

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan *true eksperimental*. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen *Randomized Post Test Control Only Group Design* dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dengan randomisasi, maka seluruh kelompok mempunyai sifat yang sama pada awalnya, sehingga perbedaan hasil *post test* pada kedua kelompok tersebut dapat dianggap sebagai pengaruh dari intervensi atau perlakuan yang diberikan.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus strain Wistar* yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dalam kandang yang bersih.

##### 4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

###### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jenis *Rattus norvegicus strain Wistar*
- Jenis kelamin jantan
- Usia 6-8 minggu
- Berat badan 140-250 gram
- Dalam keadaan sehat selama penelitian dan tidak mendapat pengobatan sebelumnya

**4.2.2.2 Kriteria Eksklusi**

- a. Tikus tidak mau makan selama penelitian
- b. Tikus sakit atau mati saat penelitian

**4.2.3 Besar Sampel**

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok penelitian terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol terdiri dari satu kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok dan satu kelompok tikus lainnya dipapar asap rokok. Sedangkan kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi tepung daun ubi jalar ungu dengan dosis yang berbeda untuk masing-masing kelompok. Jumlah tikus percobaan untuk masing-masing kelompok penelitian dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut:

$(t - 1) (n - 1)$	15
$(5-1) (n-1)$	15
$4 (n-1)$	15
$4n - 4$	15
$4n$	19
$n$	4,75 dibulatkan menjadi 5

Keterangan:

t = banyaknya kelompok pada sampel

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

(Arkermen dan David, 2006 dalam Fadlia, 2011)

Dari hasil perhitungan di atas didapatkan jumlah tikus untuk masing-masing kelompok penelitian adalah 5 ekor. Masing-masing kelompok penelitian ditambah 1 ekor tikus sebagai cadangan. Jadi, total sampel yang dibutuhkan adalah  $6 \times 5 = 30$  ekor tikus.



#### 4.2.4 Randomisasi dan Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Posttest Only Control Group Design*. Rancangan ini memungkinkan setiap tikus percobaan berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok kontrol maupun dalam kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini tikus dibagi ke dalam 5 kelompok yaitu kontrol negatif (K(-)), kontrol positif (K(+)), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Pemilihan sampel untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Teknik randomisasi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Kadar *Superoksida Dismutase (SOD)* darah tikus jenis *Rattus novergicus* strain *Wistar* jantan.

##### 4.3.2 Variabel Bebas (*Independent*)

Tepung daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas (L) Lam*) dengan berbagai dosis.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk pemeliharaan hewan coba dan pengukuran kadar SOD, Laboratorium Biomedik FKUB untuk pembacaan serum dengan spektrofotometer, dan Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang untuk pembuatan tepung daun ubi jalar ungu.

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 2 bulan yakni dari bulan Januari hingga Februari 2013.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.5.1 Bahan yang Digunakan

#### 4.5.1.1 Bahan Pakan Tikus

Dalam penelitian ini terdapat satu macam jenis pakan yang diberikan yaitu pakan diet normal yang diberikan pada semua kelompok. Kebutuhan pakan tikus per ekor untuk diet normal adalah 30,5 gram dengan energi  $\pm$  104 kalori. Komposisi pakan diet normal terdiri dari Comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12%, protein 11 %, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1%, posfor 0,9%, antibiotika (coccidiostat) 53%), tepung terigu 23,5%, dan air 23,5 %. Proses Pembuatan Pakan Tikus dapat dilihat pada lampiran 8.

#### 4.5.1.2 Bahan Paparan Asap Rokok

Rokok yang digunakan pada penelitian ini adalah rokok kretek dengan merk Tali Jagat dengan kadar nikotin 2,7 mg dan tar sebanyak 43 mg. Pemaparan asap rokok menggunakan kotak/*smoking chamber* yang dihubungkan dengan *smoking pump*. Kotak tersebut diberi asap dengan cara menghisap rokok dengan *smoking pump* kemudian meniupnya ke dalam kotak tersebut. Tiga ekor tikus dimasukkan ke dalam *smoking chamber* tiap kali pemaparan. Tikus dipapar selama 5 menit sebanyak 1 batang untuk 1 hari. Daya kecepatan hisap selama 18 kali tiap menit. *Smoking chamber* dibuat dari bahan tembus pandang yang dihubungkan dengan pompa penghisap dengan spuit injeksi 20 cc, Sedangkan *smoking pump* digerakkan dengan tenaga listrik.

