

III.METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan metode acak terkontrol menggunakan *post test only controlled group design*. 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 aktivitas enzim ALT dan AST *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 sampel untuk uji eksperimental, yakni $(t-1)(n-1) \geq 15$. Dimana t merupakan jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan atau sampel 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

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \qquad n \geq 3,75 + 1$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15 \qquad n \geq 4,75$$

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

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 180–220 gram.
2. Jenis kelamin jantan.
3. Berusia sekitar 2–3 bulan.
4. Dinyatakan sehat.

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 yaitu

- Etanol dengan dosis 10ml/kgBB.
- Ekstrak daun binahong dengan dosis 50 mg/kgBB, 100mg/kgBB, 200mg/ kg BB.

- Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berasal dari IPB Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Mendapat pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

2. Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- Kandang hewan.
- Tempat pakan hewan.
- Tempat minum hewan.
- Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g untuk menimbang berat tikus.
- *Beaker glass*.
- Sonde lambung.
- *Disposable spuit 1cc*.
- *Handschoen*.
- Alat *centrifuge*.
- *Vacutainer SST (Yellow Top)*.
- Mikropipet.
- Tabung mikro.
- Kertas.
- Alkohol.
- Kamera digital.

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 dua 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 sebelumnya yang telah terbukti memiliki efek kerusakan signifikan pada hati. Pada penelitian Chen (2010), digunakan etanol dengan dosis 5g/kgBB.

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 Elin Yulinah *et al*, pemberian ekstrak etanol terhadap mencit dengan dosis 100mg/kgBB dan 200mg/kgBB dapat meminimalisir kerusakan organ dalam tikus akibat induksi bahan toksik. Untuk itu dalam penelitian ini digunakan dosis 100mg/kgBB dan 200mg/kgBB.

Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* berumur 8–12 minggu dengan berat 130g–1500g, untuk itu dilakukan penyesuaian dosis untuk sebagai berikut:

Konversi dosis 50mg/kgBB ke tikus dengan berat 130g dan 150g =

$$130\text{g} = 130/1000 \times 50\text{mg} = 6.5\text{mg}/130\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

$$150\text{g} = 150/1000 \times 50\text{mg} = 7.5\text{mg}/150\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

Konversi dosis 100mg/kgBB ke tikus dengan berat 180gr dan 220gr =

$$130\text{g} = 180/1000 \times 100\text{mg} = 13\text{mg}/130\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

$$150\text{g} = 150/1000 \times 100\text{mg} = 15\text{mg}/150\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

Konversi dosis 200mg/kgBB ke tikus dengan berat 180gr dan 220gr =

$$130\text{g} = 180/1000 \times 200\text{mg} = 26\text{mg}/130\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

$$150\text{g} = 150/1000 \times 200\text{mg} = 30\text{mg}/150\text{grBB tikus (satu ekor)}$$

4. Prosedur Perlakuan pada Tikus

- a. Tikus sebanyak 25 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 kontrol normal diberikan aquades (minum) dan pakan standar.
 - Kelompok kontrol positif, diberikan aquades pada hari 1–4, kemudian etanol dosis 10 ml/ kgBB pada hari 5–14 dan pakan standar.
 - Kelompok perlakuan 1 diberikan aquades dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 50 mg/kgBB pada hari 1–4. Pada hari 5–14 diberi ekstrak daun binahong dosis 50 mg/kgBB selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB.
 - Kelompok perlakuan 2 diberikan aquades dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 100 mg/kgBB pada hari 1–4. Pada hari 5–14 diberi ekstrak daun binahong dosis 100 mg/kgBB selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB.

- Kelompok perlakuan 3 diberikan aquades dan pakan standar ditambah ekstrak daun binahong dosis 200 mg/kgBB pada hari 1–4. Pada hari 5–14 diberi ekstrak daun binahong dosis 200 mg/kgBB selang 2 jam diinduksi etanol dosis 10 ml/kgBB.
- e. Setelah 14 hari perlakuan dihentikan.

- Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. Tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempat 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/kg + 5–10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)* menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua 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 tikus dipastikan mati, darah di ambil melalui jantung dengan menggunakan alat suntik sebanyak ± 2 cc, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST (Yellow Top)*

