

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan *Post Test Only with Control Group Design*. Perlakuan berupa pemberian Teh Daun Tapak Dara pada tikus wistar jantan inflamasi yang diinduksi DEN dengan parameter pengukuran variabel yaitu kadar SGOT dan SGPT. Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus wistar jantan yang berumur 45-75 hari yang dibagi menjadi 4 kelompok dengan pengulangan sebanyak 7 kali. Masing-masing kelompok perlakuan diberi pakan sesuai standar pakan tikus

Tabel 1. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Replikasi						
	1	2	3	4	5	6	7
P1	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
P2	X ₁₂	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇
P3	X ₁₃	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇
P4	X ₁₄	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆	X ₄₇

Keterangan :

P1 : kontrol negatif (air aquades 20 ml)

P2 : DEN kontrol positif (air aquades 20 ml + DEN)

P3 : teh daun tapak dara 3 ml + 17ml aquades + DEN

P4 : teh daun tapak dara 6 ml + 14 ml aquades + DEN

X₁₁, X₁₂, X₁₃..... X₄₇ Unit percobaan

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2020.

2. Tempat penelitian

- a. Pengadaptasian dan pemeliharaan tikus di Laboratorium Hewan Coba Poltekkes Kemenkes Malang
- b. Pembuatan teh daun tapak dara di Laboratorium Class of Excellence Poltekkes Kemenkes Malang
- c. Analisis kadar SGOT dan SGPT di Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Malang

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus wistar*) dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus jantan, berbulu putih, dan sehat
- b. Umur 45-75 hari
- c. Berat badan 105-110 gram
- d. Tikus dalam kondisi sehat : gerakan-gerakan makan dan minum keadaan tenang, tidak ada luka dan cacat

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang selama 2-3 hari berturut-turut tidak mau makan
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Dalam penelitian ini menggunakan 4 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dibutuhkan 7 ekor tikus dengan jumlah sampel sebanyak 28 ekor tikus. Jumlah tikus untuk masing-masing taraf perlakuan dihitung dengan rumus Federer (Febriyanti, 2018) sebagai berikut :

$$(n-1)(T-1) \geq 15$$

$$(n-1) 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

n = 7 subjek penelitian

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Bak plastik berukuran 60x40 cm dan kawat baja sebagai penutup untuk pemeliharaan tikus
- b. Wadah minum dan wadah makan tikus
- c. Timbangan analitik
- d. Plastik
- e. Sendok
- f. Piring
- g. Gelas ukur
- h. Sarung tangan lateks
- i. Alat bedah
- j. Panci perebusan
- k. Label
- l. Tabung EDTA
- m. Disposable Syringe/ Jarum Suntik
- n. Tabung vacutainer warna merah dan tabung *ependof* untuk penyimpanan serum
- o. Sentrifuge
- p. Spektrofotometri

2. Bahan Penelitian

- a. 28 ekor tikus wistar usia 45-75 hari dengan BB 105-110 gram
- b. Serbuk daun tapak dara
- c. Bahan pakan tikus
- d. Kloroform
- e. Kapas dan Alkohol swab
- f. Aquades steril
- g. DEN
- h. Kit SGOT dan SGPT

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian teh daun tapak dara

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar SGOT dan SGPT

F. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Variabel Penelitian

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur
Pemberian Teh Daun Tapak Dara	Serbuk teh daun tapak dara didapatkan dari Materia Medika Batu, Jawa Timur. Kelompok perlakuan P1 dan P2 diberikan teh daun tapak dara dengan dosis 3 ml ditambah aquades 17 ml dan 6 ml ditambah aquades 14 ml. Teh daun tapak dara diberikan setiap jam 13.00 selama 24 jam.	Metode pemberian teh daun tapak dara melalui oral sebagai pengganti air minum. Mengukur takaran pemberian teh daun tapak dara dalam satuan ml dengan gelas ukur dan spuit 12 ml	Rasio
Kadar SGOT dan SGPT	Kadar SGOT dan SGPT	Jumlah SGOT dan SGPT di	Rasio

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur
	adalah enzim yang dihasilkan dari sel hati sebagai indikator pemeriksaan fungsi hati.	dalam serum (U/L) yang diuji menggunakan spektrofotometer	