#### 4.5.1.3 Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

##### 4.5.1.3.1 Penepungan Daun Ubi Jalar Ungu

Proses penepungan daun ubi jalar ungu dilakukan di laboratorium kimia Polinema Malang. Penepungan dilakukan dengan cara pengeringan daun

menggunakan oven kemudian diblender/dihaluskan. Diagram alir proses pembuatan tepung daun ubi jalar ungu dapat dilihat pada lampiran 2.

#### 4.5.1.3.2 Perhitungan Dosis Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Penghitungan dosis tepung daun ubi jalar ungu didapatkan dari penelitian sebelumnya oleh Chiao Ming Chen pada tahun 2008 yang melihat efek konsumsi daun ubi jalar ungu dalam penurunan peroksidasi lemak dan kerusakan DNA pada manusia dengan menggunakan zat aktif yang sama yaitu polifenol. Pada penelitian tersebut didapatkan dosis yang optimal yaitu dengan konsumsi daun ubi jalar ungu sebanyak 200 gram/hari yang mengandung 902 mg polifenol. Perhitungan dosis tepung daun ubi jalar ungu adalah dosis yang disesuaikan dengan anjuran konsumsi polifenol pada tikus. Perhitungan dilakukan dengan perkalian silang antara kebutuhan polifenol manusia, rata-rata berat badan manusia dewasa, dan rata-rata berat badan tikus.

$$\frac{\text{kebutuhan polifenol pada manusia}}{\text{rata - berat badan manusia dewasa}} = \frac{\text{kebutuhan polifenol pada tikus}}{\text{rata - berat badan tikus}}$$

$$\frac{902 \text{ mg GAE}}{70000} = \frac{x}{200}$$

$$x = \frac{902 \times 200}{70000}$$

$$x = 2,577 \text{ mg GAE}$$

Pada penelitian pendahuluan, didapatkan bahwa 100 gram tepung daun ubi jalar ungu mempunyai kandungan polifenol total sebanyak 1805 mg GAE.

Sehingga daun ubi jalar ungu yang digunakan untuk perlakuan adalah:

$$\frac{2,577 \text{ mg GAE}}{x} = \frac{1805 \text{ mg GAE}}{100 \text{ gram}}$$

$$x = \frac{2,577 \times 100}{1805}$$

$$1805$$

$$x = 0,14 \text{ gram}$$

Penentuan dosis untuk kelompok perlakuan I, II, dan III dilakukan dengan pola  $\frac{1}{2}x$ ,  $x$ , dan  $2x$ . Sehingga pemberian tepung daun ubi jalar ungu pada kelompok perlakuan I, II, dan III adalah 0,07 gram, 0,14 gram, dan 0,28 gram.

#### 4.5.1.3.2 Kebutuhan Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Tepung daun ubi jalar ungu yang dibutuhkan selama penelitian seperti pada tabel 4.1 berikut:

**Tabel 4.1** Kebutuhan Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Kelompok	Tepung Daun Ubi jalar Ungu	
	gram/ekor	Jumlah (gram)*
K (-)	Placebo	-
K (+)	Placebo	-
P1	0,07	12,6
P2	0,14	25,2
P3	0,28	50,4
<b>Total</b>		<b>88,2</b>

\*Jumlah tepung daun ubi jalar yang dibutuhkan untuk 6 ekor tikus/kelompok selama 30 hari

#### 4.5.1.4 Bahan Pemeriksaan Kadar SOD

Pemeriksaan kadar SOD dilakukan dengan menggunakan bahan berikut ini

- Darah tikus (*Rattus Novergicus* strain Wistar)
- Eter
- Akuades
- EDTA
- NBT (Nitro Blue Tetrazolium)
- Xantine
- Xantine Oksidase

#### 4.5.1.5 Bahan Pemeliharaan Tikus

- Sekam
- Sabun untuk mencuci kandang dan tempat minum
- Air

#### 4.5.2 Alat yang Digunakan

##### 4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Tikus Percobaan

- Kandang dari kotak plastik
- Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
- Botol air untuk minum
- Timbangan analitik
- Alat untuk memantau keadaan tikus: form pemantauan mingguan
- Spons mencuci
- Sikat mencuci
- Batu atau bata untuk menahan tutup kandang

##### 4.5.2.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

- Timbangan analitik untuk mengukur kebutuhan tepung daun ubi jalar ungu dan diet normal
- Baskom plastik
- Pengaduk

##### 4.5.2.3 Alat Pemaparan Asap Rokok

- *Smoking chamber* adalah ruang khusus yang terbuat dari fiberglass yang tembus pandang yang memungkinkan pengamatan perilaku tikus selama pemaparan asap rokok. *Smoking chamber* dihubungkan ke *smoking pump* dengan pipa kecil yang terbuat dari karet.

