

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup**

Ruang lingkup penelitian ini adalah meliputi bidang keilmuan farmakologi, parasitologi dan imunologi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Waktu penelitian telah dilaksanakan pada tanggal 26 April sampai dengan 16 Mei 2016.

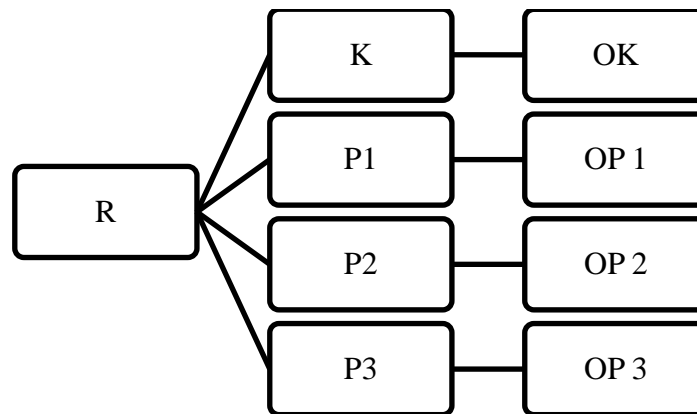
#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

##### **3.3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium murni. Karena pada penelitian ini diberikan intervensi berupa ACT dan ekstrak *A. muricata* pada mencit *Swiss* yang diinokulasikan PbA.

### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni yang didesain menggunakan desain *Post Test Only Control Group Design*. Objek yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit *Swiss* yang berjenis kelamin betina dengan berat mencit rata – rata 20 – 35 gram dan umur mencit adalah 8 minggu. Penelitian dilakukan dengan menganalisis hasil pengamatan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.



Gambar 3.3. Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol mencit yang diinokulasi PbA dan diberi Air.

P1 : Kelompok perlakuan mencit yang diinokulasi PbA dan diberi ACT (DHP).

P2 : Kelompok perlakuan mencit yang diinokulasi PbA dan diberi ekstrak *A. muricata*

P3 : Kelompok perlakuan mencit yang diinokulasikan PbA dan diberi ekstrak

*A. muricata* dan ACT (DHP).

- OK : Pengamatan pada kelompok kontrol.  
OP1 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 1.  
OP2 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 2.  
OP3 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 3.

### **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 terjangkau pada penelitian ini adalah mencit *Swiss* yang ada di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

#### **3.4.3 Sampel**

##### **3.4.3.1 Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mencit *Swiss* betina.
2. Usia 8 minggu.
3. Berat badan 20 sampai dengan 35 gram.
4. Kondisi sehat (aktif dan morfologi tampak normal).

### **3.4.3 Cara Sampling**

Sampel diambil dengan cara *simple random sampling* atau randomisasi sederhana, dimana semua objek yaitu mencit *Swiss* mempunyai kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel. Pengelompokan dilakukan secara acak setelah 6 hari mencit diadaptasi di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

### **3.4.4 Besar Sampel**

Berdasarkan ketentuan WHO untuk penelitian menggunakan herbal, besar sampel minimal tiap kelompok adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 10%. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Besar sampel yang digunakan adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 1 ekor mencit sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 24 ekor mencit.

## **3.5 Variabel Penelitian**

### **3.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian terapi ACT (DHP) dan ekstrak air daun *A. muricata*.

### **3.5.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase limfoblas limpa dan persentase parasitemia mencit *Swiss* yang diinokulasi PbA.

### 3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.2 Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	ACT (DHP)  Obat antimalaria yang digunakan untuk <i>P. falciparum</i> . Diberikan dalam dosis 0,546 mg <i>dihydroartemisinin</i> .	mg/KgBB	Nominal
2	<i>Annona muricata</i>  Ekstrak daun <i>A. muricata</i> dalam bentuk serbuk dilarutkan dalam air. Diberikan dalam dosis 3.12 mg <i>A. muricata</i> untuk pencegahan dan 6.24 mg untuk pengobatan.	mg/KgBB	Nominal
3	Persentase Parasitemia  Persentase parasitemia dihitung dari jumlah PbA dalam eritrosit diamati melalui mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.	%	Rasio
4	Persentase limfoblas limpa mencit <i>Swiss</i>  Persentase limfoblas dihitung dari jumlah limfoblas per 200 sel limpa (limfosit + limfoblas) diamati melalui mikroskop cahaya sesuai dengan standar prosedur yang digunakan.	%	Rasio

### **3.7 Cara Pengumpulan Data**

#### **3.7.1 Bahan dan Alat pada Persiapan dan Perlakuan**

##### **3.7.1.1 Bahan**

1. ACT (DHP) yang didapatkan dari Dinas Kesehatan Kabupaten Nabire Provinsi Papua.
2. Ekstrak daun *A. muricata* yang didapatkan dari PT Sidomuncul Semarang, Jawa Tengah.
3. *P. berghei* ANKA yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi UGM Yogyakarta.
4. Mencit betina strain *Swiss* yang didapatkan dari Laboratorium ITB Bandung.
5. Air
6. Pakan dan minum standar.

##### **3.7.1.2 Alat**

1. Kandang hewan coba.
2. Timbangan.
3. Sonde lambung.
4. Tabung reaksi.
5. Pipet ukur.
6. Batang pengaduk.
7. Spatula.
8. Inkubator

### **3.7.2. Bahan dan Alat pada Proses Isolasi Splenosit dan Pengukuran Persentase Limfoblas**

#### **3.7.2.1 Bahan**

1. *Lysing buffer* ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,17 M).
2. *Glutamin* (GIBCO).
3. *Fetal Bovine Serum*, FBS.
4. *Roswell Park Memorial Institute*
5. *Penicilin Streptomycin* (GIBCO).
6. Larutan *Giemsa*.
7. *Ethanol*, 70% (v/v).
8. *Sodium pentobarbital*, 50 mg/ml.
9. *Free Han'k balanced salt solution* (CMF-HBSS), mengandung  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  (GIBCO).

#### **3.7.2.2 Alat**

1. *Petri dishes plastic*.
2. *Refrigerated centrifuge*.
3. *Laminar flow hood*.
4. *Pipet Pasteur*.
5. *Object glass*.
6. Mikroskop cahaya.
7. Pipet.
8. Pinset.

### **3.7.3 Bahan dan Alat pada Proses Preparat Darah dan Perhitungan Parasitemia**

#### **3.7.3.1 Bahan**

1. *Giemsa* 5%.
2. *Methanol* absolut.
3. Minyak Emersi.

#### **3.7.3.2 Alat**

1. Sarung tangan.
2. Gunting.
3. *Object glass*.
4. Gelas ukur.
5. Mikroskop cahaya.
6. *counter*.

#### **3.7.4 Jenis Data**

Data pada penelitian ini bersifat primer karena pemeriksaan dilakukan sendiri oleh peneliti.

#### **3.7.5 Cara Kerja**

##### **3.7.5.1 Persiapan ACT (DHP) dan *A.muricata***

- Perhitungan dosis ACT (DHP):

Mencit : Manusia = 20 gram : 70 kg



Dosis harian =  $70 \times 3 \text{ mg dihydroartemisinin} = 210 \text{ mg dihydroartemisinin}$

Mencit 20 gram =  $210 \times 0,0026 = 0,546 \text{ mg dihydroartemisinin}$

Mencit 30 gram =  $30/20 \times 0,546$

=  $0,819 \text{ mg dihydroartemisinin}$

- Perhitungan dosis *A. muricata* :

\* Pencegahan

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

Dosis harian =  $3 \times 400 \text{ mg } A. muricata = 1200 \text{ mg } A. muricata$

Mencit 20 gram =  $1200 \times 0,0026 = 3,12 \text{ mg } A. muricata$

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

=  $4,68 \text{ mg } A. muricata$

\* Pengobatan

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

Dosis harian =  $6 \times 400 \text{ mg } A. muricata = 2400 \text{ mg } A. muricata$

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

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

=  $9,36 \text{ mg } A. muricata$

### 3.7.5.2 Perlakuan

1. 24 ekor mencit *Swiss* berumur 8 minggu diadaptasikan selama tujuh hari (hari ke- 1 – 6) di laboratorium di dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum.
2. Setelah diadaptasikan, pada hari ke- 7 mencit- mencit tersebut dibagi menjadi 4 kelompok kecil secara acak dan dikandangkan per-kelompok.
3. Kelompok Kontrol (K) : enam mencit pada hari ke- 7 sampai hari ke- 13 diberi air dan mendapatkan pakan standar serta minum. Hari ke- 14 enam mencit tersebut diinokulasikan  $10^7$  PbA. Selama hari ke- 14 sampai hari ke- 20 mencit diberi perlakuan pakan standar dan minum serta diberikan pelarut jamu air. Hari ke- 21 mencit diterminasi dan mengisolasi splenosit serta membuat preparat darah.
4. Kelompok Perlakuan 1 (P1) : enam mencit pada hari ke- 7 sampai hari ke- 13 diberi *A.muricata* dengan dosis 3.12 mg per hari dan mendapatkan pakan standar serta minum. Hari ke- 14 enam mencit tersebut diinokulasikan  $10^7$  PbA. Selama hari ke- 14 sampai hari ke- 17 diberi perlakuan pakan standar dan minum serta diberikan *A. muricata* dengan dosis 3.12 mg per hari secara oral. Hari ke- 18 sampai hari ke- 20 diberi perlakuan pakan standar dan minum serta diberikan *A. muricata* dengan dosis 6.24 mg per hari secara oral.

Hari ke- 21 mencit diterminasi dan mengisolasi splenosit serta membuat preparat darah.

5. Kelompok Perlakuan 2 (P2) : enam mencit pada hari ke- 7 sampai hari ke- 13 tidak diberikan perlakuan apapun hanya pakan standar dan minum. Hari ke- 14 enam mencit tersebut diinokulasikan  $10^7$  PbA. Selama hari ke- 15 sampai hari ke- 17 tidak diberi perlakuan apapun hanya pakan standar dan minum. Hari ke- 18 sampai hari ke- 20 enam mencit tersebut diberi ACT (DHP) dengan dosis 0,546 mg per hari secara oral dan pakan standar serta minum. Hari ke- 21 mencit diterminasi dan mengisolasi splenosit serta membuat preparat darah.

6. Kelompok perlakuan 3 (P3) : enam mencit pada hari ke- 7 sampai hari ke- 13 diberi *A.muricata* dengan dosis 3.12 mg per hari dan mendapatkan pakan standar serta minum. Hari ke- 14 enam mencit tersebut diinokulasikan  $10^7$  PbA.<sup>41</sup> Selama hari ke- 14 sampai hari ke- 17 diberi perlakuan pakan standar dan minum serta diberikan *A. muricata* dengan dosis 3.12 mg per hari. Hari ke-18 sampai hari ke- 20 diberi *A. muricata* dan ACT (DHP) dengan dosis masing - masing 6.24 dan 0.546 mg secara oral dan pakan standar serta minum. Hari ke- 21 mencit diterminasi dan mengisolasi splenosit serta membuat preparat darah.

### 3.7.5.3 Prosedur Isolasi Splenosit

1. Mencit diterminasi dengan dislokasi cervix atau inhalasi dengan sodium pentobarbital, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disiram *ethanol* 70%.
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset kearah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas, dan tampak *peritoneum*. Basahi peritoneum dengan *ethanol* 70% untuk menyingkirkan bulu – bulu rontok.
3. Rendam gunting dan pinset dalam *ethanol* 95%. Gunting *peritoneum* dengan irisan bentuk huruf U mengelilingi limpa. *Peritoneum* dilipat ke atas, angkat limpa dengan menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya menggunakan gunting. Letakkan limpa pada *petri dish* berisi 1,5 ml HBSS.
4. Hancurkan limpa menggunakan pinset.
5. Dengan menggunakan pipet *Pasteur*, pindahkan suspense sel tabung pemusing. Biarkan sel – sel yang menggumpal mengendap selama 5 atau 6 menit.
6. Pindahkan suspense sel ke tabung yang lain dan pusingkan sel pada kecepatan 200xg selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml *lysing buffer* pada suhu ruang (25<sup>0</sup>C)

untuk melisiskan eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C.

