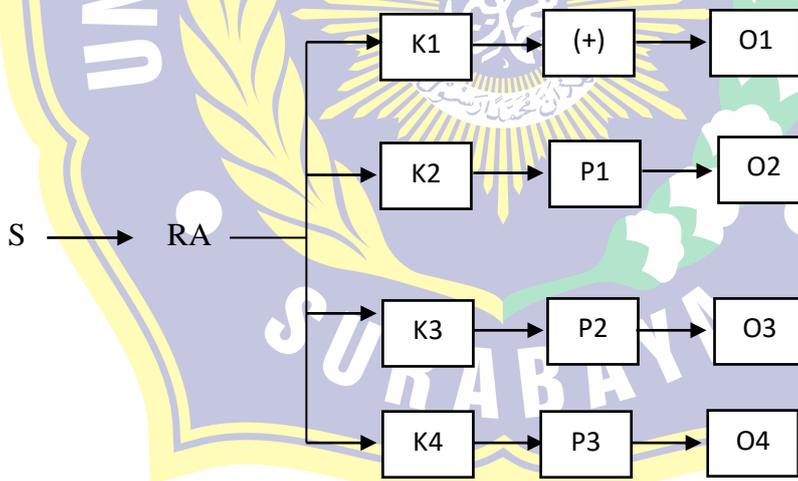


## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Sebelumnya telah banyak penelitian yang membuktikan terkait kandungan dan manfaat dari *Vitis vinivera* sebagai terapi pada penderita diabetes melitus. Untuk tahap selanjutnya ialah melakukan true eksperimental pada hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) yang diinduksi Bakteri *Staphylococcus aureus* yang dapat mengakibatkan Infeksi Saluran Kemih yang disebabkan oleh bakteri tunggal yaitu *Staphylococcus aureus* dan untuk mengetahui dosis yang tepat dan mekanisme dari *Vitis vinivera* terhadap penurunan kadar Bakteri *Staphylococcus aureus* pada hewan coba dengan teknik “*Randomized pre and post test control group design*” dan memberi perlakuan pada mencit yang telah dibuat Infeksi Saluran Kemih dan diberikan terapi oral ekstrak *Vitis vinivera* dan dipantau kadar dari Bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan Tes Urin di Laboratorium setiap harinya hingga didapatkan Penurunan kadar Bakteri *Staphylococcus aureus* yang diharapkan, dan sampai didapatkan bersih dari angka Koloni Bakteri.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Mencit putih (*Mus musculus*) jantan  
 RA : Randomisasi  
 K1 : Kelompok kontrol positif amoxicilin 250 mg  
 K2 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Vitis vinivera* 1  
 K3 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Vitis vinivera* 2  
 K4 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Vitis vinivera* 3  
 P1 : Kelompok pemberian ekstrak *Vitis vinivera* dosis 200mg  
 P2 : Kelompok pemberian ekstrak *Vitis vinivera* dosis 300mg  
 P3 : Kelompok pemberian ekstrak *Vitis vinivera* dosis 500mg  
 O1 : Pengamatan pada kelompok control pada hari ke 7  
 O2 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 1 pada hari ke 7  
 O3 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 2 pada hari ke 7  
 O4 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 3 pada hari ke 7

## 4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

### 4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) yang dipelihara dalam kandang yang sama di ruangan sama serta diberi perlakuan yang sama di laboratorium Zoologi Departemen Biologi Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya.

### 4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) sekitar usia 6 minggu hingga 21 minggu dengan kisaran berat 120 hingga 200 gram. Pemilihan tmencit putih harus dalam keadaan sehat dan telah dilakukan pre test sebelumnya agar tidak mempengaruhi hasil sampling dari penelitian.

