

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan metode acak terkontrol menggunakan *post test only controlled group design* (Notoatmodjo, 2012). Pada penelitian ini 25 ekor tikus putih galur *Sprague Dawley* berumur 2–3 bulan yang dipilih secara random yang dibagi menjadi 5 kelompok .

#### **B. Tempat dan Waktu**

Pengambilan tanaman uji dilakukan di Bandar Lampung. Sedangkan pengolahan tanaman dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung. Dan pengelolaan tikus putih dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

#### **C. Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas (*independent variable*) adalah ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*).
2. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah gambaran histopatologi hepar tikus putih galur *Sprague Dawley*.

#### D. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit galur *Sprague dawley* berumur 2–3 bulan yang diperoleh dari laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi kedalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

Menurut Supranto (2000), rumus penentuan sample untuk uji eksperimental, yakni  $(t-1)(n-1) \geq 15$ . Dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok perlakuan, dan  $n$  adalah jumlah pengulangan atau sample setiap kelompok, nilai  $n$  sama dengan 5 kali.

Cara pengambilan sampel untuk penelitian eksperimental, dengan menggunakan Supranto (2000) :

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

$t$  : jumlah kelompok

$n$  : jumlah sampel

Pada penelitian kali ini terdapat 4 kelompok, sehingga

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

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

$$(n-1) \geq 3,75$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n \geq 4,75$$

Sehingga jumlah sampel yang diambil adalah dibulatkan menjadi 5.

## **E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

Sampel yang di ambil harus memiliki kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Memiliki berat badan antar 180–220gr
2. Jenis kelamin jantan
3. Berusia sekitar 2–3 bulan

Adapun kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memiliki penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif.
2. Keluarnya eksudat yang tidak normal darimata, mulut, anus, genital setelah masa adaptasi.
3. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10 % setelah masa adaptasi di laboratorium

## **F. Alat dan Bahan**

Untuk mendukung terlaksananya penelitian ini, penulis menggunakan alat dan bahan, sebagai berikut :

### **1. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu etanol dengan dosis 10ml/kgBB dan ekstrak daun binahong dengan dosis 50 mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB. Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi dengan metode paraffin meliputi : Larutan Formalin 10% untuk fiksasi, garam fisiologis NaCl (0,9%), alkohol teknis, tolulol,

xylol, paraffin dengan titik cair 50–55 derajat celcius, pewarnaan Haematoxylin dan eosin Y, akuades, Meyer's albumin, enthelen.

## 2. Alat penelitian

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g untuk menimbang berat tikus
- 2) Sduit oral 1 cc
- 3) Mikropipet
- 4) Gunting minor set, untuk membedah perut mencit (laparotomi)
- 5) Kapas dan alkohol

## 3. Alat pembuat preparat histologi

Adapun alat pembuat preparat histologi adalah mikrotom, *waterbath*, *embedding cassette*, *cover glass* dan kaca preparat.

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*)

Pembuatan ekstrak dilakukan di laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak diawali dengan menyediakan daun binahong. Masing masing sampel tersebut dicuci bersih kemudian dikeringkan, selanjutnya digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan kemudian ditimbang, serbuk tersebut diekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut.

Buat ekstrak dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai yang dapat menyaring sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Jika tidak dinyatakan lain gunakan etanol 70% (Depkes, 2009).

Masukan satu bagian serbuk simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya duaa kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama (Depkes, 2009).

Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 2009).

## **2. Prosedur Pemberian Etanol**

Dosis etanol yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil penelitian Chen (2010) yang telah membuktikan bahwa pemberian etanol 5g/kgBB selama 10 hari meyebabkan efek kerusakan yang signifikan pada hati.

Perhitungan volume pemberian etanol yaitu 1 gram etanol sama dengan 1 mL alkohol 100% . Jadi jika konsentrasi etanol dibuat 50% maka dalam 50% v/v 100 ml terdapat 50 gram etanol.

$$\text{Maka volume etanol } 5\text{g/kgBB} = 5\text{g} / 50\text{g} \times 100\text{mL} = 10\text{ml/kgBB}$$

### **3. Prosedur Pemberian Ekstrak Daun Binahong**

Dosis pada penelitian ini di daasarkan atas penelitian sebelumnya yaitu penelitian-penelitian Sukandar dkk. pada tahun 2010, 2011, dan 2013. Hasil dari penelitian-penelitian menunjukkan bahwa ekstrak binahong pada dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB memiliki efek terapeutik yang signifikan pada tubuh manusia, yaitu dapat menurunkan kadar glukosa darah, menurunkan kadar kreatinin darah yang diakibatkan kerusakan ginjal, memperbaiki gambaran histopatologi kerusakan pankreas dan juga memperbaiki gambaran histopatologis kerusakan ginjal.

