

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia, Kimia dan Farmakologi.

3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

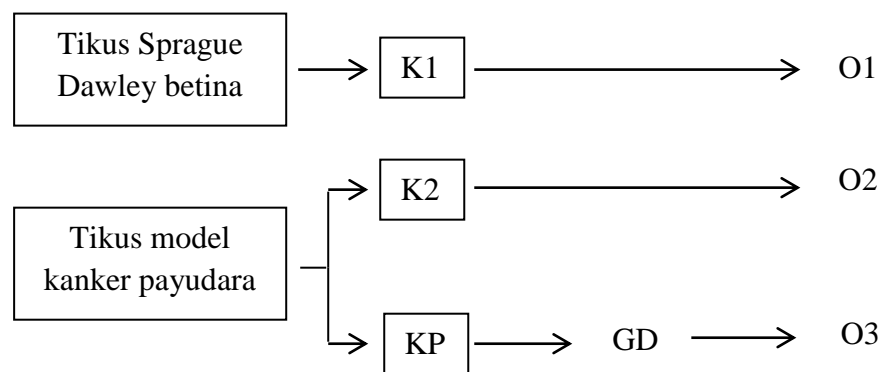
Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat:

- 1) Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu – Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta untuk pengadaan hewan coba, intervensi terhadap hewan coba, pengambilan sampel, serta pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT.
- 2) Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pembuatan ekstrak daun dewa.
- 3) Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro untuk uji determinasi tanaman daun dewa (*Gynura divaricata*).

Penelitian ini dilakukan selama 14 minggu selama bulan Februari-Mei 2016.

3.3 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok, yaitu satu kelompok kontrol negatif (K1), satu kelompok kontrol positif (K2), dan satu kelompok perlakuan (KP).



Gambar 5. Rancangan penelitian

Keterangan:

- K1 : Kelompok tikus Sprague Dawley betina yang tidak diinduksi maupun diberikan ekstrak daun dewa
- K2 : Kelompok tikus model kanker payudara yang tidak mendapat ekstrak daun dewa
- KP : Kelompok tikus model kanker payudara yang mendapat ekstrak daun dewa
- GD : Tikus diberikan ekstrak daun dewa dengan dosis 750 mg/kgBB per oral selama 14 hari
- O1, O2, O3 : Pengukuran kadar SGOT dan SGPT

3.4 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus Sprague Dawley betina normal dan model kanker payudara (induksi DMBA per oral) yang diperoleh dari LPPT-LP3HP Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.1 Kriteria Inklusi

- Tikus Sprague Dawley betina
- Usia 13-17 minggu
- Tidak ada kelainan anatomis yang tampak

3.4.2 Kriteria Eksklusi

- Tidak ditemukan adanya benjolan setelah diinduksi

3.4.3 Kriteria Drop Out

- Tikus mati

3.4.4 Cara Sampling

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *random sampling allocation*.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO *dalam Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok. Terdapat dua kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan,

sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 15 sampel.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun dewa (*Gynura divaricata*)

3.5.2 Variabel Tergantung

- Kadar SGOT
- Kadar SGPT

3.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Ekstrak daun dewa (<i>Gynura divaricata</i>)	Ekstrak berasal dari daun dewa (<i>Gynura divaricata</i>) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 45% dengan metode maserasi dan dilarutkan dalam PEG dengan konsentrasi larutan hasil pengenceran 56,25 mg/ml. Ekstrak diberikan dalam dosis 750 mg/kgBB selama 2 minggu.	mg/kgBB	Nominal
2.	Kadar SGOT	SGOT, adalah enzim aminotransferase yang berada pada hepar dalam konsentrasi tinggi, dapat diukur melalui darah sebagai indikator jejas pada hepar, dengan cara masing-masing kelompok dilakukan pengambilan darah 1cc melalui pleksus retroorbitalis dan didiamkan hingga serum keluar. Serum kemudian diolah mengikuti metode.	U/l	Rasio
3.	Kadar SGPT	SGPT, adalah enzim aminotransferase yang berada pada hepar dalam konsentrasi tinggi, dapat diukur melalui darah, sebagai indikator jejas pada hepar, dengan cara masing-masing kelompok dilakukan pengambilan darah 1cc melalui pleksus retroorbitalis dan didiamkan hingga serum keluar. Serum kemudian diolah mengikuti metode.	U/l	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

- 1) Pembuatan ekstrak
 1. Kain lunak
 2. Erlenmeyer
 3. Pisau
 4. *Waterbath*
 5. Gelar ukur
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
 1. Kandang hewan
 2. Timbangan hewan
 3. Sonde lambung *syringe*
 4. Tabung penampung
- 3) Pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT
 1. Kapas alkohol
 2. Sputit
 3. Tabung penampung
 4. Sentrifuge
 5. Mikropipet (+ *yellow tip* dan *blue tip*)
 6. Vortex-mixer
 7. Spektrofotometer MICROLAB 300

3.7.2 Bahan

- 1) Pembuatan ekstrak
 1. Daun dewa (*Gynura divaricata*)
 2. Alkohol 45%
 3. Aquadest
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
 1. 15 ekor tikus Sprague Dawley betina (5 ekor tikus normal dan 10 ekor tikus kanker payudara)
 2. Pakan dan minum standar
 3. Ekstrak daun dewa (*Gynura divaricata*)
- 3) Pemeriksaan kadar SGOT
 1. Darah vena/kapiler dari vena retroorbita
 2. Reagen Kit AST (GOT) (Dyasis)

a.Reagen 1	:	Tris pH 7,65	80 mmol/l
		L-aspartate	240 mmol/l
		Malate dehydrogenase (MDH)	≥ 600 U/l
		Lactate dehydrogenase (LDH)	≥ 900 U/l
b.Reagen 2	:	2-Oxoglutarae	12 mmol/l
		NADH	0,18 mmol/l
 3. Reagen pencuci cuvet khusus (Extran)
 4. Aquadest

4) Pemeriksaan kadar SGPT

1. Darah vena/kapiler dari vena retroorbita

2. Reagen Kit ALT (GPT)

a. Reagen 1	: Tris pH 7,15	80 mmol/l
	L-alanine	240 mmol/l
	Lactate dehydrogenase (LDH)	≥1700 U/l
b. Reagen 2	: 2-Oxoglutarae	12 mmol/l
	NADH	0,18 mmol/l

3. Reagen pencuci Cuvet khusus

4. Aquadest

5. NaCl fisiologis (9 g/l)

3.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT tikus Sprague Dawley mendapatkan data primer. Data diperoleh melalui pembacaan hasil pemeriksaan laboratorium terhadap kadar SGOT dan SGPT darah tikus Sprague Dawley betina dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Pembuatan ekstrak daun dewa

Daun tanaman *Gynura divaricata* mula-mula dibersihkan dan dipotong-potong, kemudian diletakkan pada tabung erlenmeyer yang telah diisi larutan etanol 45%. Setelah itu, lakukan maserasi selama 30 menit dengan cara menggoyang-goyangkan tabung erlenmeyer tersebut. Setelah selesai, didiamkan sebentar, lalu menyaring campuran tersebut

dengan menggunakan kain lunak untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian diproses refluks selama 30 menit dengan temperatur 90°C. Ekstrak yang telah didapat kemudian dilarutkan dengan *polyethylene glycol* (PEG) sehingga didapatkan konsentrasi akhir larutan setelah pengenceran adalah 56,25 mg/ml.

3.7.4.2 Perlakuan pada hewan coba

Kelompok kontrol negatif diberi pakan dan minum standar, kelompok kontrol positif diberi pakan dan minum standar disertai pemberian larutan PEG 1,25%, sedangkan kelompok perlakuan diberi pakan dan minum standar disertai pemberian ekstrak daun dewa (*Gynura divaricata*). Dosis yang diberikan adalah 750 mg/kgBB selama 14 hari. Sebelum diberikan perlakuan, tikus harus selalu ditimbang untuk mendapatkan dosis yang tepat.

3.7.4.3 Pengambilan data

Pemeriksaan laboratorium dilakukan pada hari ke-15, tikus pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk diambil darahnya pada plexus retroorbitalis untuk diperiksa kadar SGOT dan SGPT.

3.7.4.4 Pemeriksaan kadar SGOT

1. Membuat sediaan
 - a. Blanko aquades
 - b. Sampel:
 - Serum atau plasma 100 ul
 - Monoregent 1000 ul
2. Mencampur dengan seksama menggunakan vortex-mixer.
3. Membaca sampel 1, 2, 3 menit menggunakan spektrofotometer MICROLAB 300, pada panjang gelombang 340 nm Mode Kinetik dengan blank aquades.
4. Melakukan perhitungan

$$\text{Kadar SGOT} = \Delta \text{Abs sampel } x - 1745 \text{ U/l}$$

$$\text{Kisaran tes: } \Delta A_{0,16}/\text{menit} (279,2 \text{ U/l})$$

Nilai melebihi kisaran tersebut diencerkan 10x dengan 9 g/l NaCl, hasil dikali 10

3.7.4.5 Pemeriksaan kadar SGPT

1. Membuat sediaan
 - a. Blanko aquades
 - b. Sampel:
 - Serum atau plasma 100 ul
 - Monoregent 1000 ul
2. Mencampur dengan seksama menggunakan vortex-mixer.

3. Membaca sampel 1, 2, 3 menit menggunakan spektrofotometer MICROLAB 300, pada panjang gelombang 340 nm Mode Kinetik dengan blank aquades.

4. Melakukan perhitungan

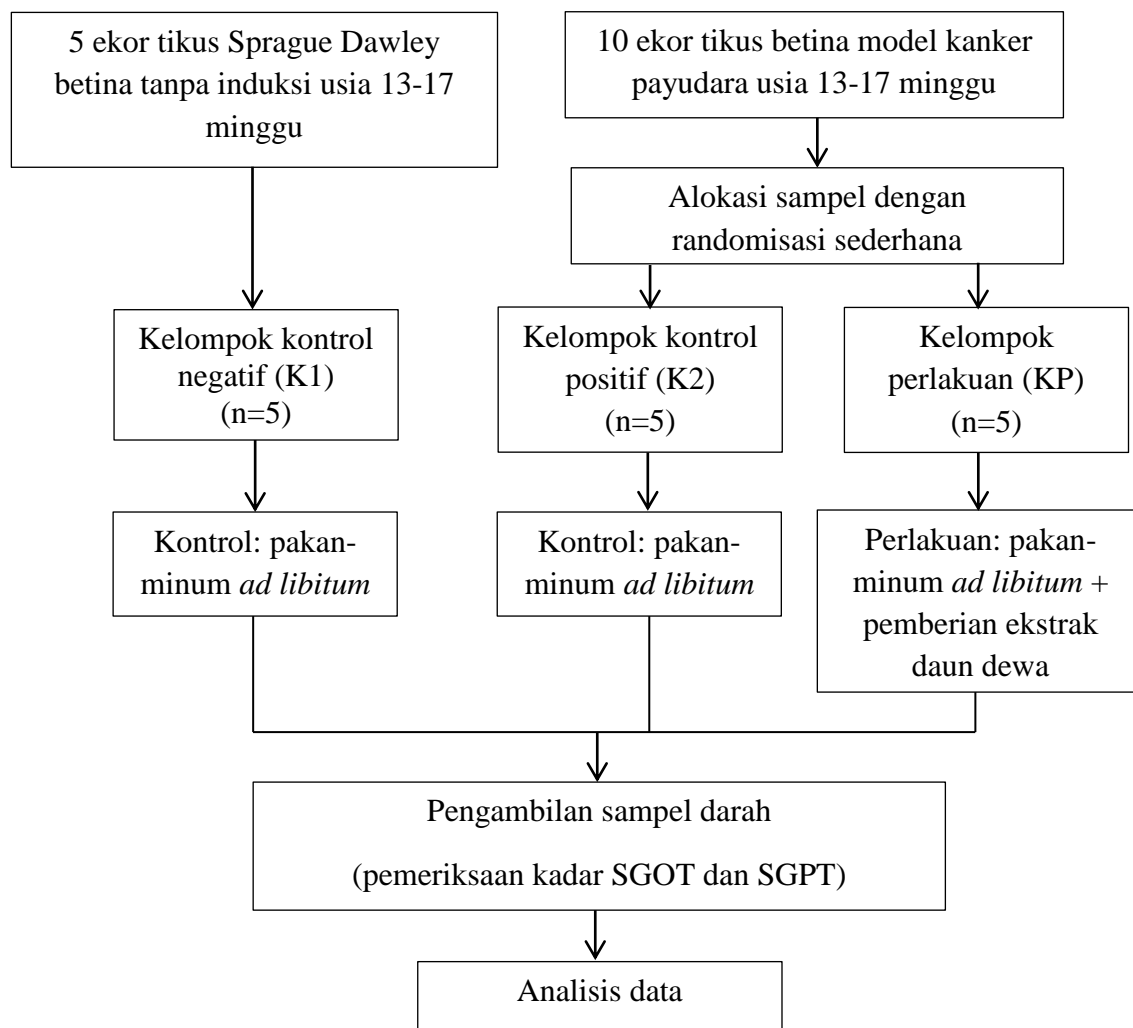
$$\text{Kadar SGPT} = \Delta \text{Abs sampel} \times 1745 \text{ U/l}$$

$$\text{Kisaran tes: } \Delta A 0,16/\text{menit} (279,2 \text{ U/l})$$

Nilai melebihi kisaran tersebut diencerkan 10x dengan 9 g/l NaCl,

hasil dikali 10

3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan program komputer. Normalitas distribusi data diuji menggunakan uji Saphiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel. Uji homogenitas data dilakukan dengan menggunakan *Levene's test*. Analisis deskriptif disajikan dalam

bentuk rerata, simpang baku, dan *error bar* untuk data berdistribusi normal, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal disajikan dalam bentuk median, persentil, dan *box plot*. Perbedaan kadar SGOT dibandingkan menggunakan uji statistik nonparametrik Kruskal-Wallis karena syarat uji parametrik tidak terpenuhi, dan kemudian dilanjutkan dengan analisis *Mann-Whitney*. Perbedaan kadar SGPT dibandingkan menggunakan uji statistik parametrik *one way ANOVA* karena syarat uji parametrik terpenuhi.

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini menggunakan 15 ekor Sprague Dawley betina yang dirawat secara berkelompok dan diberi pakan standar selama 2 minggu untuk kelompok kontrol dan pakan standar serta intervensi selama 2 minggu untuk kelompok perlakuan. Setelah 2 minggu, darah tikus akan diambil sebanyak 1 ml untuk diperiksa kadar SGOT dan SGPT dalam darah. Selanjutnya tikus akan dibunuh dengan mendislokasi sendi atlantooccipital dan dikubur oleh ahli dari LPPT-LP3HP Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.