

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUB dan laboratorium Faal FKUB secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan model tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar jantan dewasa berusia 8 minggu dengan berat 120-160 gram. Tikus wistar dipilih sebagai hewan coba karena merupakan hewan coba yang rentan terhadap aterosklerosis, mudah ditangani atau dipelihara, dan memiliki respon imun yang mirip dengan manusia. (Kahfi, 2012). Jenis kelamin yang dipilih adalah jantan karena tidak memiliki pengaruh terhadap faktor hormonal seperti pada tikus betina (hormon estrogen) yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol.

##### 4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Tikus yang dipilih masuk ke dalam kriteria inklusi sebagai berikut :

- a. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar jantan.

- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat badan tikus 120-160 gram
- d. Memiliki bulu putih dan bersih
- e. Dalam kondisi yang sehat dan aktif

Kriteria eksklusi, diantaranya sebagai berikut :

- a. Tikus yang sakit dan memiliki asupan makanan kurang pada saat penelitian.
- b. Tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung.

#### 4.2.3. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu : kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan A, kelompok perlakuan B, dan kelompok perlakuan C. Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut :

$$(p-1) (n-1) \geq 15$$

Ket : p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

Dalam penelitian ini digunakan p=5 (kelompok K+, K-, dosis A, dosis B, dan dosis C), sehingga jumlah pengulangan menjadi:

$$(p-1) (n-1) \geq 15$$

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

$$n-1 \geq 15:4$$

$$n = 3,75 + 1 = 4,75$$

Diperoleh hasil perhitungan 4,75 sehingga dibulatkan ke atas menjadi 5 pengulangan. Hewan coba yang dibutuhkan adalah minimal 5 ekor tikus untuk

setiap kelompok, atau secara keseluruhan dibutuhkan 25 ekor tikus. Namun untuk mencegah akibat dari kriteria eksklusi, maka untuk tiap kelompok perlakuan ditambahkan satu ekor tikus, sehingga jumlah keseluruhan menjadi 30 ekor tikus.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) yang dibagi dalam kelompok :

- Kontrol negatif : tikus sehat dengan pakan standart (pakan normal).
- Kontrol positif : tikus dengan diet aterogenik saja.
- Perlakuan A : tikus dengan diet aterogenik dan diberi ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 150 µg/g BB.
- Perlakuan B : tikus dengan diet aterogenik dan diberi ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 300 µg/g BB.
- Perlakuan C : tikus dengan diet aterogenik dan diberi ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 500 µg/g BB.

Dosis ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) dari pemaparan diatas, diadaptasi pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sathisekar dan Subramanian (2005) yang meneliti potensi ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) sebagai antioksidan, dan Gill *et al* (2012) yang meneliti potensi ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) sebagai antiinflamasi.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar TNF- $\alpha$  serum tikus yang diberi diet aterogenik.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), yaitu : Laboratorium Farmakologi sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, pemberian diet aterogenik, pembuatan ekstrak biji pare yang akan diberikan, pemberian perlakuan, dan pembedahan. Sedangkan pengukuran kadar TNF- $\alpha$  serum dilakukan di Laboratorium Faal FKUB. Penelitian dilaksanakan selama tiga setengah bulan, yaitu mulai akhir bulan Juni hingga Oktober 2013.

#### 4.5 Bahan dan Alat/Instrument Penelitian

##### 4.5.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

Alat yang diperlukan antara lain kandang berupa baskom dengan ukuran 20x30 cm dengan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat sebanyak 30 buah, botol minum tikus 30 buah, timbangan analitik, baskom untuk pembuatan pakan tikus, *handscoon*, dan pembersih kandang. Sedangkan bahan yang digunakan berupa sekam, bahan-bahan pakan standar, dan air minum untuk tikus.

