

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

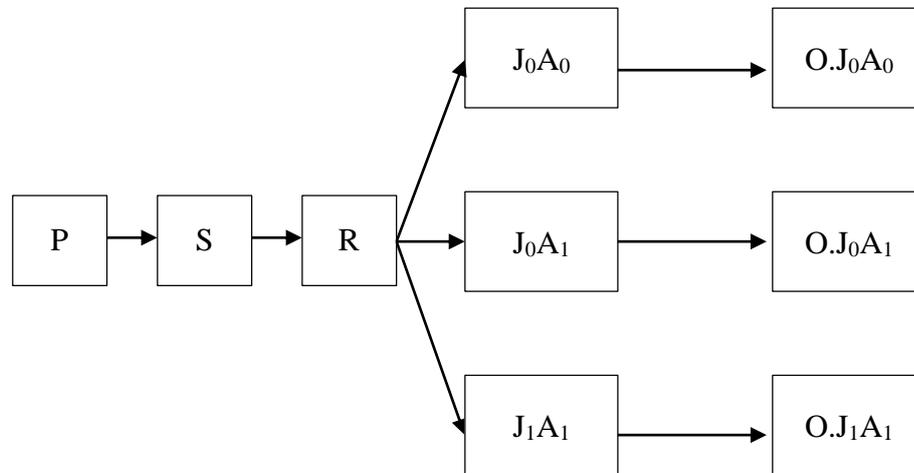
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Gizi dan Biokimia.

#### **3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pengandangan secara individual hewan coba, pemberian pakan, dan perlakuan. Pemeriksaan dan analisis kadar MDA darah dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

#### **3.3 Jenis Dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan *true experimental* dengan desain *post test only control group* pada tikus. Terdapat 3 kelompok perlakuan pada penelitian ini : kelompok tidak diberikan jus brokoli kukus dan tanpa aktivitas fisik maksimal ( $J_0A_0$ ), kelompok tidak diberikan jus brokoli kukus dan dengan aktivitas fisik maksimal ( $J_0A_1$ ), dan kelompok diberikan jus brokoli kukus dan dengan aktivitas fisik maksimal ( $J_1A_1$ ). Keluaran (*outcome*) dari penelitian ini adalah kadar MDA darah tikus.



Gambar 5. Skema desain penelitian

P : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

$J_0A_0$  : Kontrol negatif yang tidak diberi jus brokoli kukus dan tanpa aktivitas fisik maksimal

$J_0A_1$  : Kontrol positif yang tidak diberi jus brokoli kukus dan dengan aktivitas fisik maksimal

$J_1A_1$  : Kelompok perlakuan yang diberi jus brokoli kukus dan dengan aktivitas fisik maksimal

$O.J_0A_0$  : Kadar MDA darah kelompok  $E_0P_0$

$O.J_0A_1$  : Kadar MDA darah kelompok  $E_0P_1$

$O.J_1A_1$  : Kadar MDA darah kelompok  $E_1P_1$

### **3.4 Populasi Dan Sampel**

#### **3.4.1 Populasi Target**

Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

#### **3.4.2 Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau adalah seluruh tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berada di lokasi penelitian.

#### **3.4.3 Sampel**

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus wistar jantan yang dikandangkan dalam keadaan dalam kandang individual yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus jantan dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme hampir sama dengan manusia. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### **3.4.3.1 Kriteria Inklusi**

1. Tikus wistar jantan
2. Berat badan tikus normal (150-200 gram)
3. Usia 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi

##### **3.4.3.2 Kriteria Eksklusi**

1. Kelainan anatomis pada tikus
2. Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

### **3.4.5 Cara Sampling**

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *random sampling allocation*.

### **3.4.6 Besar Sampel**

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO dalam *Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus wistar untuk setiap kelompok perlakuan sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat tiga kelompok penelitian, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 18 sampel.

## **3.5 Variabel Penelitian**

### **3.5.1 Variabel Bebas**

1. Jus brokoli kukus (*Brassica oleracea L. var italica*)
2. Aktivitas fisik maksimal

### **3.5.2 Variabel Terikat**

Kadar MDA darah

### 3.6 Definisi Operasional

Tabel 6. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi operasional dan cara pengukuran	Unit	Skala
1.	Aktivitas fisik maksimal	kemampuan melakukan renang bebas sekuat-kuatnya sampai tenggelam yakni kepala tikus tetap berada di bawah permukaan air selama lima detik. Aktivitas fisik maksimal diberikan sebanyak lima kali dalam seminggu selama 4 minggu	Menit	Nominal
2.	Jus brokoli kukus	Jus yang dibuat dari sayuran brokoli yang telah dikukus dan diberikan pada tikus dengan dosis 35 mg/gramBB tikus. Jus brokoli kukus diberikan sebanyak satu kali sehari selama 4 minggu	mg	Nominal
3.	Kadar MDA darah	hasil perusakan oksidatif oleh radikal bebas yang ditentukan dari sampel darah tikus setelah perlakuan berakhir, dengan menggunakan metode spektrofotometri menggunakan TBARS assay	nmol/ml	Rasio

