

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan desain *true experimental* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Penelitian dilakukan pada hewan coba atau *in vivo*.

4.2 Populasi dan Subyek Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Tikus dipilih sebagai hewan coba karena mudah ditangani, mudah dipelihara, dan memiliki respon imun yang mirip dengan manusia.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi meliputi berat badan tikus Wistar antara 130-180 gram, jenis kelamin jantan, usia kurang lebih 8 minggu, dan kondisi sehat ditandai dengan nafsu makan baik, berperilaku normal, dan belum menerima asupan bahan kimia dengan cara apapun. Kriteria eksklusi meliputi tikus yang mati selama penelitian, tikus yang menderita penyakit-penyakit yang dapat mempengaruhi penelitian, berat badan menurun drastis, dan saat otopsi ditemukan kelainan bawaan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

4.2.3 Subyek Penelitian

Subyek penelitian ditentukan dengan metode *simple random sampling*.

Jumlah subyek penelitian dihitung dengan rumus Federrer (Lamanepa, 2005):

$$(t-1)(n-1) > 15$$

(n = jumlah sampel tiap perlakuan, t = jumlah perlakuan)

Dosis ekstrak biji *Momordica charantia* diadaptasi dari Sathishsekar dan Subramanian (2005) yang meneliti potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antioksidan, dan Gill *et al* (2012) yang meneliti potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antiinflamasi. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini digunakan 5 perlakuan dengan keterangan sebagai berikut:

1. Kontrol positif : tikus dengan diet aterogenik saja.
2. Perlakuan A : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 150 µg/g BB.
3. Perlakuan B : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 300 µg/g BB.
4. Perlakuan C : tikus dengan diet aterogenik dan ekstrak biji *Momordica charantia* dosis 500 µg/g BB.
5. Kontrol negatif : tikus sehat dengan pakan standart.

Sehingga didapatkan nilai n dengan perhitungan sebagai berikut:

$$(5-1)(n-1) > 15$$

$$n-1 > 3,75$$

$$n > 4,75$$

Jadi, jumlah sampel yang dibutuhkan dalam tiap perlakuan adalah minimal 5 ekor tikus, sehingga jumlah total minimum tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar resistin serum.

4.3.2 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak biji pare (*Momordica charantia*).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba, pemberian diet atherogenik, pembuatan ekstrak, pemberian perlakuan, dan pembedahan dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), sementara pengukuran kadar resistin serum dengan ELISA dilakukan di Laboratorium Faal FKUB. Penelitian dilakukan mulai Juli 2013 hingga pertengahan Februari 2014.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus galur Wistar jantan berumur kurang lebih 8 minggu, berat 120-130 gram.
2. Pakan standar tersusun atas 64% pellet (*cornfeed*), 35% terigu, dan 1% air serta minum secara *ad libitum*. Semua bahan pakan dicampur dan dibuat buletan dengan berat 40 gram, diberikan sekali setiap hari (Nugraha dan Winarsih, 2011).
3. Pakan atherogenik tersusun atas 75% pellet (*cornfeed*) dan terigu, 8.05% minyak lemak babi, 10% minyak lemak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur bebek (yolk saja), dan 0.825% air (Nugraha dan Winarsih, 2011).

4. Buah pare (*Momordica charantia*) jenis pare gajah, dibeli dari pasar lokal, dicuci bersih dan diambil bijinya. Dalam satu buah pare terdapat antara 10-20 biji pare, dengan berat total biji per buah 1,8-4 gram (Grubben, 2004). Kemudian biji dikeringkan dengan cara dianginkan di suhu ruang, kemudian dihaluskan dengan mortar hingga diperoleh serbuk. Serbuk disimpan dalam wadah kedap udara pada suhu 4°C hingga tiba saatnya digunakan (Sathishsekar dan Subramanian, 2005). Maserasi dilakukan dengan pelarut aquades untuk mendapatkan ekstrak cair. Air dipilih karena terbukti dapat menarik metabolit peptide lebih efektif dibandingkan ethanol, petroleum ether, dan n-hexane (Mahmood *et al*, 2012). Selain merupakan pelarut ramah lingkungan, air membuat ekstrak dapat diliofilisasi (mencegah terbentuknya komponen degradasi akibat pemanasan berlebihan) dan membuat proses ekstraksi lebih mudah untuk dilakukan (Engelberth *et al*, 2010).
5. Dosis ekstrak biji *Momordica charantia* diadaptasi dari dua penelitian. Pertama, Sathishsekar dan Subramanian (2005) yang meneliti potensi ekstrak biji *Momordica charantia* (dari dua varian berbeda) sebagai antioksidan. Dalam penelitian ini digunakan dosis 150 µg/g BB. Kedua, Gill *et al* (2012) yang meneliti potensi ekstrak biji *Momordica charantia* sebagai antiinflamasi. Dalam penelitian ini digunakan dosis 300 dan 500 µg/g BB. Karena itu dosis yang digunakan adalah 150, 300, dan 500 µg/g BB diberikan dengan sonde lambung sekali setiap hari.
6. Pengukuran kadar resistin dilakukan pada sampel serum menggunakan metode ELISA dengan satuan ukuran ng/ml.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, baskom, bahan-bahan pakan standar, air minum, timbangan, dan *handscoon*.

