

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain true experimental dengan metode yang digunakan yaitu *Randomized Post test Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan secara in vivo pada mencit.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Parasitologi. Waktu penelitian selama 2 bulan yaitu bulan Januari – februari 2016.

#### 4.3 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan parasit *Plasmodium berghei* didapatkan dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan uji yang dipakai adalah mencit BALB/c berjenis kelamin betina yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya. Hewan uji dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.4 Teknik Sampling

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian diambil secara *Randomized Sampling*, dengan restriksi sebagai berikut:

1. Jenis mencit : mencit BALB/c
2. Umur mencit : 6-8 minggu
3. Berat badan mencit : 20-40 gram
4. Jenis kelamin mencit : Betina

#### 4.5 Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 4 jenis perlakuan, maka jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus *The Resource equation method* (Mead 1988).

$$\begin{aligned}\text{Jumlah sampel tiap perlakuan} &= E / \text{jumlah perlakuan} \\ &= 18 / 4 \\ &= 4,5,\end{aligned}$$

E adalah error dimana angka yang di rekomendasikan adalah diatas 10 dan dibawah 20. Penelitian ini mengambil angka 18 sebagai nilai sehingga jumlah sampel setiap perlakuan dibutuhkan 5.

Metode ini digunakan karena tidak terdapat penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan besar *Effect size* sehingga metode *power analysis* tidak dapat dilakukan

#### 4.6 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infeksi *Plasmodium berghei* dan pemberian ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa*) secara intramuskular dalam dosis 400 mg/kg. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah derajat parasitemia dalam darah mencit. Variabel perancu (*confounding factors*) pada penelitian ini meliputi:

- a. Dapat dikendalikan :
  - 1) Spesies mencit
  - 2) Umur mencit
  - 3) Suhu ruangan
  - 4) Infeksi sekunder
  - 5) Stres mencit
  - 6) Ketelitian pengamatan

b. Tidak dapat dikendalikan :

1) Variasi genetic

#### 4.7 Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol batang brotowali (*Tinospora crispa*) adalah hasil ekstraksi serbuk (simplisia) batang brotowali (*Tinospora crispa*) menggunakan pelarut methanol.
2. *Plasmodium berghei* adalah salah satu dari empat Plasmodium selain *P. vinckei*, *P. chabandi* dan *P. voelii* yang menginfeksi rodent.
3. Derajat Parasitemia adalah jumlah parasit malaria bentuk aseksual yang menginfeksi eritrosit dibandingkan dengan 1000 eritrosit yang diamati, untuk menghitungnya menggunakan rumus:

$$\% \text{ Eritrosit Terinfeksi} = \frac{\sum \text{eritrosit terinfeksi}}{\text{eritrosit yang dihitung}} \times 100$$

4. Eritrosit Parasitik (EP) yaitu eritrosit yang mengandung *P. berghei* dalam bentuk aseksual yang diamati dengan hapusan darah tipis menggunakan Giemsa.
5. Dosis ekstrak batang brotowali adalah ukuran yang diberikan kepada mencit per oral dan intramuskular sebesar 400 mg/kg yang diberikan 1 kali sehari selama 7 hari. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian Suryawati dan Suprapti (2007)
6. Dosis artesunate adalah ukuran yang diberikan kepada mencit per oral sebesar 32 mg/kg yang diberikan 1 kali sehari selama 7 hari. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian Clemmer *et al* (2011)
7. Lama pemberian ekstrak batang Brotowali adalah waktu mulai parasit tampak di hapusan darah tipis sampai selesai perlakuan (hari ke 7).

8. Inokulasi *Plasmodium berghei* adalah suatu tindakan memberi infeksi Plasmodium pada Mencit BALB/c, diinokulasi dengan  $5 \times 10^6$  sel darah merah *P. berghei* secara intraperitoneal pada semua kelompok mencit.

#### 4.8 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.8.1 Alat Penelitian

Alat-alat diperlukan untuk pemeliharaan mencit dan perlakuan adalah kandang mencit, tempat minum, tabung eppendorf, mikropipet, pinset, hemositometer, gelas objek, tabung flacon, gunting steril, mikroskop, spuit, tabung gelas ukur, timbangan, mortal, pengaduk, sonde lambung mencit, mikroskop, scalpel, pinset, kasa, tempat plastik jaringan.

Alat-alat yang digunakan untuk membuat sediaan histopatologi pada pengecatan giemsa adalah gelas objek, heater, mikrotom, pipet, bak pengecatan, refrigeratori  $2-8^{\circ}\text{C}$ , cover glass, mikroskop.

##### 4.8.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan mencit adalah pellet makanan dan minuman standart. Bahan yang digunakan untuk perlakuan adalah *P. berghei*, *Phosphat buffer solution* (PBS), aquades, ekstrak batang brotowali, . Bahan yang digunakan dalam pengecatan giemsa adalah aquades, larutan methanol absolute, larutan giemsa, dan Buffer Pro Giemsa (BPG).

#### 4.9 Cara Kerja

##### 4.9.1 Pemeliharaan Mencit

Selama masa pemeliharaan, keempat kelompok mencit mendapatkan perlakuan yang berbeda. Pada kelompok I dilakukan inokulasi *P. berghei*, dengan pemberian artesunate secara oral dengan dosis 32 mg/kg. Pada

kelompok II (kontrol positif) dilakukan inokulasi *P. berghei* dengan perlakuan berupa pemberian aquadest secara oral. Pada kelompok III dilakukan inokulasi *P. berghei*, dengan pemberian ekstrak batang brotowali secara oral dengan dosis 400 mg/kg. Pada kelompok IV dilakukan inokulasi *Plasmodium berghei*, dengan pemberian ekstrak batang brotowali secara intramuskular dengan dosis 400 mg/kg. Pemberian ekstrak batang brotowali dilakukan apabila, setelah diinokulasikan *P. berghei*, hapusan darah mencit menunjukkan adanya gambaran eritrosit yang terinfeksi *P. berghei* (mencit positif terinfeksi malaria).

Setelah terbukti positif (hari ke-1), mencit kelompok I, II, III, dan IV diberi perlakuan sebagaimana mestinya. Pemberian ekstrak batang brotowali baik secara oral dan intramuskular diberikan masing-masing 1 kali sehari pada pengulangan jam yang sama setiap harinya hingga hari ke-7. Setiap harinya pengambilan sampel darah didapatkan dari ujung ekor tikus untuk dilihat jumlah parasit dalam darah dengan pengecatan giemsa. Setiap hari semua kelompok mencit selama penelitian mendapatkan pakan yang normal.

#### 4.9.2 Metode Ekstraksi dengan Cara Maserasi

Bahan dipersiapkan yaitu batang brotowali segar dicuci, dibersihkan kemudian ditiriskan. Kemudian dilakukan pengeringan, pengeringan yang digunakan terdiri dari 3 cara yaitu pengeringan dengan matahari sinar, pengeringan dengan alat pengering (oven), pengeringan dengan aliran udara (kering angin). Bahan yang sudah kering digiling dan diayak dengan kehalusan 60 mesh. Ditimbang 100 g kedalam piala gelas Ditambahkan metanol 90% sebanyak 500 ml. Diaduk selama 4 jam menggunakan pengaduk listrik dan kemudian didiamkan selama malam. Selanjutnya

disaring dengan kertas saring. Sisa/ampas ditambah dengan 300 ml metanol 95% diaduk kembali seperti semula, langsung disaring. Saringan I dan II dicampur, kemudian diuapkan dengan alat rotasi evaporator hingga tidak ada metanol yang menetes lagi. Diperoleh ekstrak pekat, selanjutnya ditimbang. Ekstraksi diulang masing-masing tiga kali. Untuk menghasilkan ekstrak yang steril maka setelah ekstraksi yang sudah kering akan dipaparkan dengan sinar UV.

#### **4.9.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Batang Tanaman Brotowali**

Dosis 400 mg/kg di konversikan menjadi 0,4 mg/gr. Dosis 0,4 mg/gr dikalikan dengan berat rata-rata mencit (30 gr) menghasilkan dosis 12 mg per ekor mencit. Lalu diencerkan dalam larutan PBS hingga volumenya mencapai 0,2 ml.

