

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Studi ini memanfaatkan studi *post-test control-grup* studi eksperimental laboratorium dengan menggunakan tikus putih jantan galur wistar selaku hewan uji dalam percobaan. Hewan uji dikelompokkan di bagi lima kelompok perlakuan, yakni kelompok kontrol negatif yang diinduksi gentamisin dosis 80 mg/kg, kelompok normal serta kelompok eksperimen dengan 3 dosis ekstrak yang berbeda.

3.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) yang didapatkan dari Hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Kabupaten Langkat, Sumatera Utara yang banyak dihuni oleh suku Karo. Daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC) ini kemudian dibuat menjadi ekstrak daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC). Tikus jantan Galur Wistar ini didapatkan dari Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan BB tikus 100-200 gr. Tikus putih jantan galur wistar yang kemudian hewan uji dikelompokkan dengan cara randomisasi.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan Penelitian

Tikus putih jantan galur wistar (*Rattus novergicus*) 20 ekor, Daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A. DC), Pewarna Hematoksinilin Eosin (He), Gentamisin injeksi (PT. Kimia Farma), etanol 70%, akuades, PGA 1%, Larutan bouhing.

3.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini diantaranya yakni mortir serta stamper (Onemed®), rotary evaporator (Eyela®), tabung reaksi (Pyrex®), beaker glass (Herma®), batang pengaduk (Rofa®), sonde (Onemed®), handscoon (Sensi latex®), spuit 5 cc (Onemed®), mikropipet (Thermo

Scientific®), Mikroskop optik, kandang, tempat minum serta makan tikus dan Macerator Magnetic Stirrer (M-MS) .

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

3.4.1.1 Variabel bebas

Variabel studi ini yang dimanfaatkan yakni ekstrak etanol daun cep-
cepan dengan penginduksi gentamicin dalam beberapa variasi dosis yang
berbeda.

3.4.1.2 Variabel terikat

Variabel terikat studi ini yakni mengukur kadar serta efek nekrosis
pada tikus jantan putih galur wistar memanfaatkan uji hispatologi.

3.4.1.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol ini factor fisiologi dapat mempengaruhi hasil pada
penelitian.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut tabel definisi operasional variabel pada studi yakni:

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

NO	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Variabel bebas Dosis ekstrak daun Cep- cepan	Lima kelompok perlakuan, diantaranya kelompok kontrol negatif yang diinduksi gentamisin	-	Nominal	1. K - = Kontrol negatif gentamisi n 80 Mg/KgB. 2. Kontrol normal memana

		dosis 80 mg/kg, kelompok normal dan kelompok eksperimen dengan 3 dosis ekstrak yang berbeda			atkan aquadest. 3. Kelompok ekstrak dengan 3 dosis
2	Variabel Terikat	Dilakukan dengan cara organ ginjal di mikroskopik dan di beri Pewarna Hematoksilin Eosin (He)	Mikroskopik	Nominal	Pada histopatologi agar nekrosis ginjal : 0 = nekrosis tidak ditetapkan; 1 = nekrosis setempat (fokal); 2 = nekrosis setempat (difusa).
3	Variabel Terkendali	Faktor yang mempengaruhi yaitu factor fisiologi dari tikus putih	-	-	Yang dapat mempengaruhi hasil yaitu bobot tikus, volume pemberian, pakan serta

		jantan galur wistar			minum serta jenis kelaminan
--	--	------------------------	--	--	-----------------------------------

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi

Pada tahap awal penelitian ini, identifikasi dan karakterisasi daun cep (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) dilakukan dengan membandingkan karakter morfologi yang terdapat pada literatur. Tumbuhan daun cep-cepan (*Catanopsis Costata* (blume) A.DC) di determinasi di herbarium jatinangor departemen biologi FMIPA universitas padjajaran bandung.

