

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

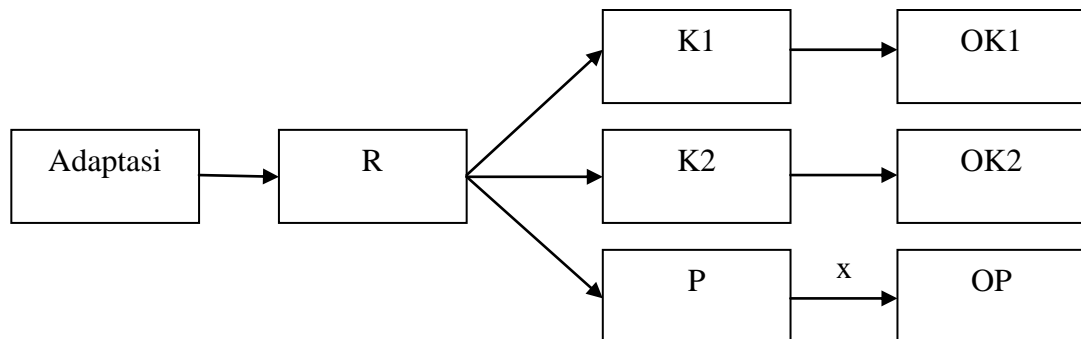
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia, Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian, pemeriksaan, dan analisis data ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan Maret hingga Mei 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus Sprague dawley. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L*) dan asap rokok , sedangkan keluaranya (outcome) adalah kadar SOD dalam plasma tikus Sprague Dawley.



Gambar 9. Rancangan penelitian

Keterangan:

- R :Randomisasi
- K1 :Kelompok negatif (pakan standar)
- K2 :Kontrol positif yang terpapar asap rokok dan pakan standar
- P :Kelompok perlakuan yang diberi minyak jintan hitam (*Nigella sativa L*), paparan asap rokok, dan pakan standar
- x : Perlakuan pada kelompok perlakuan yaitu pemberian ekstrak jintan hitam dengan dosis 500mg/hari mulai hari ke-8 hingga ke-28.
- OK1 : Kadar SOD plasma kelompok K1
- OK2 : Kadar SOD plasma kelompok K2
- OP : Kadar SOD plasma kelompok P

3.4 Populasi dan Sampel

1.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan Sprague dawley.

1.4.2 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus Sprague dawley yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bahan *stainless stell* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32⁰C. galur Sprague dawley jantan dipilih karena memiliki karakteristik mirip manusia dari data dasar fisiologis dan metabolisme untuk pemeriksaan SOD. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Tikus Sprague dawley jantan,
- 2) Berat badan tikus normal (200-250 gram),
- 3) Usia dua belas minggu sebelum dilakukan adaptasi.

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Kelainan anatomis,
- 2) Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit.
- 3) Tikus mengalami penurunan berat badan >10% (berat badan kurang dari 200 gram),
- 4) Diare,
- 5) Perubahan perilaku,
- 6) Tikus mati dalam penelitian.

1.4.3 Cara Sampling

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

1.4.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria *WHO dalam Reseach Guideline for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk mengantisipasi apabila terdapat tikus yang mati saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat dua kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 18 sampel.

1.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas : ekstrak biji jintan hitam

Variabel terikat : kadar SOD plasma tikus Sprague dawley

1.6 Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi operasional

No.	Variabel	Unit	Skala
1	Ekstrak biji jintan hitam Ekstrak biji jintan hitam didapatkan dari laboratorium kimia FK UNDIP, dengan menggunakan 2 kg biji jintan hitam. Hasil pengolahan biji jintan hitam diberikan pada tikus Sprague dawley dengan dosis 500mg/hari sesuai penelitian yang dilakukan Dalla (2011). ⁷	ml	nominal
2	Kadar SOD plasma Kadar antioksidan dalam tubuh yang diukur pada plasma dengan ELISA KIT. Pada penelitian ini kadar SOD plasma diperiksa pagi hari oleh petugas LPPT UGM	ng/ml	Rasio
3.	Asap rokok Asap rokok berasal dari rokok merek tertentu yang menghasilkan asap dari hasil pembekaran salah satu ujungnya. Pemberian asap rokok 4 batang perhari dimana 2 batang pada pagi hari dan 2 batang siang hari.	Per batang	nominal

1.7 Cara pengumpulan data

1.7.1 Alat

- 1) Kandang tikus
- 2) Sonde lambung
- 3) Timbangan
- 4) Tabung reaksi

1.7.2 Bahan

- 1) Plasma darah tikus Sprague Dawley jantan
- 2) Ekstrak jintan hitam
- 3) Pakan standar hewan coba dan minum
- 4) Rokok kretek
- 5) EDTA
- 6) SOD *activity* ELISA *Kit*

1.7.3 Jenis data

Pemeriksaan kadar SOD plasma setelah pemberian ekstrak biji jintan hitam pada tikus Sprague dawley yang terpapar asap rokok merupakan data primer.

1.7.4 Cara kerja

1.7.4.1 Penyesuaian dosis terapi dan pembuatan sediaan obat

1.7.4.1.1 Penyesuaian dosis terapi

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa pemberian ekstrak jintan hitam pada hewan coba berjenis tikus sebanyak 1-2 g/KgBB/hari selama 10 hari dapat menunjukkan efek terapeutik.^{17,7} Selain itu pada penelitian yang bertujuan untuk mengetahui dosis

toksik akut juga diketahui bahwa pemberian ekstrak jintan hitam sebanyak 3 g/KgBB masih belum menunjukkan efek toksik dari ekstrak tersebut.⁴²

Berdasarkan hal-hal tersebut, peneliti memutuskan untuk memberikan ekstrak jintan hitam dengan dosis sebesar 2 g/KgBB/hari. Selanjutnya sesuai dengan salah satu kriteria inklusi sampel yaitu berat badan hewan coba berkisar antara 200-250 g, maka didapatkan dosis ekstrak jintan hitam yang harus diberikan berkisar antara 400-500 mg/hari, sesuai dengan berat badan hewan coba. Namun guna memberikan kepastian dan kemudahan peneliti dalam memberikan ekstrak tersebut, maka ditetapkan dosis terapi harian yang diberikan menjadi 500 mg/hari untuk seluruh hewan coba.

1.7.4.1.2 Perlakuan terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangan secara individual di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpatu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Selama penelitian, Sprague Dawley mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh Sprague dawley hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*.

Pada hari ke-8, wistar dibagi secara acak ke dalam 3 kelompok:

- K1 :Sprague dawley mendapat pakan standard dan air minum *ad libitum*
- K2 :Sprague dawley mendapat pakan standar, air minum *ad libitum*, dan paparan asap rokok dengan pemberian 4 batang rokok per hari, yang diberikan pagi dan sore hari.
- P :Sprague dawley mendapat pakan standar, air minum *ad libitum*, paparan asap rokok dengan pemberian 4 batang rokok per hari, yang diberikan pagi dan sore hari, dan minyak jintan hitam dengan dosis 500 mg/hari yang diberikan melalui sonde lambung.

Kelompok K2, P, akan diadaptasikan terlebih dahulu terhadap asap rokok selama tujuh hari sebelum perlakuan. Perlakuan dilakukan setiap hari sampai 28 hari. Pada hari ke-29 dilakukan pengambilan sampel darah untuk kelompok K1, K2, dan P. Darah diambil pada regio plexus retroorbital.

1.7.4.1.3 Pemaparan asap rokok

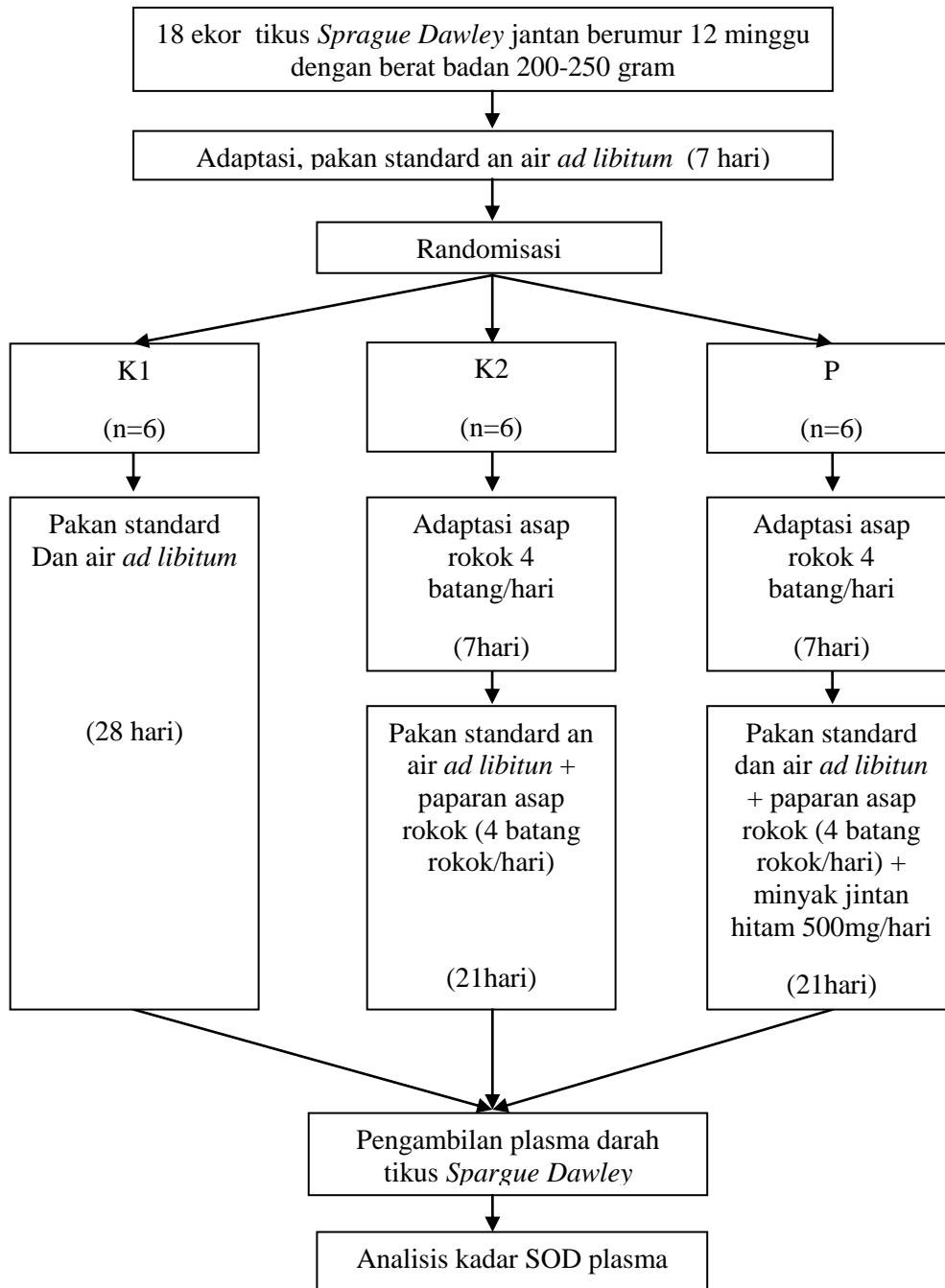
Tikus akan dimasukkan ke dalam kandang khusus pemaparan asap rokok. Kandang khusus ini mempunyai beberapa bilik yang saling terhubung dengan lubang-lubang pada panelnya. Tikus akan dipapari asap rokok, baik asap rokok *mainstream* maupun *sidestream*. Ujung rokok yang dibakar akan menghasilkan *sidestream smoke* dan ujung ini dimasukkan ke dalam kandang, sedangkan ujung lain yang dihisap (menghasilkan *mainstream smoke*) akan dihubungkan dengan mesin pemompa dan *mainstream smoke* akan dimasukkan melalui bagian kandang yang lain. Rokok yang dipakai adalah rokok kretek merk tertentu dengan kadar tar 39 mg dan nikotin 2,3 mg.

1.7.4.1.4 Pemeriksaan kadar SOD plasma

Pertama, mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Menambahkan 50uL standar dan sampel disetiap sumur. Segera setelah itu Menambahkan 50uL *Biotinylated Detection Ab* pada setiap sumur. Setelah itu melakukan inkubasi selama 45 menit pada suhu 37⁰C. kemudian melakukan aspirasi dan dicuci selama 3 kali. Tambahkan 100uL *HRP conjugate* disetiap sumur dan inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37⁰C . Lakukan aspirasi dan cuci 5 kali. Menambahkan 90uL *Substrate reagent* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰C . kemudian

Menambahkan 50uL *Stop Solution*, segera melakukan pembacaan pada panjang gelombang 450nm. mendapatkan hasil kadar SOD plasma.

1.8 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur penelitian

1.9 Analisis Data

Analisis data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan yang bermakna akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

1.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang.

1.11 Jadwal penelitian

Tabel 6. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan ke – (Tahun 2015-2016)																							
	1				2				3				4				5				6			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literatur	■	■	■	■																				
Penyusunan proposal					■	■	■	■																
Seminar proposal									■	■	■	■												
Persiapan peminjaman laboratorium													■	■	■	■								
Persiapan alat & bahan																	■	■	■	■				
Penelitian																					■	■	■	■
Analisis data & evaluasi																								
Penulisan laporan																								
Seminar hasil																								