

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah ekperimental laboratoris dengan rancangan *the post-test only control group design* yaitu melakukan pengamatan dan pengukuran setelah perlakuan (Notoatmojo, 2002) dengan menggunakan hewan coba yaitu tikus wistar jantan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat taraf perlakuan dan masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali. Desain penelitian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Replikasi						
	1	2	3	4	5	6	7
P 1	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
P 2	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₄	X ₂₆	X ₂₇
P 3	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇
P 4	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆	X ₄₇

Keterangan :

P 1 : Teh 3 ml + Air Aqua 17 ml + DEN 1 ml

P 2 : Teh 6 ml + Air Aqua 14 ml + DEN 1 ml

P 3 : Air 20 ml (kontrol negatif)

P 4 : Air 20 ml + DEN (kontrol positif)

X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₄₇ : Unit Percobaan

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat

- Pembuatan Teh Tapak Dara di Laboratotium *Center of Excellence* Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.
- Pembedahan dan pengambilan sampel darah tiap tikus wistar jantan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.
- Analisis pemeriksaan LED dilakukan di Laboratorim Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang yang dibantu oleh Laboran yang telah lulus pendidikan jurusan teknologi laboratorium (analisis kesehatan).

b. Waktu

Penelitian dilakukan selama 7 minggu yaitu :

1. Seminggu pertama untuk adaptasi

2. Minggu ke 2-4 diberikan perlakuan sesuai yang ditetapkan
3. Pada minggu ke 4, hari terakhir dilakukan pembedahan pertama yaitu sebanyak 3 ekor tikus tiap perlakuan, diambil darahnya lalu dianalisis LED tiap kelompok perlakuan.
4. Dilanjutkan setelah pembedahan, sisa tikus diberikan perlakuan sesuai yang ditetapkan sampai minggu ke-7
5. Pada hari terakhir minggu ke-7 dilakukan pembedahan kedua, diambil darahnya lalu dianalisis LED tiap kelompok perlakuan.

3.3 Populasi dan Sampel

a. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus wistar putih berbulu lebat berkelamin jantan usia 3-4 bulan dengan berat 100 – 200 g.

b. Sampel

Sampel penelitian memiliki kriteria sebagai berikut :

- Kriteria inklusi

1. Tidak ada abnormalitas yang tampak pada tubuhnya
2. Sehat dan aktif bergerak
3. Bulu bersih, tidak rontok dan kulit tidak ada luka

- Kriteria eksklusi

1. Tikus yang selama 2-3 hari berurut-turut tidak mau makan
2. Tidak aktif bergerak

c. Besar Sampel

Dalam penelitian ini menggunakan 4 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dibutuhkan 7 ekor tikus, dengan begitu dalam penelitian ini menggunakan tikus sebanyak 28 tikus. Adapun perhitungan tersebut didapat dengan menggunakan rumus Federer :

$$\begin{aligned}
 t (n - 1) &\geq 15 \\
 4 (n - 1) &\geq 15 \\
 4 n - 4 &\geq 15 \\
 n &\geq 4,75 \\
 n &\approx 5
 \end{aligned}$$

Keterangan :

t = perlakuan,

n= jumlah sampel

Menunjukkan bahwa besar sampel sebaiknya lebih dari 4,75, oleh karena itu peneliti menggunakan 7 tikus dalam setiap kelompok perlakuan. Selanjutnya, akan dilakukan pembedahan pada minggu ke-3

yaitu sebanyak 3 ekor tikus setiap perlakuan dan minggu ke-12 dilakukan pembedahan kedua sebanyak 4 tikus setiap perlakuan. Sehingga, jumlah tikus yang dibutuhkan yaitu sebanyak 28 tikus.

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independent) : Pemberian Teh Tapak Dara
2. Variabel Terikat (Dependent) : Kadar Laju Endap Darah

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel Independent

Variabel Independent	Definisi	Cara Ukur	Hasil Pengukuran	Skala
Teh Tapak Dara	<p>Adalah suatu formula berupa minuman yang terbuat dari herbal daun tapak dara (<i>Catharanthus roseus</i>) dengan tambahan air dan gula, dibuat sendiri, diberikan pada tikus wistar jantan dengan jumlah sesuai dengan kebutuhan kelompok perlakuan, diberikan melalui oral yaitu diminum menggunakan botol. Kemudian, teh tapak dara yang disiapkan diletakkan didalam kandang setiap hari setiap pukul 13.00. Setelah 24 jam minuman akan diganti</p> <p>P1: Kelompok perlakuan teh 3 ml, tikus nomer 1-7 P2 : Kelompok perlakuan teh 6 ml, tikus nomer 8-14</p>	Diberikan sesuai jumlah yang telah ditetapkan pada setiap perlakuan	-	Nominal

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel Dependent

Variabel Dependent	Definisi	Cara Ukur	Hasil Pengukuran	Skala
Kadar Laju Endap Darah	Laju Endap Darah adalah kecepatan sampel darah mengendap yakni eritrosit dengan menggunakan metode <i>westergreen</i> yang dinyatakan dalam mm/jam. Hasil dari kadar LED ini dapat membuktikan bahwa adanya suatu peradangan aktif, terkena infeksi atau menandakan adanya inflamasi (Guarner, et al, 2015)	Menggunakan metode <i>westergreen</i>	(mm/jam)	Rasio

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perlengkapan kandang tikus dan bahan untuk perlakuan

- Kandang dengan ukuran 60 x 40 cm
- Sekam
- Tempat pakan tikus dengan diberi pengait kawat
- Pakan tikus yaitu setiap tikusnya diberi pakan sebanyak 30 g yang berisi :

Tabel 2. Kebutuhan Pakan Tikus dalam Sehari (Rahman et al, 2013)

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

Keterangan : pakan diberikan sebanyak 30 g/ tikus

- Botol minum tikus
- Spuit 1 cc untuk menyuntikkan dietilnitrosamin
- Dietilnitrosamin

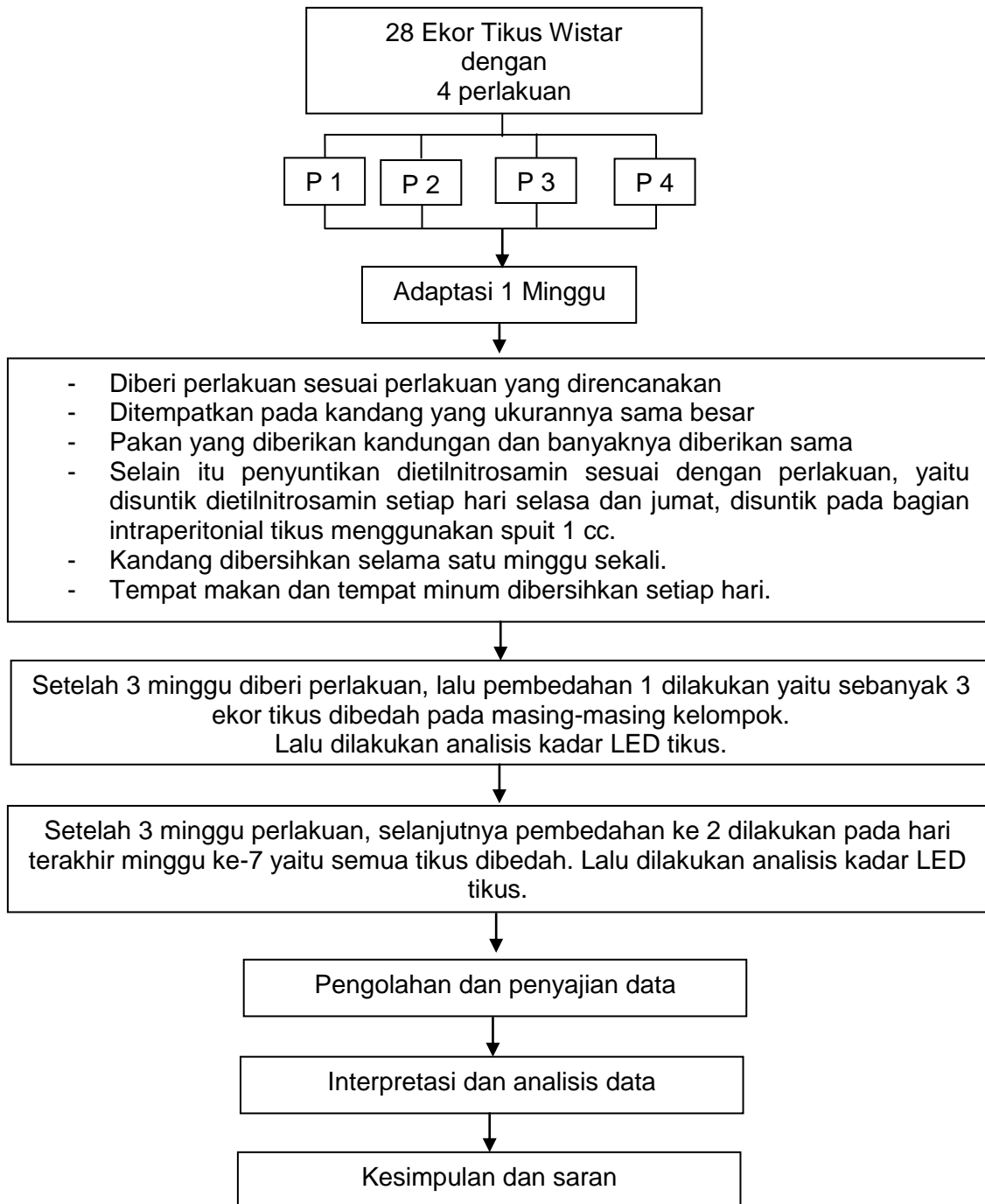
2. Pembedahan tikus

- Kloroform
- Kapas
- Meja preparat
- Tabung untuk tempat bius tikus
- 5 buah pines
- Gunting bedah
- Gelas beker
- Spuit 5 cc untuk sampel darah tiap tikus yang diambil dari bagian jantung
- Sarung tangan latex
- Masker bedah karet
- Tabung ETDA

3. Analisis LED

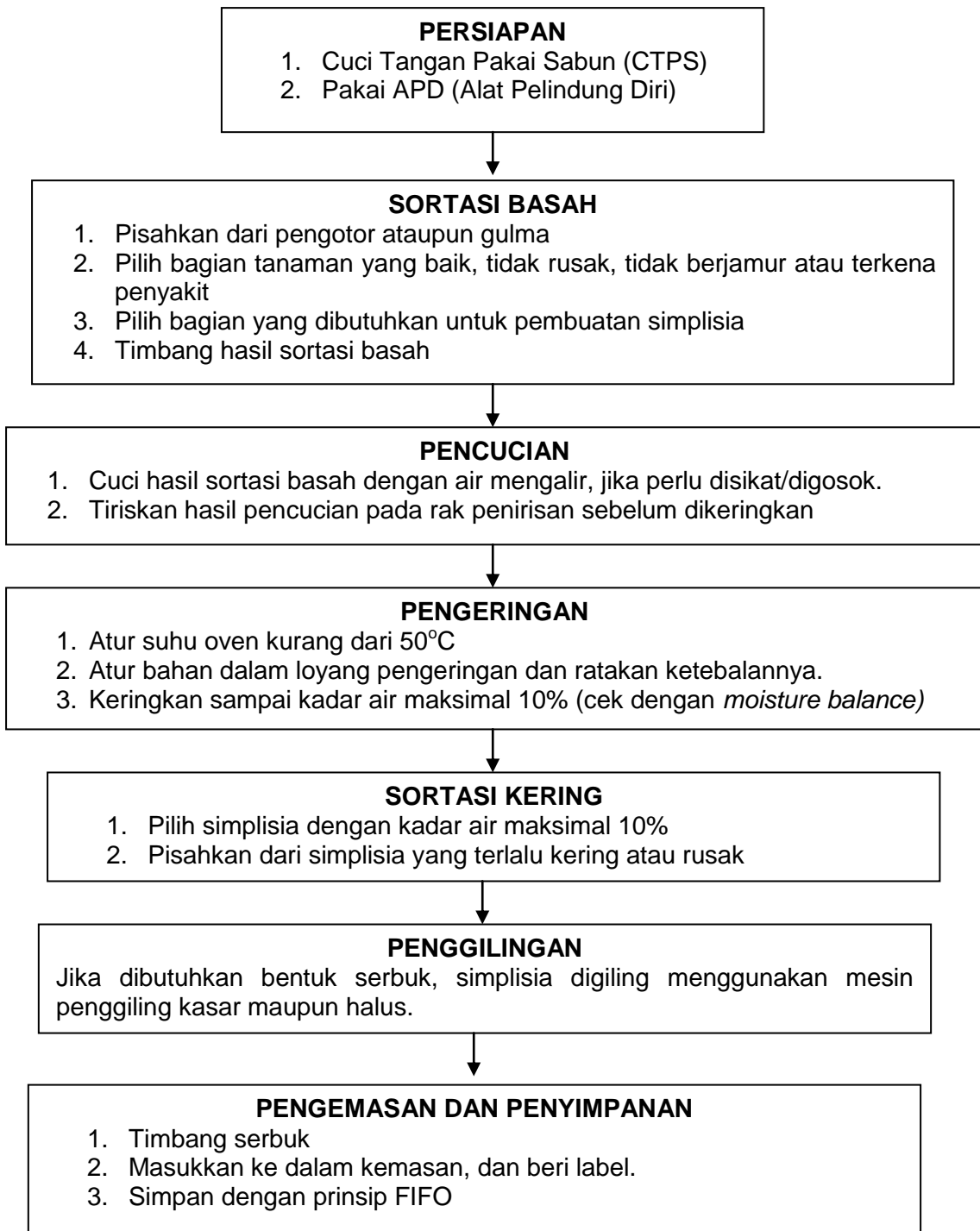
- Rak westergreen
- Tabung/pipet westergreen
- Penghisap/ Rubber Bulp
- NaCl
- Timer

