

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2003):

$p(n-1) > 15$ p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 6 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$6(n-1) > 15$

$n-1 > 15:6$, $n > 3,5$ jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah

4

4.3 Tempat Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan April hingga bulan Juli di Laboratorium Biomedik FKUB dan Laboratorium Parasitologi FKUB.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian oral *fucoïdan* dari ekstrak kasar alga coklat yang diekstrak di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus wistar yang tidak diberi diet tinggi lemak dan tidak diberi perlakuan)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diberi diet tinggi lemak tanpa diberikan fucoidan)
3. Kelompok 3: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *fucoidan* 30 mg/kgbb
4. Kelompok 4: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *fucoidan* 60 mg/kgbb
5. Kelompok 5: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *fucoidan* 120 mg/kgbb
6. Kelompok 6 : tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan simvastatin 40 mg/kgbb

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: (a) kadar adiponektin dalam darah

4.5 Definisi Operasional

1. Alga coklat (*Sargassum* sp) adalah jenis rumput laut penghasil alginat yang cukup tinggi. Proses ekstraksi alga coklat yang sebelumnya di dapat UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur dan di ekstrak di Fakultas Teknik Pangan Universitas Brawijaya.
2. Fucoidan adalah polisakarida kompleks pada dinding sel rumput laut yang mengandung polisakarida sulfat yang terdiri dari kumpulan molekul polydispersi berdasarkan sulfat L-fucose. Hasil ekstraksi fucoidan dari

Sargassum sp dengan metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian Sugiono pada tahun 2014.

3. Adiponektin adalah adipokin yang diproduksi oleh jaringan adiposa dan pengatur utama sensitivitas insulin, inflamasi, metabolisme lipid, dan fungsi endothel yang merupakan molekul penting dalam sindroma metabolik.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perawatan tikus

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

2. Pemberian diet normal dan diet tinggi lemak

Alat: Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan

Diet normal: PARS 120gr, 60gr tepung terigu, 52mL air. Diet tinggi lemak: adalah 30 gram yang terdiri dari campuran chow(PAR-S) 405 gr, tepung terigu 202.5gr, asam kolat 0,04 gr, minyak babi 20,25mL, kuning telur 2 butir.

3. Pemberian terapi *fucoïdan*

Pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit 3cc, kapas alkohol, *fucoïd*

4. Pembedahan Tikus

Alat dan bahan : Gunting bedah2, Pinset 2, Jarum pentul 2 set, Steroform 2, Kapas, Kloroform 20 ml, Alkohol, Wadah plastik+tutup 25 buah, Spuit insulin 1 ml

5. Pengukuran kadar adiponektin pada darah tikus dengan ELISA

Alat dan Bahan: ELISA Kit, tabung polypropylene, microplate, well plate.

PBS, BSA 1%, tween, Substrate TMB, antibodi adiponektin Antibodi sekunder, coating buffer, dan HCL 1 N

4.7 Prosedur Penelitian

1. Diet tinggi lemak

Pembuatan diet tinggi lemak dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 30g/100 gBB sehingga komposisi untuk tiap tikus perlakuan adalah 30 gram yang terdiri dari campuran chow(PAR-S) 405 gr, tepung terigu 202.5gr, asam kolat 0,04 gr, minyak babi 20,25mL, kuning telur 2 butir. Diet tinggi lemak diberikan selama 12 minggu pada kelompok perlakuan 2,3,4,5,6.

2. Pemberian fucoidan

Pemberian fucoidan dilakukan menggunakan metode sonde oral dengan menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit. Setelah 4 minggu, dilakukan induksi diet tinggi lemak dan diberikan setiap hari selama 8 minggu.

3. Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu mengambil sample darah pada jantung untuk dilanjutkan dengan pengukuran kadar adiponektin dengan ELISA.

4. Pengukuran adiponektin serum dengan ELISA

Sample darah tikus disimpan pada suhu 4°C semalaman kemudian dilakukan sentrifugasi selama 20 menit dan mengambil cairan supernatan dengan Assay buffer dengan perbandingan 1:10. Hasil kemudian dimasukkan kedalam mikropate ELISA diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit. Penambahan 50µL blocking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Pencucian reagen dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit. Inkubasi dengan 100 µl antibodi primer dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1:500 selama 2 jam. Suspensi diambil dan dicuci kembali dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam tris buffer salin dengan perbandingan 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 2 kali selama masing-masing 5 menit. Penambahan 50µL substrat pNPP dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 2 kali selama 5 menit. Substrat TMB dimasukkan dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan NAOH 1 N selama 15 menit. Hasil dibaca pada ELISA reader dengan λ 405 nm.

4.8 Analisis Stasistik

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan. Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian untuk menentukan varian data sama atau tidak. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one*

way anova dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Hasil penelitian dianggap bermakna apabila didapatkan nilai $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 20.

