

BAB III
METODE
PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dari penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan kepada tikus wistar jantan yang di induksi dietilnitrosamin dan diberikan teh daun tapak dara selama 9 minggu, masing-masing taraf perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali, yang kemudian diukur akibat atau pengaruh pemberian tapak dara terhadap kadar albumin dalam darah tikus wistar.

Tabel 1. Rancangan Acak Lengkap

Perlakuan	Kelompok						
	1	2	3	4	5	6	7
P1	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17
P2	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27
P3	X31	X32	X33	X34	X35	X36	X37
P4	X41	X42	X43	X44	X45	X46	X47

Keterangan :

P1 = Akua 20 ml (Kontrol Negatif)

P2 = Air Akua 20 ml + DEN 1 ml (Kontrol Positif)

P3 = Teh 3 ml + Air Akua 17 ml + DEN 1 ml Air

P4 = Teh 6 ml + Air Akua 14 ml + DEN 1 ml

X11,X12,X13,X47 : Unit Percobaan

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 9 minggu sesuai dengan surat keterangan lolos komisi etik penelitian kesehatan Reg.No.:959 / KEPK-POLKESMA/2020

2. Tempat Penelitian

Tempat yang digunakan untuk penelitian ini adalah Laboratorium Politeknik Kesehatan Malang

3.3 Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini meliputi semua tikus putih galur wistar jantan

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, antara lain

a. Kriteria inklusi :

- Keturunan wistar murni yang dibuktikan pada surat keterangan tikus.
- Jenis kelamin jantan
- Sehat
- Umur 2-3 bulan
- Berat badan 105 – 110 gram
- Sudah dapat memakan makanan kering
- Tidak terdapat abnormalitas anatomis

b. Kriteria eksklusi

- Terlihat sakit atau infeksi selama masa adaptasi 7 hari (gerak tidak aktif, bulu terlihat kotor, luka gigitan)
- Mati selama perlakuan berlangsung

3. Besar Sampel

Penentuan besar sampel menggunakan rumus Federer :

$$t(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah taraf perlakuan

n = jumlah pengulangan/jumlah sampel tiap kelompok

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 7$$

n = 7 subjek penelitian

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat Penelitian merupakan alat bantu untuk mendapatkan data penelitian yang diinginkan, pada penelitian ini alat yang digunakan adalah:

- a. Alat untuk pembuatan pakan tikus yaitu, baskom, sendok dan timbangan elektrik
- b. Alat pembuat teh daun tapak dara yaitu, panci, kompor, gelas ukur, timbangan elektrik, botol laboratorium plastic.
- c. Alat untuk penyuntikan DEN yaitu jarum suntik 1 ml, nasker, dan sarung tangan.
- d. Alat pemeliharaan tikus, yaitu kandang tikus sebanyak 28 kandang, tempat pakan, dan bool air, spuit 12 ml, masker dan sarung tangan.
- e. Alat pembedahan tikus yaitu meja bedah, gunting bedah, pinset, jarum suntik, toples anestesi, masker dan sarung tangan
- f. Alat pengambilan dan penyimpanan sampel darah yaitu spuit disposable, jarum suntik 3 ml, jarum suntik 1 ml, tabung vacutainer, tabung ependof, dan sentrifuge
- g. Alat yang digunakan dalam analisis yaitu kit albumin

3.4.2 Bahan penelitian

Bahan Penelitian merupakan bahan yang digunakan untuk mendapatkan data penelitian yang diinginkan, pada penelitian ini bahan yang digunakan yaitu pakan tikus yang terdiri dai tepung jagung, tepung ikan, tepung tulang, tepung kedelai, tepung kacang tanah, mineral mix, vitamin B kompleks, minyak goreng, garam.

