

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan rancangan percobaan *post-test only control group design*.

B. Variabel Penelitian

1. Variable bebas : dosis ekstrak *Echinacea*
2. Variable tergantung : angka parasitemia dan lama hidup
3. Variable terkendali :

a. Dapat dikendalikan :

Subyek penelitian menggunakan mencit *Swiss* yang berumur 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan sekitar 20 sampai 25 gram berjenis kelamin jantan dengan kondisi kandang dan pakan yang sama.

b. Tidak dapat dikendalikan

Variasi genetik dan metabolisme mencit.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah Mencit *Swiss* yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA dengan kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Mencit *swiss* yang berusia 2,5 sampai 3 bulan dengan berat badan 20 sampai 25 gram.
2. Mencit *swiss* berjenis kelamin jantan, sehat dan tidak ada kelainan anatomis.

Kriteria eksklusi antara lain mencit sakit dan terdapat kelainan anatomis.

D. Sampel Penelitian

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan *Research Guidelines For Evaluating The Safety and Efficacy Of Herbal Medicines*, yaitu jumlah mencit pada tiap kelompok minimal 5 ekor. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 49 ekor mencit. Sampel dikelompokkan secara acak (*Simple Random Sampling*) ke dalam 7 kelompok yang seluruhnya diinfeksi dengan *P.berghei*, yaitu :

Kelompok perlakuan 5 hari sebelum dan 5 hari sesudah infeksi

Kelompok I : mencit diberi Echinacea 0,195 mg/25gBB.

Kelompok II : mencit diberi Echinacea 0,39 mg/25gBB.

Kelompok III : mencit diberi Phylantes 5,15mg/25g BB.

Kelompok perlakuan 5 hari sesudah infeksi saja

Kelompok IV : mencit diberi Echinacea 0,195 mg/25gBB.

Kelompok V : mencit diberi Echinacea 0,39 mg/25gBB.

Kelompok VI : mencit diberi Phylantes 5,15mg/25g BB.

Kelompok kontrol

Kelompok VII : kontrol negatif yang diinfeksi dan diberi aquades.

A. Alat Penelitian

1. Pemeliharaan mencit : Kandang mencit, ram kawat, alas kandang, tempat makanan, tempat minuman, sikat.

2. Perlakuan pada mencit: gelas objek, spuit 3 ml, spuit 1 ml, jarum suntik G22, mikroskop cahaya, minyak emersi, pipet tetes, kanula/sonde, porselen penggerus obat, label, tisu, lap, spidol.
3. Pengambilan data : sarung tangan, gunting, pinset, spuit 3 ml.

E. Bahan Penelitian

Plasmodium berghei galur ANKA, serbuk klorokuin difosfat, ekstrak Echinacea, pakan mencit (pelet BR-1), RPMI 1640 (zat pengencer), Eter, Heparin, antikoagulan EDTA, minyak emersi, formalin 10%, alkohol 70% dan cat giemsa.

F. Definisi Operasional

1. Phylantes

Dosis Phylantes yang digunakan adalah 5,15 mg/gBB mencit. Phylantes diencerkan dengan aquadest (5,15 mg/250 µl aquades), diberikan per oral dengan sonde.

2. Echinacea

Ekstrak *Echinacea* diperoleh dari perusahaan farmasi. Dosis yang diberikan pada penelitian ini menggunakan dosis yang direkomendasikan oleh WHO, yaitu 0,195 mg/g BB mencit. Dalam penelitian ini dosis yang digunakan adalah dosis 0,195 mg dan 0,39 mg. Dosis 0,39 mg digunakan untuk mengetahui keefektifan dibandingkan dengan dosis 0,195 mg dalam meningkatkan lama hidup mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. Ekstrak Echinacea dilarutkan dalam 2 ml aquadest steril dan diberikan per oral melalui sonde.

3. Angka Parasitemia

Parasitemia ditandai dengan beredarnya parasit dalam darah penderita dan dapat sangat tinggi kadarnya pada pasien dengan *immunocompromised*. Angka parasitemia dikatakan positif jika kadar parasit dalam darah lebih dari 2-3%. Angka parasitemia menentukan berat ringannya infeksi, tingkat kesembuhan dan lama hidup akibat infeksi malaria.

4. Lama hidup

Lama hidup menandakan kemampuan mencit untuk bertahan dari infeksi parasit (parasitemia) baik dengan mekanisme pertahanan tubuh mencit secara normal maupun pemberian terapi yang meningkatkan ketahanan mencit. Lama hidup mencit ditentukan dalam satuan hari (pengamatan lama hari maksimal mencit dapat hidup).

G. Cara Penelitian

1. Perlakuan terhadap Mencit

- a. Ambil darah mencit donor dari UGM yang sudah terinfeksi *Plasmodium berghei* sebanyak 4 ml. Kemudian masukkan ke tabung reaksi bersama antikoagulan dengan perbandingan 90% : 10%.
- b. Mencit uji diinokulasi dengan darah yang mengandung *Plasmodium berghei* ANKA sebanyak 0.2 ml (mengandung $\pm 10^7$ *Plasmodium berghei* stadium eritrositik), kemudian dicampur dengan RPMI 1640 untuk pengenceran. Inokulasi dilakukan secara intra peritoneal menggunakan spuit 1 ml.

- c. Tunggu hingga 24 jam lalu ukur kadar parasitemia setelah infeksi menggunakan apusan darah tipis. Lalu beri perlakuan berbeda-beda sesuai kelompok:
- d. Setelah diberi perlakuan, tunggu hingga 24 jam, lalu ukur kadar parasitemia. Setelah diukur, beri terapi lagi sesuai kelompok. Ulangi pada 24 jam berikutnya dan lakukan selama 10 hari.

2. Penentuan Parasitemia

Diperiksa dengan membuat sediaan apus darah tipis dari ujung ekor mulai hari ke-1 post infeksi.

- a. Darah diambil dengan memotong ujung ekor mencit (1 mm) lalu buat apusan darah tipis.
- b. Genangi gelas obyek dengan cat giemsa selama \pm 45 menit, lalu dicuci pada air mengalir, dan dikeringkan pada suhu kamar.
- c. Apusan darah diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dengan minyak emersi. Dilakukan pemeriksaan pada tiga lapang pandang yang mengandung \pm 200 eritrosit, dengan susunan tidak menumpuk, dihitung eritrosit terinfeksi parasit (P-RBC) per 1000 eritrosit, berdasarkan rumus:

$$\text{Angka parasitemia} = \frac{\text{P-RBC}}{(\text{P-RBC} + \text{RBC normal})} \times 100\%$$

3. Pengambilan data

Data diambil dari pengamatan dan perhitungan jumlah parasitemia pada apusan darah tepi yang dilakukan pada hari pertama setelah infeksi sampai mencit mati.

4. Analisis Angka Parasitemia dan Lama Hidup Mencit

Angka parasitemia mencit yang terinfeksi *P. berghei* dinilai dengan melihat angka parasitemia dalam apusan darah tepi. Lama hidup setiap kelompok perlakuan dengan Phylantes, tanpa terapi dan perlakuan dengan ekstrak *Echinacea* akan dibandingkan dengan cara mengamati dan menghitung hari maksimal mencit dapat hidup.

H. Analisis Data

Skala pengukuran angka parasitemia adalah kategorikal. Skala pengukuran data penelitian lama hidup adalah rasio. Data diolah secara statistik menggunakan metode uji non parametric *Kruskal-Willis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok menggunakan program *SPSS for Windows Release 15.0*.

I. Alur Penelitian

