

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, tabung reaksi 25 ml, neraca analitik, mikropipet, maserator, ayakan 30 mesh, *rotary evaporator*, *sentrifuse*, lemari pendingin suhu -80°C , mikroskop cahaya (Olympus[®]), spuit 1 cc, labu destilasi, slide gores, sonde, pipet volume, blender, kertas saring, cawan penguap, bilik hitung, spatula, kandang mencit.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth), heparin (Inviclot[®]), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Giemsa, alkohol, klorokuin diproduksi oleh Kimia Farma, etanol 70%, objek gelas, mencit Swiss (berat badan 20-30 gram, usia 8 minggu, berjenis kelamin jantan), biakan *Plasmodium bergeri* dari *frozen stock* Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.2. Hewan Uji

3.2.1. Jumlah Hewan Uji Penelitian

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan: t = Jumlah kelompok perlakuan (5 Kelompok)

n = Jumlah sampel tiap kelompok

Perhitungan :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4)(n-1) \geq 15$$

$$(4n-4) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Kelompok perlakuan dalam penelitian ini terdiri dari 5 kelompok. Berdasarkan hasil perhitungan tersebut diketahui bahwa jumlah mencit uji dalam satu kelompok berjumlah 5 ekor.

3.2.2. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Hewan dalam keadaan sehat
- b. Memiliki berat badan antara 20- 30 gram
- c. Hewan berjenis kelamin jantan
- d. Berusia 8-10 minggu

2. Kriteria Eksklusi

- a. Jika angka parasitemia $> 5\%$ setelah *re passage P. berghei*
- b. Hewan tampak agresif, tidak lincah atau lemah sebelum perlakuan
- c. Hewan tampak sakit yang ditandai dengan keluar sekret dari mata, dan hidung sebelum perlakuan
- d. Hewan mati saat pengujian berlangsung

3.2.3. Aklimatisasi Hewan Uji

Aklimatisasi dilakukan agar mencit mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Pemeliharaan mencit uji di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Mencit uji diaklimatisasi pada suhu ruangan dilakukan selama 7 hari

sebelum pengujian. Mencit uji ditempatkan di dalam ruangan bersih dengan siklus cahaya 12 jam terang dan 12 jam gelap. Mencit diberi pakan standar dan minum. Kandang pemeliharaan terbuat dari plastik berukuran 30 cm x 16 cm x 16 cm yang dilengkapi kawat penutup. Kandang uji diberi sekam sebagai penghangat bagi mencit. Kandang mencit juga dilengkapi dengan botol minum di bagian atasnya. Dilakukan pemantauan suhu dan kelembaban setiap hari dengan kisaran optimal yaitu $26,56 \pm 1,46^{\circ}\text{C}$ dan $82,86 \pm 7,08\%$. Sekam dalam kandang dan botol minuman dibersihkan dan diganti setiap dua hari sekali, sedangkan air minum diisi ulang apabila air telah habis.

3.3. Cara Penelitian

3.3.1. *Ethical Clearance* (EC)

Mengajukan *Ethical Clearance* (EC) kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan melakukan pegisian dan menyerahkan formulir EC serta proposal.

3.3.2. Penyiapan Sampel Tanaman dan Determinasi

Tanaman kenikir (*Cosmos caudatus*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Piyungan, Bantul, Daerah Istimewwa Yogyakarta. Bagian tanaman yang digunakan dalam pengujian adalah bagian daunnya. Daun kenikir di determinasi di laboratorium Biologi Universitas Gajah Mada.

3.3.3. Ekstraksi Kenikir

Daun kenikir segar dibersihkan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel menggunakan air mengalir. Daun kenikir ditiriskan untuk menghilangkan sisa air yang ada pada daun kenikir saat proses pencucian. Selanjutnya dilakukan penimbangan daun kenikir yang sudah didapatkan. Daun kemudian dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 40°C selama 24 jam untuk mendapatkan simplisia. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan nomer 30 *mesh*, kemudian ditimbang berat daun kenikir setelah berbentuk serbuk halus.

Daun kenikir diekstraksi dengan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan perbandingan 1:10 simplisia dan pelarut untuk 100% ekstrak murni. Tahap pertama dimasukkan 800 gram serbuk kering simplisia ke dalam wadah kemudian ditambahkan dengan etanol sebanyak 8000 ml. Campuran maserasi diaduk hingga homogen, kemudian segera ditutup, simpan dalam suhu ruangan, terhindar dari cahaya matahari, dan sering dikocok untuk mendapatkan filtrat. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50-60°C. Ekstrak etanol daun kenikir kemudian ditimbang bobot dan rendemennya.

3.3.4. Sisa Pelarut

Ekstrak etanol daun kenikir kemudian dilanjutkan dengan uji sisa pelarut menggunakan metode kromatografi gas di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia.