7. Buang *supernatant* dan *pellet* dicuci 2x dengan RPMI dengan cara dipipet berulang – ulang dan dipusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C.

8. Hitung sel – sel menggunakan *hematocytometer*.

#### **3.7.5.4 Prosedur Pemeriksaan Persentase Limfoblas**

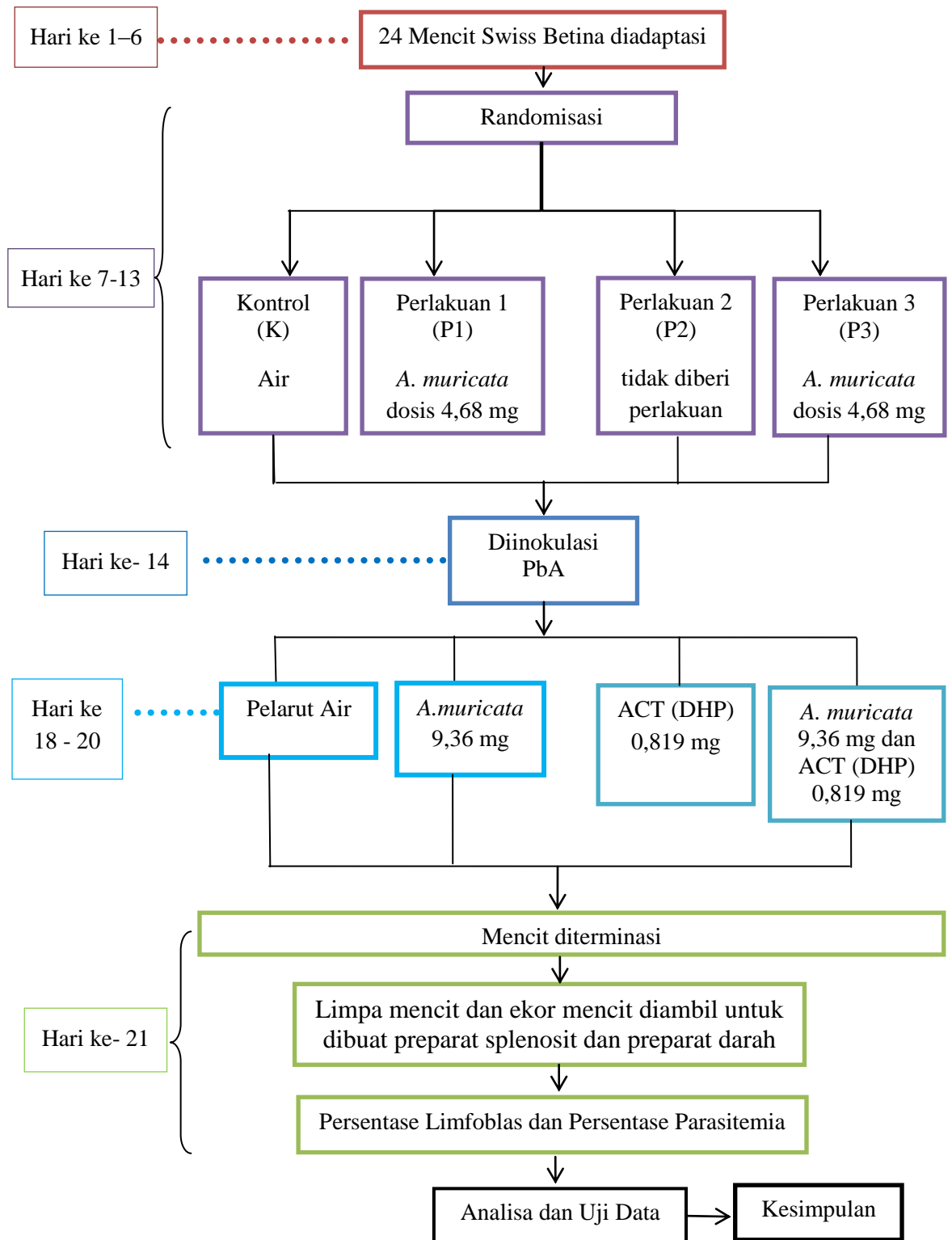
1. Siapkan splenosit yang telah dihitung kepadatannya 10<sup>7</sup> sel/ml.
2. Teteskan 1 tetes pada *object glass*, untuk dibuat sediaan hapus, keringkan di udara.
3. Fiksasi dengan *methanol*.
4. Cat dengan *giemsa*.
5. Baca dengan mikroskop cahaya, hitung jumlah limfoblas dari 200 sel (limfosit+limfoblas) pada area *homogen* sesuai standar prosedur pemeriksaan.

