

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan rancangan *post test only control group design*.

### 4.2 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus jantan dan betina yaitu jenis *Rattus Novergicus strain Wistar* sejumlah 40 ekor.

### 4.3 Sampel dan Metode Pengambilan Sampel

#### 4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan adalah tikus percobaan yang berjumlah 40 ekor, dengan kriteria sampel sebagai berikut :

- Tikus jenis *Rattus norvegicus Strain Wistar*
- Umur 6-8 minggu
- Berat 150-200gram
- Warna bulu putih
- Tikus aktif

Kriteria eksklusi :

- Tikus yang tidak mau makan
- Tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati

#### 4.3.2 Besar Sampel

Penentuan besar sampel pada penelitian ini menggunakan rumus (Solimun, 2001) :

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

p = jumlah perlakuan

q = jumlah sampel

Sehingga jumlah sampel untuk satu kelompok perlakuan adalah :

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

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

$$(n-1) \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

Dan hasil perhitungan di atas, dalam satu kelompok diperlukan 5 tikus jantan dan 5 tikus betina, sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 40 tikus dengan perincian sebagai berikut :

**Tabel 4.1 Pengelompokan Sampel**

Kelompok	Macam Diet dan Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol	Diet normal + sonde <i>sterile water</i> (NS)	10
Dosis 10mg/kgBB	Diet normal + sonde antosianin 10mg/kgBB	10
Dosis 20mg/kgBB	Diet normal + sonde antosianin 20mg/kgBB	10
Dosis 80mg/kgBB	Diet normal + sonde antosianin 80mg/kgBB	10

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

##### 4.4.2 Waktu penelitian

Penelitian pada binatang dilakukan pada bulan September 2014 sampai dengan Januari 2015. Kemudian dilakukan pemeriksaan variabel sampai dengan Januari 2015.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel bebas

Variable bebas pada penelitian ini adalah :

- Antosianin dari ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu berbagai dosis.
- Kelompok kontrol
- Kelompok dosis (terbagi 3 : 10mg/kgBB, 20mg/kgBB, 80mg/kgBB)

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah *intake* makan, berat badan dan *visceral fat*.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Antosianin dari ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu dipurifikasi oleh Dr.Ciptati MS,MSc dari Laboratorium Kimia FMIPA ITB.
2. Hewan coba yang akan digunakan adalah tikus jantan dan betina galur wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus diperoleh dari Laboratorium Fisiologi fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, berusia 1.5-2 bulan dengan berat badan 150-200 gram.
3. Diet normal berupa pakan standar sesuai AIN 93-G yang telah dimodifikasi menurut Reeves dan Handayani dengan komposisi total kandungan karbohidrat 61%, lemak 4%, protein 13% dan mineral, vitamin, air 22%.
4. *Visceral fat* merupakan jaringan adiposa yang terdapat di perirenal dan peri-epididimal. (Gerbaix M, 2010)
5. Uji toksisitas subkronis merupakan pemberian suatu senyawa dengan dosis berulang pada hewan uji tertentu secara teratur dan berulang-ulang melalui satu rute atau lebih selama periode 90 hari atau kurang dari 3 bulan. (Donatus, 2011)

#### 4.7 Instrumen Penelitian

##### 4.7.1 Alat

- a. Kandang untuk pemeliharaan tikus beserta tempat makan dan minum, gelas ukur 100ml.
- b. Alat untuk membuat pakan tikus:
  - timbangan analitik,

- baskom,
  - mixer,
  - kompor listrik,
  - lemari es,
  - panci,
  - pengaduk,
  - sendok,
  - gelas ukur,
  - plastik
  - wadah kedap air,
  - staples
  - mortar & alu
- c. Alat untuk melakukan penyondean
- sonde 5ml
  - 3 tabung gelas untuk masing2 dosis antosianin
- d. Alat pengenceran antosianin
- kalkulator
  - mikro pipet
  - vortex
  - sendok timbang
  - kertas aluminium
  - timbangan (*Chyo*)

#### 4.7.2 Bahan

- a. Bahan pembuatan pakan

Diet normal yang digunakan adalah AIN.

Komposisi untuk 1 kg pakan AIN adalah sebagai berikut :

- |                          |          |
|--------------------------|----------|
| • Tepung jagung          | 615 gram |
| • Gula pasir             | 85 gram  |
| • Soya oil               | 45 gram  |
| • Gelatin                | 65 gram  |
| • Kasein                 | 90 gram  |
| • CMC                    | 51 gram  |
| • Multivitamin & mineral | 5 butir  |

- Air 750mL
- Pewarna makanan 30 tetes

Untuk perlakuan pada setiap hewan coba, penelitian ini menggunakan antosianin dari ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu. Konsentrasi yang digunakan adalah 10 mg, 20 mg dan 80 mg.

b. Bahan penyondean

- Antosianin dosis 10 mg/kgBB, 20 mg/kgBB dan 80 mg/kgBB
- *Sterile water*

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi perlu dilakukan selama 5-7 hari pertama agar tikus dapat beradaptasi dengan baik dengan makanan dan lingkungan yg baru. Selama aklimatisasi tikus diberi diet normal, ditimbang sisa pakannya, diganti air minumnya, dan juga diganti sekamnya setiap 3 hari sekali.

##### 4.8.2 Pembuatan antosianin

Antosianin diproduksi di Laboratorium kimia Fakultas MIPA Institut Teknologi Bandung oleh DR. Ciptati MS,MSc.

##### 4.8.3 Pengenceran antosianin

Antosianin diencerkan setiap 3-4 hari sekali dan disimpan dalam lemari es agar tidak rusak.

Prosedur pengenceran antosianin adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan kalkulator, mikro pipet, vortex, tabung, timbangan (*Chyo*), sendok timbang, kertas alumunium, sterile water dan ekstrak antosianin.
- Menghitung dosis yg diberikan kepada tikus berdasarkan berat badannya dengan kalkulator.
  - Menghitung dosis antosianin untuk tiap tikus sesuai dosis kelompoknya (10,20,80 mg/kgBB)
  - Menghitung jumlah dosis antosianin untuk 1 hari, kemudian dikalikan dengan jumlah hari yang diinginkan (tidak boleh lebih dari 6 hari) , 3/4 hari

- Menghitung molaritas larutan antosianin yang akan disondekan dengan rumus

$$M = \frac{\sum x a}{(a \times 20 \text{ mL}) + 10 \text{ mL}}$$

M = Molaritas

a = Jumlah hari yang diinginkan

$\sum$  = Jumlah dosis antosianin untuk 1 hari

- Mengambil ekstrak antosianin dengan sendok timbang dan meletakkan di atas kertas alumunium hingga sesuai dengan berat yg dibutuhkan.
- Memindahkan ekstrak antosianin yg telah dihitung ke dalam tabung
- Menuangkan 60mL (untuk 3 hari) atau 80 mL (untuk 4 hari) sterile water ke dalam tabung besar
- Mengisi masing-masing tabung yg berisi ekstrak antosianin dengan 2 mL *sterile water* yg dipindahkan dengan mikro pipet.
- Mencampurkan larutan ekstrak antosianin dan sterile water dengan menggunakan *vortex* sampai tercampur merata dan tidak ada gumpalan ekstrak antosianin.

#### 4.8.4 Pembuatan pakan AIN (Reeves, P.G. 1997 , Handayani, D.2012)

Prosedur pembuatan :

- Mencampur tepung jagung 615 gram dengan gula pasir 85 gram, *soya oil* 45 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram dan multivitamin & mineral yg telah dihaluskan.
- Memanaskan larutan gelatin 65 gram dengan air 500 mL hingga tercampur merata dan mendidih di atas kompor dengan api kecil sembari diaduk.
- Mencampurkan larutan gelatin dengan campuran tepung lalu diaduk hingga kalis dengan *mixer* kecepatan 2.
- Menambahkan air 250 mL yg telah dididihkan sambil terus diaduk.
- Menambahkan pewarna makanan 30 tetes, lalu diratakan dengan tangan.

- f. Meletakkan pakan normal ke kotak tertutup (sambil diratakan permukaannya) lalu dimasukkan ke dalam *freezer* minimal 30 menit.
- g. Setelah dingin, pakan dibentuk kotak-kotak dengan berat masing-masing 30 gram.
- h. Mengemas pakan AIN ke dalam plastik dengan jumlah sesuai jumlah tikus kemudian disteple.
- i. Meletakkan bungkus pakan AIN ke dalam *freezer*.

#### 4.8.5 Pemberian pakan tikus

Pakan AIN diberikan setiap hari sejumlah 30 gr/ekor tikus pada siang hari pukul 12.00-14.00. Sisa pakan diambil dan ditimbang setelah 24 jam. Hasilnya kemudian dihitung sebagai rata-rata asupan pakan harian tikus/kelompok/hari.

Prosedur pemberian pakan normal :

- Mengeluarkan pakan yang telah dibuat dan disimpan di dalam lemari es agar tidak terlalu dingin
- Membagikan pakan ke setiap kandang tikus (diatas kandang, agak ditekan agar tidak menggelinding/jatuh)

#### 4.8.6 Penimbangan pakan tikus

Sisa pakan tikus diambil dan ditimbang setiap hari kemudian dihitung *intake* pakannya (gram).

Prosedur penimbangan sisa pakan :

- Mengambil sisa pakan dari kandang tikus
- Meletakkan sisa pakan diatas timbangan
- Membaca & mencatat berat sisa pakan yang tertera di timbangan

#### 4.8.7 Pemberian antosianin

Antosianin diberikan per sonde satu kali per hari sebanyak 3 dosis untuk 3 kelompok perlakuan yaitu 10 mg/kgBB/hari, 20 mg/kgBB/hari dan 80 mg/kgBB/hari.

Prosedur pemberian atosianin dengan menggunakan sonde :

- Mengeluarkan kandang tikus yg akan dipapar antosianin
- Mempersiapkan alat sonde dan larutan antosianin

- Memasukkan larutan antosianin ke dalam alat sonde sesuai dengan dosis yg telah dihitung
- Mengeluarkan tikus dari dalam kandang
- Memegang tikus dengan tangan kiri pada daerah tengkuk sambil agak ditekan ke lantai, lalu membalik tikus, menjepit bagian ekor dengan jari kelingking agar posisi tikus terfiksasi dan mulut terbuka
- Memasukkan sonde dengan arah tegak lurus secara perlahan hingga seluruh panjang jarum sonde masuk sampai ke lambung
- Menginjeksikan antosianin sesuai dengan dosis ke dalam lambung tikus
- Mengeluarkan sonde dari mulut tikus
- Mengembalikan tikus ke dalam kandang

#### 4.8.8 Penimbangan berat badan tikus

Berat badan tikus ditimbang minimal 2x dalam seminggu.

Prosedur penimbangan berat badan tikus :

- Mengeluarkan tikus yang akan ditimbang dari kandang
- Menyiapkan timbangan, tempat tikus untuk ditimbang, kain pembungkus tikus. Berat tempat dan kain dinetralkan
- Meletakkan tikus diatas kain, kemudian diletakkan di tempat timbangan
- Membaca berat yang tertera di timbangan. Nilai berat badan diambil dari nilai yang paling stabil
- Mencatat berat badan tikus

#### 4.8.9 Penggantian sekam

Setiap 3 hari sekali kandang tikus dibersihkan dan diganti sekamnya agar kandangnya tidak bau dan tikus tetap hangat .

Metode penggantian sekam :

- Mengeluarkan semua kandang tikus yang akan dibersihkan dan diganti sekamnya

- Mempersiapkan beberapa kandang sementara untuk penempatan tikus yang kandangnya dicuci dan sekamnya diganti
- Membuang sekam yang kotor, kemudian mencuci kandang dengan menggunakan spons dan sabun
- Mengeringkan kandang dengan menggunakan kanebo
- Mengisi kandang bersih dengan sekam baru
- Memindahkan tikus dari kandang sementara ke kandang semula

#### 4.8.10 Persiapan Pembedahan

- Tikus telah dipuaskan 24 jam sebelum pembedahan
- Menimbang berat badan tikus yang akan dibedah
- Mencatat berat badan tikus di tabel yang tersedia
- Memindahkan tikus dari *animal room* ke laboratorium faal FKUB
- Menyiapkan botol-botol organ berisi formalin 10% yang telah diberi label nama

#### 4.9.11 Pembedahan

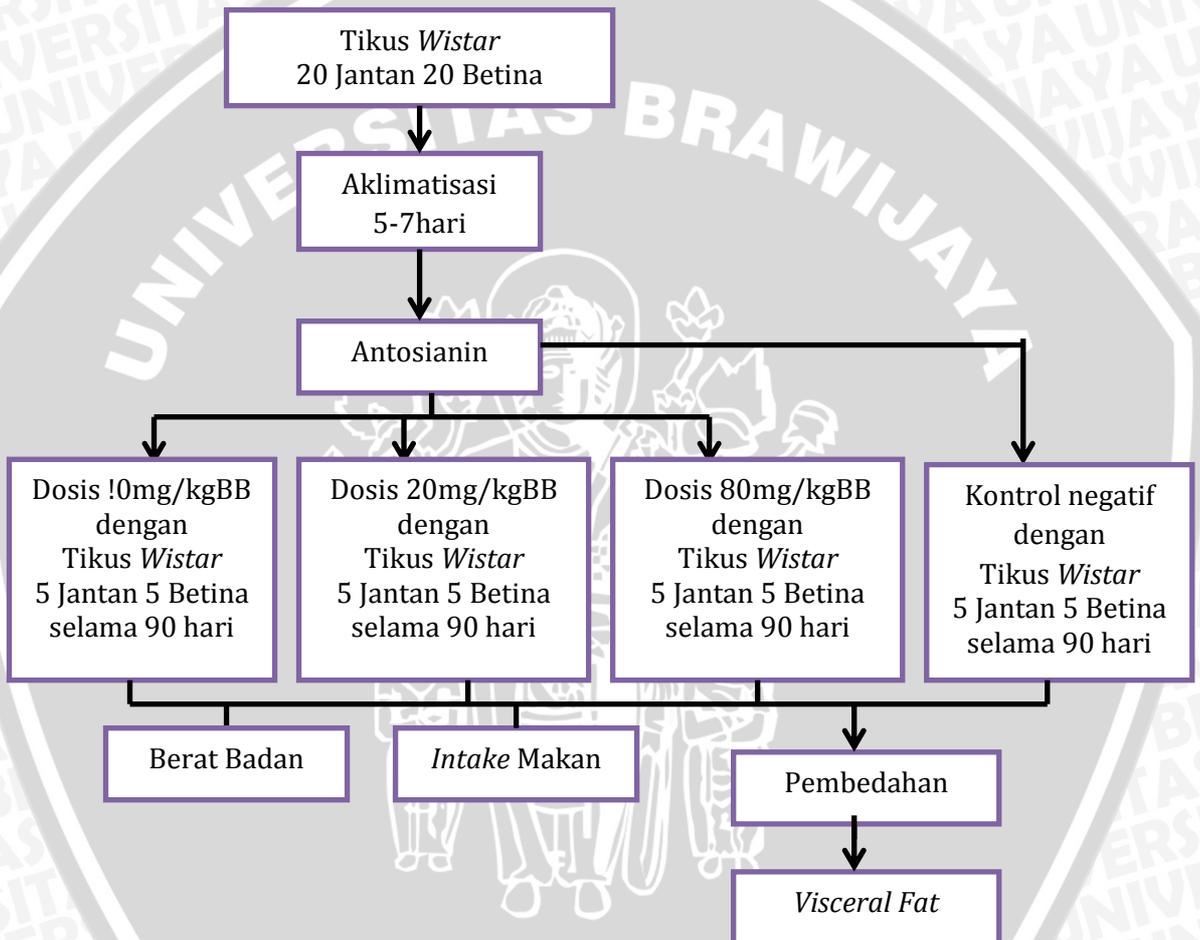
- Tikus diinjeksikan *ketamine* secara *intramuscular* dengan dosis sesuai berat badan rata-rata kelompok dosis.
- Memfiksasi tikus pada papan bedah dengan menusukkan jarum pada keempat ekstremitas tikus
- Mengiris tikus dengan pisau di bagian perut hingga dada
- Mengambil *visceral fat*
- Memasukkan organ-organ ke dalam tabung organ berisi formalin 10%

### 4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan *one way ANOVA*. Uji *one way ANOVA* digunakan untuk menguji hipotesis-hipotesis komparatif lebih dari dua sampel. Data hasil penelitian disajikan dalam mean  $\pm$ SD. Kemudian semua Data diolah dengan menggunakan program *Statistical Product Service Solution*

(SPSS) for Windows versi 21, setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Syarat data untuk dapat diuji kemaknaan dengan uji ANOVA adalah distribusi data normal ( $p > 0.05$ ) dan varians data homogen ( $p > 0.05$ ).

#### 4.10 Prosedur Penelitian Uji Toksisitas Sub Kronik



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

### 4.11 Jadwal Penelitian

JADWAL PENELITIAN UJI TOKSISITAS ANTOSIANIN SUBKRONIK																																
Bulan	Tanggal Penelitian																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
September																																
Oktober																																
November																																
Desember																																
Januari																																

Keterangan:

- : Aklimatisasi tikus dengan pakan AIN diet normal
- : Pemberian antosianin pada kelompok dosis 10 mg, dosis 20 mg, dosis 80 mg
- : FOB (Functional Observational Battery)
- : Tikus dipuaskan
- : Euthanasia dan pengambilan sampel penelitian

Gambar 4.2 Jadwal Kegiatan