3.3.5. Uji Antiplasmodium

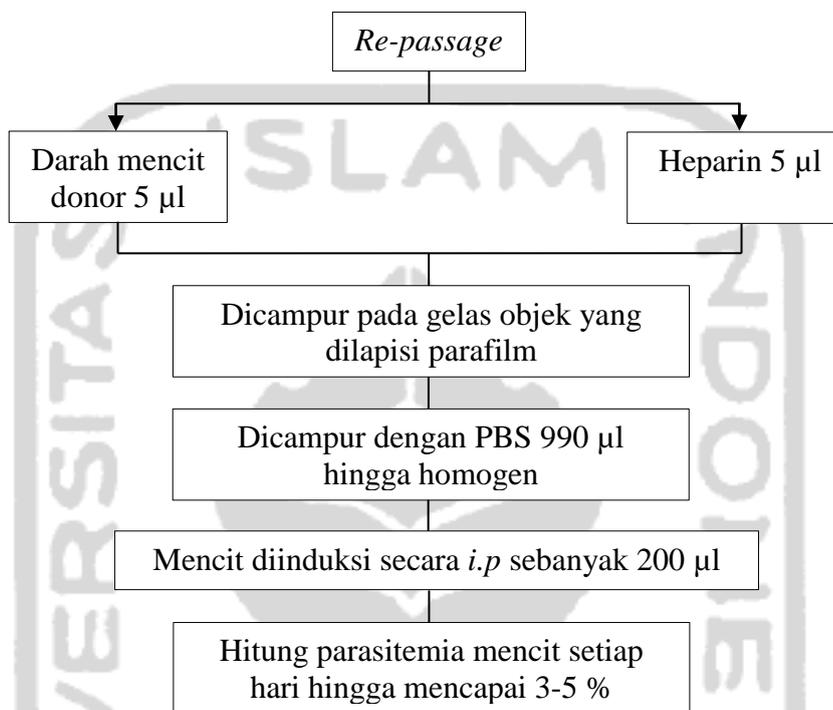
3.3.5.1. Pembuatan Mencit Donor

Langkah pertama dalam uji antiplasmodium secara *in vivo* adalah pembuatan mencit donor. Pada tahap ini digunakan mencit sebanyak 2 ekor. Berikut adalah langkah-langkah pembuatan mencit donor:

- a. Disiapkan darah yang mengandung *Plasmodium berghei* dari *frozen stock* sebanyak 200 µl.
- b. Disiapkan mencit donor dan dilakukan desinfeksi menggunakan alkohol 70% pada abdomen mencit.
- c. Diinjeksikan darah yang mengandung *Plasmodium berghei* secara *i.p* (intraperitoneal).
- d. Diamati parasitemia mencit donor setiap hari dengan membuat apusan darah dari ekor mencit hingga mencapai angka parsitemia > 10%.

3.3.5.2. *Re-passage Plasmodium berghei*

Langkah selanjutnya setelah didapatkan mencit donor adalah melakukan *re-passage* parasit pada mencit uji. Berikut merupakan langkah-langkahnya:



3.3.5.3 Pembuatan Dosis Uji

Pembuatan dosis uji dimulai dengan melakukan uji kelarutan ekstrak pada pelarut ekstrak DMSO, CMC Na 0,5%, tween 80. Pelarut dengan hasil kelarutan yang terbaik yang akan digunakan sebagai pelarut ekstrak. Mencit *re-passage* dengan parasitemia 3-5% kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari 3 variasi konsentrasi (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Kelompok uji antiplasmodium ekstrak daun kenikir.

Kelompok	Kode	Keterangan
Kontrol negatif	K1	Pelarut tween 80
Kontrol positif	K2	Klorokuin 10 mg/kgBB
Perlakuan	K3	Ekstrak 50 mg/kgBB
	K4	Ekstrak 100 mg/kgBB
	K5	Ekstrak 200 mg/kgBB

Pembuatan dosis uji dimulai dengan mencari % rendemen ekstrak yang didapatkan dari berat ekstrak kasar dibagi berat simplisia dikalikan 100%. Perhitungan dilanjutkan untuk mendapatkan % rendemen simplisia yaitu dengan membagi berat simplisia dengan berat bahan segar dikalikan 100%. Tiga dosis uji yang telah ditetapkan di awal (mg/kgBB) kemudian dikonversi menjadi 0,3 ml/20g BB dengan asumsi rerata berat mencit adalah 20 g dan per sondase adalah 0,3 ml.

1. Kelompok Kontrol Negatif

Setiap kelompok uji terdiri dari 5 tikus. Dosis sekali pemberian per oral adalah 0,3 ml/20gBB mencit, sehingga langkah pembuatannya adalah sebagai berikut:

- a. Diambil pelarut tween 80 sebanyak 0,3 ml.
- b. Dikalikan pelarut yang diambil dengan jumlah mencit yang digunakan sebagai kelompok kontrol negatif
- c. Dilarutkan pelarut tersebut ke dalam 5 ml akuades.
- d. Disonde sebanyak 0,3 ml/20gBB diberikan pada mencit secara per-oral

2. Kelompok Kontrol Positif

Berikut adalah langkah-langkah pembuatan larutan klorokuin:

- a. Ditimbang 1 tablet klorokuin sebesar 469 mg yg mengandung 150 mg klorokuin basa
- b. Dihaluskan 1 tablet klorokuin
- c. Dihitung dosis klorokuin untuk mencit dengan cara berikut:

$$\begin{aligned} \text{Konversi Dosis} &= 150 \text{ mg} \times 0,0026 \\ &= 0,39 \text{ mg (dibulatkan menjai 0,4)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Berdasarkan BB} &= \frac{1000 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0,4 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$= 20 \text{ mg/kgbb}$$

$$\begin{aligned} \text{Dibuat larutan suspensi} &= \frac{60 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml}} \times 0,39 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$= 78 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat yang ditimbang} &= \frac{78 \text{ mg}}{150 \text{ mg}} \times 469 \text{ mg} \\ &= 243,88 \text{ mg (add 60 ml akuades)} \end{aligned}$$

- d. Disondekan suspense klorokuin sesuai dengan berat badan mencit. jika 20 g mencit disonde 0,3 ml, maka 30 g mencit disonde 0,45 ml.

3. Kelompok Kontrol Perlakuan

Berikut adalah langkah cara pembuatan dosis uji dari *Cosmos caudatus*

$$\begin{aligned} \text{a. Dosis 50 mg/kgBB} &= \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 20 \text{ g/kgBB} \\ &= 1 \text{ mg} \\ \text{b. Dosis 100 mg/kgBB} &= \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 20 \text{ g/kgBB} \\ &= 2 \text{ mg} \\ \text{c. Dosis 200 mg/kgBB} &= \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 20 \text{ g/kgBB} \\ &= 4 \text{ mg} \end{aligned}$$

Berikut langkah pembuatan dosis uji per berat badan mencit uji jika diketahui berat mencit uji adalah 30 g untuk dosis 50 mg/kgBB:

- Ditimbang berat badam mencit uji adalah 30 mg
- Diketahui dosis uji untuk 20 gBB mencit adalah 1 mg/20gBB
- Diketahui sondase ekstrak daun kenikir per mencit uji adalah 0,3 ml
- Dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{20}{0,3} = \frac{30}{x}$$

$$20x = 9$$

$$x = \frac{9}{20}$$

$$x = 0,45 \text{ ml}$$

3.3.6. Uji Fitokimia

Ekstrak kental kenikir sebanyak 0,005 g ditimbang kemudian dilarutkan kedalam 5 ml etanol 70%, kemudian dibagi kedalam dua tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, dan tabung ke dua ditambahkan serbuk Mg secukupnya serta 3 tetes HCL pekat. Sampel positif mengandung flavonoid ditandai dengan perubahan warna kemerahan, kuning atau jingga (Sangi *et al.*, (2008).

3.4. Analisis Hasil

Hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk persen parasitemia dan persen penghambatan. Pengamatan angka parasitemia dilakukan selama 7 hari (H₀-H₇) untuk melihat parasitemia setelah terinfeksi malaria hingga hari ke-8. Angka parasitemia dinilai dengan membuat apusan darah tipis yang diambil dari ekor mencit setiap hari pada waktu dan jam yang sama. Penghitungan persen parasitemia pada mencit dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel darah merah yang terinfeksi parasitemia dibagi dengan 1000 eritrosit dalam persen (Rumus 1). Persen penghambatan didapatkan dari hasil persen parasitemia pada hari ke-8 setelah infeksi *P. berghei* hewan uji. (Rumus 2).

Rumus 1.

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi } P. \text{ berghei}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Rumus 2

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{Parasitemia kontrol negatif} - \text{Parasitemia kelompok uji}}{\text{Parasitemia kontrol negatif}} \times 100\%$$

3.4.1. Perhitungan IC₅₀

Analisis hasil dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menyatakan nilai konsentrasi yang dapat menghambat 50% pertumbuhan parasit. Hasil perhitungan % penghambatan tersebut kemudian dilanjutkan dengan perhitungan nilai IC₅₀ (mg/kgBB). Perhitungan IC₅₀ diperoleh dengan menggunakan analisis probit (*probability unit*) pada program SPSS yang

dilanjutkan dengan membuat kurva hubungan antara probit (*probability unit*) dan presen penghambatan.



1.5. Skema Penelitian