#### 4.2.2.1 Kriteria Penerimaan (Inklusi)

1. Mencit putih berusia sekitar 6 minggu hingga 21 minggu, dengan berat kisaran 120 – 200 gram
2. Mencit Putih yang telah tersertifikasi Sehat oleh Balai Peternakan Hewan

#### 4.2.2.2 Kriteria Penolakan (Eksklusi)

1. Berat lebih dari atau kurang dari rentang berat yang ditentukan
2. Mencit sakit yang telah terinfeksi
3. Mencit yang mati

#### 4.2.3 Besar Sampel

Besar Sampel yang digunakan pada penelitian ini menganut rumus dari besar sampel pada uji ANOVA, dikarenakan peneliti menggunakan experiment lebih dari 2 kelompok pasangan yang mana berguna untuk mencari keefektifan dari dosis yang tepat untuk hasil ekstrak pada setiap percobaan kelompok perlakuan, dengan kalkulasi perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

t = Banyaknya kelompok perlakuan

r = Banyaknya Replikasi

Dalam penelitian ini, peneliti membandingkan 4 kelompok perlakuan, maka jumlah replikasi minimalnya sehingga dapat diolah menggunakan ANOVA yaitu :

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

$$(r-1) > 15/3$$

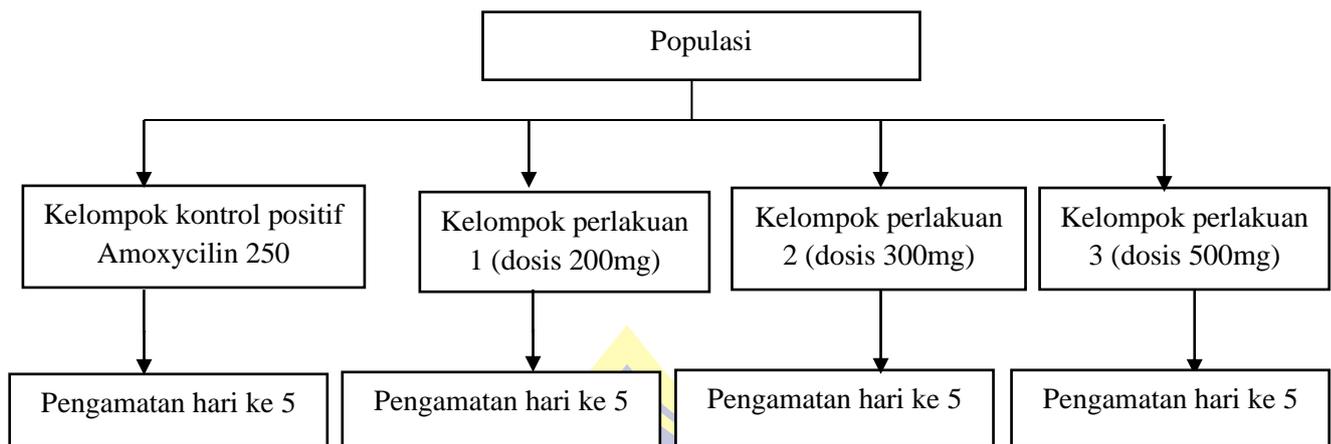
$$r > 5+1$$

$$r > 6$$

Sehingga minimal replikasi setiap kelompoknya minimal 7 ekor, namun untuk mengatasi hasil dropout, peneliti menambahkan 1 sampel di setiap kelompok menjadi 8 ekor mencit, sehingga didapatkan total sampling dari penelitian yang digunakan adalah 8x4 kelompok yaitu 32 mencit.

#### 4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik Pengambilan sampel pada penelitian ini adalah Teknik Random (*Probability sampling*) dengan jenis Teknik Random Stratified (*Stratified Randomization*) dengan penjelasan sebagai berikut :



Gambar 4.2 Teknik Random Stratified pada Penelitian

- a. Kelompokan secara random populasi mencit (*Mus musculus*) menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari 7 ekor mencit pada tiap kelompoknya
- b. Perlakukan mencit pada wadah atau tempat pembiakan yang telah disediakan, lakukan pre test lab urin dengan cara mengambil urin mencit menggunakan cup urin, catat hasilnya untuk menilai hasil normal
- c. Bius mencit menggunakan ketamine dengan dosis 46-60mg/KgBB secara intravena, setelah itu lakukan induksi *Staphylococcus aureus* melalui ureter mencit per hari selama lima hari berturut-turut dan amati kembali nilai hasil lab kultur urin mencit, diharapkan terjadi infeksi saluran kemih pada mencit putih dengan etiologi pasti *Staphylococcus aureus* tanpa adanya invasi bakteri lain agar hasil penelitian tidak bias.
- d. Setelah hasil dari tes lab urin mengalami adanya infeksi saluran kemih dari bakteri *Staphylococcus aureus*, bagi populasi mencit putih menjadi empat kelompok, satu kelompok kontrol positif yang diberikan terapiantibiotik amoxycilin dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan terapi menggunakan ekstrak *Vitis vinivera* dengan masing-masing dosis 200 mg, 300 mg, dan 500 mg via oral
- e. Dan amati hingga hari ke 7 untuk melihat dosis *therapeutic* yang efektif dalam penurunan kadar *Staphylococcus aureus* pada mencit putih tersebut.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Klasifikasi Variabel

##### 4.3.1.1 Variabel Dependent (Tergantung)

1. Penurunan kadar *Staphylococcus aureus*
2. Peningkatan kadar *Staphylococcus aureus*

##### 4.3.1.2 Variabel Independent (Bebas)

1. Ekstrak *Vitis vinivera* dosis 200mg/kgBB
2. Ekstrak *Vitis vinivera* dosis 300mg/kgBB
3. Ekstrak *Vitis vinivera* dosis 500mg/kgBB

##### 4.3.1.3 Variabel Kontrol Positif

Menggunakan Kontrol Pembeding yaitu Antibiotik Amoxycilin  
250 mg/KgBB

#### 4.3.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel Independent	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak Buah Anggur merah <i>Vitis vinivera</i>	Kandungan senyawa Flavonoid dan fenol yang diperoleh melalui proses pengekstrakkan Anggur merah	Penilaian dilakukan secara kuantitatif dari hasil proses pengekstrakkan <i>Vitis vinivera</i>	Milligram (Mg)	Rasio Nominal
Variabel Dependent	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Hasil Ukur	Skala Data
Kadar <i>Staphylococcus aureus</i> pada urin mencit	Mencit putih ( <i>Mus musculus</i> ) yang diinduksi <i>Staphylococcus aureus</i> melalui vesica urinaria agar mengalami infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri tunggal <i>Staphylococcus aureus</i> selanjutnya diberikan ekstrak <i>Vitis vinivera</i>	Penilaian dilakukan secara kuantitatif visual dengan pengambilan urin mencit putih yang diperiksa melalui kultur urin dengan teknik mayo atau <i>colony counting</i>	1. $10^1$ - $10^2$ 2. $10^3$ - $10^4$ 3. $10^5$ - $10^6$	Rasio

## 4.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

### 4.4.1 Instrumen Penelitian

Dalam Penelitian ini Peneliti menggunakan Instrumen seperti Cup Urin, Disk Plate, Mortar, Sendok, Neraca Stoikiometri, Timbangan, dan Alat pelindung diri seperti Handscoon, Masker, dan Jas Laboratorium. Alat- alat ini suda teruji melalui standar WHO dan dinyatakan Valid serta kepekaan dan presisinya terjamin. Kandang mencit coba berukuran 30 x 40 x 40 cm, tempat pakan dan tabung minum untuk mencit coba, timbangan, tinta dan kertas sebagai penanda pada hewan coba, tabung 15ml untuk membuat dan meletakkan kuman *Staphylococcus aureus*, spuit 1 ml dan 3 ml untuk menginduksikan *Staphylococcus aureus* secara intraureteral dan untuk injeksi ketamine secara intravena melalui Vena Femoralis.

