

**BAB 4**

**METODE PENELITIAN**

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain studi *true experimental* dengan pedekatan *randomized group post test only design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* menggunakan tikus wistar jantan. Pemilihan subjek dilakukan dengan metode *simple random sampling*.

**4.1.1 Rancangan Sampel Acak Sederhana (*Simple Random Sampling*)**

Setiap bagian dari populasi memiliki kesempatan untuk diseleksi sebagai sampel, maka pengambilan sampel dapat dilakukan secara acak sederhana. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana dengan menggunakan angka acak (*random number*).

**4.1.2 Subjek Penelitian**

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan. Menurut Supranto (2000), untuk penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap menggunakan rumus Federer. Berikut adalah rumus Federer (1991) dalam menghitung jumlah sampel:

$$(t-1) (n-1) \geq 15 \dots\dots\dots(4.1)$$

Dimana: t = banyaknya grup perlakuan

n = besar sampel



Pada penelitian ini diberikan 5 perlakuan, sehingga  $t = 5$  dan besar sampel adalah:

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

$$n-1 \geq 15:4$$

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

$$n \geq 4,75$$

Dari perhitungan tersebut, didapatkan bahwa besar sampel adalah 4,75 dan dibulatkan menjadi 5, sehingga total sampel yang diperlukan adalah  $5 \times 5$ , yaitu 25 sampel. Menurut Supranto (2000), perlu dilakukan koreksi pada besar sampel untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen dengan rumus:

$$N = \frac{n}{1-f} \dots\dots\dots (4.2)$$

Dimana:  $N$  = besar sampel koreksi

$n$  = besar sampel awal

$f$  = perkiraan proporsi *drop out* sebesar 10%

Menurut perhitungan dengan rumus di atas, didapatkan hasil bahwa besar sampel tikus setiap kelompok adalah 6 tikus yang terdiri dari 5 ekor tikus perlakuan dan 1 ekor tikus koreksi.

#### 4.1.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Penentuan kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan agar karakteristik sampel tidak menyimpang jauh dari populasi dan memenuhi syarat untuk dijadikan sampel dalam penelitian. Kriteria inklusi untuk tikus dalam penelitian ini adalah:

- a) Tikus jenis wistar.
- b) Jenis kelamin jantan.
- c) Berat badan 150-250 gram.
- d) Tikus sehat, dan tidak cacat.

Kriteria eksklusi untuk tikus dalam penelitian ini adalah:

- a) Tikus mengalami hepatotoksik sebelum dilakukan induksi.
- b) Tikus dengan kelainan anatomi.

#### 4.2 Variabel Penelitian

##### 4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah dosis ekstrak semanggi gunung. Dosis yang diberikan adalah 5, 10, dan 20 mg/kg/hari.

##### 4.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah perubahan kadar ALP, ALT, AST, bilirubin direk, bilirubin indirek, dan bilirubin total.

#### 4.3 Definisi Operasional

- a. OAT merupakan obat anti tuberkulosis yang terdiri dari rifampin, isoniazid, dan pirazinamid.

- b. AST adalah enzim mitokondria yang juga ditemukan dalam hati, jantung, ginjal, dan otak. Bila jaringan tersebut mengalami kerusakan yang akut, kadarnya dalam serum meningkat.
- c. ALT mengkatalisis pemindahan satu gugus amino antara lain alanin, dan asam alfa ketoglutarat. Kadar tertinggi ditemukan dalam hubungannya dengan keadaan yang menyebabkan nekrosis hati yang luas seperti hepatitis virus berat, cedera hati akibat toksin atau kolaps sirkulasi yang berkepanjangan.
- d. ALP merupakan enzim yang berperan dalam mempercepat hidrolisis fosfat organik dengan melepaskan fosfat anorganik. Peningkatan ALP terjadi akibat adanya kolestasis dan pada obstruksi intra maupun ekstrabiliar enzim ini akan meningkat 3-10 kali dari nilai normal sebelum timbul ikterus.
- e. Bilirubin total adalah hasil penjumlahan bilirubin indirek dengan bilirubin direk.
- f. Bilirubin indirek adalah hasil pemecahan *heme* dari hemoglobin yang kemudian dikatabolisme menjadi biliverdin kemudian diubah menjadi bilirubin tak terkonjugasi.
- g. Bilirubin direk adalah hasil konjugasi dari bilirubin indirek dengan *glucoronide* pada hepar.

#### 4.4 Tempat, dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Tempat Penelitian

Tempat pelaksanaan penelitian berada di beberapa tempat yang tertera pada tabel 4.1

**Tabel 4.1 Tempat Penelitian**

No.	Kegiatan	Tempat pelaksanaan
1.	Pengkondisian hewan coba, pemberian CMC Na, isoniazid, rifampin, pirazinamid, dan ekstrak semanggi gunung	Laboratorium Farmasi FKUB
2.	Pembedahan tikus dan pengambilan darah	Laboratorium Biokimia FKUB
3.	Pengukuran bilirubin, AST, ALP, dan ALT	Laboratorium Patologi Klinik RSSA

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian adalah pada bulan September 2014 hingga Mei 2015.

#### 4.5 Alat, dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: gelas arloji, sendok *stainless steel*, timbangan digital, gelas ukur 10 ml, pipet tetes, penangas air, kertas saring, tabung reaksi, *beaker glass* 50 ml, bunsen, penjepit kayu, pH meter, kandang tikus, botol air minum, spuit oral ukuran 5 ml, spuit dari Terumo Syringe untuk mengambil darah ukuran 3 mL, dan *auto-analyzer* oleh Roche Diagnostic.