#### **3.7.5.5 Proses Membuat Preparat Darah dan Penghitungan Parasitemia**

1. Ekor mencit dipotong dengan menggunakan gunting.
2. Ambil setetes darah mencit untuk dibuat preparat darah tipis.

3. Biarkan darah mengering pada suhu ruangan kemudian difiksasi dengan menggunakan *methanol* absolut, keringkan.
4. Sediaan dicat dengan *giemsa* 5 % selama 30 menit.
5. Cuci dengan air mengalir dan keringkan pada suhu ruangan.
6. Hitung persentase parasitemia dengan cara menghitung jumlah PbA dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Pilih bagian yang susunan eritrositnya tidak saling menumpuk.

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian

## 3.9 Pengolahan dan Analisis Data

### 3.9.1 Pengolahan Data

#### 3.9.1.1 *Cleaning*

Data dilakukan pembersihan agar data penelitian tidak terdapat data yang tidak diperlukan.

#### 3.9.1.2 *Editing*

Dilakukan *editing* data untuk meneliti kelengkapan data, kesinambungan data, keseragaman data sehingga didapatkan data yang valid.

#### 3.9.1.3 *Coding*

*Coding* dilakukan untuk memudahkan dalam pengolahan data termasuk pemberian skor. Pada penelitian ini ditampilkan pemberian skor seperti berikut.

Tabel 3.3 Penskoran Berdasarkan Kelompok

Skor	Kelompok
1	Kelompok Kontrol
2	Kelompok Perlakuan 1
3	Kelompok Perlakuan 2
4	Kelompok Perlakuan 3



#### **3.9.1.4 Entry**

Proses dimana data dimasukkan dalam komputer untuk proses analisis data.

#### **3.9.2 Analisis Data**

Data dianalisis dengan menggunakan program SPSS. Analisis deskriptif menampilkan nilai *mean*. Untuk uji normalitas digunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dengan kriteria penerimaan dan penolakan hipotesis yakni hipotesis diterima bila  $p \text{ value} > \alpha = 0,01$  untuk penelitian kesehatan digunakan  $\alpha = 0,01$ . Uji homogenitas juga syarat yang harus dilakukan sebelum uji *One- Way Anova* yaitu dengan uji *Lavene test*. Dengan kriteria penerimaan hipotesis yakni hipotesis diterima bila  $p \text{ value} > \alpha = 0,01$ . Setelah asumsi normalitas dan homogenitas terpenuhi maka digunakan uji *One- Way Anova* dengan kriteria penerimaan hipotesis, hipotesis diterima jika nilai  $p \text{ value} > \alpha = 0,01$ . Jika uji *One- Way Anova* menghasilkan  $p \text{ value} < \alpha = 0,01$  maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Apabila data tidak berdistribusi normal digunakan uji *Kruskall Wallis test* dengan kriteria penerimaan hipotesis, hipotesis diterima jika nilai  $p \text{ value} > \alpha = 0,01$  kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

#### **3.9.3 Etika Penelitian**

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