

BAB III

SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian, Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan *swiss webster*. Mencit yang berumur 2-4 bulan dengan berat badan 25-40 gram.

3.1.2 Kriteria Inklusi

- a. Mencit (*Mus musculus*) jantan galur *swiss webster* yang berjenis kelamin jantan berumur 2-4 bulan
- b. Berat badan mencit 25-40 gram
- c. Mencit dalam keadaan sehat
- d. Mencit belum pernah dipakai dalam penelitian sebelumnya

3.1.3 Kriteria Eksklusi

Mencit (*Mus musculus*) jantan galur *swiss webster* yang sakit atau mati saat penelitian.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris menggunakan desain penelitian *post test only control group design*.

3.2.2 Variabel Penelitian

A. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: konsentrasi ekstrak etanol teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)
2. Variabel Terikat: waktu perdarahan pada luka
3. Variabel Terkendali :
 - a. Spesies mencit
 - b. Jenis kelamin mencit
 - c. Umur mencit
 - d. Berat badan mencit
 - e. Makanan standar mencit
 - f. Panjang luka potong.

B. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau	Hasil ekstraksi daun teh hijau dengan etanol dan dilarutkan dengan <i>carboxymethyl cellulose</i> (CMC) menjadi konsentrasi 10%, 20%, dan 40% sesuai ketentuan Farmakope Indonesia	Gelas ukur	Mililiter	Numerik

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
2	Waktu Perdarahan	Kemampuan efektifitas daun teh hijau dalam menghambat proses perdarahan. Efektifitas berdasarkan waktu perdarahan mulai dari perdarahan ekor mencit dimulai sampai berhenti	Kertas saring	Menit	Numerik
3	Spesies mencit	Spesies mencit yang digunakan adalah mencit (<i>Mus musculus</i>) jantan galur <i>swiss webster</i>			
4	Jenis kelamin mencit	Jenis kelamin yang digunakan adalah mencit jantan			
5	Umur mencit	Umur mencit pada penelitian ini adalah 2-4 bulan			
6	Berat mencit	Berat badan mencit pada penelitian ini 25-40 gram	Timbang-an	Gram	Numerik
7	Makanan standar mencit	Pakan mencit menggunakan pellet	Timbang-an	Gram	Numerik
8	Panjang pemotongan ekor mencit	Ekor mencit akan dipotong sekitar 2-3 mm dari ujung ekor	Penggaris	Milimeter	Numerik
9	Epinefrin	Obat kontrol positif dengan dosis 0,5 mg/200 g berat mencit			

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
10	<i>Carboxymethyl cellulose</i>	Zat pengental ekstrak yang akan membagi ekstrak menjadi konsentrasi 10% (10 ml), 20% (20 ml), dan 40% (40 ml)	Pipet tetes	Mililiter	Numerik

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Ohaus*), gunting bedah, stopwatch, kertas saring, kompor listrik, kapas, dan *povidone iodine*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40%, epinefrin, *carboxymethyl cellulose* (CMC), *povidone iodine* dan mencit (*Mus musculus*) jantan galur *swiss webster*.

3.2.3.2 Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun teh hijau

Pada pembuatan ekstrak etanol daun teh hijau pada penelitian ini menggunakan prinsip dari pedoman Farmakope Indonesia edisi V. Daun teh yang dipilih berdasarkan kriteria untuk mendapatkan kadar tanin yang cukup, yakni bukan dari pucuk, tidak busuk dan tidak rusak. Daun teh dipetik di

kawasan perkebunan teh Ciwidey. Kemudian daun teh dibersihkan dengan air mengalir, kemudian di keringkan. Daun teh yang telah kering di uapkan dengan uap panas sehingga terjadi proses oksidasi enzimatis sehingga menjadi simplisia daun teh hijau. Simplisia daun teh hijau sebanyak satu kilogram dihaluskan dengan blender, kemudian direndam pada etanol 95% selama 24 jam. Untuk konsentrasi 10% dibutuhkan 1 gram ekstrak etanol daun teh hijau yang di rendam bersama 10 ml *carboxymethyl cellulose* (CMC), dan perbandingan yang sama untuk konsentrasi 20% dan 40%. Simplisia daun teh hijau kering direndam didalam perkulator, setelah didiamkan satu malam kemudian ekstrak dikeluarkan etanolnya lalu disaring menggunakan kertas saring. Etanol diuapkan sampai ekstrak kental dengan menggunakan alat rotavapor. Kemudian ekstrak dikeringkan dengan waterbath pada suhu 60° sampai 70° celcius.

2. Pembagian kelompok uji dan besar sampel per kelompok

Mencit (*Mus musculus*) jantan galur *swiss webster* akan ditimbang terlebih dahulu, sehingga berat badan mencit sesuai dengan kriteria inklusi dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, yakni dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Pembagian kelompok perlakuan dijabarkan dalam **Tabel**

3.2.

Tabel 3.2 Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol negatif, luka potong perdarahan ekor mencit dicelupkan <i>carboxymethyl cellulose</i> (CMC) (KI)
II	Kontrol positif, luka potong perdarahan ekor mencit dicelupkan epinefrin (KII)
III	Luka potong perdarahan ekor mencit dicelupkan ke dalam ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 10% (KIII)
IV	Luka potong perdarahan ekor mencit dicelupkan ke dalam ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 20% (KIV)
V	Luka potong perdarahan ekor mencit dicelupkan ke dalam ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 40% (KV)

Jumlah besar sampel per kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus Federer: $(n - 1)(t - 1) \geq 15$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$(n - 1)(4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Demi mencegah adanya mencit yang *drop out* karena tidak sesuai dengan kriteria eksklusi saat jalannya penelitian, maka ditambahkan 1 ekor mencit jantan pada masing-masing kelompok perlakuan. Maka jumlah mencit tiap kelompok

perlakuan menjadi 6 ekor, sehingga jumlah total mencit dari semua kelompok perlakuan adalah 30 ekor mencit jantan.

3. Perlakuan pada hewan uji

- a. Sebelum diberi perlakuan, ekor mencit di tandai dengan spidol untuk mempermudah urutan saat pemberian perlakuan
- b. Ekor mencit yang akan dipotong dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%
- c. Ekor mencit diukur dengan penggaris milimeter dan dipotong 2-3 mm dengan gunting bedah

4. Pemberian perlakuan

Pemberian perlakuan dilakukan setelah pemotongan ekor mencit sepanjang 2-3 mm dari ujung ekor. Ekor mencit yang telah dipotong di celupkan ke dalam ekstrak etanol daun teh hijau selama 5 detik. Kemudian waktu perdarahan diukur dengan *stopwatch* dari mulai darah menetes sampai darah berhenti pada kertas saring (luka tidak boleh menyentuh kertas saring)

5. Pengamatan dan pengumpulan data pengaruh perlakuan

Stopwatch dihentikan ketika sudah tidak ada lagi darah yang menetes pada kertas saring dan catat waktu yang tertera. Prosedur yang sama dilakukan pada kelompok kontrol positif dengan epinefrin, negatif dengan *carboxymethyl cellulose*, dan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau lainnya.

3.2.4 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat

Pembuatan ekstrak etanol daun teh hijau dan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi & Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

b. Waktu

Persiapan bahan penelitian meliputi daun teh sampai komponen pembuatan ekstrak, kontrol positif, kontrol negatif dan pemesanan mencit dilakukan terhitung sejak tanggal 17 Juni 2019 sampai jalannya penelitian dalam pengambilan waktu perdarahan mencit pada tiap kelompok dari tanggal 22 Juni 2019 – 28 Juni 2019.

3.2.5 Aspek Etik Penelitian

Aspek etik penelitian mengatur mengenai penderitaan hewan coba untuk kebaikan manusia akan dijamin kesejahteraan dan diperlakukan secara manusiawi serta menggunakan prinsip *replacement*, *reduction* dan *refinement*.

a. *Replacement*

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) jantan galur *swiss webster* dikarenakan memiliki ukuran ekor yang memenuhi untuk dilakukan perlakuan sehingga memudahkan untuk dilakukan pemotongan pada bagian tersebut dan penilaian terhadap waktu perdarahan.

b. Reduction

Jumlah mencit (*Mus musculus*) yang digunakan dalam penelitian ini telah dihitung dengan menggunakan rumus Federer sehingga penggunaan mencit (*Mus musculus*) pada penelitian ini efisien dan efektif.

c. Refinement

Setelah dilakukan perlakuan, ekor mencit akan diberi pengobatan dengan penggantian perban luka oleh kasa dan *povidone iodine* sampai ekor pulih kembali.

3.2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk*. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji analisis varians satu arah (*ANOVA*) untuk melihat adanya pengaruh pemberian ekstrak daun teh hijau terhadap waktu perdarahan.

3.2.7 Alur Penelitian