- *Smoking pump* berbentuk pompa compressor yang dihubungkan dengan tempat pembakaran asap rokok yang kerjanya dibantu adaptor
- Penjepit untuk menjepit pipa penghubung smoking chamber dengan smoking pump yang digerakkan secara manual dan periodik
- *Timer* untuk menghitung waktu pemaparan

#### 4.5.2.4 Alat Pemberian Tepung Ubi Jalar Ungu

- Panci
- Kompor listrik untuk memanaskan air
- Mortir untuk mencampur tepung daun ubi jalar ungu dengan air
- Saringan
- Mangkok plastik
- Spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde yang bisa melewati mulut, esophagus, hingga lambung.

#### 4.5.2.5 Alat Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Darah Tikus percobaan

Seperangkat alat bedah minor, spuit disposable 5 ml, tabung vial 5 ml, kapas, dan plastik bening.

#### 4.5.2.6 Alat Pengukuran Kadar SOD

- Tabung kimia
- Alat sentrifuge
- Alat mengambil serum
- Alat pemanas tabung
- Spektrofotometer

## 4.6 Definisi Operasional

### 4.6.1 Pemberian Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Daun ubi jalar ungu yang digunakan berasal dari Blitar yang ditepungkan di Laboratorium Politeknik Negeri Malang yang diberikan pada tikus melalui sonde dengan dosis yang dinyatakan dalam gram.

### 4.6.2 *Superoksid Dismutase (SOD)*

*Superoksid Dismutase* merupakan antioksidan enzimatik yang mengkatalisa dismutase anion superoksid menjadi molekul oksigen dan hydrogen peroksida yang kadarnya ditentukan dengan mengukur hasil oksidasi NBT menjadi formazen menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 580 nm. Satuan SOD dinyatakan dalam unit/cc.