##### 4.5.2 Bahan Penelitian

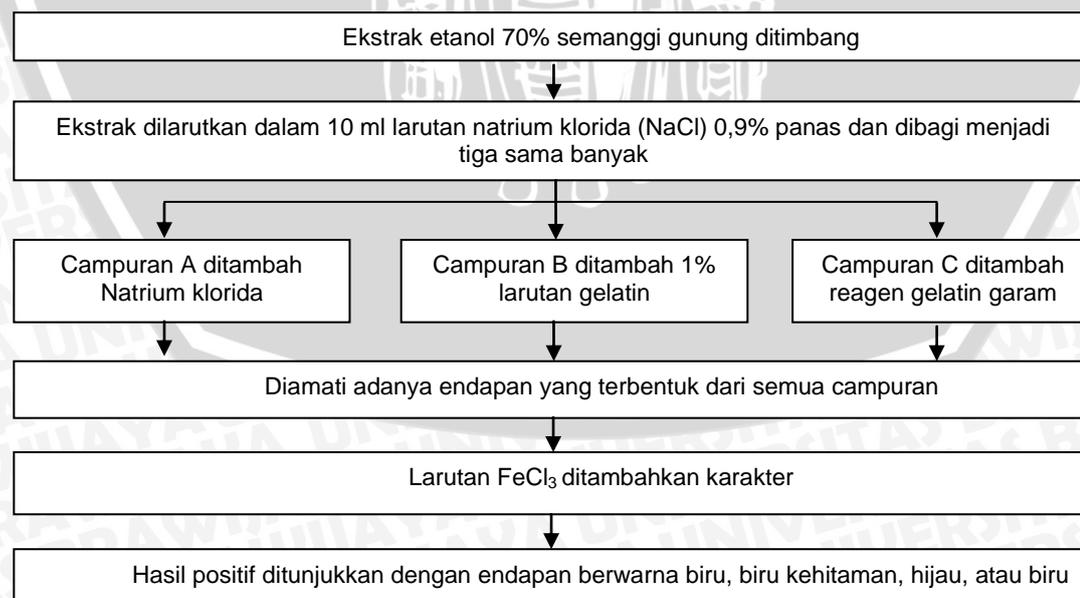
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: ekstrak etanol 70% semanggi gunung, larutan NaCl 0,9% panas, larutan gelatin 1%, larutan FeCl<sub>3</sub>, larutan FeCl<sub>3</sub> 2%, aquades, asam asetat glasial, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kloroform, HCl 0,1 N; NaOH 0,1 N; larutan Fehling A, larutan Fehling B, amonia encer,

larutan aluminium, etil asetat, HCl 2 N, NaCl, reagen mayer, reagen wagner, reagen dragendorff, 30 ekor tikus wistar jantan, pakan tikus, CMC Na 0,2%. OAT yang diperoleh dari Kimia Farma yaitu: isoniazid, rifampin, dan pirazinamid. Reagen kit yang diperoleh dari Roche Diagnostic terdiri dari: reagen AST TRIS, L-alanin, laktat dehidrogenase, reagen ALT 2-oksoglutarat, reagen AST TRIS, L-aspartat, malat dehidrogenase, laktat dehidrogenase, reagen AST 2-oksoglutarat, NADH, diethanolamine pH 9,8 1,2 mmol/L, magnesium klorida 0,6 mmol/L, p-nitrophenylphosphate 50 mmol/L, larutan sodium nitrit, larutan asam sulfanik, larutan akselerator, larutan serum, phosphate 25 mmol/L, *detergent*, *stabilizers* pH 10; 3,5-dichlorophenyl diazonium salt  $\geq 1,35$  mmol/L, phosphoric acid 85 mmol/L, HEDTA 4,0 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, *detergent* pH 1,9; dan 3,5-dichlorophenyl diazonium 1,5 mmol/L pH 1,3.

#### 4.6 Prosedur Skrining Fitokimia Kualitatif Ekstrak

##### 4.6.1 Tanin

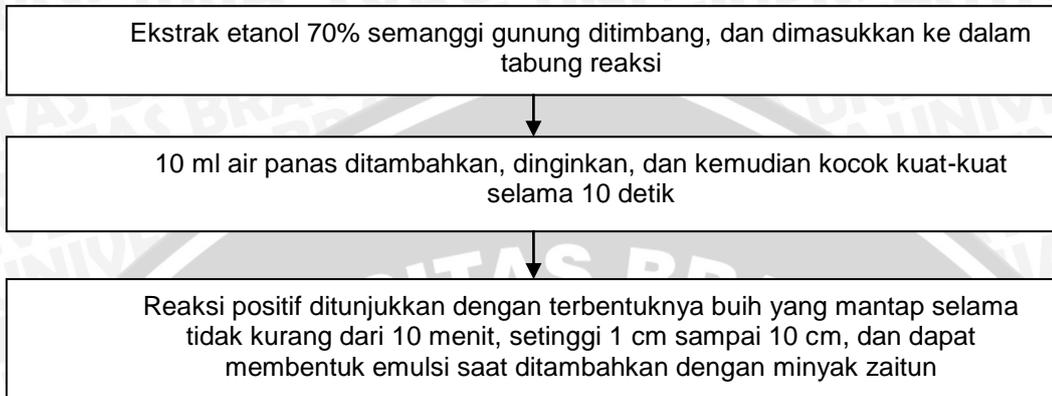
Berikut ini adalah prosedur skrining fitokimia tanin:



**Gambar 4.1** Prosedur Skrining Fitokimia Tanin (Mojab, 2003)

#### 4.6.2 Saponin

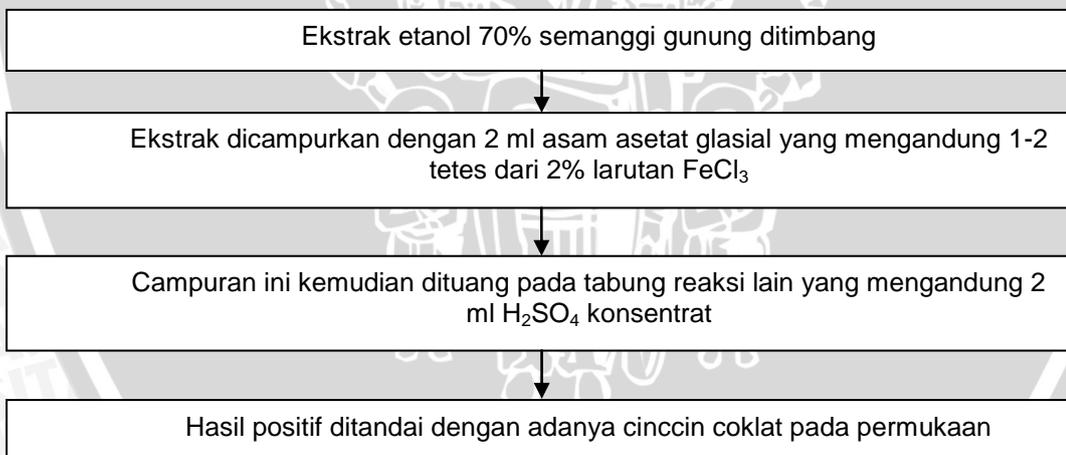
Berikut adalah prosedur skrining saponin:



**Gambar 4.2** Prosedur Skrining Fitokimia Saponin (Depkes RI, 1995)

#### 4.6.3 Glikosida Jantung

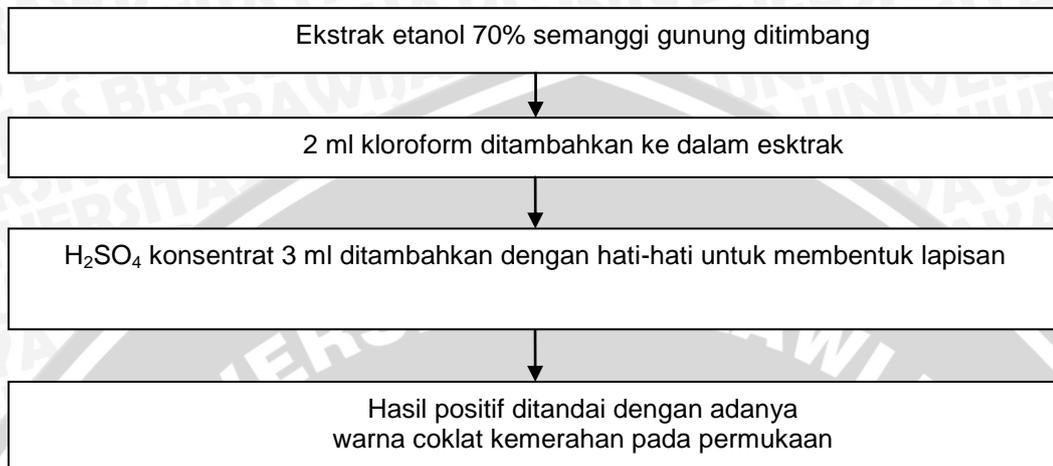
Berikut adalah prosedur skrining glikosida jantung:



**Gambar 4.3** Prosedur Skrining Fitokimia Glikosida Jantung (Yadav, 2011)

#### 4.6.4 Terpenoid

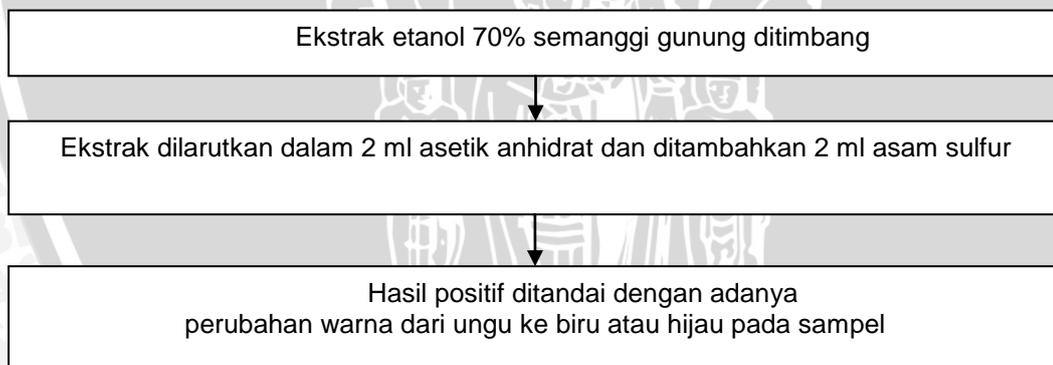
Berikut adalah prosedur skrining terpenoid:



**Gambar 4.4** Prosedur Skrining Fitokimia Terpenoid (Ayoola *et al.*, 2008)

#### 4.6.5 Steroid

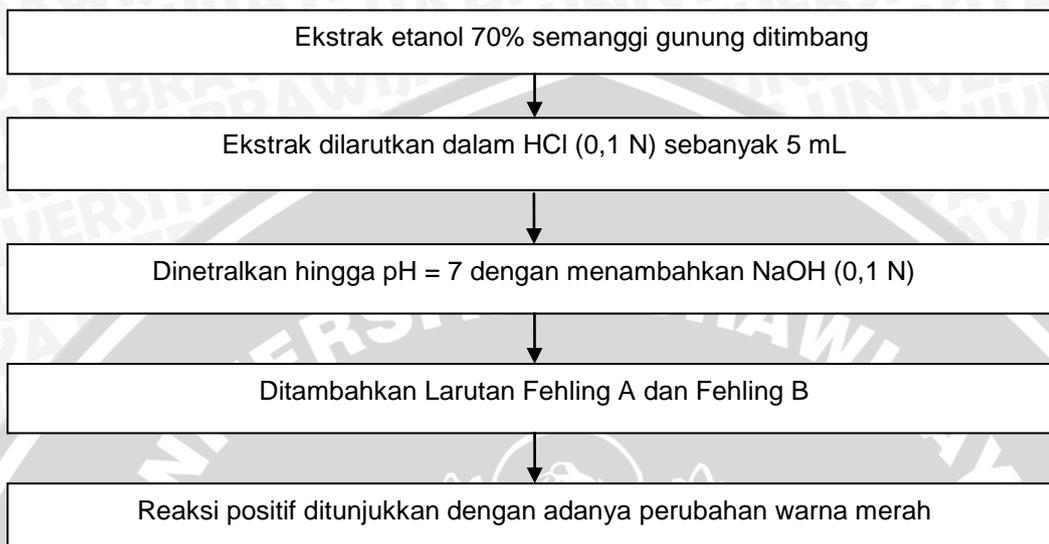
Berikut adalah prosedur skrining steroid:



**Gambar 4.5** Prosedur Skrining Fitokimia Steroid (Uddin, 2011)

#### 4.6.6 Glikosida

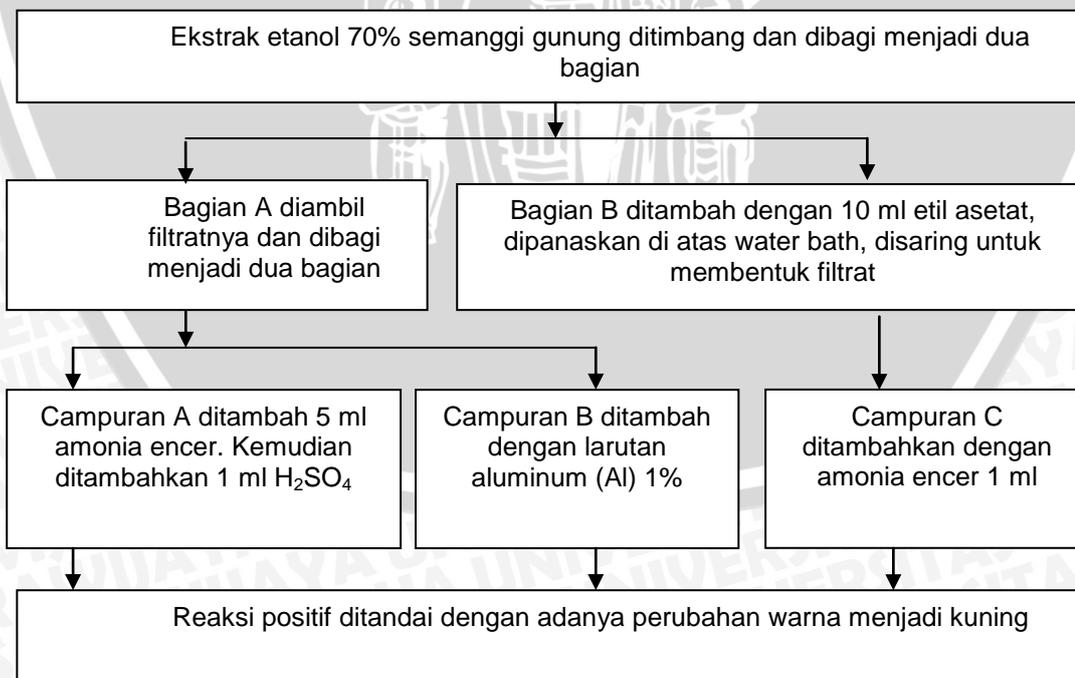
Berikut adalah prosedur skrining glikosida:



