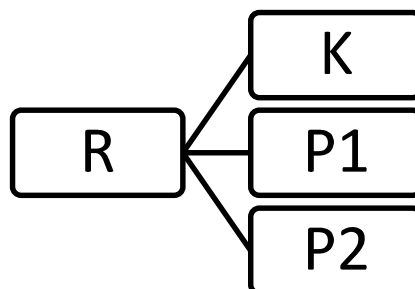


III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *post-test only control design*. Menggunakan 30 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berusia 3 – 4 bulan yang terbagi menjadi 3 kelompok.



K : Kontrol, tikus diberi pakan standard tanpa diinduksi etanol.

P1 : Perlakuan 1, tikus diberi pakan standard, dicekok akuades, dan diinduksi etanol

P2 : Perlakuan 2, tikus diberi pakan standard, dicekok ekstrak jintan hitam dan diinduksi etanol.

B. Tempat dan Waktu

Dalam pelaksanaannya, penelitian ini dilakukan pada :

1. Tempat

Penelitian dan pengambilan darah sampel dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (FK Unila), sedangkan pemeriksaan aktivitas enzim AST dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Abdul Moeloek (RSAM). Pembuatan ekstrak etanol jantan hitam dilakukan di laboratorium kimia organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung (FMIPA Unila), sedangkan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Desember 2012 hingga Januari 2013.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain :

1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang didapatkan dari Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor (IPB). Penelitian menggunakan tikus percobaan akan bermanfaat jika digunakan dalam demonstrasi fisiologi dan farmakologi. Anatomi dan

fisiologis tikus mendukung suatu penelitian percobaan nutrisi dengan penggunaan metode *ad libitum* (Muchtadi, 1989). Ada dua sifat yang membedakan tikus dari hewan percobaan lain, yaitu bahwa tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim di tempat *esofagus* yang bermuara ke dalam lambung, serta tidak memiliki kantung empedu (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian sebanyak 30 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 3 kelompok. Pada uji eksperimental ini, variabel yang diuji adalah numerik tidak berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus (Dahlan, 2009) :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(z\alpha + z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

Dengan nilai $\alpha = 5\%$ (maka $z\alpha = 1,96$), $\beta = 20\%$ ($z\beta = 0,84$), S = simpangan baku dan $(x_1 - x_2)$ sebagai perbedaan aktivitas enzim AST yang diharapkan.

Pada penelitian sebelumnya oleh Putri Paramita (2007) yang membandingkan aktivitas enzim AST, didapatkan simpangan baku 7,48. Dengan memasukkan data masing-masing peningkatan pada indikator tersebut ke dalam rumus maka akan diperoleh jumlah sampel yang digunakan sebagai berikut :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(z\alpha + z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 0,84) 7,48}{15,7} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2[1,78]^2$$

$$n_1 = n_2 = 3,55 \text{ atau } 4$$

Maka jumlah minimal sampel per kelompok adalah 4 ekor tikus per kelompok. Sedangkan untuk mempermudah analisis data sampel dibulatkan menjadi 10 ekor per kelompok percobaan.

Sampel yang diambil memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Tikus putih jantan galur Sprague dawley
2. Usia 3 – 4 bulan
3. Berat badan 200 – 250 gram
4. Kondisi sehat, aktif bergerak
5. Belum pernah digunakan untuk penelitian

Dan kriteria eksklusi sebagai berikut :

1. Penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital setelah masa adaptasi.
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi.

D. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain :

1. Neraca analitik
2. Kandang tikus
3. Sduit 3 cc
4. Sduit oral 1 cc
5. Tabung reaksi
6. Rak tabung
7. Sentrifus
8. Autoanalizer
9. Pipet mikrohematokrit

Sedangkan bahan yang diperlukan selama penelitian :

1. Pakan dan minuman tikus putih (*Rattus norvegicus*)
2. Ekstrak jintan hitam
3. Etanol 50%
4. Kit untuk pemeriksaan aktivitas enzim AST

E. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terbagi sebagai berikut :

