

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sample

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus L.* strain wistar) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah model tikus jenis *Rattus novergicus L.* jantan karena tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi lemak dan kolesterol, berjumlah 30 ekor yang diambil secara Random Sampling sesuai kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi:

- Tikus jenis *Rattus novergicus*

- Jenis kelamin jantan
- Umur 6-8 minggu
- Berat 150-200 gram
- Warna bulu putih
- Tikus aktif

b. Kriteria eksklusi:

- Tikus yang tidak mau makan
- Tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati.

4.2.3 Metode Pemilihan Sampel

Metode pengambilan sampel dilakukan dengan estimasi besar subyek penelitian. Dalam penelitian ini estimasi besar subyek penelitian yang digunakan adalah 5 kelompok perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel berdasarkan Supranto (2000) adalah sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$r \geq 4,75$$

Dibesarkan menjadi 5 pengulangan.

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan pada tiap perlakuan

15 = nilai konstan

Untuk setiap perlakuan diberikan penambahan dalam jumlah tikus sebagai cadangan dan ditetapkan sejumlah 1 kali pengulangan. Sehingga total sampel yang dibutuhkan sejumlah 30 ekor tikus dengan rincian 6 ekor dan 5 pengulangan untuk masing-masing kelompok.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak rhizoma rumput teki (*Cyperus rotundus*) yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diberikan diet atherogenik dan tidak diberikan ekstrak rhizoma rumput teki)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diberikan diet atherogenik tanpa ekstrak rhizoma rumput teki per-oral)
3. Kelompok 3: tikus yang diberikan diet atherogenik selama 60 hari dengan diberikan per oral ekstrak rhizoma rumput teki dosis 1 yaitu 6,14 mg ekstrak/hari.
4. Kelompok 4: tikus yang diberikan diet atherogenik selama 60 hari dengan diberikan per oral ekstrak rhizoma rumput teki dosis 2 yaitu 12,28 mg ekstrak/hari.
5. Kelompok 5: tikus yang diberikan diet atherogenik selama 60 hari dengan diberikan per oral ekstrak rhizoma rumput teki dosis 3 yaitu 12,28 mg ekstrak/hari.

Konsumsi total polifenol yang dianjurkan pada manusia adalah >500 mg/hari (Williamson, Holst, 2008). Berdasarkan Tabel Perbandingan Luas Permukaan Hewan Coba, dosis polifenol tikus dengan berat 200gram dibandingkan dengan manusia adalah 0,018 (Paget, Barnes, 1964)

Rincian konversi sebagai berikut:

Dosis manusia (70 kg bb) = 500 mg/hari

Dosis tikus (200 g bb) = 500 mg/hari x 0,018
= 9 mg/hari

Kandungan *polifenol* dari 100 gram ekstrak kering rhizoma rumput teki adalah 73,27±4,26 gr, berarti 73,27% (dapat diartikan juga terkandung 73,27 mg *polifenol* dari 100 mg ekstrak rhizoma rumput teki rumput teki) (Nagulendran *et al.*, 2007), sehingga **dosis standar** pemberian ekstrak rhizoma rumput teki pada tikus adalah:

$$\text{Dosis} = \frac{9}{73,27} \times 100 \text{ mg} = 12,28 \text{ mg/hari}$$

Variasi pemberian dosis didasarkan pada deret ukur $\frac{1}{2}n$ (dosis 1), n (dosis 2), dan $2n$ (dosis 3) adalah sebagai berikut:

- dosis 1 = 6,14 mg ekstrak /hari
- dosis 2 = 12,28 mg ekstrak /hari
- dosis 3 = 24,56 mg ekstrak /hari

4.3.2 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah kadar MCP-1 dalam serum tikus (*Rattus novergicus*) strain wistar yang diberi diet aterogenik.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeriksaan kadar MCP-1 dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian berlangsung pada bulan Maret sampai dengan Juni 2013.

