

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian *True experimental* dengan desain penelitian *randomized post test only control group design*. Pengumpulan data dilakukan di akhir setelah perlakuan, baik dari kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar untuk mengetahui perbedaan hitung sel darah putih (leukosit) pada kondisi sepsis dengan diberikan probiotik (*Lactobacillus spp*) dibandingkan dengan pemberian makanan biasa.

4.2. Sampel

4.2.1. Kriteria Sampel

Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Tikus diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang.

Kriteria inklusi penelitian antaralain:

1. Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar
2. Jenis kelamin jantan
3. Tikus sehat dengan bulu rata berwarna putih, mata jernih, bergerak aktif, dan tingkah laku normal
4. Usia 10-12 minggu
5. Berat badan 150-200 gram

Sedangkan kriteria eksklusi penelitian antaralain:

1. Tikus sakit yang tampak dari perubahan pola makan/minum, aktivitas, penurunan berat badan dan sebagainya
2. Tikus mati dalam masa penelitian

4.2.2. Besar Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus yaitu (Notoadmojo, 2010):

$$P(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

n : jumlah sampel tiap kelompok

P : jumlah kelompok/ jumlah perlakuan

Pada penelitian ini menggunakan tiga kelompok, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan dalam satu kelompok adalah:

$$P(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq \frac{18}{3}$$

$$n \geq 6$$

Jadi, penelitian ini membutuhkan jumlah sampel ≥ 6 ekor tikus untuk masing-masing kelompok. Peneliti menggunakan 7 ekor tikus pada masing-masing kelompok, sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini sebanyak 21 ekor tikus. Pembagian kelompok dilakukan dengan cara *simple random sampling*.

Penelitian ini membagi sampel dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif (P0): kelompok tikus putih normal tanpa diberikan probiotik.
2. Kelompok kontrol positif (P1): kelompok yang terpapar LPS *E. coli* dengan dosis 1 mg/kg BB.
3. Kelompok perlakuan (P2): kelompok yang diberi probiotik *Lactobacillus* spp. dengan dosis 10^9 CFU/Kg BB/hari selama 14 hari, dan kemudian terpapar LPS *E. coli* dengan dosis 1 mg/kg BB.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah pemberian probiotik *Lactobacillus* spp.

4.3.2. Variabel Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah jumlah sel darah putih pada darah tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1. Tempat

Pembuatan probiotik dan LPS *E. coli* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FK UB. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UB. Pengukuran jumlah sel darah putih dilakukan di Laboratorium Biomedik FK UMM.

4.4.2. Waktu

Penelitian akan dilakukan pada bulan November-Desember 2016.

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antarlain:

1. Bahan kultur probiotik *Lactobacillus spp*: formula medium MRS-Agar, formula medium MRS-Broth, bakteri *Lactobacillus sp*
2. Bahan untuk isolasi *crude* LPS: medium Luria-Broth, larutan fenol.
3. Bahan pemberian probiotik: larutan D 5%.
4. Bahan induksi LPS: larutan NaCl 0,9%.
5. Bahan untuk pengukuran jumlah leukosit: papan hitung.
6. Bahan untuk membunuh tikus: kloroform.

4.5.2. Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

1. Alat untuk pemeliharaan tikus/ hewan coba: kandang, tempat minum, pakan.
2. Alat untuk perlakuan pada tikus: sonde oral, timbangan, sarung tangan non steril, masker.
3. Alat untuk preparasi sampel darah: spuit 1 cc, *alcohol swab*, tabung hematokrit, tabung serologi, blue tip, microtube, tabung centrifuge 10-50 mL, label data.
4. Alat untuk membawa sampel: *cool box*, *dry ice*.
5. Alat untuk menghitung leukosit: *hematology monitor*.

4.6. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala
Variabel independen: Pemberian probiotik (<i>Lactobacillus spp</i>)	Bakteri probiotik <i>Lactobacillus spp.</i> dari Laboratorium Mikrobiologi FK UB, yang diberikan dengan dosis 10^9 CFU/Kg BB/hari yang dilarutkan dalam media D5% sebanyak 0,5 cc. Probiotik diberikan melalui sonde lambung sekali sehari selama 14 hari untuk mencapai pengaruh yang optimal (Crooks et al., 2012).	ml	Rasio
Variabel dependen: Hitung sel darah putih	Hitung sel darah putih pada tikus putih yang terpapar LPS <i>E. coli</i> akan dilakukan dengan metode <i>improved neubauer</i> (kamar hitung). Dilakukan pengenceran pada pipet sebanyak 20 kali, kemudian hasil hitung dikali 50.	ul	Rasio
Variabel lain: Sepsis	Respon tubuh terhadap infeksi yang bersifat sistemik, ditandai dengan nilai hitung sel darah putih (leukositosis/ leukopenia) dan hasil hitung PCT meningkat signifikan dari kelompok kontrol.	-	Rasio

