

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

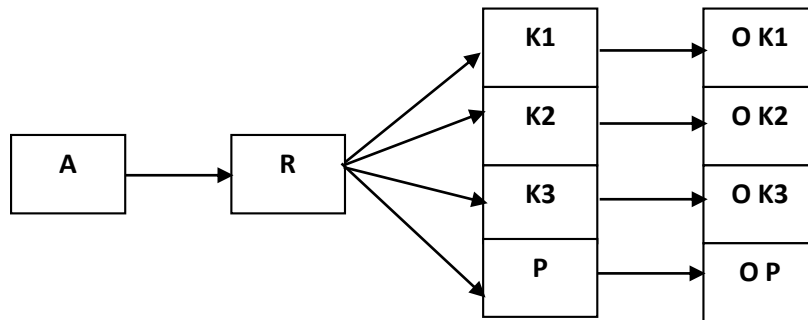
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP untuk pengandangan hewan coba, pengambilan sampel dan perlakuan renang. Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah dilakukan di Laboratorium Obat Tradisional kawasan Laboratorium Sentral RSND. Pemeriksaan dan analisis kadar MDA serum dilakukan di Laboratorium Kedokteran Dasar FK UNDIP. Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ekstrak kulit buah naga merah dan pemberian aktivitas fisik maksimal, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar MDA serum tikus.



Gambar 5. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

A : Adaptasi. Sampel hanya diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama 7 hari

R : Randomisasi. Sampel akan dibagi ke dalam empat kelompok secara acak

K1 : Kontrol negatif yang diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari

K2 : Kontrol positif yang diberikan pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal

K3 : Kontrol positif yang diberi pakan standar dan di sonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB selama 28 hari

P : Kelompok perlakuan yang diberikan pakan standar dan disonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal

O K1 : Kadar MDA kelompok K1

O K2 : Kadar MDA kelompok K2

O K3 : Kadar MDA kelompok K3

O P : Kadar MDA kelompok P

3.4 Populasi dan Sample

3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus Wistar jantan.

3.4.2 Sample

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus Wistar jantan yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari stainless steel dengan pencahayaan 12 jam mendapat makan dan minum *ad libitum* serta suhu kandang 28-32°C. Tikus jantan dipilih karena memiliki karakteristik metabolisme yang hampir sama dengan manusia dan tidak terganggu oleh adanya hormon. Sampel penelitian yang digunakan memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

- Tikus Wistar jantan
- Usia 7 minggu sebelum adaptasi
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)

Kriteria Eksklusi

- Kelainan anatomis
- Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

Kriteria Drop Out

- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati pada saat penelitian

3.4.3 Cara Sampling

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

3.4.4 Besar Sample

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

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompok sebagai antisipasi apabila terjadi *drop out* saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat tiga kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 24 sampel.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- Ekstrak kulit buah naga merah

3.5.2 Variabel Terikat

- Kadar MDA serum tikus Wistar

3.6 Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Ekstrak kulit buah naga merah	Kulit buah naga merah diekstrak dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Ekstrak diberikan pada tikus dengan dosis 300 mg/kgBB	mg/kgBB	Nominal
2.	Kadar MDA	Parameter peroksidasi lipid yang dapat diukur dalam darah. Pemeriksaan kadar MDA dengan metode TBARS dengan λ 545 nm	$\mu\text{mol/L}$	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan
- d. Sduit
- e. Mikropipet 100 μl
- f. Tabung reaksi
- g. Rak tabung reaksi
- h. Sentrifuse

- i. Waterbath
- j. Vortex
- k. Cuvet
- l. Spektrofotometer
- m. Oven
- n. Kertas saring Whatman
- o. Erlenmeyer
- p. Cawan porselen
- q. Corong gelas
- r. Pisau

3.7.2 Bahan

- a. Tikus Wistar jantan
- b. Pakan standar dan air minum
- c. Ekstrak kulit buah naga merah
- d. Larutan TCA 15%
- e. Larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N
- f. Aquadest

3.7.3 Jenis Data

Kadar MDA serum tikus setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah pasca aktivitas fisik maksimal merupakan data primer yang bersifat kuantitatif.

3.7.4 Cara Kerja

1. Aktivitas Fisik Maksimal

Perlakuan aktivitas fisik maksimal berupa renang maksimal pada tikus sampai hampir tenggelam atau tampak tanda-tanda kelelahan berupa tenggelamnya hampir semua badan kecuali hidung dan melemahnya gerakan anggota gerak serta menurunnya waktu reaksi. Lamanya renang berkisar antara 30-60 menit.³⁸

2. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah

Sampel buah naga merah dikupas untuk memisahkan kulit dengan dagingnya. Selanjutnya kulit buah naga dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Setelah air sisa cucian tiris, kulit buah naga dirajang kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80°C sampai kering. Kulit buah naga yang sudah kering dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan etanol 70% sampai semua sampel terendam. Goyok erlenmeyer kemudian tutup bagian atasnya dan simpan di tempat yang gelap selama 24 jam. Setelah 24 jam, rendaman tersebut disaring menggunakan kertas saring dan dituangkan ke dalam cawan porselen. Filtrat hasil penyaringan diuapkan menggunakan waterbath pada suhu 60-70°C sehingga didapat ekstrak kental lalu ditimbang beratnya.³²

3. Perlakuan terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel dikandangan secara berkelompok di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP. Selama penelitian Wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Adaptasi dilakukan selama 7 hari serta diberikan pakan dan minum standar ad libitum. Pada hari ke-8, Wistar dibagi ke dalam empat kelompok secara acak, yaitu K1 : kontrol negatif yang diberi pakan standar dan minum ad libitum

selama 28 hari, K2: kontrol positif yang diberikan pakan standar dan minum *ad libitum* selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal, K3: kontrol positif yang diberi pakan standar dan di sonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB selama 28 hari, P: kelompok perlakuan yang diberikan pakan standar dan disonde ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 300 mg/kgBB selama 28 hari kemudian hari ke-29 diberikan aktivitas fisik maksimal. Perlakuan aktivitas fisik maksimal dan pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP.

Pemberian ekstrak kulit buah naga merah sebesar 300 mg/kgBB sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana dosis 300 mg/kgBB dapat menurunkan kadar AST/ALT tikus secara signifikan.³⁹ Berdasarkan hal tersebut, pemberian dosis 300 mg/kgBB diputuskan pada penelitian ini.

Perlakuan dilakukan per hari mulai hari ke-8 selama 28 hari dan pada hari ke-29 dilakukan aktivitas fisik maksimal lalu dilanjutkan dengan pengambilan sampel darah melalui *medial canthus sinus orbitalis* untuk kelompok K1, K2, K3 dan P.

4. Pemeriksaan Kadar MDA

Metode yang digunakan untuk pemeriksaan kadar MDA pada penelitian ini *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) dengan cara sebagai berikut:⁴⁰

- a. Darah vena sebanyak 3 cc dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang telah diberi EDTA