4.5 Bahan dan Alat

1. Perawatan tikus

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

2. Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Aterogenik

Alat yang dibutuhkan untuk membuat ransum makanan adalah timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan

Bahan :

- Diet normal : terdiri dari Comfeed PARS 66,67% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1 %, Fosfor 0,9%, antibiotik coccidiostat 53%) dan air 33,33%

- Diet Aterogenik : terdiri dari pakan ternak 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, minyak babi 5%, dan air 17,8% (Murwani, 2005)

3. Pemberian Ekstrak rhizoma rumput teki (*Cyperus rotundus*)

Alat untuk pembuatan ekstrak yaitu: Oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, pendingin spiral/rotary evaporator, labu penampung etanol, evaporator, setal water pump, water pump, water bath, vacuum pump

Bahan-bahan yang dibutuhkan: rhizoma rumput teki, etanol 96%, aquades, botol hasil ekstrak.

4. Pembedahan tikus

Alat yang di pakai adalah gunting bedah, stereofom 2, pinset 2, kapas, jarum pentul 2 set.

Bahan pembedahan: Kloroform 20 ml, spuit insulin 1 ml 30 buah, formalin 10% 200 ml, wadah plastik+tutup 30 buah, alkohol, vakuotainer 30 buah

5. Pengukuran serum MCP-1 dalam darah

Alat yang digunakan multichannel pipet, mikro pipet, vortek, tabung, ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) reader .

Bahan-bahannya serum tikus, MCP-1 ELISA kit unit: coating buffer, BSA 1%, PBS, TWEEN, antibody primer, ab sekunder (IgG BIOTIN), anti MCP-1, HCl 1 N.

4.6 Definisi Operasional

1. Diet aterogenik

Diet aterogenik yang terdiri dari pakan ternak 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, minyak babi 5%, dan air 17,8% (Murwani, 2005) dimaksudkan untuk menginduksi pembentukan plak aterosklerosis pada lapisan tunika intima-media aorta tikus

2. Ekstrak rhizoma rumput teki (*Cyperus rotundus*)

Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah dari ekstrak rhizoma rumput teki yang diberikan untuk perlakuan nantinya adalah 6,14 mg; 12,28 mg; 24,56 mg untuk kelompok 1, 2, dan 3 setiap harinya.

3. Kadar MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) dalam serum adalah besarnya kadar MCP-1 yang diukur dalam satuan ng/ml dengan metode ELISA pada setiap kelompok tikus.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Adaptasi

Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 35 gram.

4.7.2 Diet Atherogenik

Pembuatan diet atherogenik dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa perekor setiap hari adalah 35 gram sehingga komposisi untuk tiap tikus perlakuan adalah 35 gram diet atherogenik, diberikan selama 60 hari pada kelompok 1, 2, dan 3. Pakan tikus diberikan secara peroral.

- Pakan standar terdiri dari Comfeed PARS 66,67% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, kalsium 1,1%, fosfor 0,9%, antibiotic coccidiostat 53%) dan air 33,33%.
- Diet atherogenik terdiri dari pakan ternak 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, minyak babi 5%, dan air 17,8% (Murwani dkk, 2005).

4.7.3 Ekstraksi rhizoma rumput teki (*Cyperus rotundus*)

Ekstrak rhizome rumput teki (*Cyperus rotundus*) diberikan menggunakan metode sonde. Pembuatannya melewati 2 proses, yaitu proses ekstraksi dan proses evaporasi. Tahapan pada proses ekstraksi yang pertama masukkan 100 gram bubuk umbi rumput teki ke dalam gelas Erlenmeyer, rendam dengan etanol sampai volume 900 mL setelah itu kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit) dan diamkan satu malam sampai mengendap. Proses perendaman dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya adalah proses evaporasi, masukkan hasil ekstraksi ke dalam labu evaporasi 1L, kemudian pasang labu evaporasi pada evaporator. Water bath diisi air sampai penuh. Pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (sampai sesuai titik didih etanol), sambungkan dengan aliran listrik. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada di dalam labu. Tunggu sampai aliran ethanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5-2

jam untuk satu labu). Hasil yang diperoleh kira-kira seperempat dari bubuk rhizome rumput teki yang di ekstraksi. Setelah jadi simpan di dalam freeze.

4.7.4 Proses Perlakuan pada Hewan Coba

Semua tikus dilihat umur dan ditimbang berat badannya. Dilakukan randomisasi dengan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

- Kelompok 1: kelompok kontrol negatif, diberi diet (pakan) normal
- Kelompok 2: kelompok kontrol positif, diberi diet aterosklerosis
- Kelompok 3: kelompok yang diberi diet aterogenik dan ekstrak rumput teki 6,14 mg
- Kelompok 4: kelompok yang diberi diet aterogenik dan ekstrak rumput teki 12,28 mg
- Kelompok 5: kelompok yang diberi diet aterogenik dan ekstrak rumput teki 24,56 mg

Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (1 ekor per kandang).

Sebelum perlakuan, semua kelompok tikus percobaan diadaptasikan pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari.

Pada saat perlakuan, pakan dan minuman tikus diberikan secara oral. Pakan tikus ditimbang tiap hari. Ekstrak umbi rumput teki diberikan dengan menggunakan sonde dengan dosis 6,14 mg; 12,28 mg; dan 24,56 mg pada kelompok masing-masing. Pemberian pakan dilakukan selama 60 hari.

Pembedahan dilakukan setelah 8 minggu diet atherogenik. Untuk pembedahan, tikus dianestesi dengan cara pembiusan menggunakan eter. Toraks dibuka lalu sampel darah di ambil dari aorta sebanyak 5-7 ml, setelah itu serum darah dipisahkan menggunakan sentrifugasi. Serum darah tikus diambil dan diperiksa kadar MCP-1 menggunakan metode ELISA.

4.7.5 Pengukuran Kadar MCP-1

Metode yang digunakan dalam mengukur kadar MCP-1 pada serum tikus adalah metode ELISA, dengan langkah-langkah seperti berikut: memberikan coating antigen pada piring mikrotubes dan mencampur serum dengan coating buffer (serum:coating = 1:40), sampai 100 μ L lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama satu malam. Setelah itu dicuci dengan dengan larutan PBS-T (PBS + Tween-20) 0,2% 100 μ L sebanyak 6X. Tahapan selanjutnya mengeblok dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PSB) sebanyak 50 μ L/well dan diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan kemudian dicuci dengan dengan larutan PBS-T (PBS + Tween-20) 0,2% 100 μ L sebanyak 6X.

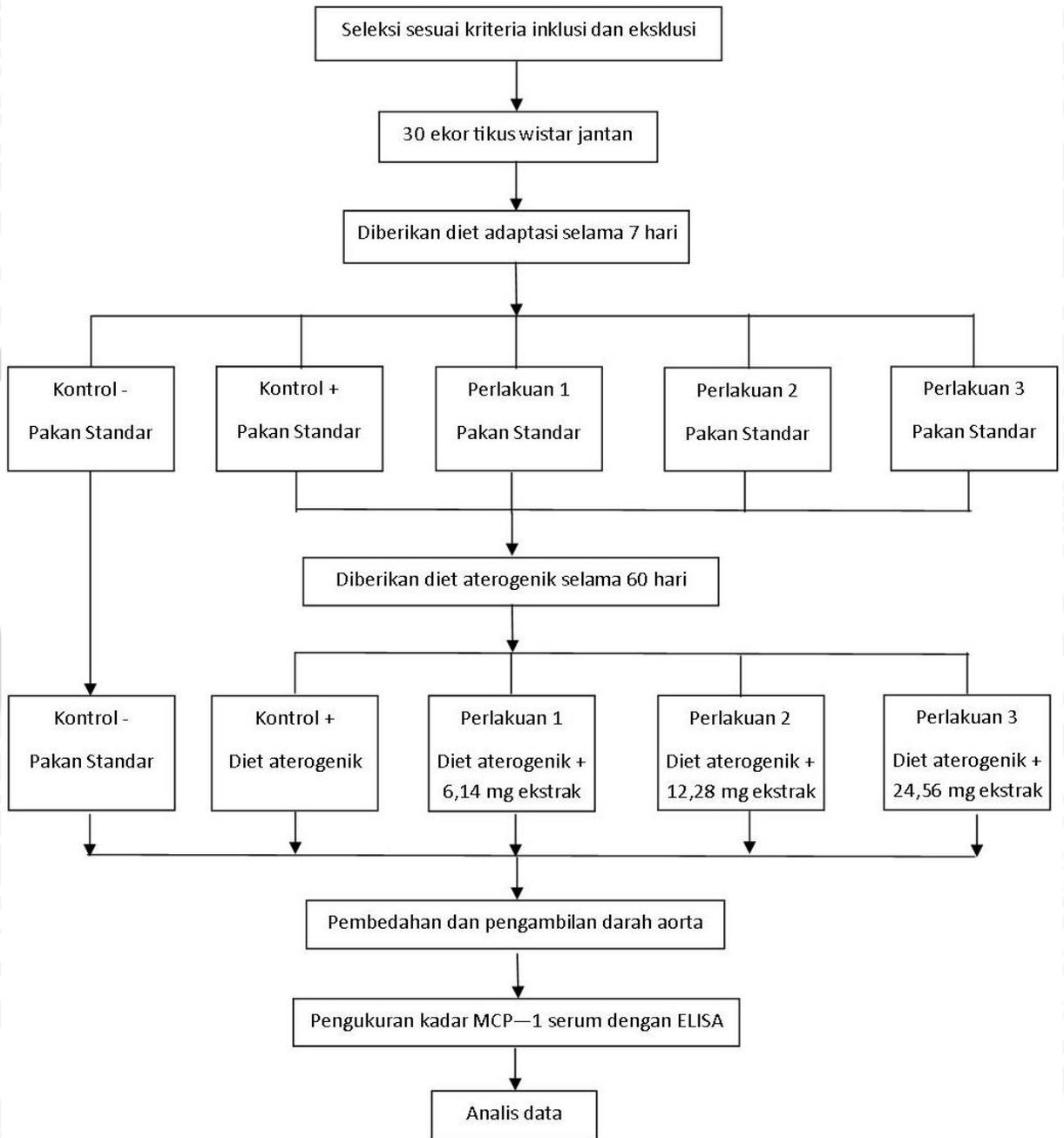
Tahapan selanjutnya dengan memberikan coating Ab primer dan diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan kemudian dicuci dengan dengan larutan PBS-T (PBS + Tween-20) 0,2% 100 μ L sebanyak 6X. setelah Ab primer dilanjutkan dengan pemberian coating Ab sekunder dengan memberikan penambahan anti mouse anti MCP-1 dalam Assay buffer dengan perbandingan 1:2000 dan diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan kemudian dicuci dengan dengan larutan PBS-T (PBS + Tween-20) 0,2% 100 μ L sebanyak 6X.

Menambahkan substrat TMB (Tetra Methyl Benzidine) untuk menghasilkan warna biru, diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruangan. Terakhir, hentikan reaksi dengan menambahkan HCl 1 N untuk menghasilkan warna kuning. Hasil dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda=450$ nm setelah menit ke-10 dan ke-15.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.7.6 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian.

4.8 Analisis Data

Data hasil perhitungan kadar serum MCP-1 masing-masing kelompok yang dilihat rata-ratanya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif. Data perubahan serum MCP-1 yang telah dikumpulkan, diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistik (dengan menggunakan bantuan *software* SPSS 16.0) sebagai berikut:

1. Menilai distribusi normalitas data secara analitis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* atau *Shapiro-Wilk* (Dahlan, S., 2011).
2. Uji homogenitas untuk menilai atau menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varians data sama, maka hasil dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Karena syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$) (Dahlan, S., 2011).
3. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui perbandingan antara masing – masing kelompok (Dahlan, S., 2011).
4. Uji *Post Hoc* digunakan untuk menilai apakah ada perbedaan bermakna pada kelompok dari hasil tes ANOVA (Dahlan, S., 2011).
5. Uji korelasi digunakan untuk mengetahui arah hubungan, apakah dengan peningkatan dosis ekstrak rumput teki dapat mengurangi kadar MCP-1 (korelasi -) atau sebaliknya (Dahlan, S., 2011).
6. Uji regresi digunakan untuk mengetahui berapa besar pengaruh rumput teki terhadap kadar MCP-1 (Dahlan, S., 2011).