

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan Penelitian

##### 4.1.1 Fraksi Tanaman

Fraksi etil asetat terstandar *Cassia siamea* L. yang diperoleh didapatkan dari hasil penelitian Hamsidi, 2013 dengan spesifikasi organoleptis sebagai berikut :

Bentuk	Cairan kental
Warna	Cokelat kehitaman
Bau	Khas aromatik
Rasa	Pahit

Berdasarkan peneliti sebelumnya juga telah dilakukan penentuan kadar senyawa Cassiarin A dalam fraksi etil asetat *C. siamea* yang digunakan dalam penelitian ini, berikut adalah hasil penetapan kadar berdasarkan replikasi yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya :

No.	Kadar Fraksi (% b/b)
1.	4.757
2.	4.577
3.	4.593
4.	4.233
5.	4.333
<b>Kadar Cassiarin A rata-rata</b>	<b>4.49 ± 0.21</b>

#### **4.1.2 Bahan Kimia**

Bahan yang digunakan dalam percobaan in selama proses penginfeksian parasit hingga pembedahan adalah artesunat, amodiaquin, PBS, eter, formalin 10 %, CMC-Na, Etanol 70 %, Aquadest, Metanol.

#### **4.1.3 Binatang percobaan**

Dalam penelitian ini digunakan mencit strain Balb/c yang didapatkan di Pusvetma (Pusat Veteriner Farma) Surabaya yang berumur 1,5 bulan – 2 bulan, dilakukan pemeliharaan dengan cara yang sama dan diberi makanan dan minuman dengan cara yang sama. Sebelum dilakukan treatment dilakukan pengelompokan dalam dosis penelitian dan diadaptasi selama 1 minggu. Penimbangan dilakukan sesaat sebelum treatment dan dilakukan sebanyak 1 kali selama percobaan karena dianggap tidak ada perubahan yang berarti selama kurung waktu percobaan (3 hari).

#### **4.2 Alat penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sonde 1.0 ml, beaker glass 50 ml, mortar, stamper, *eppendorf*, kertas perkamen, labu ukur 100 ml, labu ukur 25 ml, labu ukur 10 ml, pipet tetes, gelas ukur 25 ml, mikropipet, hematositometer, pot sediaan, sendok stainless steel, gunting bedah, bak bedah,

corong kecil, lemari pendingin, neraca analitik, handscoop, masker, cawan timbang, pinset, mikroskop cahaya, gelas objek.

### 4.3 Metode penelitian

#### 4.3.1 Rancangan percobaan

Pada penelitian uji pengaruh kombinasi artesunat dan fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* terhadap hepar mencit yang terinfeksi *P.berghei* ini dilakukan pemberian terapi kombinasi antimalaria serta pemberian terapi kombinasi obat jadi Artesunat dan Amodiaquin yang disuspensikan masing-masing dalam CMC-Na 0.5 %. Pada uji ini juga digunakan Kelompok 2 yang diberi terapi menggunakan artesunat dan amodiaquin (kombinasi antimalaria yang sudah dipatenkan oleh WHO) yang disuspensikan dalam CMC-Na 0.5 % serta kelompok control 3 yang diberi terapi artesunat saja dan kontrol negatif dan juga digunakan kelompok sehat. Jumlah kelompok kombinasi terapi yang akan dilakukan ada 2 macam kelompok kombinasi. Setiap kelompok digunakan 4 ekor mencit. Terapi dilakukan selama 3 hari terhitung saat jumlah persen parasitemia dalam mencit yang telah diinfeksi parasit *Plasmodium berghei* sekitar 1 – 5 %. Pembedahan dilakukan setelah tepat hari terakhir terapi kemudian darah diambil dari jantung untuk sampel pemeriksaan SGOT dan SGPT, serta dilakukan pengambilan organ hati dan . Analisis data dari histopatologi hepar serta hasil SGOT dan SGPT

dapat menunjukkan adanya kerusakan hepar yang diakibatkan oleh kombinasi terapi atau tidak serta efek terapi yang ditimbulkan oleh terapi kombinasi terhadap hepar yang terinfeksi oleh *Plasmodium berghei*.

Jumlah hewan uji mencit berjumlah 4 mencit tiap kelompok, hal ini di tinjau dari jumlah kelompok yang akan diuji sehingga dapat diketahui jumlah minimal mencit yang diuji dari rumus Freederer sebagai berikut:

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

Keterangan :

n = jumlah replikasi

t = jumlah perlakuan

dengan jumlah perlakuan yang diberikan adalah 5 sehingga diperoleh bahwa jumlah replikasi yang sesuai dengan rumus Freederer minimal adalah 4 ekor, maka digunakan mencit untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 4 ekor

#### 4.3.2 Pembuatan suspensi uji

Suspensi uji yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksi etil asetat daun *C. siamea* Lamk yang dibuat dengan dosis 5 mg/kg BB, CMC-Na 0.5 %, artesunat dengan dosis 4 mg/ Kg BB, serta amodiaquin dengan dosis 10 mg/ Kg BB. Dengan asumsi bahwa berat badan standar mencit adalah 25 gram dan volume tiap pemberian adalah 250  $\mu$ L, maka perhitungan dosis didasarkan atas berat badan

tersebut. Bila mencit yang diuji memiliki berat badan yang lebih atau kurang dari berat standar maka dilakukan konversi sesuai dengan ekivalennya.

Cara pembuatan bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Suspensi CMC Na 0.5 % yang digunakan untuk diberikan pada kelompok kontrol negatif dibuat dengan cara menimbang 500 mg CMC Na ditaburkan dalam 10 ml aquadest didiamkan selama 15 menit. Kemudian aduk dan gerus ad mucilago dan terbentuk suspensi CMC Na tambahkan aquadest sedikit demi sedikit. Masukkan dalam labu ukur kemudian di ad kan hingga 25 ml.
- Suspensi uji fraksi etil asetat 5 mg/kg BB dengan pemberian tiga kali sehari dibuat dengan cara menimbang fraksi etil asetat kering sejumlah 1112 mg fraksi etil asetat daun *C. siamea*. dan disuspensikan dengan suspensi CMC Na 0.5% sampai volume 100 ml
- Suspensi uji artesunat dosis 4 mg/Kg BB dengan pemberian satu kali sehari dibuat dengan cara gerus 2 tablet artesunat pada obat standart. Timbang hasil gerusan tablet sejumlah 808.89 mg dan disuspensikan

dengan suspensi CMC Na 0.5 % sampai volume 25 ml.

- Suspensi uji amodiaquin dosis 10 mg/Kg BB dengan pemberian satu kali sehari dibuat dengan cara gerus 1 tablet amodiaquin pada obat standart. Timbang hasil gerusan tablet sejumlah 132.36 mg dan disuspensikan dengan suspensi CMC Na 0.5 % sampai volume 10 ml.

#### 4.3.3 Penentuan untuk kombinasi uji

Pemilihan untuk kombinasi uji didasarkan pada efek terapi yang diberikan oleh artesunat dan daun johar. Artesunat memiliki khasiat sebagai skizontosida darah yang dapat membunuh parasit pada fase skizon dalam darah yaitu fase awal parasit saat menginfeksi darah. Dari hal tersebut dapat disimpulkan artesunat bila dikombinasikan dengan antimalaria lain dapat diberikan pada awal terapi maupun akhir terapi karena dapat menghentikan fase tumbuh parasit pada fase skizon yang biasa terjadi pada awal infeksi maupun pada saat akhir terapi sehingga tidak berlanjut ke fase selanjutnya. Sedangkan pada penggunaan fraksi etil asetat daun johar (*Cassia siamea* L.) telah terbukti memiliki efektivitas yang optimum pada dosis 5 mg/Kg BB yang diberikan 3 kali sehari. Maka dibuat 3 kelompok dengan pemberian terapi yang berbedai dan 1 kontrol negatif serta 1 kelompok sehat yang

merupakan kelompok mencit sehat yang tidak diberi perlakuan untuk membandingkan efektivitas terapi antimalaria terhadap hepar mencit yang terinfeksi dengan mencit sehat. Berdasarkan hal tersebut maka kelompok kombinasi yang digunakan untuk terapi selama 3 hari pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut :

- Kelompok 1 :

Hari 1 : Fraksi Etil Asetat Daun Johar + Artesunat

Hari 2 : Fraksi Etil Asetat Daun Johar + Artesunat

Hari 3 : Fraksi Etil Asetat Daun Johar + Artesunat

- Kelompok 2 :

Selama 3 hari terapi diberi terapi dengan kombinasi artesunat dan amodiaquin

- Kelompok 3:

Selama 3 hari terapi diberi terapi dengan Artesunat

- Kelompok Kontrol Negatif :

Selama 3 hari terapi diberi terapi dengan blanko yaitu CMC Na 0.5 %

- Kelompok Sehat :

Tidak diberikan terapi maupun tidak diinfeksi dengan *P.berghei*

#### 4.3.4 Penginfeksian mencit donor dengan *Plasmodium berghei*

Penginfeksian *Plasmodium berghei* dilakukan dengan cara menginjeksikan darah yang terinfeksi *Plasmodium berghei* pada tubuh mencit. Bahan yang digunakan untuk menginfeksikan mencit donor adalah simpanan beku eritrosit yang terinfeksi *P. berghei*. Pertama, eritrosit tersebut dinaikkan suhunya dengan cara dihangatkan dengan telapak tangan sambil diputar-putar agar sesuai dengan suhu tubuh mencit. Setelah itu, eritrosit tersebut diinjeksikan ke dalam tubuh mencit secara intraperitoneal (disuntikkan pada rongga perutnya) sebanyak 200  $\mu$ L. kemudian dicek persen parasitemia pada mencit setiap hari. Apabila persen parasitemia pada mencit sudah mencapai kurang lebih 20 % maka mencit siap untuk dibedah dan diambil darahnya yang ada pada intrakardial. Tahap penginfeksian mencit coba dilakukan dengan metode sebagai berikut yaitu pertama darah yang berasal dari intrakardial mencit donor dimasukkan ke dalam *ependorf* dan disentrifuse 2.000 rpm selama 5 menit kemudian Serum pada bagian atas dibuang dan hanya tersisa darah pada *ependorf*. Darah yang tersisa di *ependorf* ditambah 500  $\mu$ L PBS dan diaduk rata/kocok kemudian diencerkan 2x dengan PBS dengan perbandingan 1:1 (darah : PBS). Setelah itu darah hasil pengenceran ditetaskan pada *Neubauer* kemudian sel dihitung pada 5 kotak kecil yang ada



pada *Neubauer* dengan bantuan mikroskop cahaya. Eritrosit yang terinfeksi parasit diinjeksikan sebanyak  $1 \times 10^6$  pada mencit coba secara intraperitoneal sebanyak 200  $\mu\text{L}$

#### 4.3.5 Penyiapan hapusan darah

Mencit yang sudah terinfeksi parasit di potong ekornya sedikit saja sedemikian sehingga dapat diambil darahnya dan ditetaskan pada kaca preparat. Dibuat hapusan tipis dengan menggosokkan slide preparat pada darah dan dibuat 2 kali replikasi untuk masing-masing ekor. Sebelum diwarnai slide yang sudah terdapat hapusan darah difiksasi dengan methanol selama 20 detik. Kemudian dibuat larutan giemsa 20 % untuk pewarnaan hapusan. Hapusan diwarnai dengan giemsa selama 20 menit kemudian dibilas dengan air mengalir.

#### 4.3.6 Perhitungan persen parasitemia

Hapusan darah yang telah dibuat dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali. persen parasitemia di dapat dari jumlah eritrosit yang terinfeksi dibagi dengan total jumlah eritrosit yang diamati dikali 100 %. Perhitungan persen parasitemia sebagai berikut :

$$\begin{aligned} & \% \text{ parasitemia} \\ & = \frac{\text{jumlah eritrosit terinfeksi}}{5000} \times 100\% \end{aligned}$$

## 4.4 Pengumpulan data

### 4.4.1 Pengambilan sampel darah untuk pengujian SGOT dan SGPT

Pada akhir masa terapi, mencit dibedah kemudian diambil sampel darah dan organ hatinya. Sebelumnya mencit dibius dengan anastesi eter. Kemudian dilakukan penyayatan dari bagian bawah abdomen hingga pangkal leher. Kemudian darah diambil dengan menggunakan *syringe* dari jantung kemudian dimasukkan dalam *ependorf*. Kemudian di sentrifuge untuk dipisahkan dengan bagian serumnya.