##### 4.5.2 Alat dan Bahan Diet Aterogenik

Alat yang digunakan adalah timbangan, baskom, gelas ukur, dan *handscoon*. Sedangkan bahan yang dibutuhkan adalah PARS terigu 75%, minyak babi 8,05%, minyak kambing 10%, minyak kelapa 1%, asam cholat 0,125%, kuning telur bebek 5%, dan air 0,825% (Hrotkiewick dalam Kahfi, 2012).

#### 4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

Alat yang digunakan adalah timbangan, blender, oven, gelas erlenmeyer, kertas saring watman no.1, cawan, gelas untuk hasil ekstraksi. Bahan yang digunakan diantaranya biji pare yang telah dikeringkan dan aquades.

#### 4.5.4 Alat dan Bahan *Froating Test*

Alat dan bahan yang dibutuhkan diantaranya, serbuk ekstrak biji pare (*Momordica charantia*), aquades, dan botol tempat ekstraksi.

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

Alat yang dibutuhkan adalah sonde lambung. Bahan yang dibutuhkan adalah ekstrak biji pare dan aquades yang telah dicampurkan dengan dosis yang sudah ditentukan.

#### 4.5.6 Alat dan Bahan Pembedahan Tikus

Alat yang dibutuhkan antara lain papan wax, gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform, kertas label, marker, botol organ dan tutup sebanyak 80 buah, spuit sebanyak 60 buah, vacuotainer, dan *handscoon*. Bahan yang digunakan adalah klorofom 20 ml dan formalin untuk menyimpan sampel.

#### 4.5.7 Alat dan Bahan ELISA TNF- $\alpha$

Alat yang digunakan adalah: *multichannel pipet*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, mikropipet, vortex, *tube*, *sentrifuge*, ELISA reader. Bahan yang digunakan

adalah serum darah tikus, PBS, BSA 1%, tween, Surblu TMB, antibodi TNF- $\alpha$ , Antibodi sekunder, coating buffer, dan HCL 1 N.

#### 4.5.8 Alat dan Bahan untuk Sanitasi dan Higienisasi

Meliputi tempat cuci tangan, *handscoon*, jas lab, antiseptik, masker, alkohol, dan sabun.

#### **4.6 Definisi Istilah/Operasional**

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Tikus wistar : merupakan hewan coba dengan jenis *Rattus novergicus* strain wistar berjenis kelamin jantan, berusia 8 minggu dengan berat 120–160 gram. Tikus wistar dibeli dari peternak tikus lokal di Kota Malang.
- b. Diet normal/standar : tersusun atas 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).
- c. Diet aterogenik : tersusun atas 75% pellet (*cornfeed*) dan terigu, 8.05% minyak lemak babi, 10% minyak lemak domba/kambing, 1% minyak kelapa, 0.125% asam cholat, 5% kuning telur bebek , dan 0.825% air (Nugraha dan Winarsih, 2011).
- d. Buah pare (*Momordica charantia*) jenis pare gajah, dibeli dari pasar lokal, dicuci bersih dan diambil bijinya. Dalam satu buah pare terdapat sekitar 10-20 biji pare, dengan berat total biji per buah 1,8-4 gram (Grubben, 2004). Kemudian biji dikeringkan dengan cara dianginkan di suhu ruang, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk. Serbuk disimpan dalam wadah kedap udara pada suhu 4°C

hingga tiba saatnya digunakan (Sathishsekar dan Subramanian, 2005). Maserasi dilakukan dengan menggunakan aquades untuk mendapatkan ekstrak cair. Air dipilih karena terbukti dapat menarik metabolit peptide lebih efektif dibandingkan ethanol, petroleum ether, dan n-hexane (Mahmood *et al*, 2012). Selain merupakan pelarut ramah lingkungan, air membuat ekstrak dapat diliofilisasi (mencegah terbentuknya komponen degradasi akibat pemanasan berlebihan) dan membuat proses ekstraksi lebih mudah untuk dilakukan (Engelberth *et al*, 2010). Ekstrak cair kemudian disaring dan panasi dalam oven hingga didapatkan ekstrak kental.