#### **4.9.4 Pemberian Ekstrak Batang Tanaman Brotowali**

Dosis 12 mg diencerkan dalam larutan PBS hingga volumenya mencapai 0,2 ml. Untuk perlakuan peroral menggunakan spuit dan sonde untuk pemberian peroral. Pemberian ekstrak brotowali secara peroral sebanyak 0,2 ml untuk tiap mencit kelompok peroral. Untuk perlakuan intramuskular dengan dosis yang sama dan diencerkan dalam larutan PBS hingga volumenya mencapai 0,2 ml. Pemberian ekstrak brotowali secara intramuskular dengan spuit dan jarum 27 ½ G, disuntikkan di daerah paha mencit pada tiap mencit kelompok intramuskular

#### **4.9.5 Pembuatan inokulum *Plasmodium berghei***

##### **a. Menghitung jumlah eritrosit/ml darah**

Melakukan pengambilan darah dari ujung ekor mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 10 µl dengan mikropipet yang tip-nya telah dibasahi dengan antikoagulan heparin. Lalu ditambahkan 990 µl PBS (*Phosphate Buffered Salin*) sehingga menghasilkan larutan I. Selanjutnya

dlakukan pengambilan 10 µl larutan I dan tambahkan 990 µl PBS sehingga menghasilkan larutan II. Jika sudah selesai, melakukan pengenceran 10<sup>4</sup> kali. Jika sudah, melakukan perhitungan jumlah eritrosit dalam kamar hitung eritrosit Naubauer dengan rumus:

$$\text{Jumlah eri/ml darah} = N (\sum \text{eri dlm 5 kotak}) \times 5 \times 10^4 \times 10^4$$

(pengenceran)

#### b. Menghitung derajat parasitemia (P%)

Derajat parasitemia diperiksa melalui sediaan apus darah tipis dari ujung ekor mencit. Mengambil darah dari ujung ekor mencit, setelah itu meneteskan pada gelas obyek, diapus dengan gelas obyek yang lain, dikeringkan pada suhu kamar, lalu digenangi giemsa ± 30 menit, dicuci pada air mengalir, dikeringkan pada suhu kamar. Setelah itu mengamati di bawah mikroskop perbesaran 1000X dengan minyak emersi. Pemeriksaan pada lapangan pandang dengan susunan tidak menumpuk, dihitung eritrosit terinfeksi parasit per 1000 eritrosit dengan rumus :

$$P\% = \frac{\sum \text{PRBC}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100 \%$$

#### c. Menghitung jumlah parasit/ml darah dengan rumus :

$$\text{Parasit/ml} = P\% \times \text{jumlah eritrosit/ml}$$

#### d. Menentukan dosis infeksi

inokulasi secara intraperitoneal ditetapkan konsentrasi parasit 5x10<sup>6</sup> dalam 0,2 ml darah untuk tiap mencit.

Rumus pengenceran

$$= \frac{\sum \text{parasit/ml darah mencit yang akan ditransfer parasitemianya}}{\sum \text{parasit/ml darah yang dibutuhkan untuk inokulasi}}$$

Pungsi darah dari jantung mencit yang akan ditransfer parasitemianya, dan diencerkan dengan PBS sesuai dengan hasil

perhitungannya, sehingga dihasilkan konsentrasi parasit  $5 \times 10^6 / 0,2$  ml larutan darah.

#### 4.9.6 Cara Inokulasi *Plasmodium berghei*

Dengan menggunakan spuit dan jarum insulin 27 ½ G diambil bahan inokulan sebanyak 0,2 ml. Mencit yang akan diinokulasi dipegang tengkuk dan ekornya menggunakan ibu jari dan jari telunjuk (posisi tangan seperti menggenggam) dengan erat diposisikan dengan peritoneum mencit menghadap ke arah praktikan. Bagian mencit yang akan diinokulasi diolesi alkohol 70%. Bahan inokulan disuntikkan intraperitoneal ke mencit. Masing-masing mencit disuntik bahan inokulasi sebanyak 0,2 ml. Menekan bagian peritoneum mencit pada tempat inokulasi dengan menggunakan kapas alkohol dan kemudian secara perlahan-lahan spuit dan jarum dicabut.

#### 4.9.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one-way Anova* yang dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok hewan coba. Apabila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk uji *one-way Anova*, maka sebagai alternatifnya akan digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk membandingkan perbedaan *mean* lebih dari dua kelompok. Kemudian akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok. Hasil uji statistik signifikan jika nilai  $p < 0,05$ .



#### 4.10 Prosedur penelitian in vivo

