

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksperimental *Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian antosianin dari *Ipomoea batatas L.* varietas ungu dalam meningkatkan kadar SOD dalam darah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi diet tinggi lemak. Penelitian ini menggunakan randomisasi untuk pemilihan sampel. Metode yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Setiap hari tikus diberi makan diet tinggi lemak dan antosianin dalam berbagai dosis. Setelah minggu ke-12 akan dilakukan pengukuran kadar SOD dalam darah, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan berbagai dosis antosianin, untuk mengetahui pengaruh antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) varietas ungu terhadap kadar SOD.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus jantan tipe kolesterol sensitif yaitu jenis *Rattus Norvegicus Wistar Race*.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok, maka jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus  $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$  dengan  $n$

= jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan. Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%.

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

$$[(5n-1) - (5-1)] \geq 16$$

$$(5n-1) - 4 \geq 16$$

$$(5n-1) \geq 20$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

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

Kelompok	Macam Diet dan Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol Negatif	Diet normal	4
Kontrol Positif	Diet aterogenik	4
Aterogenik + antosianin (1)	Diet aterogenik + antosianin 5 mg	4
Aterogenik + antosianin (2)	Diet aterogenik + antosianin 10 mg	4
Aterogenik + antosianin (3)	Diet aterogenik + antosianin 20 mg	4

Pada penelitian ini diambil 4 sampel yang dianggap sesuai batas minimal sampel. Hal ini untuk membuat jumlah sampel tiap kelompok sama, karena adanya eksklusi sampel pada kontrol negative karena mengalami prolapse rekti sehingga diduga mengalami inflamasi kronis yang mengakibatkan perubahan penanda yang akan diamati.

#### 4.2.3 Kriteria Sampel

##### 4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan sekitar 150-200 gram
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomik

##### 4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian
- b. Tikus yang sakit dan mati selama masa 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 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

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

##### 4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar SOD.

#### 4.4 Lokasi dan waktu penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 12 minggu, yaitu pada bulan Mei sampai September 2013.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

1. Kandang untuk pemeliharaan tikus beserta tempat makan dan minum.
2. Alat untuk membuat pakan tikus: timbangan analitik, baskom, plastik, pengaduk, *hand scoen*, gelas ukur, penggiling, dan nampan.
3. Alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah: spuit *disposable* 10 ml, peralatan bedah, tabung penyimpanan serum dengan antikoagulan (EDTA), dan tabung sentrifugasi.
4. Alat pemeriksaan kadar SOD serum, SOD Assay kit

##### 4.5.2 Bahan

1. Bahan untuk diet normal terdiri dari tepung jagung, gula pasir, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral air, pewarna merah, dan essens keju (Handayani, 2012)
2. Kapas
3. Bahan untuk diet tinggi lemak terdiri dari tepung jagung, gula pasir, corvet, margarin, *pig oil*, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral, air, pewarna hijau, asam kolat, kuning telur, dan essens keju (Handayani, 2012)

4. Antosianin *Ipomoea batatas* varietas ungu dengan konsentrasi 5 mg/kgBB tikus, 10 mg/kgBB tikus, 20 mg/kgBB tikus (Fan *et al*, 2012)
4. Bahan yang diperlukan untuk pengukuran SOD telah tersedia di dalam SOD Assay kit ( *Enzychrom superoxide dismutase assay kit*)

#### 4.6 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. Hewan coba yang digunakan adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan, dan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya Malang.
3. Diet normal berupa pakan standart yang terdiri tepung jagung, gula pasir, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral, air, pewarna, dan essens keju, sedangkan diet tinggi lemak terdiri dari diet normal yang ditambahkan corvet, margarin, *pig oil*, asam kolat, dan kuning telur (Handayani, 2012)
4. Kadar SOD diukur dengan SOD Assay kit melalui spektrofotometri pada setiap kelompok tikus.

#### 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 10 hari 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 5 kelompok:

1. Kelompok 1 : tikus yang mendapatkan pakan AIN normal modifikasi tanpa antosianin
2. Kelompok 2 : tikus yang mendapatkan pakan AIN aterogenik modifikasi tanpa antosianin
3. Kelompok 3 : tikus yang mendapatkan pakan AIN aterogenik modifikasi bersamaan dengan pemberian antosianin 5mg/ kg BB
4. Kelompok 4 : tikus yang mendapatkan pakan AIN aterogenik modifikasi bersamaan dengan antosianin 10 mg/kg BB
5. Kelompok 5 : Tikus yang mendapatkan pakan AIN aterogenik modifikasi bersamaan dengan antosianin 20 mg/kg BB

Semua tikus ditimbang berat badannya dan kemudian dilakukan randomisasi dalam pemilihan kelompok perlakuan agar setiap tikus memiliki kesempatan yang sama untuk mendapat perlakuan. Kemudian, tikus diaklimatisasi selama 10 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan waktu pemberian makanan. Setelah aklimatisasi, tikus dibagi

menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak, kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak dan diberi antosianin 5 mg, 10 mg, 20 mg. Dosis ini ditentukan berdasarkan penelitian tentang ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas L.*) dalam melihat penghambatan NF- $\kappa$ B dalam proses inflamasi (Fan, 2012). Antosianin diberikan peroral dengan menggunakan sonde. Diet sebanyak 50 gram/ekor tikus/hari diberikan setiap hari. Diet diberikan pada siang hari pukul 12.00-14.00. 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 diperoleh dari proses ekstraksi, isolasi, pemurnian, dan karakterisasi antosianin yang dilakukan oleh Dr. Ciptati MS, MSc Laboratorium Kimia FMIPA ITB. Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan merendam sampel dalam pelarut etanol-HCl 0,01% selama 14 jam pada suhu ruang. Pemisahan antosianin dari ekstrak sampel dilakukan dengan kromatografi kolom flash termodifikasi dengan poliamida CC-6 sebagai fasa diam dan sebagai fasa gerak ialah air dan etanol. Untuk mengetahui jumlah senyawa antosianin dalam sampel, antosianin hasil pemisahan dilakukan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). HPLC menggunakan fasa diam C<sub>18</sub> dan fasa gerak gradien pelarut air : asam format (95:5) dan asetone nitril : asam format (95:5). Selanjutnya antosianin dihidrolisis dengan HCl untuk menghasilkan antosianidin. Untuk mengetahui sifat optik antosianin hasil pemisahan dilakukan pengukuran spektrum UV-Vis dan untuk mengetahui struktur

antosianidin dilakukan pengukuran spektrum infra merah, spektrofotometer massa dan resonansi magnetik inti. Bioaktivitas antosianin hasil pemisahan diukur dengan uji antioksidan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Jadmiko, 2013).

#### 4.7.4 Bahan Diet yang Diberikan pada Tikus

Bahan untuk diet normal terdiri dari tepung jagung, gula pasir, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral, air, pewarna merah, dan essens keju (Handayani, 2012). Bahan untuk diet tinggi lemak terdiri dari tepung jagung, gula pasir, corvet, margarin, *pig oil*, *soybean oil*, gelatin, kasein, CMC, vitamin, mineral, air, pewarna hijau, asam kolat, kuning telur, dan essens keju (Handayani, 2012).

#### 4.7.5 Pengambilan sampel

Pada akhir minggu ke 12 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 Pengukuran Kadar SOD Serum

##### 4.7.6.1 Persiapan Standar

1. *Standards*: dibuat *standards* sebagai berikut:

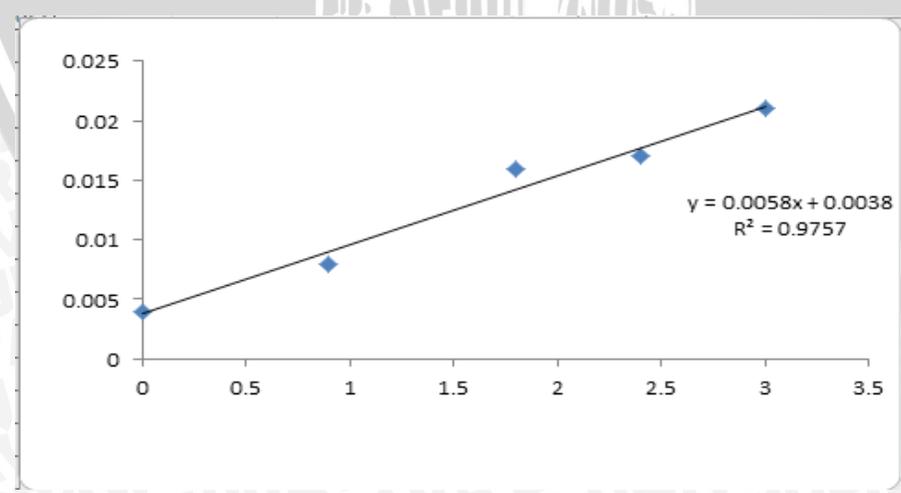
no	SOD dan pelarut	Standard (u/ml)
1	100 $\mu$ l SOD + 0 $\mu$ l <i>Diluent</i>	3.0
2	80 $\mu$ l SOD + 20 $\mu$ l <i>Diluent</i>	2.4
3	60 $\mu$ l SOD + 40 $\mu$ l <i>Diluent</i>	1.8
4	40 $\mu$ l SOD + 60 $\mu$ l <i>Diluent</i>	1.2
5	18 $\mu$ l SOD + 82 $\mu$ l <i>Diluent</i>	0.54
6	8 $\mu$ l SOD + 92 $\mu$ l <i>Diluent</i>	0.24
7	4 $\mu$ l SOD + 96 $\mu$ l <i>Diluent</i>	0.12
8	0 $\mu$ l SOD + 100 $\mu$ l <i>Diluent</i>	0.0

Lalu ditempatkan 20  $\mu$ l ke tiap *appendorf* untuk sebagai *Standard*.

