

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental*, metode yang digunakan adalah *posttest-only controlled design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK), yakni dengan membagi sampel dalam beberapa kelompok perlakuan secara acak.

4.2 Populasi dan Sampel

1. Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar DM tipe 2.
2. Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus model DM tipe 2 melalui induksi makanan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
3. Sampel dalam penelitian ini adalah tikus jantan model DM tipe 2 yang diinduksi dengan makanan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kg BB satu kali sebagai dosis tunggal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.1 Besaran Sampel

Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing perlakuan (5 perlakuan) dihitung menggunakan rumus Federer (1991):

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

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

$$\begin{aligned}4n - 4 &\geq 15 \\4n &\geq 19 \\n &\geq 4,75 \approx 5 \rightarrow \text{total } 25\end{aligned}$$

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

n: jumlah sampel

Dengan demikian, untuk setiap kelompok uji dibutuhkan 5 ekor tikus putih strain

Wistar sebagai sampel sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor dan keseluruhan berkelamin jantan.

4.2.2 Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan berjumlah 5 (lima) yang dibagi secara acak (P_n, P_1, P_2, P_3, P_p), dengan ketentuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (P_n): 5 ekor tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan 2 mL larutan tween 80 10% tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_1): 5 ekor tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_2): 5 ekor tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_3): 5 ekor tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
- Kelompok kontrol positif (P_p): 5 ekor tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari.

Berdasarkan penelitian Andaloussi tentang aktivitas biji jintan hitam terhadap penurunan glukosa darah (2011), didapatkan dosis efektif biji jintan hitam adalah 48 mg/kg/hari, sehingga dalam penelitian ini digunakan dosis tersebut. Selain itu, digunakan dosis ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari dan 96 mg/kg/hari bertujuan untuk mengetahui dosis optimum yang dapat memberikan perbedaan kadar MDA ginjal tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2.

4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak agar setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok perlakuan. Metode yang digunakan adalah sistem lotre, sebanyak 2 kali. Lotre pertama menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan lotre kedua untuk mengelompokkan tikus.

Terlebih dahulu dilakukan lotre untuk menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu. Dalam lotre ini terdapat 5 macam kertas, yakni Pn, Pp, P1, P2, dan P3, kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dulu ditentukan anggotanya, lalu kertas yang telah keluar tidak dimasukkan lagi. Selanjutnya untuk menentukan pengelompokan hewan coba, terlebih dahulu hewan coba diberi nomor 1-25 pada kandang menggunakan kertas label. Selanjutnya dilotre untuk masuk ke kelompok tertentu. Nomor *lotree* yang sudah diambil tidak dimasukkan kembali.

4.2.4 Kriteria Subyek

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar karena dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2, penanganan mudah dan harga terjangkau. Kriteria tikus yang digunakan sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- a) Berjenis kelamin jantan.
- b) Usia 12 bulan. Tikus pada usia tersebut sepadan dengan manusia usia 30 tahun.
- c) Berat badan 250-550 gram.
- d) Sehat, aktif, dan mau makan.

Kriteria Eksklusi:

- a) Tikus dengan DM sebelum dilakukan induksi DM tipe 2.
- b) Tikus yang mengalami infeksi pada saat sebelum perlakuan, ditandai dengan pembengkakan nodus limfe, adanya luka dan timbul kemerahan di daerah luka.
- c) Tikus yang pernah menjadi subyek penelitian lain sebelumnya.

Subyek yang digunakan bukan manusia karena studi ini bertujuan untuk menyumbang data preklinis dan fungsi ekstrak biji jintan hitam di samping terapi standar sebelum direkomendasikan penggunaannya pada manusia. Selain itu, sampai saat ini penggunaannya dalam peresepan masih sangat jarang.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji jintan hitam dosis 24 mg/kgBB/hari, 48 mg/kgBB/hari, 96 mg/kgBB/hari dan metformin 75 mg/kgBB/hari.

4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar MDA ginjal tikus putih strain Wistar jantan model DM tipe 2.

4.4 Instrumen Analisis

Kadar MDA ginjal diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan reaksi warna dengan *Thiobarbituric Acid* (TBA).

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Fitoterapi Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Sedangkan untuk pengujian kadar MDA ginjal dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penulisan proposal dimulai pada Oktober 2013. Waktu penelitian dimulai pada Januari 2014 setelah mendapatkan persetujuan etik, dan berakhir pada pertengahan Juni 2014.

