

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis rancangan penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian eksperimental dengan desain penelitian yaitu *post test control grup design*.

3.2. Populasi dan Sampel

Populasi dan Sampel pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun *C. costata*. Daun *C. costata* diperoleh disekitar hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak dihuni oleh suku karo. Daun *C. costata* selanjutnya dibuat menjadi ekstrak etanol *C. costata* dan dilakukan skrining fitokimia

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorim Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan laboratorium MIPA Universitas Padjajaran Jatinangor selama kurang lebih 8 bulan yaitu dari januari sampai Agustus 2022

3.3.1. Bahan

Bahan yang di gunakan untuk penelitian ini adalah daun *C. costata*, paracetamol, silymarin "*Silybum Marianum* atau *Milk Tisthle*" (Liparin 140mg), kurkumin (*Curcuma Longa*), etanol, tikus putih jantan galur wistar umur 2 bulan bobot $\pm 150-200$ gram, kapas, alkohol, kloroform, NaCl 0,9%, PGA, bahan pembuatan preparat histopatologi seperti alkohol 70%, 80%, dan

95%, Larutan Fiksatif (Bouin), xylol, parafin, gliserin, dan perwarnaan *Hematoksillin Eosin (HE)*

3.3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak plastik, penutup kawat, tempat makan tikus, botol minum tikus, bejana maserasi, corong bushner (Pyrex), kertas saring, rotary evaporator (IKA), beaker glass (Pyrex), batang pengaduk, spuit injeksi, ember, alat bedah (Gold Cross), tissue proccesor, mikroskop cahaya (Olympus CX31), mikrotom, waterbath (Daihan Labtech), gelas objek, dan gelas penutup.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu pengujian hepatoprotektif dengan menggunakan sampel tikus dan ekstrak daun *C. costata* yang diberikan kepada tikus uji dengan enam kelompok meliputi (K-) Paracetamol, dan kontrol positif Kurkumin 50mg/kgBB, Silymarin 50mg/kgBB, Kelompok terapi uji ekstrak *C. costata* dosis bertingkat 100,200,400 mg/kgBB

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel Terikat pada penelitian ini yaitu histopatologi sel hepar dari kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas paracetamol dengan parameter nekrosis sel.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah Tabel Definisi Operasional Variabel Yang

Terdapat Dari Penelitian yaitu:

Tabel 3.1. Tabel Definisni Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1	Uji Hepatoprotektif Ekstrak Daun <i>C. costata</i>	6 kelompok perlakuan dengan Kelompok kontrol negatif paracetamol dan kontrol positif silymarin, kurkumin dan dosis ekstrak daun <i>C. costata</i> bertingkat	-	Nominal	1. K+ 1 = silymarin dosis 50 mg/KgBB 2. K+ 2 = Kurkumin dosis 50mg/KgBB. 3. K- = PCT 1g/kgBB 4. E100 = kelompok terapi dosis 1 5. E200 = kelompok terapi dosis 2 6 E400 = kelompok terapi dosis 3
Variabel Terikat					
1	Kerusakan Nekrosis sel	Pengamatan dilakukan pada preparat organ hati. Kerusakan sel dilihat dari nekrosis sel yang ditandai dengan penggumpalan, pecah dan menghilang yaitu nekrosis sel.	Mikroskop Cahaya	Interval	1. Normal 0% 2. Ringan < 30% 3. Sedang 30- 50% 4. Berat > 50%

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun *C.costata*

Daun segar *C. costata* sebanyak 1 kg daun *C.costata* dimaserasi dengan etanol 70% sampai filtrat tidak berwarna selama 72 jam. Setelah ekstrak cair diperoleh dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C. Untuk mendapatkan hasil yang kental kemudia dipanaskan pada waterbath pada suhu 40°C. Untuk membuat berbagai dosis suspensi ekstrak dilarutkan dalam air suling. Dan dihitung persentase rendemen ekstrak (Alkandahri *et al.*,2019).

3.5.2 Pembuatan Suspensi Kurkumin

PGA 1% dilarutkan dalam volume air 100 ml larutan ini digunakan sebagai pelarut kurkumin (*Curcuma Longa*). Suspensi kurkumin dibuat dengan melarutkan sejumlah kurkumin yang telah ditimbang kedalam PGA 1% sebanyak 1ml, setelah menjadi suspensi di berikan pada hewan uji

3.5.3 Pembuatan Suspensi Silymarin

PGA 1% dilarutkan dalam volume air 100 ml larutan ini digunakan sebagai pelarut Silymarin. Suspensi Silymarin (*Silybum Marianum*) pada obat standar Liparin 140mg dibuat dengan melarutkan Silymarin yang telah ditimbang kedalam PGA 1% sebanyak 1ml, setelah menjadi suspensi di berikan pada hewan uji.

