

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian.

Penelitian ini merupakan penelitian dengan metode eksperimental laboratorik murni dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai subjek penelitian.

B. Tempat dan Waktu.

Penelitian ini dilakukan di dua tempat, yaitu :

1. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Rancangan waktu penelitian :

Penelitian dilaksanakan selama 8 minggu sejak bulan November 2010 - Januari 2011. Perincian waktu penelitian dapat dilihat pada tabel dibawah :

Tabel 1. Rancangan waktu penelitian

Jenis Kegiatan	Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Minggu VIII
Persiapan penelitian.								
Pemberian perlakuan.								
Pembuatan preparat.								
Pembacaan hasil preparat.								

C. Subjek Penelitian.

Subjek penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) swiss dengan galur DDI yang diperoleh dari Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan inokulum *Plasmodium berghei* ANKA yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Mencit (*Mus musculus*) swiss dengan galur DDI yang digunakan memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi :
 - a. Mencit betina.
 - b. Galur DDI.
 - c. Berat badan 20–30 g.
 - d. Umur 2,5-3 bulan.
 - e. Sehat.
 - f. Tidak ada kelainan anatomi.
2. Kriteria Eklusi :
 - a. Tidak terjadi malaria setelah dilakukan inokulasi.
 - b. Terjadi infeksi selain malaria.

D. Besar Sampel.

Tjumlah sampel penelitian dari tiap kelompok akan dihitung dengan

Terdapat tiga kelompok, yakni kelompok kontrol negatif dan perlakuan (terapi kombinasi klorokuin dan ekstrak echinacea).

Rumus Federer : $(t-1)(n-1) \geq 15$; dengan t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

$$(3-1)(n-1) \geq 15 \rightarrow 2(n-1) \geq 15 \rightarrow n-1 \geq 7,5 \rightarrow n \geq 8,5$$

Berdasarkan penghitungan tersebut, maka jumlah sampel untuk tiap kelompok adalah minimal 9 ekor mencit. Sehingga total sampel adalah sebesar 27 ekor. Namun, penelitian ini merupakan penelitian dimana digunakan lima kelompok, yakni kelompok kontrol positif, perlakuan (terapi ekstrak echinacea 0,65 mg), perlakuan (terapi kombinasi klorokuin dan ekstrak echinacea 0,65 mg), perlakuan (terapi kombinasi klorokuin dan ekstrak echinacea 0,65 mg + ekstrak echinacea 0,65 mg), dan perlakuan (terapi kombinasi klorokuin dan ekstrak echinacea 0,65 mg + ekstrak echinacea 0,65 mg + ekstrak echinacea 0,65 mg). Berdasarkan rumus Federer diperlukan sampel sebesar minimal 5 ekor per kelompok. Sebelum dilakukan penelitian, mencit terinfeksi dengan *Plasmodium berghei* yang diperoleh dari Universitas

E. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.

1. Variabel.

a. Variabel bebas :

- 1) Ekstrak echinacea dosis 0,65 mg.
- 2) Klorokuin tablet.

Dosis yang diberikan terdiri dari dua dosis yaitu

- b. Variabel tergantung :
 - 1) Aktivitas sel mikroglia.
 - 2) Jumlah persebaran parasit *Plasmodium berghei*.
- c. Variabel pengganggu :
 - 1) Dapat dikendalikan :
 - a) Umur mencit.
 - b) Berat mencit.
 - c) Spesies mencit.
 - d) Jenis kelamin mencit.
 - e) Infeksi sekunder (infeksi akibat jamur, bakteri, virus).
 - f) Suhu ruangan.
 - g) Ketelitian pengamatan.
 - 2) Tidak dapat dikendalikan :
 - a) Metabolisme mencit.
 - b) Variasi genetik.
 - c) Imunitas mencit.

2. Definisi Operasional.

- a. Ekstrak echinacea.

Ekstrak *Echinacea angustifolia* yang digunakan dalam penelitian

... ..

Dosis ekstrak echinacea ditentukan dengan cara dikonversikan terhadap berat badan mencit. Dosis manusia didasarkan pada aturan pemakaian suplemen yaitu 250 mg. Dosis yang akan diterapkan selanjutnya dikonversi ke dosis mencit dengan dikalikan 0,0026 (lampiran 1). Sehingga didapatkan dosis sebesar $250 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,65 \text{ mg}$.

b. Klorokuin tablet.

Klorokuin yang digunakan menggunakan obat dengan merek dagang resochin. Klorokuin tablet ditentukan dosisnya dengan dikonversikan terhadap berat badan mencit (lampiran 1), dan dosis pada manusia mengacu pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Syarif,dkk (2010).

Hari I : $600 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,56 \text{ mg}$

Hari II : $600 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,56 \text{ mg}$

Hari III : $300 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,78 \text{ mg}$

Klorokuin diencerkan dengan aquades sebanyak 1 ml dan diberikan per oral dengan sonde.

Kedua dosis tersebut mengalami penyesuaian dalam penelitian ini menjadi 3,033 mg (dosis yang disondekan 3,6 mg) selama dua hari dan 1,517 mg (dosis yang disondekan 1,8 mg) pada hari ketiga. Penyesuaian dilakukan karena tablet klorokuin dalam penelitian ini mengandung klorokuin fosfat 250 mg yang setara klorokuin base 150

mg. Dosis yang diberikan sengaja dilebihkan sedikit untuk mengantisipasi tersangkutnya obat pada alat sonde.

c. Aktivitas sel mikroglia.

Sel mikroglia merupakan jenis makrofag pada sistem syaraf sebagai pertahanan hospes non spesifik yang mempunyai karakteristik susunan fagosit mononukleus yang berbentuk memanjang dengan juluran-juluran pendek yang iregular. Peningkatan aktivitas sel mikroglia disini akan dinilai berdasarkan jumlah, ukuran, dan persebaran sel mikroglia yang didapatkan dari preparat histologi otak mencit swiss terinfeksi *P. berghei* dengan pemeriksaan dibawah mikroskop.

d. Jumlah persebaran infeksi *Plasmodium berghei*.

Jumlah persebaran infeksi *P. berghei* dilihat dari tingkat persebaran infeksi *P. berghei* pada preparat histologi otak mencit yang diinfeksi *P. berghei* dengan menggunakan data kualitatif, yaitu : tidak ada,(+) sedikit, (++) sedang, dan (+++) banyak.

F. Alat dan Bahan.

1. Alat :

a. Pemeliharaan mencit : kandang mencit, alas kandang mencit, ram kawat, dan tempat makan dan minum.

b. Perlakuan pada mencit : spuit 10 ml, porselen penggerus obat,

timbangan digital,Obang, sonde, sendak, kertas puyer, label, dan tisu

- c. Pengambilan data : gunting tajam, tabung dengan penutup, pisau bedah, objek kaca, label, *cassette* dan pinset.
- d. Mikroskop cahaya.

2. Bahan :

- a. *Plasmodium berghei* ANKA.
- b. Serbuk klorokuin fosfat.
- c. Ekstrak *Echinacea angustifolia*.
- d. Pakan mencit.
- e. Aquades.
- f. Pewarna HE (Hematoksilin dan Eosin).
- g. Formalin 10%.
- h. PBS (*Phosphate buffered saline*).

G. Rencana Kerja.

1. Penginfeksi dengan *Plasmodium berghei* in vivo.
 - a. Hewan uji diaklimatisasikan terlebih dahulu.
 - b. Tiap-tiap mencit ditimbang berat badannya.
 - c. Dilakukan pengambilan darah pada mencit yang terinfeksi *P. berghei* (inokulum) melalui mata mencit, kemudian dicampurkan dengan PBS dan EDTA. Kemudian campuran tersebut disuntikkan ke setiap mencit.
 - d. Mencit-mencit tersebut kemudian dibiarkan selama 24 jam.
2. Perlakuan pada mencit.

- 1) Kelompok I (kontrol negatif) : tidak diberikan diinfeksi *P. berghei*.
- 2) Kelompok II (kontrol positif) : diberikan kloro mg/ekor pada hari pertama dan kedua, sedangkan dosis diturunkan menjadi 1,8 mg/ekor.
- 3) Kelompok III (perlakuan) : diberikan diberikan echinacea dengan dosis 0,65 mg/ekor selama klorokuin dengan dosis 3,6 mg/ekor pada hari pertama pada hari ketiga dosis diturunkan menjadi 1,8 mg/ekor pada hari keempat dan kelima tidak diberikan klorokuin

3. Pengambilan sampel organ otak.

- a. Pada hari keenam post infeksi, semua mencit yang dimatikan dengan menggunakan ether 35%.
- b. Mencit difiksasi dan dilakukan pembedahan pada mencit.
- c. Organ otak mencit diambil dan dimasukkan ke dalam formalin 10%.

4. Pembuatan preparat histologi organ otak mencit.

- a. Otak mencit dicuci terlebih dahulu dengan aquades.
- b. Otak besar dan otak kecil dipotong melintang dengan 2-3 mm.

- c. Potongan otak mencit dimasukkan ke dalam *cassette*.

- d. Dilakukan proses pembuatan preparat histologi otak mencit dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE).
5. Pemeriksaan aktivitas sel mikroglia dan jumlah persebaran infeksi *P.berghei* pada preparat histologi otak mencit dengan mikroskop.

H. Cara Pengumpulan Data.

1. Pada akhir pemberian perlakuan, hari keenam mencit dimatikan dengan pemberian narkosa kemudian disembelih.
2. Dilakukan pembedahan mencit pada perut.
3. Diambil organ otak pada masing-masing mencit swiss, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi formalin 10% hingga seluruh organ otak mencit terendam.
4. Organ otak mencit yang telah diambil dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan UGM untuk diproses menjadi preparat histologi.

I. Analisis Data.

Jenis penelitian eksperimental dengan data yang diperoleh berupa data kuantitatif pada jumlah mikroglia yang dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji parametrik berupa uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey HSD* untuk membandingkan kelompok mana yang memiliki perbedaan yang signifikan antara satu dengan lainnya dan data kualitatif pada jumlah persebaran parasit plasmodium yang dianalisis dengan

uji non-parametrik yaitu dan uji *Kruskal-Wallis* dengan menggunakan program SPSS for Windows Release 17.0.

J. Kesulitan Penelitian

Kesulitan penelitian ini adalah jumlah mencit yang kurang untuk pelaksanaan penelitian. Jumlah mencit yang ideal untuk setiap kelompok perlakuan adalah 5 ekor tetapi penelitian ini hanya memakai 4 ekor. Penyebabnya adalah kurangnya jumlah mencit dari UMY yang memenuhi standar berat badan 20 gram saat penelitian hendak dilakukan. Penelitian tidak dapat ditunda karena mencit dari UGM yang menjadi sumber *Plasmodium berghei* tidak dapat dibiarkan terlalu lama karena akan segera mati akibat parasitemia berat.

K. Etika Penelitian.

Pengelolaan binatang percobaan pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan binatang percobaan dalam kandang, pemberian makan dan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, dan pemusnahannya