

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Disiplin ilmu yang terkait dengan penelitian ini meliputi: Parasitologi dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Universitas Diponegoro. Penelitian dan pengumpulan data berlangsung pada bulan April - Mei 2016.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design* dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi tindakan.

	K	OK
R	P1	OP1
	P2	OP2
	P3	OP3

Keterangan :

R : Randomisasi

K : Kontrol (Kelompok mencit yang hanya di inokulasi PbA)

P1 : Perlakuan 1 (Kelompok mencit yang di beri terapi ekstrak *Annona muricata* saja)

P2 : Perlakuan 2 (Kelompok mencit yang di beri terapi *ACT* saja)

P3 : Perlakuan 3 (Kelompok mencit yang diberi terapi kombinasi *ACT* dan ekstrak *Annona muricata*)

OK : Pengamatan pada kelompok kontrol

OK 1 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 1

OK 2 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 2

OK 3 : Pengamatan pada kelompok perlakuan

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah mencit *Swiss* yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi penelitian ini adalah mencit *Swiss* di kembangbiakan dari laboratorium ITB Bandung.

3.4.3 Sampel Penelitian

3.4.3.1 Kriteria Inklusi :

Mencit *Swiss* betina, umur 8 minggu dengan berat badan 20-30 gram, dalam keadaan yang tampak sehat anatomi , serta aktivitas dan tingkah laku yang normal.

3.4.4 Cara Sampling

Sampel penelitian dipilih secara simple random agar tidak bias. Sehingga semua individu mempunyai kesempatan yang sama terpilih menjadi sampel penelitian.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah terapi *ACT* yang di beri kombinasi *Annona muricata*.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah indeks parasitemi dan lama hidup.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1	ACT(DHP) Obat anti malaria yang digunakan untuk plasmodium falciparum. Diberikan dalam dosis 0,819ml/hari	mg/kgBB	Nominal
2	Annona muricata Ekstrak daun Annona muricata dengan dosis 9,36 ml/hari	mg/kgBB	Nominal
3	Lama Hidup Banyaknya jumlah mencit yang hidup pasca diberi perlakuan akan dihitung per kelompok dengan batas waktu yang ditentukan	%	Rasio

3.7 Bahan dan Cara Kerja

Materi dan Alat Penelitian

1. Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan
3. Sonde lambung
4. Spuit untuk inokulasi parasit
5. Mikroskop
6. Deck glass
7. Object glass
8. Batang pengaduk
9. Bak pengecat
10. Bak pengering
11. Spreader
12. Tabung ependorf
13. Exhaust fan

2. Bahan

1. Ekstrak *Annona muricata*
2. Mencit *Swiss*
3. Darah perifer dari mencit *Swiss*
4. Parasit Malaria PbA
5. Pakan mencit
6. Larutan giemsa
7. Air
8. Methanol 90%
9. Buffer Sorensen
10. ACT (DHP) D-Artep.
11. Larutan NaCl

Cara Kerja

1. 48 mencit di adaptasikan selama 6 hari
2. Mencit-mencit di bagi dalam 4 kelompok yang masing-masing kelompok berisi 12 mencit.
3. Kelompok kontrol pada hari ke 6 sampai 13 diberi pakan biasa. Mencit di inokulasi PbA 10^7 pada hari ke 14, diberi pakan standar seperti biasa tanpa diberi pengobatan hanya diberi air agar kelompok kontrol merasakan perlakuan yang sama dengan kelompok lain.
4. Kelompok perlakuan 1, pada hari ke 6 sampai ke 13, diberikan pakan standar dan ditambah pemberian ekstrak *Annona muricata* per oral 4,68 mg/hari per oral dan di inokulasi 10^7 PbA perenteral pada hari ke 14, kemudian lanjutkan pemberian pakan standar dan pemberian ekstrak *Annona muricata* per oral 9,36 mg/hari per oral .
5. Kelompok perlakuan 2, pada hari ke 6 sampai hari ke 13 mencit diberi pakan standar. Mencit di inokulasi 10^7 PbA perenteral pada hari ke 14, diberikan pakan standar dan di berikan ACT pada hari ke 18 dengan dosis: 0,819 mg