3.5.2 Persiapan dan Pembuatan Simplisia Daun Cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC)

Tumbuhan daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) diperoleh dari Medan, Sumatera Utara. Setelah daun tersebut di terima dalam bentuk simplisia kering, dimana sudah dilakukan proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. kemudian simplisia diekstraksi dengan metode meserasi.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Daun Cep-Cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC)

Simplisia daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) serbuk sebanyak 5kg dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Sebab etanol 70% yakni pelarut universal yang dapat memikat senyawa yang memiliki sifat polar maka non polar (kian ke senyawa kurang polar) serta didiamkan selama 72 jam sesekali dilakukan pengadukan sehingga di dapatkan hasil ekstrak yang kian optimal (Ambaro *et al.*, 2020). Ekstrak disimpan dalam suhu 4°C sebelum digunakan dalam percobaan. Ekstrak etanol kering dilarutkan dalam air suling untuk menyiapkan dosis yang berbeda (Alkandahri., 2019).

3.5.4 Penginduksi Pada Hewan Uji

Ditimbang bobot tikus, setelah didapat disesuaikan dengan dosis induksi gentamisin 80 mg/kg. Setelah itu diukur volume larutan gentamisin serta diberikan secara intraperitoneal (Aiswarya *et al.*, 2018).

3.5.5 Pengelompokan Perlakuan Pada Hewan Uji

Tikus jantan galur wistar bersama berat sekitar 100 – 200 g serta berumur 15 – 20 minggu digunakan selaku hewan uji dalam penelitian ini. Dengan memanfaatkan hewan uji 20 ekor tikus diacak. Perlakuan di bagi mempunyai 5 kelompok percobaan. Kelompok pertama ialah kontrol normal dihari ke-1 sampai ke-8 hanya di berikan aquadest, kelompok kontrol negatif di hari ke1 sampai ke-3 di berikan suspense PGA 1% dilanjut hari ke-4 smapai ke-8 tikus putih jantan galur wistar diinduksi gentamisin bersama dosis 80 mg/kg, serta kelompok uji yang diberikan ekstrak daun cep-cepan (*Castanopsis costata* (Blume) A.DC) pada 3 tikus putih jantan galur wistar dengan berbagai dosis. Hari ke-1 sampai hari ke-3 sebelum di induksi hewan uji diberi ekstrak daun cep-cepan bersama berbagai dosis. Selanjutnya pada hari ke-4 sampai hari ke-8 hewan uji di induksi dengan gentamisin 80 mg/kg secara intraperitoneal dan diberikan ekstrak daun cep-cepan bersama berbagai dosis.

3.5.6 Pengujian Hispatologi

Setelah dilakukan perlakuan, di hari ke-9 tikus putih galur wistar di beri anestesi di korbakan memanfaatkan anestesi ketamine serta xylazine untuk di ambil organ ginjal setelah itu dilakukan analisis histopatologi. Dengan cara difiksasi dan di rendam dengan larutan NBF 10% selama satu hari, potong serta tempatkan dalam wadah sampel plastik. Selain itu, proses dehidrasi dilakukan selama 2 jam pada tiap-tiap konsentrasi alkohol bertahap 70%, 80%, serta 90% alkohol, I absolut serta II absolut. Mereka kemudian dibersihkan dalam xylene, kemudian dicetak parafin, serta preparat dicetak bersama blok parafin serta disimpan di lemari es. Blok parafin selanjutnya

