

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

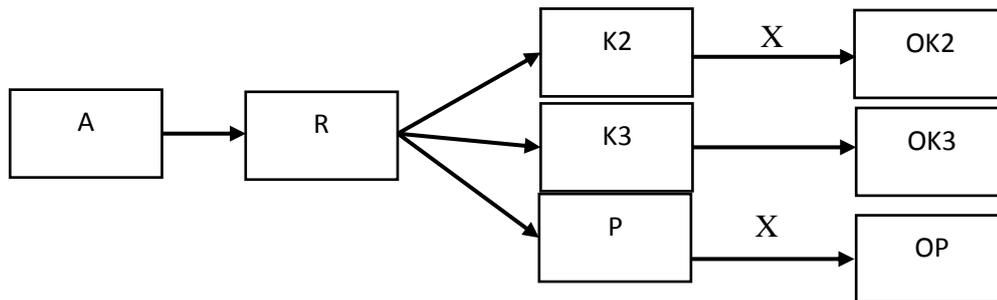
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia.

3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP untuk pengandangan hewan coba, pengambilan sample dan perlakuan renang. Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Diponegoro. Pemeriksaan dan analisis kadar AST dan ALT darah dilakukan di Laboratorium RSND (Rumah Sakit Nasional Diponegoro). Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

3.3 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ekstrak kulit buah naga merah dan pemberian aktivitas fisik maksimal, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar AST dan ALT darah tikus.



Gambar 3. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

A : Adaptasi. Sampel hanya diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama 7 hari

R : Randomisasi. Sampel akan dibagi ke dalam tiga kelompok secara acak.

K1 : Kontrol positif yang diberikan pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal.

K2 : Kontrol positif yang diberi pakan standar dan di sonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB .

P : Kelompok perlakuan yang diberikan pakan standar dan disonde ekstrak kulit buah naga merah selama 28 hari .

X : Pada hari ke-29 diberi perlakuan aktivitas fisik maksimal.

O K1 : Kadar AST dan ALT kelompok K1

O K2 : Kadar AST dan ALT kelompok K2

O P : Kadar AST dan ALT kelompok P

3.4 Populasi Dan Sample

3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus Wistar jantan.

3.4.2 Sample

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus Wistar yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari stainless steel dengan pencahayaan 12 jam mendapat makan dan minum *ad libitum* serta suhu kandang 28-32°C. Tikus jantan dipilih karena memiliki karakteristik metabolisme yang hampir sama dengan manusia dan tidak terganggu oleh adanya hormon. Sampel penelitian yang digunakan memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

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

Kriteria Eksklusi

- Kelainan anatomis
- Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

Kriteria Drop Out

- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati pada saat penelitian

3.4.3 Cara Sampling

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

3.4.4 Besar Sample

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO dalam *Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompok sebagai antisipasi apabila terjadi *drop out* saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat tiga kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 18 sampel.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- Ekstrak kulit buah naga merah

3.5.2 Variabel Terikat

- Kadar AST dan ALT serum tikus Wistar

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Ekstrak kulit buah naga merah	Kulit buah naga merah diekstrak dengan metode maserasi. Dosis ekstrak kulit buah naga merah yang diberikan adalah 300 mg/kgBB	Gram/ml	Nominal
2	Kadar AST dan ALT	Parameter kerusakan sel hepar yang dapat diukur dalam darah. Pemeriksaan kadar AST dan ALT dengan metode IFCC tanpa Pyridoxal Phosphate 37 ⁰ C. Pengambilan darah tikus melalui medial canthus sinus orbitalis. Sampel darah sebanyak 2 ml.	IU/L	Rasio

3	Aktifitas Fisik Maksimal	Perlakuan menginduksi agar terjadi stres oksidatif pada tikus. Perlakuan aktivitas fisik maksimal berupa renang maksimal pada tikus sampai hampir tenggelam atau nampak tanda-tanda kelelahan berupa tenggelamnya hampir semua badan kecuali hidung dan melemahnya gerakan anggota gerak serta menurunnya waktu reaksi. Lamanya renang adalah 60 menit.	untuk Menit	Nominal
----------	--------------------------	---	-------------	---------

