouse* CD8 dalam *Cell Staining Buffer* dengan perbandingan 1:100 yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.6.1 Alat dan Bahan Kultur *Candida albicans*

Alat dan bahan yang digunakan adalah *Candida albicans*, bubuk *Saboraud's Dextrose Agar*, akuades, petri disk, busen *burner*, dan tabung Erlenmeyer.

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Panen *Candida albicans*

Alat dan bahan yang digunakan adalah ose, busen, *laminar air flow*, *falcon tube*, timbangan, PBS, *plate* berisi kultur *Candida albicans*.

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Pengecatan *Candida albicans* dengan Pengecatan Gram

Alat dan bahan yang digunakan adalah *object glass (slide)*, ose, kristal violet, safranin, alkohol 96%, lugol, korek api, busen *burner*, pipet, sampel *Candida albicans*, mikroskop binokuler, minyak emersi, spidol, dan akuades.

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Pengambilan Darah dan Pembuatan Serum

Alat dan bahan yang digunakan adalah *vacutainer*, spuit 5 cc, *torniquet*, alat sentrifus, mikropipet, *falcon tube*, kapas alkohol 70%, dan *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA).

#### 4.6.5 Alat dan Bahan Tes Pseudohifa (*Germ Tube Test*)

Alat dan bahan yang digunakan adalah serum darah, *microtube*, sampel *Candida albicans*, inkubator, *object glass (slide)*, *cover glass*, bunsen *burner*, ose, korek api, minyak emersi, dan mikroskop binokuler.

#### 4.6.6 Alat dan Bahan Isolasi Dinding Sel *Candida albicans*

Alat dan bahan yang digunakan adalah *lysis buffer* yang terdiri atas PMSF 0,036 gram dilarutkan dalam 50 cc akuades, tris- HCL 7,592 gram dilarutkan dalam 200cc akuades. NaCl 1% 50cc (NaCl 0,501 gram dilarutkan dalam 50cc akuades), NaCl 2% 50cc (NaCl 1,004 gram dilarutkan dalam 50cc akuades), NaCl 5% (NaCl 2,501 gram dilarutkan dalam akuades 50cc), *magnetic stirrer*, Erlenmeyer, *falcon tube*, timbangan, *aluminium foil*, *glass bead* diameter 0,1 mm, larutan NaCl 5%, akuades, *vortex*, alat sentrifugasi, *falcon tube*, dan *omnimixer*.

#### 4.6.7 Alat dan Bahan Pengecekan Dinding Sel *Candida albicans*

Alat dan bahan yang digunakan adalah *object glass (slide)*, ose, korek api, bunsen *burner*, pipet, kristal violet, safranin, alkohol 96%,

lugol, sampel *Candida albicans* hasil proses pelisisan sel, mikroskop binokuler, minyak emersi, spidol, dan akuades.

#### 4.6.8 Alat dan Bahan Uji Sensitivitas *Salmonella* Typhimurium terhadap Antibiotik Siprofloksasin

Alat dan bahan yang digunakan adalah koloni *Salmonella* Typhimurium dalam *falcon tube*, *slant agar*, *incubator* 37°C, agar BSA, dan penggaris.

#### 4.6.9 Alat dan Bahan Identifikasi $\beta$ -glucan Menggunakan FTIR

Alat dan bahan yang digunakan adalah sampel larutan yang mengandung  $\beta$ -glucan, *vortex*, alat sentrifugasi, mikropipet dan *blue tip*, *microtube*, *falcon tube*, larutan NaOH, larutan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, *microtube*, akuades, cawan petri, kertas saring, alat spektroskopi FTIR.

#### 4.6.10 Alat dan Bahan Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Dinding Sel *Candida albicans*

Alat bahan yang diperlukan adalah pelet ekstrak dinding sel *Candida albicans*, PBS, mikropipet, *blue tip*, *falcon tube*, dan sonde.

