

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *pre test 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. Subjek di pelihara di Laboratorium PAU Pasca Sarjana Universitas Gadjra Mada dengan pencahayaan yang cukup yaitu dengan perbandingan 50:50, siang hari terang dan malam hari gelap dengan suhu ruangan 20-25 derajat celcius dan makanan yang diberikan jenis AD 2. Ukuran kandang panjang 20 cm lebar 12 cm dan tinggi 15 cm dan dalam 1 kandang terdapat 5 subjek.

Perhitungan besar sampel tiap kelompok yang digunakan dapat dihitung dengan rumus Federel :

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

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 perlakuan apapun.
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

#### 1. Lokasi

Laboratorium PAU Pasca Sarjana Universitas Gadjra Mada sebagai tempat pemeliharaan dan pemberian perlakuan terhadap subjek penelitian, pembuatan ekstrak etanol *Centela asiatica*, tempat penimbangan obat dan ekstrak etanol *Centela asiatica*, sesuai dosis yang telah ditentukan dan sebagai tempat pengukuran kadar SGPT dan SGOT mencit (*Mus musculus*).

#### 2. Waktu

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama tiga bulan dari bulan Januari sampai April 2013.

### A. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Perlakuan dan dosis ekstrak *Centela asiatica* masing masing 55mg/kgBB, 110mg/kgBB dan 220mg/kgBB.
2. Variabel tergantung : Pengamatan hasil tes indikator SGOT dan SGPT.
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). dengan parameter peningkatan kadar SGOT dan SGPT yang diambil dari vena orbita dan diukur menggunakan spektrofotometer.

### **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/kgBB peroral 1 kali sehari selama 21 hari

### 4. Indikator SGOT dan SGPT

Indikator hepatitis alkoholik adalah serum SGOT dan SGPT. Pengambilan sampel kadar SGOT dan SGPT dilakukan 3 kali. Sebelum diinduksi alkohol, setelah diinduksi alkohol selama 21 hari dan setelah 21 hari pemberian perlakuan. Pengambilan serum dilakukan pada pembuluh darah vena mata diukur menggunakan spektrofotometer dan diuji menggunakan *pretest posttest control group design*.

## A. Alat dan Bahan Penelitian

1. Bahan : Alkohol 14,7 %, Aquades, Prednisolon, Plasma darah Puasa menciit, Daun Pegagan (ekstrak *Centela asiatica*), Etanol 80%, Larutan Na-CMC 0,5%.
2. Alat : Neraca analitik, Blender, Kain saring, Tabung, Saringan, Sonde, Pipet, Gelas kaca, Spuit, Spektrofotometer.

## B. Jalanya 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 (tanpa perlakuan), kelompok III sebagai kontrol positif (Prednisolon),

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 ).