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan
- d. Sput

e. Mikropipet 100 μ l

f. Tabung reaksi

g. Rak tabung reaksi

h. Sentrifuse

i. Waterbath

j. Vortex

k. Cuvet

l. Indiko

3.7.2 Bahan

a. Tikus Wistar jantan

b. Pakan standar dan air minum

c. Ekstrak kulit buah naga merah

3.7.3 Jenis Data

Kadar AST dan ALT tikus setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah pasca aktivitas fisik maksimal merupakan data primer yang bersifat kuantitatif.

3.7.4 Cara Kerja

1. Aktivitas Fisik Maksimal

Perlakuan aktivitas fisik maksimal berupa renang maksimal pada tikus sampai hampir tenggelam atau tampak tanda-tanda kelelahan berupa tenggelamnya hampir semua badan kecuali hidung dan melemahnya gerakan anggota gerak serta menurunnya waktu reaksi. Lamanya renang adalah 30-60 menit

2. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah

Prosedur Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Naga

Dengan Pelarut Etanol 70% (Metode Maserasi)

A. Alat:

- | | | |
|------------------------|------------------------------|------------|
| 1. Erlen Meyer 1 Liter | 6. Neraca Digital | 11. Statip |
| 2. Cawan Porselin | 7. Water Bath | |
| 3. Pipet Tetes | 8. Corong | |
| 4. Beker Glass | 9. Kertas Saring/Kain flanel | |
| 5. Gelas Ukur | 10. Pengaduk | |

B. Bahan:

1. Sampel Kulit Buah Naga Merah Kering
2. Pelarut Etanol 70%
3. Aquadest

C. Cara Kerja:

1. Kupas buah naga segar,ambil kulitnya lalu dicuci bersih hingga hilang kotorannya.

2. Dipotong-potong, kemudian keringkan dibawah sinar matahari tetapi tidak terkena langsung sinarnya (diatasnya ditutup kain/kertas) atau di oven. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi/menghilangkan kandungan air yang ada dalam kulit buah naga.
3. Timbang seksama sampel kulit buah naga merah yang telah kering masing-masing : sampel (I) +/- 50,9753 gr, sampel (II) +/- 66,7274 gr.
4. Masukkan ke-duanya dalam dua erlen meyer berbeda ukuran 1 liter.
5. Tambahkan ke-duanya pelarut etanol 70%, masing-masing (I) 500 ml, (II) 400 ml sampai semua sampel terendam.
6. Gojok/aduk rendaman, tutup erlen meyer, simpan ditempat gelap dan biarkan selama 24 jam.
7. Setelah 24 jam, saring rendaman tersebut dengan kain flanel dan tuangkan dalam cawan porselin.
8. Uapkan diatas water bath dengan suhu 60-70 derajat atau diangin-anginkan sampai air dan pelarutnya hilang dan didapat ekstraknya.
9. Sisa rendaman ditambah pelarut lagi dengan volume yang lebih kecil dari yang pertama dan dilakukan percobaan yang sama.
10. Proses rendaman dilakukan 2 kali atau lebih dengan penambahan volume pelarut semakin mengecil.
11. Timbang ekstrak yang diperoleh.

3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel dikandangan secara berkelompok di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP. Selama penelitian Wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Adaptasi dilakukan selama 7 hari serta diberikan pakan dan minum standar *ad libitum*. Pada hari ke-8, Wistar dibagi ke dalam empat kelompok secara acak, yaitu :

- K1: kontrol positif yang diberikan pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal.
- K2: kontrol positif yang diberi pakan standar dan di sonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB .
- P: kelompok perlakuan yang diberikan pakan standar dan disonde ekstrak kulit buah naga merah selama 28 hari
- X : kelompok perlakuan diberikan pakan standar dan disonde ekstrak kulit buah naga merah selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal.