Tabel 2. Komposisi Bahan untuk Pakan Tikus dalam Sehari

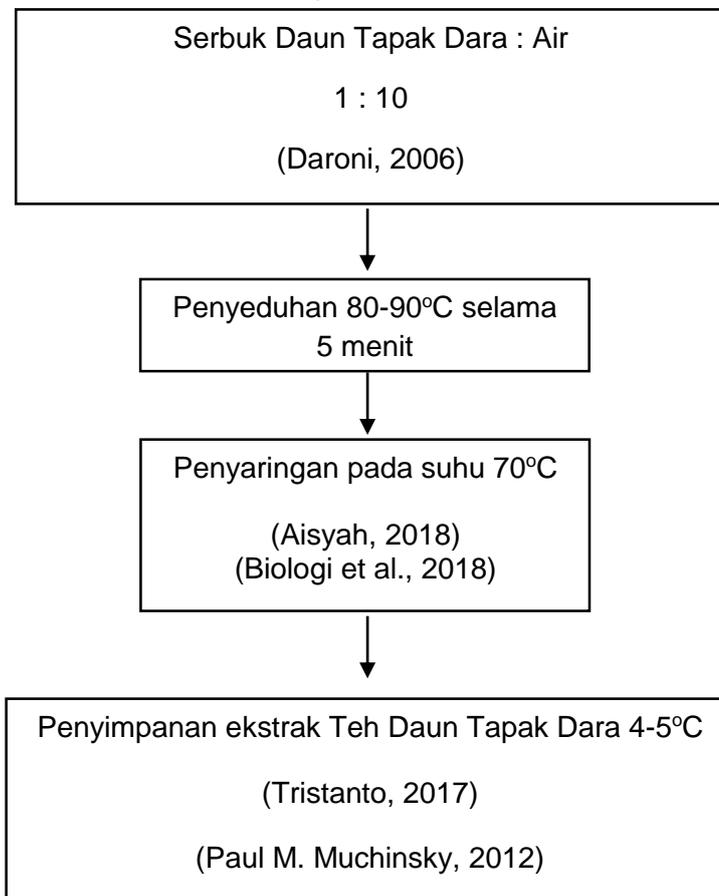
Bahan	%	Berat bahan pakan / kg (kg)
Tepung Jagung	75	0,75
Tepung Ikan	5	0,05
Tepung Tulang	1	0,01
Tepung Kedelai	10	0,10
Tepung Kacang Tanah	5	0,05
Mineral mix	0,2	0,002

Bahan	%	Berat bahan pakan / kg (kg)
Vitamin B Kompleks	1 blr/hari	1 blr
Minyak Goreng	1	0,01
Garam	0,2	0,002

Keterangan : Pakan diberikan sebanyak 30 g / tikus.

Dibutuhkan bubuk daun tapak dara dan juga air untuk pembuatan teh daun tapak dara, sedangkan untuk pemeliharaan tikus dibutuhkan air dan sekam, lalu untuk pembedahan tikus dibutuhkan kloform.

Pembuatan Teh Daun Tapak Dara



Gambar 5. Diagram Alir Proses Pembuatan Teh Daun Tapak Dara

Kebutuhan teh Daun Tapak Dara adalah \pm 5860 ml selama penelitian untuk 2 taraf perlakuan yaitu pemberian teh 3 ml dan 6 ml dengan masing-masing taraf perlakuan terdiri dari 7 ekor tikus. Cara pembuatan ekstrak Daun Tapak Dara adalah sebagai berikut, Teh

Daun Tapak Dara dilarutkan dalam air dengan perbandingan 1 : 10, dan diekstraksi selama 15 menit (Daroini, 2006). Kemudian dilakukan penyaringan. Filtratnya digunakan sebagai teh dan ampasnya akan dibuang. Kandungan yang diharapkan dari proses penyaringan daun tapak dara adalah kandungan antioksidan dalam daun tapak dara.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel Independen (Bebas) :

- Pemberian teh daun tapak dara

Variable Dependen (Terikat)

