

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* laboratorik pada hewan coba tikus jantan strain wistar dengan menggunakan desain penelitian *control group post test design* (Notoatmodjo, 2005). Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen.

4.2 Hewan Coba

Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus jantan tikus jantan (*Rattus norvegicus* strain Wistar) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan yaitu:

Kelompok I = Kontrol Negatif (tikus yang tidak diberikan diet atherogenik dan tidak diberikan bubuk daun katuk)

Kelompok II = Kontrol Positif (tikus yang diberikan diet atherogenik tanpa bubuk daun katuk dalam pakan)

Kelompok III = Diet aterogenik+ bubuk daun katuk dosis 1 dalam pakan

Kelompok IV = Diet aterogenik+ bubuk daun katuk dosis 2 dalam pakan

Kelompok V = Diet aterogenik+ bubuk daun katuk dosis 3 dalam pakan

Jumlah sampel yang dibutuhkan berdasarkan jumlah ulangan (replikasi).

Jumlah ulangan telah cukup baik bila memenuhi persamaan :

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

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

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

$$(r-1) 4 \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \approx 5 \text{ ekor}$$

dimana t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Dari rumus tersebut diperoleh jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan adalah lebih besar sama dengan 5. Sebagai cadangan, 1 ekor tikus ditambahkan pada setiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi kemungkinan yang tidak diinginkan seperti kematian, kegagalan pengambilan sampel, kehilangan dan lain-lain sehingga total sampel adalah 30 ekor hewan coba.

4.2.2 Satuan Percobaan

Masing-masing perlakuan memerlukan 6 sampel sehingga total sampel adalah 30 ekor satuan percobaan.

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus putih (*Rattus novvergicus* strain wistar)
- Umur \pm 2 bulan
- Berat badan \pm 200 gr
- Jenis kelamin jantan
- Bulu putih dan halus.
- Tikus dengan gerak aktif (dalam keadaan sehat selama penelitian)
- Tidak mempunyai kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- Tikus yang kondisinya menurun/ mati selama penelitian berlangsung.

4.3 Teknik Randomisasi

Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) mengingat satuan percobaan yang digunakan adalah homogen dan semua faktor luar dapat dikendalikan oleh peneliti (Setiawan, 2009). Pada rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol. Pengambilan sampel dilakukan pengacakan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Memberikan nomer urut 1 – 30 pada tikus.
2. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus. Umumnya menggunakan 3 angka acak.

3. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas (*Independent*)

Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah pemberian bubuk daun katuk dalam pakan.

4.4.2. Variabel Tidak Bebas (*Dependent*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar SOD jaringan hati tikus wistar jantan.

4.4.3. Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini, yaitu : jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal, pemberian diet atherogenik, kondisi lingkungan kandang, dan pemberian bubuk daun katuk dalam pakan.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Eksperimen ini dilaksanakan sekitar 2 bulan di dua tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium diet dan penyelenggaraan makanan Universitas Brawijaya sebagai tempat penimbangan dosis bubuk daun katuk

2. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus, pengambilan dan penyediaan jaringan hati tikus.
3. Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat uji variabel kadar Superoksida Dismutase (SOD)

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1. Alat Penelitian

Tabel 4.1. Alat Penelitian

Proses	Alat Yang Diperlukan
Pemeliharaan Binatang Coba	Kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air diletakkan dalam kandang dari kotak plastik.
Pembuatan Ransum Makanan Binatang Coba	Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur
Penimbangan dosis bubuk daun katuk	Bubuk daun katuk, mangkuk plastik, sendok dan timbangan
Pengukuran Kadar SOD jaringan hati dengan Metode Spektrofotometri :	
Pengambilan sampel	<ul style="list-style-type: none"> - Jarum suntik 5 ml - Spuilit disposable - Kapas - Seperangkat alat bedah minor
Pengukuran kadar SOD	<ul style="list-style-type: none"> - Pipet - Tabung reaksi - Pemanas