3.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Teh Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*) Terhadap Laju Endap Darah Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Dietilnitrosamin

- **Cara membuat serbuk teh daun tapak dara**



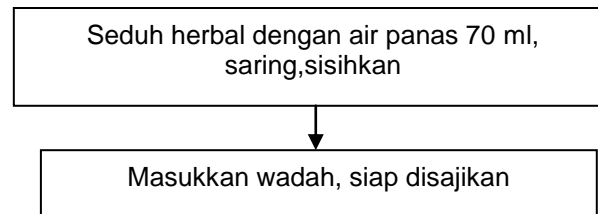
Gambar 5. Bagan Alur Pembuatan Serbuk Teh Daun Tapak Dara

- **Cara membuat teh Tapak Dara**

Bahan :

Herbal tapak dara	7 g
Air	70 ml
Gula	2,5 g

Untuk P1 dengan jumlah tikus 7 dan P2 dengan jumlah tikus 7 dalam 1 hari.

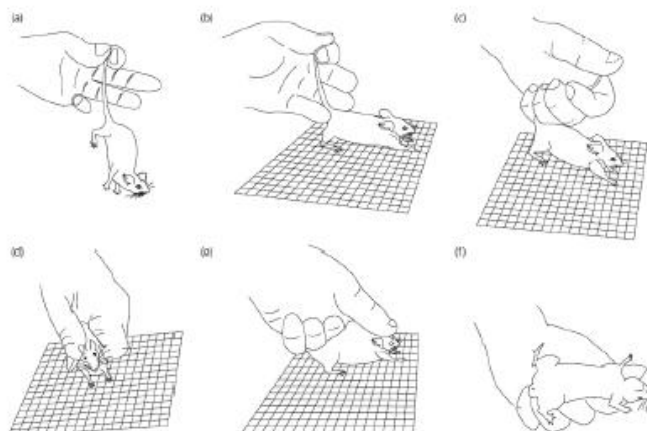


Gambar 6. Cara membuat Teh Tapak Dara

- **Cara memegang hewan coba dan persiapan tikus**

1. Gunakan alat pelindung diri antara lain jas lab, masker, penutup kepala dan sarung tangan.
2. Selalu mencuci tangan sebelum dan setelah melakukan praktikum.
3. Cara memegangnya yaitu, mengangkat tikus dengan cara memegang ekornya kearah atas dengan tangan kiri, dimiringkan 45° .
4. Kemudian, tangan kiri, ibu jari dan jari telunjuk menjepit kulit tengkuk tikus seerat/setegang mungkin.
5. Lalu, menjepit ekor diantara jari kelingking dan jari manis tangan kiri.
6. Tikus telah terpegang oleh tangan kiri dan siap untuk diberi perlakuan (induksi Dietilnitosamin).

(Stevani, 2016)



Gambar 7. Cara memegang tikus

- Sekam diganti setiap seminggu sekali untuk mencegah terjadinya penyakit.
- Menjaga suhu ruangan yaitu 20-25°C yaitu suhu ruang.
- Menyalakan lampu laboratorium pada pagi hari dan mematikan lampu pada sore hari sebagai fase gelap terang (12 jam : 12 jam), untuk menyesuaikan dengan habitat tikus, dimana tikus merupakan hewan malam (Muchtadi, 2010)

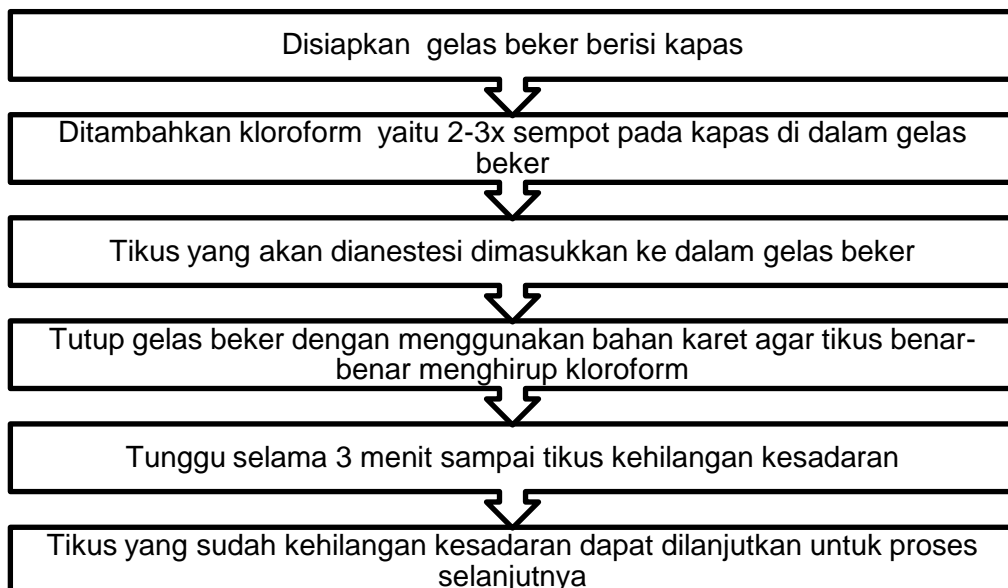
- **Cara memberikan minum pada tikus**

Diberikan dengan jalur oral, yaitu dengan menggunakan botol minum tikus dengan pipa yang dilengkapi 'klep' peluru bulat yang terletak di ujung pipa lalu diletakkan dengan tegak. Menurut (Tolistiawaty, 2015), pemberian minum pada tikus yaitu sebanyak 3-6 ml/hari dengan bobot berat badan 20-40 g, sehingga tikus pada penelitian ini akan diberikan minum sebanyak 20 ml/hari dan selalu diganti pada waktu yang ditentukan yaitu pada pukul 13.00.

- **Cara menyuntik Dietilnitrosamin pada tikus**

Penyuntikan dilakukan pada bagian intra peritoneal yaitu dengan cara pada saat penyuntikan, abdomen tikus diposisikan lebih rendah daripada kepala tikus. Jarum disuntikkan dengan sudut sekitar 100° yaitu pada bagian abdomen bawah disebelah garis midsagital. Penyuntikan menggunakan spuit 1 cc diberikan sesuai dengan perlakuan yang direncanakan. Penyuntikan ini dilakukan dalam seminggu 2x yaitu 1 cc setiap hari selasa dan jumat.

