

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian bersifat eksperimental laboratorik murni dengan desain penelitian *post test control group* yang bertujuan untuk melihat efek dari ekstrak *Echinacea* pada gambaran histologi lien mencit yang di infeksi oleh *Plasmodium berghei*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di:

1. Pemeliharaan perlakuan dilakukan di kandang Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Pembuatan dan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada.

Rancangan waktu penelitian:

Jadwal pelaksanaan penelitian yang akan dilakukan ditunjukkan pada

Tabel 2 Jadwal pelaksanaan penelitian

No.	Uraian Kegiatan	Pelaksanaan Kegiatan (Minggu)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	Konsultasi dosen pembimbing												
2	Perumusan Masalah dan Metopel												
3	Persiapan penelitian												
4	Pemberian perlakuan												
5	Pembuatan preparat												
6	Pembacaan hasil preparat												
7	Pengumpulan data												
8	Pendokumentasian data												
9	Pengolahan data												
10	Analisis hasil penelitian												

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah mencit swiss (*Mus musculus*) strain DDI yang diperoleh dari kandang Laboratorium Biomedik-Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, sedangkan biakan inokulum *Plasmodium berghei* ANKA didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada.

1. Kriteria inklusi yaitu:

- a. Mencit swiss jantan.
- b. Berat badan 20 – 25 gram.
- c. Umur 2,5 – 3 bulan.
- d. Tidak mempunyai kelainan anatomis yang tampak .

2. Kriteria eksklusi yaitu:

- a. Tidak ada infeksi malaria setelah dilakukan inokulasi
- b. Tidak terinfeksi selain malaria.

Besar sampel penelitian yang digunakan 16 mencit swiss. Sebelum dilakukan penelitian, mencit terlebih dahulu di inokulasi dengan biakan *Plasmodium berghei* yang diperoleh dari Universitas Gajah Mada.

Hewan percobaan di bagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu:

Kelompok I: sebagai kontrol negatif, mencit hanya di infeksi *Plasmodium berghei* tanpa diberi perlakuan apapun.

Kelompok II: sebagai kontrol positif, mencit yang telah di infeksi *Plasmodium berghei* di berikan klorokuin 1,56 mg/ekor pada hari pertama dan kedua, kemudian 0,8 pada hari ketiga.

Kelompok III: P I, yaitu mencit yang di infeksi *Plasmodium berghei* di berikan ekstrak Echinacea 0,65 mg/hari selama 5 hari.

Kelompok IV: P II, yaitu mencit yang di infeksi *Plasmodium berghei* di berikan ekstrak Echinacea 1,3 mg/hari selama 5 hari.

D. Identifikasi Variabel

1. Variabel yang terlibat dalam penelitian ini adalah:

a. Variabel bebas yaitu:

- 1) Ekstrak Echinacea dosis 0,65 mg
- 2) Ekstrak Echinacea dosis 1,3 mg

b. Variabel tergantung yaitu:

- 1) Pelebaran pulpa rubra pada lien mencit.
- 2) Adanya parasit *Plasmodium berghei* pada lien mencit.

c. Variabel pengganggu yaitu:

1) Dapat dikendalikan

a) Umur

b) Spesies mencit

c) Suhu ruangan

d) Tingkat ketelitian pengamatan

e) Infeksi sekunder (infeksi akibat jamur, bakteri, virus dll)

2) Tidak dapat dikendalikan

a) Metabolisme mencit

b) Variasi genetik

2. Definisi operasional

a. Ekstrak *Echinacea*

Ekstrak *Echinacea angustifolia* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari suplemen ekstrak *Echinacea* dalam bentuk kapsul masing-masing 250 mg. Konsumsi suplemen ekstrak *Echinacea* dianjurkan maksimal 2 kapsul sehari atau 500 mg. Dosis yang diberikan berbeda pada perlakuan PI dan PII. Hal ini berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis. Untuk mencit yang mempunyai berat badan 20-25 gram dikonversikan dengan manusia 70 kg memiliki nilai konversi sebesar 0,0026. Perhitungan konversi dosis sebagai berikut:

Dosis perlakuan I= $250 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,65 \text{ mg}$.

Dosis perlakuan II= $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg}$.

Ekstrak *Echinacea* diberikan melalui sonde dengan dosis 0,65 mg/hari pada mencit P I, serta 1,3mg/hari pada mencit P II yang dilarutkan menggunakan aquades 2 ml.

- b. Peningkatan aktivitas makrofag di lihat dari pelebaran pulpa rubra. Pelebaran pulpa rubra pada lien di dapat dari peningkatan jarak antara pulpa alba satu dengan yang lain. Jarak yang di ukur adalah jarak terlebar serta tersempit antara dua pulpa alba yang terlihat di bawah mikroskop yang dilengkapi mikrometer dengan perbesaran 10x.
- c. Adanya infeksi *Plasmodium berghei* dilihat dari histologi lien mencit menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Penilaian berdasarkan data kuantitatif dengan kelompok data: sedikit apabila terlihat 1-5 parasit berwarna kecoklatan, sedang bila terdapat 6-10 parasit ,dan banyak bila terdapat > 10 parasit dalam satu lapangan pandang.