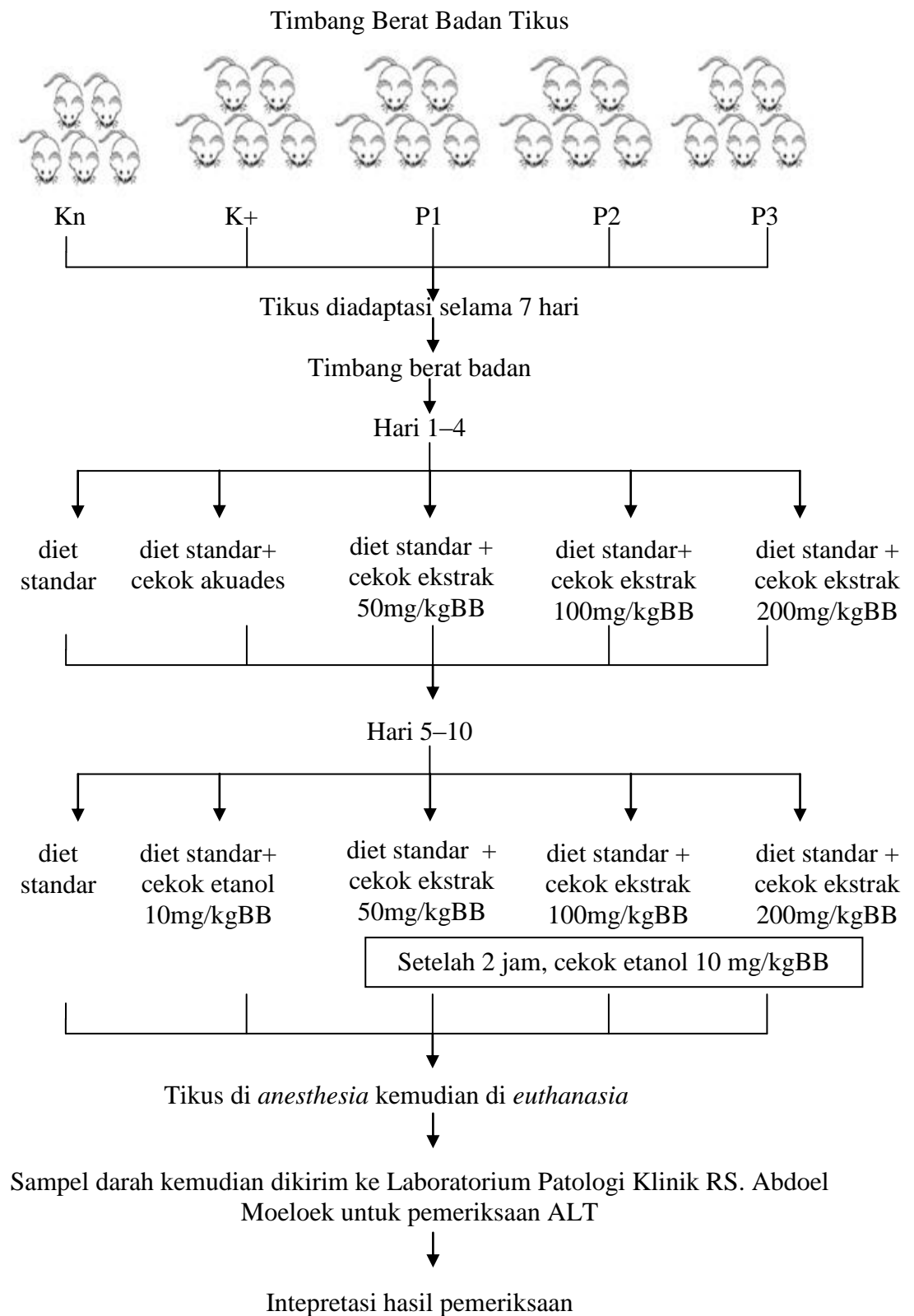
yang sudah berisi *clot activator* dan *inner separator*. Tikus kemudian dimusnahkan dengan cara dibakar.

- Cara Pembuatan Serum

Darah yang sudah berhasil didapatkan lalu dipusingkan selama 10–20 menit pada kecepatan 4000 rpm. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel–sel darah dengan menggunakan pipet sebanyak 200 μ L.

- Prosedur Pemeriksaan Aktivitas AST dan ALT

Pemeriksaan menggunakan alat *Chemistry Autoanalyzer DiagnosticCOBAS Integra 400 Plus*. Serum di analisis secara *spektrofotometri* absorbansi 340 nm dengan metode kinetik–*International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* dan pembacaan hasil secara otomatis oleh alat ini.



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian

5. Definisi Operasional

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

Tabel 1. Definisi Operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI	HASIL UKUR	SKALA
1	Daun binahong	Dosis ekstrak daun binahong Dosis I: 50 mg/kgBB/hari Dosis I: 100 mg/kgBB/hari Dosis II: 200 mg/kgBB/hari	mg/kg BB	Numerik
2	Aktivitas AST dan ALT	Tingkat aktivitas AST dan ALT tikus jantan (<i>Rattus novergicus</i>) Sprague Dawley	U/L	Numerik

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan aktivitas enzim ALT diuji analisis statistik menggunakan program SPSS versi 17.0. Hasil penelitian dianalisis secara statistik untuk mengetahui normalitas data dengan uji *Shapiro–Wilk* (karena jumlah sampel < 50). Kemudian untuk mengetahui homogenitas dilakukan uji *Levene*. Jika varian data berdistribusi normal serta homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik *one way ANOVA*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD. Hipotesis akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

Jika tidak homogen atau distribusi tidak normal atau tidak homogen dan distribusi tidak normal, dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann Whitney*. Hipotesis akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

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 Supranto yaitu $(t-1) (n-1) \geq 15$ 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 maka pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidaknyamanan maka pada penelitian hewan coba ditempatkan di *pet house* dengan suhu terjaga $20-25^{\circ}\text{C}$ kemudian

hewan coba dibagi menjadi 2–3 ekor tiap kandang. *Pet 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 pemantauan serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan. Pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan sonde. 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 untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013)