

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba atau *in vivo*, menggunakan desain *true experimental* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Subyek Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Tikus dipilih sebagai hewan coba karena mudah ditangani, mudah dipelihara, dan memiliki respon imun yang mirip dengan manusia.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi (Lamanepa, 2005):

- a) Berat badan tikus Wistar antara 180-200 gram
- b) Jenis kelamin jantan
- c) Usia kurang lebih 8 minggu (sudah dewasa)
- d) Kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik, berperilaku normal, dan belum menerima asupan bahan kimia dengan cara apapun.

Kriteria eksklusi:

- a) Meliputi tikus yang mati selama penelitian

- b) Tikus yang menderita penyakit-penyakit yang dapat mempengaruhi hasil penelitian
- c) Berat badan menurun drastis
- d) Saat otopsi ditemukan kelainan bawaan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

4.2.3 Subyek Penelitian

Subyek penelitian ditentukan dengan metode *simple random sampling*.

Jumlah subyek penelitian dihitung dengan rumus (Andayani, 2003):

$$p(n-1) > 15$$

(n = jumlah sampel tiap perlakuan, p = jumlah perlakuan)

Dosis ekstrak biji *Momordica charantia* diambil dari penelitian Sathishsekar dan Subramanian (2005) tentang potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antioksidan dan potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antiinflamasi oleh Gill *et al* (2012). Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini digunakan 5 perlakuan dengan keterangan sebagai berikut:

1. Kontrol positif : tikus dengan diet aterogenik saja.
2. Perlakuan A : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 150 µg/g BB.
3. Perlakuan B : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 300 µg/g BB.
4. Perlakuan C : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 500 µg/g BB.
5. Kontrol negatif : tikus sehat dengan pakan standart.

Sehingga didapatkan nilai n dengan perhitungan sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15$$

$$n-1 > 3$$

$$n > 4$$

Jadi, dibutuhkan minimal 5 ekor tikus dalam tiap perlakuan, sehingga jumlah total minimum tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar IL-6 serum.

4.3.2 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak biji pare *Momordica charantia*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan bertahap, untuk pemeliharaan hewan coba, pemberian diet aterogenik, pembuatan ekstrak, pemberian perlakuan, dan pembedahan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), untuk selanjutnya yaitu pengukuran kadar IL-6 serum dilaksanakan di Laboratorium Faal FKUB. Penelitian dilakukan mulai Juni 2013 hingga akhir bulan November 2013.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus galur Wistar jantan. Tikus berumur 8 minggu (sudah dewasa), berat 180-200 gram.
2. Pakan standar yang terdiri dari 64% pellet (*cornfeed*), 35% terigu, dan 1% air serta minum secara *ad libitum*. Semua bahan pakan dicampur dan dibuat

bulatan dengan berat 40 gram, diberikan sekali setiap hari (Nugraha dan Winarsih, 2011).

3. Pakan ateroogenik dengan komposisi 75% pellet (*cornfeed*) dan terigu, 8.05% minyak lemak babi, 10% minyak lemak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur bebek (yolk saja), dan 0.825% air (Nugraha dan Winarsih, 2011).
4. Jenis buah pare (*Momordica charantia*) yang digunakan adalah pare gajah, dibeli dari pasar lokal, dicuci bersih lalu diambil bijinya. Terdapat antara 10-20 biji pare dengan berat biji total 1,8-4 gram dalam satu buah pare (Grubben, 2004). Biji yang sudah dicuci dikeringkan di suhu ruang, kemudian ditumbuk dengan menggunakan mortar hingga menjadi serbuk. Serbuk disimpan dalam wadah kedap udara pada suhu 4°C hingga nantinya digunakan (Sathishsekar dan Subramanian, 2005). Untuk mendapatkan ekstrak cair dilakukan maserasi dengan pelarut air karena terbukti lebih efektif dalam menarik metabolit peptide dibandingkan etanol, petroleum eter, dan n-hexane. Selain itu air juga ramah lingkungan, dapat mencegah terbantuknya komponen degradasi akibat pemanasan yang berlebihan, dan membuat proses ekstraksi lebih mudah untuk dilakukan (Mahmood *et al*, 2012; Engelberth *et al*, 2010).
5. Dosis ekstrak biji *Momordica charantia* diambil dari penelitian Sathishsekar dan Subramanian (2005) tentang potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antioksidan (dosis 150 µg/g BB) dan potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antiinflamasi (dosis 300 dan 500 µg/g BB) oleh Gill *et al* (2012). Maka dosis yang digunakan adalah 150, 300, dan 500 µg/g Bb diberikan dengan sonde lambung sekali setiap hari.

6. Penelitian ini adalah penelitian payung, dimana dalam satu tikus diambil beberapa organ seperti aorta, hepar, ginjal, arteri ekor, dan darah di jantung.
7. Pengukuran kadar IL-6 dilakukan pada sampel serum menggunakan metode ELISA dengan satuan ukuran ng/ml.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, baskom, bahan-bahan pakan standar, air minum, timbangan, dan *handscoon*.

4.6.2 Alat dan Bahan Induksi Aterosklerosis

Bahan-bahan pakan aterogenik (75% pellet dan terigu, 8.05% minyak lemak babi, 10% minyak lemak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur bebek (yolk saja), dan 0.825% air), baskom, tempat minum, timbangan, dan *handscoon*.

4.6.3 Alat dan Bahan Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

Bahan berupa serbuk biji yang sudah dipersiapkan sebelumnya. Alat-alat botol 1,5 liter bersih, cawan bersih, kertas saring, oven *Memmert*, *microwave*, gelas ukur, wadah bersih untuk ekstrak kental, timbangan *Mettler Toledo* dengan ketelitian 0,001 mg

4.6.5 Alat dan Bahan Pemberian Ekstrak Biji pare (*Momordica charantia*)

Bahan yang dibutuhkan adalah ekstrak biji pare yang sudah dilarutkan dengan aquades sesuai dengan dosis yang ditentukan. Alat yang dipergunakan adalah set sonde lambung.

4.6.6 Alat dan Bahan Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang diperlukan antara lain papan wax, jarum, pinset, *chirurgis*, gunting, *scalpel*, alcohol, penyemprot alcohol, vacuotainer, eter.

4.6.7 Alat dan Bahan ELISA IL-6

Alat dan bahan yang diperlukan antara lain serum tikus, *flat bottom 24 well plate*, *rat IL-6 ELISA kit*, air distilasi, *test tube*, mikropipet, vortex, *microplate shaker*, *microplate reader 450 nm*.

4.6.8 Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi

Meliputi tempat cuci tangan, *handscoon*, jas lab, antiseptik, masker, alcohol.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan sebanyak 25 ekor dipelihara dalam kandang ukuran 40x30x20 cm di Laboratorium Farmakologi FKUB. Adaptasi dilakukan selama kurang lebih 1 minggu. Makan dan minum diberikan sehari sekali dengan pakan standar, kecuali saat perlakuan.

4.7.2 Pemberian Diet aterogenik

Diet aterogenik terdiri atas 75% pellet dan terigu, 8.05% minyak babi, 10% minyak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur itik (hanya kuning telur), dan 0.825% air. Masing-masing dicampur dan ditimbang sebesar 40 gram untuk setiap tikus, diberikan selama 65 hari (Nugraha dan Winarsih, 2011).

4.7.3 Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi terhadap simplisia biji pare dalam pelarut aquades. Simplisia dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:10 selama 72 jam. Pellet dibuang, sementara supernatan disaring menggunakan kertas saring menjadi ekstrak cair. Ekstrak cair dioven dalam oven *Memmert* selama kurang lebih 12 jam pada suhu 100°C hingga menjadi ekstrak kental. (Mahmood *et al*, 2011; Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Danladi, 2012).

4.7.4 Pemberian Ekstrak Biji Pare (*Momordica charantia*)

Pemberian ekstrak biji pare dilakukan sekali satu hari, dengan 3 dosis perlakuan yaitu perlakuan A 150 µg/g BB, perlakuan B 300 µg/g BB, perlakuan C 500 µg/g BB (Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Gill *et al*, 2012). Berat badan tikus disesuaikan dengan hasil penimbangan tikus setiap minggunya. Setiap pemberian ekstrak dilarutkan dalam air aquades sampai 1cc/ekor dan diberikan menggunakan set sonde lambung. Ekstrak biji pare diberikan mulai minggu ke-8 hingga minggu ke-12.

Hasil dari penelitian Lamanepa (2005) menyatakan bahwa peningkatan bermakna jumlah sel busa pada pemberian diet atherogenik hingga minggu ke-8, tetapi belum diikuti peningkatan bermakna ketebalan aorta. Kondisi tersebut belum bisa disebut aterosklerosis. Perkembangan aterosklerosis dicapai dalam jangka waktu 12 minggu (Nugraha dan Winarsih, 2011). Berdasarkan hal tersebut pemberian ekstrak biji pare pada penelitian ini dimulai pada minggu ke-8 hingga minggu ke-12 agar sesuai dengan kondisi perkembangan aterosklerosis.

4.7.7 Pembedahan Tikus

Whole blood diisolasi dari jantung tikus dan ditempatkan dalam *vacuotainer*. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Serum yang didapatkan disimpan pada suhu -40°C .