- e. Dosis ekstrak biji *Momordica charantia* diadaptasi dari dua penelitian. Pertama, Sathishsekar dan Subramanian (2005) yang meneliti potensi ekstrak biji *Momordica charantia* (dari dua varian berbeda) sebagai antioksidan. Dalam penelitian ini digunakan dosis 150  $\mu\text{g/g}$  BB. Kedua, Gill *et al* (2012) yang meneliti potensi ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) sebagai anti inflamasi, antioksidan, dan anti *ulcer*. Dalam penelitian ini digunakan dosis 300 dan 500  $\mu\text{g/g}$  BB. Karena itu dosis yang digunakan adalah 150, 300, dan 500  $\mu\text{g/g}$  BB diberikan dengan sonde lambung sekali setiap hari selama 30 hari.
- f. Pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dilakukan pada sampel serum menggunakan metode ELISA dengan satuan ukuran ng/ml.

## 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

### 4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan sebanyak 30 ekor dipelihara dalam kandang ukuran 20x30 cm (satu tikus dalam satu kandang) di Laboratorium Farmakologi FKUB. Adaptasi dilakukan selama 1 minggu. Makan dan minum diberikan sehari sekali dengan pakan standar, kecuali saat perlakuan. Sekam diganti 2-3 kali dalam seminggu.

#### 4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Diet Normal

Diet normal merupakan asupan normal pada tikus dan tidak menimbulkan efek aterogenik. Diet normal ini diberikan pada masa adaptasi untuk semua kelompok, dan khusus diberikan pada kelompok kontrol negatif saat pemberian diet aterogenik (kontrol positif, kelompok perlakuan dosis A, B dan C) telah dilakukan. Diet normal dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan dengan komposisi sebagai berikut :

**Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal (Mutiyani, 2005)**

PAR-S	Tepung terigu	Air
25,6 gram	14 gram	0,4 gram
Total diet normal = 40 gram/tikus/hari		

Semua bahan diatas dicampurkan dalam baskom, dan kemudian ditimbang dengan bentuk bulat seberat 40 gram untuk satu ekor tikus. Diet normal ni diberikan sekali setiap harinya dengan berat pakan yang tetap (40 gram).

#### 4.7.3 Pembuatan dan Pemberian Diet aterogenik

Diet aterogenik merupakan diet yang diberikan pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan dosis A, dosis B, dan dosis C. Diet aterogenik yang diberikan terdiri atas 75% pellet dan terigu, 8.05% minyak babi, 10% minyak

domba/kambing, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% kuning telur bebek, dan 0.825% air (Nugraha dan Winarsih, 2011). Atau dengan komposisi dalam berat masing-masing sebagai berikut :

**Tabel 4.2 Komposisi Diet Aterogenik (Mutiyani, 2005)**

PAR-S + Tepung Terigu	Asam Cholat	Minyak babi	Minyak Kambing	Minyak Kelapa	Kuning Telur	Air
30 gr	0,05 gr	3,22 ml	4 ml	0,4 ml	2 gr	0.33 gr
Total diet aterogenik = 40 gram/tikus/hari						

Bahan-bahan diatas dicampur dalam baskom, kemudian dibulatkan dan ditimbang dengan berat masing-masing 40 gram untuk setiap tikus. Diet aterogenik ini diberikan selama 12 minggu (87 hari) pada kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol negatif.

#### 4.7.4 Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

- 1) Biji pare dikupas dan dikeringkan dalam suhu kamar
- 2) Biji pare yang telah kering dihaluskan (simplisia)
- 3) Panaskan aquades hingga mendidih dengan perbandingan 1:10 dengan simplisia biji pare
- 4) Simplisia biji pare dilarutkan dalam aquades selama 72 jam
- 5) Pellet rendaman biji pare dan aquades dibuang, sedangkan supernatan disaring dengan menggunakan kertas saring menjadi ekstrak cair.

- 6) Ekstrak cair kemudian dimasukkan dalam oven *Memmert* selama kurang lebih 12 jam pada suhu 60°C hingga menjadi ekstrak kental (Mahmood *et al*, 2011; Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Danladi, 2012).