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Bahan

1. Tikus jantan
2. Ransum pakan standar untuk hewan coba
3. Jus brokoli kukus
4. Aquabides
5. EDTA ( Ethylenediamine tetraacetic acid)
6. Reagensia untuk pengukuran kadar MDA

### **3.7.2 Alat**

1. Kandang tikus
2. Sonde lambung
3. Timbangan
4. Tabung reaksi
5. Tabung sentrifuge
6. Bak lilin
7. Stop watch/ timer
8. Bak kolam renang tikus
9. Spektrofotometer
10. Sentrifuse
11. Waterbath
12. Kapas dan alkohol 70 %
13. Mikropipet ukuran 10- 1000  $\mu$ l

### **3.7.3 Jenis Data**

Pemeriksaan kadar MDA darah tikus setelah pemberian jus brokoli kukus pada tikus dengan aktivitas fisik maksimal merupakan data primer yang bersifat kuantitatif.

### 3.7.4 Cara Kerja

#### 1. Aktifitas Fisik Maksimal

Perlakuan aktivitas fisik maksimal berupa renang bebas sekuat-kuatnya sampai tikus tenggelam yakni kepala tikus tetap berada di bawah permukaan air selama lima detik.

#### 2. Pembuatan Jus Brokoli Kukus

Jus brokoli kukus dibuat dengan langkah sebagai berikut : brokoli yang telah didapat dari pasar lokal selanjutnya ditimbang sebesar 100 gram, dipotong, dicuci sampai bersih, dan dikukus. Pengukusan dilakukan dengan cara sayuran ditempatkan dalam kukusan *stainless steel* yang ditutupi dengan tutup kain dan dikukus di atas air mendidih 150 ml pada tekanan atmosfer. Lama pengukusan adalah 8 menit. Brokoli yang telah dikukus diolah menggunakan *juicer* dihasilkan jus brokoli kukus.

Dosis jus brokoli kukus yang diberikan berdasar kepada penelitian sebelumnya. Penelitian sebelumnya menggunakan brokoli kukus dengan dosis sebesar 5900 mg yang diberikan pada tikus dengan berat rata-rata 170,4 gram dapat menurunkan kadar MDA darah wistar secara signifikan. Dosis yang diberikan merupakan dosis antioksidan optimal untuk mengatasi stres oksidatif di plasma darah dan jaringan tubuh. Penelitian ini akan menggunakan dosis jus brokoli kukus sebesar :

$$5900 \text{ mg} / 170,4 \text{ gramBB} = 34,62 \text{ mg/gramBB} \approx 35 \text{ mg/gramBB} \text{ tikus.}$$

Setelah didapatkan jus brokoli kukus, jus dimasukkan ke dalam gelas ukur untuk mengetahui volum jus brokoli kukus yang diperoleh (x ml). Jadi diperoleh

sediaan jus brokoli dengan konsentrasi 100 gram / x ml, dimana setiap 1 ml sediaan jus brokoli mengandung =  $100 \text{ g} / x \text{ ml} = y \text{ gr/ml}$ . Jika dalam pemberian jus brokoli kukus untuk 1 kali pemberian dalam sehari melebihi kapasitas lambung tikus (5 ml), maka pemberian jus brokoli kukus akan disesuaikan dengan memberikan 2 kali atau 3 kali sehari dengan dosis yang tidak diubah dari perhitungan dosis yang telah didapat untuk satu kali pemberian.

