

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

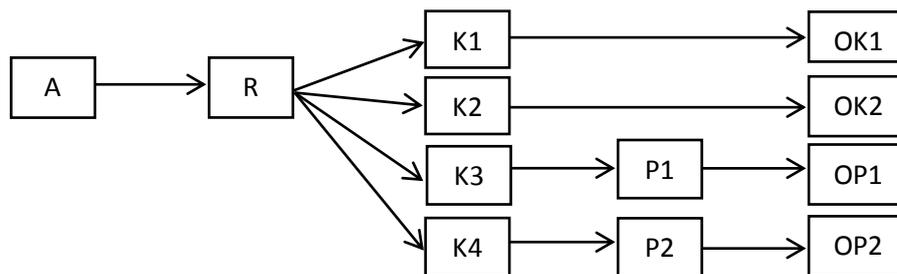
Ruang lingkup penelitian ini adalah di bidang Farmakologi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Laboratorium Kedokteran Dasar dan Laboratorium Obat Tradisional Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada bulan Juni hingga Oktober 2018.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan penelitian adalah *post test only with controlled group design* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Tikus wistar yang diinduksi hati ayam dan potasium oksonat diberikan ekstrak tomat sebagai perlakuan. Hewan coba yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dibagi secara acak dibagi menjadi 4 kelompok. Perlakuan yang telah diberikan pada setiap kelompok terdapat dalam skema desain penelitian.



**Gambar 8.**Skema Desain Penelitian

Keterangan:

A: Adaptasi. Pada kelompok ini sampel hanya diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* selama 7 hari.

R: Randomisasi. Sampel dibagi kedalam 4 kelompok secara acak.

K1: Kelompok kontrol negatif tidak diberikan perlakuan.

K2: Kelompok yang diberikan pakan standar, hati ayam dan potasium oksonat selama 28 hari (hari ke 8 - 35).

K3: Kelompok yang diberi pakan standar, hati ayam dan potasium oksonat selama 14 hari (hari ke 8 - 21).

K4: Kelompok yang diberi pakan standar, hati ayam dan potasium oksonat selama 14 hari (hari ke 8 - 21).

P1: Kelompok yang diberi pakan standar, hati ayam, potasium oksonat dan ekstrak tomat 1 mg/200grBB selama 14 hari (hari ke 22 - 35).

P2: Kelompok yang diberi pakan standar, hati ayam, potasium oksonat dan ekstrak tomat 1,5 mg/200grBB selama 14 hari (hari ke 22 - 35).

OK1: Kadar Asam Urat Serum Kelompok K1

OK2: Kadar Asam Urat Serum Kelompok K2

OP1: Kadar Asam Urat Serum Kelompok P1

OP2: Kadar Asam Urat Serum Kelompok P2

### 3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan hiperurisemia.

#### 3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar jantan terandomisasi yang dikandangkan dengan siklus pencahayaan 12 jam, suhu ruangan, mendapat makanan dan minuman *ad libitum*. Galur wistar jantan dipilih karena lebih mudah diinduksi menjadi hiperurisemia. Sampel yang digunakan memenuhi kriteria sebagai berikut:

##### 3.4.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar jantan
2. Usia 12 minggu sebelum adaptasi
3. Berat badan tikus wistar 150-220 gram
4. Kondisi sehat
5. Tidak tampak kelainan anatomis

##### 3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati selama aklimatisasi 7 hari

#### 3.4.2.3 Kriteria Drop Out

1. Berat badan tikus turun >10 % (berat badan <100gram)
2. Tikus mati selama masa penelitian

#### 3.4.3 Cara Sampling

Alokasi sampel dengan randomisasi sederhana (simple random sampling).

#### 3.4.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO dalam *Research Guideline for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok.<sup>43</sup> Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus wistar untuk setiap kelompoknya sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat penelitian berlangsung. Penelitian ini menggunakan 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan, maka total tikus wistar yang dibutuhkan selama penelitian berjumlah 24 ekor.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas: Ekstrak Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Variabel terikat: Kadar GSH plasma tikus wistar

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3.** Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional dan cara pengukuran	Unit	Skala
1	Pemberian Ekstrak Tomat	Ekstrak yang dibuat dari bahan dasar tomat ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) berwarna merah yang segar (tidak busuk) dan diberikan peroral menggunakan sonde lambung pada kelompok perlakuan. Dosis ekstrak tomat 5mg/kgBB. Dosis yang diberikan untuk kelompok perlakuan I yaitu 1mg/kgBB dan untuk kelompok perlakuan II diberikan dosis 1,5mg/kgBB. Kelompok perlakuan 1 diberikan ekstrak tomat dengan dosis 1 mg/200gramBB tikus perhari, kelompok perlakuan 2 diberikan dosis 1,5 mg/200gramBB tikus perhari. Pemberian dilakukan dalam satu kali pemberian.	ml	Nominal
2	Kadar GSH Darah	Kadar GSH plasma darah yang diukur dengan pemeriksaan spektrofotometer yang menggunakan metode DTNB dengan panjang gelombang 412nm.	µg/ml	Rasio

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Bahan

1. Darah tikus wistar jantan
2. Ekstrak tomat
3. Pakan standar hewan coba dan air minum
4. Hati ayam
5. Potasium oksonat
6. Aquades
7. Reagen DTNB: 39,6 mg DTNB dilarutkan dalam 10 ml bufer fosfat 0,1M dengan pH 7,0
8. TCA 5%: Larutan standar TCA 25% diencerkan dengan air suling sampai didapat konsentrasi TCA 5%.

#### 3.7.2 Alat

1. Sonde lambung
2. Timbangan sartorius
3. Sduit 1 ml dan feeding needle
4. Spektrofotometer
5. Cuvet
6. Gelas ukur
7. Inkubator
8. Mikropipet
9. Tabung reaksi
10. Sentrifuse

11. Waterbath
12. Vortex
13. Blender
14. Kapas
15. Masker
16. *Handscoon*
17. Alkohol

### 3.7.3 Jenis Data

Kadar GSH plasma darah setelah pemberian ekstrak tomat pada tikus wistar hiperurisemia merupakan data primer.

### 3.7.4 Cara Kerja

#### 3.7.4.1 Persiapan tikus wistar hiperurisemia

Tikus Hiperurisemia disiapkan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

##### 1. Pembuatan hati ayam

Langkah awal pembuatan hati ayam adalah menimbang hati ayam sebanyak 10-15 gram, kemudian dicacah lalu diberikan kepada hewan coba.

##### 2. Pembuatan larutan potasium oksonat

Lima gram potasium oksonat 2% (w/v; pH 7) dilarutkan ke dalam air sehingga didapatkan volume sebanyak 250 liter.<sup>6</sup>

### 3.7.4.2 Pembuatan Ekstrak Tomat

Pembuatan ekstrak tomat menggunakan metode maserasi. Sebanyak 1000 gram tomat dipilih dengan tingkat kematangan yang sama. Tomat dicuci dengan air sampai bersih, dipotong kecil-kecil lalu diblender. Tomat dimaserasi dengan metode pelarut etanol 70% selama 3x24 jam sampai di dapat maserat yang jernih, kemudian dievaporasi dengan menggunakan rotatory evaporator vacuum sampai diperoleh ekstrak pekat dan ditimbang beratnya.

### 3.7.4.3 Persiapan dan Perlakuan terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel tikus wistar dipelihara di dalam kandang pemeliharaan secara berkelompok di Laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Masing-masing kandang terdiri dari 6 sampel tikus wistar. Untuk adaptasi dilakukan selama 7 hari seluruh sampel hanya diberikan makanan dan minuman *ad libitum*. Selanjutnya sampel dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok sebagai berikut:

**Tabel 4.** Perlakuan yang diberikan pada hewan coba

Kelompok	Perlakuan (hari)	
	7	14
<b>I</b>	Pakan standar	Pakan standar
<b>II</b>	Pakan standar+hati ayam+ potasium oksonat	Pakan standar+hati ayam + potasium oksonat
<b>III</b>	Adaptasi Pakan standar+hati ayam+ potasium oksonat	Pakan standar+hati ayam +ekstrak tomat 1 mg/200grBB/hari+ potasium oksonat
<b>IV</b>	Pakan standar+hati ayam+ potasium oksonat	Pakan standar+hati ayam +ekstrak tomat 1,5 mg/200grBB/hari+

#### 3.7.4.4 Penentuan Dosis

##### a. Dosis Ekstrak Tomat

Pada penelitian sebelumnya, dosis ekstrak tomat segar rata-rata per hari yang diberikan pada tikus adalah 5mg/kgBB atau setara dengan 1 mg/200 gBB.<sup>38</sup> Sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 mg/200 gBB dan 1,5mg /200 gBB.

##### b. Dosis Potasium Oksonat

Potasium oksonat 2% (w/v;pH7)=2 mg/100 ml, dimana 5 gram=5000mg. Sehingga volume potasium oksonat yang didapatkan sebanyak 250 liter dan diberikan *ad libitum*.<sup>6</sup>

##### c. Dosis hati ayam

Pemberian hati ayam untuk menginduksi hiperurisemia dengan dosis 10-15 gram untuk tiap ekor tikus.<sup>44</sup>

##### d. Perlakuan Kontrol

Perlakuan kontrol terdiri dari 2 jenis perlakuan yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi perlakuan hati ayam dan potasium oksonat 28 hari sebagai induksi hiperurisemia pada tikus wistar. Kontrol negatif hanya diberi pakan standar selama 28 hari.

#### 3.7.4.5 Pemeriksaan Kadar GSH

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar GSH darah adalah metode *ditio bisnitro benzoate* (DTNB). Prinsip pengukurannya adalah reaksi antara DTNB dengan GSH menghasilkan senyawa *dianion tionitro*

*benzoate* yang berwarna kuning. Setiap tikus diambil darahnya melalui plexus retroorbitalis sebanyak kurang lebih 1ml dan ditampung dalam tabung uji berisi heparin.<sup>36</sup>

a. Persiapan sampel darah

Darah diambil 2 jam setelah pemberian potasium oksonat. Darah dalam tabung berisi heparin disentrifus dengan kecepatan 3000rpm selama 5 menit. Plasma dipisahkan dan digunakan untuk pengukuran kadar GSH.