#### 4.7.5 Frothing Test Ekstrak Biji Pare (*Momordica charantia*)

*Frothing test* dilakukan untuk membuktikan keberadaan saponin dalam ekstrak biji pare (*Momordica charantia*). Tes ini dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak kering secukupnya ke dalam 10 ml aquades dalam tabung reaksi, dikocok selama 30 detik hingga 1 menit, dan diamati buih yang terbentuk (Danladi, 2012; Marisan, 2007). Buih yang terbentuk akibat adanya senyawa saponin relatif bertahan lebih lama. Waktu lamanya buih akibat saponin yang terbentuk menurut Kurniawan *et al* (2013) buih karena saponin yang terbentuk akan tetap stabil selama  $\pm 7$  menit dengan tebal buih setinggi 3,5 cm. Sedangkan menurut Marisan (2007) buih akibat saponin dapat bertahan selama  $\pm 15$  menit, dan menurut Danladi (2012) buih saponin dapat bertahan hingga 30 menit.

#### 4.7.6 Pemberian Ekstrak Biji Pare (*Momordica charantia*)

Ekstrak kering biji pare diberikan dengan sonde lambung sekali dalam satu hari, dengan dosis pada kelompok perlakuan A, B, dan C masing-masing sebesar 150, 300, dan 500  $\mu\text{g/g}$  BB (Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Gill *et al*, 2012). Ekstrak biji pare diberikan pada tikus secara peroral menggunakan *orogastric tube*. Pemberian ekstrak biji pare dimulai pada minggu ke-8 (hari ke-

58) hingga minggu ke-12 (hari ke-87) sejak dimulainya diet aterogenik selama 30 hari.

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

#### 4.7.7 Pembedahan Tikus

Setelah pemberian diet aterogenik selama 12 minggu dan pemberian ekstrak biji pare setiap hari selama 4 minggu seperti yang sudah dijelaskan di atas, dilakukan pembedahan tikus untuk kemudian diambil darahnya untuk kemudian dilakukan ELISA untuk pembacaan TNF- $\alpha$ . Dikarenakan penelitian ini merupakan penelitian payung, maka beberapa organ yang juga diambil adalah pembuluh darah aorta, hepar, ginjal, dan pembuluh darah ekor. Pembedahan diawali dengan euthanasia dengan cara memasukkan tikus ke dalam toples berisi eter. Setelah tikus mati, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan wax. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan thorax. Pertama, darah diambil dengan spuit 3 cc melalui jantung. Aorta dipotong mulai dari arcus aorta, aorta thoracalis, dan aorta abdominalis. Dan dilanjutkan dengan organ-organ lainnya. Selanjutnya aorta dan organ lain disimpan dalam gelas plastic dengan formalin 10% pada suhu 4°C.

