

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen karena dalam penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena penelitian ini dilakukan di dalam laboratorium sehingga data dianggap homogen. Penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan ekstrak daun *Ageratum conyzoides* pada mencit betina. Pemberian ekstrak daun *A. conyzoides* dilakukan dengan cara diinjeksikan di bagian intraperitoneal selama tujuh hari dengan tempo sehari sekali. Selama tahap perlakuan, seluruh mencit diberikan pakan standar dan air minum selama tujuh hari.

Jumlah sampel yang diperlukan beserta pengulangannya menurut rumus Gomez dan Gomez (1983) :

$$T(r-1) \geq 20$$

Jika $T = 6$, maka $6(r-1) \geq 20$

$$6r - 6 \geq 20$$

$$r \geq 26/6$$

$$r \geq 4,33 \text{ dibulatkan jadi } 4$$

Keterangan:

T = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Sebanyak 24 mencit betina yang digunakan dibagi menjadi enam kelompok konsentrasi pemberian ekstrak daun *Ageratum conyzoides*, yaitu kontrol (mencit diberi larutan salin normal), konsentrasi 14 mg/kg bb, 28 mg/kg bb, 42 mg/kg bb, 56 mg/kg bb, dan 70 mg/kg bb. Ekstrak daun diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut *methanol*. Sebelum diinjeksikan pada mencit, hasil ekstraksi yang berupa pasta dilarutkan menggunakan larutan salin normal (Ita, 2007). Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu. Penimbangan berat badan dilakukan setiap sebelum perlakuan. Parameter yang diukur adalah jumlah butir darah merah, butir darah putih, kadar hemoglobin, berat badan, organ hati dan ginjal mencit.

Setiap kotak diberi tanda dan nomor untuk mencit. Penempatan perlakuan pada setiap kandang dilakukan randomisasi. Setelah dirandom, maka penempatan mencit pada kelompok perlakuan dalam setiap kandang sebagai berikut.

Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi Mencit

21C	12F	23F	17B
10B	9A	11A	6E
15C	20B	1D	4E
8D	19D	5A	2C
7F	14D	18C	16F
13E	24B	22A	3E

Tabel 3.2 Peta kandang

Kandang	Nomor Mencit			
A	5	11	22	9
B	17	10	20	24
C	15	18	2	21
D	1	14	8	19
E	13	3	6	4
F	12	7	23	16

Keterangan:

- A: kontrol (diberi larutan salin normal/ NaCl 0,9%)
- B: ekstrak daun bandotan konsentrasi 14 mg/kg bb
- C: ekstrak daun bandotan konsentrasi 28 mg/kg bb
- D: ekstrak daun bandotan konsentrasi 42 mg/kg bb
- E: ekstrak daun bandotan konsentrasi 56 mg/kg bb
- F: ekstrak daun bandotan konsentrasi 70 mg/kg bb

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua mencit (*Mus musculus* L.) betina galur *Swiss Webster*. Sampel dalam penelitian ini yang diambil adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina galur *Swiss Webster* berat 25 - 30 gram.

D. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Struktur Hewan Jurusan Pendidikan Biologi, dan Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

Terlampir pada Lampiran 14.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pemeliharaan Hewan Uji

Dalam penelitian ini digunakan hewan mencit putih dengan galur, umur, jenis kelamin, dan kondisi lingkungan yang relatif sama untuk menghindari perbedaan aktivitas biologi. Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi pada suhu ruang 23-26⁰C selama tujuh hari dengan tujuan agar hewan dapat beradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama penelitian. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di rumah Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

Mencit dikelompokkan ke dalam enam kandang berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan enam ekor mencit di setiap kandangnya. Selama aklimatisasi, mencit diberi pakan standar dan minum. Botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang dengan air apabila air telah habis. Aklimatisasi dilakukan untuk meminimalisir faktor-faktor yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung (Rachmawati dan Utami, 2011). Pemilihan jenis kelamin betina dilakukan untuk meminimalisir kematian mencit, dikarenakan jika dibandingkan dengan mencit jantan, maka mencit jantan mempunyai sifat yang jauh lebih agresif.

Hewan uji dikelompokkan menjadi enam kelompok, yaitu :

- (1) Kelompok kontrol, pada kelompok kontrol mencit diinjeksikan larutan saline normal (NaCl 0,9%) atau tanpa pemberian ekstrak daun *Ageratum conyzoides* sebanyak 0,3 ml/hari.

- (2) Kelompok D1, mencit diinjeksikan ekstrak daun *Ageratum conyzoides* dengan konsentrasi 14 mg/kg bb sebanyak 0,3 ml/hari.
- (3) Kelompok D2, mencit diinjeksikan ekstrak daun *A. conyzoides* dengan konsentrasi 28 mg/kg bb sebanyak 0,3 ml/hari.
- (4) Kelompok D3, mencit diinjeksikan ekstrak daun *A. conyzoides* dengan konsentrasi 42 mg/kg bb sebanyak 0,3 ml/hari.
- (5) Kelompok D4, mencit diinjeksikan ekstrak daun *A. conyzoides* dengan konsentrasi 56 mg/kg bb sebanyak 0,3 ml/hari.
- (6) Kelompok D5, mencit diinjeksikan ekstrak daun *A. conyzoides* dengan konsentrasi 70 mg/kg bb sebanyak 0,3 ml/hari.

b. Pembuatan Ekstrak Daun *A. conyzoides*

Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah Metode Harborne (1987) yaitu bahan diekstrak dengan *rotary evaporimeter*, proses ekstraksi yang dilakukan adalah ekstrak kasar, adapun tahapannya adalah daun *A. conyzoides* dibersihkan dari sisa tanah dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Selanjutnya daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

Selanjutnya dilakukan maserasi. Tahap ini merupakan tahap yang cukup menentukan keberhasilan karena dalam tahap ini harus mengetahui pelarut yang cocok untuk senyawa tertentu. Daun yang sudah dihaluskan kemudian direndam dengan pelarut *methanol* selama dua hari pada suhu kamar. Sebagai asumsi pelarut *methanol* dapat menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun *A. conyzoides*,

khususnya senyawa yang polar (larut dalam air). Maserasi minimum 3x24 jam diulang beberapa kali sampai diperoleh maserat bening. Hasil proses maserasi kemudian disaring dengan kertas saring.

Daun hasil maserasi kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporimeter* pada suhu 50⁰C sehingga diperoleh ekstrak berbentuk pasta. Pasta ditimbang sesuai dengan konsentrasi ekstrak yang digunakan kemudian dilarutkan dengan larutan salin normal (NaCl 0,9%). Larutan ekstrak yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik dengan tutup yang baik dan siap diinjeksikan terhadap mencit.

c. Pembuatan Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak daun *Ageratum conyzoides* diberikan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu pemberian ekstrak daun *A. conyzoides* terhadap tikus dengan konsentrasi 200 mg/kg bb, 400 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb (Ita *et al.*, 2007) dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan untuk mengkonversi dosis tikus ke mencit. Nilai konversi didapatkan sebesar 0,14 (Lauren dan Bacharac, 1964 dalam Nur, 2010). Nilai konversi dapat dilihat lebih jelas pada Lampiran 1.

Konsentrasi yang diambil adalah konsentrasi terendah dan tertinggi yaitu 200 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb untuk tikus, maka perhitungan konversi konsentrasi ekstrak daun untuk mencit adalah 28 mg/kg bb dan 70 mg/kg bb. Konsentrasi ekstrak daun kemudian dimodifikasi menjadi ekstrak dengan konsentrasi 14 mg/kg bb, 28

mg/kg bb, 42 mg/kg bb, 56 mg/kg bb, dan 70 mg/kg bb. Sedangkan dosis pemberian ekstrak daun dilihat dari volume penyuntikan untuk mencit umumnya adalah 1 ml/100 g bobot badan (Singagerda, 2009). Apabila rata-rata berat badan mencit sebesar 30 gram, maka volume penyuntikan yang diinjeksikan pada mencit adalah 0,3 ml. Penyuntikan larutan ekstrak dilakukan secara intraperitoneal (Bamidele, 2010).