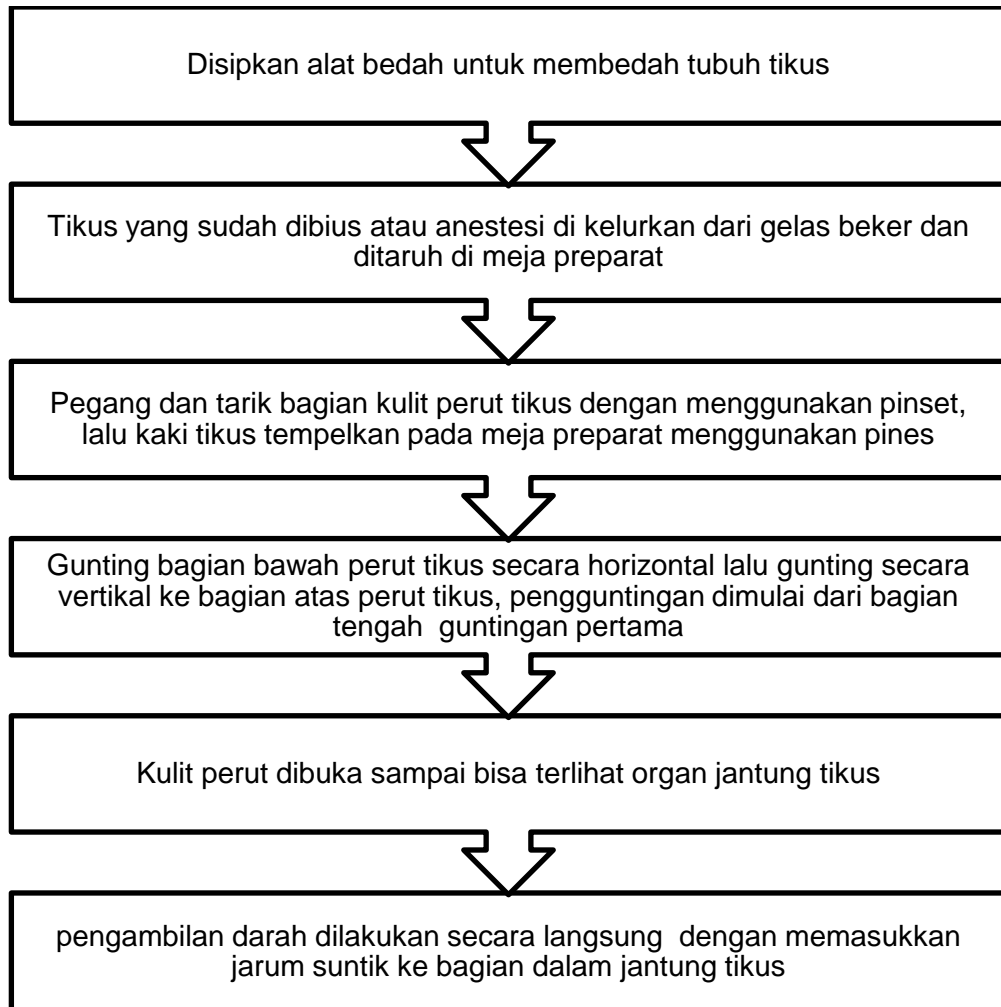
- **Cara menganastesi tikus**



(Wati, 2009)

Gambar 8. Cara menganastesi tikus

- **Cara membedah dan mengambil sampel darah tikus**



(Wati, 2009)

Gambar 9. Cara membedah dan mengambil sampel darah tikus

- **Cara analisis LED menggunakan metode westergreen (Christopher, 2003)**

1. Prinsip Kerja

Darah yang dicampur dengan antikoagulan dimasukkan ke dalam tabung westergren dan diamankan dalam suhu kamar dengan posisi tegak lurus selama satu jam, maka eritrosit akan mengendap di dasar tabung dan bagian atas tertinggal plasma, nilai LED dinyatakan dalam mm/jam.

2. Cara Kerja

- Homogenisasi sampel sebelum diperiksa
- Sampel darah yang diencerkan tersebut kemudian dihisap ke dalam tabung westergreen sampai menunjukkan skala 0.
- Tabung diletakkan pada rak dengan posisi tegak lurus, jauh dari getaran dan terkena paparan sinar matahari langsung.

