

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

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

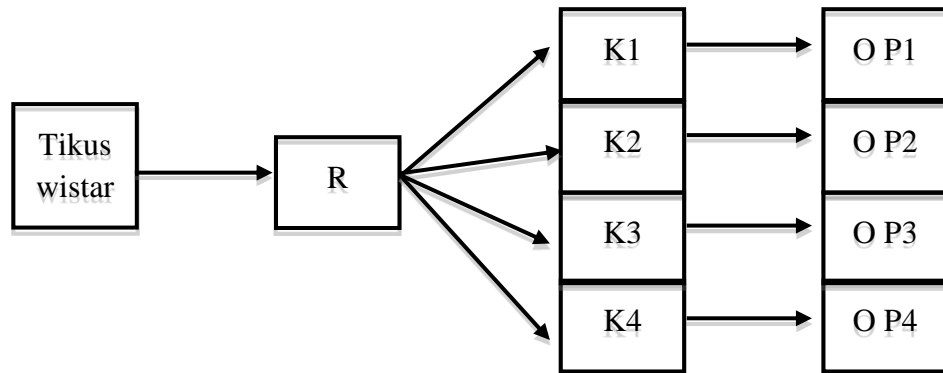
3.2. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang untuk pembuatan ekstrak jahe merah. Sedangkan untuk pengandangan hewan coba, pemberian ekstrak jahe merah, pemberian paparan asap rokok dilakukan di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pengambilan darah hewan coba, pemeriksaan dan analisis kadar AST dan ALT darah tikus juga dilakukan di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.3. Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *pre dan post test only control group design* pada tikus. Penelitian ini dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberikan suatu tindakan serta membandingkan antara kadar AST dan ALT darah saat belum diberi perlakuan dengan kadar AST dan ALT darah setelah diberi perlakuan. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan pemberian jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) dan

pemberian paparan asap rokok pada tikus, sedangkan keluarannya (outcome) adalah kadar AST dan ALT darah tikus.



Gambar 5. Skema Desain Penelitian

Keterangan:

- R : Randomisasi
- K1 : Diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde placebo selama 7 hari.
- K2 : Kontrol positif 1 yang diberi pakan standar, dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Perlakuan ini dilakukan selama 7 hari tiap perlakuan. Setelah itu 7 hari berikutnya diberi sonde placebo
- K3 : Kontrol positif 2 yang diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde ekstrak jahe merah selama 7 hari kemudian.
- K4 : Kelompok perlakuan selama 7 hari diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Pada hari ke 8 setelah pemaparan asap rokok diberikan ekstrak

jahe merah melalui sonde lambung dengan dosis 200mg/kgbb/hari selama 7 hari.

- OP1 : Kadar AST dan ALT darah kelompok K1 setelah perlakuan
OP2 : Kadar AST dan ALT darah kelompok K2 setelah perlakuan
OP3 : Kadar AST dan ALT darah kelompok K3 setelah perlakuan
OP4 : Kadar AST dan ALT darah kelompok K4 setelah perlakuan

3.4. Populasi Dan Sampel

4.7.1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar yang dikandangkan dalam kandang individual yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus jantan dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme hampir sama dengan manusia. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi

Kriteria Eksklusi

- Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

Kriteria Drop Out

- Tikus mengalami penurunan berat badan > 10% (berat badan kurang dari 150 gram)
- Mengalami diare selama masa penelitian
- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati saat penelitian.

4.7.2. Cara Sampling

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

4.7.3. 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.

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus wistar untuk setiap kelompok perlakuan sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 24 sampel.

3.5. Variabel Penelitian

4.7.1. Variabel Bebas

- Ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* *oe var. rubrum*)
- Paparan asap rokok

4.7.2. Variabel Tergantung

- Kadar AST dan ALT darah

3.6. Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Paparan Rokok	Asap Perlakuan untuk menginduksi agar terjadi stres oksidatif pada tikus berupa paparan asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis satu batang rokok per lima belas menit selama enam puluh menit, dua kali sehari, yaitu pukul 09.00 dan 14.00	Menit	Nominal
2.	Ekstrak jahe merah	Rimpang jahe merah sebanyak 950 gram di maserasi pelarut etanol 96% diberikan pada tikus wistar dengan dosis 200mg/kgbb/hari dalam 1,2 ml suspensi dengan pelarut CMC 0,25% peroral	ml	Nominal
3.	Kadar AST/ALT	Parameter kerusakan sel hepar yang dapat diukur dalam darah. Pemeriksaan kadar AST dan ALT dengan metode IFCC tanpa Pyridoxal Phosphate 37 ⁰ C	IU/L	Rasio

3.7. Cara Pengumpulan Data

4.7.1. Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung

- c. Timbangan
- d. Tabung reaksi
- e. Alkohol 70%
- f. Disposable syringes
- g. Kuvet
- h. Mikropipet 100 ul
- i. Stop watch/ timer
- j. Smoking pump
- k. Smoking chamber
- l. Spectrofotometer
- m. Sentrifuse
- n. Vortex
- o. Waterbath
- p. Pemantik
- q. Kertas saring whatman no.1

4.7.2. Bahan

- a. Tikus jantan
- b. Ransum pakan standar untuk hewan coba
- c. Ekstrak jahe merah
- d. Rokok kretek

4.7.3. Jenis Data

Pemeriksaan kadar AST dan ALT setelah pemberian jahe merah pada tikus pasca paparan asap rokok merupakan data primer yang bersifat kuantitatif.

4.7.4. Cara Kerja

1. Paparan asap rokok

Hewan coba ditempatkan dalam kandang hewan sesuai dengan kelompoknya. Pada saat diberi paparan asap rokok, hewan coba dipindahkan dalam kandang khusus berupa kotak yang di dalamnya terdapat jeruji pembatas untuk memisahkan hewan coba dengan ujung rokok yang terbakar, sehingga hewan coba dapat secara langsung terkena paparan asap rokok tersebut. Kotak perlakuan memiliki dua lubang, dimana fungsi lubang pertama; sebagai jalan arus pengeluaran asap yang dipaparkan, sedangkan fungsi lubang kedua; untuk memasukkan ujung rokok yang dibakar. Adapun asap rokok dihembuskan berulang kali dengan bantuan spuit sampai rokok habis terbakar. Asap rokok diberikan dua kali setiap hari, pada jam 09.00 dan jam 14.00 wib.

2. Pembuatan Ekstrak Jahe merah

Pengumpulan, Penyiapan, dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Rimpang jahe merah yang telah dikumpulkan, dipilih yang kondisinya baik, dengan usia kira-kira menjelang panen, lebih kurang 10 bulan. Rimpang lalu dibersihkan menggunakan

air mengalir sampai bersih lalu ditiriskan. Rimpang yang diperoleh sebanyak 1680 gram, lalu diiris tipis-tipis, setelah itu diangin-anginkan di dalam ruangan terbuka, kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering pada suhu 40-50⁰C hingga kering. Rimpang yang telah kering diserbukkan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 25, kemudian ditimbang.

Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Merah

Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol jahe merah adalah maserasi. Serbuk kering jahe merah yang diperoleh sebanyak 240 g, dimasukkan ke dalam botol coklat, lalu ditambahkan 1 L etanol 96%, dikocok selama 6 jam dengan menggunakan *shaker*, kemudian didiamkan sampai 24 jam. Ampasnya dipisahkan dengan cara disaring dengan kertas saring. Proses diulangi beberapa kali sampai filtrat menjadi tidak berwarna. Semua filtrat yang diperoleh dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* bertekanan rendah pada suhu 50°C dengan kecepatan putar 30 rpm. Selanjutnya, filtrat pekat diuapkan diatas penangas air pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental.

- a. Penetapan Rendemen, Susut Pengeringan, Penetapan Rendemen

Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen)

b. Penetapan Susut Pengeringan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram sampai 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu 105°C hingga selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, tutup dibuka dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar.

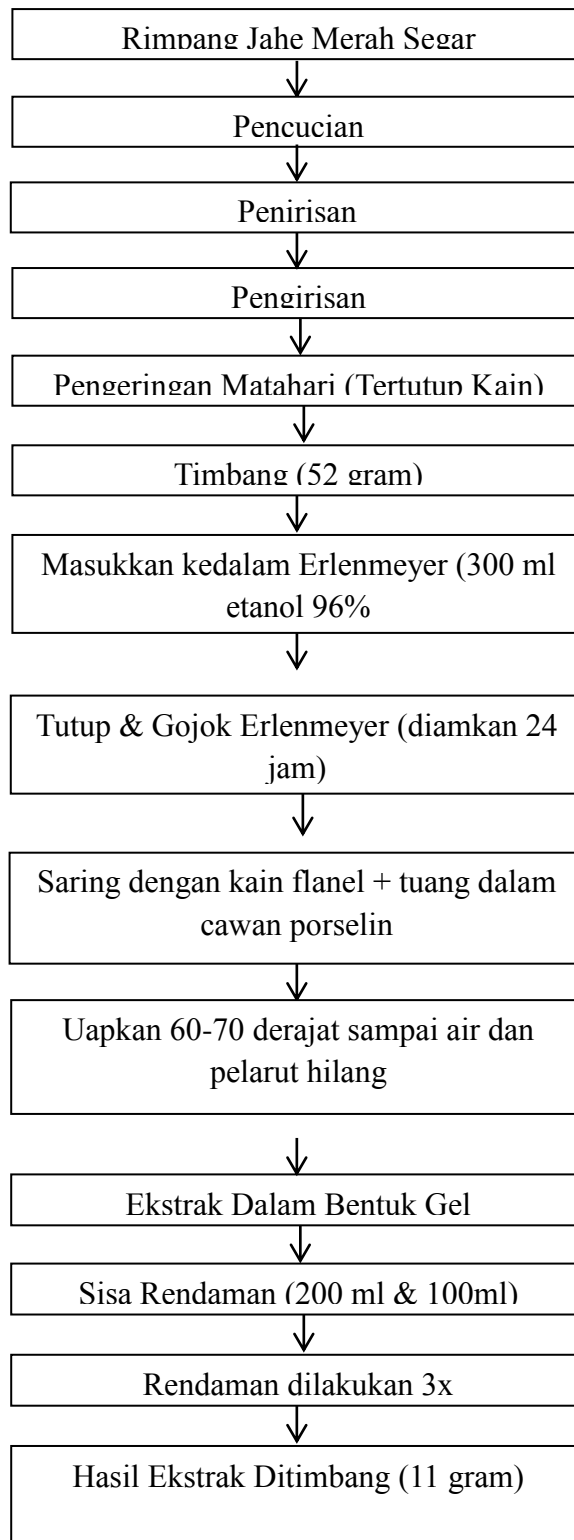
Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak sebanyak 11 gram disuspensikan menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,25% sebagai bahan pensuspensi. Sebanyak 400 mg serbuk CMC ditaburkan pada lumpang berisi aquadest panas bersuhu 70⁰C dengan volume 10 ml. Kemudian CMC dibiarkan mengembang selama kurang lebih 10 menit. CMC yang telah mengembang tersebut digerus bersama ekstrak, dan ditambahkan perlahan-lahan dengan

aquadest sambil dihomogenisasi, hingga mencapai volume suspensi 80 ml. Suspensi ini disimpan dalam lemari pendingin. Untuk menjaga kestabilan suspensi tersebut, suspensi baru dibuat dan diberikan pada hewan coba menjelang percobaan. Pemberian pada hewan coba dilakukan secara oral dengan teknik sonde.

Pembuatan Larutan CMC 0,25%

Sebanyak 500 mg CMC ditimbang lalu dikembangkan dengan aquadest hangat (70°C) dengan volume lebih kurang 10 ml. Setelah mengembang, CMC digerus dan ditambahkan aquadest sambil dihomogenisasi hingga mencapai volume suspensi 100 ml.



Gambar 6. Skema Pembuatan Serbuk Jahe Merah Kering³

3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

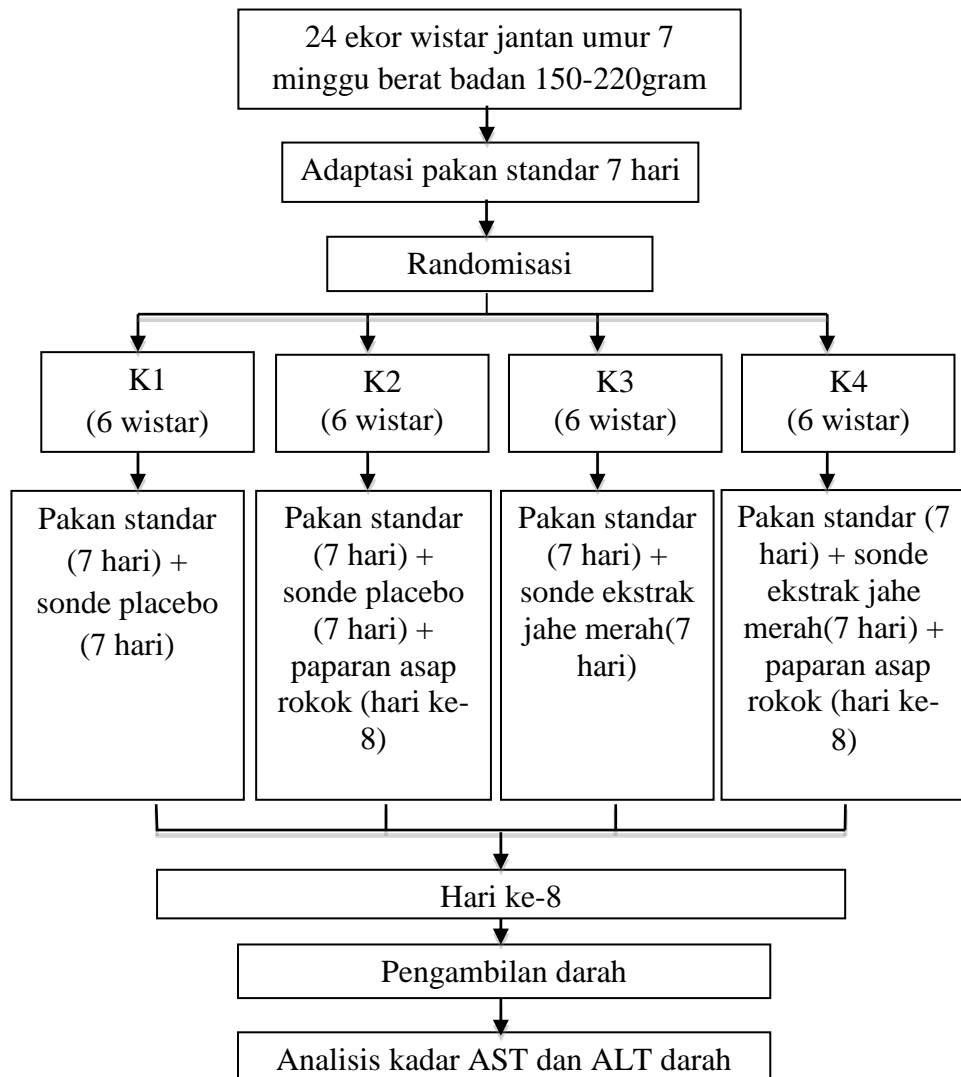
Seluruh sampel dikandangan secara individual di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Selama penelitian, wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh wistar hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*. Pada hari ke-1, wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yaitu, (K1) : Kontrol negatif yang nantinya akan diberi pakan standar, kelompok 2 (K2) : Kontrol positif yang diberikan paparan asap rokok dan pakan standar selama 7 hari, kelompok 3 (K3): Diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde ekstrak jahe merah 200mg/kgbb/hari selama 7 hari, kelompok 4 (K4): Diberi pakan standar selama 7 hari, sonde ekstrak jahe merah selama 7 hari dan papran asap rokok 7 hari sebelum diberi jahe merah. Dosis pemberian ekstrak jahe merah yaitu sebesar 200 mg/kgbb, dimana penelitian sebelumnya berhasil membuktikan bahwa pemberian dosis ekstrak jahe merah sebesar itu efektif sebagai antiinflamasi tikus putih dan 200 mg/kgBB/hari ekstrak jahe merah menurunkan kadar SGPT.⁸ Pengambilan sampel darah dilakukan setelah terpapar rokok 7 hari lalu diberi jahe merah selama 7 hari.

4. Pengambilan Data

Pengambilan darah tikus melalui medial canthus sinus orbitalis. Sampel darah sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan untuk mendapatkan serumnya. Tabung reaksi yang berisi

darah tanpa antikoagulan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Serum di atas sel-sel darah yang menggumpal selanjutnya diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung endorf. Serum dibaca kadar AST dan ALT dengan metode IFCC (international Federation of Clinical Chemistry) tanpa Pyridoxal Phosphate 37⁰C. Skala yang digunakan adalah skala rasio.

3.8. Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram Alur Penelitian

3.9. Analisis Data

Analisis data menggunakan program SPSS 18. *for Windows*. Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data dan uji *Levene's test* untuk melihat homogenitas data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis*.

3.10. Etika Penelitian

Telah dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor 351/EC/FK-RSDK/2016 pada tanggal 1 April 2016

3.11. Jadwal Penelitian

Tabel 4.Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi Literatur	■	■																		
Survei Laboratorium			■	■																
Penulisan Proposal			■	■	■	■	■	■												
Seminar Proposal								■												
Revisi Proposal									■	■										
Penelitian												■								
Analisis data dan Evaluasi													■	■						
Penulisan Laporan															■	■	■	■	■	■
Seminar Laporan																				■

