

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini termasuk dalam lingkup keilmuan Patologi Klinik dan Farmakologi

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

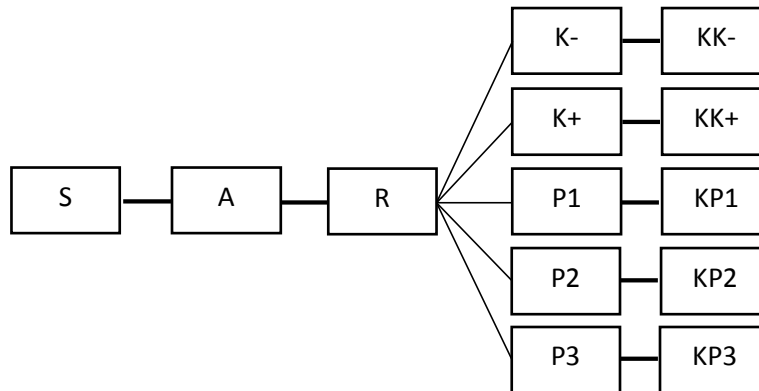
Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Agustus - September 2018. Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat antara lain:

- a. Laboratorium Obat Tradisional Universitas Diponegoro untuk pembuatan ekstrak daun kumis kucing.
- b. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit IV Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk perawatan tikus, pemberian perlakuan dan pengambilan sampel darah.
- c. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit I Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *quasi experimental* dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan hewan coba berupa tikus wistar jantan usia 2 bulan sebagai subjek penelitian.

Skema rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 6. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Populasi

A : Kelompok sampel (masa adaptasi selama tujuh hari)

R : Randomisasi

K (-) : Kelompok kontrol negatif diberi ransum pakan standar dan tidak diberi perlakuan apapun selama 14 hari.

K (+) : Kelompok kontrol positif yang diberi ransum pakan standar, aquades dan Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari selama 14 hari.

P1 : Kelompok perlakuan 1 diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 50 mg/kg BB/hari selama 14 hari.

P2 : Kelompok perlakuan 2 diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 100 Mg/kg BB/hari selama 14 hari.

P3 : Kelompok perlakuan 3 diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 200 mg/kg BB/hari selama 14 hari.

KK (-) : Tes kadar SGPT dan SGOT kelompok kontrol negatif.

KK (+): Tes kadar SGPT dan SGOT kelompok kontrol positif.

KP1 : Tes kadar SGPT dan SGOT kelompok perlakuan 1

KP2 : Tes kadar SGPT dan SGOT kelompok perlakuan 2

KP3 : Tes kadar SGPT dan SGOT kelompok perlakuan 3

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus wistar.
- b. Berat badan 150-200 gram.
- c. Usia 2 bulan.
- d. Tikus dalam kondisi sehat.
- e. Tidak terdapat kelainan anatomi.

3.4.3.2 Kriteria Ekslusi

- a. Tikus terlihat sakit (tidak aktif bergerak).
- b. Ada kelainan anatomis.

3.4.3.3 Kriteria *drop out*

- a. Tikus mati selama penelitian berlangsung.

3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari tikus wistar sudah memenuhi kriteria inklusi dan *drop out* sehingga dianggap cukup homogen. Semua diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi dan diberi ransum pakan standar.

3.4.5 Besar Sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *World Health Organization* (WHO) dengan rumus frederer adalah 5 ekor untuk setiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus wistar jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing – masing terdapat 5 ekor tikus wistar jantan. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out* selama penelitian maka dilakukan koreksi pada tiap kelompok didapatkan 6 ekor tikus wistar, sehingga yang digunakan adalah 30 ekor tikus wistar jantan.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) pada hewan coba yang diberikan secara peroral.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar SGPT dan SGOT serum tikus wistar yang diinduksi plumbum asetat peroral dan diberi ekstrak daun kumis kucing.

