

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini termasuk dalam lingkup keilmuan Biokimia dan Farmakologi.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

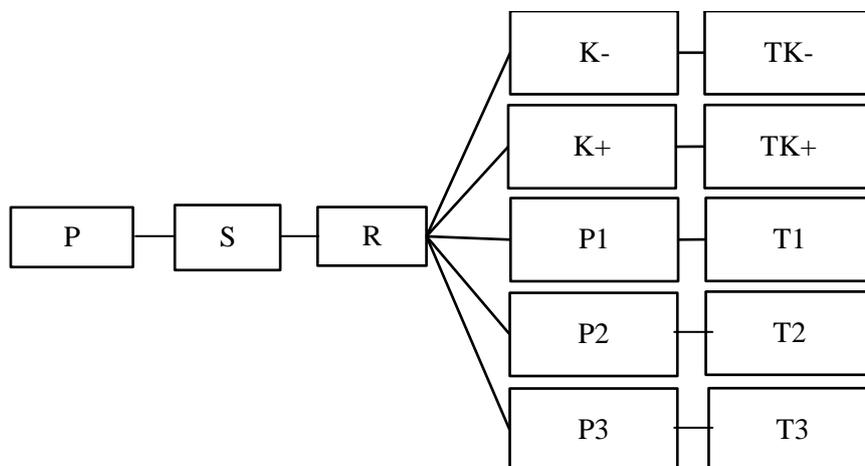
Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Juli 2017. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat antara lain:

- a) Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan ekstrak ethanol daun kelor (*Moringa oleifera*).
- b) Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pemeliharaan hewan coba, intervensi terhadap hewan coba, serta pengambilan sampel.
- c) Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental* laboratorik dengan rancangan *Post Test only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa tikus wistar sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 4. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

P : Populasi

S : Kelompok sampel

R : Randomisasi

K (-) : Perlakuan kelompok kontrol diberi pakan standar dan tidak diberi perlakuan apapun

K (+) : Kelompok kontrol yang diberi pakan standar, akuades, dan formalin peroral 100 mg/kgBB/hari selama 21 hari.

P1 : Perlakuan kelompok 1 diberi pakan standar, ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB selama 5 hari, dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB pada pagi hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB pada sore hari selama 21 hari.

P2 : Perlakuan kelompok 1 diberi pakan standar, ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB selama 5 hari, dilanjutkan pemberian

formalin peroral 100 mg/kgBB pada pagi hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB pada sore hari selama 21 hari.

P3 : Perlakuan kelompok 1 diberi pakan standar, ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB selama 5 hari, dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB pada pagi hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB pada sore hari selama 21 hari.

TK (-) : Tes kelompok kontrol negatif

TK (+) : Tes kelompok kontrol positif

T1 : Tes kelompok perlakuan 1

T2 : Tes kelompok perlakuan 2

T3 : Tes 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 Pengembangan dan Penelitian Hewan Percobaan Universitas Airlangga Surabaya

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria inklusi

- a. Tikus wistar jantan
- b. Berat badan rata-rata 150-250 gram

- c. Usia 2-3 bulan
- d. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif bergerak
- e. Tidak terdapat kelainan anatomi

3.4.3.2 Kriteria *drop out*

- a. Tikus tidak mau makan dan minum
- b. Tikus mati saat penelitian berlangsung

3.4.3 Cara Pengambilan Sampel

Sampling 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 sehingga dianggap cukup homogen. Semua diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

3.4.4 Besar Sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *World Health Organization* (WHO) adalah 5 ekor tiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus strain wistar jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing masing berisi 5 ekor. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out* selama penelitian, maka pada tiap kelompok ditambahkan satu ekor tikus.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada hewan coba yang diberikan secara peroral.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar ureum dan kreatinin serum tikus wistar yang diinduksi formalin peroral dan diberi ekstrak daun kelor.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

| Jenis Variabel | Variabel | Definisi Operasional | Unit | Skala |
|----------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
| Bebas | Ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | Daun kelor diperoleh dari daerah Kedungsari Semarang, sebanyak 35 gram diekstraksi menggunakan etanol 70% 350 ml dengan ekstraksi maserasi multistahap. Hasil diencerkan dengan akuades sebelum digunakan. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba (P1) dosis 200 mg/kgBB, (P2) dosis 400 mg/kgBB, dan (P3) dosis 800 mg/kgBB dengan sonde peroral sebanyak satu kali sehari selama 26 hari. | mg/kgBB | Nominal |

| | | | | |
|------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| Tergantung | Kadar ureum serum | Masing-masing tikus diambil darah 1 cc melalui pleksus retroorbitalis dan disentrifuse untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa kadar urea dengan metode “Urease-GLDH” dan dibaca pada $\lambda = 578$ nm menggunakan alat spektrofotometer Microlab 300 | mg/dl | Rasio |
| Tergantung | Kadar kreatinin serum | Masing-masing tikus diambil darah 1 cc melalui pleksus retroorbitalis dan disentrifuse untuk mendapatkan serum. Serum diperiksa kadar kreatinin dengan tes kinetik dan dibaca pada $\lambda = 492$ nm menggunakan alat Fotometer Microlab 300 | mg/dl | Rasio |

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Pembuatan ekstrak
 - a. Daun kelor (*Moringa oleifera*)
 - b. Etanol 70%
 - c. Aquades
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
 - a. 25 ekor tikus wistar jantan

- b. Pakan dan minum standar
 - c. Formalin 37 %
 - d. Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*)
- 3) Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin
- a. Darah vena/kapiler dari plexus retroorbitalis
 - b. Reagen kit ureum
 - c. Reagen kit kreatinin
 - d. Aquades

3.7.2 Alat

- 1) Pembuatan ekstrak
- a. Erlenmeyer
 - b. Pisau
 - c. Gelas ukur
 - d. Waterbath
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
- a. Kandang hewan
 - b. Timbangan hewan
 - c. Sonde lambung *syringe*
 - d. Tabung penampung
- 3) Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin
- a. Kapas alkohol
 - b. Sput

- c. Tabung darah
- d. Tabung mikrohematokrit
- e. Alat sentrifuge
- f. Mikropipet (*yellow tip* dan *blue tip*)
- g. Cuvet
- h. Vortex-mixer
- i. Spektrofotometer Microlab 300

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer. Data diperoleh melalui hasil pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin tikus wistar jantan dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Pembuatan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*)

Daun kelor (*Moringa oleifera*) sebanyak 35 gram dibersihkan dan dipotong-potong lalu di biarkan di tempat terbuka. Daun yang sudah agak mengering diletakkan dalam tabung erlenmeyer yang telah terisi etanol 70% 350 ml kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam dengan pengulangan 2-3 kali, lalu menyaring campuran tersebut dengan kain lunak untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat kemudian dilakukan penguapan pada suhu 60-70°C. Ekstrak yang diperoleh dapat disimpan pada suhu 4°C untuk kemudian digunakan.

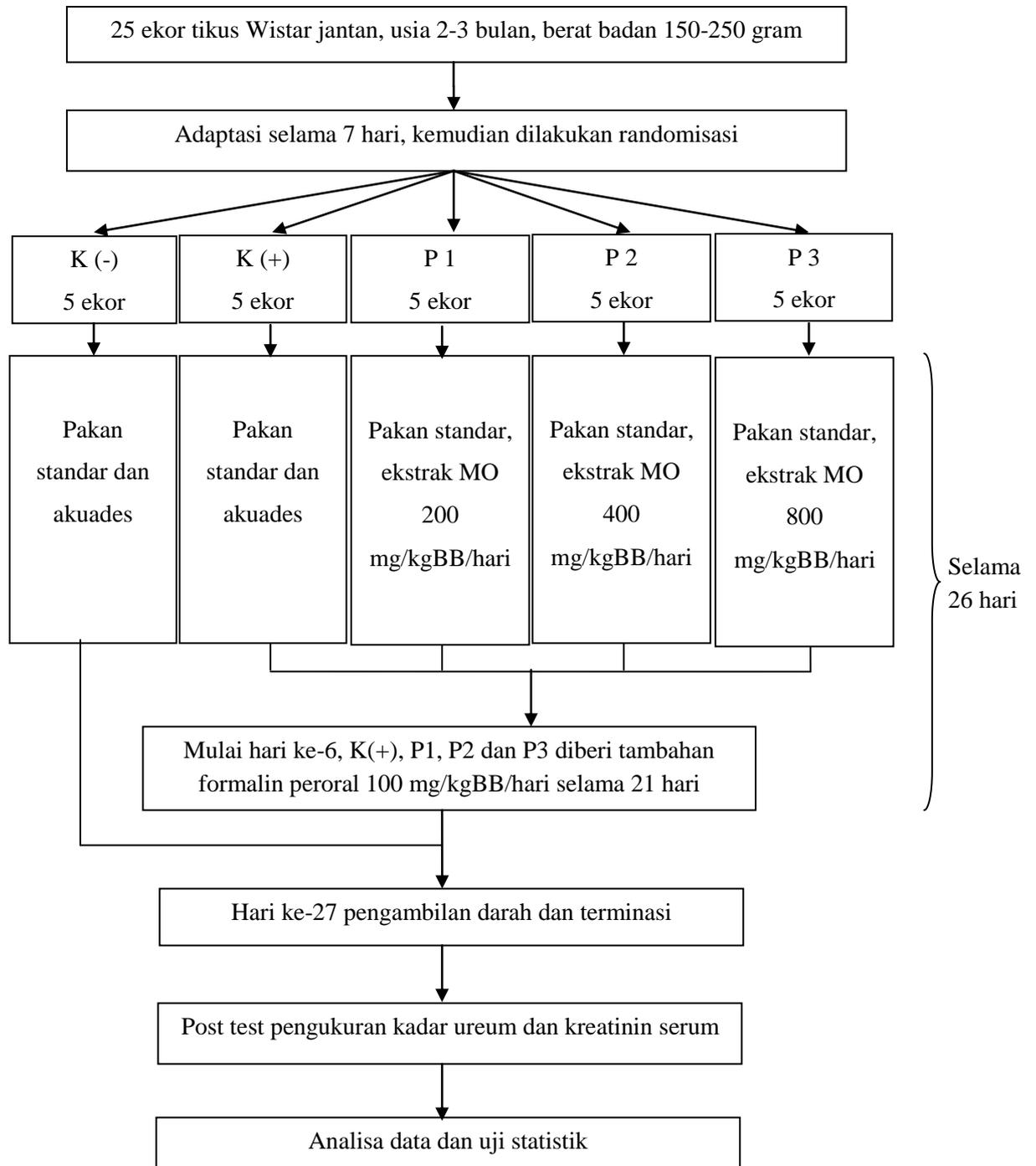
3.7.4.2 Perlakuan pada hewan coba

- 1) Dua puluh lima ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- 2) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih berdasarkan *simple random sampling*.
- 3) Mulai hari ke-8 pada kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif yang diberikan pakan dan minum standar *ad libitum* selama 26 hari berturut turut tanpa perlakuan.
- 4) Pada kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif, tikus wistar diberikan pakan standar dan aquadest selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari selama 21 hari tanpa diberi perlakuan apapun.
- 5) Kelompok Perlakuan 1, diberi pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari selama 5 hari pertama, dan dilanjutkan formalin peroral 100 mg/kgBB/hari pada pagi hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) 200 mg/kgBB/hari pada sore hari selama 21 hari.
- 6) Kelompok Perlakuan 2, diberi pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari selama 5 hari pertama, dan dilanjutkan formalin peroral 100 mg/kgBB/hari pada pagi hari dan

ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) 400 mg/kgBB/hari pada sore hari selama 21 hari

- 7) Kelompok Perlakuan 3, diberi pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari selama 5 hari pertama, dan dilanjutkan formalin peroral 100 mg/kgBB/hari pada pagi hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) 800 mg/kgBB/hari pada sore hari selama 21 hari.
- 8) Pada hari ke-27 tikus dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi kemudian diambil darah pada plexus retroorbitalis untuk diperiksa kadar ureum dan kreatinin serum.
- 9) Tikus wistar dilakukan anestesi terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dekapitasi.

3.8 Alur Penelitian



Keterangan: Tiap kelompok diberi cadangan 1 tikus

Gambar 5. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh telah diolah dengan program komputer SPSS 21.0. Data primer yang diperoleh berupa kadar ureum dan kreatinin serum diolah menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, jika $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney test*.

- a. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna, uji hipotesis dianggap signifikan secara statistik
- b. Jika $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, formalin dicampur dengan akuades kemudian disondekan. Untuk ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) diberikan dengan menggunakan sonde peroral. Setelah penelitian selesai, hewan diterminasi dengan cara dekapitasi leher dengan sebelumnya dilakukan anestesi terlebih dahulu. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

| No. | Kegiatan | Bulan ke- | | | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------|-----------|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1. | Penyusunan proposal | | | | | | |
| 2. | Seminar proposal penelitian | | | | | | |
| 3. | Revisi proposal penelitian | | | | | | |
| 4. | Pengurusan Ethical clearance | | | | | | |
| 5. | Pelaksanaan penelitian (pemilihan sampel, perlakuan, terminasi) | | | | | | |
| 6. | Pengumpulan dan pengolahan data | | | | | | |
| 7. | Analisis data | | | | | | |
| 8. | Penyusunan laporan akhir dan seminar hasil penelitian | | | | | | |