

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 metanol akar *Ageratum conyzoides* pada mencit betina. Pemberian ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dilakukan dengan cara diinjeksikan secara intraperitoneal selama tujuh hari. Selama tahap perlakuan, seluruh mencit diberikan pakan standar CP551 dan air minum secara *ad libitum*.

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

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

Jika $T = 6$, maka

$$6(r-1) \geq 20$$

$$6r-6 \geq 20$$

$r \geq 4,3$ dibulatkan menjadi 4

Keterangan:

T = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Sebanyak 24 mencit betina yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok konsentrasi pemberian ekstrak metanol akar *Ageratum conyzoides* yaitu 14 mg/kg, 28 mg/kg, 42 mg/kg, 56 mg/kg, dan 70 mg/kg, serta ditambah satu kelompok kontrol (mencit hanya diberi larutan salin normal). Ekstrak metanol akar diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Sebelum diinjeksikan pada mencit, hasil ekstraksi yang berupa pasta dilarutkan menggunakan larutan salin normal (Ita *et al.*, 2007).

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu. Penimbangan berat badan dilakukan setiap hari sebelum perlakuan. Parameter yang diukur adalah jumlah butir darah merah, butir darah putih, kadar hemoglobin, berat badan, berat organ hati dan ginjal.

Berikut merupakan Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 yang menyajikan tabel pengacakan dan penempatan mencit dalam kandang :

Tabel 3.1 Pengaturan Pengacakan 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 metanol akar *Ageratum conyzoides* konsentrasi 14 mg/kg
 C: ekstrak metanol akar *A. conyzoides* konsentrasi 28 mg/kg
 D: ekstrak metanol akar *A. conyzoides* konsentrasi 42 mg/kg
 E: ekstrak metanol akar *A. conyzoides* konsentrasi 56 mg/kg
 F: ekstrak metanol akar *A. conyzoides* konsentrasi 70 mg/kg

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) betina galur *Swiss Webster*. Sampel dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina galur *Swiss Webster* usia tiga bulan.

D. Lokasi Penelitian

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

E. Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 15.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pemeliharaan Hewan Uji

Pemeliharaan hewan uji ini dilakukan selama satu minggu. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah mencit betina galur *Swiss Webster* yang berusia tiga bulan. Mencit terlebih dahulu diaklimatisasi pada suhu ruang 23-26 °C selama satu minggu. Aklimatisasi dilakukan dengan tujuan agar mencit tersebut dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Pemeliharaan mencit berlokasi di rumah hewan Kebun Botani UPI. Mencit-mencit tersebut dipelihara di dalam kandang yang terbuat dari bak plastik dengan ukuran 30x20x12 (cm) yang telah dialasi serbuk gergaji dengan masing-masing kandang berisikan empat ekor mencit betina dan diberi pakan CP551 serta air minum secara *ad libitum*.

Hewan uji dikelompokkan menjadi enam kelompok, yaitu : (1) kelompok kontrol, pada kelompok kontrol mencit diinjeksikan larutan salin normal (NaCl 0,9%), tanpa pemberian ekstrak metanol akar *Ageratum conyzoides*. (2) kelompok mencit yang diinjeksikan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan konsentrasi 14 mg/kg BB. (3) kelompok mencit yang diinjeksikan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan konsentrasi 28 mg/kg BB. (4) kelompok mencit yang diinjeksikan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan konsentrasi 42 mg/kg BB. (5) kelompok mencit yang diinjeksikan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan konsentrasi 56 mg/kg BB. (6) kelompok mencit yang diinjeksikan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan konsentrasi 70 mg/kg BB.

b. Pembuatan Ekstrak Metanol Akar *Ageratum conyzoides*

Pembuatan ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Langkah pertama dimulai dengan mempersiapkan akar *A. conyzoides* terlebih dahulu. Akar dibersihkan dari sisa tanah kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Akar tersebut ditimbang sampai mencapai berat konstan. Akar yang sudah mencapai berat konstan kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender sehingga menghasilkan bentuk serbuk. Hasil tersebut disaring menggunakan penyaring berdiameter paling kecil agar serbuk yang didapat lebih halus. Simplisia yang halus tersebut kemudian ditimbang sebelum dilakukan proses ekstraksi. Simplisia akar sebanyak 35 gram direndam metanol sampai simplisia terendam selama 3x24 jam. Campuran metanol tersebut disaring menggunakan kertas saring kemudian diuapkan pada *water bath* dengan suhu 52⁰C sampai metanolnya habis menguap dan hasil ekstraksi 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. Ekstrak yang tidak digunakan disimpan dalam kulkas 4⁰C.

c. Pembuatan Konsentrasi

Konsentrasi ekstrak metanol akar *A. conyzoides* diberikan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu pemberian ekstrak etanol alkaloid daun *A. conyzoides* terhadap tikus albino dengan konsentrasi 200 mg/kg, 400 mg/kg dan 500 mg/kg

BB (Ita *et al.*, 2007). Konsentrasi tersebut kemudian dikonversi agar dapat digunakan pada mencit yaitu dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan. Nilai konversi dari tikus ke mencit didapatkan sebesar 0,14 (Lauren dan Bacharac, 1964 dalam Nur, 2010). Nilai konversi dapat dilihat lebih jelas pada Lampiran 12.

Konsentrasi 200 mg/kg, 400 mg/kg dan 500 mg/kg yang diberikan untuk tikus (Ita *et al.*, 2007), maka perhitungan konversi konsentrasi ekstrak untuk mencit adalah 28 mg/kg, 56 mg/kg, dan 70 mg/kg BB (Lampiran 13). Konsentrasi ekstrak kemudian dimodifikasi menjadi ekstrak dengan konsentrasi 14 mg/kg, 28 mg/kg, 42 mg/kg, 56 mg/kg, dan 70 mg/kg. Sedangkan dosis pemberian ekstrak metanol akar disesuaikan dengan volume penyuntikan untuk mencit yaitu 1 ml/100 g bobot badan mencit (Singagerda, 2009). Penyuntikan ekstrak pada mencit dilakukan secara intraperitoneal (Bamidele, 2010).

2. Tahap Perlakuan

Perlakuan pemberian ekstrak metanol akar *Ageratum conyzoides* dilakukan selama tujuh hari. Perlakuan dan pemberian pakan dilakukan setiap hari mulai pukul 09.30 pagi hingga selesai. Sebelum dimulai perlakuan, masing-masing mencit diukur berat badannya terlebih dahulu. Pengukuran dilakukan selama perlakuan untuk dapat melihat perubahan berat badan. Setelah pengukuran berat badan, mencit kemudian diberi ekstrak metanol akar *A. conyzoides* dengan cara diinjeksikan melalui intraperitoneal sesuai dengan kelompok konsentrasi yang telah ditentukan secara hati-hati.

3. Tahap Pengambilan Sampel Darah

Mencit yang telah diberi perlakuan ekstrak metanol akar *Ageratum conyzoides* pada hari ke-1, 3, 5, dan hari ke-7 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 eppendorf sebanyak $\pm 0,5$ ml kemudian simpan sampel darah yang telah dikumpulkan pada lemari es 4°C untuk selanjutnya dilakukan tahap penghitungan.

4. Penghitungan Struktur Darah dan Berat Organ

a. 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 eppendorf 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 membentuk angka 8 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) :

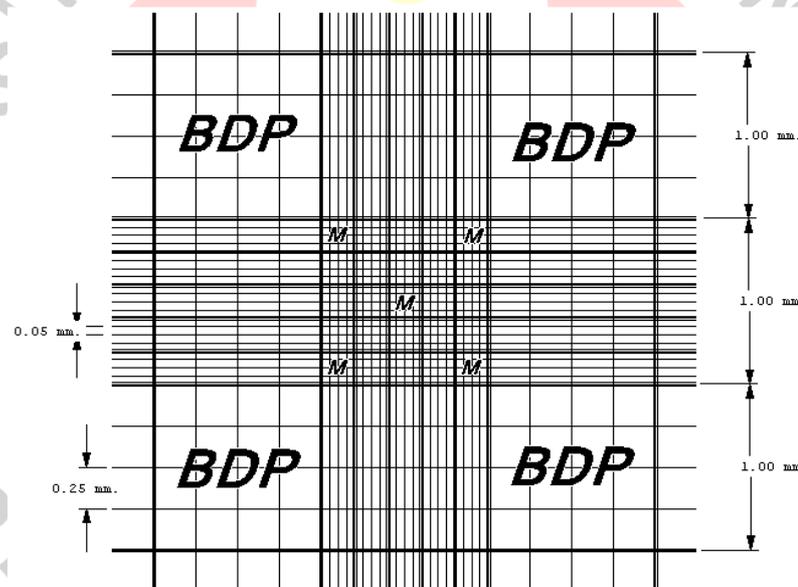
$$\begin{aligned} \text{Jumlah BDP/mm}^3 \text{ darah} &= 20 \times \frac{10}{4} \times a \text{ butir darah} \\ &= a \times 50 \text{ butir} \end{aligned}$$

Keterangan : a = total BDP dalam empat kotak

b. 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 eppendorf 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 membentuk angka 8 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). Gambar 3.1 dibawah ini adalah gambaran kamar hitung Hemositometer Neubauer yang digunakan untuk menghitung jumlah butir darah merah dan putih.



Gambar 3.1 Kamar Hitung Hemositometer Neubauer
 Sumber : <http://www.hausserscientific.com>

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

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. Campuran darah tersebut didiamkan selama 3 menit sampai terbentuk asam hematin berwarna coklat. Darah yang didalam tabung pengencer diencerkan kembali menggunakan 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.

d. Pengukuran Berat Hati dan Ginjal

Mencit yang telah diberi ekstrak metanol akar *Ageratum conyzoides* selama tujuh hari dibedah untuk memperoleh organ hati dan ginjal. 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. 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.

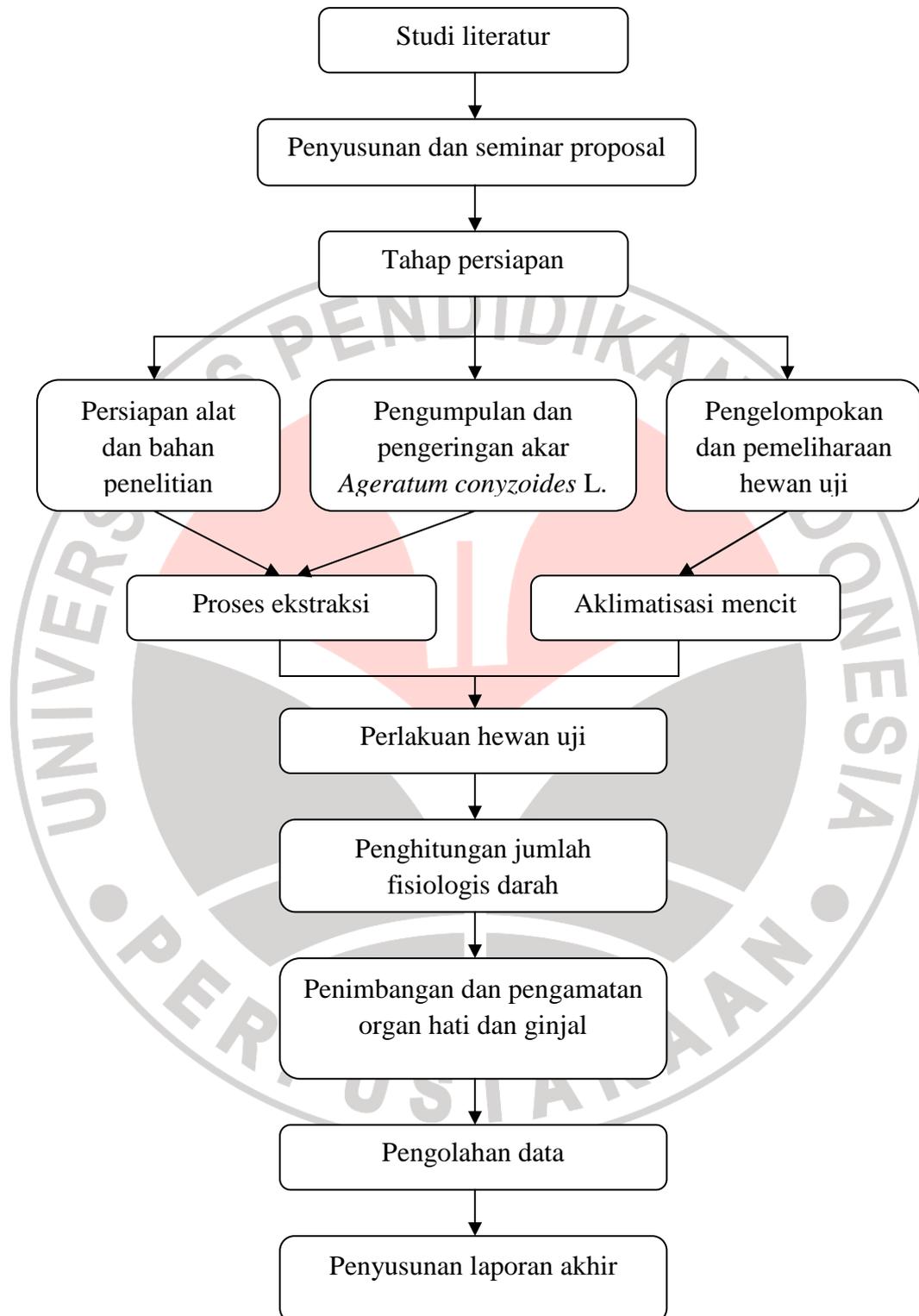
5. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dianalisis menggunakan program SPSS 16 *for windows*. Tahap awal yang dilakukan adalah uji persyaratan yaitu uji homogenitas dan uji normalitas. Uji homogenitas menggunakan uji *Levens* dan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika varians data bervariasi homogen serta berdistribusi normal, maka dianalisis menggunakan statistik parametrik yaitu

menggunakan uji *ANOVA (Analysis of Variance) One-way*. Selanjutnya dilakukan uji *Duncan* untuk mengetahui konsentrasi dari ekstrak akar yang berpengaruh terhadap berat badan, struktur darah, berat organ hati dan ginjal mencit.



6. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian