

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan dengan membandingkan 4 kelompok mencit jantan usia minimal 8 minggu *mus musculus balb/c*, dengan tiap kelompok berisi 4 ekor mencit diberi diet normal laboratorium. Kelompok pertama sebagai kontrol (K) diinfeksi dengan *P. berghei*, kelompok kedua (D1) adalah kelompok mencit perlakuan yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi dengan ekstrak *Murraya paniculata* i.p. dengan dosis 50 mg/ml, kelompok ke tiga (D2) adalah kelompok mencit perlakuan yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi dengan ekstrak *Murraya paniculata* i.p. dengan dosis 100 mg/ml, kelompok ke empat (D3) adalah kelompok mencit perlakuan yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi dengan ekstrak *Murraya paniculata* i.p. dengan dosis 150 mg/ml (Valdes *et al.*, 2011). Penelitian ini telah mendapat kelaikan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Unibersitas Brawijaya dengan Surat Keputusan No. 167/ EC/ KEPK – S1/ 04/ 2013.

4.2 Populasi dan Subyek Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah mencit jantan *mus musculus balb/c* berusia minimal 8 minggu dan berat badan 40 gram.

4.2.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah mencit jantan *mus musculus balb/c* yang diambil dari populasi dan dikelompokkan secara *random alocation*. Jumlah subyek penelitian sebanyak 48 sampel. Sampel diambil dari 4 kelompok perlakuan yang masing-masing berisi 4 mencit dan diambil hapusan darahnya pada hari ke-3, 5, dan 7.

4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel darah mencit diambil dari subyek penelitian melalui ujung ekor pada hari ke 3, 5, dan 7 sebanyak 1 tetes untuk dibuat hapusan darah untuk melihat derajat parasitemia.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak akar *M. Paniculata* yang diberikan pada mencit yang diinfeksi oleh *P. berghei*.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah derajat parasitemia pada masing-masing kelompok mencit.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi FKUB, Laboratorium Biomedik FKUB, dan Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia FKUB.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Maret 2013 sampai Mei 2013.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Simplisia Akar Kemuning

Bahan simplisia akar kemuning adalah akar kemuning yang sudah kering

4.5.2 Bahan Ekstrak Akar Kemuning

Bahan Ekstrak Akar Kemuning adalah simplisia akar kemuning, N-Hexane, 60%, *Aquadest*, Kloroform, HCl dan NH₄OH

4.5.3 Bahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Bahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah HCl 2N, NH₄OH 20%, NaCl, etil asetat, metanol, air, kertas saring, isolasi, plat silika, pipa kapiler, dan ekstrak pelarut hexane.

4.5.4 Bahan Infeksi *P. berghei* Pada Mencit

Bahan infeksi *P. berghei* pada mencit adalah *P. berghei*, mencit donor, darah mencit, dan *Fetal Bovine Serum* (FBS).

4.5.5 Bahan Pembuatan Hapusan Darah dan Penghitungan Derajat Parasitemia.

Bahan pembuatan hapusan darah adalah gunting, alkohol 70%, kapas/tissue, metanol p.a absolut, giemsa, *Buffer Pro Giemsa* (BPG), dan air.

4.5.6 Instrumen Penelitian

4.5.7 Instrumen Pembuatan Simplisia Akar Kemuning

Instrumen pembuatan simplisia akar kemuning adalah pisau pemotong akar, oven, penggiling kasar, dan penggiling halus.

4.5.8 Instrumen Pembuatan Ekstrak Akar Kemuning

Instrumen pembuatan ekstrak akar kemuning adalah gelas beker, timbangan analitik, *stirer*, kain flanel, *rotary evaporator*, corong pisah, pH meter digital, dan stoples kaca.

4.5.9 Instrumen Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Instrumen Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah *chamber*, UV 366 Å, dan UV 254 Å.

4.5.10 Instrumen Infeksi *P. berghei* Pada Mencit

Instrumen infeksi *P.berghei* pada mencit adalah sentrifugasi, spuit 1 cc, hemositometer dan *cryotube*.

4.5.11 Instrumen Pembuatan Hapusan Darah dan Penghitungan Derajat Parasitemia

Instrumen penghitungan derajat parasitemia adalah *object glass*, mikroskop, dan minyak emersi

4.6 Definisi Operasional

1. Derajat parasitemia merupakan prosentase parasit di dalam darah yang ditandai dengan adanya bentukan *ring form* dan *schizont* pada hapusan darah tipis yang diambil dari darah mencit yang terinfeksi malaria dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi. Prosentase dihitung berdasarkan jumlah eritrosit terinfeksi dalam 1000 eritrosit.
2. Ekstrak akar kemuning didapatkan dari akar tumbuhan kemuning yang dijadikan simplisia terlebih dahulu, kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan n-heksan lalu di evaporasi di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia FKUB sehingga didapatkan ekstrak akar kemuning.
3. Malaria diinfeksi dengan cara menyuntikkan *P. berghei* yang diambil dari *Liquid Nitrogen* sebagai tempat penyimpanan Plasmodium, kemudian di *thawing*