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Pembuatan Kultur *Lactobacillus spp*

Medium MRS-Agar

Komposisi

Formula	Gram/ml
Glucose	: 18.5
<i>Pancreatic digest of gelatin</i>	: 10.0
<i>Beef extract</i>	: 8.0
<i>Yeast Extract</i>	: 4.0
Sodium acetate	: 3.0
K ₂ HPO ₄	: 2.0
Ammonium citrate	: 2.0
Polysorbate	: 1.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	: 0.2
MnSO ₄ . 7 H ₂ O	: 0.05
Agar	: 15

Prosedur Pembuatan:

1. Menimbang 62 gram bubuk/powder medium MRS-Agar
2. Memasukkan erlemeyer 2 L
3. Menambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1L
4. Memasukkan dalam *water bath* suhu 100°C selama 15 min
5. Selama pemanasan di *water bath* sesekali digoyang erlemeyer untuk membantu pelarutan (supaya homogen)

6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlemeyer
7. Medium dalam erlemeyer tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 2 Atm selama 15 menit
8. Setelah disterilisasi medium didinginkan sampai suhu ± 45 (hangat-hangat kuku)
9. Medium dituangkan pada cawan steril ± 20 ml per cawan petri
10. Jika sudah mengeras medium dalam cawan tersebut diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas medium
11. Jika melewati uji sterilitas medium sudah siap untuk digunakan.

Medium MRS-Broth

Komposisi

Formula	Gram/ml
Glucose	: 18.5
Pancreatic digest of gelatin	: 10.0
Beef extract	: 8.0
Yeast Extract	: 4.0
Sodium acetate	: 3.0
K ₂ HPO ₄	: 2.0
Ammonium citrate	: 2.0
Polysorbate 80	: 1.0

MgSO₄. 7H₂O : 0.2

MnSO₄. 7 H₂O : 0.05

Prosedur Pembuatan:

1. Menimbang 54 gram bubuk/powder medium MRS-Broth
2. Memasukkan erlemeyer 1 L
3. Menambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 L
4. Memasukkan dalam *water bath* suhu 100°C selama 15 min
5. Selama pemanasan di *water bath* sesekali digoyang erlemeyer untuk membantu pelarutan (supaya homogen)
6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya yang menempel pada dinding erlemeyer
7. Medium dalam erlemeyer tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 2 Atm selama 15 menit
8. Jika melewati uji sterilitas medium sudah siap untuk digunakan

Prosedur Kultur *Lactobacillus spp.*

1. Sterilisasi ose lengkung dengan pemanasan diatas bunsen hingga pijar
2. Setelah ose dipastikan dingin ambil bakteri *Lactobacillus spp.* dari stock dengan cara menyentuhkan ujung ose pada stock
3. Menggoreskan dipermukaan media MRS-Agar, dengan metode streaking kuadran untuk mendapatkan koloni terpisah

4. Menginkubasikan media 37°C selama 24 jam.
5. Koloni murni yang tumbuh diidentifikasi ulang untuk memastikan spesies bakteri.
6. Setelah terbukti spesies *Lactobacillus spp.* dilakukan kultur pengayaan untuk memproduksi dalam jumlah yang besar.

Prosedur Pengayaan

1. Dengan ose steril, mengambil koloni murni, kemudian memasukkan ke dalam erlemeyer yang berisi media cair MRS-Broth
2. Menutup erlemeyer dengan kapas steril, kemudian memasukkan kedalam shaker waterbath
3. Menginkubasikan pada suhu 37°C dengan kecepatan *shaking* (pengocokan) 100 RPM selama 2x24 jam
4. Mengamati hasil kultur pastikan tidak ada kontaminasi dengan pewarnaan gram dan dilihat dibawah mikroskop
5. Kemudian kepadatan bakteri kultur ditera dengan *Mc Farland*, *Haemocytometer*, atau *Spectrofotometer*.
6. Dari hasil pengukuran OD (*Optical Dencity*), melakukan pengenceran sesuai dengan kepadatan bakteri yang diinginkan.

Probiotik diberikan dengan dosis 10^9 CFU/Kg BB/hari yang dilarutkan dalam media Dextrose 5% (D5%) sebanyak 0,5 cc. Dosis rata-rata yang akan diberikan pada tikus putih dengan berat badan 150-200 gram adalah 14×10^7 CFU/ hari.

