

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### I. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental / intervensional di laboratorium untuk menilai peranan rebusan herba daun putri malu (*Mimosa pudica, L*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar terhadap kadar enzim alkaline phosphatase (ALP) serum. Pada penelitian ini obyek penelitian diikuti secara prospektif selama periode tertentu untuk mencari ada tidaknya efek dari perlakuan yang diberikan.

Metode yang digunakan adalah *pre- / post test control group design*. *Pre-test* dilakukan dengan mengamati kadar enzim alkaline phosphatase (ALP) sebelum diberikan perlakuan, hal itu bertujuan untuk mengetahui apakah pada awal penelitian obyek penelitian dalam keadaan sehat dengan kadar enzim alkalin phosphatase dalam batas nilai normal. Kemudian *post-test* akan dilakukan dengan mengamati kadar alkaline phosphatase (ALP) pada hari ke-10 setelah diberikan perlakuan, apakah ada perbedaan yang signifikan pada kedua kelompok obyek penelitian.

## II. Tempat dan Waktu

### a. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan LPPT PAU Pasca-sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### b. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tanggal 27 Juni – 8 Juli 2008.

## III. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel dalam penelitian ini :

- a. **Populasi Target (*Target Population*)** : tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang sehat dengan kadar *alkaline phosphatase* (ALP) dalam batas nilai normal.
- b. **Populasi Terjangkau (*Accessible Population, Source Population*)** : tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar sehat yang didapat dari Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia (UII), Yogyakarta.
- c. **Sampel yang digunakan pada penelitian ini** : tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar sehat dengan bobot  $\pm 150 - 250$  gram usia 2 – 3 bulan yang didapat dari Laboratorium Farmasi

Universitas Islam Indonesia (UII), Yogyakarta. Sampel berjumlah 10 ekor, dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

- 1) Kelompok sampel I / kelompok control : 5 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi makan dan minum selama 10 hari kemudian diberi pajanan CCl<sub>4</sub> pada hari ke-11.
- 2) Kelompok sampel II / kelompok perlakuan : 5 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi makan, minum, dan rebusan *M. pudica* selama 10 hari kemudian diberi pajanan CCl<sub>4</sub> pada hari ke-11.

#### IV. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi didapat dari populasi terjangkau, yaitu :

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang sehat dengan kadar ALP dalam kisaran normal.
- b. Tikus putih dengan bobot  $\pm 150 - 250$  gram.
- c. Tikus putih yang berusia 2 – 3 bulan.

Kriteria eksklusi sampel, meliputi :

- a. Tikus putih yang kadar ALP-nya tidak dalam kisaran normal.
- b. Tikus yang mati.

#### V. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Beberapa variabel yang berperan pada penelitian ini antara lain:

- a. Variabel perlakuan (bebas) / variabel dependen : rebusan *M. pudica*.

Dosis yang diberikan berdasarkan dosis tertinggi efektifitas

hepatoprotektif (1,890 gram/kg BB) pada penelitian yang telah dilakukan oleh Linawati, dkk (1999).

- b. Variabel tergantung / variabel independen : keaktifan kadar enzim *alkaline phosphatase* (ALP)-serum. Diamati perubahan kadar ALP setelah perlakuan dengan pemberian rebusan *M. pudica* pada tikus yang diinduksi  $\text{CCl}_4$ , apakah mengalami perubahan yang bermakna atau tidak dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- c. Variabel pengganggu terkendali: terdapat beberapa faktor yang dapat mengganggu hasil penelitian ini diantaranya :
- 1) Ras. Sama halnya pada manusia, perbedaan ras dapat mempengaruhi farmakokinetik, dan efek samping dari suatu obat. Untuk mengendalikan penyakit dari faktor ini maka tikus yang digunakan pada penelitian ini dipilih dari galur yang sama, yaitu galur wistar.
  - 2) Berat badan. Berat badan yang berbeda dengan pemberian dosis obat yang sama maka ada kemungkinan akan munculnya efek yang berbeda, sehingga untuk meminimalkan efek tersebut maka tikus yang digunakan dalam satu kelompok dipilih yang memiliki berat badan yang hampir sama, yaitu  $\pm 150 - 250$  gram.
  - 3) Diet. Makanan dapat mengganggu farmakokinetik obat dan kemungkinan juga dapat berinteraksi dengan rebusan herba putri malu sehingga hasil kurang tepat. Oleh karena itu kita menggunakan pellet sebagai bahan makanan pada semua obyek penelitian.

- 4) Jenis kelamin. Pengaruhnya hampir sama dengan pengaruh ras, meskipun pengaruhnya itu sangat kecil akan tetapi untuk mendapatkan hasil yang valid maka dipilih tikus yang berjenis kelamin sama, yaitu jantan.

d. Variabel pengganggu tak terkendali

- 1) Kesehatan ginjal dan hepar tikus. Hepar berfungsi sebagai memetabolisme obat dan ginjal berfungsi sebagai pelepasan obat melalui urin. Oleh karenanya dalam penelitian, keadaan hepar dan ginjal tikus harus dipastikan dalam keadaan sehat, namun penentuan kesehatan hepar dan ginjal dalam penelitian ini hanya berdasarkan aktivitas hewan (gerakan-gerakan), ada-tidaknya luka, dan hewan terlihat kurus atau tidak. Hal itu dikarenakan pemeriksaan kesehatan ginjal dan hepar sangatlah sulit dan rumit karena keduanya adalah organ dalam.
- 2) Faktor genetik, hal ini berpengaruh pada semua aktivitas biologis dan biokimia tiap hewan yang bersifat khas sehingga setiap hewan akan memiliki tingkat kepekaan atau kesensitifitasan yang berbeda pada pemberian dosis obat.

## VI. Alat dan Bahan

Bahan yang diuji adalah rebusan *Mimosa pudica*, yang diperoleh dari LPPT PAU Pasca-sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Air suling

yang digunakan untuk merebus diambil dari LPPT PAU Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan untuk model hepatotoksin berupa  $\text{CCl}_4$  dari LPPT PAU Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Dan reagen yang digunakan ada dua macam, yaitu:

- a. Reagen I : 2-amino-2-methyl-1-propanol (0,35 mol/L; pH 10,4), magnesium sulfat (2,0 mmol/L), zinc-sulfat (1,0 mmol/L), dan HEDTA (2,0 mmol/L).
- b. Reagen II : p-Nitrophenylphosphate (16,0 mmol/L).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan *International Federation of Clinical Chemistry*, yaitu :

- |               |                          |
|---------------|--------------------------|
| a. Sentrifuge | g. Neraca                |
| b. Pipet      | h. Sonde                 |
| c. Kompor     | i. Micro-hematokrit tube |
| d. Inkubator  | j. Spektrofotometer      |
| e. Stopwatch  | k. Spuit injeksi         |
| f. Alat gelas | l. Alat infus            |

## VII. Cara Kerja

- a. Pembuatan rebusan *M. pudica*.

Sejumlah daun segar *M. pudica* yang telah ditimbang sesuai dosis 1,890 gram/kg BB dimasukkan ke dalam panci, kemudian tambahkan air. Rebus

daun *M. pudica* sampai mendidih dalam waktu 15 menit sehingga didapatkan dosis akhir rebusan *M. pudica* masing-masing kelompok sampel 5 ml. Kemudian rebusan ini disaring dalam keadaan masih panas. Panci harus ditutup supaya air yang menguap tidak banyak hilang.

a. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji.

Sepuluh ekor tikus putih dibagi ke dalam dua kelompok, masing-masing berjumlah lima ekor. Tikus kelompok I diberi makan dan minum aquades selama 10 hari berturut-turut kemudian pada hari ke-11 diinduksi  $\text{CCl}_4$  sebagai kelompok kontrol. Tikus kelompok II diberi rebusan *M. pudica* selama 10 hari berturut-turut diikuti dengan induksi  $\text{CCl}_4$  sebagai kelompok perlakuan. Setelah 24 jam induksi  $\text{CCl}_4$ , kedua kelompok tikus diambil cuplikan darahnya melalui vena orbital untuk diambil serumnya dan diukur aktivitas ALP-serumnya secara spektrofotometri.

b. Pembuatan serum.