4.7.8 ELISA IL-6

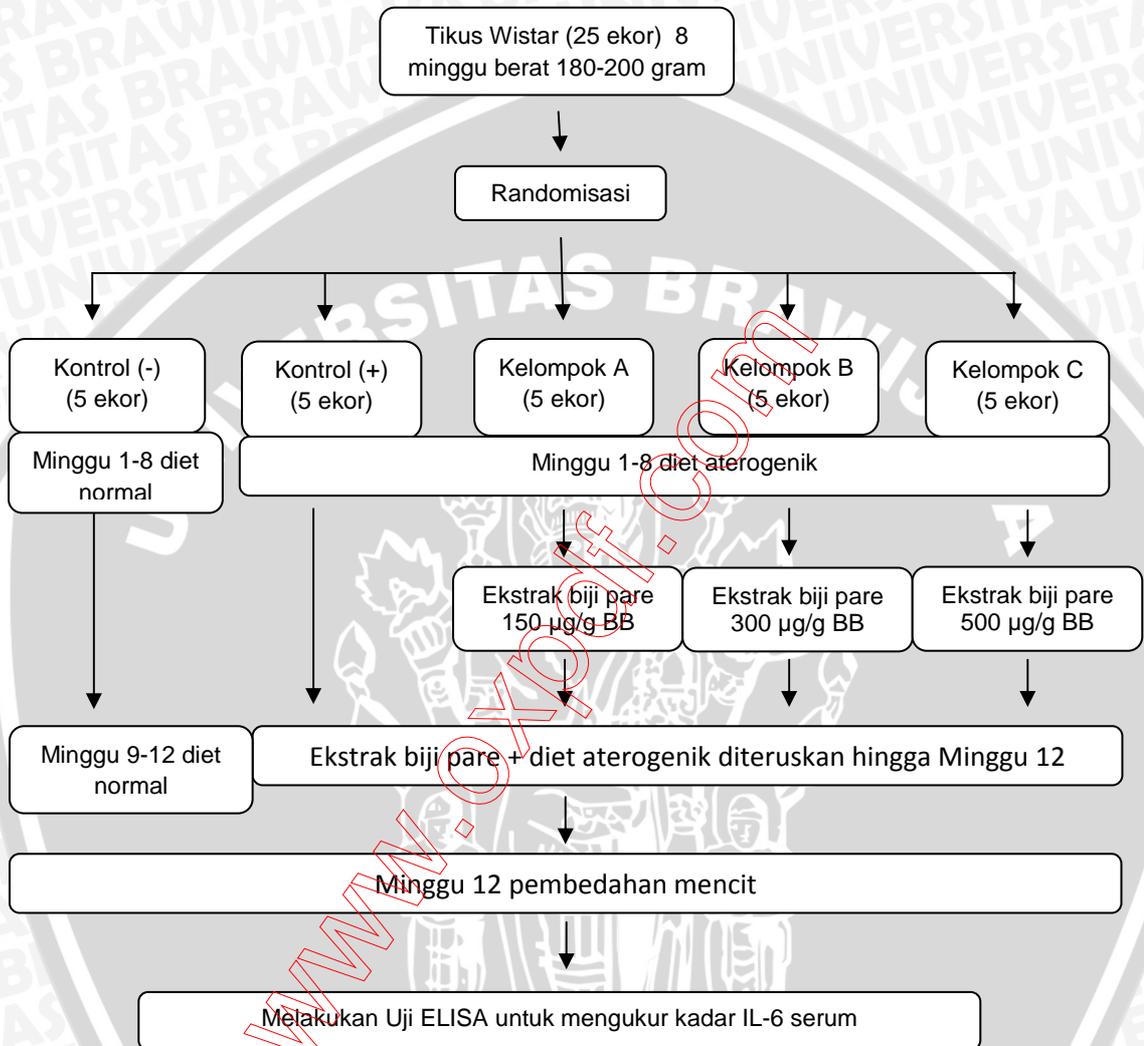
Prosedur hari pertama :

Serum diencerkan dalam *coating buffer* dengan perbandingan 1:20, lalu di-vortex hingga homogen.

Prosedur hari kedua :

Washing menggunakan PBS-Tween 0,2% sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit. Dilanjutkan dengan *blocking* menggunakan BSA 1% selama 30 menit, kemudian *washing* lagi. Antibodi primer (anti-IL-6) diencerkan dengan perbandingan 1:1000 dalam PBS, kemudian diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Antibodi sekunder (IgG Biotin anti-rabbit) diencerkan dengan perbandingan 1:1000, kemudian diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Enzim SA-HRP diencerkan 1:1000, diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Sureblue TMB, diinkubasi 30 menit. Diakhiri dengan *stop solitiuon* HCl 1N, lalu inkubasi 15 menit. Perubahan warna dari biru menjadi kuning akan terlihat di dalam sumur. Pembacaan dilakukan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450nm.

4.7.9 Flowchart Desain Penelitian



Gambar 4.1 Flowchart Desain Penelitian