#### 4.6.11 Alat dan Bahan Induksi *Salmonella* Typhimurium ke Mencit

Alat dan bahan yang dipergunakan ialah sonde dan *Salmonella* Typhimurium 10<sup>8</sup> sel/mL sebanyak 300  $\mu$ L.

#### 4.6.12 Alat dan Bahan Pemberian Siprofloksasin ke Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan ialah sonde dan siprofloksasin 200 mg / 100 mL.

#### 4.6.13 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah air bersih, tempat minum mencit, pakan mencit, sekam kayu, wadah bersih untuk mencampur pakan mencit dengan air, kandang mencit dan penutupnya, dan label.

#### 4.6.14 Alat dan Bahan Pembedahan Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah masker, *handscoen*, toples berisi kloroform dengan kapas, mikropipet dan *blue tip*, pinset, cawan petri, *falcon tube*, alat sentrifugasi, spuit, *Eppendorf*, mencit, meja bedah, gunting, alat saring, PBS, *RBC lysis buffer*.

#### 4.6.15 Alat dan Bahan Pemeriksaan Persentase Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> dengan Metode *Flowcytometry*

Alat dan bahan yang digunakan adalah *Staining Solution* (campuran antibiotik FITC *anti mouse* CD4 0,5  $\mu\text{L}$ /sampel dan PE *anti mouse* CD8 1  $\mu\text{L}$ /sampel dalam *Cell Staining Buffer* dengan perbandingan 1:100), mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, suspensi sampel, *vortex*, kuvet baca.

#### 4.6.16 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Paska Pembedahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk proses identifikasi bakteri adalah Microbact™ GNB 12 A / 12 E bermerek Oxoid, ose, sampel koloni dari cawan petri untuk hitung koloni organ, larutan *saline* steril, mikropipet dan *blue tip*, *mineral oil* steril, dan aplikasi Microbact™ *Computer Aided Identification Package*.

### 4.7 Metode Pengumpulan Data

#### 4.7.1 Prosedur Pengulturan *Candida albicans*

1. Menuangkan bubuk SDA ke dalam *aquades* dalam Erlenmeyer.
2. Memanaskan di atas bunsen, kemudian menuangkan ke *petri disk*. Biarkan agak dingin selama beberapa jam.
3. Memasukan dalam kulkas 4°C semalaman.

#### 4.7.2 Prosedur Panen *Candida albicans*

1. Tuang PBS ke dalam *falcon tube* sampai 7cc.
2. Dengan ose steril, ambil koloni *Candida albicans* dari *plate* dan masukkan ke dalam PBS di *falcon tube*.
3. Lakukan sampai semua koloni terambil.
4. Timbang *falcon tube*.

#### 4.7.3 Prosedur Pengecatan *Candida albicans* dengan Pengecatan Gram

1. Sampel diambil dengan ose yang sebelumnya telah disterilkan dengan cara dibakar.



2. Sampel diletakkan di atas *object glass*, lalu dilewatkan ke api beberapa kali untuk fiksasi.
3. Sampel ditetesi kristal violet, ditunggu 1 menit, kemudian ditetesi lugol ditunggu 30 detik, dibilas dengan akuades, dan dikeringkan.
4. Sampel ditetesi alkohol 96%. Cuci dengan akuades, dikeringkan
5. Sampel ditetesi safranin ditunggu 1 menit, kemudian cuci dengan akuades dan dikeringkan.
6. Sampel diamati di mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

#### 4.7.4 Prosedur Pengambilan Darah dan Pembuatan Serum

1. Memasang *torniquette*.
2. Membersihkan area yang akan diambil darahnya (vena mediana cubiti) dengan kapas alkohol 70%.
3. Mengecek kesiapan spuit dan jarum.
4. Mengambil darah dengan spuit 5cc.
5. Memasukkan darah pada *vacutainer* berisi EDTA.
6. Melepas *torniquette* dan menekan daerah yang disuntik dengan kapas alkohol.
7. Sentrifus *vacutainer* yang dimasukkan ke *falcon tube* 3000 G selama 10 menit.

