

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode *true eksperimental Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian antosianin dari *Ipomoea batatas L.* varietas ungu terhadap efek toksisitas subkronik pada fungsi ginjal tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina yang diberi diet normal. Penelitian ini menggunakan randomisasi untuk pemilihan sampel. Metode yang digunakan adalah rancangan acak lengkap karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Setiap hari tikus diberi makan diet normal dan antosianin dalam berbagai dosis untuk kelompok perlakuan, sedangkan untuk kelompok kontrol diberi makan diet normal dan disonde dengan sterile water. Setelah hari ke 90 akan dilakukan pengukuran kadar ureum dan kreatinin dalam serum, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan berbagai dosis antosianin, untuk mengetahui pengaruh antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu cultivar Gunung Kawi terhadap efek toksisitas subkronik pada fungsi ginjal.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus jantan dan betina jenis *Rattus Norvegicus Wistar*.

4.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan, maka jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus $p(n-1) \geq 15$ dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan. Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%.

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 4 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 5 (Solimun, 2001).

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel sebanyak 5 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 40 ekor tikus dengan perincian sebagai berikut:

Kelompok	Perlakuan	Jumlah Tikus Jantan	Jumlah Tikus Betina
Kontrol	Diet normal + sterile water	5	5
antosianin dosis I	Diet normal + antosianin 10 mg/kgBB	5	5
antosianin dosis II	Diet normal + antosianin 20 mg/kgBB	5	5
antosianin dosis III	Diet normal + antosianin 80 mg/kgBB	5	5

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar berjenis kelamin jantan dan betina
- b. Umur 2 bulan
- c. Berat badan dalam rentang maksimal $\pm 20\%$ dari berat rata-rata dalam satu kelompok perlakuan
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomis

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian
- b. Tikus yang sakit dan mati selama masa perlakuan bukan karena efek toksisitas selama perlakuan

4.2.3.3 Kriteria Drop Out

Tikus dinyatakan *drop out* apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3 Lokasi dan waktu penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 90 hari, yaitu pada bulan September 2014 sampai Januari 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah antosianin dari ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar ureum dan kreatinin.

4.5 Definisi operasional

1. Antosianin diperoleh dari proses purifikasi ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu yang dilakukan oleh Dr. Ciptati MS, MSc, Laboratorium Kimia FMIPA ITB dengan menggunakan kromatografi kolom *flash* termodifikasi dengan fasa diam poliamida CC-6 dan fasa gerak air dan etanol.
2. Uji Toksisitas Subkronik dilakukan selama 90 hari berdasarkan *guideline* OECD 408.
3. Diet normal berupa pakan standard AIN yang terdiri tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, multivitamin 5 tablet, air 750 ml, dan pewarna (Handayani, 2012).
4. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan jumlah 20 berjenis kelamin jantan dan 20 berjenis kelamin betina, usia 2 bulan.
5. Pembedahan tikus setelah 90 hari dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan eutanasia menggunakan ketamine.
6. Kadar ureum dan kreatinin diukur dengan metode kolorimetri.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

- Kandang untuk pemeliharaan tikus beserta tempat minum. Kandang berasal dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, anyaman kawat tutup kandang sebagai tempat menaruh pakan.
- Alat untuk membuat pakan tikus: *Doughmaker (mixer)*, kompor, lemari es, baskom plastik, timbangan, sarung tangan, pengaduk, gelas ukur, wadah plastik.
- Alat untuk penyondean : sonde dan botol ekstrak antosianin
- Alat untuk mengencerkan ekstrak antosianin: timbangan mikro Chyo, botol untuk penyimpanan, sendok timbang, dan Vortex.
- Alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah: peralatan untuk bedah (*scalpel*, pinset, gunting, jarum pentul, cawan petri), kapas, spuit *disposable* 10 ml, tabung penyimpanan sampel, dan tabung sentrifugasi.
- Alat pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin menggunakan alat spektrofotometer

4.6.2 Bahan Penelitian

- Bahan untuk pemeliharaan tikus: air dan sekam yang disediakan dari Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Bahan untuk diet normal terdiri dari tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, multivitamin 5 tablet, air 750 ml, dan pewarna. (Handayani, 2012)

- Bahan untuk mengencerkan ekstrak antosianin: ekstrak antosianin, *sterile water*, dan *aluminium foil*.
- Bahan untuk pembedahan: ketamine
- Antosianin *Ipomoea batatas* varietas ungu dengan konsentrasi 10 mg/kgBB tikus, 20 mg/kgBB tikus, 80 mg/kgBB tikus (Fan *et al*, 2012)
- Bahan yang diperlukan untuk pengukuran ureum adalah enzim *glutamate dehydrogenase* sebagai reagen
- Bahan yang diperlukan untuk pengukuran kreatinin adalah *alkaline picrate* sebagai reagen

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan mempersiapkan alat dan bahan penelitian yang akan digunakan dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi. Tikus sebelumnya diaklimatisasi selama 2 minggu dengan diberi diet normal. Diet diberikan setiap hari sebanyak 30 gram/ ekor tikus/ hari. Sisa pakan kemudian diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/ kelompok/ hari.

4.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Tikus dibagi menjadi 4 kelompok:

1. Kelompok 1: Kelompok tikus kontrol dengan diberi diet normal dan disonde *sterile water* selama 90 hari.
2. Kelompok 2: Kelompok tikus yang diberi diet normal dan disonde ekstrak antosianin 10 mg/kg berat badan selama 90 hari.

3. Kelompok 3: Kelompok tikus yang diberi diet normal dan disonde ekstrak antosianin 20 mg/kg berat badan selama 90 hari.
4. Kelompok 4: Kelompok tikus yang diberi diet normal dan disonde ekstrak antosianin 80 mg/kg berat badan selama 90 hari.

Dosis ini ditentukan berdasarkan penelitian tentang efek ekstrak antosianin terhadap foam cell tikus pada penelitian Maharani et al pada 2014 dan dimodifikasi berdasarkan *guideline* OECD 408 tahun 1998. Pada penelitian uji toksisitas subkronik antosianin ini, dosis antosianin yang diberikan kepada tikus wistar mulai dari dosis 10 mg/kgBB karena dosis ini merupakan dosis yang paling optimal dalam penelitian tentang efek ekstrak antosianin terhadap foam cell tikus pada penelitian Maharani *et al.* pada 2014 dan dosis berikutnya 20 mg/kgBB dan 80 mg/kgBB merupakan lipat dua dan lipat empat dari dosis optimal penelitian sebelumnya yang penentuannya berdasarkan *guideline* OECD 408 ayat 13 tahun 1998. Antosianin diberikan peroral dengan menggunakan sonde. Sonde antosianin diberikan setiap hari selama 90 hari. Diet sebanyak 30 gram/tikus/hari diberikan setiap hari. Sisa pakan kemudian diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari.

4.7.3 Pembuatan Antosianin dari Ubi Jalar Varietas Ungu (*Ipomoea batatas L.*)

Antosianin dari ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu dipurifikasi oleh dari Dr. Ciptati MS, MSc Laboratorium Kimia FMIPA ITB. Proses pemisahan dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom *flash* termodifikasi dengan fasa diam poliamida CC-6 dan fasa gerak air dan etanol.

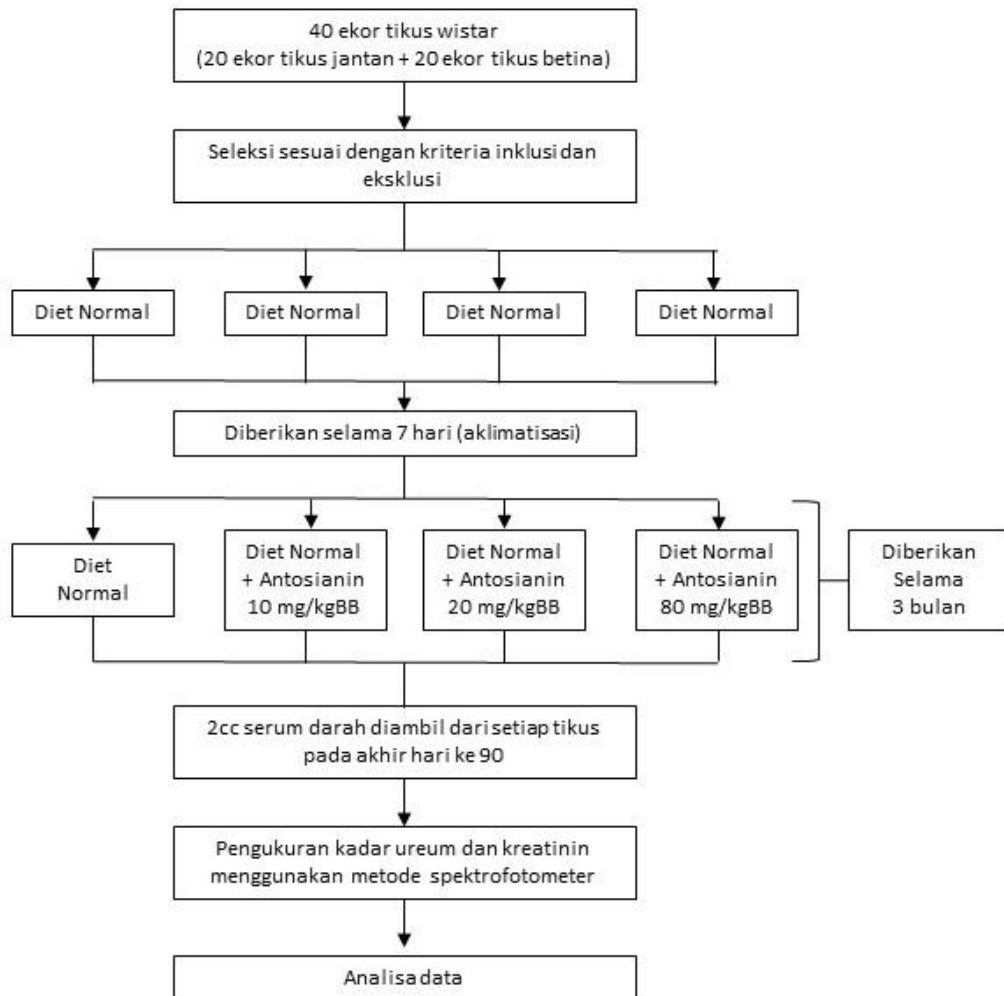
4.7.4 Bahan Diet yang Diberikan pada Tikus

Bahan untuk diet normal terdiri dari tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, multivitamin 5 tablet, air 750 ml, dan pewarna. (Handayani, 2012).

4.7.5 Pengambilan sampel

Pada akhir hari ke 90 dilakukan pembedahan pada tikus. Sebelumnya tikus dieutanasia menggunakan *ketamine* dengan dosis 0,1 mg/kgBB. Setelah itu tikus dibedah, lalu diambil darahnya sebanyak 2cc dari jantung.

4.7.6 Bagan Alur Penelitian



4.8 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$. Kemudian semua data dianalisis dengan statistik parametrik menggunakan *One-way* ANOVA setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p > 0,05$). Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p = 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui perbedaan dan hubungan tiap kelompok. Analisa data menggunakan program SPSS dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.