2. Dibuat working solution : 160 µl assay buffer, 5µl xanthine, 2µ wst-1,
3. Didilusikan xanthine oxidase sampai lebih encer 20 kali. Dimasukkan 20µl ke tiap *appendorf*.
4. Diambil 20 µl, masukkan ke tiap well. Dibaca dengan spektrofotometri pada gelombang 440nm (OD0). Diinkubasikan di suhu ruangan selama 60 menit. Dibaca lagi dengan spektrofotometri pada gelombang yang sama(OD60).
5. Dicatat hasil tiap *well* , dihitung OD60-OD0
6. Dibuat grafik dari hasil perhitungan selisih OD.

Tabel 4. 1 absorbansi standard SOD

No	SOD (U/mL)	ABS
1	3	0.021
2	2.4	0.017
3	1.8	0.016
4	0.9	0.008
5	0	0.004

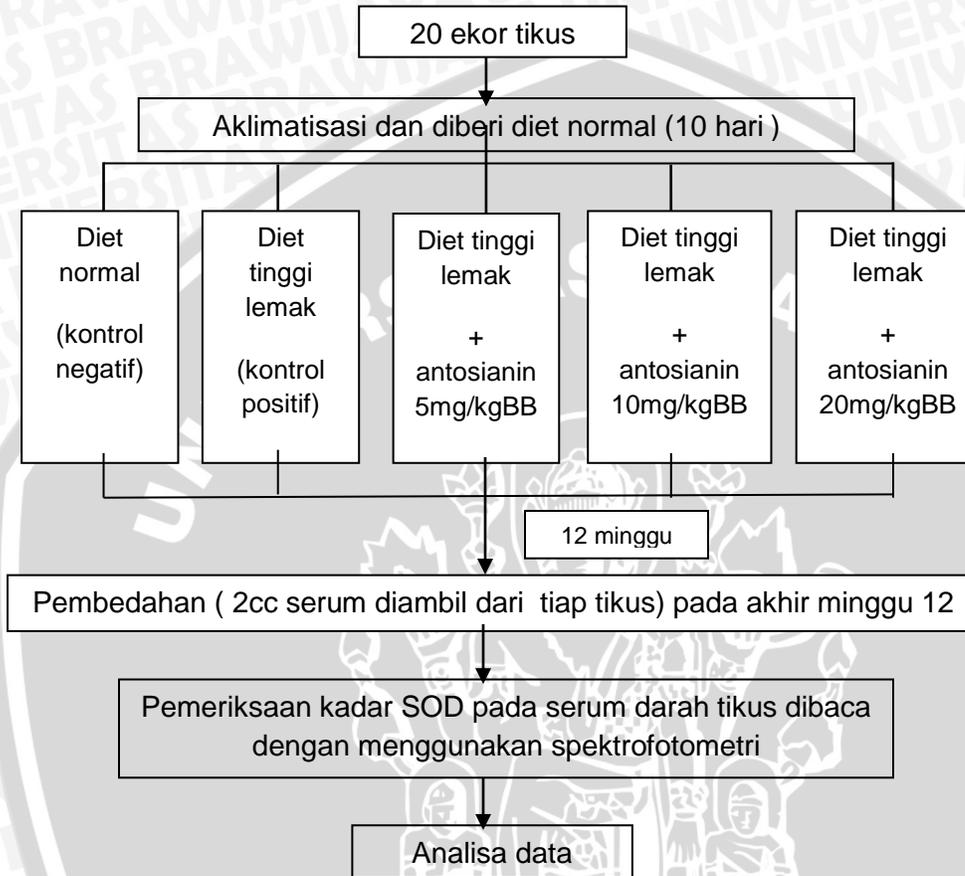


Gambar 4.1 kurva standard SOD

#### 4.7.6.2 Protokol Spektrofotometri

1. Disiapkan 30 well
2. Dibuat mapping dari *well*. Ambil serum, dimasukkan 20  $\mu$ l serum untuk tiap *appendorf*.
3. Dibuat working solution : 160  $\mu$ l assay buffer, 5  $\mu$ l xanthine, 2  $\mu$ l wst-1, dicampurkan dan diratakan di shaker.
4. Didilusikan xanthine oxidase sampai lebih encer 20 kali. Dimasukkan 20  $\mu$ l ke tiap *appendorf*.
4. Diambil 20  $\mu$ l, masukkan ke tiap well. Dibaca dengan spektrofotometri pada gelombang 440nm (OD0). Diinkubasikan di suhu ruangan selama 60 menit. Dibaca lagi dengan spektrofotometri pada gelombang yang sama (OD60).
5. Dimasukkan nilai absorbansi yang didapat dari kurva yang didapatkan pada standard. Dihitung aktivasi dari SOD.

#### 4.7.7 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 Tukey

untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Analisa data menggunakan program SPSS dengan derajat kepercayaan 95% dan  $\alpha=0,05$ . Uji statistik dinyatakan signifikan apabila  $p<0,05$ .