sehingga dapat diinfeksi ke mencit donor. Setelah mencit donor terinfeksi maka diambil darah mencit donor dan diinfeksi kepada kelompok mencit perlakuan dengan dosis 200 μ l dengan spuit 1000 μ l secara intra peritoneal.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Langkah-langkah pelaksanaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah 0,1 gram ekstrak pelarut n-heksan dilarutkan dengan 1,67 ml HCl 2N, dipanaskan diatas pemanas air atau *water bath* selama 3 menit sambil diaduk. Kemudian setelah dingin ditambahkan 0,167 gram NaCl, diaduk rata dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan 1,67 ml HCl 2N. Larutan yang terbentuk ditambah dengan larutan NH₄OH 20% sampai menjadi basa (pH = 8,9), kemudian ditambahkan kloroform 5 ml dan dipisahkan dengan menggunakan *water bath* hingga kira-kira tersisa 3 ml. Fase kloroform ditotolkan pada plat silika dan ekstrak pelarut n-heksan ditotolkan disampingnya. Mempersiapkan *chamber* dan meletakkan kertas saring hingga keruh ke dalam *chamber*. Eluen yang mengandung etil asetat, metanol, dan air dengan perbandingan 10 : 1,65 : 1,35 dalam 10 ml dimasukkan ke dalam *chamber*. Memberikan tanda pada plat silika dan menotolkan fase kloroform dari ekstrak pelarut n-heksan dengan menggunakan pipa kapiler. Meletakkan plat silika dalam *chamber* hingga batas atas terbasahi lalu plat dikeringkan dan mengamati pada UV dengan gelombang 254Å dan 366Å. Hasil KLT pada UV light 366Å terlihat pendaran berwarna biru yang menandakan adanya alkaloid.

4.7.2 Thawing *P.berghei* dan Inokulasi pada mencit donor

Langkah – langkah thawing *P.berghei* adalah sebagai berikut, pertama ambil cryotube yang mengandung *P.berghei* dari tabung nitrogen cair lalu ditunggu hingga tabung yang berisi *P.berghei* sudah mencair dalam suhu ruang, kemudian di sentrifus 2000rpm dan supernatan dibuang lalu pelet dicuci dengan medium RPMI yang mengandung serum manusia 2-3x dan terakhir didilusi hingga mencapai 1 ml. Inokulasi ke hewan coba dilakukan dengan menyuntikan dilusi dari pelet *P.berghei* secara intra peritoneal sebanyak 200 ul setiap mencitnya.

4.7.3 Infeksi pada Mencit perlakuan

Apabila mencit donor sudah positif derajat parasitemianya minimal 5% maka darah dari mencit donor dapat diinfeksi ke mencit perlakuan dengan cara, sebagai berikut : Mencit donor dibius dengan dimasukkan ke wadah yang berisi kloroform dan kapas hingga mencit mengalami kematian, Segera mencit dibedah dan diambil darah dari jantung sebanyak 1000ul dan dimasukan dalam vacutaener yang berisi antikoagulan. Darah diambil 10 ul dan diencerkan pada 10^2 dan 10^4 kali. Jumlah eritrosit dihitung dengan hemositometer. Selain itu 10 ul darah dibuat hapusan darah dan dicat dengan Giemsa dan dihitung derajat parasitemianya. Didapatkan jumlah eritrosit pada pengenceran pada 10^4 adalah 77 dan derajat parasitemia adalah 20% sehingga perhitungan dilusi/pengenceran yang harus dilakukan untuk menginfeksi 5.10^6 parasit/ml darah adalah :