### 4.4.2 Bahan Penelitian

Pakan standar untuk mencit putih, ekstraksi dari vitis vinivera, larutan dapat sitrat 0.05M Ph 4.3-4.5, larutan dekstrose 10%, larutan NaCl 0,9%, Bakteri *Staphylococcus aureus*, ketamine untuk pembiusan terhadap mencit, dan mencit jantan (*Mus musculus*) yang berusia sekitar 6 minggu hingga 21 minggu, dengan berat kisaran 120 – 200 gram.

### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian juga sebagian dilaksanakan di Laboratorium Zoologi Departemen Biologi Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya pada bulan Agustus 2019 hingga bulan Februari 2020. Pembuatan ekstrak *Vitis vinivera* dilakukan di Laboratorium Balai Materia Medika, Malang

### 4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Dipilih mencit putih yang sehat dan tidak terinfeksi dalam jumlah 32ekor dengan kriteria usia dan berat badan antara 6-21 minggu dan kisaran berat badan 120-200gram. Kemudian dibagi kedalam 4 kelompok

1. Kelompok kontrol positif Amoxycilin 250 mg/KgBB
2. Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak buah anggur merah (*Vitis vinivera*) dosis 200mg/KgBB

3. Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian ekstrak buah anggur merah (*Vitis vinifera*) dosis 300mg/KgBB

4. Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak buah anggur merah (*Vitis vinifera*) dosis 500mg/KgBB

Tiap kelompok terdiri dari 7 ekor mencit

Dilakukan pembiusan menggunakan ketamine dosis 46-60mg/KgBB pada semua populasi mencit secara intramuscular dengan spuit 3ml

5. Langkah selanjutnya dilakukan induksi Bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan spluit 1 ukuran ml secara intraureteral selama lima hari berturut-turut

6. Melakukan pengecekan kadar *Staphylococcus aureus* pada urin mencit dengan melakukan pungsi urin *intravesicae* dan hasilnya dilakukan kultur urin dengan melalui teknik mayo atau *colony counting*. Perlakuan induksi *Staphylococcus aureus* diberikan ke semua kelompok populasi mencit

