

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang penelitian hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Penelitian berlangsung pada bulan September sampai Oktober 2014.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan selama penelitian ini adalah hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan sebanyak 30 ekor umur 8-10 minggu dengan berat badan antara 20-30 gram, Bahan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), pakan mencit berupa pellet medicated 593 produksi PT. Charoen Pokphand Indonesia, vehiculum, dan *chloroform*.

Pemeriksaan penghitungan total dan hitung jenis leukosit, digunakan bahan antara lain EDTA sebagai antikogulan, larutan pengencer Turk, pewarna Wright, dan minyak emersi.

3.2.2 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah baskom plastik, penyaring *Buchner* dan pompa *vacuum*, *rotavapor*, labu pisah, gelas ukur,

kertas saring, alu dan mortir, gelas pengaduk, toples kaca. Peralatan lain yang digunakan selama penelitian ini adalah kandang mencit berserta tempat makan dan minum, spuit 1 ml untuk pemberian perlakuan dan pengambilan darah, sonde, *disposable hand gloves*, gelas ukur 100 ml, tabung erlenmeyer, kamar pendingin, alat tulis. Alat-alat yang digunakan untuk penghitungan leukosit meliputi: 25 buah tabung reaksi dan rak, pipet leukosit, gelas objek, *cover glass*, kamar penghitung *improved neubeuer*, mikroskop *binokuler* (Olympus CX41) dan *blood cell counter*.

Stres panas digunakan ruangan tertutup berventilasi dengan ukuran panjang 130 cm, lebar 75 cm, dan tinggi 50 cm yang terbuat dari papan kayu. Sebagai sumber panas digunakan dua bola lampu pijar di masing-masing kandang dengan kekuatan masing-masing sebesar 40 watt.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan ekstrak daun jambu biji dan daun sambiloto

Proses ekstraksi daun sambiloto dan daun jambu biji dilakukan secara terpisah. Selanjutnya daun sambiloto dan daun jambu biji secara terpisah dikeringkan dalam ruang tertutup dengan temperatur kamar 27,5 °C dan tidak terkena sinar matahari langsung, ini bertujuan supaya zat yang terkandung tidak terurai. Setelah kering dilakukan penimbangan untuk mengetahui susutnya berat basah setelah pengeringan, pada jambu biji didapatkan berat susut 6 kg dari 7 kg berat basah dan pada sambiloto dari 8 kg berat basah didapatkan berat susut 7 kg. Selanjutnya dibuat serbuk halus dengan blender dan dilakukan pengayakan, lalu

dilakukan penimbangan kembali. Pada jambu biji didapatkan berat serbuk 1,2 kg sedangkan pada sambiloto didapatkan berat serbuk 1,5 kg. Masing-masing serbuk halus tanaman tersebut dilakukan maserasi menggunakan 1,5 liter etanol 96%, perendaman dilakukan di dalam toples selama 24-48 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, supaya prosesnya cepat dan efisiensi waktu dibantu menggunakan pompa vacum. Hasil saringan berupa cairan yang sudah terlihat bening dilakukan penguapan dengan mensin penguap (evaporator) dengan suhu 50-55 °C sampai pada akhirnya menjadi ekstrak kental. Hasil akhir dari ekstrak daun jambu biji sebanyak 70 gram dan pada daun sambiloto didapatkan 85 gram. Cairan kental dari masing-masing daun tersebut disebut dengan ekstrak etanol daun sambiloto dan ekstrak etanol daun jambu biji.

3.3.2. Dosis kombinasi ekstrak daun jambu biji dan ekstrak daun sambiloto

Berdasarkan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap sambiloto, guna untuk memperbaiki kondisi tubuh manusia dalam bentuk serbuk/bubuk yang dikemas dalam kapsul biasanya menggunakan dosis 500 mg dipakai 3 kali sehari, atau 1.500 mg per hari, sedangkan jambu biji yang digunakan untuk meningkatkan trombosit pada penderita DHF dengan dosis 500 mg diberikan 4 kali sehari atau 2.000 mg per hari.

Dosis obat yang dipakai pada manusia (70 kg) dikonversikan pada hewan coba mencit (20 gram) sebesar 0,0026, sehingga dosis ekstrak sambiloto pada mencit dengan berat badan 20 gram adalah $70/50 \times 1500 \text{ mg} \times 0,0026 = 5,46 \text{ mg}$ per 20 gram per hari, sedangkan dosis ekstrak daun jambu biji adalah $70/50 \times 2000 \text{ mg} \times 0,0026 = 7,28 \text{ mg}$ per 20 gram per hari.

Karena dosis yang diberikan berupa kombinasi maka digunakan perbandingan antara ekstrak daun sambiloto dan ekstrak daun jambu biji sebagai berikut. Dosis untuk ekstrak sambiloto adalah $25\% \times 5,46 = 1,36$ mg, $50\% \times 5,46 = 2,73$ mg, $75\% \times 5,46 = 4,09$ mg, sedangkan dosis untuk ekstrak daun jambu biji adalah $25\% \times 7,28 = 1,82$ mg, $50\% \times 7,28 = 3,64$ mg, $75\% \times 7,28 = 5,46$ mg. Masing-masing perlakuan diberikan 0,5 ml per ekor dari perbandingan dosis kombinasi dan dibuat dalam bentuk sediaan obat (BSO) cair jenis suspensi dengan larutan CMC Na 0,5 % sebagai suspensator dan untuk prosedur pembuatannya terlampir pada lampiran 1.