Perlakuan aktivitas fisik maksimal dan pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP. Perlakuan dilakukan per hari mulai hari ke-8 selama 28 hari dan pada hari ke-29 dilakukan aktivitas fisik maksimal lalu dilanjutkan dengan pengambilan sampel darah melalui untuk kelompok K1, K2, K3 dan P.

4. Pemeriksaan Kadar AST/ALT

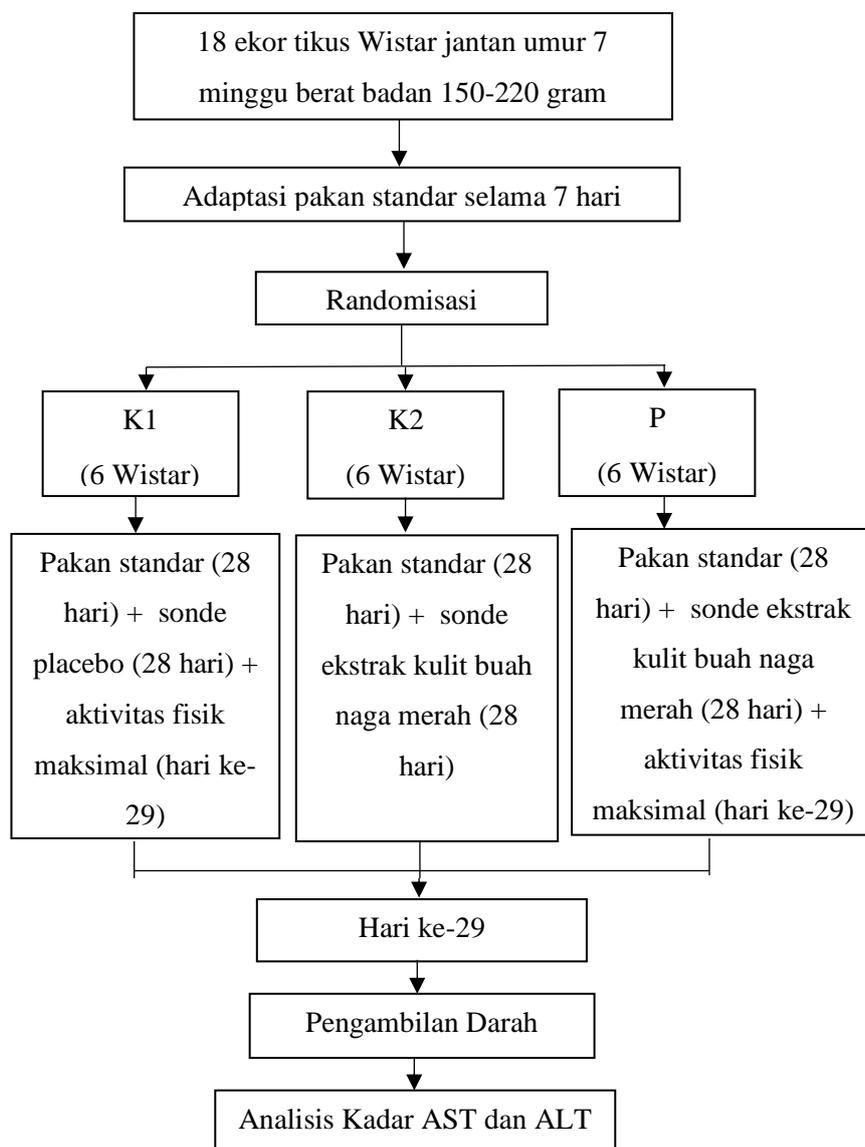
Kadar AST/ALT ditentukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Pengambilan darah tikus melalui medial canthus sinus orbitalis. Sampel darah

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 3000 rpm selama 10 menit. Serum di atas sel-sel darah yang menggumpal selanjutnya diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf. Serum dibaca kadar AST dan ALT dengan metode IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) tanpa Pyridoxal Phosphate 37⁰C. Alat untuk mengukur kadar AST dan ALT adalah Indiko. Skala yang digunakan adalah skala rasio.

3.8 Analisis Data

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 terdistribusi 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 terdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 4. Diagram Alur Penelitian

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK)

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, RSUP Dr. Kariadi.