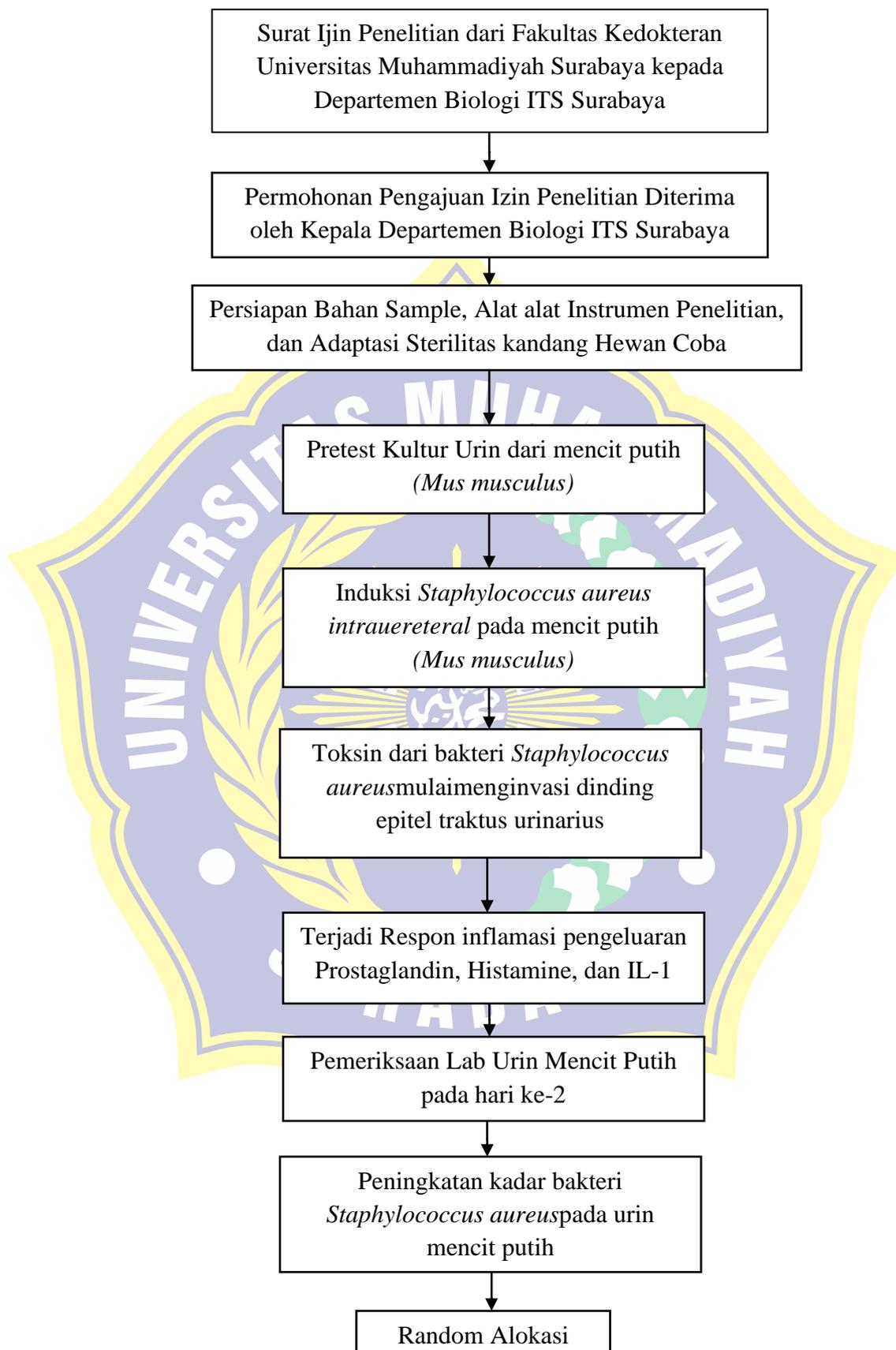
7. Setelah terjadi peningkatan kadar *Staphylococcus aureus* di urin Mencit putih pada semua kelompok populasi mencit, bagi mencit kedalam 4 kelompok. Pada kelompok 1 yaitu kelompok control tidak diberikan perlakuan terapi sedangkan pada 3 kelompok lainnya diberikan perlakuan terapi menggunakan ekstrak buah anggur merah (*Vitis vinifera*) dengan masing-masing dosis 200mg/kgBB, 300mg/kgBB dan 500mg/kgBB secara oral melalui sonde per oral dengan sebelumnya telah dilarutkan dengan senyawa etanol 75% agar zat Anthocyanidine lebih aktif.