Kemudian serum darah yang diperoleh dapat langsung dianalisis atau disimpan terlebih dahulu dalam *refrigerator* pada suhu 2-8 ° C (penyimpanan maksimal 3 hari).

### 4.4.2 Pembuatan Histopatologi organ hati

Setelah dilakukan pemedahan dan pengambilan sampel darah dari jantung kemudian dilakukan pengmabilan organ hepar. Pembuatan preparat histopatologi hati mencit (BALB/c) jantan dilaksanakan di laboratorium patologi fakultas kedokteran hewan universitas airlangga melalui beberapa tahap yaitu:.

#### a. Fiksasi dan pencucian

Organ hati dari hasil pembedahan dicuci dengan NaCl isotonis, dimasukkan wadah yang

sudah dimasukkan formalin 10 % dan dibiarkan 24 jam (semua organ harus tenggelam dalam larutan formalin).

b. Dehidrasi dan Clearing

Organ hepar yang dicuci dengan air kran selama 30 menit, dimasukkan ke dalam reagen berturut-turut dari mulai alkohol 70 %, 80 %, 95 %alkohol absolute I, II, III, xylol I dan xylol II masing-masing selama 30 menit

c. Infiltrasi

Setelah dilakukan dehidrasi dan clearing, organ hati dan dimasukkan ke dalam paraffin I yang mencair selama 1 jam kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50 °C – 60 °C selama 1 jam.

d. Pembuatan Blok Parafin

Disiapkan beberapa beberapa cetakan besi yang sebelumnya telah diolesi oleh gliserin dengan maksud untuk mencegah melekatnya paraffin pada cetakan besi tersebut, kemudian cetakan besi tersebut diisi dengan paraffin cair panas. Organ selanjutnya dimasukkan dengan menggunakan pinset ke dalam cetakan besi dengan posisi diatur, ditunggu sampai paraffin tersebut membeku atau mengeras

e. Pengirisan dengan mikrotom

Blok paraffin yang sudah mengeras disiapkan. Pertama-tama mikrotom

dibersihkan, digosok dengan kertas tisu pada relnya hingga bersih, kemudian relnya diberi minyak pelican. Mata pisau dipasang dengan mikrotom. Diatur tinggi rendahnya permukaan blok pada skala 10-15. Sudut permukaan organ diatur dengan arah potongan pisau membentuk 45 °. Dan tebal tipisnya potongan pun diatur, untuk organ yang kersdapat dengan  $\pm 5 \mu\text{m}$ . pemotongan diambil secara random, tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7  $\mu$  setelah itu jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya telah diolesi putih telur dan dikeringkan dengan hotplate dengan suhu 60 °C.

f. Pewarnaan

Pewarnaan yang dilakukan menggunakan pewarnaan Hematoxylin eosin yang digunakan untuk mewarnai sitoplasma dan inti sel.

g. Mounting

Bila pewarnaan sudah kering , maka gelas objek yang ada sayatan jaringan tersebut ditutup dengan gelas penutup yang yang sebelumnya sudah diolesi dengan Canada balsam. Untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi pada gambaran histopatologi hati dan tikus yang sduah jadi tersebut dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya, mula-mula dengan

perbesaran 100 kali kemudian dengan perbesaran 400 kali

## 4.5 Analisis data

### 4.5.1 Analisis Histopatologi Hepar

Preparat yang telah siap untuk diamati, dapat segera dilakukan pengamatan histopatologi. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya serta dapat dibantu dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Terhadap preparat tersebut, dilakukan penghitungan jumlah perubahan sel pada jaringan. Pengamatan pada organ hati dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami degenerasi, nekrosis, dan sel hati yang normal di lima lapang pandang sekitar vena sentralis dan di sekitar vena porta. Pada masing-masing lapang pandang dihitung jumlah sel hati (hepatosit) yang mengalami degenerasi dan nekrosis kemudian dibagi dengan jumlah hepatosit dalam lima lapang pandang tersebut. Keadaan yang diamati digolongkan menjadi 4 poin berdasarkan total perubahan sel yang mengalami perubahan dibanding dengan jumlah seluruh sel hepatosit dalam lima lapang pandang untuk pengamatan degenerasi dan nekrosis sel hepatosit. Pemberian skor berdasarkan degenerasi dan sel nekrosis yang teramati dan pemberian skor sebagai berikut :