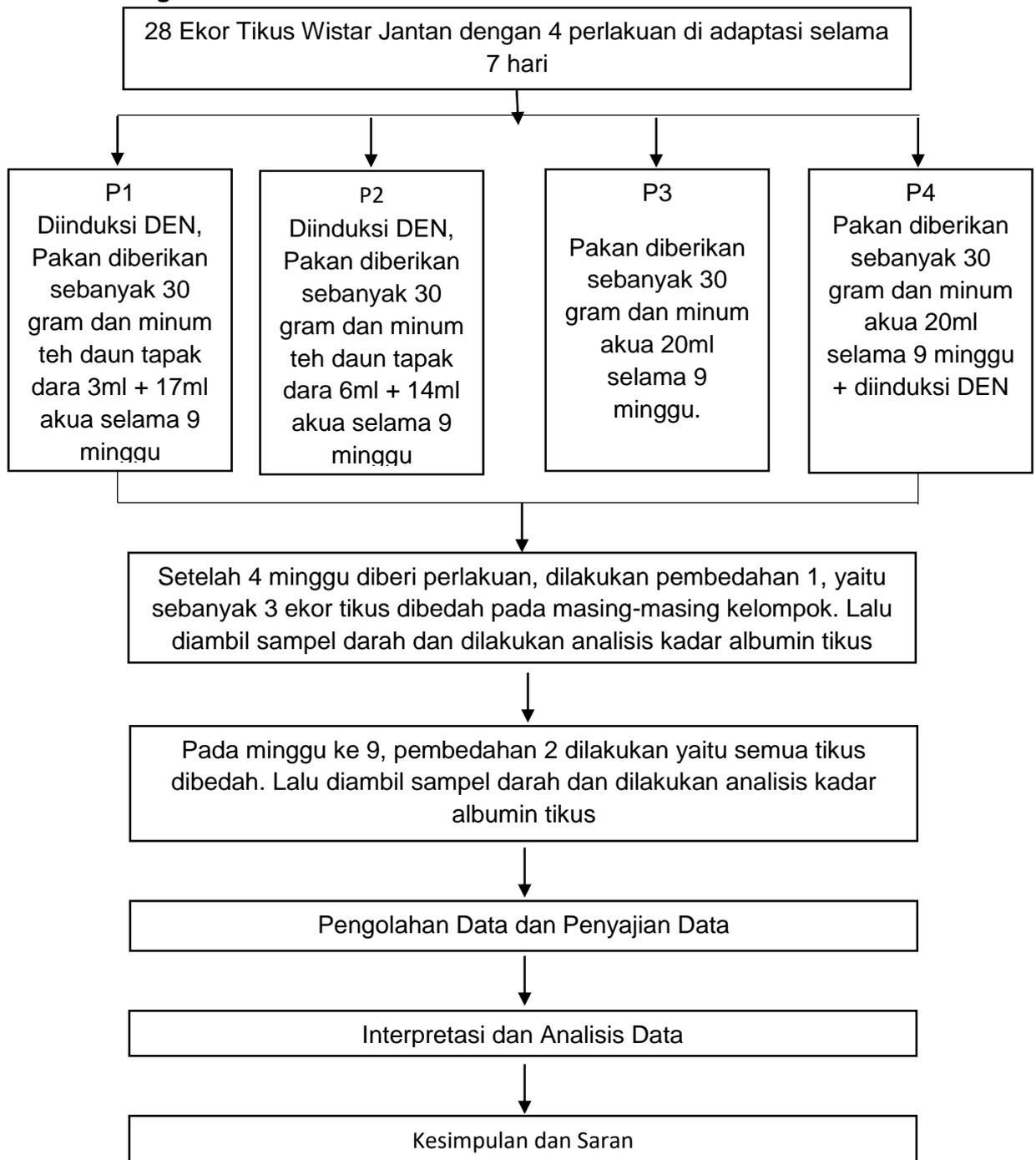
- Kadar Serum Albumin pada Tikus Wistar yang diinduksi Dietilnitrosamin

3.6 Definisi Operasional

Tabel. 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat dan Cara pengukuran	Skala
Pemberian Teh Tapak Dara	Pemberian teh daun tapak dara pada 2 taraf perlakuan, yaitu P3 dan P4, diberikan selama 9 minggu. Pemberian minum berupa campuran teh daun tapak dara dan akua sebanyak 20ml untuk 24 jam setiap pukul 13.00. Cara pembuatan ekstrak Daun Tapak Dara adalah sebagai berikut, Teh Daun Tapak Dara dilarutkan dalam air dengan perbandingan 1 : 10, dan diekstraksi selama 15 menit (Daroini, 2006). Kemudian dilakukan penyaringan. Filtratnya digunakan sebagai teh dan ampasnya akan dibuang	Mengukur pemberian the daun tapak dara (P3 = 3ml teh daun tapak dara + 17ml akua, P4 = 6ml teh daun tapak dara + 14 ml akua) dalam satuan ml dengan gelas ukur dan spuit 12ml	Rasio
Kadar Albumin	Perubahan kadar albumin tikus wistar jantan, dapat digunakan sebagai salah satu biomarker.	Mengukur jumlah albumin didalam serum yang diuji menggunakan spektrofotometer	Rasio

3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian pengaruh pemberian teh daun tapak dara terhadap kadar albumin pada tikus wistar jantan yang diinduksi DEN (*Dietilnitrosamin*)

3.8 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan 28 tikus wistar jantan. Sebelum diberikan perlakuan, tikus diseleksi sesuai kriteria inklusi, bila tidak sesuai dengan kriteria maka tikus akan diganti. Tikus dibagi secara acak dalam 4 taraf perlakuan. Tikus di berikan masa adaptasi dalam kandang pada laboratorium hewan coba selama 7 hari, dilanjutkan dengan induksi *dietilnitrosamin* (DEN) secara intraperitoneal dengan frekuensi 2 kali dalam seminggu selama 5 minggu. Perlakuan pada tikus dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-9. Pada minggu ke-5 dan ke-9 dilakukan pengambilan sampel secara berturut-turut 12 tikus pada pembedahan pertama dan 16 tikus pada pembedahan kedua untuk analisi kadar albumin pada tikus wistar jantan.

1. Persiapan Peneliti saat akan menangani hewan coba
 - Menggunakan alas kaki khusus ruangan hewan coba
 - Menganakan jas lab
 - Mencuci tangan
 - Menggunakan masker dan penutup kepala
2. Prosedur Pemegangan Tikus
 - Memegang tikus menggunakan tangan kiri
 - Memegang pada bagian pangkal (bukan pada bagian ekor)
 - Memegang pada bahu, dibelakang kaki bagian depan
 - Memposisikan ibu jari dibawah mandibular untuk mencegah tergigit
 - Memegang kaki bagian belakang dengan tangan yang lain

Pemegangan tikus hewan coba dengan benar bertujuan untuk membuat tikus merasa aman sesuai dengan etika penggunaan hewan coba, dimana tikus harus terhindar dari rasa stress. Selama penelitian, pemegangan tikus dilakukan pada saat penimbangan berat badan dan saat kandang tikus ibersihkan

3. Pemeliharaan Hewan Percobaan
 - Persiapan kandang metabolik yang tidak dibeai sekam dengan tujuan untuk memisahkan urin dan feses tikus
 - Tikus dimasukkan pada kandang metabolik yang telah disiapkan (satu kandang metabolik untuk satu tikus)

- Adaptasi tikus selama 7 hari dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan kondisi kandang metabolik dan lingkungan laboratorium
- Kandang metabolik dibersihkan 2 kali dalam seminggu untuk mencegah munculnya penyakit
- Menjaga suhu laboratorium berada pada kisaran suhu kamar 20 - 25°C
- Lampu laboratorium dinyalakan di pagi hari dan dimatikan pada sore hari sebagai fase gelap terang (12 jam : 12 jam) untuk menyesuaikan dengan habitat tikus, dimana tikus merupakan hewan malam

(Muchtadi,2010)

- Makanan tikus diberikan sebanyak 1 kali dalam sehari, dengan komposisi tepung jagung, tepung ikan, tepung tulang, tepung kedelai, tepung kacang tanah, mineral mix, vitamin B kompleks dan minyak goreng dengan berat 30 gram per penyajian yaitu pukul 07.00 WIB dan mengontrol pada pukul 16.00 WIB. Kebutuhan makanan bagi setiap tikus putih setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika makanan tersebut merupakan makanan kering.