$$\frac{77 \cdot 10^4 \cdot 10^4 \cdot 20 \cdot 10^{-2}}{5.10^6} = 308$$

$$5.10^6$$

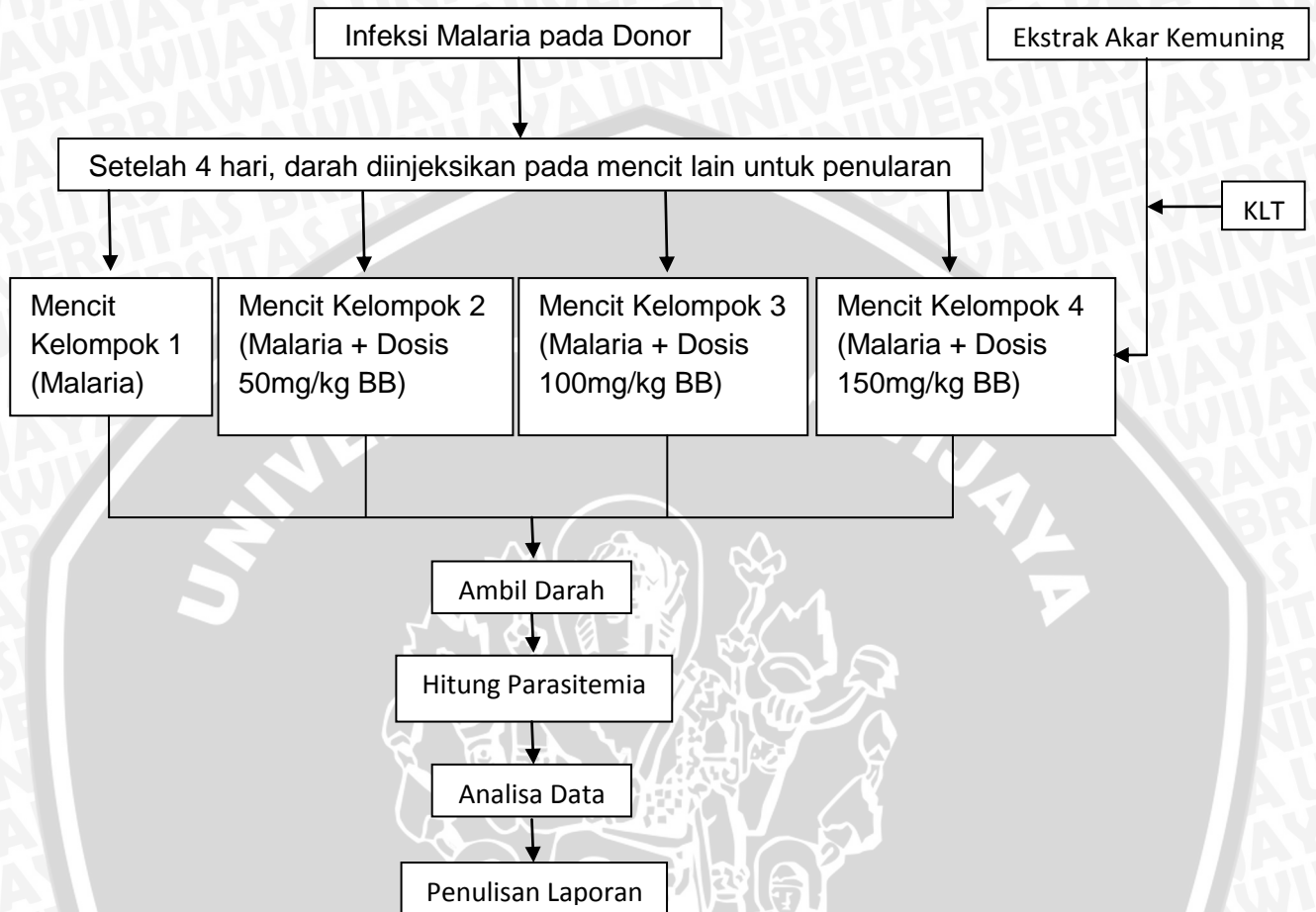
Setiap mencit disuntikkan 200ul dengan spuit 1000ul secara intra peritoneal.

Setelah diinfeksi dengan malaria, maka mencit perlakuan diamati derajat parasitemianya pada hari ke-3, 5, 7 untuk mengetahui apakah mencit sudah menderita malaria dengan menemukan bentukan *ring form* pada darah mencit yang diambil dan diamati dibawah mikroskop. Apabila sudah ditemukan bentukan *ring form*, maka mencit diterapi dengan ekstrak akar *Murraya paniculata* i.p. selama 7 hari. Mulai hari ke-3, ke-5, dan ke-7, derajat parasitemia diamati dan dihitung.

4.7.4 Pembuatan hapusan darah dan Pengecatan Giemsa

Pengecatan Giemsa dilakukan untuk melihat derajat parasitemia mencit yang sudah terinfeksi malaria dengan hapusan darah tipis. Pertama memotong ujung ekor mencit, kemudian diambil 10 ul darah dari ekor mencit dan diletakkan diatas *object glass* lalu dengan ujung *object glass* yang lain dibuat hapusan darah tipis dan ditunggu hingga kering. Setelah kering, hapusan darah ditetesi dengan methanol hingga seluruh bagian merata, ditunggu hingga kering. Setelah itu membuat campuran giemsa dan *Buffer Pro Giemsa* (BPG) dengan perbandingan 1:9 kemudian ditetaskan dan diratakan di *object glass*, ditunggu hingga 30 menit. Hapusan darah dibilas dengan air kemudian ditunggu hingga kering, setelah kering preparat dapat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Data dianalisa dengan menggunakan uji ANOVA pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Uji hipotesis disertai dengan syarat sebagai berikut :

1. Uji normalitas dengan menggunakan *Shapiro-Wilk* $p > 0,05$ yang berarti distribusi sampel normal.
2. Uji homogenitas $p > 0,05$ yang berarti sampel bersifat homogen.
3. Uji ANOVA $p < 0,05$ berarti signifikan.

Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Multiple Comparison Test* dengan

metode *Tukey* dan uji korelasi *Pearson*. Uji korelasi dilakukan untuk menguji hubungan antara dua variabel yang berdata rasio atau kuantitatif. Untuk melihat ada hubungan atau tidak dapat dilihat dari nilai signifikan dan seberapa kuat hubungannya dilihat dengan nilai r . Apabila terdapat hubungan, maka nilai $p < 0,05$ dan kuat hubungannya apabila nilai r mendekati 1 atau -1.