4.6.2 Alat dan Bahan Diet Aterogenik

Bahan-bahan diet aterogenik (75% pellet dan terigu, 8.05% minyak lemak babi, 10% minyak lemak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur bebek (yolk saja), dan 0.825% air), baskom, tempat minum, timbangan *sartorius Melter* dengan ketelitian 0,1 kg, dan *handscoon*.

4.6.3 Alat dan Bahan Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

Bahan berupa serbuk biji pare dan pelarut aquades. Alat-alat berupa botol 1,5 liter bersih, cawan bersih, kertas saring, oven *Memmert*, microwave, gelas ukur, wadah bersih untuk ekstrak kental, timbangan *Mettler Toledo* dengan ketelitian 0,001 mg,

4.6.4 Alat dan Bahan Pemberian Ekstrak Biji pare (*Momordica charantia*)

Bahan yang dibutuhkan adalah ekstrak biji pare yang sudah dilarutkan dalam aquades berdasarkan dosis. Alat yang diperlukan adalah set sonde lambung.

4.6.5 Alat dan Bahan Pembedahan Tikus

Alat dan bahan yang diperlukan antara lain papan *wax*, jarum, pinset, *chirurgis*, gunting, *scalpel*, alkohol, penyemprot alkohol, vacuotainer, kloroform.

4.6.6 Alat dan Bahan ELISA Resistin

Alat dan bahan yang diperlukan antara lain serum tikus, *flat bottom well plate*, resistin ELISA kit, aquades, *test tube*, mikropipet, vortex, *microplate shaker*, *microplate reader* 450 nm.

4.6.7 Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi

Tempat cuci tangan, *handscoon*, jas lab, antiseptik, masker, alkohol.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan sebanyak 25 ekor dipelihara dalam kandang ukuran 40 x 30 x 20 cm per ekor di Laboratorium Farmakologi FKUB. Adaptasi dilakukan selama kurang lebih 1 minggu. Makan dan minum diberikan sehari sekali dengan pakan standar, kecuali saat perlakuan.

4.7.2 Pemberian Diet Aterogenik

Diet aterogenik terdiri atas 75% pellet dan terigu, 8.05% minyak babi, 10% minyak domba, 1% minyak kelapa, 0.125% asam kolik, 5% telur itik (hanya kuning telur), dan 0.825% air. Masing-masing dicampur dan ditimbang sebesar 40 gram untuk setiap tikus, diberikan selama 12 minggu (Nugraha dan Winarsih, 2011).

4.7.3 Ekstraksi Biji Pare (*Momordica charantia*)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi terhadap simplisia biji pare dalam pelarut aquades. Simplisia dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:10 selama 72 jam. Pellet dibuang, sementara supernatan disaring menggunakan kertas saring menjadi ekstrak cair. Ekstrak cair dioven dalam oven

Memmert selama kurang lebih 12 jam pada suhu 100°C sampai jadi ekstrak kental (Mahmood *et al*, 2011; Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Danladi, 2012).

4.7.4 Pemberian Ekstrak Biji Pare (*Momordica charantia*)

Ekstrak kering biji pare diberikan dengan sonde lambung sekali dalam satu hari, dengan dosis untuk perlakuan A, B, dan C masing-masing sebesar 150, 300, dan 500 µg/g BB (Sathishsekar dan Subramanian, 2005; Gill *et al*, 2012). Berat badan disesuaikan dengan hasil penimbangan tikus setiap minggunya. Setiap dosis dilarutkan dalam aquades hingga 1 cc/ekor dan diberikan menggunakan sonde lambung. Ekstrak biji pare diberikan mulai minggu ke-8 hingga minggu ke-12.