4.6 Instrumen penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian dikelompokkan berdasarkan metode masing-masing, adalah sebagai berikut:

- a) Bahan untuk pemeliharaan tikus: sekam sebagai alas kandang tikus, alkohol 70% untuk memandikan tikus, pakan *comfeed* PAR-S dan tepung terigu untuk diet normal, lemak babi, serta sukrosa. Adapun

kandungan zat gizi dan energi per 100 gram bahan diet normal tikus adalah:

Tabel 4.1 Komposisi Energi dan Zat Gizi Diet Tikus Normal

Zat Gizi	Comfeed PAR-s	Tepung Terigu
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11
Lemak (gram)	4	0,9
Karbohidrat (gram)	58	72

(Adi, 2008)

Tikus diet normal membutuhkan 102 kkal yang bersumber dari comfeed PAR-S dan tepung terigu. Untuk membuat diet normal dengan perbandingan *comfeed*:tepung (2:1) dibutuhkan *comfeed* sebanyak 19,77 gram (68 kkal) dan tepung sebanyak 10 gram (34 kkal). Untuk membuat diet tinggi kalori maka perlu ditambahkan lemak babi sebanyak 10% dan 20% sukrosa dari total energi yang dibutuhkan pada diet normal, yaitu 10,2 kkal dan 20,4 kkal (Wang *et al.*, 2007). 1 gram sukrosa setara dengan 3,87 kkal sedangkan 1 gram lemak babi setara dengan 9,02 kkal energi (PERSAGI, 2005). Untuk mendapatkan 10,2 kkal maka dibutuhkan lemak babi sebanyak 1,13 gram dan sukrosa sebanyak 5,27 gram.

- b) Bahan untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: Serbuk biji jintan hitam didapatkan dari Timur Tengah yang diimpor oleh Batu Materia Medika, Kota Batu, Profinsi Jawa Timur sejumlah 1 kg. Pelarut

ekstraksi yang digunakan adalah etanol 80% sebanyak 900 mL, dengan perbandingan simplisia:pelarut 1:3.

c) Uji fitokimia kualitatif

(i) minyak atsiri: ekstrak biji jintan hitam, Sudan III ((1E)-1-[(4-phenyldiazenylphenyl)hydrazinylidene]naphthalene-2-one).

(ii) Alkaloid: ekstrak biji jintan hitam, HCl 2N, NaCl, Mayer, Wagner, dan akuades.

(iii) Saponin: akuades dan HCl 2N.

d) Bahan pemberian ekstrak biji jintan hitam dan metformin pada tikus: ekstrak biji jintan hitam, metformin, tween 80, akuades.

e) Bahan untuk pembuatan homogenat jaringan ginjal: jaringan ginjal tikus, TCA, dan akuades.

f) Bahan untuk pemeriksaan MDA ginjal: TCA (*Tri Chloride Acetic Acid*) dan *Thiobarbituric Acid* (TBA).

g) Bahan untuk pembuatan kurva baku dan pengukuran λ max: MDA standar, TBA, dan TCA.

4.6.2 Alat Penelitian

a) Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan.

b) Alat untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: timbangan digital untuk menimbang sampel, toples sebagai wadah dalam proses maserasi, *stirrer*, batang pengaduk, kain penyaring untuk memisahkan filtrat,

rotary evaporator untuk menguapkan pelarut, dan *vacuum oven* untuk memekatkan ekstrak.

c) Uji fitokimia kualitatif

(i) minyak atsiri: plat tetes dan pipet tetes.

(ii) Alkaloid: cawan porselen, timbangan, gelas ukur, plat tetes, pipet tetes, penangas air, dan kertas saring.

(iii) Saponin: gelas ukur dan pipet tetes.

d) Alat pemberian ekstrak biji jintan hitam dan metformin pada tikus: timbangan digital, gelas ukur, pengaduk dan sonde lambung tikus.

e) Alat pembedahan tikus: wadah organ, pisau bedah, papan bedah, pinset, dan gunting bedah.

f) Alat pembuatan homogenat jaringan ginjal: eppendorf, batang penghancur, gunting, pinset, mikropipet.

g) Alat untuk pemeriksaan MDA: sentrifuge, vortex, oven dengan pengaturan tekanan, spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang maksimal, mikropipet, *blue tip*, dan *yellow tip*.

4.7 Definisi Operasional

a) DM tipe 2 ditandai dengan peningkatan nilai glukosa darah ≥ 200 mg/dL setelah diinduksi menggunakan diet tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB sebanyak satu kali sebagai dosis tunggal karena STZ pada dosis 30 mg/kg BB dapat memberikan efek paling mendekati karakteristik DM tipe 2 dibandingkan dengan dosis 20 dan 60 mg/kg BB.

b) Biji jintan hitam yang digunakan dalam penelitian ini diimpor dari Timur Tengah oleh UPT Batu Materia Medika.

- c) Ekstrak biji jintan hitam yang digunakan dibuat melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 80% sebanyak 900 mL.
- d) Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan berusia 12 bulan dengan berat badan antara 250-550 gram, karena hewan coba ini dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2 dan sepadan dengan manusia usia 30 tahun. Pada populasi usia tersebut DM tipe 2 memiliki insiden yang cukup tinggi.
- e) Kadar MDA pada jaringan ginjal diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan reaksi warna merah muda dengan TBA pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh dari pengukuran sebelumnya. Pemisahan protein dilakukan dengan penambahan TCA.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam

Tahap ekstraksi biji jintan hitam berdasarkan penelitian Andaloussi (2011) tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah pada tikus diabetes adalah sebagai berikut:

- a) Serbuk biji jintan hitam dimasukkan ke dalam toples kaca bertutup sebanyak 300 gram.
- b) Etanol 80% sebanyak 900 mL ditambahkan ke dalam toples, diaduk hingga homogen lalu toples ditutup. Didiamkan sampai 24 jam.
- c) Hasil maserasi disaring menggunakan kain penyaring, residu penyaringan dimaserasi kembali sebanyak dua kali.

- d) Hasil ekstraksi pertama dan ekstraksi residu disatukan. Lalu dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* pada suhu kurang dari 40°C hingga pelarut menguap.
- e) Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan *vacuum oven* suhu kurang dari 40°C dan tekanan 200-400 kPa.

4.8.2 Uji Fitokimia Kualitatif

(i) Minyak atsiri

- Ekstrak biji jintan hitam di tempatkan dalam gelas arloji.
- Tambahkan Sudan III, hasil positif menunjukkan adanya minyak atsiri jika terbentuk warna merah.

(ii) Alkaloid

- Ekstrak ditimbang sebanyak 0,3 gram dengan cawan porselen.
- Ditambah HCl 2N sebanyak 5 mL.
- Dipanaskan selama 3 menit di atas penangas air sambil diaduk.
- Didinginkan kemudian ditambah 0,5 gram NaCl.
- Diaduk kemudian disaring.
- Ditambah HCl 2N sebanyak 5 mL.
- Diteteskan pada 3 lubang plat masing-masing 5 tetes (A,B,C).
- Pada lubang A ditambah Mayer 3 tetes.
- Pada lubang B ditambah Wagner 3 tetes.
- Diamati perubahan warna yang terjadi.

(iii) Saponin

- Ekstrak diambil sebanyak 1 mL kemudian diencerkan dengan 10 mL akuades.
- Dikocok selama 10 menit.
- Diberi HCl 2N sebanyak 1 tetes.
- Diamati busa yang terbentuk.

4.8.3 Pengondisian Hewan Coba

Sebelum tikus diberi perlakuan, dilakukan pengkondisian terlebih dahulu yang bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dalam kondisi percobaan dengan cara:

- a) Tikus ditempatkan pada kandang coba yang tertutup dengan anyaman kawat. Setiap kandang berisi 1 ekor tikus.
- b) Suhu ruangan kandang tikus adalah $23 \pm 1^\circ \text{C}$.
- c) Dalam kandang disediakan botol minum sehingga tikus dapat minum secukupnya.
- d) Makan tikus berupa *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- e) Sekam ditempatkan di kandang hewan coba.
- f) Tikus diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.

4.8.4 Induksi Diabetes Melitus Tipe 2

Berdasarkan penelitian Wang (2007), induksi DM tipe 2 pada tikus dilakukan dengan cara:

- a) Tikus Wistar sejumlah 25 ekor diberi diet tinggi kalori.
- b) Diet tinggi kalori diberikan selama 2 bulan kemudian dilakukan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB sebanyak satu kali sebagai dosis tunggal.

- c) Cek kadar glukosa darah puasa (GDP) dilakukan 3 hari setelah injeksi STZ. Tikus dikatakan mengalami DM jika nilai GDP \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) (Wang *et al.*, 2013; Wilson and Islam, 2012).

4.8.5 Pembuatan Larutan dan Prosedur Pemberian

- a) Ekstrak biji jintan hitam ditimbang sesuai kebutuhan untuk 15 ekor tikus dengan dosis 24, 48, dan 96 mg/kgBB.
- b) Metformin dihaluskan dan ditimbang sesuai kebutuhan untuk 5 ekor tikus dengan dosis 90 mg/kgBB/hari.
- c) (a) dilarutkan dalam tween 80 10% sampai diperoleh kadar tertentu.
- d) (b) dilarutkan dalam tween 80 10% sampai diperoleh kadar tertentu.
- e) Larutan disondekan pada masing-masing tikus sesuai kelompok perlakuan dan sesuai berat badan.

4.8.6 Terminasi Hewan Coba

Terminasi dilakukan untuk mengambil jaringan ginjal, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Hewan coba dikorbankan dengan *servical dislocation*.
- b) Tikus dibedah dan diambil organ ginjalnya.

4.8.7 Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Tikus yang dikorbankan untuk penelitian selanjutnya akan dikubur di dalam tanah sesuai prosedur Lab Faal FKUB.

4.8.8 Pembuatan Larutan Baku Kerja

Larutan baku kerja dibuat dengan cara mengencerkan standar MDA hingga kadar 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 ng/mL.

4.8.9 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimal

Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada *range* panjang gelombang 450-550 nm untuk memperoleh panjang gelombang maksimal dengan absorbansi MDA tertinggi.

4.8.10 Pembuatan Kurva Baku

- a) Larutan baku dengan berbagai kadar tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diukur sebelumnya.
- b) Dibuat kurva kadar terhadap kadar MDA dicari persamaan regresi dan besaran R^2 mendekati satu untuk memperoleh linearitas yang baik.

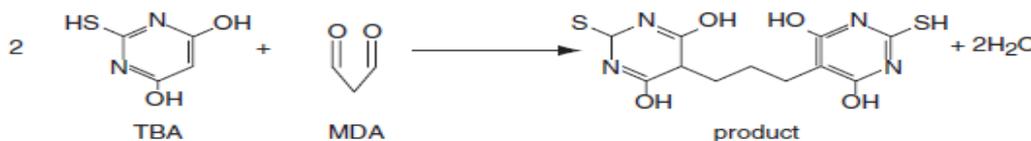
4.8.11 Pengukuran kadar MDA

Pengukuran kadar MDA pada homogenat jaringan ginjal menggunakan metode berikut ini :

- a) Organ ginjal dibersihkan dari lemak kemudian dicuci dengan PBS.
- b) Diambil 100 mg.
- c) Dihomogenkan menggunakan *microtube* dan batang penghancur serta dilakukan penambahan 0,1% TCA sebanyak 1 mL.
- d) Divortex hingga homogen.
- e) Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 gx selama 10 menit untuk memisahkan debris.
- f) Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* baru.
- g) Ditambah 20% TCA sebanyak 4 mL yang mengandung TBA 0,5%.
- h) Divortex kembali.
- i) Diinkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit untuk mempercepat reaksi.

- j) Diukur kadarnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

Persamaan reaksi warna merah muda yang dihasilkan dari kompleks MDA-TBA adalah sebagai berikut :



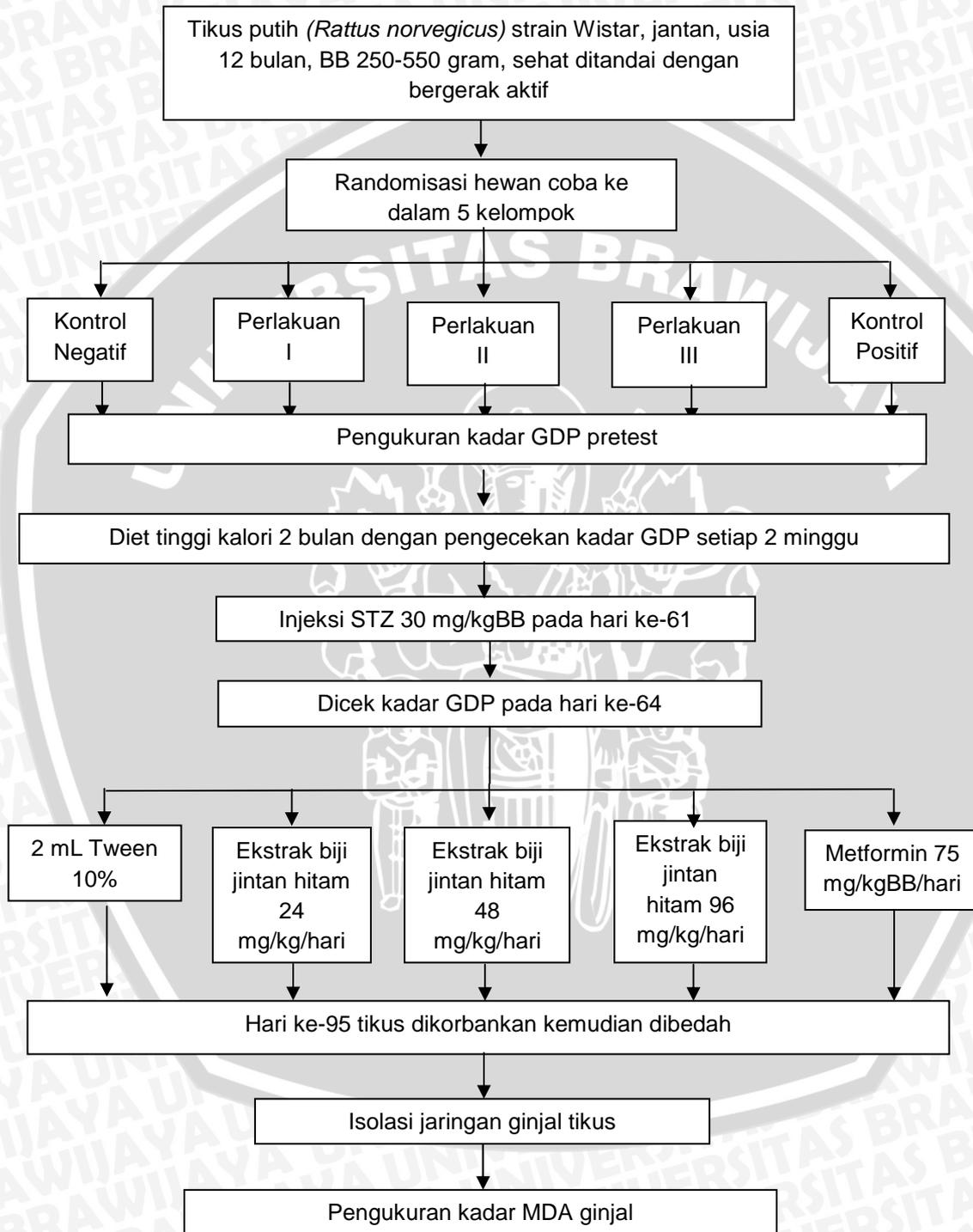
4.8.12 Perlakuan pada Tikus

Selama proses penelitian, perlakuan yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

- Sebanyak 25 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- Tikus diberi diet tinggi kalori selama 2 bulan untuk mendapatkan kondisi resistensi insulin. Masing-masing tikus menggunakan satu kandang karena perlu dilakukan kontrol pakan.
- Tikus dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan melalui metode lotre, dengan pembagian kelompok:
 - Kelompok kontrol negatif (Pn): 5 ekor tikus Wistar model DM tipe 2, diberikan 2 mL larutan tween 80 10% tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
 - Kelompok perlakuan (P1): 5 ekor tikus Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari selama 30 hari.

- Kelompok perlakuan (P2): 5 ekor tikus Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - Kelompok perlakuan (P3): 5 ekor tikus Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - Kelompok kontrol positif (Pp): 5 ekor tikus Wistar model DM tipe 2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari
- d) Makanan yang diberikan selama perlakuan adalah diet tinggi kalori, yang terdiri dari *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 ditambah 10% lemak babi dan 20% sukrosa.
- e) Kelompok P1, P2, dan P3 selain diberi diet tinggi kalori juga mendapatkan ekstrak biji jintan hitam melalui sonde selama 30 hari.
- f) Pada hari ke-95 tikus dibedah untuk diambil jaringan ginjalnya dan dilakukan pengukuran terhadap terhadap kadar MDA.

4.9 Alur Penelitian



4.10 Analisa Data

Pada penelitian ini data variabel bebas berupa data nominal sedangkan pada variabel tergantung adalah data numerik sehingga dilakukan uji ANOVA, syarat untuk melakukan uji ANOVA adalah distribusi data normal dan homogen oleh karena itu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Apabila distribusi data normal dan homogen dapat dilakukan uji ANOVA *One Way*, namun apabila data tidak memenuhi syarat maka dilakukan transformasi data dan jika masih belum memenuhi syarat dapat dilakukan uji nonparametrik yaitu uji Kruskal Wallis. Setelah data memenuhi syarat dapat dilihat signifikansinya apakah H_0 diterima atau ditolak. Jika H_0 ditolak artinya H_1 diterima, terdapat perbedaan kadar MDA ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 2 yang diberikan ekstrak dalam berbagai dosis, metformin, dan yang tidak mendapat perlakuan. Jika menolak H_0 dilanjutkan dengan analisis *post hoc* untuk mengetahui dasar penolakan tersebut melalui pencarian letak perbedaan.