### 3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

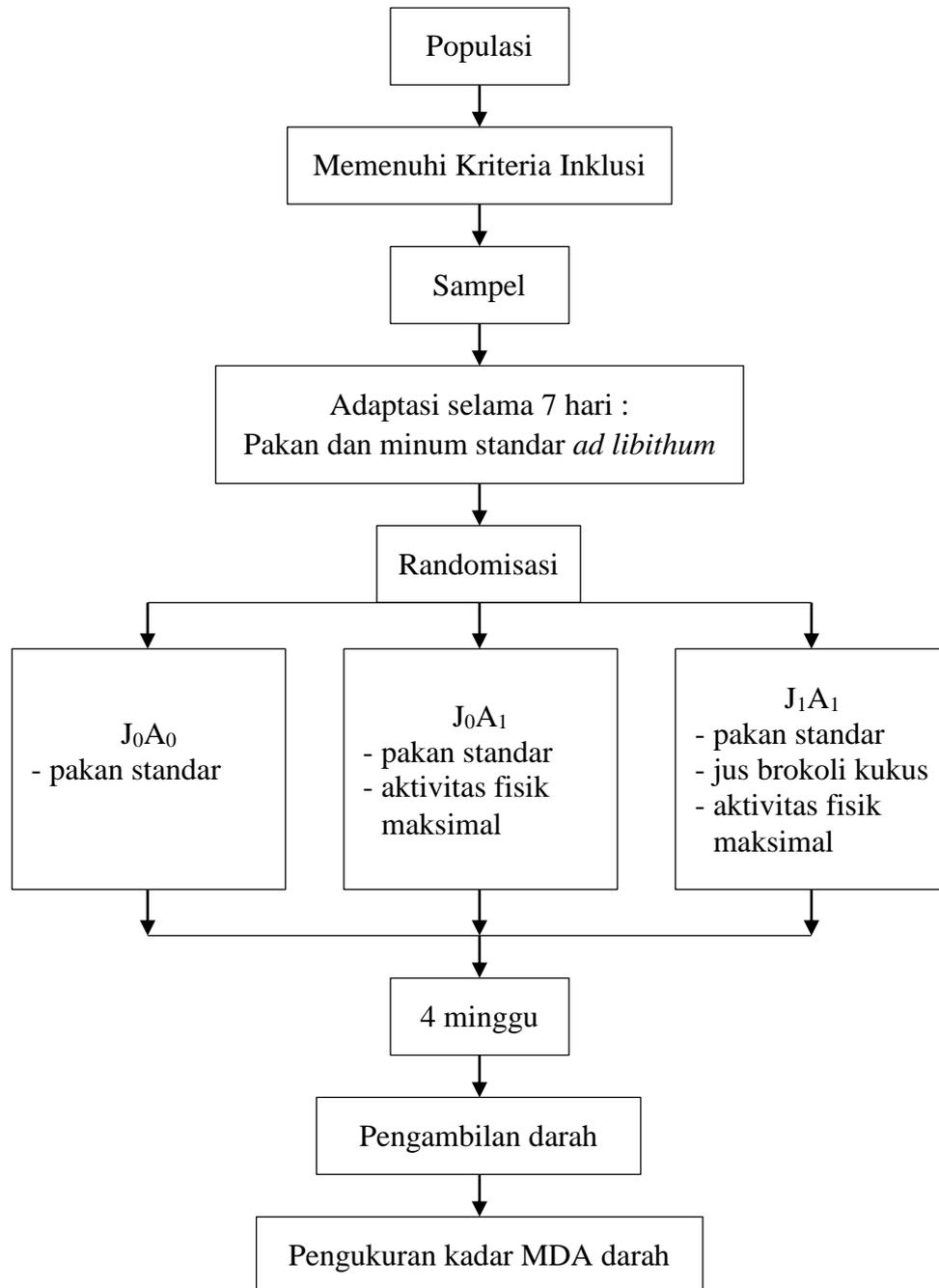
Seluruh sampel dikandangkan secara individual. Selama penelitian, wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh wistar hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*. Pada hari ke-8, wistar dibagi secara acak kedalam 3 kelompok yaitu : J<sub>0</sub>A<sub>0</sub> : Kontrol negatif yang hanya diberi pakan standar setiap hari selama empat minggu, J<sub>0</sub>A<sub>1</sub> : Kontrol positif yang diberi pakan standar setiap hari selama empat minggu dan aktivitas fisik maksimal lima kali per minggu, selama empat minggu, J<sub>1</sub>A<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan yang diberi pakan standar dan jus brokoli kukus setiap hari selama empat minggu serta diberikan aktivitas fisik maksimal lima kali per minggu, selama empat minggu.

#### 3.7.5 Pengambilan Data

Sampel darah diambil dari tikus pada hari ke-35. Darah diambil dari *medial canthus sinus orbitus* kurang lebih sebanyak 2 ml, dimasukkan ke tabung yang mengandung EDTA 1 mg/ml darah, kemudian disentrifuse 4000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatant. Supernatant diambil sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dimasukkan kedalam tabung sentrifuge yang kosong. Kedalam tabung sentrifuge

ditambahkan larutan TCA 15% sebanyak 1ml dan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N. Tabung sentrifuge yang berisi supernatant, TBA, dan TCA dipanaskan dalam waterbath pada suhu 80°C selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang, tabung disentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dan dimasukkan kedalam cuvet dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Sebagai standar digunakan 1,1,3,3 tetraetoksiopropana (TEP).

### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Diagram alur penelitian

### 3.9 Analisis Data

Analisis data akan menggunakan program SPSS 18. *for Windows*. Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat distribusi data dan uji *Levene's test* untuk melihat homogenitas data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan yang bermakna akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila  $p \leq 0,05$  pada interval kepercayaan 95%.

### 3.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang.

### 3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 7. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi Literatur	■	■																		
Survei Laboratorium			■	■	■	■	■	■												
Penulisan Proposal			■	■	■	■	■	■												
Seminar Proposal								■												
Revisi Proposal									■	■										
Penelitian									■	■	■	■	■	■	■	■				
Analisis Data dan Evaluasi													■	■						
Penulisan Laporan																	■	■	■	
Seminar Laporan																				■