

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain penelitian *randomized post test only control group*. Pengukuran variabel bebas hanya dilakukan pada akhir penelitian. Sehingga kelemahan desain penelitian ini adalah tidak dapat membandingkan kadar MDA serum sebelum dan sesudah perlakuan.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dan persiapan pengukuran kadar MDA serum tikus dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan pengukuran MDA melalui spektrofotometer dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan bulan Maret hingga bulan Juni 2015.

4.3 Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar. Hewan uji yang dipakai adalah tikus Wistar jantan, berusia 2 bulan, berat badan 150-170 gram, dan tingkah laku normal. Hewan uji dalam penelitian ini dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Adapun keuntungan menggunakan hewan coba tikus wistar antara lain:

1. Mudah beradaptasi dengan lingkungan pemeliharaan
2. Tidak mudah muntah, karena memiliki pusat pengaturan muntah

4.4 Teknik Sampling

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian diambil secara *Purposive Sampling*, dengan restriksi sebagai berikut:

1. Jenis tikus : tikus Wistar
2. Umur tikus : 2 bulan
3. Berat badan tikus : 150-170 gram
4. Jenis kelamin : jantan

Dan dilanjutkan dengan *simple random sampling* untuk membagi subyek penelitian ke dalam kelompok berikut :

Kelompok N : Kelompok kontrol negatif (tikus normal)

Kelompok DM : Kelompok kontrol DM

Kelompok DK1 : Kelompok tikus DM dan diberi ekstrak daun kemiri dengan dosis 100mg/kgBB

Kelompok DK2 : Kelompok tikus DM dan diberi ekstrak daun kemiri dengan dosis 200mg/kgBB

Kelompok DK3 : Kelompok tikus DM dan diberi ekstrak daun kemiri dengan dosis 400mg/kgBB

4.5 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung dengan rumus $p(n-1) \geq 15$. Dengan p = jumlah perlakuan; n = jumlah pengulangan tiap perlakuan (Solimun, 2001). Jika dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan, maka besar sampel yang dapat digunakan :

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan rumus diatas, maka minimal ada 4 kali pengulangan dalam 1 kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor tikus setiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 4 ekor dikali 5 kelompok perlakuan yaitu 20 ekor tikus. Dan ditambahkan tikus cadangan sebanyak 2 ekor tikus/kelompok, karena tikus DM mudah mati.

4.6. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kemiri dalam variasi dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid serum tikus Wistar model DM tipe 2.

Variabel perancu (*confounding factors*) pada penelitian ini meliputi:

a. Dapat dikendalikan:

- 1) Berat badan tikus
- 2) Jenis kelamin tikus
- 3) Umur tikus
- 4) Makan dan minum tikus
- 5) Suhu ruangan
- 6) Stres terhadap lingkungan pemeliharaan
- 7) Ketelitian pengamatan

b. Tidak dapat dikendalikan:

- 1) Variasi genetik
- 2) Metabolisme tikus

4.7 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.7.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah:

- Tikus Wistar jantan
- Usia 2 bulan
- Berat tikus 150-170 gram
- Belum pernah diberi perlakuan
- Tampak sehat, aktif, tingkah laku normal, tidak cacat (Anantyo, 2009).

4.7.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang masuk dalam kriteria eksklusi, yaitu tikus yang tidak mau makan dan mati selama waktu penelitian.

4.8 Definisi Operasional

4.8.1 Tikus Model DM Tipe 2

Tikus model DM tipe 2 yang termasuk dalam penelitian ini adalah tikus yang diberi diet tinggi lemak dan diinduksi dengan streptozocin (STZ) intraperitoneal dengan *range* dosis 25-30mg/kgBB. Tiga hari setelah dilakukan injeksi STZ, dilakukan pengecekan gula darah acak dan gula darah puasa. Jika gula darah acak di dapatkan > 200 mg/dL, dan gula darah puasa didapatkan >140mg/dL, maka induksi DM pada tikus berhasil (Zhang *et al.*,2008). Namun bila 3 hari setelah injeksi STZ tidak terdiagnosis DM, maka perlu dilakukan injeksi STZ ulang dengan dosis yang sama. Tikus yang sudah berhasil diinduksi DM, maka selanjutnya diberi ekstrak daun kemiri peroral selama 28 hari.

4.8.2 Ekstrak daun kemiri

Ekstrak daun kemiri adalah hasil pembuatan ekstrak dari daun tua pohon kemiri yang didapatkan pada bulan Maret 2015 dari perkebunan kemiri Wonosalam, Jombang. Ekstrak ini dibuat secara maserasi, yaitu dikeringkan, dihaluskan, dan diberi pelarut etanol 90%. Ekstrak ini berbentuk pasta, dan diberikan menggunakan sonde lambung dengan dosis 100mg/kgBB untuk kelompok 3, 200mg/kgBB untuk kelompok 4, dan 400mg/kgBB untuk kelompok 5. Dosis ditentukan berdasarkan hasil eksplorasi dosis pada penelitian pendahuluan.

4.8.3 Kadar Malondialdehid Serum

Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel darah tikus diambil dari jantung menggunakan spuit 10 cc dan segera dimasukkan kedalam vacuotainer untuk selanjutnya dilakukan sentrifugasi. Setelah sentrifugasi (2500 rpm, 10 menit), kadar MDA serum diukur dengan metode TBARS dan spektrofotometer pada gelombang 532 nm (Jawi, 2008).

4.8.4 Induksi DM dengan Streptozotocin

Bahan yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 2 yaitu streptozotocin. Streptozotocin (STZ) digunakan dengan dosis 27,5mg/kgBB.

$$\text{Kebutuhan STZ} = \frac{\text{BB (g)} \times 27,5 \text{ mg}}{1000}$$

Untuk membuatnya menjadi larutan, maka perlu ditambahkan aquabides, dan ditambahkan 3 tetes asam sitrat hingga pH menjadi 4,4.

Lalu untuk mengetahui jumlah volume yang dapat diinjeksikan kepada tiap tikus, maka dapat digunakan rumus :

$$\text{Volume injeksi STZ} = ((\text{Kebutuhan STZ})/9) \times 0,5$$

4.8.5 Diagnosis DM pada Hewan Coba

Setelah diinduksi DM dengan menggunakan STZ intraperitoneal, maka perlu

ditunggu 3 hari untuk sebelumnya dicek kembali gula darah hewan coba. Untuk mengukur gula darah, digunakan sampel darah dari ekor tikus Wistar.

Induksi dikatakan berhasil, apabila 3 hari setelah induksi STZ, glukosa darah puasa tikus menunjukkan ≥ 140 mg/dL. Apabila belum mendapat tikus yang DM pada hari 3 setelah injeksi STZ, maka diulangi injeksi STZ dengan dosis yang sama, dan diulangi pengecekan gula darah di 3 hari setelahnya.

4.9 Alat Penelitian

4.9.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Alat-alat yang diperlukan untuk pemeliharaan tikus adalah kandang tikus 30 x 20 x 15 cm, kawat penutup kandang 35 x 25 cm, tempat minum, pinset, *glucometer digital* dan *stick Accu Check*, timbangan digital dan *handscoen*.

4.9.2 Alat Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun kemiri adalah oven, penggilingan/*blender*, labu dan evaporator.

4.9.3 Alat untuk pembedahan tikus

Alat yang digunakan untuk perlakuan terhadap hewan coba tikus, yaitu gunting steril, kasa, jarum pentul 4 buah untuk fiksasi kaki dan tangan tikus dan styrofoam 40 cm x 40 cm untuk alas membedah tikus.

4.9.4 Alat untuk Pengukuran kadar MDA serum

Alat-alat yang digunakan untuk membuat sediaan serum yang siap di ukur kadar MDA adalah mikropipet, vortex, pemanas, kuvet, dan spektrofotometer *double beam* 532 nm Shimadzu UV-1700 Pharma Spec.

4.10 Bahan Penelitian

4.10.1 Bahan pembuatan ekstrak daun kemiri

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun kemiri adalah daun kemiri, kertas whatman dan etanol 90%.

4.10.2 Bahan untuk Induksi DM hewan coba

Bahan yang digunakan untuk menginduksi DM pada hewan coba adalah STZ, aquabides, asam sitrat.

4.10.3 Bahan pemeliharaan hewan coba

Bahan yang digunakan untuk memelihara hewan coba adalah *glucose stick*, spuit 10 cc, air, *comfeed-PARS*, tepung terigu, telur bebek, minyak babi, minyak kambing, asam kolat.

4.10.4 Bahan untuk Pembedahan Tikus

Bahan yang digunakan untuk pembedahan adalah alkohol 70%, vacuotainer 5 mL, *spuit* 10 cc dan ketamin untuk euthanasia.

4.10.5 Bahan untuk Pemeriksaan MDA

Bahan yang digunakan untuk mengukur kadar MDA pada serum yaitu *TBA*, *TCA*, *HCl 1 N*, *Na-Thiobarbiturat 1%*, *microtube* dan *tissue*.

4.11 Prosedur Penelitian

4.11.1 Pemeliharaan Tikus

Tikus Wistar pada penelitian ini dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tikus ini dipelihara di kandang yang masing-masing berukuran 30 cm x 20 cm x 15 cm, dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air minum, dan sekam. Tikus pada penelitian ini dipelihara dengan 1 kandang untuk 1 ekor. Untuk menimbang berat badan tikus digunakan neraca Sartorius, dan untuk mengukur kadar gula darah menggunakan *glucometer* digital dengan strip.

Dalam pemeliharaan hewan coba ini, pakan untuk kelompok kontrol negatif terbuat dari *Comfeed-PARS 67%*, tepung terigu dan air secukupnya (Handayani dan Prijadi, 2007). Sedangkan untuk kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak yang komposisinya adalah asam kolat, telur bebek, minyak babi, minyak kambing, terigu dan air secukupnya. Setiap tikus diberi makan 40 gram/hari dan diberi minum dari air PDAM \pm 50 mL/hari.

4.11.2 Ekstrak Daun Kemiri

4.11.2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

Daun kemiri didapatkan pada bulan Maret 2015 dari perkebunan kemiri di Wonosalam, Jombang. Dipilih daun dari pohon tua, yaitu yang berbentuk lanset (tidak

menjari) dan panjang daun 15 cm.

Langkah pembuatan ekstrak yaitu daun segar dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan dalam suhu ruang (tidak terpapar sinar matahari langsung). Kemudian daun yang sudah kering dihaluskan dengan *blender*. Serbuk daun kemiri yang tidak segera digunakan dapat disimpan dalam *freezer*. Sebelum diekstrak, daun dipanaskan dalam *oven* dahulu pada suhu 60°C hingga benar-benar kering. Kemudian 100 gram serbuk daun kemiri ditambahkan dengan 1 liter etanol 90%, kemudian dikocok dan direndam selama 3 hari. Hasil rendaman disaring dengan kertas Whatman. Kemudian filtrat diletakkan pada labu yang disambung ke evaporator untuk menguapkan etanol. Setelah itu hasil ekstraksi diletakkan dalam oven 60°C semalam untuk proses penguapan etanol lebih lanjut. Diyakinkan bahwa tidak ada sedikitpun etanol dalam ekstrak dengan menimbang berat ekstrak secara berkala. Apabila berat sudah tidak berubah, maka etanol telah menguap sempurna. *Crude extract* yang sudah diuapkan etanolnya, diletakkan di cawan putih, dan kemudian ekstrak disimpan dalam botol dan disimpan dalam *freezer*.

4.11.3 Pembuatan dosis sonde

Pembuatan dosis sonde menyesuaikan dengan berat badan hewan percobaan yang diberi perlakuan (DK1, DK2, DK3). Berat badan hewan percobaan masing – masing dibuat dalam satuan kilogram dan dikalikan dengan dosis yang sudah ditentukan sesuai dengan kelompok perlakuan. Kelompok Perlakuan 3 (DK1): Berat badan tikus dalam kilogram dikalikan dengan dosis 100 mg/kgBB, kelompok Perlakuan 4 (DK2): Berat badan tikus dalam kilogram dikalikan dengan dosis 200 mg/kgBB, kelompok Perlakuan 5 (DK3): Berat badan tikus dalam kilogram dikalikan dengan dosis

400 mg/kgBB. Untuk keakuratan dosis, dilarutkan dalam aquabides sebanyak 1 cc/hari/tikus.

4.11.4 Pengambilan Sampel Darah dan Analisis MDA

Setelah tikus dianestesi menggunakan ketamin dengan dosis 40mg/kgBB secara intraperitoneal, tikus dibedah dengan menggunting bagian perut tengah bawah, merobek peritonealnya hingga thorax. Darah langsung diambil dari jantung melalui bagian apex sebanyak ± 6 mL dengan menggunakan *sput / disposable syringe* 10 mL. Setelah mendapatkan sampel darah, kemudian segera dipindah ke vacuotainer 5 mL. Kemudian darah disentrifugasi 2500 rpm selama 10 menit dan diambil serumnya menggunakan mikropipet dan dipindah ke tabung reaksi. Selanjutnya serum dicampur dengan *thiobarbituric acid* (TBA) reagen untuk kemudian dicampur hingga homogen. Lalu ditambahkan HCl 1N sebanyak 200 μ L dan dicampur hingga homogen. Dan kemudian ditambahkan asam Na-Thiobarbiturat sebanyak 100 μ L. Selanjutnya diinkubasi 30 menit dalam suhu 105°C diikuti dengan pendinginan dalam air biasa selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi 2500 rpm selama 10 menit dan diambil bagian teratasnya, atau yang disebut supernatan untuk dilakukan analisis. MDA serum diukur menggunakan spektrofotometer *double beam* pada panjang gelombang 532 nm dan dapat dilihat hasilnya.

4.12 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one-way Anova* atau *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan

signifikan antar kelompok dan dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan. Hasil uji statistik signifikan jika nilai $p < 0,05$. Dan akan digunakan uji korelasi pearson atau spearman untuk mengetahui hubungan antara dosis ekstrak daun kemiri dengan kadar MDA serum tikus.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.13 Alur penelitian in vivo