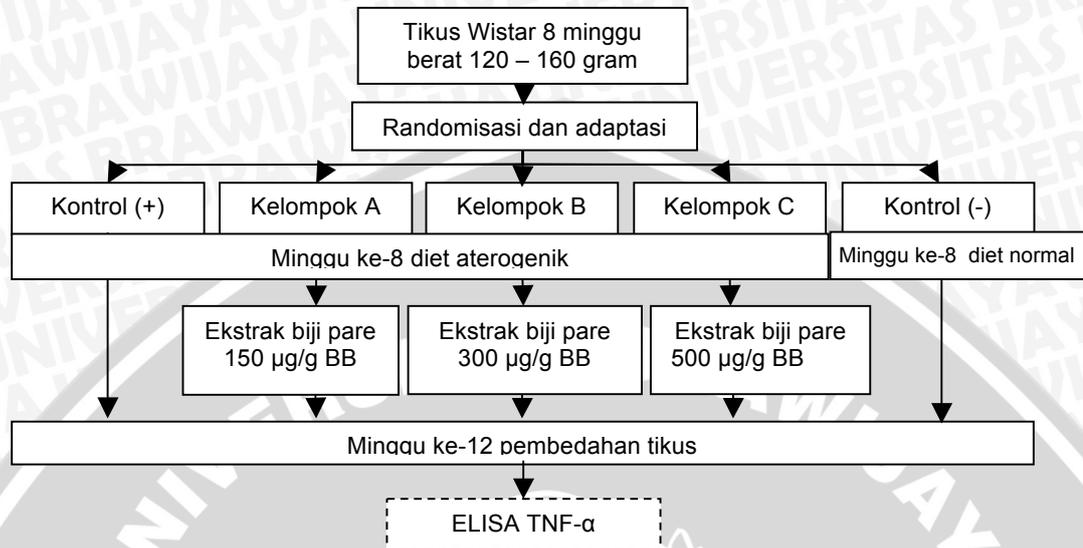
#### 4.7.8 Pengambilan Serum

*Whole blood* diisolasi dari jantung tikus dan dibiarkan menggumpal selama kurang lebih 30 menit dalam vacuotainer. Kemudian disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Serum yang didapatkan harus segera digunakan, atau jika tidak memungkinkan harus disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Megawati, 2008).

#### 4.7.9 ELISA TNF- $\alpha$

- 1) Coating antigen dengan perbandingan 1:20, *overnight* dengan suhu 4 serajad celcius.
- 2) Cuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit.
- 3) Blocking dengan BSA 1% selama 30 menit.
- 4) Dicuci kembali dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit.
- 5) Antibodi primer 1:500 dalam PBS dan di inkubasi selama 1 jam.
- 6) Cuci kembali dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit.
- 7) Antibodi sekunder anti rat 1:1000 dengan inkubasi 1 jam.
- 8) Cuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit.
- 9) SA-HRP 1:1000 diinkubasi selama 1 jam.
- 10) Dicuci dengan PBS-T 0,2% 3 kali selama 3 menit.
- 11) Kemudian dilakukan penambahan *Sureblue* TMB dan diinkubasi 30 menit.
- 12) Tanpa membuang *Sureblue* TMB, reaksi distop dengan HCl 1N, dan di inkubasi 15 menit.
- 13) Kemudian dibaca menggunakan ELISA reader ( $\lambda = 450\text{nm}$ ).

#### 4.7.10 Alur Rancangan Penelitian



**Gambar 4.1 Rancangan Penelitian**

Keterangan : Tikus wistar dibagi menjadi kelompok kontrol (negatif dan positif) serta tiga kelompok perlakuan (kelompok perlakuan A, B, dan C). Diet aterogenik diberikan pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan A, B, dan C selama 12 minggu. Ekstrak biji pare diberikan secara peroral setiap hari mulai minggu ke-8 selama 30 hari dengan diet aterogenik yang terus diberikan. Pada minggu ke-12 dilakukan pembedahan dan pengambilan organ. Selanjutnya, dilakukan pengecekan terhadap ekspresi TNF- $\alpha$ , melalui analisis menggunakan ELISA reader.

#### 4.8 Analisis Data

Analisis yang dilakukan merupakan analisis deskriptif berdasarkan hasil ELISA, dilanjutkan dengan melakukan uji statistik menggunakan SPSS 16.0. Uji hipotesis *One Way Anova* dilakukan bila didapatkan sebaran data normal pada uji normalitas dan uji varian. Namun, jika data yang didapatkan justru sebaliknya, maka digunakan uji *non-parametrik Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc LSD (Least Significant Differences)* sebagai lanjutan *One way Anova* untuk mengetahui letak perbedaan dari perlakuan yang diberikan. Selain itu, dilakukan juga uji *homogeneous subsets* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki rerata tidak berbeda secara signifikan dan uji korelasi untuk

mengetahui hubungan antara dosis ekstrak biji pare yang diberikan terhadap kadar TNF- $\alpha$  serum tikus yang dianalisis (dinilai bermakna bila didapatkan nilai  $p < 0,05$ )