2. Tahap Perlakuan

Perlakuan pertama yang dilakukan adalah mencit diberi pakan setiap satu kali sehari. Kemudian mencit diberi ekstrak daun *Ageratum conyzoides* dengan cara diinjeksikan melalui intraperitoneal sesuai dengan kelompok konsentrasi yang telah ditentukan selama tujuh hari. Penimbangan dilakukan setiap harinya sebelum pemberian ekstrak daun *A. conyzoides*. Penimbangan dilakukan dengan menggunakan neraca Ohaus.

3. Tahap Pengambilan Sampel Darah

Mencit yang telah diberi perlakuan ekstrak daun *A. conyzoides* pada hari ke satu, tiga, lima, dan hari ketujuh dilakukan pengambilan sampel darah. Sampel darah mencit diambil dari bagian ekornya. Ujung ekor mencit dipotong sedikit sampai mengeluarkan darah, selanjutnya ekor diurut dari bagian pangkal sampai ujung ekor agar dapat mempermudah proses keluarnya darah. Darah yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang sebelumnya telah diberi zat Heparin

yang bertujuan agar darah tidak cepat membeku. Darah yang dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* sebanyak $\pm 0,5$ ml kemudian disimpan pada lemari es 4°C .

4. Penghitungan Darah dan Berat Organ

a. Penghitungan Butir Darah Merah (BDM)

Penghitungan butir darah merah (BDM) dilakukan dengan menggunakan Hemositometer Neubauer (skala pipet 0,5-1,0-101). Larutan yang digunakan sebagai pengencer darah yaitu larutan Hayem. Darah dihisap dari tabung *ependorf* menggunakan pipet pengencer hingga skala 0,5. Ujung pipet tersebut dibersihkan menggunakan kertas saring. Hindari adanya udara diantara darah di dalam pipet sewaktu menghisap, apabila terjadi hal itu maka darah harus segera dikeluarkan dari pipet dan penghisapan darah harus diulangi. Setelah penghisapan darah berlangsung dengan baik maka segera menghisap larutan Hayem hingga skala 101. Pipet kemudian dikocok dengan hati-hati selama dua menit. Setelah dua menit, lima tetesan pertama larutan darah dibuang, setelah itu ujung pipet diletakkan diantara gelas objek dan gelas penutup hemositometer hingga larutan darah mengalir dengan bebas. Larutan darah kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (Sastradipradja *et al.*, 1989).

Butir darah merah (BDM) dihitung menggunakan lima kotak kecil yang terletak di empat sudut kamar hitung dan satu ditengah yang masing-masing kotak kecil terdiri dari 16 kotak terkecil. Darah yang dihisap hingga skala 0,5 ditambahkan larutan pengencer hingga skala 101 dan dikurangi satu bagian yang tidak ikut

tercampur sehingga pengencerannya 200x. Adapun perhitungan jumlah BDM yaitu sebagai berikut (Sastradipradja *et al.*, 1989) :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah BDM/mm}^3 \text{ darah} &= 200 \times 50 \times b \text{ butir darah} \\ &= b \times 10^4 \text{ butir} \end{aligned}$$

Keterangan : b = jumlah BDM dalam lima kotak.

b. Penghitungan Butir Darah Putih (BDP)

Penghitungan butir darah putih (BDP) dilakukan dengan menggunakan Hemositometer Neubauer (skala pipet 0,5-1,0-11). Larutan yang digunakan sebagai pengencer darah yaitu larutan Turk. Darah dihisap dari tabung *ependorf* menggunakan pipet pengencer hingga skala 0,5. Ujung pipet tersebut dibersihkan menggunakan kertas saring. Hindari adanya udara diantara darah di dalam pipet sewaktu menghisap, apabila terjadi hal itu maka darah harus segera dikeluarkan dari pipet dan penghisapan darah harus diulangi. Setelah penghisapan darah berlangsung dengan baik maka segera menghisap larutan Turk hingga skala 11. Pipet kemudian dikocok dengan hati-hati selama dua menit. Setelah dua menit, lima tetesan pertama larutan darah dibuang, setelah itu ujung pipet diletakkan diantara gelas objek dan gelas penutup hemositometer hingga larutan darah mengalir dengan bebas. Larutan darah kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (Sastradipradja *et al.*, 1989).

Butir darah putih (BDP) dihitung menggunakan empat kotak yang terletak di keempat sudut kamar hitung yang masing-masing terdiri dari 16 kotak. Darah yang

dihisap hingga skala 0,5 ditambahkan larutan pengencer hingga skala 11 dan dikurangi satu bagian yang tidak ikut tercampur sehingga pengencerannya 20x. Adapun perhitungan jumlah BDP yaitu sebagai berikut (Sastradipradja *et al.*, 1989) :

$$\begin{aligned}\text{Jumlah BDP/mm}^3 \text{ darah} &= 20 \times \frac{10}{4} \times a \text{ butir darah} \\ &= a \times 50 \text{ butir}\end{aligned}$$

Keterangan : a = jumlah BDP dalam empat kotak.

c. Pengukuran Kadar Hemoglobin Darah

Pengukuran kadar hemoglobin (Hb) darah dilakukan dengan metode Sahli yaitu darah yang telah diencerkan dengan larutan HCl 0,1 N disamakan warna campurannya dengan warna cairan yang terdapat pada tabung standar. Larutan HCl 0,1 N dihisap dari botol hingga skala yang tertera pada pipet Sahli yaitu 0,02 ml kemudian dipindahkan dengan ke dalam tabung pengencer Sahli. Darah dihisap menggunakan pipet Sahli hingga skala 0,02 ml kemudian darah tersebut segera dipindahkan ke dalam tabung pengencer dengan cara meniup pipet secara perlahan-lahan. Pipet kemudian dibilas menggunakan larutan HCl 0,1 N selama beberapa kali agar tidak ada sisa darah yang tertinggal didalam pipet. Darah yang didalam tabung pengencer diencerkan kembali menggunakan larutan aquades setetes demi setetes dan dihomogenkan secara perlahan menggunakan pengaduk gelas hingga warna darah dalam tabung sama dengan warna cairan pada tabung standar. Apabila warna campuran darah yang telah sama warnanya dengan warna cairan pada tabung standar

maka didapatkan konsentrasi Hb dalam darah tersebut dengan cara membaca skala yang terdapat pada tabung pengencer (Winatasasmita *et al.*, 2010).

d. Pengukuran Berat Hati dan Ginjal

Mencit yang telah diberi ekstrak daun *Ageratum conyzoides* selama tujuh hari, dibedah untuk memperoleh organ hati dan ginjal. Sebelumnya dilakukan penimbangan berat badan terlebih dahulu, selanjutnya mencit dimasukkan ke dalam wadah berisikan kapas yang telah ditetesi larutan eter. Hal ini bertujuan agar mencit terbius dan pingsan. Mencit yang pingsan kemudian diletakkan pada bak bedah dengan posisi ditelentangkan. Bagian tangan dan kaki mencit direntangkan menggunakan jarum sehingga bagian perut dapat terlihat dan mempermudah proses pembedahan. Bagian perut mencit dibedah lalu organ hati dan ginjal mencit diambil dan dimasukkan ke dalam larutan salin normal (NaCl 0,9%). Organ hati dan ginjal mencit dibersihkan dari sisa darah menggunakan larutan salin normal. Organ hati dan ginjal mencit yang telah bersih dari darah dan sisa-sisa larutan salin normal, kemudian dilakukan penimbangan berat masing-masing organ menggunakan timbangan Ohaus.

G. Analisis Data

Data yang didapatkan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji normalitas menggunakan uji *Test Of Normality (Kolmogorov-Smimov)* dan uji homogenitas menggunakan *Tes of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*. Data yang

terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis parameterik yaitu analisis varian (*ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji wilayah perbandingan berganda *Duncan* (Trihendradi, 2008 dalam Nur 2010). Analisis data menggunakan *Software SPSS 16 for Windows*.



H. Alur Penelitian