G. Tahapan Penelitian

1. Adaptasi/Pemeliharaan Tikus

- a. Menyiapkan kandang tikus yang terbuat dari plastik dengan ukuran 40x60 cm dan diberi penutup yang terbuat dari kawat. Kemudian kandang tersebut diberi alas berupa sekam dan meletakkan wadah pakan dan minum.
- b. Tikus dimasukkan pada kandang yang telah disiapkan (satu kandang untuk satu tikus). Adaptasi tikus dilakukan selama 7 hari dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan kondisi kandang dan lingkungan laboratorium.
- c. Pemberian pakan dan minum dilakukan setiap hari pada jam 13.00 selama 24 jam. Setiap tikus diberikan pakan 30g/hari dan minum 20 ml. Setelah 24 jam dilakukan penimbangan sisa pakan menggunakan neraca digital dan minum tikus menggunakan spuit kemudian hasilnya dicatat. Rata-rata asupan makan tikus dihitung menggunakan excel pada setiap perlakuan.
- d. Penimbangan berat badan tikus dilakukan seminggu sekali menggunakan timbangan digital.
- e. Pembersihan kandang tikus dilakukan seminggu sekali setiap hari jumat agar terhindar dari penyakit.
- f. Suhu laboratorium berada pada suhu ruang yaitu 20-25 °C.

2. Pembuatan Tikus Inflamasi

a. Persiapan Penelitian

- 1) Memakai jas lab
- 2) Mencuci tangan
- 3) Memakai masker dan penutup kepala

b. Prosedur Pemegangan Tikus

- 1) Memegang tikus dengan tangan kiri (bukan pada bagian ekor)
- 2) Ekor tikus dipegang diantara jari kelingking dan jari manis
- 3) Memposisikan tikus dalam keadaan terlentang

c. Induksi DEN (Dietilnitrosamin)

Setelah adaptasi, kelompok tikus perlakuan (P1), kelompok tikus perlakuan (P2), dan kelompok tikus kontrol positif (P4), diinjeksi DEN. Dosis DEN yang diberikan yaitu 10-90 mg / Kg BB (Tolba, 2015) sebanyak 2cc secara intraperitoneal selama 5 minggu dengan frekuensi pemberian 2 kali dalam seminggu. Penyuntikan DEN dilakukan pada hari Selasa dan Jumat.

3. Pembuatan Teh Tapak Dara

Dalam pembuatan teh tapak dara menggunakan serbuk daun tapak dara dengan perbandingan serbuk daun tapak dara dan air yaitu 1:10 (Daroini, 2006). Serbuk daun tapak dara yang digunakan sebanyak 10 gram kemudian diseduh dengan air mendidih sebanyak 100 ml. Kemudian diaduk sampai serbuk daun tapak dara larut secara merata. Setelah itu, teh daun tapak dara dibiarkan selama 5 menit lalu disaring. Setelah disaring, filtrat digunakan menjadi teh daun tapak dara dan ampasnya dibuang. Kemudian baru siap ditakar sesuai perlakuan dan diberikan kepada tikus.

4. Prosedur Pembuatan Pakan Tikus

- a. Bahan pakan tikus disiapkan yaitu tepung jagung, tepung ikan, tepung tulang, tepung kedelai, tepung kacang tanah, mineral mix, vitamin B kompleks, minyak goreng dan garam
- b. Seluruh bahan pakan tersebut dicampur dalam suatu wadah kemudian diaduk secara merata

- c. Setelah tercampur rata bahan pakan tersebut ditakar sesuai standar pakan tikus yaitu 30g/hari. Lalu dimasukkan ke dalam wadah pakan dan diberikan kepada semua tikus perlakuan.

Tabel 3. Komposisi Bahan Pakan Tikus dalam Sehari

Bahan	%	Berat bahan pakan / kg (kg)
Tepung Jagung	75	0,75
Tepung Ikan	5	0,05
Tepung Tulang	1	0,01
Tepung Kedelai	10	0,10
Tepung Kacang Tanah	5	0,05
Mineral mix	0,2	0,002
Vitamin B Kompleks	1 blr/hari	1 blr
Minyak Goreng	1	0,01
Garam	0,2	0,002

5. Pemberian Teh Tapak Dara

- a. Teh daun tapak dara diberikan pada kelompok tikus perlakuan P1 dan P2. Pada kelompok tikus P1 diberikan dengan dosis 3 ml ditambah aquades 17 ml. kemudian pada kelompok tikus P2 diberikan dengan dosis 6 ml ditambah aquades 14 ml.
- b. Pemberian teh tapak dara pada tikus melalui oral sebagai pengganti air minum, dilakukan pada jam 13.00 selama 24 jam. Setelah 24 jam ditimbang sisa teh tapak dara yang sudah diminum sehingga dapat mengetahui jumlah teh yang sudah diminum.