Infeksi sekunder oleh organisme selain *Plasmodium berghei* ANKA dapat dicegah dengan melakukan tindakan aseptik pada saat inokulasi dan pada waktu terapi per oral, selain itu dengan menjaga kandang mencit. Stres mencit dikendalikan dengan adaptasi mencit sebelum pemberian perlakuan.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dilibatkan dalam penelitian ini adalah:

1. Alat – alat penelitian yang digunakan adalah:
 - a. Pemeliharaan mencit: kandang mencit, alas kandang mencit (koran), dan timbangan digital Ohaus.
 - b. Perlakuan pada mencit: sonde, porcelen penggerus obat, spuit, sendok, tisu, kertas puyer.
 - c. Pengambilan data: pisau bedah, tabung dengan penutup, pinset, gunting, objek kaca.
 - d. Mikroskop cahaya
 - e. Micrometer
2. Bahan–bahan penelitian yang digunakan adalah:
 - a. Formalin 10 %
 - b. *Plasmodium berghei* ANKA
 - c. Serbuk klorokuin fosfat
 - d. Ekstrak *Echinacea angustifolia*
 - e. Pakan mencit
 - f. Aquades
 - g. Pewarna HE (Hemaktosilin Eosin)

F. Alur Kerja

Rencana kerja dalam penelitian ini adalah:

1. Mencit betina 24 ekor strain DDI dengan umur 2,5–3 bulan dan berat 25–30 gram diaklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu dengan dikandangkan berkelompok dengan diberi pakan setiap harinya.

2. Dilakukan inokulasi infeksi *Plasmodium berghei* selama 1 minggu.
3. Mencit betina 24 ekor yang telah terinfeksi malaria kemudian dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang dipilih secara acak dan ditempatkan dalam 1 kandang yang telah di beri label perlakuan.
4. Masing-masing kelompok mendapat pakan yang sama.
5. Kelompok 1 yang merupakan kontrol negatif tidak diberikan perlakuan apapun.
6. Kelompok 2 sebagai kontrol positif berikan klorokuin dosis 1,56 mg pada hari pertama dan kedua, kemudian dosis 0,8 mg pada hari ketiga.
7. Kelompok 3 (PI) berikan ekstrak Echinacea 0,65 mg/hari selama 5 hari.
8. Kelompok 4 (PII) berikan ekstrak echinacea 1,3 mg / hari selama 5 hari.
9. Lakukan pembedahan pada setiap mencit dengan diambil lien.
10. Masukkan semua organ dalam tabung yang berisi formalin untuk disimpan sementara di bawa ke tempat pembuatan preparat.
11. Iris secara melintang organ lien (pada ujung kaudalnya saja) dengan ketebalan maksimal 2 mm.
12. Masukkan dalam kotak penyimpanan yang telah di beri label perlakuan, simpan dalam formalin 10 % selama 3-4 hari.
13. Preparat organ lien, kemudian di cat menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).
14. Pembacaan hasil preparat digunakanlah mikroskop cahaya dengan persebaran 400x (lemah) dan 1000x (kuat) untuk menilai ada tidaknya

15. Pembacaan pelebaran antara dua pulpa digunakanlah mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan micrometer dengan perbesaran 10X.

G. Pengumpulan Data

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pengumpulan data adalah:

1. Pada akhir pemberian perlakuan, hari ke-6 mencit dibunuh dengan pemberian narkosa kemudian disembelih.
2. Dilakukan pembedahan mencit pada perut.
3. Diambil organ lien pada setiap mencit swiss yang kemudian diletakkan pada tabung kecil bertutup yang telah di isi dengan formalin 10 % sehingga seluruh bagian lien terendam.
4. Organ lien yang telah diambil, kemudian dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi FKH – UGM untuk dibuat preparat histopatologi.
5. Pembacaan adanya infeksi *Plasmodium berghei* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKH – UGM berdasarkan nilai: ada, sedang, banyak.
6. Pembacaan jarak antara pulpa alba untuk menghitung pelebaran pulpa rubra dilakukan di Laboratorium Histologi FKIK UMY menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi mikrometer dengan perbesaran 10X.
7. Pembacaan dilakukan sebanyak 3x lapangan pandang, kemudian diambil rata-rata ketiganya untuk pengolahan data

H. Validitas Reliabilitas

1. Validitas sampel

Sampel yang digunakan telah diseleksi dan dipilih sesuai dengan kriteria subyek penelitian, serta terus menerus diamati dan dipantau untuk mengendalikan variabel noneksperimental lainnya yang mungkin mempengaruhi kondisi subyek dan jalannya penelitian.

2. Validitas cara pengamatan

Cara pengamatan variabel dilakukan dengan cara mengamati preparat organ lien menggunakan mikroskop cahaya di laboratorium Patologi Klinik FKH UGM serta pengamatan di Laboratorium Histologi FKIK UMY dengan peralatan yang mendukung dan berfungsi baik.

3. Reabilitas intra peneliti

Penelitian ini dilakukan dalam kondisi peneliti sehat dan tidak terganggu fisik serta mental.

I. Analisis Data

Jenis penelitian eksperimental dengan data ordinal pada penelitian ini membutuhkan cara pengukuran non-parametrik, sehingga pengolahan data yang dipakai adalah *Kruskal-Walis*. Uji *Kruskal-Walis* bertujuan untuk melihat perbedaan perbandingan mean lebih dari 2 kelompok. Uji analisis yang digunakan selanjutnya menggunakan *Mann-whitney* dengan menggunakan program SPSS for Windows versi 16.00 (Dablan, 2008)

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 dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, dan pemusnahannya