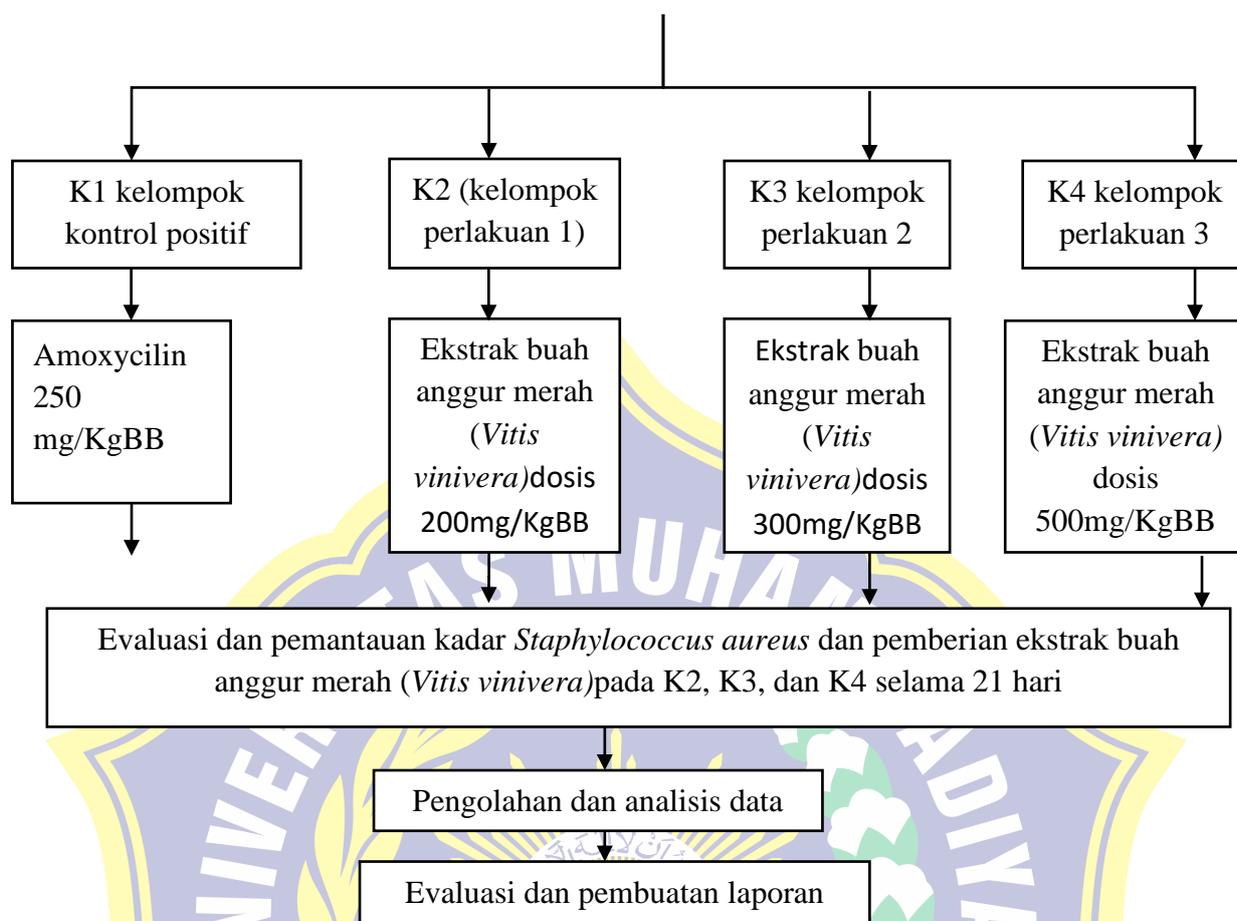
8. Pemberian ekstrak buah anggur merah (*Vitis vinifera*) diberikan setiap hari selama 5 hari kedepan karena untuk mengevaluasi proses bakterisidal alami dari senyawa zat Anthocyanidine.

9. Perlakuan mencit pada tiap kelompok diberikan perlakuan yang sama

10. Untuk mengetahui keefektifan *Staphylococcus aureus* terhadap dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok perlu dilakukan pengecekan kadar *Staphylococcus aureus* pada urin mencit putih dihari ke 5 hari

#### 4.6.1 Bagan Alur Penelitian





Gambar 4.2 Skema Lengkap Alur Penelitian

## 4.7 Cara Pengolahan dan Analisis Data

### 4.7.1 Pengolahan Data

Pengolahan Data yang akan dilakukan untuk hasil penelitian adalah sebagai berikut :

#### a. *Editing*

*Editing* merupakan kegiatan untuk pengecekan, membenaran, dan perbaikan dari data yang telah diambil atau diinput dari hasil penelitian berupa Nilai Dosis Ekstrak dan Unit Pembentuk Kuman.