3.5.4 Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol *C.costata*

PGA 1% dilarutkan dalam volume air 100 ml larutan ini digunakan sebagai pelarut Ekstrak Daun *C.costata*. Suspensi Ekstrak Daun *C.costata* dibuat dengan melarutkan sejumlah Silymarin yang telah ditimbang

kedalam PGA 1% sebanyak 1ml, setelah menjadi suspensi ekstrak daun *C.costata* kemudian di berikan pada hewan uji.

3.5.5 Pembuatan Suspensi Paracetamol

Larutan PGA dibuat dengan cara melarutkan PGA 1% yang telah ditimbang seksama ke dalam air sampai volume 100 ml. Larutan digunakan sebagai pembawa paracetamol. Suspensi paracetamol dalam PGA dibuat dengan cara melarutkan sejumlah gram paracetamol yang telah ditimbang ke dalam larutan PGA 1% sebanyak 1 ml , suspensi paracetamol dengan volume 1 ml tersebut yang diberikan pada hewan uji

3.5.6 Perlakuan Pada Tikus

Penelitian ini digunakan 18 tikus dengan 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 3 tikus ekor sebagai pengulangan, berikut :

Tabel 3.2 Pengelompokan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan
I. Kontrol Negatif	Suspensi parasetamol dosis 1000mg/KgBB diberikan pada hari ke 15 – 21
II. Kontrol Positif 1	Kurkumin dosis 50 mg/KgBB diberikan pada hari ke 1 –14 . Hari ke 15- 21 + Paracetamol
III. Kontrol positif 2	Silymarin dosis 50 mg/KgBB diberikan pada hari ke 1 – 14. Hari ke 15- 21 + Paracetamol
IV. Ekstrak Dosis 1	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 100 mg/KgBB diberikan selama 21 hari + hari 14

	Paracetamol selama 7 hari
V. Ekstrak dosis 2	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 200 mg/KgBB diberikan selama 21 hari + hari ke 14 Paracetamol selama 7 hari
VI. Ekstrak dosis 3	Ekstrak <i>C. costata</i> dosis 400 mg/KgBB diberikan selama 21 hari + hari 14 Paracetamol selama 7 hari

Hewan uji tikus putih jantan galur wistar diaklimatisasikan selama 7 hari terlebih dahulu berfungsi untuk melakukan adaptasi dengan lingkungan (kondisi laboratorium). Penelitian dilakukan selama 21 hari. Selama 14 hari, kelompok perlakuan diberikan obat (Silymarin dan Kurkumin) serta ekstrak *C. costata* diberikan secara oral, pada hari ke 15 selama 7 hari diberikan induksi paracetamol (Oral) dan tetap dilanjutkan pemberian silymarin, kurkumin dan ekstrak *C. costata* sampai hari ke-21 hanya diberikan induksi paracetamol 1g/Kg BB. Setelah perlakuan selesai hewan uji di nekropsis yang bertujuan untuk melihat histopatologi organ hati dengan parameter nekrosis secara mikroskopik.

3.5.7 Pemeriksaan Histopatologi Organ Hati

Pada hari ke-22 (akhir perlakuan) hewan uji di bius menggunakan Kloroform di dalam wadah yang tertutup. hewan uji di bius menggunakan dietileter di dalam wadah yang tertutup. Setelah semua darah tikus diambil kemudian hewan dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ hepar. Organ hati yang telah dicuci dengan NaCl 0,9% dimasukkan kedalam pot salep yang berisi larutan fiksatif, kemudian dibiarkan selama 24 jam.