0 : tidak terjadi perubahan

- 1 : perubahan yang teramati  $\leq 25 \%$
- 2 : perubahan yang teramati antara  $> 25 - 50 \%$
- 3 : perubahan yang teramati antara  $> 50 - 75 \%$
- 4 : perubahan yang teramati  $> 75 \%$

Untuk melihat keadaan inflamasi yang terjadi pada sel hepar, maka diamati sel hepar pada 5 lapang pandang dan dilihat berdasarkan persen area total jumlah sel inflamasi yang terjadi pada hepar dan diberi scoring sebagai berikut :

- 0 : tidak terjadi perubahan
- 1 : perubahan yang teramati  $\leq 25 \%$
- 2 : perubahan yang teramati antara  $> 25 - 50 \%$
- 3 : perubahan yang teramati antara  $> 50 - 75 \%$  /lebih
- 4 : perubahan yang teramati  $> 75 \%$

Hasil yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok kontrol dan perlakuan.

#### **4.5.2 Analisis SGPT dan SGOT**

##### **4.5.2.1 Analisis Enzim SGPT berdasarkan IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*)**

Prinsip dari analisis enzim SGPT adalah pembentukan piruvat dari reaksi antara L-alanin dengan 2 oksoglutarat yang dikatalisis oleh enzim GPT (Glutamat Piruvat Transaminase). Piruvat yang terbentuk selanjutnya bereaksi

dengan NADH dan atom hidrogen membentuk senyawa akhir berupa L-laktat dan NAD<sup>+</sup>. Prosedur pengujiannya adalah dengan mengambil sampel darah kemudiandisentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, kemudian diambil serumnya sebanyak 15 µl. Serum lalu diukur pada panjang gelombang 340 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

#### **4.5.2.2 Analisis Enzim SGOT berdasarkan IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*)**

Prinsip analisis enzim SGOT secara umum mirip dengan analisa enzim SGPT. Hanya saja, di dalam pengujian ini senyawa yang direaksikan bukanlah L-alanin, melainkan L-aspartat. Reaksi dikatalisis enzim GOT (Glutamat Oksaloasetat Transaminase) menghasilkan senyawa oksaloasetat. Oksaloasetat yang bereaksi dengan NADH dan H<sup>+</sup> akan menghasilkan produk akhir berupa L-malat dan NAD<sup>+</sup>. Prosedur pengujiannya adalah dengan mengambil sampel darah kemudiandisentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, kemudian diambil serumnya sebanyak 15 µl. Serum lalu diukur pada panjang gelombang 340 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

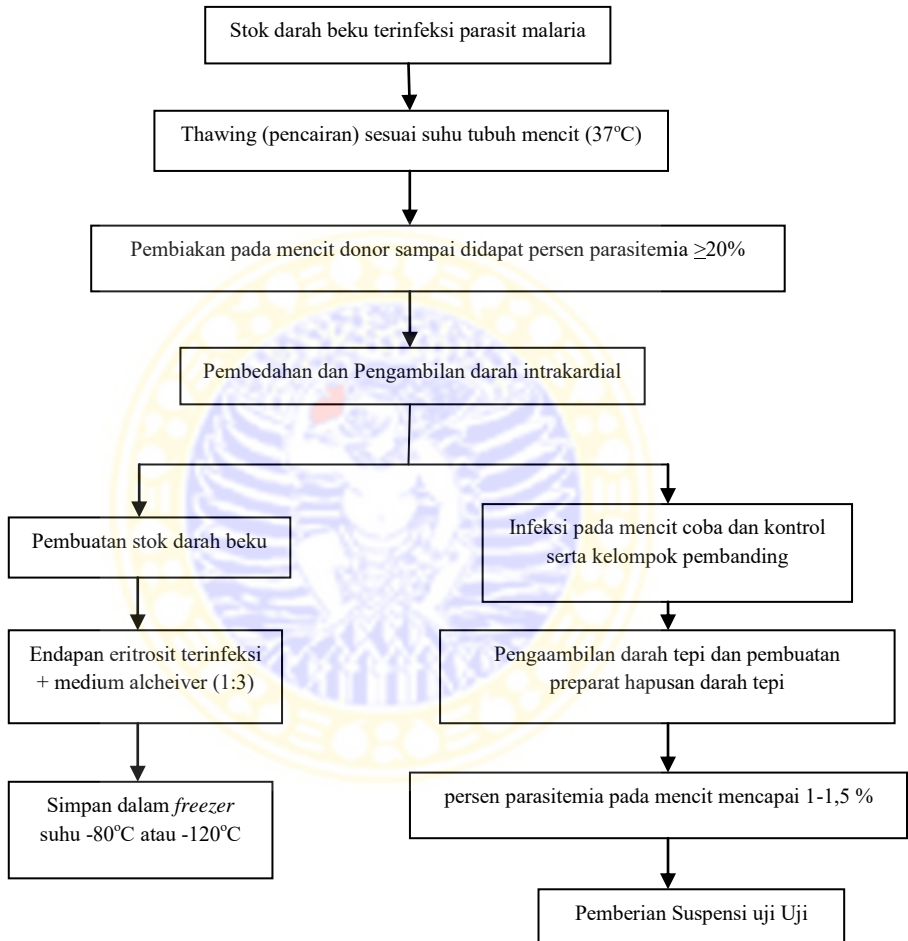
#### 4.5.2.3 Analisis data Enzim SGPT dan SGOT

Analisis data SGPT dan SGOT dilakukan dengan metode ANOVA *one way* untuk masing-masing perlakuan, kemudian dilanjutkan uji Tukey untuk mengetahui tingkatan yang terbaik antar kelompok.