6. Pengambilan Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada minggu ke-5 dan minggu ke-9 perlakuan pada hewan coba. Pengambilan darah dilakukan oleh tenaga profesional lain secara intrakardial yaitu dengan mengambil darah dari jantung tikus dengan menggunakan spuit.

- a. Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, tikus dibius menggunakan kloroform. Semua peralatan dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70 %. Kemudian, tikus diambil dari kandang

dan dimasukkan ke tabung kemudian dibius dengan kloroform dengan cara disemprot hingga 2-3x.

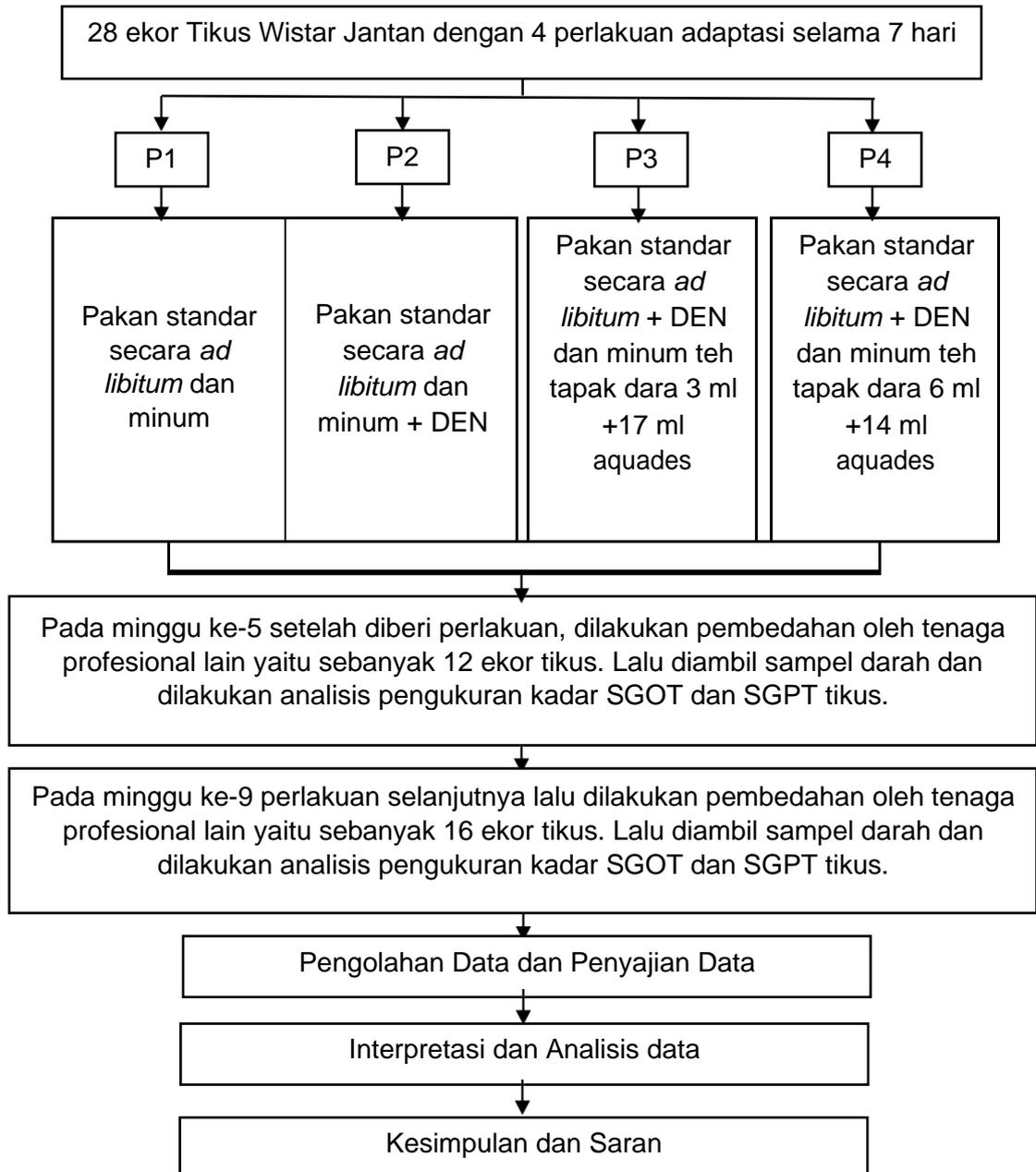
- b. Setelah itu, hewan difiksasi dan ditelentangkan pada papan pembedahan (posisi *supine*) menggunakan jarum untuk menusuk kaki sehingga tikus terlentang lebar.
- c. Kemudian dilakukan pembedahan sampai organ jantung terlihat. Darah diambil dengan memasukkan jarum suntik ke bagian jantung sedalam 5 mm dari torak menuju dagu. Jarum suntik membentuk sudut 25-30° dari dada tikus.
- d. Darah langsung diambil sebanyak 5 ml menggunakan *sputit* dan ditampung dalam tabung *vacutainer*.

7. Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT

- a. Darah yang telah diambil dan dimasukkan ke tabung *vacutainer* kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Serum yang terpisah diambil dan dimasukkan dalam tabung *ependof* yang bersih dan kering dan ditutup.
- b. Pengukuran SGOT Serum darah diambil 100 μ l dengan mikropipet, ditambahkan reagen SGOT BUF 1000 μ l, kemudian divortex, diinkubasi selama 5 menit. Setelah diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, campuran yang telah berisi reagen diukur selama 3 menit dengan spektrofotometer. Pada setiap menitnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 340 nm karena pada panjang gelombang tersebut, sampel akan memberikan serapan maksimum. Setelah dilakukan pengukuran absorbansi, data dicatat untuk dihitung dan diinterpretasikan.

- c. Pengukuran SGPT Serum darah diambil 100 μ l dengan mikropipet, ditambahkan reagen SGPT BUF 1000 μ l, kemudian divortex, diinkubasi pada selama 5 menit. Setelah diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, campuran yang telah berisi reagen diukur selama 3 menit dengan spektrofotometer. Pada setiap menitnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 340 nm karena pada panjang gelombang tersebut, sampel akan memberikan serapan maksimum. Setelah dilakukan pengukuran absorbansi, data dicatat untuk dihitung dan diinterpretasikan.

H. Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Teh Daun Tapak Dara pada Kadar SGOT dan SGPT

I. Metode Pengumpulan Data

1. Data Karakteristik Tikus

Data karakteristik tikus yang diambil yaitu berat badan tikus, asupan makanan tikus, dan asupan minuman tikus. Berat badan tikus ditimbang setiap seminggu sekali menggunakan timbangan digital. Asupan makanan menggambarkan tercukupi kebutuhan zat gizi seperti protein, lemak dan serat bagi tikus dan dapat melihat adanya penurunan nafsu makan selama penelitian. Hal ini dilakukan dengan cara menimbang pakan setiap hari sebelum pemberian makan dimulai pada hari kedua dengan cara menghitung selisih berat pakan yang diberikan dengan berat pakan yang tersisa. Asupan minuman dihitung setiap hari sebelum pemberian minuman dimulai pada hari kedua dengan cara menghitung selisih volume minuman yang diberikan dengan volume minuman yang tersisa.

2. Data Kadar SGOT dan SGPT

Data kadar SGOT dan SGPT tikus didapatkan dari pemeriksaan laboratorium dari sampel darah tikus pada pembedahan minggu ke-5 dan minggu ke-9 dengan metode spektrofotometri

J. Pengolahan dan Analisis Data

1. Data Karakteristik Tikus

Pengolahan data karakteristik tikus dilakukan secara deskriptif untuk setiap perlakuan. Kemudian dianalisis kondisi tikus pada setiap perlakuan selama penelitian. Maka dengan hasil data karakteristik tikus tersebut dapat diketahui bahwa ada perubahan berat badan dan perubahan nafsu makan pada tikus selama penelitian.

2. Data Kadar SGOT dan SGPT

a. Uji Normalitas Data

Uji normalitas data akan dianalisis jika memiliki data berdistribusi normal dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila $p > 0,05$ maka akan didapatkan data berdistribusi normal.

b. Uji Varians

Uji varians atau Levene's Test digunakan untuk mengetahui homogenitas dari dua kelompok atau lebih. Apabila $p > 0,05$ maka data homogen.

c. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar SGOT dan SGPT pada kelompok perlakuan yang terdistribusi normal dan varians data homogen menggunakan uji parametrik One Way ANOVA atau sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, maka sebagai alternatif dapat digunakan uji Jonckhere Terpstra.

d. Uji Post Hoc (Lanjutan)

Uji post hoc bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap kadar SGOT dan SGPT. Apabila terdapat perbedaan nyata dari uji One Way ANOVA dengan hasil $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji beda *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Untuk uji alternatif menggunakan *Man-Whitney*.

K. Instrumen Analisis Data Penelitian

Instrumen analisis data penelitian yaitu *Microsoft Word* 2010, *Microsoft Excel* 2010, SPSS 25, dan alat tulis.