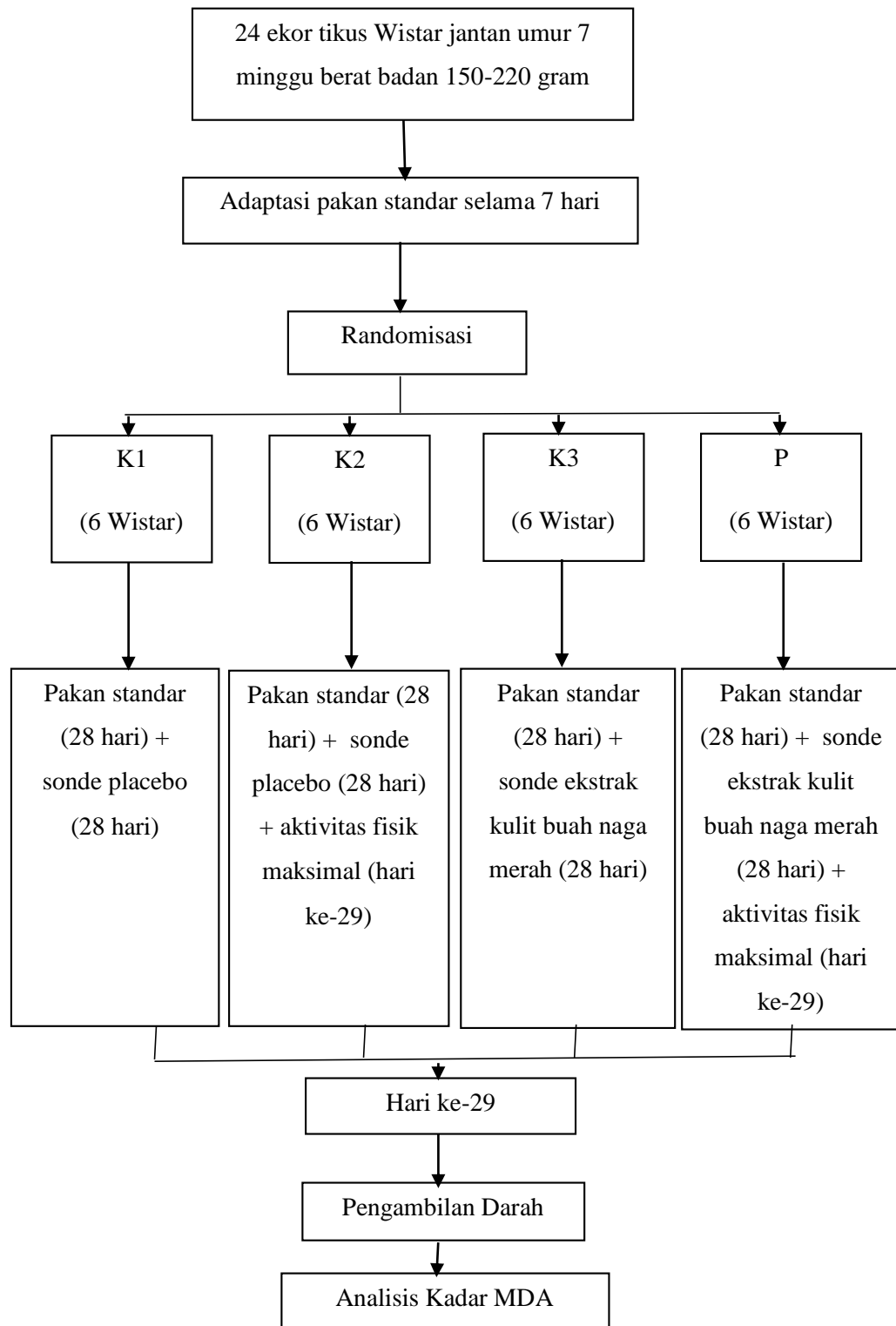
- b. Sample darah (3 cc) disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, supernatan sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang kosong
- c. Tambahkan dengan larutan TCA 15% sebanyak 2 ml
- d. Tambahkan dengan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N
- e. Panaskan dalam *waterbath* pada suhu 80°C selama 60 menit
- f. Sentrifus selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm
- g. Ambil supernatan dan masukkan ke dalam cuvet
- h. Baca absorbansi supernatan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm dengan blanko berupa TCA dan TBA
- i. Kemudian kadar MDA didapatkan menggunakan rumus:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = \frac{0,2422 + \text{absorbansi}}{0,0241}$$

3.8 Analisis Data

Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data dan uji *Levene's test* untuk melihat homogenitas data. Apabila data terdistribusi 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 terdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 6. Diagram Alur Penelitian

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK)

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, RSUP Dr. Kariadi.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 6. 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									■											
<i>Ethical Clearance</i>									■	■	■	■								
Penelitian													■	■	■	■				
Analisis Data dan Evaluasi																■	■			
Penulisan Laporan Hasil																	■	■	■	■
Seminar Hasil																				■