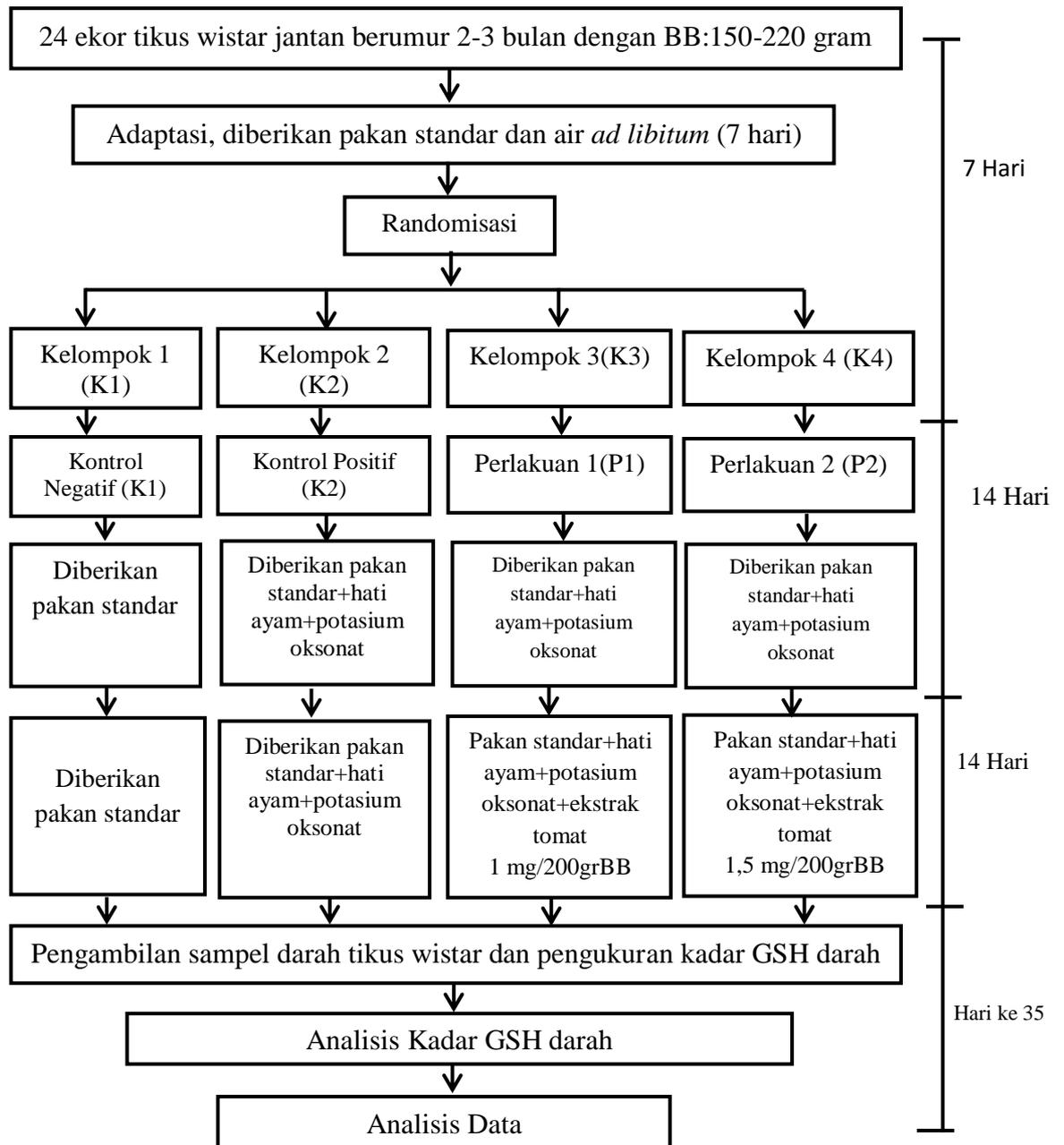
b. Pembuatan kurva kalibrasi untuk GSH.

- Buat standar larutan GSH: 2mg/ml dalam bufer fosfat 0,1 MpH 8,0.
- Dari larutan standar diambil 0,0  $\mu$ l, 5,0  $\mu$ l, 10,0  $\mu$ l, dan 50,0  $\mu$ l.
- Larutan bufer fosfat 0,1 M pH 8,0 ditambahkan ke dalam masing-masing tabung hingga volumenya menjadi 1,5 mg.
- Tambahkan 1 ml larutan TCA 5% ke masing-masing tabung.
- Kocok sampai homogen.
- 4,0 ml dari masing-masing tabung diambil dan ditambahkan 0,05 ml reagen DTNB.
- Sisa larutan dari tabung digunakan sebagai blanko.
- Ukur uji serapan absorban dan absorban standar terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai ordinat (y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (x).

c. Pengukuran sampel plasma.

- Tambahkan 8,90 ml bufer fosfat pH 8,0 dan 1,0 ml TCA 5% kedalam tabung yang berisi 0,250 ml plasma.
- Kocok hingga homogen.
- Larutan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 5 menit.
- 4,0 ml supernatan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,05 ml DTNB, lalu diamkan selama 1jam.
- Sisa larutan supernatan digunakan sebagai blanko.
- Ukur serapan absorban sampel terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 9.** Alur Penelitian

### 3.9 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan program *software* statistik. Uji normalitas data dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dan uji statistik parametrik *One-Way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok.

### **3.10 Etika Penelitian**

*Etichal clearance* No. 74/EC/H/FK-RSDK/VI/2018 telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang pada tanggal 28 Juni 2018.