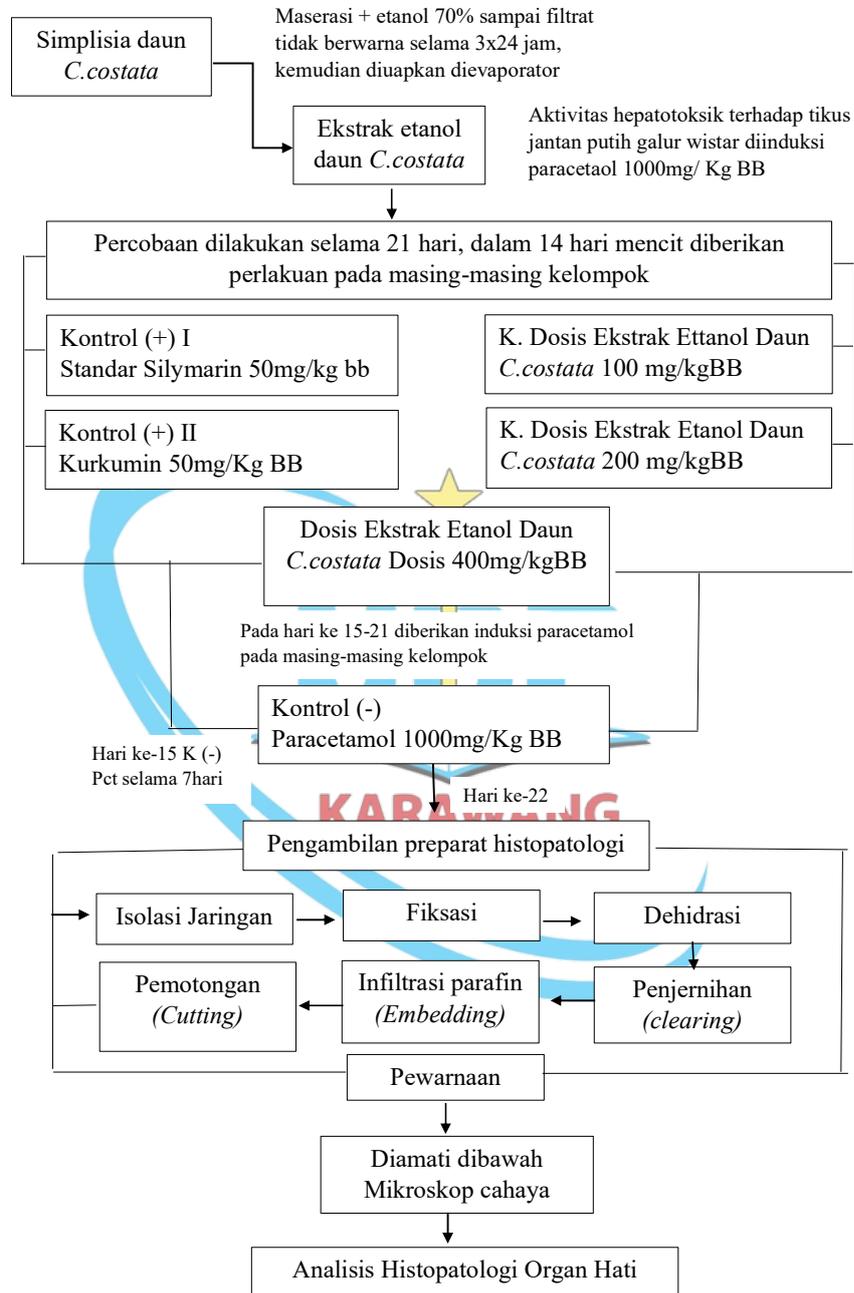
Pengamatan Histopatologi Organ Hati Kemudian, didehidrasi dalam etanol serial dan dibersihkan dalam NaCl 0,9%. Proses selanjutnya dibenamkan dalam lilin parafin. Bagian dengan ketebalan 4-5 mikron dibuat dari blok parafin dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin untuk pengamatan histopatologi. Slide mikroskopis disiapkan dan diperiksa di bawah mikroskop. Gambar diambil menggunakan kamera CCD Olympus DP12 pada perbesaran asli 10x (Olympus DP12 Microsystems Digital Imaging Olympus, Jepang

Preparat Histopatologi organ hati diamati dan pengamatan preparat jaringan hati dilakukan dengan perbesaran 100 kali untuk mengamati seluruh lapang pandang. Daerah yang akan diamati yaitu sentrilobuler. Kerusakan yang ditimbulkan oleh paracetamol banyak yang terdapat dalam sitokrom P450 disekitarnya. Perbesaran mikroskop dengan pembesaran 100 kali inti sel hepar yang diamati tampak dengan jelas, kemudian setelah itu dihitung jumlah inti sel yang mengalami kerusakan pada sel hepar (nekrosis). Perhitungan dilakukan dengan cara yang sama terhadap sampel.

3.6 Analisis Data

Analisis data dengan skor perhitungan lapang pandang yang terbagi menjadi 3, skor 1 untuk kerusakan kurang dari <10%, skor 2 untuk kerusakan 10 sampai 50%, dan skor 3 diantara >50% sel. Hasil pengamatan ini akan dianalisis lebih lanjut menggunakan aplikasi SPSS Anova One Way untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan dosis efektif diantara kelompok perlakuan dan di lanjut dengan Tukey HSD untuk melihat perbedaan yang signifikan

3.7 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian