

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengukuran kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase/ Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGPT/SGOT) dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini mulai dilakukan pada tanggal 1 Maret 2015 – 15 April 2015.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah bak plastik sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, botol minum tikus, sekam, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, spuit 3 cc, microtube, timbangan digital, seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas ukur, labu takar (10, 100, 500, dan 1000 mL), tabung reaksi, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, *autoclave*, mortar, *refrigerator*, *freezer*, mikropipet, aluminium foil, saringan berbahan plastik, *centrifuge* (*Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*), *appendorf micropipette* ukuran 10-100  $\mu$ L, spektrofotometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kedelai, *grain* kefir kaukasia, gula, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* umur 8-12 minggu dan berat badan rata – rata 180 gram, boraks, reagen kit BMR (*Borax Main Reagent*), serum, pakan tikus, Aquades steril, Alkohol

70%, reagen R1 (Tris Buffer pH 7,5 100 mmol/L, NADH 0,18 mmol/L), reagen R2 (2-oxoketoglutarat 15 mmol/L, NADH 0,18 mmol/L)

### 4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Penentuan dosis boraks dalam pakan dan dosis suplementasi kefir susu kedelai
3. Paparan boraks pada kelompok B, C, D, E serta suplementasi kefir susu kedelai pada kelompok C, D, E
4. Pengambilan darah
5. Pengujian kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) menggunakan metode spektrofotometri
6. Analisis hasil pengujian kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT)

### 4.4 Prosedur Penelitian

#### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Estimasi besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Kusningrum (2008) berikut:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = banyaknya perlakuan yang dicoba

n = banyaknya ulangan yang diperlukan

Estimasi besar sampel hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor tikus dengan jumlah tikus sebanyak 4 ekor sebagai ulangan pada masing-masing kelompok perlakuan. Tikus dikandangkan dalam bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan.

Hewan coba diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan untuk mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungan yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap kondisi umum hewan coba (Saputri, dkk., 2008). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, dengan uraian sebagai berikut : kelompok pertama (kelompok A) sebagai kontrol negatif, yaitu diberikan pakan standar dan diberi minum adlibitum, kelompok kedua sebagai kontrol positif (kelompok B) yang diberi pakan mengandung boraks dengan konsentrasi 10300 ppm dan diberi minum adlibitum, kelompok ketiga (kelompok C) tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai 5% dengan dosis 0,5 ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Kelompok keempat (kelompok D) tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai 5% dengan dosis 1ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Kelompok kelima (kelompok E) tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai 5% dengan dosis 1,5ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Pemberian perlakuan

dilakukan secara bersamaan pada hari ke 8 – 21 hari setelah aklimatisasi. Kefir susu kedelai diberikan secara per oral melalui sonde lambung dan diberikan secara bersamaan dengan boraks yang dipapar melalui makanan.

**Tabel 4.1** Rancangan penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Kadar enzim transaminase (SGPT dan SGOT)				
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif boraks)				
Kelompok C (volume 0.5ml kefir 5% /100gBB)				
Kelompok D (volume 1ml kefir 5% /100gBB)				
Kelompok E (volume 1,5 ml kefir 5% /100gBB)				

#### 4.4.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : paparan boraks dan suplementasi kefir susu kedelai

Variabel tergantung : kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT)

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berat badan  $\pm$  180 gram, umur 8-12 minggu, jenis kelamin jantan, pakan standart.

#### 4.4.3 Pembuatan Kefir Susu Kedelai

Susu kedelai yang digunakan diperoleh dari industri susu kedelai rumah tangga, dibuat dengan metode ekstraksi air terhadap biji kedelai, dengan tahapan awal berupa pencucian dan perendaman biji kacang kedelai menggunakan air selama satu malam. Kemudian kulit kacang kedelai dikupas, lalu dihancurkan dengan *blender*, perbandingan air dengan kacang kedelai adalah 8 L air : 1 Kg kacang kedelai. Selanjutnya kedelai yang telah dihancurkan disaring dengan kain saring untuk memperoleh filtrat atau susu kedelai yang murni. Kemudian ditambahkan 4% gula ke dalam susu kedelai lalu dididihkan sambil diaduk perlahan. Selanjutnya didinginkan hingga suhu kamar ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). (Ginting, 2002)

Pembuatan kefir 5% dilakukan dengan memasukkan 50 gram *grain* kefir ke dalam 1000 L susu kedelai kemudian diaduk perlahan lalu diinkubasi selama 20-24 jam pada suhu kamar (suhu  $25-37^{\circ}\text{C}$ ) agar proses fermentasi berlangsung. Bila susu sudah menggumpal atau tampak terpisah menjadi 2 atau 3 lapisan, yaitu dadih susu (*curd*), serum susu (*whey*), dan terkadang lapisan lemak serta tercium aroma tapai (indikator aktivitas fermentasi) dapat disaring dengan menggunakan saringan plastik untuk mendapatkan granula atau grain kefir kembali untuk disimpan. Kefir yang sudah disaring siap untuk dikonsumsi atau diberikan kepada tikus sebagai perlakuan atau bila tidak langsung dikonsumsi dapat disimpan dalam lemari pendingin suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk memperpanjang masa simpan dan agar tidak terjadi asidifikasi lanjut (Fratiwi, dkk., 2008).

Selanjutnya kefir susu kedelai diujikan secara mikrobiologis di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui kandungan total bakteri asam laktat dan total *yeast* yang ada pada kefir susu kedelai dengan menggunakan pemeriksaan *Total Plate Count* (TPC).

#### 4.4.4 Uji Total Bakteri Asam Laktat dan Yeast pada Kefir Susu Kedelai

Kefir susu kedelai 5% yang telah dibuat kemudian dilakukan pemeriksaan total bakteri asam laktat dan yeast menggunakan pengujian *Total Plate Count* (TPC). Kefir susu kedelai diambil sebanyak 25 ml secara aseptik, kemudian masukkan kedalam wadah steril. Tambahkan 225 ml larutan BPW 0,1% steril kedalam kantong steril yang berisi 25 ml kefir susu kedelai, homogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit (ini merupakan larutan dengan pengenceran  $10^{-1}$ ). Menurut Standar Nasional Indonesia (2897:2008), sampel kefir susu kedelai pengenceran  $10^{-1}$  kemudian dipindahkan sebanyak 1 ml dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ , selanjutnya dibuat pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan seterusnya dengan cara yang sama sesuai kebutuhan. Selanjutnya masukkan sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri secara duplo. Pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi ditambahkan 15 ml sampai 20 ml PCA yang sudah didinginkan hingga temperatur  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , agar larutan suspensi kefir susu kedelai dan media PCA tercampur seluruhnya, maka dilakukan pemutaran cawan ke depan dan ke belakang atau membentuk

angka delapan dan diamankan sampai menjadi padat. Inkubasikan pada temperatur  $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik. Selanjutnya hitung jumlah koloni pada setiap seri pengenceran kecuali cawan petri yang berisi koloni menyebar (*spreader colonies*) dan pilih cawan yang memounyai jumlah koloni 25 sampai 250.

#### 4.4.5 Penentuan Dosis Boraks dan Dosis Kefir

Dosis boraks yang digunakan didasarkan pada hasil temuan pada penelitian Weir *and* Fisher yang menyatakan bahwa paparan boraks dengan konsentrasi 10300 ppm boraks pada diet tikus dapat menimbulkan efek toksik pada organ dan saluran reproduksi tikus yang berupa atropi total pada testes, inflamasi kelopak mata, dan pembengkakan cakar (Krieger, 2001). Konsentrasi kefir susu kedelai 5% didasarkan pada penelitian Liu *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa kefir susu kedelai 5% berpotensi sebagai antimutagenik dan antioksidan. Menurut Widiartini (2004), pakan diberikan sekitar 10-15 g/ekor/hari untuk tikus dengan berat badan sekitar 180 - 200 g. Jadi setiap kelompok perlakuan diberikan pakan sebanyak 10 g/ekor/hari.

Dalam penelitian ini kelompok A (kontrol negatif) dan kelompok B (kontrol positif boraks) tidak diberikan kefir susu kedelai. Volume kefir yang diberikan pada kelompok C, D, dan E yaitu sebanyak 0,5 ml/100gBB, 1 ml/100gBB, dan 1,5 ml/100gBB. Pemberian dosis kefir susu kedelai yang diberikan pada kelompok C, D, dan E didasarkan

dengan pertimbangan bahwa volume maksimal pemberian terapi secara per oral pada tikus adalah sebesar 2ml/100gBB (Hrapkiewicz, *et al.*, 2013)

#### **4.4.6 Pembuatan Sediaan Pakan yang Mengandung Boraks dan Paparan Boraks Pada Hewan Coba**

Setiap pembuatan 1 kg pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi 10300 ppm, sebanyak 10,3 g serbuk boraks teknis dilarutkan kedalam akuades steril kemudian disemprotkan ke dalam 1 kg pakan hingga merata. Setelah itu pakan dikepal per 10 g dan dikeringkan dengan melalui proses pengovenan suhu 80°C selama 10 jam. Penambahan aquades dimaksudkan untuk mempermudah pakan dalam menyerap boraks.

Pemberian paparan boraks dilakukan dengan cara memberikan pakan yang mengandung boraks dengan kadar 10300 ppm (10,3 g) sebanyak 10 g pakan pada kelompok tikus B, C, D, dan E pada hari ke 8 – 28 setelah aklimatisasi. Paparan boraks diberikan bersamaan dengan suplementasi kefir susu kedelai 5% pada kelompok C, D, dan E. Pada hari ke-29 dilakukan pembedahan pada semua kelompok hewan coba untuk pengamatan kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan kadar *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT).

#### **4.4.7 Uji Konfirmasi Kandungan Boraks dalam Pakan**

Pakan yang telah dibuat selanjutnya diuji dengan menggunakan kit BMR (*Borax Main Reagent*) untuk mengkonfirmasi kandungan boraks dalam pakan. Uji konfirmasi kandungan boraks dalam pakan yang akan diberikan kepada seluruh kelompok tikus bertujuan untuk memastikan

bahwa pakan yang akan diberikan sebagai perlakuan benar-benar mengandung boraks. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 gram pakan dengan timbangan analitik. Pakan ditempatkan pada cawan petri sebagai wadah untuk mempermudah pengamatan pada proses penempelan reagen, kemudian dilakukan penambahan reagen BMR (*Borax Main Reagent*) sebanyak 2-3 ml dan diamkan selama 3-5 menit sampai timbul perubahan warna, kemudian warna yang timbul dibandingkan dengan warna standar sehingga diketahui kandungan boraksnya (Mahdi, 2008).

#### 4.4.8 Suplementasi Kefir Susu Kedelai pada Hewan Coba

Suplementasi kefir 5% pada kelompok C, D, dan E selama 21 hari dilakukan melalui sonde lambung dengan frekuensi pemberian sebanyak 1 kali sehari. Selama 21 hari, kelompok A (kelompok kontrol negatif) hanya diberikan pakan standar dan air minum adlibitum, kelompok kedua (kelompok kontrol positif) diberikan pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi sebanyak 10300 ppm dan diberi air minum adlibitum tanpa pemberian kefir susu kedelai. Kelompok C tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai 5% dengan dosis 0,5ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Kelompok D tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai 5% dengan dosis 1 ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Kelompok E tikus dipapar boraks dengan konsentrasi 10300 ppm melalui pakan, disuplementasi kefir susu kedelai

dengan dosis 1,5 ml/100gBB, dan diberi air minum adlibitum. Pada hari ke-29 tikus dibedah dan diamati kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT).

#### 4.4.9 Pengambilan darah

Euthanasia hewan coba dilakukan dengan cara dislokasi leher. Tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdominal untuk mengambil darah pada jantung. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah pada daerah jantung.

#### 4.4.10 Pengukuran Kadar SGPT dan SGOT

Tikus yang telah dibedah, kemudian diambil darahnya sebanyak 5 ml melalui jantung. Darah yang telah diambil ditampung dalam tabung sentrifugasi dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, serum yang terletak pada bagian atas dipisahkan dan diambil untuk dianalisis kadar SGPT dan SGOT. Menurut Indarto (2013), pengukuran kadar SGPT dan SGOT dilakukan dengan metode spektrofotometrik dengan mencampurkan sampel serum dengan reagen. Reagen SGOT dan SGPT terdiri dari Reagen 1 dan Reagen 2. Serum darah dan reagen SGOT/SGPT dicampur pada temperatur ruangan (15-30°C). Serum darah diambil sebanyak 100 µl dan di inkubasi pada suhu 37°C. Setelah 60 detik, absorbansi yang terukur di baca dan di catat. Kemudian campuran tersebut di bawa kembali ke suhu ruangan dan di inkubasi pada

suhu 37°C selama 60 detik. Absorbansi kemudian diukur pada menit ke 1, 2 dan ke 3. Absorbansi yang terukur kemudian dihitung dengan rumus untuk mendapatkan total kadar SGPT dan SGOT dalam darah, perhitungan kadar SGPT dengan menggunakan rumus:

$$\text{SGPT (U/L)} = \Delta \text{ Abs/ min} \times 1768$$

$$\text{SGOT (U/L)} = \Delta \text{ Abs/ min} \times 1746$$

#### 4.5 Analisa Data

Data penelitian berupa pengukuran kadar *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) secara kuantitatif menggunakan fotometer. Selanjutnya, dilakukan analisis statistika dengan pola analisis ragam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat signifikansi  $\alpha = 5\%$  menggunakan *statistical package for the social science* (SPSS) 23 for windows. (Gamst, *et.al.*, 2008)