Tikus putih jantan diambil darahnya melalui vena orbital. Darah ditampung ke dalam tabung sentrifuga melalui dinding tabung, didiamkan selama 15 menit, kemudian dipusingkan dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum).

c. Penetapan aktivitas ALP-serum.

Alat yang digunakan untuk menganalisis ALP-serum adalah vitalab-mikro. Prosedur ASSAY fotometri-nya dengan panjang gelombang 405 nmHg (400 – 420 nm), suhu 30 – 37°C :

1) Awal substrat : sampel → 20  $\mu\text{l}$

Reagen I → 1000 µl

Dicampur, diinkubasi selama  $\pm$  1 menit kemudian

ditambah dengan reagen II → 250 µl

Dicampur, baca absorbansinya setelah 1 menit, 2 menit, dan 3 menit.

2) Awal sampel : sampel → 20 µl

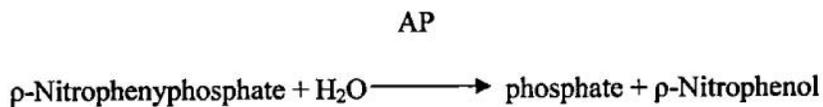
Monoreagen (4 bagian reagen I dan 1 bagian reagen II) → 1000 µl

Dicampur, dibaca absorbansinya setelah menit ke-1, 2, dan 3.

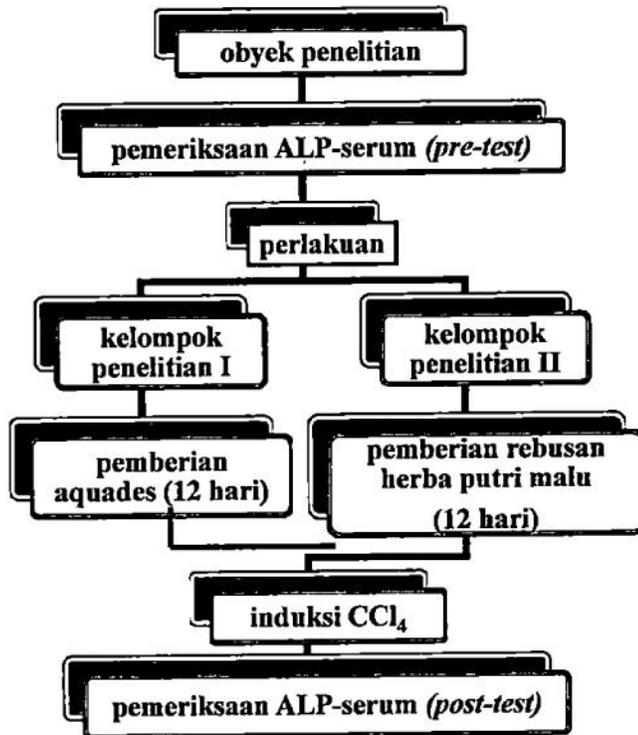
Sampel kemudian didilusi dengan 0,9 % NaCl (1 : 9).

Reagen yang digunakan dipastikan dalam keadaan stabil dan siap digunakan serta dilihat tanggal kadaluarsanya. Hindarkan adanya kontaminasi dan pastikan dalam kondisi suhu 2 – 8°C dan juga terlindungi dari cahaya.

Adapun metode pemeriksaan kadar ALP-serum ini adalah Kinetic Colorimetric Test, dengan prinsip dasar reaksi dalam pemeriksaan adalah sebagai berikut :



Skema langkah kerja :



## I. Analisa Data

Penghitungan statistik dari data hasil penelitian ALP-serum dengan uji *paired t test*, untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar ALP-serum pada kelompok sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus putih induksi karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>).