#### b. *Coding*

*Coding* merupakan kegiatan membuat data dengan cara merubah data yang masih berbentuk huruf menjadi data berbentuk angka ataupun suatu bilangan. Kegunaan *coding* dapat mempermudah kita pada saat melakukan analisis data untuk penelitian dan juga pada saat entry data. Dalam penelitian ini coding yang dilakukan adalah :

##### 1. Unit Pembentuk Koloni Kuman

Kode 1 : Hasil Jumlah Kuman pada Tes Lab Urin :  $10^{-1}$ - $10^{-2}$  ml

Kode 2 : Hasil Jumlah Kuman pada Tes Lab Urin:  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ml

Kode 3 : Hasil Jumlah Kuman pada Tes Lab Urin:  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ml

##### 2. Dosis Ekstrak Kulit dan Biji Buah Anggur Merah

Kode 1 : Hasil Jadi Dosis Ekstrak : 200 mg

Kode 2 : Hasil Jadi Dosis Ekstrak : 300 mg

Kode 3 : Hasil Jadi Dosis Ekstrak : 500 mg

#### c. *Entry Data*

Setelah proses editing dan koding telah selesai, kemudian data penelitian dari rekam medis dapat dimasukkan dalam master tabel lalu dapat disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi. Proses entry data ini menggunakan komputerisasi yang dibantu dengan program “*Statistic Product and Service Solution*” (SPSS).

#### d. *Cleaning*

Setelah data hasil penelitian dimasukkan, data penelitian dapat diperiksa kembali sehingga dapat dikatakan valid atau benar benar bersih dari kesalahan. Pada penelitian ini tidak ada data yang dibuang, dihilangkan, atau tidak terpakai.

#### 4.7.2 Analisis Data

Untuk Dapat menguji hipotesis, penelitian ini menggunakan teknik analisa statistic yang akan dianalisis ataupun diolah dan disajikan menggunakan bantuan program “*Statistical Product and Service Solution*” (SPSS).

##### a. analisis *Univariat*

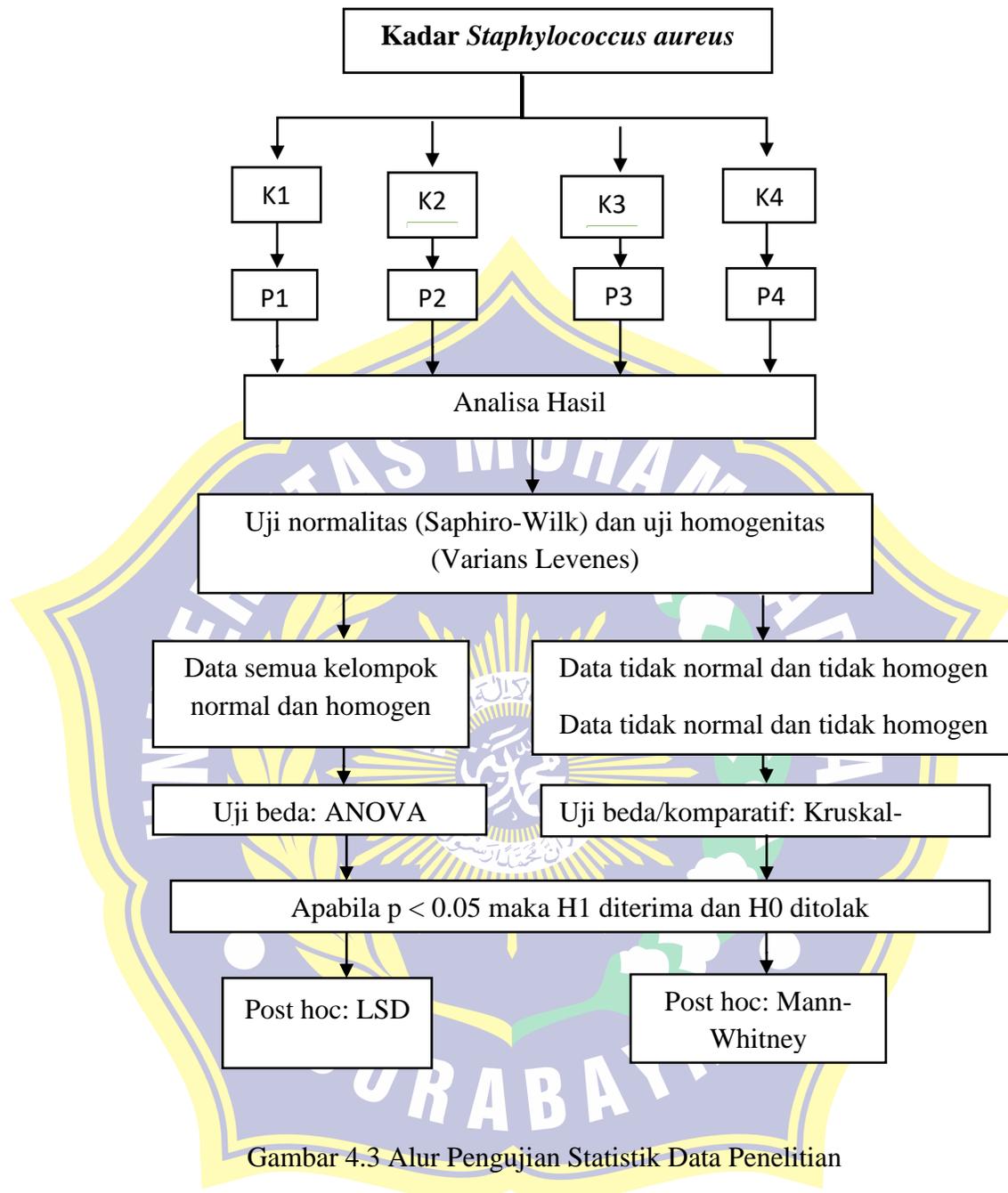
Variabel yang digunakan yaitu Unit Pembentuk Koloni, dan Dosis Ekstrak Biji dan Kulit Buah Anggur Merah yang akan dianalisis dengan statistik dengan menggunakan tabel distribusi frekuensi dan diagram.