6. Kelompok perlakuan ke 3, pada hari ke 6 sampai ke 13 mencit diberi pakan standar dan tambahan ekstrak *Annona muricata* sebanyak 4,68 kemudian mencit di inokulasi 10^7 PbA perenteral pada hari ke 14, diberikan pakan standar di tambah ekstrak *Annona muricata* sebanyak 9,36 mg/hari dan pada hari ke 18 di berikan ACT sebanyak 0,819 mg/hari

7. Pada hari ke 21 pemberian ACT dan ekstrak *Annona muricata* di berhentikan pada semua kelompok dan di lakukan pengambilan darah tepi melalui ekor mencit untuk hitung parasit yang di amati dari preparat darah apus. Pengambilan darah tepi ini bertujuan untuk memeriksa apakah jika ada mencit yang mati itu karena infeksi dari PbA bukan karena infeksi dari mikroorganisme lain. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 3 dan ke 7 pasca pengobatan

8. Pada hari ke 17, 19, 21, 23 di lakukan pengambilan darah tepi melalui ekor mencit untuk hitung parasit yang di amati dari preparat darah apus. Dari hari ke 21 hingga ke 30 di amati manakah kelompok mencit yang bertahan hidup paling lama pasca infeksi dan pemberian perlakuan, kemudian bandingkan lama hidup mencit antar kelompok.

Cara pengukuran Hitung Parasit

- a) Dihitung presentase jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit per 200 eritrosit.

b) Presentasi jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit per jumlah total eritrosit melalui perhitungan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

c) Hitung parasit = $\frac{\text{jumlah terinfeksi}}{\text{jumlah total}} \times 100\%$

Cara Perhitungan Dosis

1. Dosis ACT

Mencit : Manusia = 20gram : 70kg

Dosis harian = 3 x 70 mg dihydroartemisinin = 210 mg dihydroartemisinin

Mencit 20gram = 210 x 0,0026 = 0,546 mg/kgBB/hari dihydroartemisinin

Mencit 30 gram = 30/20 x 0,546 = 0,819 mg/kgBB/hari dihydroartemisinin

2. Dosis *Annona muricata*

1. Pencegahan

Mencit : Manusia = 20gram : 70kg = 0,0026 : 1

Dosis harian = 3 x 400mg *Annona muricata* = 1200 mg *Annona muricata*

Mencit 20gram = 1200 x 0,0026 = 3,12 mg *Annona muricata*

$$\text{Mencit 30 gram} = 30/20 \times 3,12$$

$$= 4,68 \text{ mg/kgBB/hari } \textit{Annona muricata}$$

2. Pengobatan

$$\text{Mencit : Manusia} = 20\text{gram} : 70\text{kg} = 0,0026 : 1$$

$$\text{Dosis harian} = 6 \times 400\text{mg } \textit{Annona muricata} = 2400 \text{ mg } \textit{Annona muricata}$$

$$\text{Mencit 20gram} = 2400 \times 0,0026 = 6,24 \text{ mg } \textit{Annona muricata}$$

$$\text{Mencit 30 gram} = 30/20 \times 6,24$$

$$= 9,36\text{mg/kgBB/hari } \textit{Annona muricata}$$

3.8 Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan program SPSS . Analisis deskriptif menampilkan nilai mean, median, dan simpangan baku. Presentase parasitemia pada masing-masing kelompok di uji normalitas distribusi dan homogenitas datanya. Uji beda pada data dengan distribusi normal dan homogen dilakukan dengan uji parametrik. Jika uji ANOVA menunjukkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *post Hoc*. Jika distribusi data normal tetapi tidak homogen maka digunakan uji nonparametrik. Uji nonparametrik juga digunakan jika distribusi data tidak normal. Jika uji *Kruskal Wallis* menunjukkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Uji survival juga dilakukan pada keempat kelompok hewan coba. Analisis survival dilakukan dengan asumsi *proporsional hazard* (PH). Survival yang memenuhi asumsi PH akan di asumsikan dengan time

independen analisis. Jika asumsi PH tidak terpenuhi dilakukan dengan analisis full model atau analisis reduced model.

3.10 Etika Penelitian

Pelaksanaan penelitian akan dilakukan dengan persetujuan dari komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP dr.Kariadi Semarang.