4.7.2. Prosedur Isolasi Crude LPS *E. coli* (Metode Westphal and Jann)

1. Bakteri *E. coli* ditanam dalam Luria broth yang mengandung triptone dan yeast extract kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 16-18 jam.
2. Suspensi bakteri sebanyak 500 ml disentrifugasi dengan kecepatan 15000 gr (6000 rpm) selama 1 jam.
3. Pelet yang diperoleh, diresuspensi dalam 10 ml *deionized water* (yang sudah dipanaskan pada suhu 72-75°C)
4. Kemudian suspensi tersebut di vorteks selama 20 detik dan diletakkan dalam *water bath* dengan suhu 72-75°C dengan mulut tabung terbuka.
5. Ditambahkan 10 ml larutan fenol 88% (sebelumnya dipanaskan pada suhu 72-75°C) kemudian tabung divorteks dan diinkubasikan selama 15 menit dalam *water bath*.
6. Tabung divorteks ulang setiap beberapa menit selama waktu inkubasi 15 menit kemudian di dinginkan di suhu ruang.
7. Setelah dilakukan sentrifugasi 500 gr (1000 rpm) selama 10 menit, fase air yang terletak di lapisan atas dipindahkan dan disimpan.
8. Lapisan tengah yang merupakan fase fenol dipanaskan pada suhu 72-75°C, dan ditambahkan 10 ml *deionized water* kemudian prosedur diulang kembali.
9. Fase air dari 2 kali prosedur ekstraksi digabungkan dan dipanaskan lagi pada suhu 72-75°C

10. Fenol 88% (sebelumnya dipanaskan pada suhu 72-75°C sebanyak 5ml ditambahkan dan campuran tersebut diinkubasi selama 15 menit (pada suhu 72-75°C) dengan dilakukan vorteks secara periodeik dan proses ekstraksi diulang.
11. Lapisan tengah yang mengandung protein yang terpresipitasi dibuang dan adanya fase fenol dibuktikan dengan sentrifugasi 15000 gr (6000 rpm) selama 20 menit.
12. Fase air didialisis dalam air (pada suhu 40° C) sampai seluruh sisa fenol hilang.
13. Lipopolisakarida dipresipitasi dari fase air dengan 6 kali volume 95% etanol (yang mengandung 0.15 sodium asetat per 50ml) pada suhu -20°C semalam.
14. Pelet diresuspensi dalam 1 ml air dan disimpan pada suhu -20°C.

Endotoksin lipopolisakarida *E. coli* diberikan per oral dengan dosis 1 mg/kgBB. LPS diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% dengan perbandingan 10:1. Dosis rata-rata yang akan diberikan pada tikus putih dengan berat badan 150-200 gram adalah 140 µg.

4.7.3. Perlakuan terhadap Hewan Coba

Perlakuan terhadap hewan coba sebagai berikut:

1. Hewan coba yaitu tikus putih yang berjumlah 21 ekor diadaptasikan dengan lingkungan baru selama 7 hari, diberi makan dan minum secara *ad-libitum*.

2. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dengan metode rancangan acak lengkap, yaitu 7 ekor tikus pada masing-masing kelompok.
3. Tikus diletakkan dalam kandang terpisah (3-4 ekor per kandang).
4. Tikus kelompok kontrol negatif (P0) diberi makan dan minum secara ad libitum selama 14 hari.
5. Tikus kelompok kontrol positif (P1) diinduksi dengan LPS *E. coli* pada hari ke 15.
6. Tikus Kelompok perlakuan (P2) diberi tambahan probiotik *Lactobacillus spp.* selama 14 hari, kemudian diinduksi dengan LPS *E. coli* pada hari ke 15.
7. Seluruh tikus diambil sampel darah pada hari ke 16 (24 jam setelah kelompok perlakuan terpapar *E. coli*), untuk pengukuran jumlah sel darah putih.

4.7.4. Prosedur Pemberian Probiotik

Probiotik diberikan pada kelompok P2 dengan dosis 10^9 CFU/Kg BB/hari yang dilarutkan dalam media D 5% sebanyak 0,5 cc. Probiotik diberikan 1x/hari selama 14 hari dengan prosedur pemberian sebagai berikut:

1. Mencuci tangan.
2. Memakai sarung tangan non steril dan masker.
3. Mengambil larutan probiotik sesuai dosis yang ditentukan dalam D5% 0,5cc.
4. Memberikan larutan probiotik pada hewan coba dengan menggunakan sonde oral.