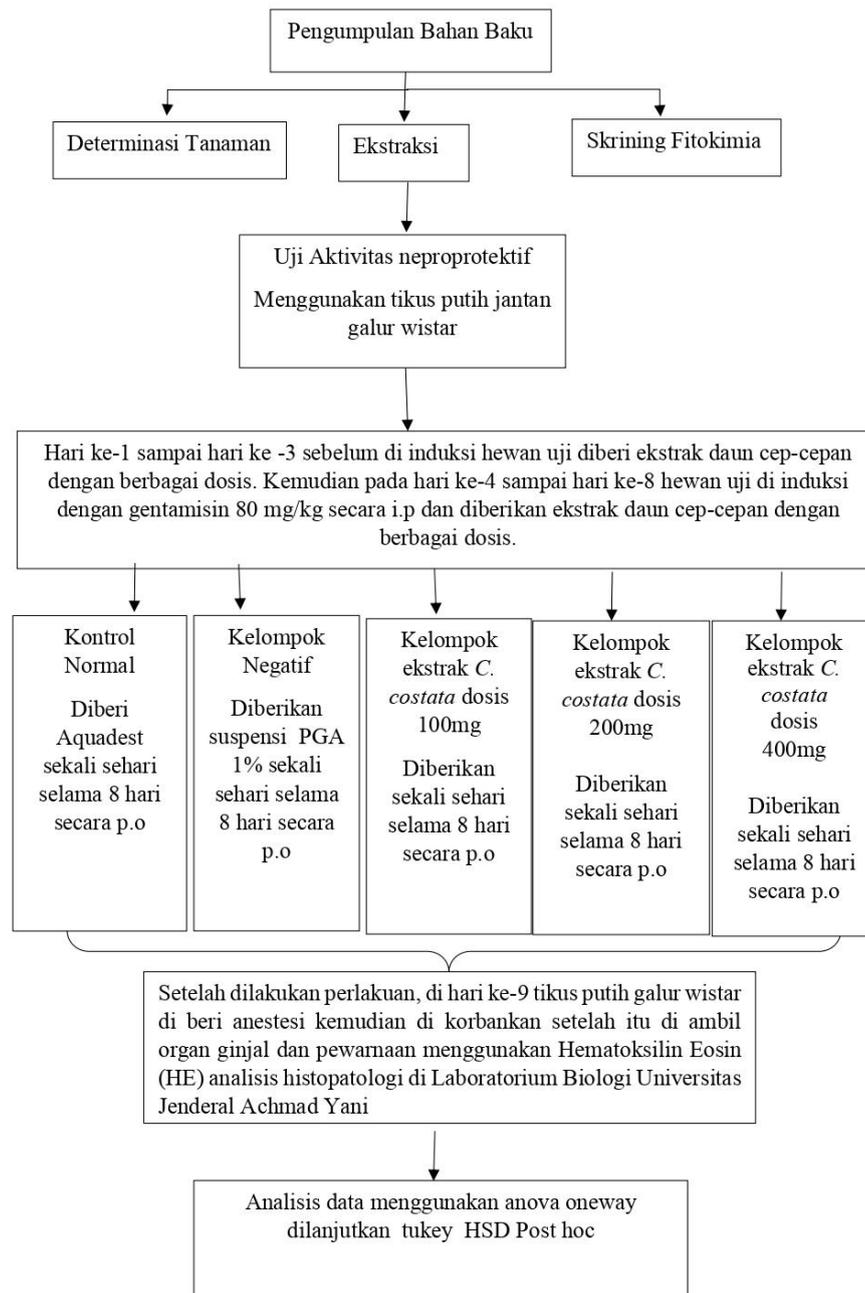
dipotong menjadi irisan tipis bersama ketebalan 5-6 μm selanjutnya memanfaatkan mikrotom. Hasil ukiran direndam bersama air hangat bersuhu 60°C selama 24 jam untuk meregangkan kain tanpa kerutan. Sediaan kemudian diangkat, ditempatkan pada objek glass serta diwarnai bersama hematoxilin serta eosin (HE). Mereka selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop bersama pembesaran 400x. Pengamatan kemudian dijalankan. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di laboratorium Universitas Jenderal Achmad Yani.

3.6 Lokasi dan Tempat Penelitian

Studi dijalankan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana perjuangan Karawang pertengahan pada bulan Januari 2023 serta Laboratorium Biologi Universitas Jenderal Achmad Yani pertengahan pada bulan Maret 2023.



3.7 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.8 Analisis Data

Hasil studi ditampilkan sebagai nilai rata-rata \pm SEM. Pengujian statistika memanfaatkan One way analisis Varians (ANOVA) dilakukan agar menetapkan perbedaan nilai rata-rata antara kelompok perlakuan. Kemudian dijalankan bersama Uji Turkey HSD untuk menentukan apakah terdapat perbedaan relevan ($p < 0,05$) pada tiap-tiap kelompok (Alkandahri *et al.*, 2021).

