

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang lingkup penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam lingkup keilmuan Biokimia, Kimia dan Farmakologi.

#### **3.2 Tempat dan waktu penelitian**

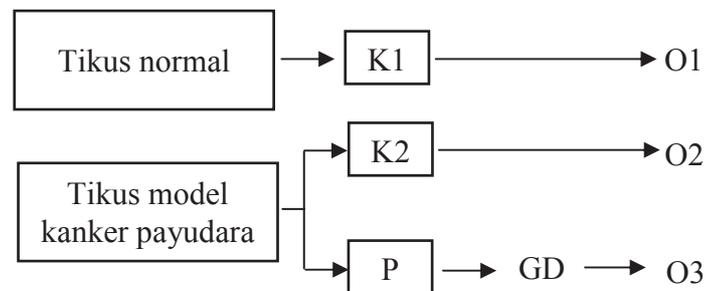
Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat antara lain:

- a) 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 ureum dan kreatinin.
- b) Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pembuatan ekstrak etanol.
- d) Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro untuk uji determinasi tanaman *Gynura divaricata*.

Waktu yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 14 minggu dari bulan Februari 2016 – Mei 2016.

### 3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* pada tikus. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok, satu kelompok kontrol negatif (K1), satu kelompok kontrol positif (K2) dan satu kelompok perlakuan (P).



**Gambar 8.** Skema rancangan penelitian

Keterangan :

K1 : Kelompok tikus Sprague Dawley betina yang tidak diinduksi maupun diberikan ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

K2 : Kelompok tikus model kanker payudara yang tidak mendapat ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

P : Kelompok tikus model kanker payudara yang mendapat ekstrak etanol daun *Gynura divaricata*

GD : Ekstrak etanol daun *Gynura divaricata* dengan dosis 750 mg/kgbb per oral selama 2 minggu

O1,O2,O3 : Pengukuran kadar ureum dan kreatinin darah

### **3.4 Sampel**

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

#### **3.4.1 Kriteria Inklusi**

- a) Tikus Sprague Dawley betina normal dan yang tikus model kanker payudara
- b) Usia 13 – 17 minggu
- c) Tidak ada kelainan anatomis yang tampak

#### **3.4.2 Kriteria Eksklusi**

Tidak ditemukan adanya benjolan setelah di induksi

#### **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 sebanyak 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 etanol daun dewa (*Gynura divaricata*)

#### 3.5.2 Variabel Terikat

- 1) Kadar ureum darah
- 2) Kadar kreatinin darah

#### 3.5.3 Variabel Terkontrol

Strain, usia, jenis kelamin, pakan, dan sistem kandang hewan coba

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3.** Definisi Operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1	Ekstrak etanol daun dewa ( <i>Gynura divaricata</i> ) Ekstrak berasal dari daun dewa ( <i>Gynura divaricata</i> ) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 45%, kemudian dilarutkan dalam PEG 1,25% dengan konsentrasi larutan hasil pengenceran 56,25 mg/ml. Ekstrak diberikan per oral sebesar 13,3 ml/kgBB/hari dengan sonde lambung selama 2 minggu.	mg/kgBB	Nominal
2	Kadar ureum darah Masing-masing kelompok dilakukan pengambilan darah 1 cc melalui pembuluh darah retroorbita dan disentrifuse hingga didapatkan serum. Serum kemudian diproses menggunakan metode "Urease-GLDH" yakni dicampur dengan reagen, diinkubasi dan dibaca menggunakan Microlab 300 pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 340 Nm.	mg/dl	Rasio
3	Kadar kreatinin darah Masing-masing kelompok dilakukan	mg/dl	Rasio

pengambilan darah 1 cc melalui pembuluh darah retroorbita dan disentrifuse hingga didapatkan serum. Serum kemudian diproses menggunakan tes kinetik tanpa deproteinasi berdasarkan metode Jaffe, yakni dicampur dengan reagen, diinkubasi dan dibaca menggunakan Fotometer Microlab 300 pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 492 Nm (490-510 Nm).

---

### **3.7 Cara pengumpulan data**

#### **3.7.1 Bahan**

##### 1) Pembuatan ekstrak

1. Daun dewa (*Gynura divaricata*)
2. Alkohol 45%
3. Aquadest

##### 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba

1. 18 ekor Tikus Sprague Dawley betina (6 ekor tikus normal dan 12 ekor tikus model kanker payudara)
2. Pakan dan minum standar
3. Ekstrak etanol daun dewa (*Gynura divaricata*)
4. Polyethylene-glycol 1,25%

##### 3) Bahan pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin

1. Darah vena/kapiler dari vena retroorbita
2. Monoreagen/reagen mix
3. Aquadest

#### **3.7.2 Alat**

##### 1) Pembuatan ekstrak

1. Kain lunak

2. Erlenmeyer
  3. Pisau
  4. *Waterbath*
  5. Gelas ukur
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
1. Kandang hewan
  2. Timbangan hewan
  3. Sonde lambung *syringe*
  4. Tabung penampung
- 3) Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin
1. Kapas alkohol
  2. Spuit
  3. Tabung penampung
  4. Sentrifuge
  5. Mikropipet (+ *yellow tip* dan + *blue tip*)
  6. Spektrofotometer Microlab 300
  7. Vortex-mixer

### **3.7.3 Jenis data**

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

### **3.7.4 Cara Kerja**

#### **3.7.4.1 Pembuatan ekstrak etanol daun *Gynura divaricata***

Daun tanaman *Gynura divaricata* mula-mula dibersihkan dan dipotong-potong. Daun yang telah terpotong-potong ditutup kain gelap lalu dijemur dibawah sinar matahari. Daun yang sudah agak mengering diletakkan pada tabung erlenmeyer yang telah terisi larutan etanol 45% kemudian dilakukan 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 dilakukan penguapan pada suhu 60-70°C. Setelah itu akan di dapatkan ekstrak dalam bentuk serbuk. Ekstrak yang telah didapat kemudian dilarutkan dalam PEG 1,25% dengan konsentrasi larutan hasil pengenceran 56,25 mg/ml.

#### **3.7.4.2 Perlakuan pada hewan coba**

Kelompok kontrol negatif diberi pakan dan minum standar, kelompok kontrol positif mendapatkan pakan dan minum standar serta PEG sebanyak 2 ml, sedangkan kelompok perlakuan diberikan pakan dan minum standar disertai pemberian ekstrak etanol daun dewa (*Gynura divaricata*). Dosis yang diberikan adalah 750 mg/kgBB selama 14 hari. Konsentrasi larutan hasil pengenceran adalah 56,25 mg/ml sehingga setiap tikus pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol *Gynura dicaricata*

sebanyak 13,3 ml/kgBB/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 vena retroorbitalis untuk diperiksa kadar ureum dan kreatinin darah.

#### 3.7.4.4 Pemeriksaan kadar ureum

##### 1. Membuat sediaan

Sediaan	Aquadest	Standard	Serum/Plasma	Reagent Mix (1 dan 2)
Blanko	1000 µl	-	-	-
Standard	-	10 µl	-	1000 µl
Sampel	-	-	10 µl	1000 µl

##### 2. Mencampur dengan seksama menggunakan vortex-mixer.

3. Menginkubasi selama 1 menit pada suhu 20-25°C atau 10 menit pada suhu 37°C.

4. Melakukan pembacaan menggunakan fotometer microlab 300 pada  $\lambda$  340 Nm.

5. Melakukan perhitungan.

$$\text{Kadar ureum (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{Abs sampel}}{\Delta \text{Abs standard}} \times \text{konsentrasi standard}$$

#### 3.7.4.5 Pemeriksaan kadar kreatinin

##### 1. Membuat sediaan

Blanko (Aquadest : Monoreagen) = 50 µl + 1000 µl

Standard (2mg/dl : Monoreagen) = 50 µl + 1000 µl

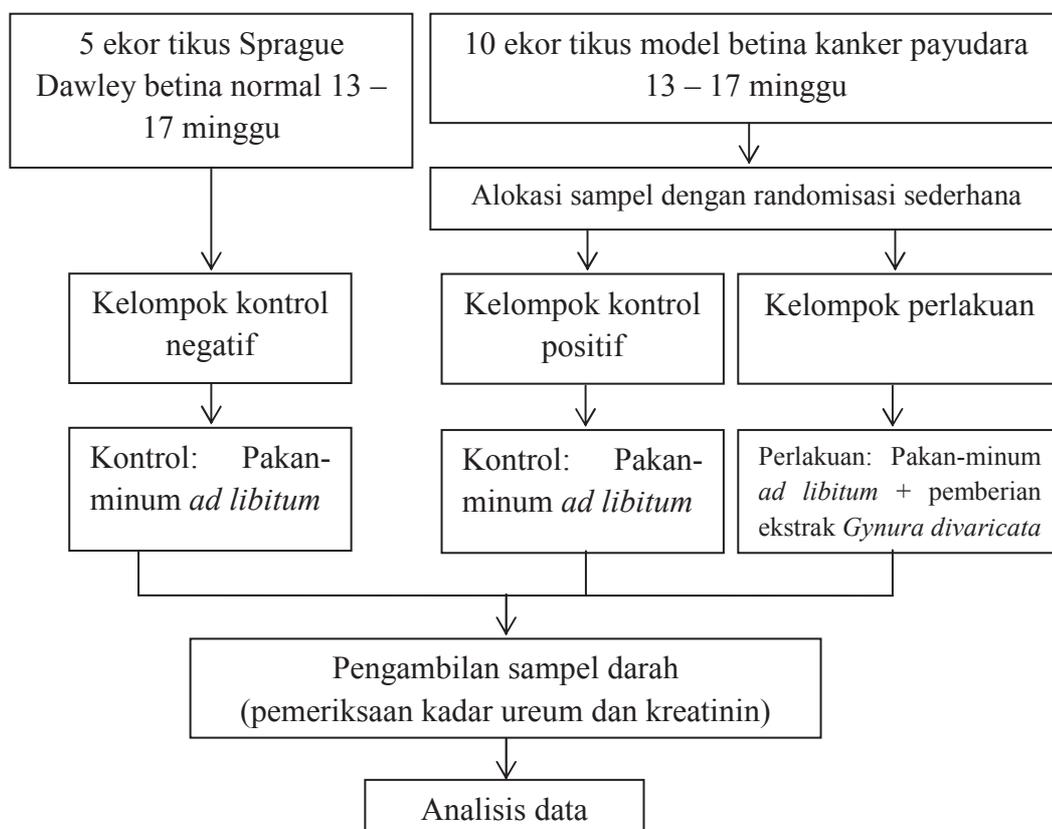
Sampel (Serum/plasma : Monoreagen) = 50 µl + 1000 µl

##### 2. Mencampur dengan seksama menggunakan vortex-mixer

3. Menginkubasi pada suhu kamar selama 1 menit.
4. Melakukan pembacaan menggunakan fotometer microlab 300 secara berurutan dengan metode kinetik pada  $\lambda$  492 Nm.
5. Melakukan perhitungan

$$\text{Kadar kreatinin (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{Abs sampel}}{\Delta \text{Abs standard}} \times \text{konsentrasi standard/cal}$$

### 3.8 Alur penelitian



**Gambar 9.** Diagram alur penelitian

### 3.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah menggunakan program *SPSS for Windows*®. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Normalitas distribusi data diuji menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Pada analisa deskriptif, jika distribusi data normal, data disajikan

dalam bentuk rerata, simpang baku, dan *error bar*. Jika distribusi data tidak normal, data disajikan dalam bentuk median, persentil, dan *box plot*. Pada uji hipotesis, jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji statistik parametrik *one way ANOVA*. Namun apabila distribusi data tidak normal, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Jika ditemukan adanya perbedaan signifikan, akan dilanjutkan dengan analisis Post-Hoc. Penelitian dianggap bermakna apabila nilai  $p < 0,05$ .

### **3.10 Etika penelitian**

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