#### 4.7.5 Prosedur Tes Pseudohifa (*Germ Tube Test*)

1. Sampel *Candida albicans* yang telah dipanen diambil dengan ose steril dan dimasukkan dalam serum darah yang telah disentrifus di *vacutainer*.
2. Serum darah kemudian diletakkan di *incubator* 37°C selama 2-3 jam.
3. Ambil serum darah dengan ose, letakkan di atas *object glass*, lalu tutup dengan *cover glass*.
4. Amati dengan pembesaran 1000x pada mikroskop dengan bantuan minyak emersi.

#### 4.7.6 Prosedur Isolasi Dinding Sel *Candida albicans*

1. *Candida albicans* dipanen di ruang *Laminar Air Flow* kemudian dikumpulkan dengan sentrifugasi yang kemudian dilanjutkan dengan filtrasi dan dicuci dengan *lysis buffer* 5 kali.
2. Dinding sel dilisiskan secara mekanis dengan *glass bead* dengan volume yang seimbang dalam *omnimixer* selama 30 detik.
3. Prosedur ini dilakukan sampai terjadi pemecahan sel secara sempurna, yang kemudian diverifikasi dengan pewarnaan gram.
4. Sel yang telah mengalami lisis kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 g selama 10 menit, yang kemudian menghasilkan fraksi dinding sel (pelet) dan fraksi sitoplasma larut (supernatan). Pelet inilah yang diambil.
5. Pelet dicuci dengan akuades 5 kali dengan sentrifugasi dingin 0 °C 3000 g selama masing-masing 3 menit.

6. Pelet dicuci dengan NaCl 5% 5 kali dengan sentrifugasi dingin 0 °C 3000 g selama masing-masing 3 menit.
7. Pelet dicuci dengan NaCl 2% 5 kali dengan sentrifugasi dingin 0 °C 3000 g selama masing-masing 3 menit.
8. Pelet dicuci dengan NaCl 1% 5 kali dengan sentrifugasi dingin 0 °C 3000 g selama masing-masing 3 menit.
9. Pelet disimpan dalam *freezer* -40°C untuk selanjutnya diidentifikasi keberadaan  $\beta$ -glucan.

#### 4.7.7 Prosedur Pengecekan Dinding Sel *Candida albicans*

1. Sampel diambil dengan ose yang sebelumnya telah disterilkan dengan cara dibakar.
2. Sampel diletakkan di atas *object glass*, lalu dilewatkan ke api beberapa kali untuk fiksasi.
3. Melakukan pengecatan dengan pewarnaan Gram sama seperti metode sebelumnya.
4. Sampel diamati di mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

#### 4.7.8 Prosedur Uji Sensitivitas *Salmonella* Typhimurium terhadap Antibiotik Siprofloksasin

1. *Salmonella* Typhimurium di *slant agar* diinkubasi di suhu 37°C selama 30 menit.
2. Koloni bakteri diambil dan distreak di *plate agar* BSA.
3. *Plate* kemudian dimasukkan ke dalam *incubator* selama 1 hari.

4. Periksa jumlah koloni bakteri.
5. Bila sudah tumbuh, *Salmonella* Typhimurium dari *plate* agar dipindah ke medium cair.
6. Dimasukkan ke dalam *incubator* 37°C selama 1 hari.
7. Dibiakkan sampai banyak, untuk persiapan uji sensitivitas.
8. Bakteri *Salmonella* Typhimurium di *streak* di agar MH.
9. *Disc* yang berisi siprofloksasin ditanam di agar MH.
10. Ditunggu selama 2 hari.
11. Mengukur zona inhibisi dengan penggaris.