3.6 Definisi Oprasional

Tabel 2. Definisi Oprasional

Jenis				
Variabel	Varriabel	Definisi Oprasional	Unit	Skala
Bebas	Ekstrak daun kumis kucing	Konsentrasi ekstrak daun kumis kucing adalah daun kumis kucing yang diekstraksi menggunakan metode distilasi dengan pelarut ethanol. Terdapat tiga konsentrasi yaitu 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB.	mg/kgBB	Nominal
Terikat	Kadar SGPT serum	Kadar SGPT tikus wistar yang diperoleh dari plexus retroorbitalis sebanyak 2 cc dan disentrifuse untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa dengan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer.	mg/dL	Rasio
Terikat	Kadar SGOT serum	Kadar SGOT tikus wistar yang diperoleh dari plexus retroorbitalis sebanyak 2 cc dan disentrifuse untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa dengan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer.	mg/dL	Rasio

3.7 Cara pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- a. Pembuatan ekstrak
 - 1) Daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*)
 - 2) Ethanol 70%
 - 3) Aquades
- b. Perawatan dan perlakuan hewan coba
 - 1) 30 ekor tikus wistar jantan
 - 2) Ransum pakan standar
 - 3) Plumbum asetat
 - 4) Ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*)
- c. Pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT
 - 1) Darah vena atau kapiler dari plexus retroorbitalis
 - 2) Reagen kit SGPT
 - Reagen 1 : TRIS
 - L-aspartat
 - MDH
 - LDH
 - Reagen 2 : 2-Oxoglutarat
 - NADH

- 3) Reagen kit SGOT
 - Reagen 1 : TRIS
 - L-alanin
 - LDH
 - Reagen 2 : 2-oksaloglutarat
 - NADH
- 4) Aquades
- 5) Garam fisiologis

3.7.2 Alat

- a. Pembuatan ekstrak
 - 1) Maserator
 - 2) Distilator
 - 3) Timbangan
 - 4) Oven
 - 5) Blender
- b. Perawatan dan perlakuan hewan coba
 - 1) Kandang hewan
 - 2) Timbangan hewan
 - 3) Sonde lambung
 - 4) Syringe
 - 5) Alat gelas

c. Pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT

- 1) Kapas alkohol
- 2) Spuit
- 3) Tabung darah serum
- 4) Tabung mikrohematokrit
- 5) Alat sentrifuge
- 6) Mikropipet
- 7) Cuvet
- 8) Spektrofotometer Microlab 300

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yang diperoleh melalui hasil pemeriksaan laboratorium kadar SGPT dan SGOT serum tikus wistar jantan dari kelompok perlakuan yang akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Pemberian plumbum asetat

Bubuk plumbum asetat dilarutkan dengan aquades agar mudah untuk diinjeksikan. Plumbum asetat memiliki kelarutan sebesar 20 g/100ml dalam air, yang berarti plumbum asetat dapat dilarutkan ke dalam aquades. Dosis Plumbum asetat yang digunakan adalah 30 mg/KgBB. Tikus yang digunakan memiliki rerata berat badan 200 gram, sehingga didapatkan konsentrasi 6 mg atau 0,006 gram yang akan dilarutkan ke

dalam aquades. Total dosis Plumbum asetat yang diberikan selama 14 hari untuk 24 sampel kontrol positif dan perlakuan sekitar 2.016 mg/KgBB. Besarnya pelarut didapatkan dari perbandingan dengan kelarutan plumbum asetat dalam air. 6 mg plumbum asetat akan dilarutkan dalam 1 ml aquades sehingga didapatkan larutan stok plumbum asetat sebesar 336 ml. Larutan plumbum asetat tersebut diberikan secara oral dengan menggunakan sonde. Dilakukan sehari sekali selama 2 minggu.