Berdasarkan Lamanepa (2005), terdapat peningkatan bermakna jumlah sel busa pada pemberian diet atherogenik hingga minggu ke-8, tetapi belum diikuti peningkatan bermakna ketebalan aorta. Kondisi ini belum bisa disebut aterosklerosis. Perkembangan kondisi aterosklerosis dicapai dalam jangka waktu 12 minggu (Nugraha dan Winarsih, 2011). Berdasarkan hal itu, maka waktu pemberian ekstrak biji pare dimulai pada minggu ke-8 hingga minggu ke-12 agar sesuai dengan kondisi perkembangan aterosklerosis.

4.7.5 Pengambilan Serum

Whole blood diisolasi dari jantung tikus dan ditempatkan dalam vacuum-tainer. Kemudian disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Serum yang didapatkan segera disimpan pada suhu -40°C (Megawati, 2008).

4.7.6 ELISA Resistin

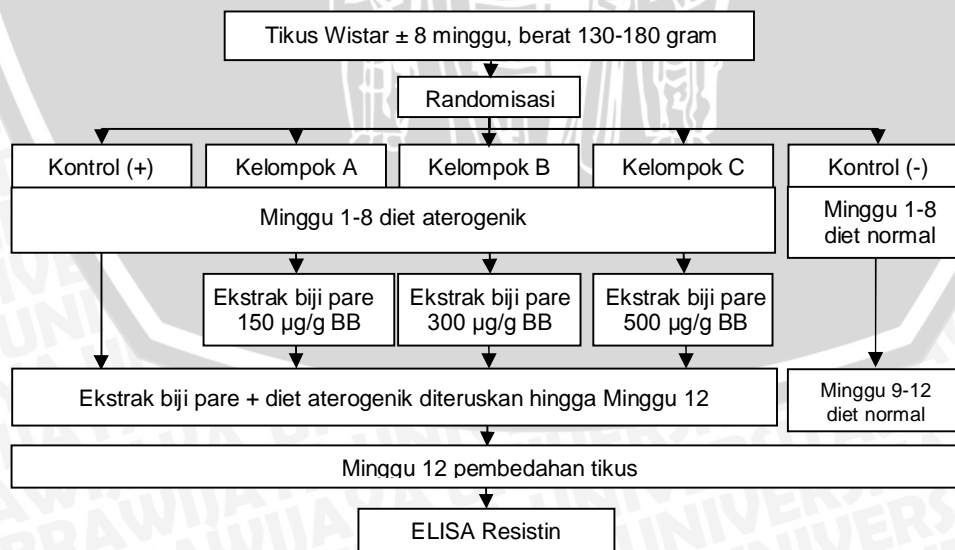
Serum diencerkan dalam *coating buffer* dengan perbandingan 1:20, lalu di-vortex hingga homogen. *Coating* dilakukan *overnight* dalam suhu 4°C. Kemu-

dian dilakukan *washing* menggunakan PBS-Tween 0,2% sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit. Dilanjutkan dengan *blocking* menggunakan BSA 1% selama 30 menit, kemudian *washing* lagi. Antibodi primer (anti-resistin) diencerkan dengan perbandingan 1:1000 dalam PBS, kemudian diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Antibodi sekunder (IgG Biotin anti-rabbit) diencerkan dengan perbandingan 1:1000, kemudian diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Enzim SA-HRP diencerkan 1:1000, diinkubasi 1 jam, lalu *washing*. Sureblue TMB, diinkubasi 30 menit. Diakhiri dengan *stop solution* HCl 1N, inkubasi 15 menit. Perubahan warna dari biru menjadi kuning akan terlihat di dalam sumur. Pembacaan dilakukan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

4.8 Pengumpulan Data dan Analisis

Analisis nonparametrik data kadar resistin serum menggunakan SPSS v.20, antara lain uji distribusi *one-sample Kolmogorov-Smirnov*, uji *K independent sample test Kruskal-Wallis*, dan uji *posthoc* nonparametrik *Mann-Whitney*.

4.9 Flowchart Desain Penelitian



Gambar 4.1 Flowchart Desain Penelitian