5. Setelah pemberian probiotik selesai dilakukan, merapikan alat dan mencuci tangan.

4.7.5. Proses Pengambilan Sampel Darah

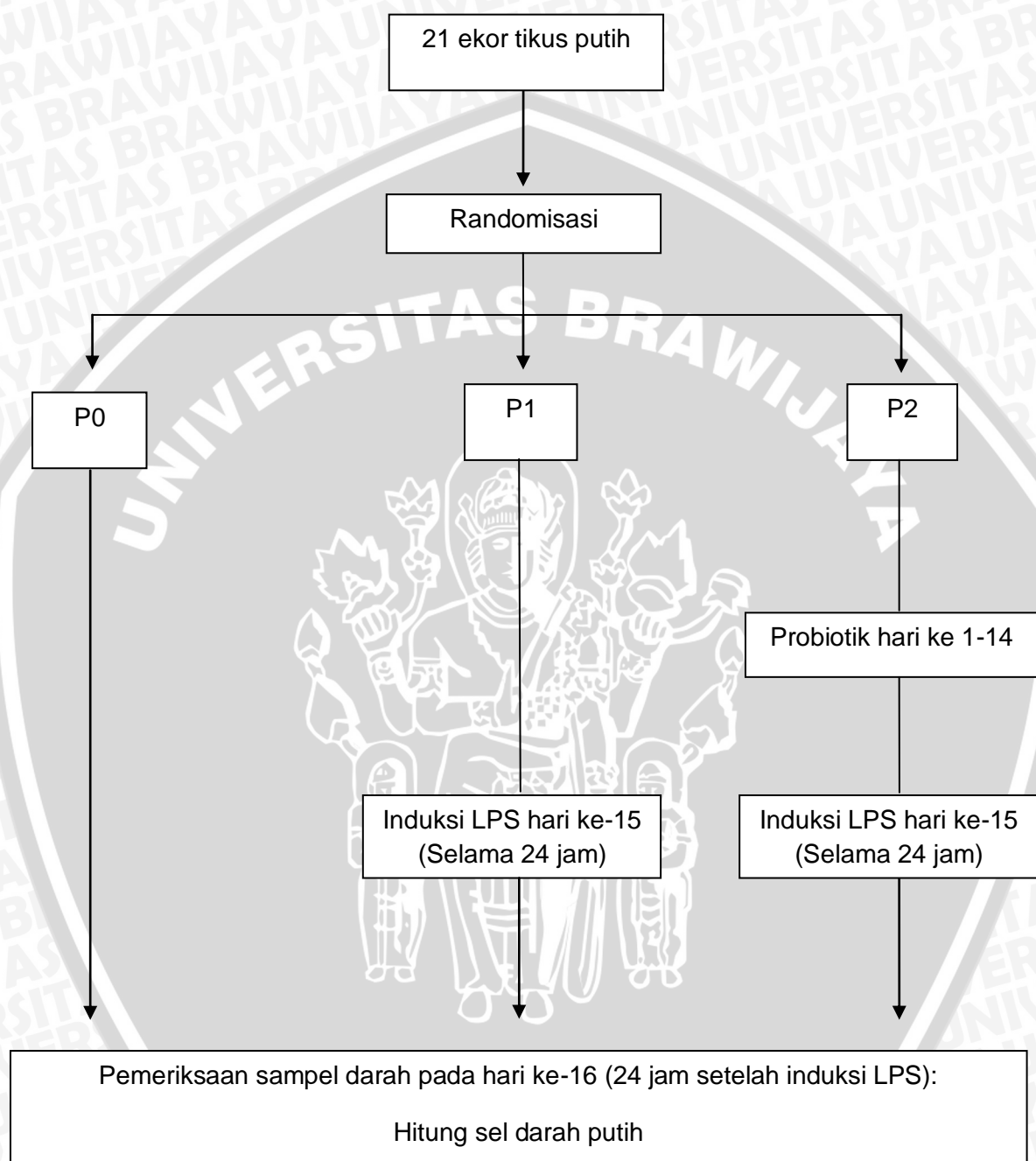
Proses pengambilan sampel darah tikus sebagai berikut:

1. Pengambilan darah dilakukan pada medial *canthus sinus orbitalis* karena pembuluh darah berukuran besar sehingga lebih mudah diambil dan waktu pemulihan lebih cepat.
2. Sampel darah diambil sebanyak 2 mL dengan tabung hematokrit setelah tikus dianestesi dengan kloroform. Darah yang keluar kemudian ditampung dalam tabung serologis yang mengandung 10% EDTA (asam etilen diamin tetrasetat).
3. Proses pengambilan sampel darah dilakukan oleh tenaga terlatih sehingga tikus tidak mengalami trauma berat akibat proses tersebut.