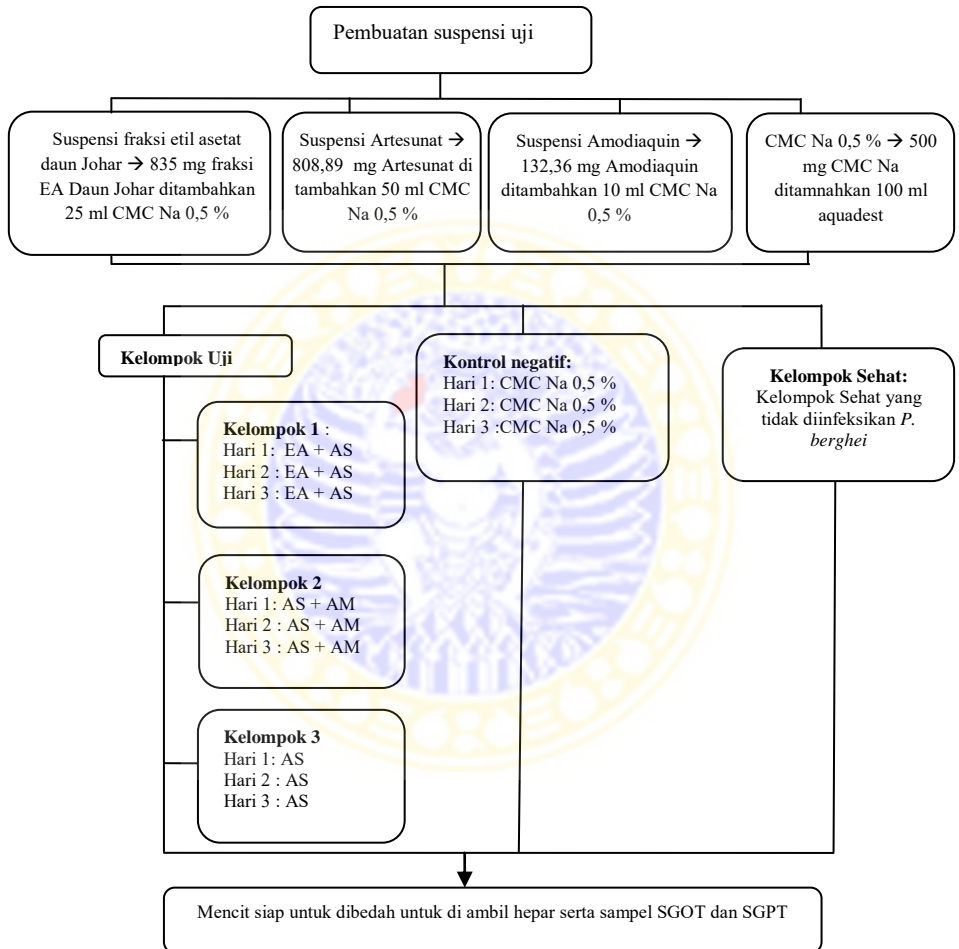


## Rancangan Penyiapan Parasit dan Pelaksanaan Uji Aktivitas Antimalaria



Gambar 4.1 Rancangan Penyiapan Parasit dan Pelaksanaan Uji Aktivitas Antimalaria

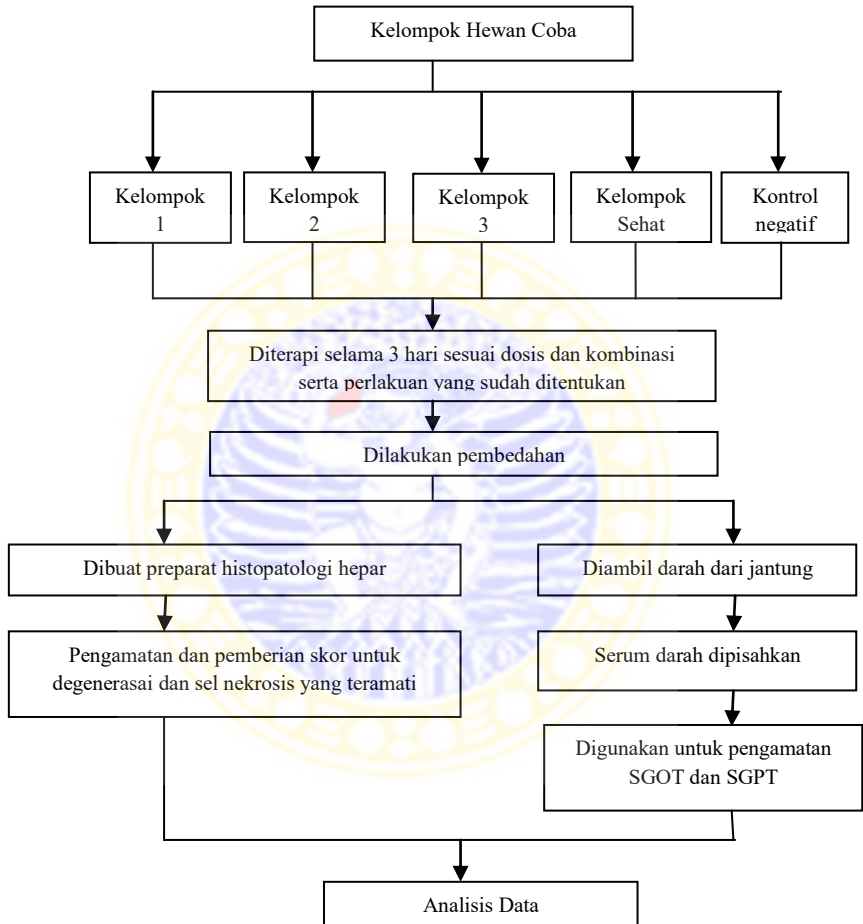
## Rancangan Pemberian terapi pada berbagai macam kombinasi Fraksi EA *C. siamea* dan artesunat



Gambar 4.2 Rancangan Pemberian terapi pada berbagai macam kombinasi Fraksi EA *C. siamea* dan artesunat

**Rancangan Penelitian uji pengaruh kombinasi fraksi etil asetat daun johar dengan artesunat pada hepar mencit yang terinfeksi**

*P.berghei*



Gambar 4.3 Rancangan Penelitian uji pengaruh kombinasi fraksi etil asetat daun johar dengan artesunat pada hepar mencit terinfeksi *P. berghei*