

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

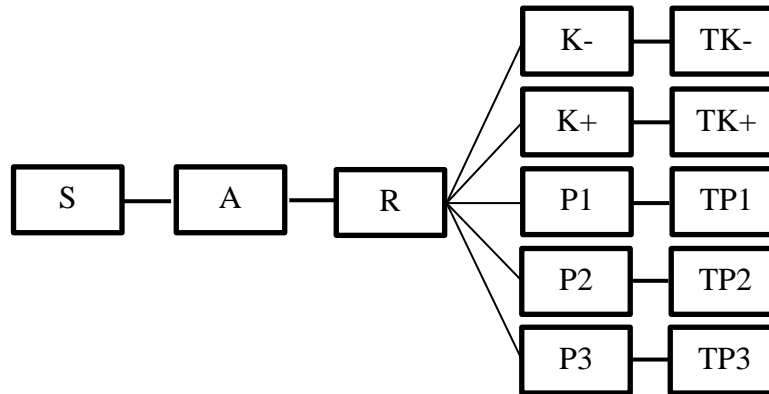
Penelitian ini dilakukan pada bulan April – September 2018. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat antara lain:

- a. Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*).
- b. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada

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 2-3 bulan sebagai subjek penelitian.

Skema rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 4. Skema rancangan penelitian

Keterangan:

S : Populasi

A : Kelompok sampel (masa adaptasi selama 7 hari)

R : Randomisasi

K (-) : Kelompok kontrol negatif hanya diberi ransum pakan standar selama 14 hari.

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

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

- P2 : Kelompok perlakuan 2 diberi ransum pakan standar, plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*) dosis 100 Mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- P3 : Kelompok perlakuan 3 diberi ransum pakan standar, plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*) dosis 200 mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- TK (-) : Tes kelompok kontrol negatif
- TK (+) : Tes kelompok kontrol positif
- TP1 : Tes kelompok perlakuan 1
- TP2 : Tes kelompok perlakuan 2
- TP3 : Tes kelompok perlakuan 3

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi target

Populasi target dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan usia 2-3 bulan.

3.4.2 Populasi terjangkau

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

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria inklusi

- a. Tikus wistar jantan
- b. Tikus wistar dalam keadaan sehat
- c. Berat badan 150-200 gram
- d. Usia 2-3 bulan
- e. Tidak terdapat kelainan anatomi

3.4.3.2 Kriteria eksklusi

Terjadi penurunan berat badan tikus setelah masa adaptasi.

3.4.3.3 Kriteria *drop out*

Tikus mati saat penelitian berlangsung

3.4.5. 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 eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semua diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi dan diberi ransum pakan standar.

3.4.6 Besar sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *World Health Organization* (WHO) 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 eksklusi selama penelitian maka pada tiap kelompok ditambahkan satu ekor tikus sehingga yang digunakan adalah 30 ekor tikus wistar jantan.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

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

3.5.2 Variabel terikat

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

3.6 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Jenis				
variabel	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
Bebas	Dosis ekstrak daun kumis kucing	Konsentrasi ekstrak daun kumis kucing adalah daun kumis kucing yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut ethanol. Terdapat tiga konsentrasi yaitu	mg/kgBB	Nominal

		50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB.		
Terikat	Kadar kreatinin serum	Masing – masing tikus diambil darah 1 cc melalui plexus retroorbitalis dan disentrifus untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa kadar kreatinin dengan metode Jaffe dan dapat dibaca pada $\lambda= 500 - 560$ nm menggunakan spektrofotometer.	mg/dl	Rasio
Terikat	Kadar ureum serum	Masing – masing tikus diambil darah 1 cc melalui plexus retroorbitalis dan disentrifus untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa kadar ureum dengan metode enzimatik “Urease-GLDH” dan dibaca pada $\lambda=578$ nm menggunakan spektrofotometer.	mg/dl	Rasio

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

- a. Pembuatan ekstrak
 - 1) Daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*)
 - 2) Ethanol 70%
- 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 spicatus*)
- c. Pemeriksaan kadar kreatinin dan ureum
 - 1) Darah vena atau kapiler dari plexus retroorbitalis
 - 2) Reagen kit kreatinin
 - 3) Reagen kit ureum
 - 4) Aquades

3.7.2 Alat

- a. Pembuatan ekstrak
 - 1) Maserator
 - 2) *Rotatory evaporator*
 - 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 kreatinin dan ureum

- 1) Kapas alkohol
- 2) Spuit
- 3) Tabung serum
- 4) Tabung mikrohematokrit
- 5) Alat sentrifuge
- 6) Mikropipet
- 7) Cuvet
- 8) Vortex-mixer
- 9) Spektrofotometer

3.7.3 Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yang diperoleh melalui hasil pemeriksaan laboratorium kadar kreatinin dan ureum serum tikus wistar jantan dari kelompok perlakuan yang 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, berarti plumbum asetat dapat dilarutkan ke dalam aquades. Dosis pemberian plumbum asetat merujuk kepada penelitian sebelumnya yaitu 30 mg/kgBB.²¹ Plumbum asetat diberikan secara peroral menggunakan sonde satu kali sehari selama tujuh hari.

3.7.4.2 Pembuatan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*)

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 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 dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*, lalu ekstrak yang kental kemudian dikeringkan menggunakan oven. Penginduksian ekstrak daun kumis kucing tersebut diberikan secara oral dengan menggunakan sonde yang dimasukkan dengan hati-hati sampai mencapai lambung. Pemberian ekstrak dilakukan sehari sekali selama satu minggu.

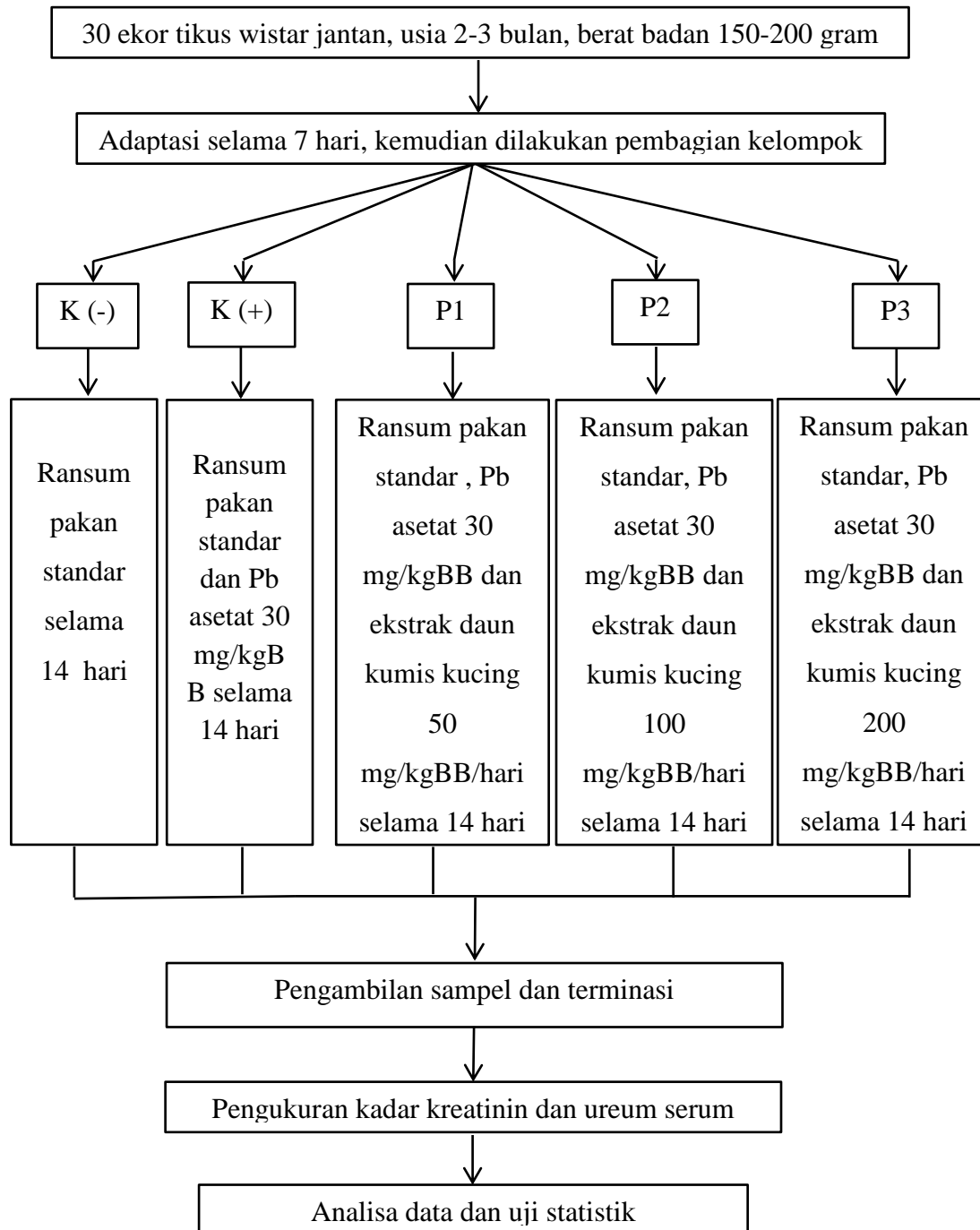
3.7.4.3 Perlakuan pada hewan coba

Tiga puluh ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium hewan coba dalam kandang dan diberikan ransum pakan standar selama 7 hari. Pada hari ke-8 tikus dibagi menjadi 5 kelompok yang masing – masing terdiri dari 6 ekor tikus wistar. Pemberian perlakuan dilakukan berdasarkan kelompok yang sudah ditentukan:

- a. Kelompok kontrol negatif (K-) hanya diberi ransum pakan standar selama 14 hari.
- b. Kelompok kontrol positif (K+) yang diberi ransum pakan standar dan plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- c. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi ransum pakan standar, plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*) dosis 50 mg/kg BB/hari selama 14 hari.

- d. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi ransum pakan standar, plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*) dosis 100 Mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- e. Kelompok perlakuan 3 (P3) diberi ransum pakan standar, plumbum asetat peroral 30 mg/kg BB/hari dan ekstrak daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus*) dosis 200 mg/kg BB/hari selama 14 hari.
- f. Pada hari ke-22 tikus dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi kemudian diambil darah melalui plexus retroorbitalis untuk diperiksa kadar kreatinin dan ureum serum.
- g. Tikus wistar dilakukan anastesi terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dekapitasi leher.

3.8 Alur penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan program komputer. Data tersebut diolah menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*. Distribusi data kadar kreatinin didapatkan persebaran data yang tidak normal maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Kemudian pada kadar ureum didapatkan sebaran data normal sehingga dilanjutkan dengan pengujian menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil penelitian dikatakan bermakna jika didapatkan perbedaan dengan nilai $p \leq 0,05$.

3.10 Etika penelitian

Penelitian mendapatkan *Ethical Clearence* yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro No. 111/EC/H/FK-RSDK/IX/2018 tanggal 24 September 2018. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Tikus wistar jantan diberi pakan ransum standar untuk setiap kelompok. Pada kelompok perlakuan diberikan plumbum astat yang dicampur dengan aquades kemudian disondekan. Pemberian ekstrak daun kumis kucing diberikan sesuai dosis yang telah ditentukan dan kemudian disondekan. Pengambilan sampel berupa darah diambil melalui plexus retroorbitalis. Terminasi penelitian dilakukan dengan cara dekapitasi leher tikus wistar yang sudah mendapatkan anastesi terlebih dahulu.

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 <i>ethical clearance</i>						
4.	Pelaksanaan penelitian						
5.	Pengumpulan data						
6.	Analisis data						
7.	Penyusunan laporan akhir dan seminar hasil penelitian						