Gambar 4.6 Prosedur Skrining Fitokimia Glikosida (Yadav, 2011)

#### 4.6.7 Flavonoid

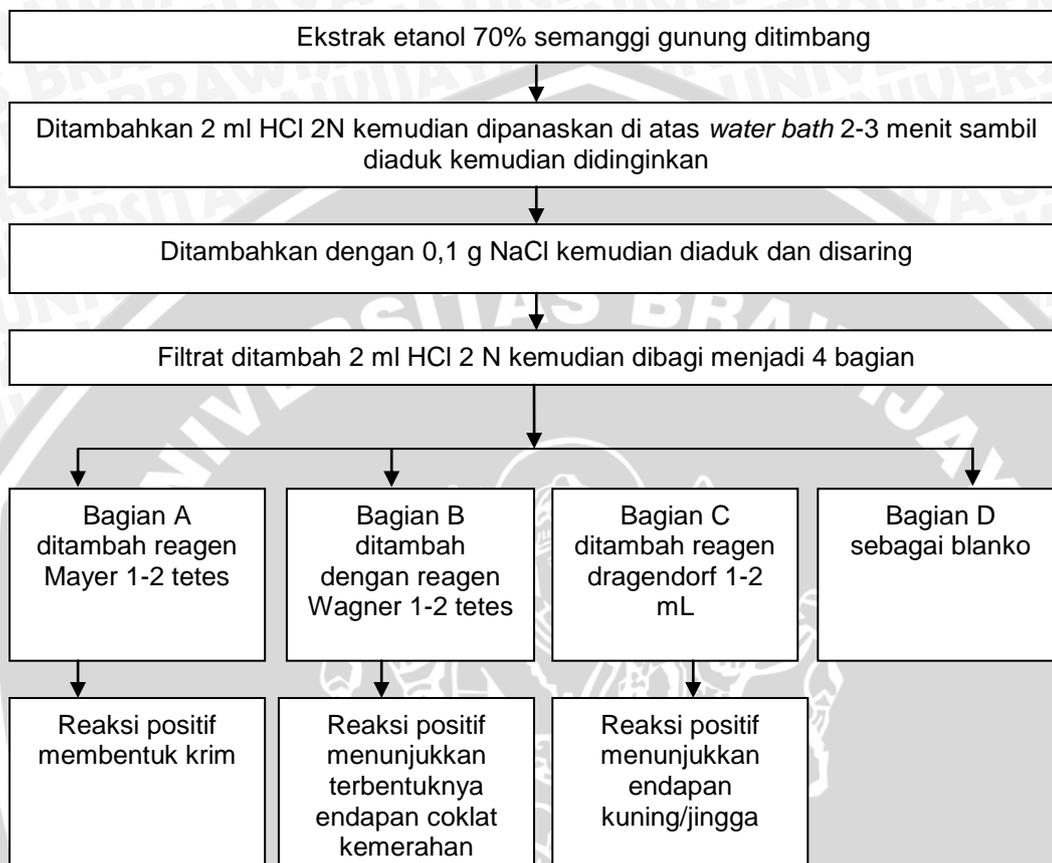
Berikut adalah prosedur skrining flavonoid:



Gambar 4.7 Prosedur Skrining Fitokimia Flavonoid (Depkes RI, 1995)

#### 4.6.8 Alkaloid

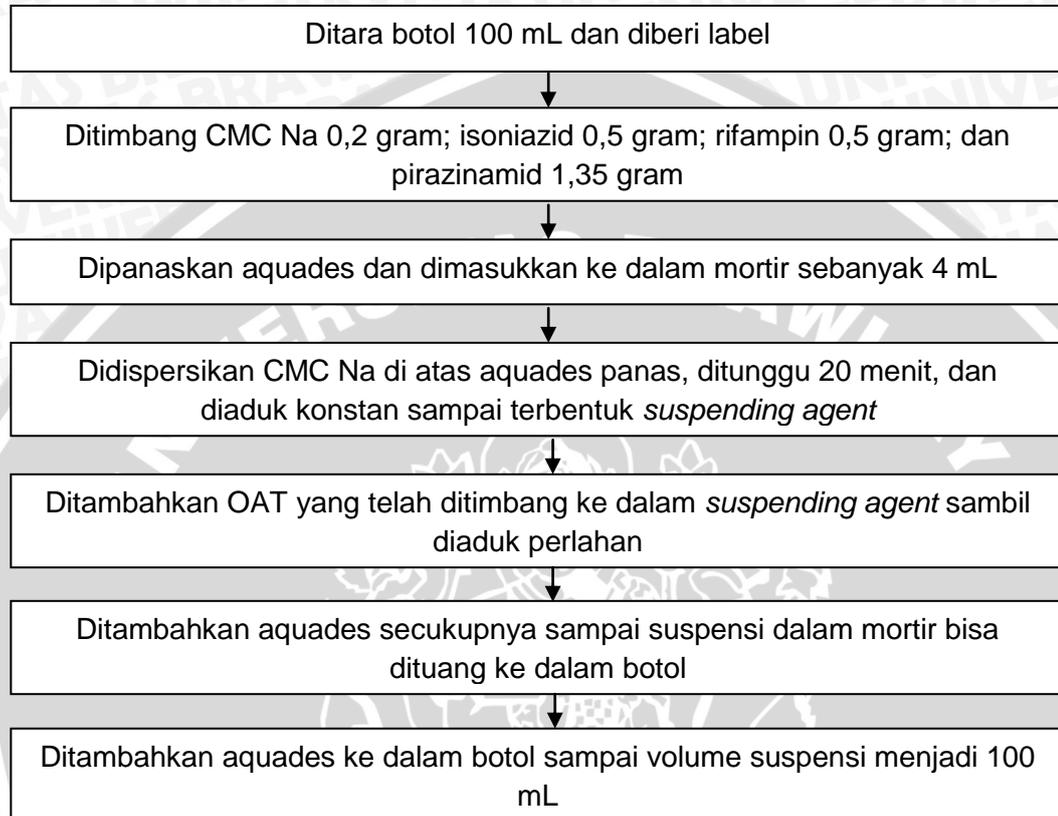
Berikut adalah prosedur skrining terpenoid:



Gambar 4.8 Prosedur Skrining Fitokimia Alkaloid (Ayoola *et al.*, 2008)

#### 4.7 Prosedur Pembuatan Suspensi OAT

Berikut adalah prosedur pembuatan suspensi OAT:

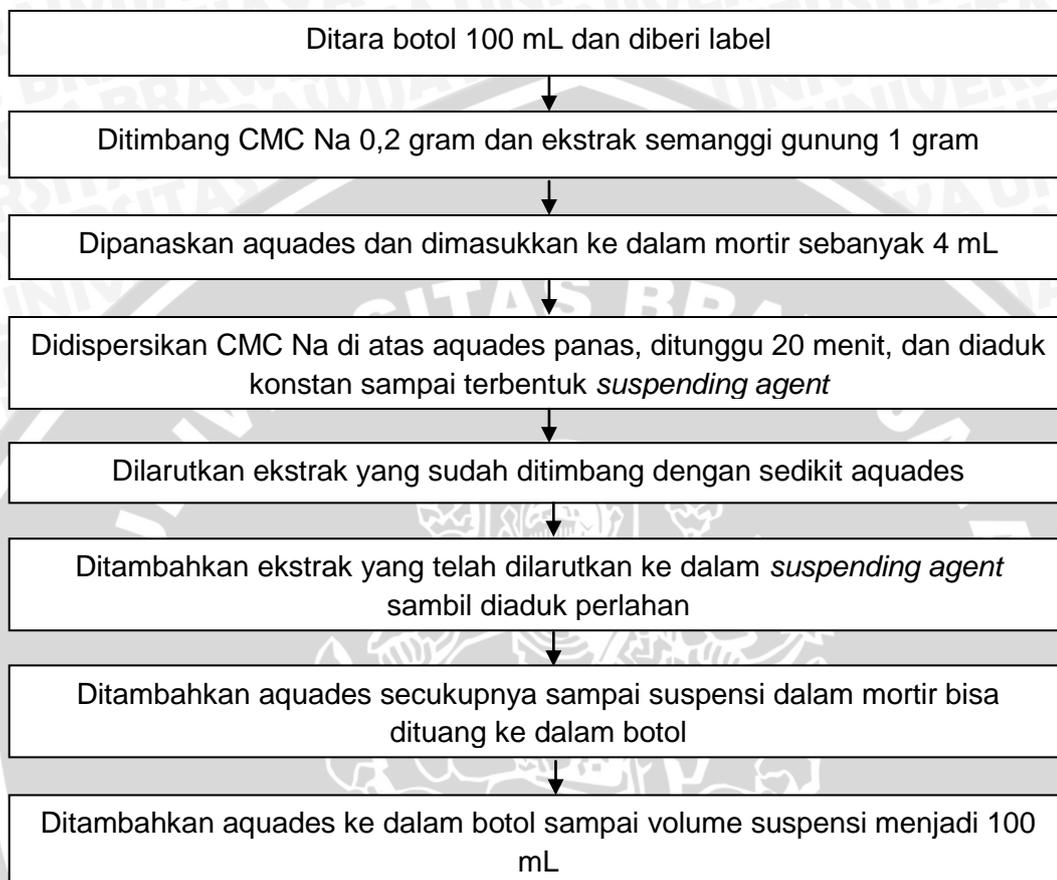


**Gambar 4.9** Prosedur Pembuatan Suspensi OAT

Perhitungan dosis OAT yang disondekan ke tikus wistar jantan dapat dilihat pada lampiran 4.

#### 4.8 Prosedur Pembuatan Suspensi Ekstrak Semanggi Gunung

Berikut adalah prosedur pembuatan suspensi ekstrak semanggi gunung:

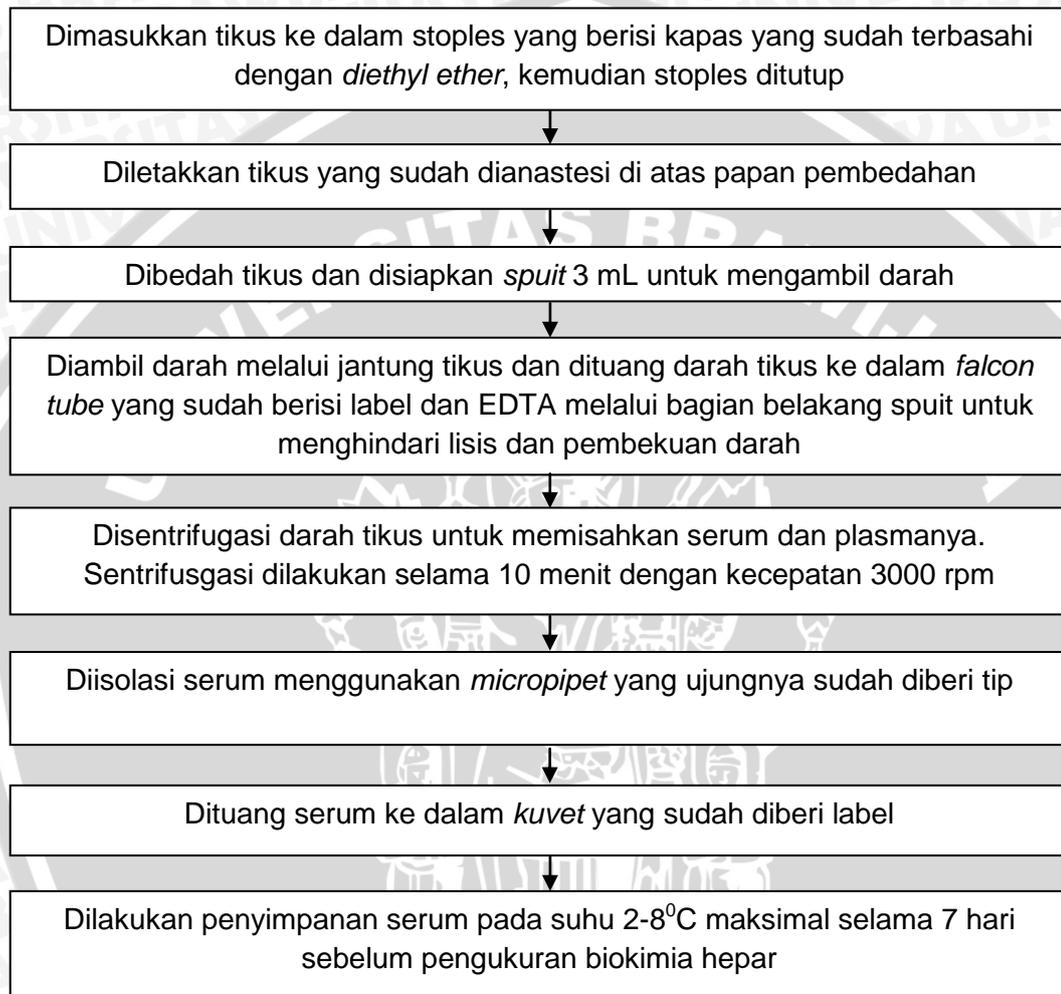


**Gambar 4.10 Prosedur Pembuatan Suspensi Ekstrak Semanggi Gunung**

Perhitungan dosis ekstrak semanggi gunung yang disondekan ke tikus wistar jantan dapat dilihat pada lampiran 5.

#### 4.9 Prosedur Isolasi Serum

Berikut adalah prosedur isolasi serum sebelum dilakukan pengukuran biokimia hepar:

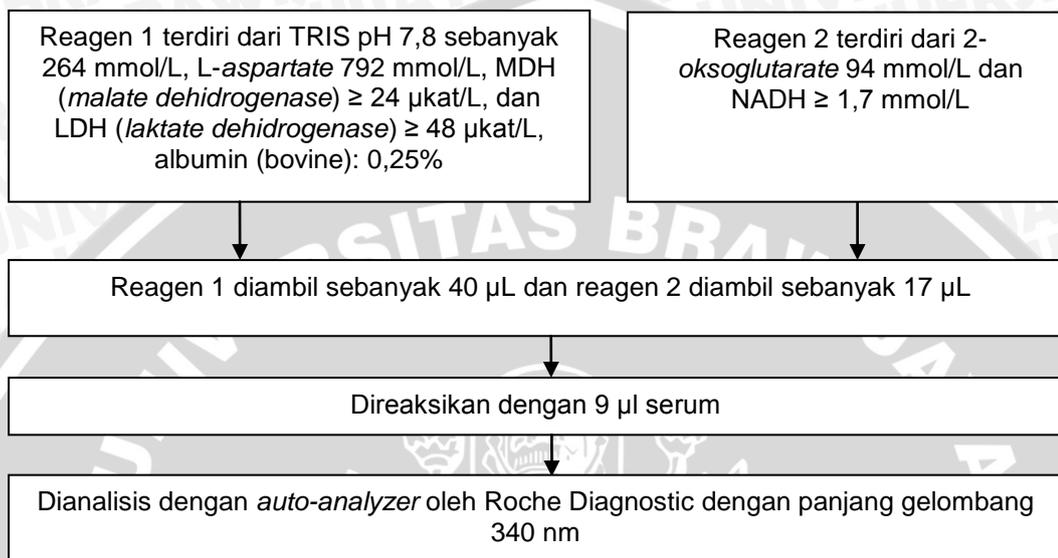


Gambar 4.11 Prosedur Isolasi Serum

#### 4.10 Prosedur Pemeriksaan AST, ALT, ALP, dan Bilirubin

##### 4.10.1 Pemeriksaan Aspartat Aminotransferase (AST)

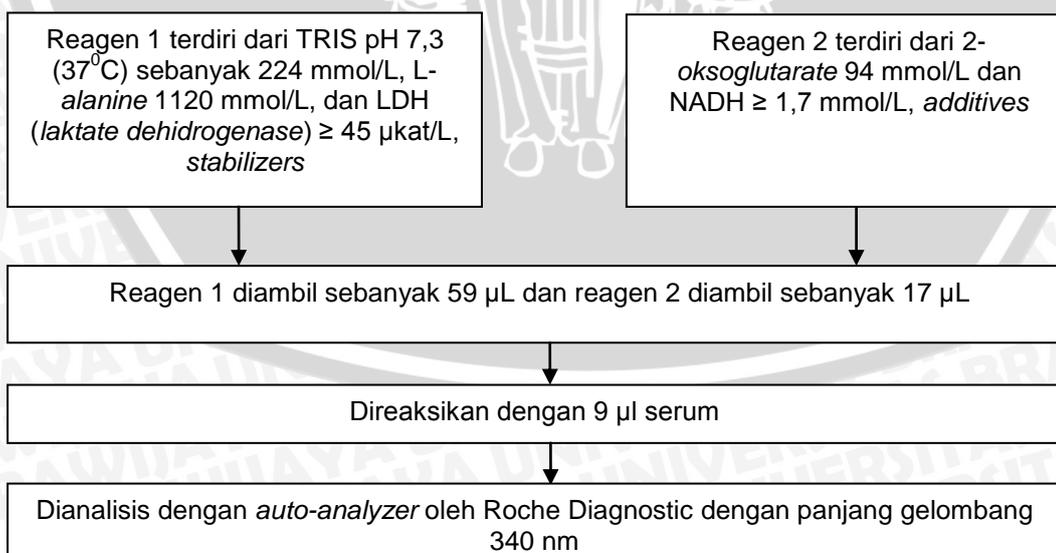
Berikut adalah prosedur pemeriksaan AST:



Gambar 4.12 Prosedur Pemeriksaan AST

##### 4.10.2 Pemeriksaan Alanin Aminotransferase (ALT)

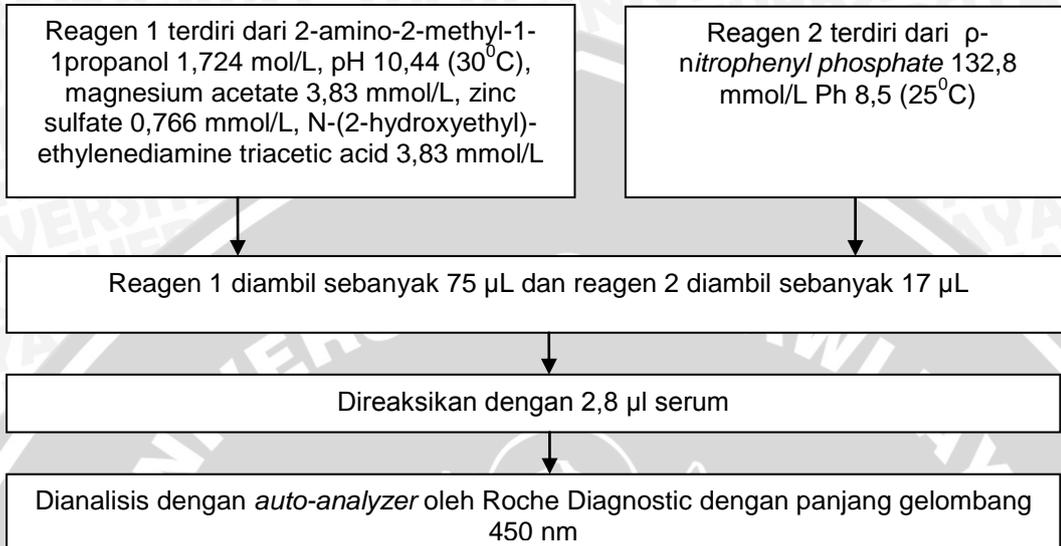
Berikut adalah prosedur pemeriksaan ALT:



Gambar 4.13 Prosedur Pemeriksaan ALT

#### 4.10.3 Pemeriksaan *Alkaline Phosphatase* (ALP)

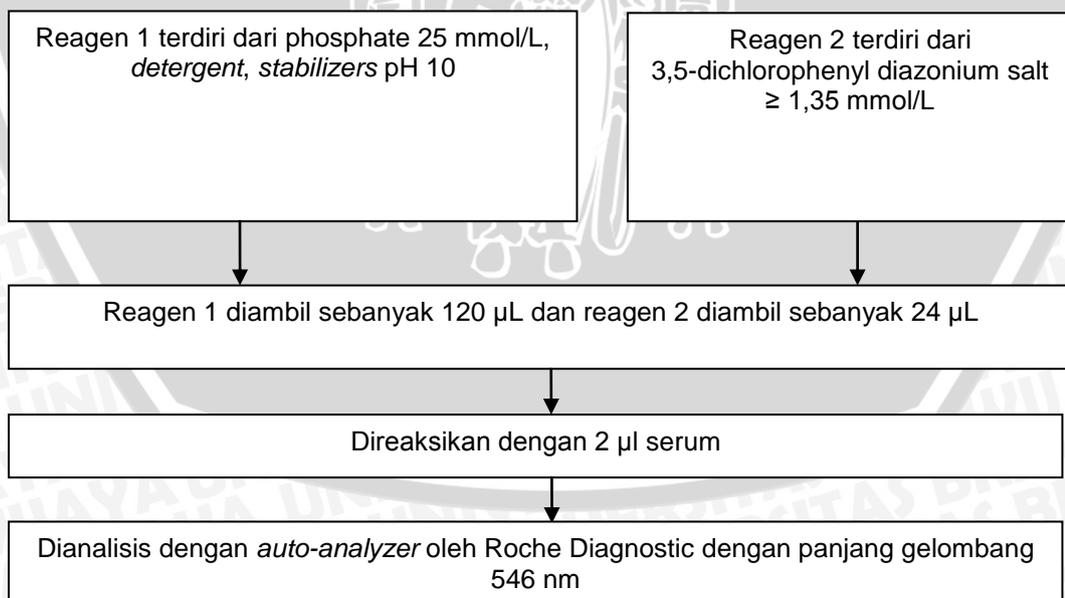
Berikut adalah prosedur pemeriksaan ALP:



**Gambar 4.14** Prosedur Pemeriksaan ALP

#### 4.10.4 Pengukuran Bilirubin Total

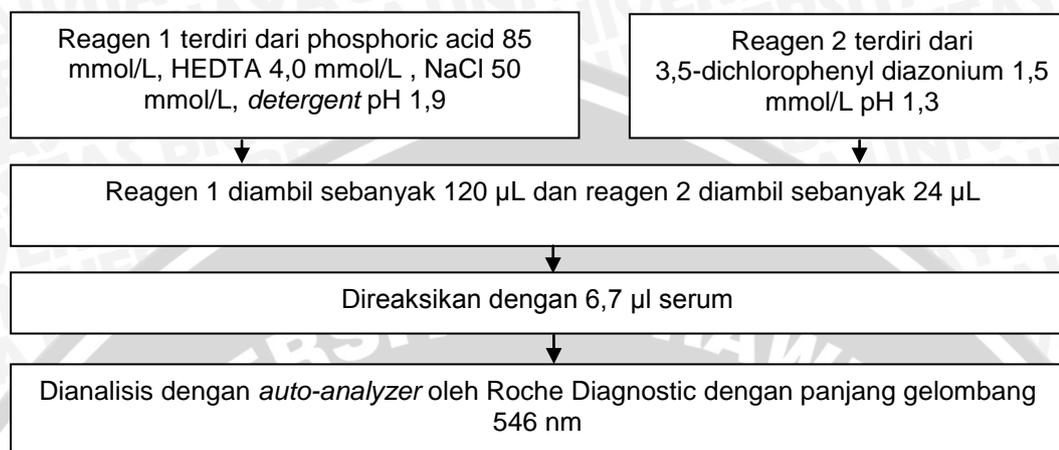
Berikut adalah prosedur pemeriksaan bilirubin total:



**Gambar 4.15** Prosedur Pemeriksaan Bilirubin Total

#### 4.10.5 Pengukuran Bilirubin Direk

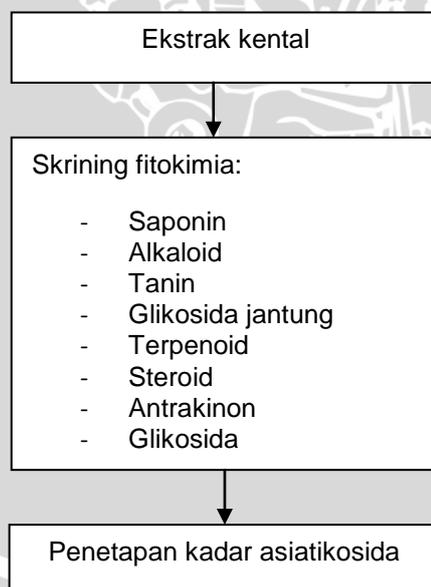
Berikut adalah prosedur pemeriksaan bilirubin direk:



Gambar 4.16 Prosedur Pemeriksaan Bilirubin Direk

#### 4.11 Alur Penelitian

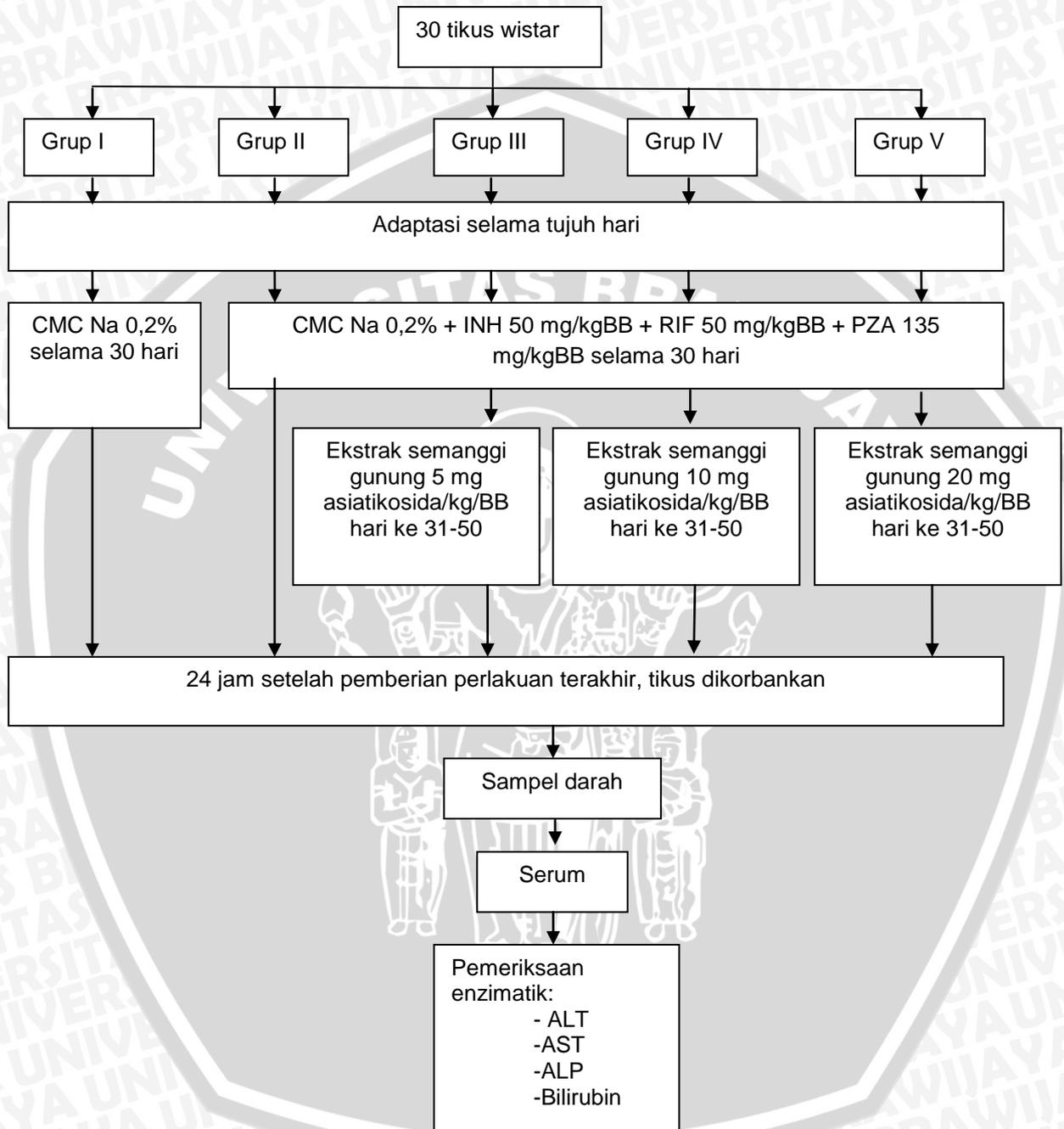
##### 4.11.1 Alur Identifikasi Asiatikosida pada Ekstrak Semanggi Gunung



Gambar 4.17 Alur Identifikasi Asiatikosida pada Ekstrak Semanggi Gunung

Penetapan kadar asiatikosida dalam semanggi gunung dilakukan oleh Fiddien (2015).

#### 4.11.2 Alur Perlakuan Tikus Wistar Jantan



Gambar 4.18 Alur Perlakuan Tikus Wistar Jantan

Keterangan:

- a. Grup I: sebagai grup plasebo yang terdiri dari lima tikus wistar jantan yang diberi CMC Na 0,2% selama 30 hari.
- b. Grup II: sebagai grup kontrol negatif yang terdiri dari lima tikus wistar jantan yang diberi CMC Na 0,2% + INH 50 mg/kgBB + RIF 50 mg/kgBB + PZA 135 mg/kgBB selama 30 hari.
- c. Grup III: sebagai grup perlakuan yang terdiri dari lima tikus wistar jantan yang diberi CMC Na 0,2% + INH 50 mg/kgBB + RIF 50 mg/kgBB + PZA 135 mg/kgBB selama 30 hari, dan ekstrak semanggi gunung 5 mg asiaticosida/kg/BB hari ke 31-50.
- d. Grup IV: sebagai grup perlakuan yang terdiri dari lima tikus wistar jantan yang diberi CMC Na 0,2% + INH 50 mg/kgBB + RIF 50 mg/kgBB + PZA 135 mg/kgBB selama 30 hari, dan ekstrak semanggi gunung 10 mg asiaticosida/kg/BB hari ke 31-50.
- e. Grup V: sebagai grup perlakuan yang terdiri dari lima tikus wistar jantan yang diberi CMC Na 0,2% + INH 50 mg/kgBB + RIF 50 mg/kgBB + PZA 135 mg/kgBB selama 30 hari, dan ekstrak semanggi gunung 20 mg asiaticosida/kg/BB hari ke 31-50.

#### 4.12 Analisis Data

Analisis data ALT, AST, ALP, dan bilirubin untuk membandingkan antar grup perlakuan dilakukan dengan uji statistik *One Way ANOVA*. Uji *One Way ANOVA* dilakukan pada penelitian yang memiliki lebih dari 2 grup perlakuan tidak berpasangan dengan distribusi data yang normal, dan varian datanya sama. Analisis data untuk mengetahui perbedaan rerata kadar biokimia hepar tiap grup yang dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dan

dilanjutkan uji *post hoc* Tukey untuk mengetahui perbedaan kadar biokimia yang paling signifikan dari beberapa dosis ekstrak yang diberikan.

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

H<sub>0</sub> = ekstrak etanol 70% semanggi gunung tidak dapat menurunkan kadar ALP, ALT, AST, dan bilirubin hepar.

H<sub>1</sub> = ekstrak etanol 70% semanggi gunung dapat menurunkan kadar ALP, ALT, AST, dan bilirubin hepar.