1. Pemberian etanol

Dosis etanol diambil berdasarkan penelitian Chen (2010) yang menunjukkan terjadinya kerusakan pada organ hati dengan pemberian etanol 50% dengan dosis 5gr/kgBB selama 10 hari secara oral. Maka dilakukan konversi dalam bentuk volum cairan agar memudahkan pelaksanaan penelitian dimana

diketahui bahwa 1 gram etanol sama dengan 1 ml alkohol 100% (Schuckit, 1984), yakni :

$$\begin{aligned} \text{volume etanol } 5 \text{ gr/Kg BB} &= \frac{5 \text{ gr/kgbb}}{50 \text{ gr}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 10 \text{ ml/kg BB} \\ &= 0,01 \text{ ml/gr BB} \end{aligned}$$

Dosis 0,01 ml diberikan setiap 1 gram berat tikus putih. Maka dosis yang diberikan pada tikus dengan rata-rata berat 200 gram yaitu sebanyak 2 ml.

2. Pemberian ekstrak jintan hitam

Dalam pemberian ekstrak jintan hitam, prosedurnya terbagi menjadi prosedur pembuatan ekstrak jintan hitam dan penentuan dosis jintan hitam.

a. Pembuatan ekstrak jintan hitam

Proses pembuatan ekstrak etanol jintan hitam dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut dengan cara sebagai berikut :

1. Dilakukan penimbangan jintan hitam.
2. Jintan hitam dikeringkan dengan lemari pengering
3. Dilakukan pembuatan serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk.
4. Etanol dengan kadar 70 % ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam. Kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam.

5. Setelah maserasi kemudian masuk dalam tahap filtrasi sehingga menghasilkan filtrat dan residu. Tahap filtrasi ini dilakukan berulang kali sampai didapatkan filtrat yang jernih.
6. Filtrat kemudian diteruskan ke tahap evaporasi dengan *Rotatory Evaporator* pada suhu 40 ° C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering. Selanjutnya dari ekstrak ini akan dibuat larutan stok.
7. Larutan stok yang dimaksud adalah larutan pekat dengan dosis 100 g/ 100 ml. Ekstrak dibuat dengan melarutkan 100 g berat ekstrak jintan hitam ke dalam 100 ml akuades sehingga 1 mL ekstrak mengandung 1000 mg.

b. Penentuan dosis jintan hitam

Menurut penelitian sebelumnya (Hamad, 2009) yang menggunakan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) didapatkan efek poten pencegahan peningkatan aktivitas enzim ALT dan Alkali Phosphatase (ALP) pada kerusakan hepar dengan dosis 300mg/kgBB. Pada penelitian Marwan *et al* (2003) pada dosis ekstrak jintan hitam 600 mg/kgBB didapatkan efek penurunan aktivitas enzim AST dan ALT pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok. Berdasarkan dosis tersebut peneliti mengambil dosis 450 mg/kgBB atau 0,45 mg/grBB pada penelitian kali ini.

Ekstrak jintan hitam yang didapat dari proses pengekstrakan biji jintan hitam sebanyak 500 gr adalah 154 gr. Untuk penghitungan dosis dalam bentuk ml, dilakukan perhitungan dari spuit yang berisikan 1 ml ekstrak

jintan hitam terdapat 0,7706 gr atau 770,6 mg. Sehingga apabila dikonversikan dengan dosis 450 mg/kgBB didapatkan perhitungan sebagai berikut :

$$\frac{770,6 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{0,45 \text{ mg}}{X \text{ ml}}$$

$$X \text{ ml} = \frac{0,45 \text{ mg} \times 1 \text{ ml}}{770,6 \text{ mg}}$$

$$X \text{ ml} = 0,00058 \text{ ml}$$

Dosis 0,00058 ml diberikan setiap 1 gram berat tikus putih. Maka dosis yang diberikan pada tikus dengan rata-rata berat 200 gram yaitu sebanyak 0,116 ml atau dibulatkan menjadi 0,12 ml.

3. Pelaksanaan perlakuan

Perlakuan yang diberikan pada tikus percobaan antara lain :

1. Tikus sejumlah 30 ekor dibagi secara acak menjadi 3 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah 10 ekor.
2. Melakukan timbangan untuk mengetahui berat badan tikus rata-rata.
3. Membuat persediaan ekstrak jintan hitam.
4. Menempatkan tikus pada masing-masing kandang dengan tiap kandang terdiri atas 5 ekor tikus.
5. Melakukan perlakuan pada tiap kelompok percobaan :
 - 1) Kelompok perlakuan I : kelompok tanpa pemberian ekstrak jintan hitam dan induksi etanol (sebagai kelompok kontrol).