##### b. analisis *Bivariat*

Penelitian ini akan menguji atau menganalisis hubungan antara tingkat dosis ekstrak kulit dan buah anggur merah terhadap kadaer kuman *Staphylococcus aureus* pada urin dari mencit putih (*Mus musculus*) Isolasi Urin dengan menggunakan Cup Urin.

##### 4.7.2.1 Uji Beda/ Komparatif

Sebelum dilakukan ujia beda, kadar bakteri *Staphylococcus aureus* pada urinmencit putih diuji normalitas terlebih dahulu dengan *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Varians Levene's* (nilai kemaknaan  $p > 0,05$ ). Apabila data telah normal dan telah homogen, uji beda yang dilakukan pada setiap kelompok perlakuan dapat dilakukan menggunakan uji varians satu arah (one way ANOVA), dengan tingkat kesalahan 5% (nilai kemaknaan  $p < 0,05$ ). Jika terjadi perbedaan yang bermakna maka digunakan uji (analisa post hoc) LSD (Least Significant Difference) uji beda nyata terkecil. Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka uji yang digunakan Kruskal-Wallis, dan apabila terdapat perbedaan yang bermakna uji yang digunakan (analisa post hoc) Mann-Whitney.



#### 4.8 Etika Penelitian

Dalam Melakukan Penelitian menggunakan hewan coba berupa mencit putih (*Mus musculus*) peneliti akan tetap menerapkan prinsip *Do No Harm* dengan kata lain peneliti tidak akan merugikan, menyakiti, dan menelantarkan hewan coba. Berdasarkan UU No.18 tahun 2009 *Animal Welfare* adalah segala urusan yang berhubungan dengan keadaan fisik dan mental hewan menurut ukuran perilaku alami hewan yang perlu diterapkan dan ditegakkan untuk melindungi hewan dari perlakuan setiap orang yang tidak layak terhadap hewan yang dimanfaatkan manusia. serta peneliti juga menerapkan sikap *Legality* dengan perizinan yang dibuat dalam meminjam dan memakai ruangan serta peralatan dari prodi Biologi Laboratorium Zoologi Fakultas Sains dan Teknologi Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya.