#### 4.7.9 Prosedur Identifikasi $\beta$ -glucan Menggunakan FTIR

1. Sampel di-*vortex* lalu dipindah ke *microtube* dan kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Dari proses tersebut dihasilkan supernatan, supernatan ini kemudian dibuang.
2. Dilakukan penambahan NaOH 1 M dengan perbandingan 1 : 1. Setelah itu, sampel dipindahkan kembali ke *falcon* dan direndam NaOH, lalu didiamkan dalam inkubator 90°C selama 2 jam.
3. Setelah direndam selama 2 jam, sampel dipindahkan ke *microtube* lalu disentrifus lagi, lalu dibuang supernatannya.
4. Sampel dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali dengan suhu 4°C, lalu dibuang supernatannya.
5. Sampel diberi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, lalu di-*vortex*, dan dikembalikan ke *falcon* untuk didiamkan selama 2 jam di suhu ruangan.

6. Sampel lalu dipindah ke *microtube* untuk disentrifugasi, dan kemudian supernatnya dibuang.
7. Sampel dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali, dengan pada pencucian terakhir dibuang supernatnya.
8. Sampel dimasukkan etanol 96%.
9. Sampel lalu di-*vortex*, dipindahkan lagi ke *falcon*, lalu dituang ke cawan petri yang ada kertas saringnya.
10. Cawan petri kemudian dimasukkan ke *incubator* 30°C, dan ditunggu 3 hari. Kemudian, serbuk sampel di atas kertas saring di ambil, dan ditimbang dengan menggunakan *aluminium foil*. Serbuk ini kemudian dianalisis dengan spektra FTIR (Zechner-Krpan *et al.*, 2010).

#### 4.7.10 Prosedur Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Dinding Sel *C. albicans*

1. Menimbang *falcon* kosong, dan kemudian dilakukan penimbangan serbuk dinding sel *C. albicans* yang diletakkan dalam *falcon*.
2. PBS diambil dengan mikropipet. PBS lalu digunakan untuk melarutkan serbuk dalam *falcon* (Qi *et al.*, 2011).
3. Larutan ini dibuat dalam konsentrasi 300 µg/0,1mL, diberi sekali sehari selama 5 hari. Pada penelitian ini sampel yang digunakan tidak murni, dan belum pernah ada penelitian terkait penggunaan  $\beta$ -glucan untuk infeksi *S. Typhimurium*, sehingga dosis 300 µg diambil berdasarkan penelitian terdahulu (Kosasih *et al.*, 2014).

#### 4.7.11 Prosedur Induksi *S. Typhimurium* ke Mencit

Mencit diberi *S. Typhimurium* 108 sel/mL sebanyak 300  $\mu$ L via sonde di hari 1 dan 3 untuk membuat mencit model demam tifoid (Winarsih, 2005)

#### 4.7.12 Prosedur Pemberian Siprofloksasin ke Mencit

Pada hari ke-3 *post* infeksi mencit (terhitung dari masa inkubasi) diberi dosis 400  $\mu$ g/0,2ml siprofloksasin per oral 2 kali sehari selama 5 hari secara intragastrik dengan menggunakan sonde. Dasar dari pemilihan dosis ini adalah literatur yang menyebutkan bahwa siprofloksasin dengan dosis 15 mg/kgBB telah sesuai dengan terapi standar dari hewan laboratorium (Endt *et al.*, 2011) Salah satu kelompok mencit secara acak diukur beratnya sebelum pemberian antibiotik, dan didapatkan rata-rata berat dari mencit ini adalah 25,6 gram. Maka dosis yang digunakan pada mencit untuk terapi ini adalah 400  $\mu$ g/0,2ml siprofloksasin per oral via sonde 2 kali sehari.

#### 4.7.13 Prosedur Pemeliharaan Mencit

1. Mencit dipindahkan ke dalam kandang dan dipastikan bersih, lalu diisi dengan sekam kayu sampai kira-kira menutupi dasar kandang.
2. Mencit dipindahkan ke dalam kandang, tiap kandang berisi 10-11 mencit.
3. Memberi makan mencit dan memberi air bersih pada tempat minum.

4. Menutup kandang.

4.7.14 Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Dinding Sel *Candida albicans*

1. Menggunakan masker dan *handscoen*.
2. Mengambil ekstrak dinding sel *Candida albicans* sebanyak 1 cc dengan spuit.
3. Melepas jarum spuit dan memasang sonde.
4. Menginduksi ke lambung mencit kemudian meletakkan mencit ke dalam kandang.
5. Melepas *handscoen* dan masker kemudian cuci tangan.