Untuk itu digunakan pada penelitian ini digunakan ekstrak daun binahong dengan dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB tikus. Penentuan dosis untuk perlakuan ditetapkan atas rata-rata berat badan hewan uji.

### **4. Prosedur Perlakuan pada Tikus**

- a. Tikus sebanyak 20 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok.
- b. Selama satu minggu tiap-tiap kelompok tikus diadaptasikan sebelum diberi perlakuan.
- c. Mengukur berat badan tikus sebelum perlakuan.
- d. Melakukan perlakuan pada masing-masing kelompok :
  - Kelompok 1 sebagai kontrol normal, diberikan aquades (minum) dan pakan standar.
  - Kelompok 2 sebagai kontrol negatif, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah etanol dosis 10 ml/ kgBB.

- Kelompok 3 sebagai perlakuan coba, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 50 mg/kgBB kemudian selang 2 jam (hal ini dikarenakan 2 jam adalah waktu untuk pengosongan lambung) diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing–masing diberikan peroral selama 10 hari.
  - Kelompok 4 sebagai perlakuan coba, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 100 mg/kgBB kemudian selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing–masing diberikan peroral selama 10 hari.
  - Kelompok 5 sebagai perlakuan coba, diberikan aquades (minum) dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 200 mg/kgBB kemudian selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB. Masing–masing diberikan peroral selama 10 hari.
- e. Setelah 14 hari , perlakuan diberhentikan.
  - f. Lima tikus jantan dari tiap kelompok dinarkosis.
  - g. Dilakukan laparotomi, hati tikus diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin eosin.
  - h. Sampel hepar difiksasi dengan formalin 10%.
  - i. Dilakukan pengamatan terhadap preparat dengan parameter skoring Manja Roenigk.

## 5. Prosedur Pengambilan Sampel Organ Hati

Tikus dikeluarkan dari kandang dan diletakkan terpisah dengan tikus lainnya kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain, pemindahan, penanganan, gangguan antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kgBB + 5-10 mg/kgBB secara IP kemudian tikus di *euthanasi* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan di kedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013). Setelah itu dilakukan laparotomi, hati tikus diambil untuk sediaan mikroskopis.

## 6. Prosedur Pembuatan Preparat

### a. *Fixation*

- 1) Menfiksasi spesimen berupa potongan organ lambung yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%
- 2) Mencuci dengan air mengalir

### b. *Trimming/sampling*

- 1) Membuat irisan potongan lambung dengan ketebalan sebesar 3-5mm.
- 2) Memasukkan potongan organ lambung tersebut ke dalam *embedding cassette*.

3) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.

c. Dehidrasi

Berturut-turut melakukan perendaman organ lambung dalam alkohol bertingkat 80% selama 2 jam, 90% selama 2 jam, 95% selama 1 jam, alkohol absolut I selama 2 jam, alkohol absolut II selama 1 jam.

d. *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing-masing selama 30 menit.

e. Impregnasi

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu 65,1<sup>0</sup>C.

f. *Embedding*

- 1) Menuangkan paraffin cair dalam pan
- 2) Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan
- 3) Melepaskan paraffin yang berisi potongan lambung dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4-6<sup>0</sup> C beberapa saat.
- 4) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan *scapel*/pisau hangat
- 5) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing
- 6) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom

g. *Cutting*

- 1) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu
- 2) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron.
- 3) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- 4) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna
- 5) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan slide bersih dan menempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.
- 6) Mengeringkan *slide*. Jika sudah kering, slide dipanaskan untuk merekatkan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan.

h. *Staining* (pewarnaan) dengan harris Hematoxylin Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih slide yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut :

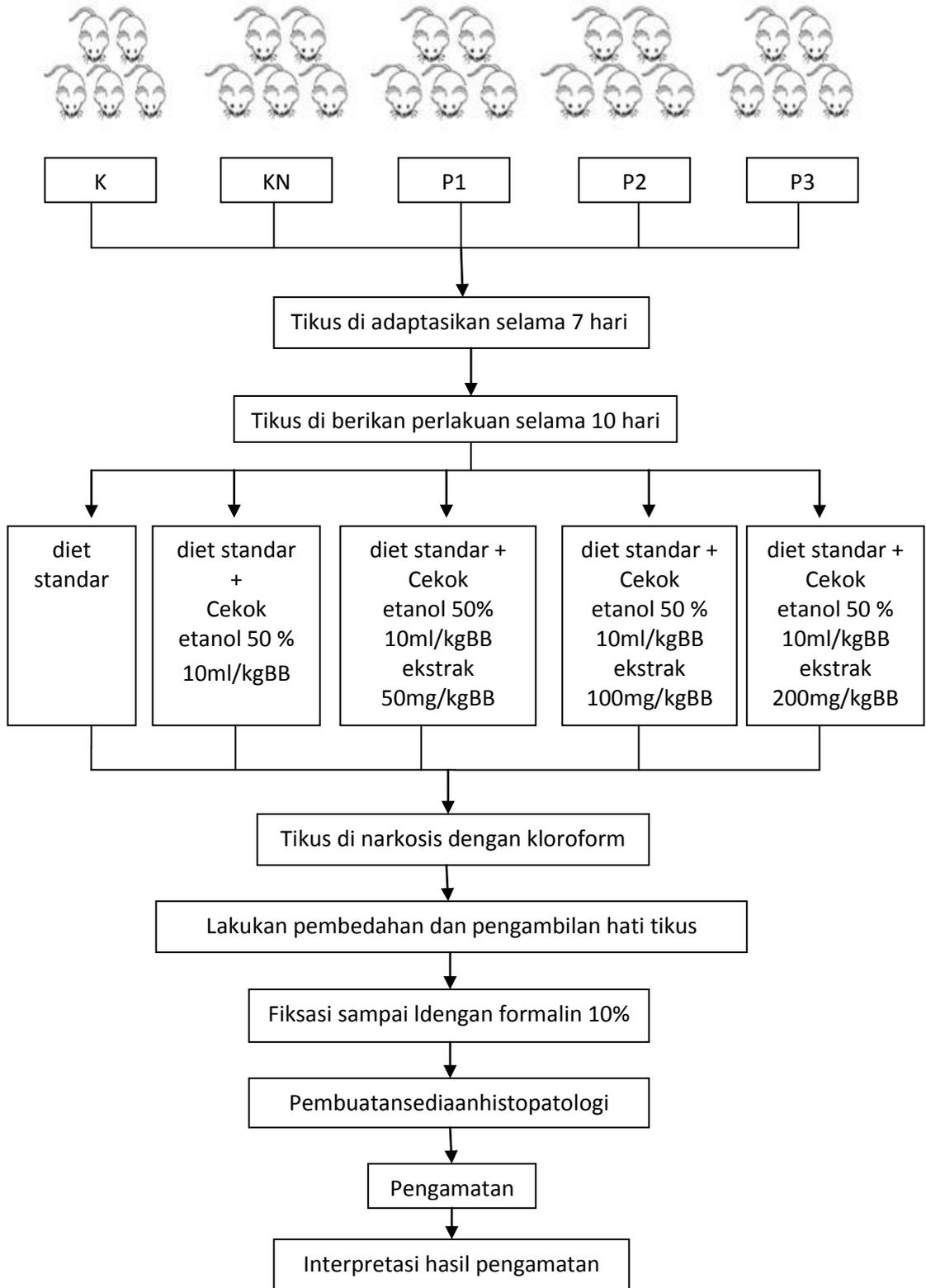
Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing–masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan dalam zat warna harris Hematoxylin selama 20 menit.

Kemudian memasukkan potongan organ dalam fosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, *alcohol absolute* III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

*i. Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan slide diatas kertas tisu pada tempat datar, meneteskan dengan mounting yaitu kanada balsam dan tutup dengan *cover glass* cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

### Timbang Berat Badan Tikus



**Gambar 8.** Diagram Alur Penelitian

## 7. Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

**Tabel 3.** Definisi Operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI	SKALA
1	Daun binahong	Daun binahong merupakan daun tunggal, helaian daun memiliki ujung runcing, pangkal berlekuk, tepi rata, permukaan licin, serta daging daun tipis lunak  Dosis ekstrak daun binahong Dosis I : 50mg/kgBB/hari Dosis I : 100 mg/kgBB/hari Dosis II : 200mg/kgBB/hari	Numerik
2	Gambaran histopatologi hati	Gambaran histopatologi hati tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop Tiap preparat jaringan hati dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan. Dinilai skor untuk setiap lapangan pandang. Dan dicari rerata skor untuk semua lapang pandang pada setiap tikus. Dengan sistem skoring sebagai berikut : 0 : Normal 1 : Bengkak keruh < 50 % 2 : Bengkak keruh > 50 % 3 : Nekrosis	Numerik

## H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan program analisis data. Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data akan dilakukan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel < 50. Jika varian data berdistribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan metode statistik *one way ANOVA* jika tidak dilakukan uji *Kruskal-Ailliss*. Hipotesis akan dianggap bermakna bila  $p < 0,05$  selanjutnya dilakukan uji *post hoc* LSD atau uji *Mann Whitney*.

## I. Ethical Clearance

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu  $(n-1) (t-1) \geq 15$ ,

dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
  - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.
  - c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih

untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).