3.3.3 Perlakuan stres panas

Mencit diberi perlakuan stres panas selama 30 menit, kemudian diistirahatkan selama 15 menit. Setelah istirahat, mencit kembali diberi perlakuan stres panas selama 30 menit. Perlakuan diberikan pada hari ke-8 sampai ke-10, dilakukan 2 kali dalam satu harinya (Isnaeni, 2011) tepatnya pada pukul 09.00-10.15 sesudah dan saat diberi kombinasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) secara intensif. Suhu yang digunakan dalam perlakuan ini adalah 39-40 °C (Settivari, 2007). Mencit dikandangan dalam lima kandang terpisah, masing-masing kandang terdiri dari 6 ekor terdiri dari 5 ekor mencit utama dan 1 ekor sebagai cadangan.

3.3.4 Pemberian kombinasi ekstrak daun jambu biji dan ekstrak daun sambiloto

Kombinasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) diberikan secara per oral dengan sonde pada pagi hari pukul 09.00 selama 10 hari termasuk perlakuan stres panas

pada hari ke-8 sampai ke-10. Setiap 1 ekor mencit diberikan perlakuan sebanyak 0,5 ml. Hal ini dilakukan mengingat salah satu fungsi peran obat herbal sebagai tindakan preventif dan promotif terhadap agen yang dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh.

3.3.5 Pengambilan sampel darah pada mencit

Sampel darah diambil dari jantung (*intracardia*) mencit yang sebelumnya diberi chloroform untuk tujuan menghilangkan kesadaran, dengan menggunakan spuit 1 ml. Sampel yang diambil sebanyak kira-kira 1 ml. Darah tersebut kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diberi antikoagulan EDTA di dalamnya, kemudian digoyang hingga tercampur rata.

3.3.6 Pemeriksaan total dan hitung jenis leukosit mencit

Pemeriksaan total dan hitung jenis leukosit mencit dilakukan menggunakan sampel darah yang telah diberi antikoagulan EDTA. Pemeriksaan total leukosit dilakukan dengan cara darah diencerkan dengan pelarut Truk dengan menggunakan pipet leukosit. Lalu darah yang telah diencerkan diisikan ke kamar penghitung "*improved Neubauer*". Selanjutnya dilakukan penghitungan total leukosit menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x (Bijanti dkk, 2010).

Pemeriksaan hitung jenis leukosit dilakukan dengan cara darah yang telah diberi EDTA dibuat preparat hapusan darah. Lalu preparat hapusan darah diwarnai dengan menggunakan pewarnaan Wright. Setelah itu pemeriksaan jenis leukosit dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x (Theml *et al.*, 2004) dengan diberi sedikit minyak emersi pada gelas objek.

Pemeriksaan total dan hitung jenis leukosit juga diujikan pada Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya untuk mendapatkan hasil yang terpercaya dan objektif. Mengingat Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya sudah menggunakan teknologi mesin seperti Roller-mixer, sysmex XT-2000i dan sistem komputerisasi dalam pengerjaan sampel.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan penentuan jumlah hewan coba mencit didasarkan pada rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$. Jumlah perlakuan 5 kelompok maka didapatkan jumlah mencit yang digunakan untuk ulangan adalah sebanyak 4,7 dibulatkan menjadi 5 ekor.

Menghindari kematian bukan akibat perlakuan maka ditambah 20% ulangan tiap kelompok perlakuan. Maka $20\% \times 5 \text{ ekor} = 1 \text{ ekor}$, sehingga seluruh ulangan tiap kelompok perlakuan sebanyak 6 ekor. Kondisi lingkungan, bahan, dan media relatif seragam, dengan perbedaan terletak pada perlakuan.

3.5 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa variabel, antara lain:

1. Variabel bebas, yaitu dosis kombinasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), stres panas, serta waktu pemeriksaan leukosit.
2. Variabel tergantung, yaitu total leukosit dan hitung jenis leukosit mencit.

3. Variabel terkontrol, yaitu jenis kelamin mencit, berat badan, umur, pakan, dan kondisi lingkungan mencit.

3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji F menggunakan ANAVA (Analisis Variasi) satu arah dengan tingkat kesalahan 5% untuk menentukan adanya perbedaan pada perlakuan. Apabila telah diketahui terdapat perbedaan maka dilakukan Uji Tukey untuk menentukan perlakuan mana yang paling efektif terhadap hasil perhitungan leukosit mencit.

3.7 Skema Penelitian

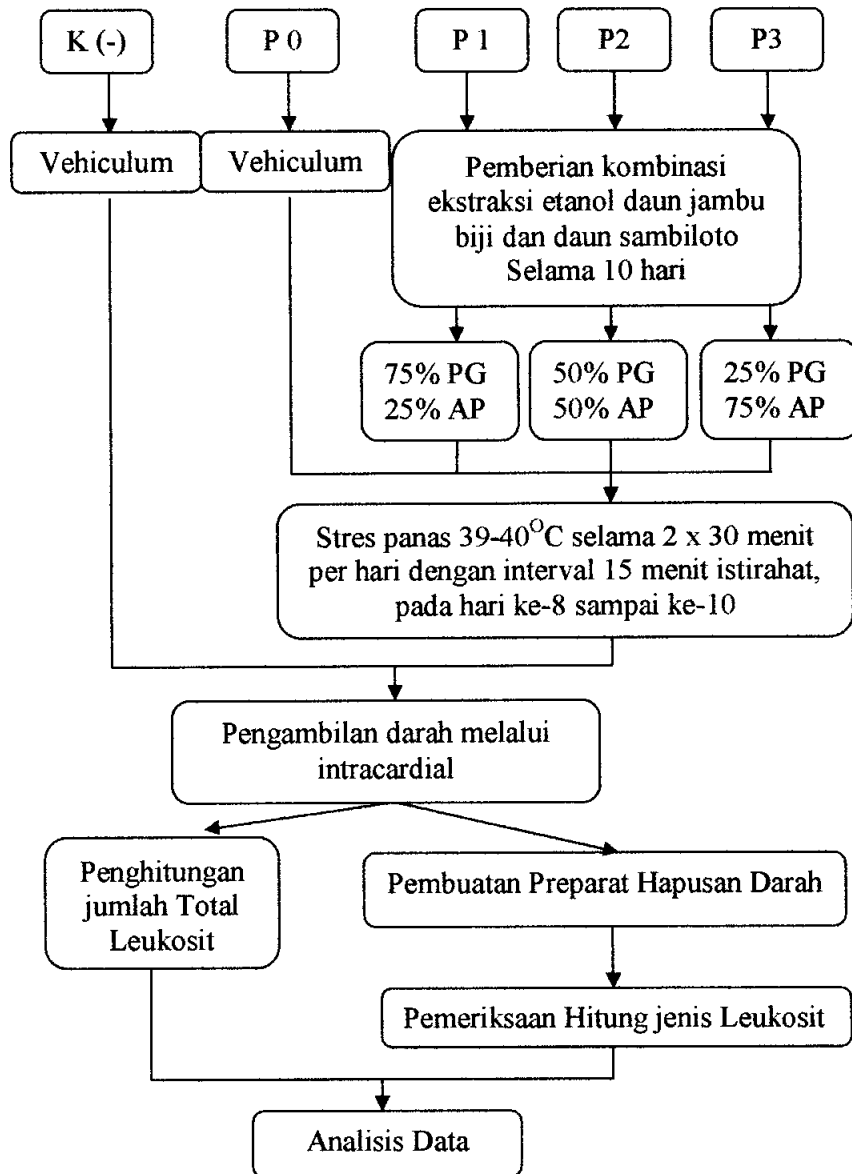
Sebanyak 30 ekor mencit dibagi ke dalam 5 kelompok secara acak, tiap-tiap kelompok terdiri dari 5 ekor dan 1 ekor sebagai cadangan. Pembagian kelompok tersebut adalah sebagai berikut:

1. K (-) : Kelompok ini diberi larutan vehiculum sebanyak 0,5 ml /ekor/hari/po selama 10 hari, dan tanpa diberi perlakuan stres panas.
2. P0 : Kelompok ini diberi larutan vehiculum sebanyak 0,5 ml /ekor/hari/po selama 10 hari, dan diberi perlakuan stres panas pada hari ke-8 sampai ke-10.
3. P1 : Kelompok ini diberi kombinasi sebanyak 0,5 ml/hari/po yang terdiri dari 75% dosis daun jambu biji dan 25% dosis daun sambiloto selama 10 hari, dan diberi perlakuan stres panas pada hari ke-8 sampai ke-10.

4. P2 : Kelompok ini diberi kombinasi sebanyak 0,5 ml/hari/po yang terdiri dari 50% dosis daun jambu biji dan 50% dosis daun sambiloto selama 10 hari, dan diberi perlakuan stres panas pada hari ke-8 sampai ke-10.
5. P3 : Kelompok ini diberi kombinasi sebanyak 0,5 ml/hari/po yang terdiri dari 25% dosis daun jambu biji dan 75% dosis daun sambiloto selama 10 hari, dan diberi perlakuan stres panas pada hari ke-8 sampai ke-10.

Pengamatan dilakukan setelah perlakuan berakhir, yaitu pada hari ke-11 setelah dilakukan pemberian imunomodulator dan stres panas. Pemeriksaan dilakukan terhadap lima ekor mencit pada masing-masing kelompok.

3.7.1 Bagan penelitian

**Keterangan :**PG = *Psidium gujava L.*AP = *Andrograis Paniculata*

Gambar 3.1 Bagan Penelitian