3.7.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*)

Pembuatan ekstrak daun kumis kucing menggunakan bagian pucuk serta kumpulan tangkai muda tanaman kumis kucing yang sudah berbunga. Bagian tanaman yang digunakan tersebut kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu lebih dari 40°C. Setelah itu dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan. Serbuk simplisia kemudian diekstraksi menggunakan etanol 70% di dalam maserator sampai terbentuk maserat selama 2-3 hari. Setelah 3 hari dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Ampas dari hasil penyaringan dilakukan remaserasi kembali menggunakan etanol 70% selama 2-3 hari seperti langkah awal. Filtrat yang terbentuk kemudian dilakukan penguapan pada suhu 60-70°C. Kemudian ekstrak yang diperoleh dapat disimpan pada suhu 4°C untuk kemudian digunakan. Penginduksian ekstrak daun kumis kucing tersebut diberikan secara oral dengan menggunakan sonde. Sonde dimasukkan dengan hati-hati sampai mencapai lambung. Pemberian ekstrak dilakukan sehari sekali selama 14 hari.

3.7.4.3 Perlakuan Pada Hewan Coba

Tiga puluh ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi di laboratorium hewan coba dalam kandang dan diberikan ransum pakan standar selama 14 hari. Dibagi menjadi 5 kelompok yang masing – masing terdiri dari 6 ekor tikus wistar yang dipilih melalui *simple random sampling*. Pemberian perlakuan dilakukan berdasarkan kelompok yang sudah ditentukan:

- a. Kelompok kontrol negatif (K-) diberi ransum pakan standar dan tidak diberi perlakuan apapun.
- b. Kelompok kontrol positif (K+) yang diberi ransum pakan standar, aquades dan Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari
- c. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 50 mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- d. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 100 Mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- e. Kelompok perlakuan 3 (P3) diberi ransum pakan standar, Pb asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dosis 200 mg/kg BB/hari selama 14 hari.

- f. Pada hari ke-15 tikus dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi kemudian diambil darah pada plexus retroorbitalis untuk diperiksa kadar SGPT dan SGOT serum.
- g. Tikus wistar dilakukan anastesi terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dekapitasi.

3.7.4.4 Pemeriksaan Kadar SGOT

1. Membuat sediaan
 - a. Blanko akuades
 - b. Sampel
 - Serum atau plasma 100 μ L
 - Monoreagen/Reagen Mix 1000 μ L
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

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

Kisaran tes : ΔA 0,16/menit (279,2U/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 akuades
 - b. Sampel
 - Serum atau plasma 100 μ L
 - Monoreagen/ Reagen Mix 1000 μ L
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

$$\text{Kadar SGPT} = \Delta \text{Abs sampel } x - 1745 \text{U/L}$$

Kisaran tes : ΔA 0,16/menit (279,2U/L)