4.7.15 Prosedur Pembedahan Mencit dan Pemeriksaan Persentase Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> dengan Metode *Flowcytometry*

1. Anestesi mencit dengan *chlorophorm*.
2. Bedah mencit dan mengambil organ liennya.
3. Memasukkan lien ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan 2 ml PBS.
4. Melakukan penggerusan dengan lembut dan perlahan sehingga sel lien terekstraksi dengan sempurna.
5. Kemudian pipet suspensi sel lien tersebut, lewatkan diatas *Cell Strainer* dan tampung dalam tabung 50 ml.
6. Pindahkan tampungan sel tersebut ke dalam tabung 1,5 mL.
7. Melakukan sentrifugasi pada 1500 rpm, 4°C selama 5 menit.
8. Buang supernatan dan tambahkan 1 mL RBC *lysis buffer* ke dalam pelet sampel.

9. Homogenkan hingga sempurna dengan cara *divortex* atau *pipetting*.
10. Lakukan sentrifugasi pada 1500 rpm, 4°C selama 5 menit.
11. Buang supernatan dan cuci pelet dengan 1 mL PBS.
12. Lakukan sentrifugasi pada 1500 rpm 4 °C selama 5 menit.
13. Buang supernatan yang terbentuk, dan cuci sekali lagi pelet sampel dengan 1 mL PBS.
14. Lakukan sentrifugasi pada 1500 rpm 4°C selama 5 menit.
15. Buang supernatan dan pipet 50 µL, suspensi pelet sampel dan masukkan dalam tabung 1,5 mL baru.
16. Buat *Staining Solution* dan menambahkan 50 µL suspensi sampel diatas, melakukan *pipetting* hingga homogen. Kemudian inkubasi pada suhu ruang dan dalam gelap selama 20-30 menit.
17. Setelah inkubasi selesai, tambahkan 350 µL *Cell Staining Buffer* kemudian pindahkan suspensi sampel ke dalam kuwet baca.
18. Segera melakukan analisis *flowcytometry* dengan *BD FACSCalibur QuestPro*.