- 2) Kelompok perlakuan II : Kelompok yang diberikan aquades dengan dosis 0,12 ml yang diberikan 2 jam sebelum diberi induksi etanol 50% dosis 2 ml selama 10 hari.
 - 3) Kelompok perlakuan III : Kelompok yang diberikan ekstrak jintan hitam dengan dosis 0,12 ml yang diberikan 2 jam sebelum diberi induksi etanol 50% dosis 2 ml selama 10 hari.
6. Setelah perlakuan selesai (setelah 10 hari), semua tikus dari tiap-tiap kelompok dipuasakan untuk kemudian diambil darahnya.
 7. Selama perlakuan tikus diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*.

4. Pemeriksaan aktivitas enzim AST

Aktivitas enzim AST diperiksa pada hari ke-11 dengan cara sebagai berikut:

1. Semua tikus dari setiap kelompok dipuasakan selama 12 jam.
2. Mengambil darah tikus untuk pemeriksaan aktivitas enzim AST melalui vena periorbital menggunakan pipet mikrohematokrit dengan cara mendorong pipet pada bagian atas kelopak mata hingga menembus konjungtiva.
3. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi darah tanpa antikoagulan untuk mendapatkan serumnya. Lalu didiamkan 30 menit dalam suhu kamar. Kemudian di sentrifus dengan sentrifuse *Hettich* tipe EBA 20 dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit.
4. Serum diatas sel-sel darah yang menggumpal selanjutnya diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf. Kemudian

dilakukan pengukuran aktivitas enzim AST dengan menggunakan reagen (kit) *cobas (Roche)*.

5. Mengukur aktivitas enzim AST dengan menggunakan kit dan pembacaannya melalui *autoanalyzer (cobas integra 400)* dengan panjang gelombang 340 nm.

Dengan prinsip :

Ketoglutarat + 1 L.Aspartat → 1 Glutamat + Oksaloasetat + NADH + H
→ L. Halat + NAD

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional yang terdapat dalam penelitian ini dijelaskan sebagai berikut :

1. Identifikasi Variabel

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak Jintan hitam dengan dosis 450 mg/kgBB per oral, sedangkan variabel dependen dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim AST serum darah tikus wistar.

2. Definisi Operasional

Definisi Operasional adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel atau konstruk dengan cara memberikan arti, atau mempersepsikan kegiatan, ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk

mengukur konstruk atau variabel tersebut (Nazir, 1988). Adapun definisi operasional dalam penelitian ini telah disajikan dalam tabel 2.

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Defenisi Operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Ekstrak jintan hitam	Ekstrak jintan hitam dari hasil pengambilan zat aktif jintan hitam (<i>Nigella sativa</i>) diberikan secara oral pada tikus percobaan yang terbagi dalam 3 kelompok : <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok 1 (K1) Tikus sebagai kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan 2. Kelompok 2 (K2) Tikus diberikan aquades dosis 0,12 ml dan diinduksi etanol 50% dengan dosis 2 ml selama 10 hari. 3. Kelompok 3 (K3) Tikus diberikan ekstrak jintan hitam dosis 0,12 ml dan diinduksi etanol 50% dosis 2 ml 	Sputit oral	1. 0 ml 2. 0,001 ml/grBB	Nominal
Aktivitas Enzim AST	Aktivitas enzim AST pada serum tikus <i>Sprague Dawley</i> percobaan	<i>Auto analyzer (Cobas integra 400)</i>	Satuan IU/L	Numerik

G. Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan secara manual. Untuk mempermudah analisis, data hasil penelitian yang telah terkumpul dimasukkan ke dalam tabel berikut

Tabel 3. Tabel Pengumpulan Data

Kelompok	Sampel										Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I											
II											
III											

H. Pengolahan dan Analisis Data

Dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan metode uji *Shapiro-Wilk* karena dalam penelitian menggunakan jumlah sampel < 50 . Apabila sebaran data normal maka untuk analisis data dilakukan uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan post hoc test metode *tukey test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Namun apabila sebaran data tidak normal, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*.