

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test control group design*.

#### **B. Subjek Penelitian**

Subjek penelitian mencit (*Mus musculus*) berkelamin jantan, galur *Swiss Webster* usia 2-3 bulan dengan berat badan 20 gram, berjumlah 30 ekor yang di acak menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 5 ekor subjek. Subjek didapat dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Perhitungan besar sampel tiap kelompok yang digunakan dapat dihitung dengan rumus Federel (Federel, 1963) :

$$\text{Rumus Federer} = (n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n : jumlah subjek tiap kelompok penelitian.

t : Jumlah kelompok dalam peneliti

sehingga perhitungan banyaknya subjek penelitian :

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel tiap kelompok pada penelitian ini sebanyak 5 ekor mencit ( $n \geq 4$ ) dan ada 6 kelompok perlakuan. Sehingga dalam penelitian ini membutuhkan 30 mencit dari populasi yang ada.

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil mencit yang memiliki genetik dan sifat yang sama. Hal ini dilakukan untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan. Pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan berat badan sebelum dan sesudah perlakuan. Kemudian dibagi menjadi enam kelompok secara *Simple Random Sampling* yaitu kelompok.

1. Kelompok I : Kontrol normal (tanpa pemberian alkohol dan perlakuan).

2. Kelompok II : Kontrol negatif (tanpa perlakuan).
3. Kelompok III : Kontrol positif (terapi prednisolon 0,1044 mg/kgBB).
4. Kelompok IV : Perlakuan ekstrak *C. Asiatica* 55 mg/kgBB.
5. Kelompok V : Perlakuan ekstrak *C. Asiatica* 110 mg/kgBB.
6. Kelompok VI : Perlakuan ekstrak *C. Asiatica* 220 mg/kgBB.

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 3 bulan ( february-april ) yang bertempat di :

1. Pemeliharaan dan perawatan dilakukan di Laboratorium PAU Pasca Sarjana Universitas Gadjja Mada.
2. Pengamatan, penilaian, dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas : Perlakuan dan dosis ekstrak *Centela asiatica* masing masing 55mg/kgBB, 110mg/kgBB dan 220mg/kgBB.
2. Variabel tergantung : Pengamatan Berat dan Volume hepar
3. Variabel terkendali:

- a. Subyek penelitian adalah Mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss webster* (umur 2-3 bulan dan berat  $\pm 20$  gram).
- b. Faktor genetik menggunakan mencit satu galur yaitu dari galur *Swiss webster* dan proses pengambilan menggunakan randomisasi.
- c. Kondisi pakan dan kandang sama.

## **E. Definisi Operasional**

### **1. Mencit Hepatitis Alkoholik**

Mencit Hepatitis Alkoholik adalah mencit yang diinduksi dengan alkohol 14,7% sebanyak 1,12 mg/20gBB peroral 1 kali sehari selama 21 hari (Prasetyo,2010).

### **2. Ekstrak daun pegagan (*Centela asiatica*)**

Ekstrak daun pegagan didapatkan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 80%. Daun pegagan didapatkan dari pasar Bringharjo yang dikeringkan dengan sinar matahari.

Ekstrak *Centela asiatica* diberikan dengan dosis 55mg/kgBB pada kelompok perlakuan III, 110mg/kgBB pada kelompok perlakuan IV, dan 220mg/kgBB pada kelompok V. Pemberian semua perlakuan dilakukan selama 21 hari (Syifaiyah, 2008).

### **3. Alkohol**

Alkohol yang digunakan termasuk dalam jenis anggur merah dengan merk Orang Tua dengan kadar 14,7%. Alkohol diberikan sebanyak 1,12 mg/kg BB peroral 1 kali, sehari selama 21 hari.

#### **4. Pengamatan Makroskopis**

Berat dan volume hepar mencit yang telah diinduksi alkohol selama 21 hari menjadi subjek pengamatan dan penilaian yang diamati, lalu diukur untuk melihat ada atau tidaknya perubahan pada berat dan volume.

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

Bahan penelitian pada penelitian kali ini adalah bahan untuk maserasi berupa simplisia daun pegagan (*Centela asiatica*), mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss webster* umur 2-3 bulan dan berat  $\pm 20$  gram, pakan dan minum, alkohol 14,7 %, aquades, prednisolon, etanol 80% untuk pembuatan ekstrak, formalin 10% untuk pengawetan organ hepar.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, Blender, Kain saring, Tabung, Saringan, Sonde, Pipet, Gelas kaca, SPUIT, tabung kecil untuk organ hepar, kapas, kandang mencit diberi kode.

#### **G. Jalannya Penelitian**

##### **1. Pembuatan ekstrak *Centela asiatica***

Daun *Centela asiatica*. dibuat ekstrak etanol menurut penelitian sebelumnya dengan cara sebagai berikut :

- a. Daun *Centela asiatica* kering disiapkan sebanyak 10kg.

- b. Daun *Centela asiatica* kering dihaluskan dengan blender menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia.
- c. Simplisia ditimbang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 80% dengan perbandingan simplisia : etanol 80% = 1 : 10 pada suhu ruangan selama 5 x 24 jam sambil sesekali diaduk sampai semua komponen terekstraksi.
- d. Setelah 24 jam, ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung pada toples kaca. Sisa bahan penyaringan direndam lagi dengan etanol (remaserasi) selama 2 x 24 jam, sama seperti perendaman yang dilakukan sebelumnya.
- e. Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring.
- f. Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam *water bath*. Hasil penguapan berupa ekstrak kental ditimbang dan dicatat berapa gram hasilnya.

## 2. Pengelompokan hewan uji.

Sebanyak 30 ekor mencit ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, yaitu : kelompok I sebagai kelompok kontrol normal (tanpa induksi alkohol dan tanpa perlakuan), kelompok II sebagai kontrol negatif (alkohol), kelompok III sebagai kontrol positif (Prednisolon), dan kelompok IV, V dan VI sebagai kelompok ekstrak *Centela asiatica* masing masing 55 mg/kgBB, 110 mg/kgBB dan 220 mg/kg BB.

## 3. Induksi *Alcoholic liver disease* ( ALD ).

Induksi alkoholik dilakukan dengan pemberian anggur merah 14,7% sebanyak 1,12 mg/20gBB peroral 1 kali sehari selama 21 hari. (Prasetyo, 2011)

#### 4. Pemberian perlakuan ekstrak *Centela asiatica*

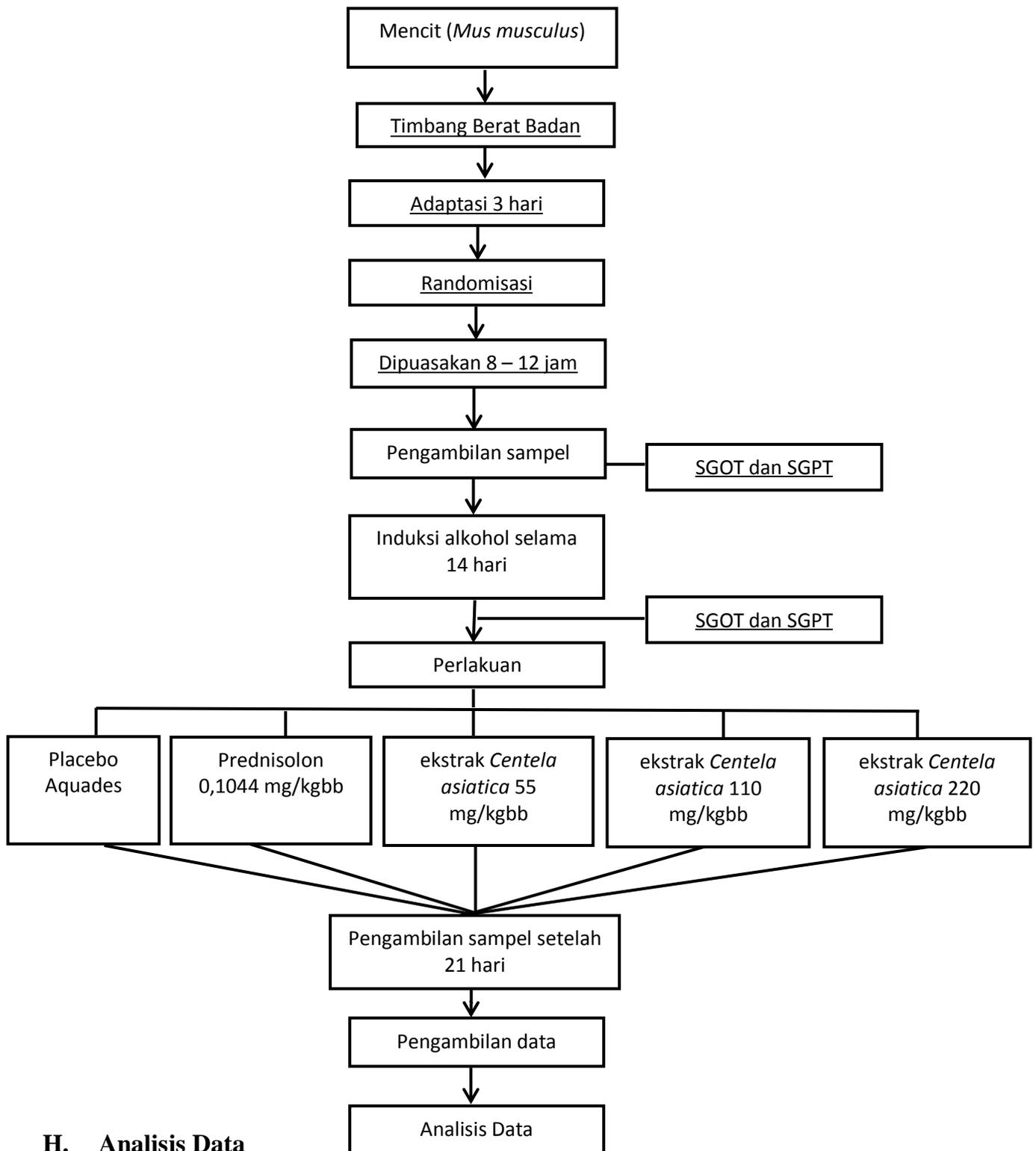
Setelah diinduksi alkohol mencit diberi perlakuan sesuai kelompoknya secara peroral. Kelompok I dibiarkan tanpa perlakuan dan tanpa pemberian alkohol, kelompok II diberi alkohol tanpa pengobatan, kelompok III diberi prednisolon 0,1044 mg/kgBB/hari/mencit, kelompok IV diberi ekstrak *Centela asiatica* 55 mg/kgBB/hari/mencit, kelompok V diberi ekstrak *Centela asiatica* 110 mg/kgBB/hari/mencit dan kelompok VI diberi ekstrak *Centela asiatica* 220 mg/kgBB/hari/mencit. Pemberian semua perlakuan dilakukan selama 21 hari. (Syifaiyah, 2008)

#### 5. Pengecekan SGOT SGPT.

Pengambilan sampel kadar SGOT dan SGPT dilakukan 2 kali. Sebelum diinduksi alkohol dan setelah diinduksi alkohol selama 21 hari dan setelah 21 hari pemberian perlakuan ekstrak daun pegagan (Syifaiyah, 2008)

#### 6. Pengambilan jaringan hepar.

Pengambilan jaringan hepar dilakukan setelah 21 hari pemberian perlakuan. Preparat hepar dibuat dari hepar mencit yang sebelumnya sudah dientusiasia dengan cara dislokasi vertebra cervicalis dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung kecil berukuran 3 kali ukuran hepar. Sampel hepar diawetkan dengan formalin sebelum dibuat menjadi preparat.



## H. Analisis Data

Data hasil pe **Gambar 3.1. Alur Penelitian** epar secara makroskopik menggunakan uji norma... analisis data menunjukkan hasil

abnormal maka analisis data dilanjutkan dengan menggunakan metode *statistik Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*.

## **I. Etika Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Mencit jantan galur *Swiss webster* umur 2-3 bulan dengan berat  $\pm 20$  gram yang tidak lepas dari perlindungan hak mencit sebagai makhluk hidup dan sudah mendapatkan surat keterangan kelayakan etik penelitian. Penelitian ini dilakukan bersama dengan Ninin Khoirunnisa AS yang telah mendapat izin komisi etik FKIK UMY dengan nomor 330/EP-FKIK-UMY/VII/2015. Selama penelitian, hewan uji dirawat dan diperlakukan sesuai etika penelitian. Saat akhir penelitian diperlukan pengambilan hepar mencit, maka mencit dibunuh dengan cara dislokasi vertebra cervicalis.