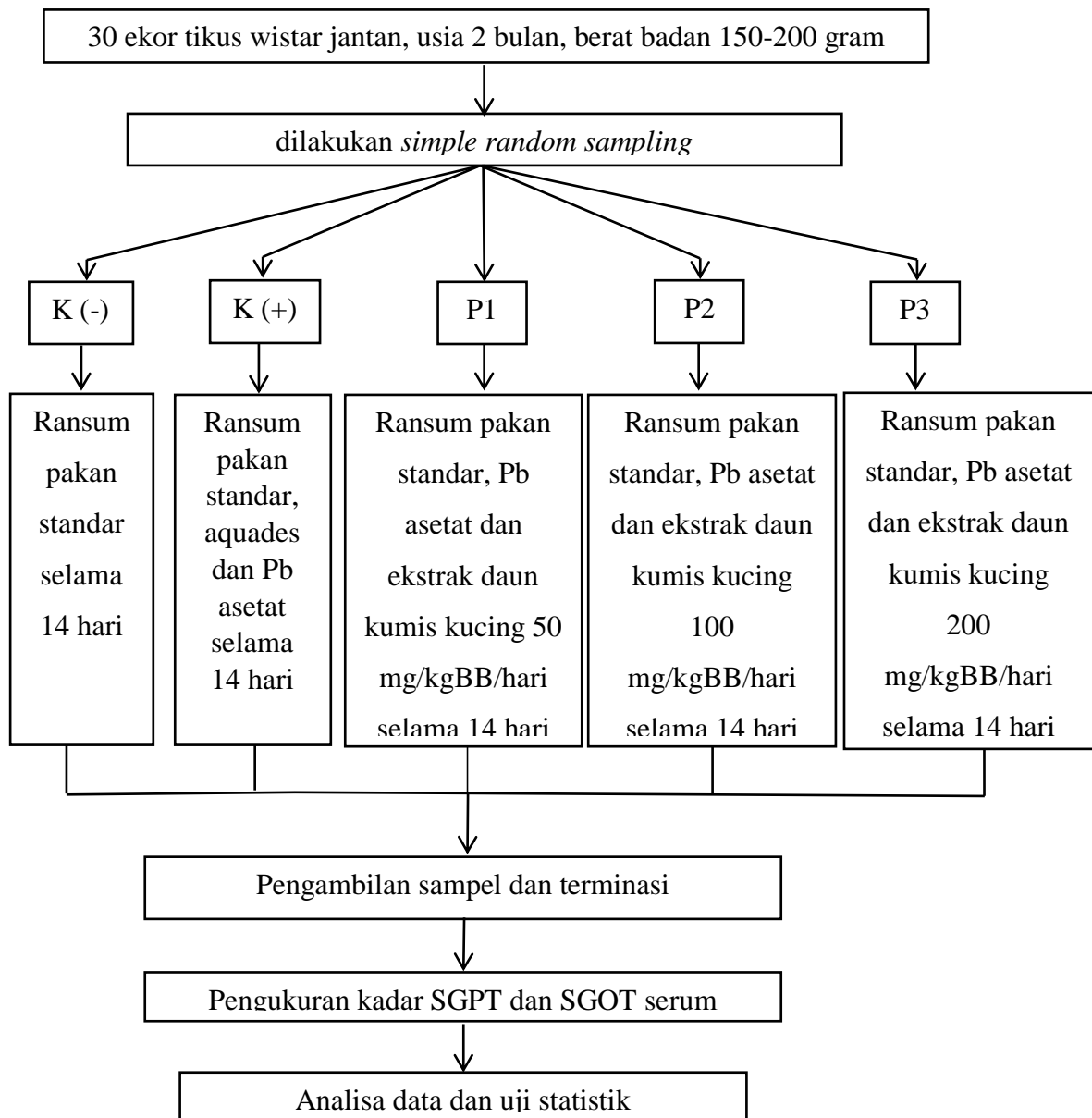
Nilai melebihi kisaran tersebut diencerkan 10x dengan 9 g/l NaCl hasil dikali 10

3.7.4.6 Pengambilan Data

- Seluruh tikus pada masing-masing kelompok diterminasi lalu diambil darah pada pleksus retroorbitalis untuk pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT serum untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Orthosiphon aristatus* terhadap kadar SGPT dan SGOT serum.

- Serum digunakan untuk pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT serum dengan spektrofotometer Microlab 300 yang dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

3.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan program komputer. Data tersebut diolah menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas didapatkan data berdistribusi normal sehingga dilanjutkan dengan pengujian menggunakan uji *One-Way Anova* kemudian dilakukan uji *post hoc*. Hasil penelitian dikatakan bermakna jika didapatkan perbedaan dengan nilai $p < 0,05$.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian telah mendapatkan *Ethical Clearence* dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro No 112/EC/H/FK-RSDK/IX/2018 tanggal 24 September 2018. Tikus dipelihara di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Tikus wistar jantan diberi pakan ransum standar untuk setiap kelompok. Pada kelompok perlakuan diberikan plumbum asetat yang dicampur dengan aquades kemudian disondekan. Pemberian ekstrak daun kumis kucing diberikan sesuai dosis yang telah ditentukan dan kemudian disondekan.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Bulan ke-					
		1	2	3	4	5	6
1.	Penyusunan proposal						
2.	Seminar proposal penelitian						
3.	Pengurusan Ethical clearance						
4.	Pelaksanaan penelitian						
5.	Pengumpulan data						
6.	Analisis data						
7.	Penyusunan laporan akhir dan seminar hasil penelitian						