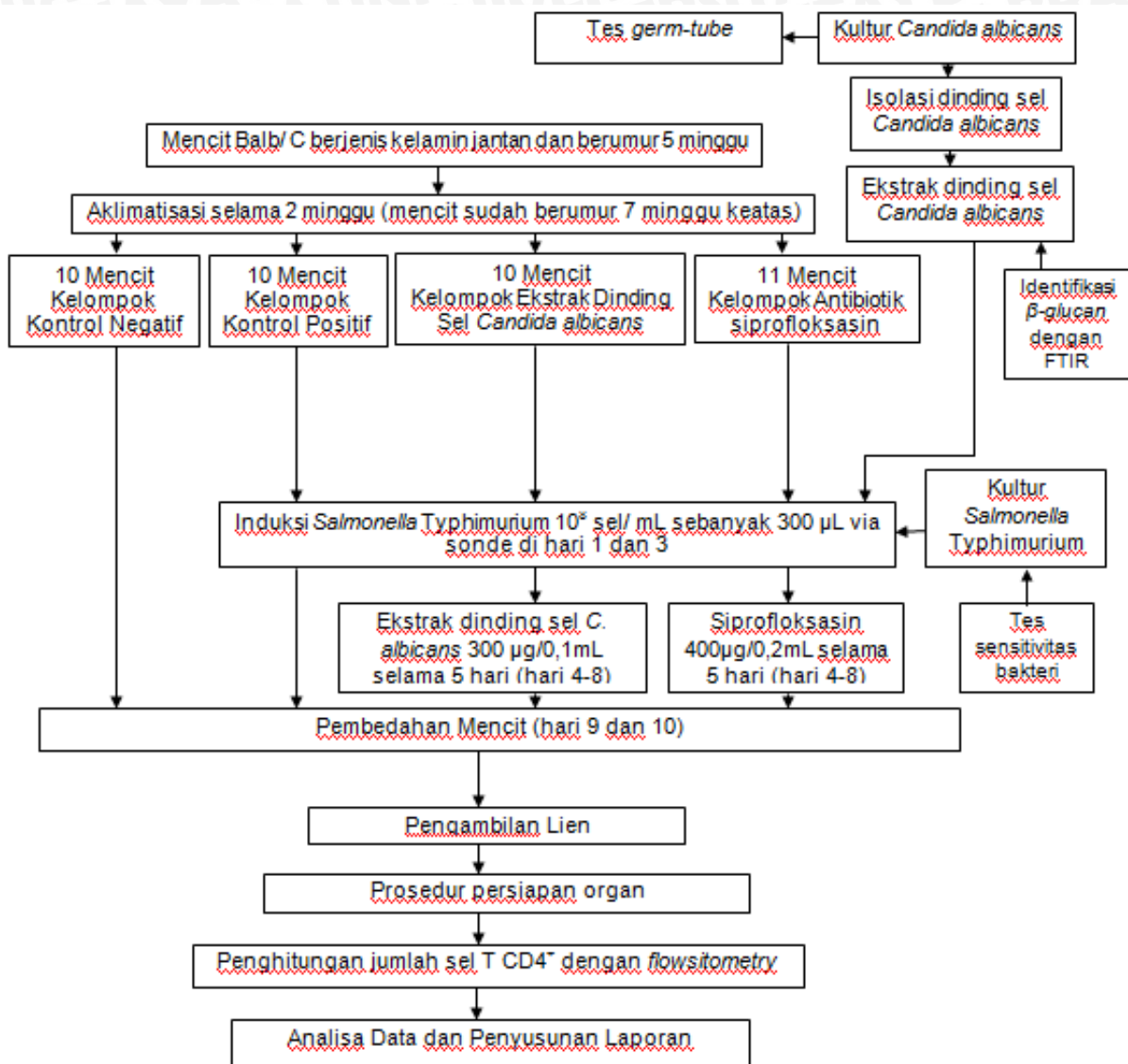
#### 4.7.16 Prosedur Identifikasi Bakteri Paska Pembedahan

1. Perlu dilakukan identifikasi pada bakteri yang akan dihitung koloninya. Maka, dari bahan inokulasi ini akan dilakukan pengecekan dengan Microbact™ 12 A / 12 E bermerek Oxoid. 1-3 koloni dari kultur yang baru (18-24 jam) diambil dan diemulsikan dalam larutan *saline* steril sebanyak 2,5 mL sampai homogen.



2. Meletakkan strip atau *plate* di *holding tray*.
3. Tiap set substrat ditambahi masing-masing dengan 4 tetes (sekitar 100  $\mu$ L) suspensi bakteri.
4. Dengan pipet steril kemudian lapisi substrat yang ditandai (dilingkari tebal) dengan *mineral oil* steril.
5. Segel ulang dan inkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  untuk 18-24 jam.
6. Strip kemudian dibaca dan dicocokkan dengan tabel interpretasinya. Tiap interpretasi akan menghasilkan angka, dan angka tersebut akan diinput untuk menentukan kemungkinan identitas dari organisme yang diidentifikasi dan persentase kemungkinan kebenaran identifikasi (Oxoid, 2015).

### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

### 4.9 Pengolahan Data

Pengolahan data penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan uji *one-way* ANOVA selang kepercayaan 95%, data persentase jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> pada organ lien diuji statistik dengan uji normalitas, uji homogenitas varian. Data yang telah terdistribusi

normal dengan variasi homogen, diuji dengan *one-way* ANOVA dengan nilai  $\alpha=0.05$ . apabila diperoleh  $p>0.05$  maka tidak ada beda nyata antar perlakuan, sebaliknya jika  $p<0.05$  maka ada beda nyata antar perlakuan. Data diuji statistik menggunakan program SPSS 21 *for Windows* 7.