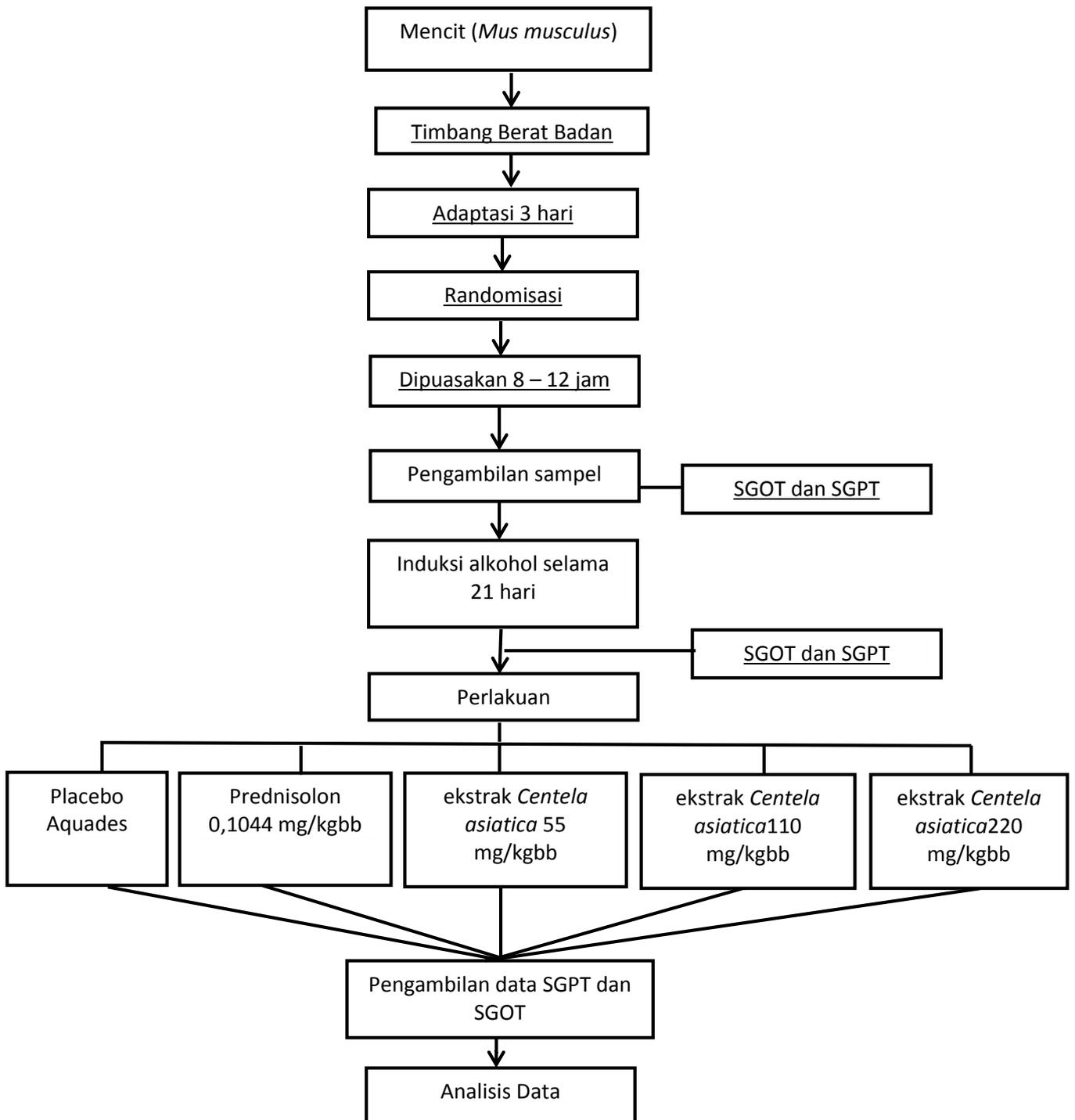
Induksi alkoholik dilakukan dengan pemberian anggur merah 14,7% sebanyak 1,12 mg/20gBB peroral 1 kali sehari selama 21 hari (Prasetyo, 2010).

4. Pemberian perlakuan ekstrak *Centela asiatica*

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

5. Pengambilan data.

Pengambilan sampel kadar SGOT dan SGPT dilakukan 3 kali. Sebelum diinduksi alkohol, setelah diinduksi alkohol selama 21 hari dan setelah 21 hari pemberian perlakuan ekstrak daun pegagan (Syifaiyah, 2008).



Gambar 8. Jalannya Penelitian

### C. Analisis Data

Data hasil pengamatan kadar serum SGOT dan SGPT, diuji adanya perbedaan yang signifikan antara sebelum dan sesudah induksi alkohol serta sebelum dan sesudah induksi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan Paired T-Test.

Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* karena subyek  $\leq 50$ . Distribusi dan normalitas data adalah normal sehingga dilanjutkan analisis menggunakan *one way ANOVA*. Dilanjutkan dengan uji rata-rata *Tuckey*.

### 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 nomor 535/EP-FKIK-UMY/I/2016. Selama penelitian, hewan uji dirawat dan diperlakukan sesuai etika penelitian.