4.7.6. Pengukuran dan Perhitungan

Pengukuran dan hitung jumlah sel darah putih dilakukan dengan menggunakan metode kamar hitung (*Improved neubauer*). Pengenceran dilakukan pada pipet sebanyak 20 kali. Kemudian jumlah semua sel yang terhitung dalam keempat bidang tersebut dibagi empat, menunjukkan jumlah leukosit dalam 0,1 ul. Setelah itu, jumlah tersebut dikali 10 (untuk tinggi) dan 20 (untuk pengenceran), sehingga akan didapatkan jumlah leukosit dalam 1 ul darah (Levefer, 2008). Sederhananya, jumlah sel yang terhitung dikali 50 = jumlah leukosit per ul darah.

4.8. Alur Kerja Penelitian



4.9. Analisis Data

Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software Product and Service Solution 20* (SPSS 20), dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p= 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha= 0,05$).

Analisis deskriptif dilakukan untuk mengetahui gambaran hasil pengukuran jumlah leukosit pada tiap kelompok. Sedangkan untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik atau LPS *E. coli* terhadap leukosit pada darah tikus putih dilakukan uji *One Way Anova* dengan signifikansi $\alpha= 0,05$.

4.10. Etika Penelitian

Penelitian dilakukan ketika peneliti telah mengajukan permohonan ijin kepada institusi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk mendapat surat keterangan penelitian yang sebelumnya telah lulus uji *Ethical Clearence* bahwa penelitian tersebut telah memenuhi aspek etika penelitian.

1. Prinsip Menghormati Harkat dan martabat Manusia (*Respect for Person*)

Merupakan prinsip menghormati harkat dan martabat manusia berarti bahwa setiap manusia harus saling menghormati terhadap kebebasan untuk bertindak, pengambilan keputusan sesuai dengan rencana yang telah ditentukannya sendiri. Pada saat penelitian dilakukan meminta ijin kepada responden secara lisan maupun tulisan harus dilakukan. Peneliti menyampaikan tujuan dari pengambilan data, manfaat dari pengambilan data, prosedur pengambilan data dan hak-hak dari responden dilakukan sebelum memulai pengambilan data.

Jika responden bersedia maka akan menandatangani lembar persetujuan dari peneliti. Responden berhak memutuskan kesediaannya untuk menjadi responden penelitian dan tidak ada paksaan dari siapapun. Peneliti menjamin kerahasiaan informasi yang diberikan oleh responden terutama identitas responden. Responden juga berhak mengundurkan diri sebagai subjek penelitian apabila dalam proses penelitian menyinggung perasaan responden dan identitas responden tetap dijamin oleh peneliti (Nursalam, 2014).

2. Prinsip Berbuat Baik (*Beneficience*)

Merupakan perinsip untuk berbuat baik dan tidak merugikan. Hal ini berkaitan dengan meningkatkan kesejahteraan manusia dan tidak mencelakakannya. Dalam penelitian merupakan suatu kewajiban untuk meminimalisir resiko dibanding potensi keuntungan dari peneliti. Prinsip etik berbuat baik ini terdiri atas: risiko penelitian harus wajar, desain penelitian memenuhi syarat ilmiah, peneliti mampu melaksanakan penelitian sekaligus menjaga kesejahteraan subjek penelitian dan menentang kesengajaan yang merugikan subjek. Peneliti berbuat baik, bertingkah laku baik dan sopan kepada setiap responden baik sebelum, selama, maupun setelah proses penelitian berlangsung. Peneliti menjawab dan menjelaskan semua pertanyaan yang diajukan oleh responden (Nursalam, 2014).

3. Prinsip Keadilan (*Justice*)

Prinsip keadilan yaitu merupakan kewajiban setiap manusia secara baik dan benar, memberikan apa yang menjadi haknya. Tidak berani dengan apa yang bukan menjadi kewajibannya dan memperhatikan masalah kerentanan (*vulnerability*). Dalam penelitian ini responden diperlakukan sama selama keikutsertaan dalam penelitian. Sebelum dilakukan pengumpulan data, peneliti

meminta persetujuan kepada semua responden. Semua responden diberikan kuesioner yang sama (Nursalam, 2014).

4. Prinsip Tidak Merugikan (*Non-Maleficience*)

Prinsip tidak merugikan ini bermakna bahwa penelitian yang dilakukan tidak merugikan subjek dalam penelitian. Penelitian yang menggunakan populasi dan sampel manusia (pasien) sangat beresiko terjadinya kerugian fisik dan psikis. Oleh karena itu, penelitian hendaknya tidak mengandung unsur yang bahaya atau merugikan pasien, apalagi sampai mengancam jiwa pasien (Nursalam, 2014).