- Tunggu dan biarkan hingga 1 jam lalu mencatat penurunan eritrosit itulah yang disebut dengan laju endap darah.

3.8 Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa data rasio, yaitu kadar Laju Endap Darah tikus wistar yang telah dibedah dan diambil sampel darahnya dengan menggunakan metode *westergreen*. Selanjutnya, data diolah dan diproses menggunakan program komputer yaitu *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*.

1. Uji Normalitas Data

Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk*, karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila distribusi data normal, maka didapatkan hasil $p > 0,05$.

2. Uji Varians

Uji varians (*Levene's test*) digunakan untuk mengetahui homogenitas dari dua atau lebih kelompok. Apabila homogenitas sama, maka didapatkan $p > 0,05$.

3. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar LED 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 *Kruskal Wallis*.

4. Uji *Post Hoc* (Lanjutan)

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

Namun, apabila ditemukan data tidak normal dan tidak homogen maka digunakanlah analisis statistik nonparametrik yakni K-Sampel Independen yaitu dengan Uji Jonckheere. Uji Jonckheere merupakan pengganti Anova

pada statistik nonparametrik, uji ini mirip Kruskal-Wallis, dan lebih spesifik. Apabila $p\text{-value} < 0,05$ maka H_0 ditolak.

3.9 Etika Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti mengajukan izin *ethical clearance* pada Komisi Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Tikus jantan wistar ini akan dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

Perlakuan hewan percobaan yang digunakan untuk penelitian kesehatan bagi manusia kebanyakan akan mengalami berbagai hal yang tidak menyenangkan bagi hewan tersebut, misalnya hewan akan mengalami : ketidak nyamanan, (inconvenience), ketidaksenangan (discomfort), Tekanan (distress), rasa nyeri (pain), mengalami kematian (death).

Oleh karenanya, dalam penelitian ini dilakukan sesuai dengan prinsip dasar pertimbangan etik penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan percobaan, yaitu Prinsip 3R:

1. *Replacement*

Dalam penelitian ini, akan digunakan Tikus Wistar sebagai hewan coba untuk menggantikan manusia, karena zat yang akan dimasukkan yakni tapak dara mengandung racun, kecuali bila sebelumnya telah diuji pada hewan dan diperoleh kesan yang cukup mengenai keamanannya. Terpilihnya menggunakan tikus wistar karena tikus tidak pernah muntah dan tidak punya kelenjar empedu (Kusumawati, 2004). Selain itu, menurut buku praktikum farmakologi yang dikeluarkan oleh BPPSDM pada tahun 2016, tikus wistar banyak digunakan dalam penelitian toksikologi, penyakit infeksi, dan aging. Lalu, fungsi metabolik dan perilaku serta proses penyakit hampir sama dengan manusia.

2. *Reduction* /model alternatif agar dapat mengurangi jumlah hewan percobaan yang digunakan, metode statistik, program komputer, teknik biokimia.

Pada penelitian ini digunakan pengambilan sampel per kelompok dengan jumlah minimal yang diperbolehkan literatur statistik, yaitu 5 ekor per kelompok dan tambahan 10% untuk mengantisipasi hewan percobaan yang drop out, sehingga total sampel per kelompok adalah 7 ekor.

3. *Refinement* /meminimalisasi/ menghindari “penderitaan” dari rasa nyeri maupun distress.

Sebelum dilakukan penelitian, untuk menghindari stres pada tikus, tikus akan diaklimatisasi selama seminggu terlebih dahulu agar dapat menyesuaikan lingkungan baru, tidak merasa stres dan nyaman. Selama penelitian, tikus diperlakukan dengan baik yaitu tidak disakiti, kandangnya dibersihkan setiap hari, diberi pakan standar dan minum sesuai kebutuhannya. Selain itu, pemberian injeksi DEN melalui IP untuk mengurangi rasa nyeri dilakukan secara lege artis. Saat sebelum dibedah dilakukan euthanasia yaitu menggunakan kloroform untuk mengurangi rasa nyeri. Setelah dibedah dan diambil darahnya, tikus tidak langsung dibuang, tetapi dikuburkan dengan baik.