	<ul style="list-style-type: none"> - Spektrofotometer - Sentrifuge
--	--

4.6.2 Bahan Penelitian

4.6.2.1 Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor per hari adalah 40 gram. Dalam penelitian ini terdapat dua macam pakan tikus yaitu diet aterogenik dan diet normal. Adapun komposisi pakan normal dan aterogenik akan dijelaskan sebagai berikut:

1. Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS dan tepung terigu perbandingan 2 : 1 dengan ditambahkan air secukupnya. Diet normal diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi diet normal adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2. Komposisi Diet Normal persaji (40 gram)

Komposisi	%	Jumlah
PARS	53%	21,2 gram
Terigu	23.5%	9,4 gram
Air	23,5%	9,4 MI

Sumber : Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya

Kandungan gizi diet normal dapat dilihat pada tabel 4.2 dibawah ini :

Tabel 4.3. Kandungan Zat Gizi Diet Normal persaji (40 gram)

Zat Gizi	Jumlah
Energi	104,9 kkal
Karbohidrat	19,06 gram
Lemak	0,93 gram
Protein	5,06 gram

2. Diet aterogenik diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi diet

aterogenik adalah sebagai berikut:

Tabel 4.4. Komposisi Diet Aterogenik persaji (40 gram)

Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
PARS	50	20
Terigu	25	10
Kuning telur bebek	5	2
Lemak kambing	10	4
Minyak kelapa	1	0.4
Minyak babi	8.9	3.55
Asam kolat	0.1	0.05
TOTAL	100	40

Sumber : Hrapkiewicz, *et al.*, 2007 ; Sacher, *et al.*, 2000

Kandungan zat gizi diet aterogenik dapat dilihat pada tabel 4.5 di bawah ini:

Tabel 4.5. Kandungan Zat Gizi Diet Aterogenik persaji (40 gram)

Zat Gizi	Jumlah
Energi	182,76 kkal
Karbohidrat	18,816 gram
Lemak	9,59 gram
Protein	5,24 gram

4.6.2.2 Bubuk daun katuk

Bubuk daun katuk akan diberikan kepada tikus percobaan selama 60 hari.

Perhitungan dosis:

Rata-rata berat badan manusia dewasa = 70 kg = 70.000 gram

Rata-rata berat badan tikus = 0,2 kg = 200 gram

Kebutuhan optimal fitosterol pada manusia = 2 – 3 g/hari

Berdasarkan tabel konversi dosis *Laurence dan Bacharach* (1984), diketahui indeks konversi dosis dari manusia (dengan berat badan 70 kg) ke tikus (dengan berat badan 200 gram) adalah sebesar 0,018 kali dosis pada manusia maka diperoleh dosis untuk tikus :

$$3 \text{ g/hari} \times 0,018 = 0,054 \text{ g/hari}$$

Dalam 100 g bubuk daun katuk mengandung 2,43 gram fitosterol sehingga perhitungan dosis yang diberikan untuk tikus dengan BB 200 gram:

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{kebutuhan fitosterol tikus}}{\text{kandungan fitosterol dalam bubuk daun katuk}} \times 100 \text{ g} \\ &= \frac{0,054 \text{ g}}{2,43 \text{ g}} \times 100 \text{ g} \\ &= 2,22 \text{ g/hari} \end{aligned}$$

Jika dipersentase ke pakan tikus 40 g, maka dosis 2,22 g adalah 5,56 % dari pakan sehingga dibulatkan menjadi 6%.

Jika 6 % dianggap sebagai dosis standar (dosis n), maka dalam penelitian ini menggunakan deret ukur n, 1½n dan 2n. Sehingga, dosis bubuk daun katuk yang digunakan:

dosis 1	Standar (n)	= 6%	= 2,4 g/hari
dosis 2	1½n	= 9%	= 3,6 g/hari
dosis 3	2n	= 12%	= 4,8 g/hari

4.6.2.3 Bahan Pemeriksaan Kadar SOD Jaringan Hati

Buffer Phosphat, H₂O, Xantin, Xantin Oksidase, NBT (nitroblue tetrazolium), *Etilen Diamin Tetraasetic Acid* (EDTA) dan jaringan hati tikus sampel yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya.

4.7 Definisi Istilah/Operasional

4.7.1. Diet Aterogenik

Diet yang digunakan untuk meningkatkan radikal bebas dalam tubuh tikus dengan kandungan berupa pakan ayam/PARS 55%, tepung terigu 28%, kuning telur 6%, lemak kambing 10%, minyak kelapa 1%, minyak babi 5%, asam kolat 0,2%, air secukupnya (Muwarni, *dkk.*, 2006)

4.7.2. Bubuk Daun Katuk

Bubuk daun katuk yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katuk yang diperoleh dari Materia Medika, Kota Batu dan dilakukan penimbangan dosis bubuk di laboratorium diet dan penyelenggaraan makanan Universitas Brawijaya.

4.7.3. Superoksida Dismutase

Antioksidan enzimatik yang ditentukan dengan mengukur kadar SOD jaringan hati dengan menggunakan spektrofotometer. Satuannya yaitu ng/mL.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1. Adaptasi

- a. Di awal penelitian semua tikus ditimbang berat badannya. Setelah itu randomisasi dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilakukan agar setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol
- b. Selama masa adaptasi 7 hari semua kelompok tikus diadaptasikan dan diberi pakan standar (normal) yang terdiri dari comfeed PARS, tepung

terigu, dan air. Masing-masing tikus mendapatkan 40 gram dari campuran bahan tersebut. Pemberian pakan tikus dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

- c. Sebelum perlakuan, berat badan tikus ditimbang, yaitu pada awal dan akhir masa adaptasi sehingga dapat dipantau berat badan tikus.

4.8.2. Pemeliharaan Tikus

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan dilakukan randomisasi dengan RAL :

- a. Kelompok I sebagai kontrol negatif, yaitu kelompok yang diberi pakan normal saja
- b. Kelompok II sebagai kontrol positif, yaitu kelompok yang diberi diet aterogenik saja
- c. Kelompok III, yaitu kelompok yang diberi diet aterogenik + bubuk daun katuk dosis 2,4 gr/hari dalam pakan
- d. Kelompok IV diberi diet aterogenik + bubuk daun katuk dengan dosis 3,6 gr/hari dalam pakan
- e. Kelompok V diberi diet aterogenik + bubuk daun katuk dosis 4,8 gr/hari dalam pakan

Pemberian bubuk daun katuk dicampur langsung dengan pakan tikus dimana bubuk daun katuk dimasukkan sebagai salah satu komposisi pakan tikus.

Pakan aterogenik diberikan selama 60 Hari agar dapat meningkatkan kadar kolesterol darah dan menginduksi terbentuknya sel busa secara bermakna (Muwarni, *dkk.*, 2006). Terbentuknya sel busa ini merupakan awal terjadinya aterosklerosis yang selanjutnya dapat memicu terjadinya penyakit metabolik salah

satunya perlemakan hati (Watanabe, 2008). Dilakukan penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari untuk mengetahui intake makanan tikus dan penimbangan berat badan tikus setiap minggu untuk mengetahui perkembangan berat badan tikus. Sedangkan pergantian sekam 2 kali setiap 1 minggu.

4.8.3. Pengumpulan dan Penyimpanan sampel

Pada akhir penelitian, tikus dipuasakan semalaman. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dibius menggunakan ether perinhalasi. Kemudian tikus dikorbankan dengan cara dikapitasi kemudian organ hatinya diambil.

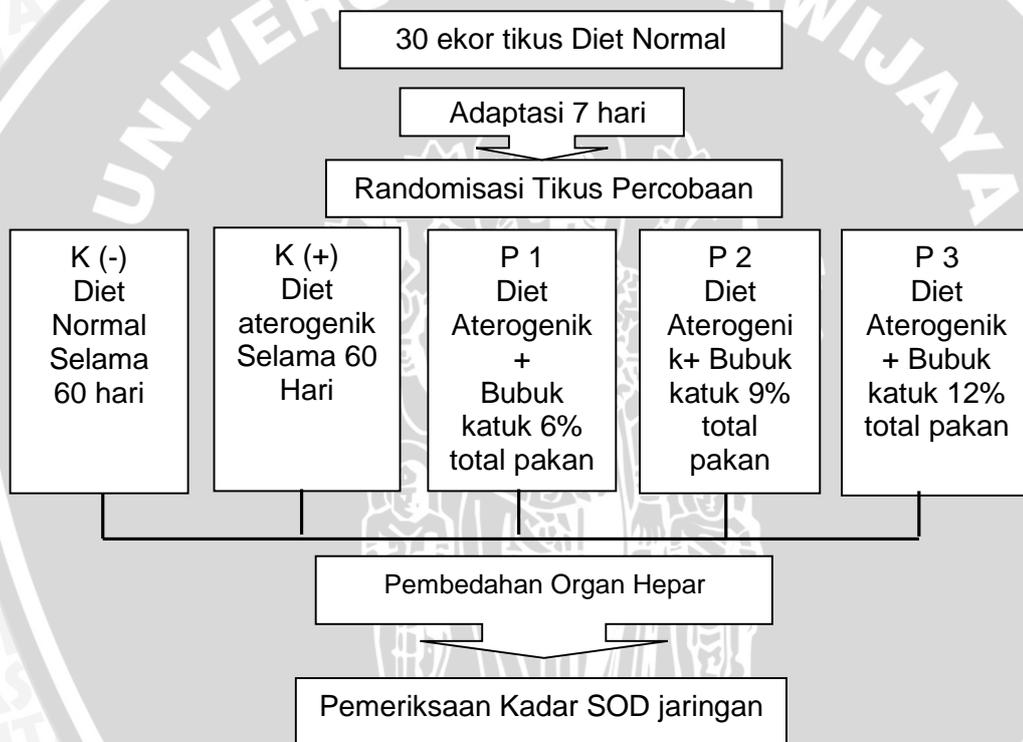
4.8.4. Pemeriksaan Kadar SOD Jaringan Hati dengan Spektrofotometer

- a) Preparasi Jaringan Hati Tikus sebanyak 100 mg per sampel.
- b) Buat homogenat dengan 1 cc buffer phosphat pH 7,4 agar sampel lebih halus bisa dilakukan penggerusan dahulu.
- c) Lakukan sonikasi (pembersihan untuk menghilangkan partikel-partikel pengotor) selama 1 menit diatas es.
- d) Masukkan tabung reaksi (ependorf) 15 cc.
- e) Sentrifuge (pemisahan partikulat padat dari cairan) 4000 rpm dengan suhu 4⁰ C, selama 15 menit
- f) Diambil supernatant (bagian cair) dengan saring
- g) Selanjutnya dipakai sebagai sampel untuk memeriksa SOD.
- h) Kemudian Sampel SOD ditambah EDTA 100 mM 100 μ L, ditambah NBT 25 unit 100 μ L, ditambah Xantin 25 unit 100 μ L, ditambah

Xantin Oksidase 1 unit μL , ditambah buffer vortex 500 μL , ditambah PBS menjadi 1 mL

- i) Inkubasi suhu 39°C selama 60 menit.
- j) Masukkan tabung ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm, sehingga hasil kadar SOD dapat terbaca

4.9 Bagan Alur penelitian



4.10 Analisis Data

Data hasil perhitungan kadar SOD masing masing kelompok dilihat reratanya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian di analisis secara deskriptif. Data kadar SOD jaringan hepar yang telah di kumpulkan diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut di lakukan uji statistik dengan

menggunakan SPSS 17.0 for Windows. Apabila dari uji *Oneway ANOVA* terdapat hubungan, maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Tukey* untuk mengetahui letak perbedaan dari perlakuan yang diberikan. Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95% dengan $\alpha = 0,05$. Hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$.