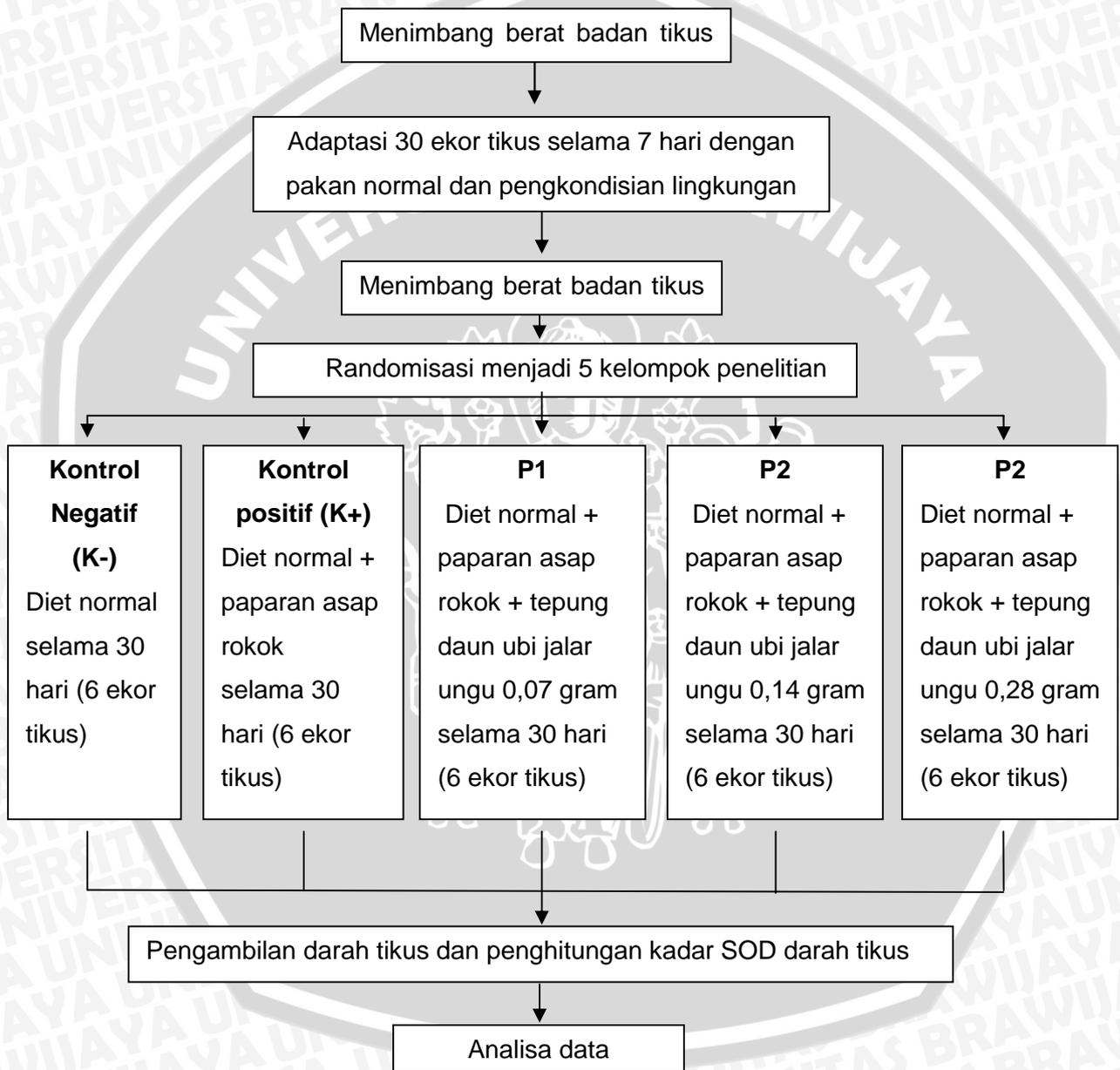
### 4.6.3 Paparan Asap Rokok

Paparan asap rokok menggunakan rokok kretek merk Tali Jagat pada tikus selama 5 menit selama 30 hari menggunakan *smoking pump* yang digerakkan dengan tenaga listrik.

#### 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

##### 4.7.1 Langkah-langkah Pelaksanaan Penelitian

Langkah-langkah pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Bagan Prosedur Penelitian

Penjelasan terkait alur penelitian terdapat pada lampiran 3.

#### 4.7.2 Prosedur Pemaparan Asap Rokok

Pemaparan asap rokok menggunakan *smoking chamber* yang dihubungkan dengan *smoking pump*. Ruangan kotak tersebut diberi asap dengan cara menghisap rokok dengan *smoking pump* sekaligus meniupnya ke dalam kotak tersebut. Tiga ekor tikus dimasukkan ke dalam *smoking chamber* tiap kali pemaparan. Tikus dipapar selama 5 menit sebanyak 1 batang untuk 1 hari. Daya kecepatan hisap selama 18 kali tiap menit. Kotak *smoking chamber* dibuat dari bahan tembus pandang pompa penghisap spuit injeksi 20 cc, Sedangkan *smoking pump* digerakkan dengan tenaga listrik. Langkah-langkah pemaparan asap rokok dapat dilihat pada lampiran 4.

#### 4.7.3 Paska Perlakuan pada Tikus Percobaan

Setelah 30 hari masa perlakuan, dilakukan pengambilan darah tikus untuk mengukur kadar SOD. Pertama tikus akan dibius menggunakan eter kemudian dilakukan pembedahan. Sampel darah diambil dari jantung tikus sekitar 5 cc kemudian dilakukan pengukuran kadar SOD.

#### 4.7.4 Prosedur Pengukuran Kadar SOD

- a. Timbang sampel 200 mg, homogenasi dengan 2 cc Buff Phospat PH 7,4 kemudian centrifuge 4000 rpm hingga didapatkan serum darah
- b. Ambil serum masing-masing 200  $\mu$ L
- c. Masukkan pada masing-masing sampel EDTA 100 mm sebanyak 200  $\mu$ L, kemudian masukkan NBT 25 unit sebanyak 100  $\mu$ L, kemudian xanthin 25 mM 100  $\mu$ L dan XO 1 unit 100  $\mu$ L
- d. Incubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 30 menit, lalu dicentrifuge
- e. Saring jika masih terdapat koloid, kemudian jadikan masing-masing sampel 3 cc dengan aquades

- f. Baca dengan spektrofotometer dengan 580 nm.

#### 4.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan program SPSS 16. Seluruh data diuji dengan uji normalitas (*Test of Normality Kolmogrov Smirnov*) dan uji varian (*Test of Homogeneity of Variances*) untuk mengetahui bahwa semua data normal dan homogen. Jika data tidak homogen dan atau tidak berdistribusi normal dilakukan transformasi data. Kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan kadar variabel SOD antar kelompok. Perbedaan dikatakan bermakna jika  $p < 0,05$ . Untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan secara bermakna dilakukan uji *Post Hoc Tukey*.