4. Induksi *Dietilnitrosamin* (DEN)

Pada penelitian ini, ada tiga kelompok tikus wistar yang diinduksi DEN, yaitu kelompok control positif atau P2, kelompok P3, dan kelompok P4. Dosis DEN yang diberikan pada hewan coba adalah sebesar 10 mg / Kg BB (Tolba et al., 2015) secara intraperitoneal selama 5 minggu dengan frekuensi pemberian 2 kali dalam seminggu. Penyuntikan DEN dilakukan pada Hari Selasa dan Hari Jumat. Dilakukan oleh tenaga profesional yang memiliki kompetensi dan keahlian pada bidang ini.

5. Pemberian Perlakuan

- a. Kelompok P1 (Kontrol Negatif) : Tikus Wistar jantan normal dengan pemberian pakan 30 gram dan akua 20ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 9 minggu
- b. Kelompok P2 (Kontrol Positif) : Tikus Wistar jantan yang diinduksi 1ml *Dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali

dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram dan akua 20 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 9 minggu

- c. Kelompok P3 : Tikus Wistar jantan yang diinduksi 1 ml *Dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram, akua 17 ml dan teh daun tapak dara 3 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 9 minggu.
- d. Kelompok P4 : Tikus Wistar jantan yang diinduksi 1 ml *Dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram, akua 14 ml dan teh daun tapak dara 6 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 9 minggu.

6. Euthanasia

Tikus wistar dieuthanasia dengan anastesi menggunakan kloroform / ether sesuai dengan anjuran Institutional *Animal Care and Use Comitte*, dimana bagi tenaga yang belum tersertifikasi lebih dianjurkan melakukan pengorbanan jewan coba dengan menggunakan kloroform (IACUC, 2015). Tikus dimasukkan dalam toples dan ditutup dengan rapat, kemudian ether dituang pada kapas sebanyak 10ml, dan dimasukkan dalam toples. Dilakukan pengamatan terhadap pernapasan dan denyut jantung tikus ± 15 detik, apabila tikus sudah tidak bernapas, dimana pada prinsipnya tikus harus terhindar dari rasa sakit. (Ridwan, 2013)

7. Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah pada penelitian ini dilakukan dengan cara pembedahan untuk mendapatkan darah dari jantung tikus wistar. Pengambilan darah dari jantung bertujuan untuk mendapatkan volume darah yang lebih banyak dibandingkan dengan pengambilan darah dibagian ekor dan mata tikus. Proses pembedahan dan pengambilan sampel darah pada tikus sebagai berikut :

- Tikus diterlentangkan pada papan pembedahan (posisi supine) menggunakan jarum untuk menusuk kaki sehingga tikus terlentang lebar
- Melakukan insisi midline pada otot dinding perut dari ujung stenum hingga simfisis pubis. Pada potongan medline akan terjadi sedikit

pendarahan. Potongan pada otot abdomen tidak mengenai diafragma untuk menghindari pneumothorax.

- Mencari letak jantung yang tepat yaitu dibagian kiri dada diantara costae ke 3 dan 4 di sebelah sinister sternum. Memasukkan jarum suntik ke bagian jantung sedalam 5 mm dari torak menuju dagu. Jarum suntik membentuk sudut 25-30° dari dada tikus
- Darah langsung diambil sebanyak 5 ml menggunakan spuit dan ditampung dalam vacuotainer
- Darah disentrifugasi pada kecepatan 3000rpm selama ±5 menit untuk memisahkan serum dan sel darah

8. Pengukuran Kadar Albumin

Pengukuran kadar albumin dilakukan dengan menggunakan kit albumin. Serum darah diambil sebanyak 10µl lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dicampur reagen (yaitu campuran dari bromocresol green dan citrate buffer sebanyak 1000µl. sebagai blanko, digunakan 10µl akuades yang dicampur 1000µl reagen. Kedua larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 10 menit dan dibaca absorpsinya terhadap blanko reagen dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm. Perhitungan kadar albumin dapat dilakukan dengan menggunakan rumus: kadar albumin (g/dL) = Skala sampel / Skala standar x Konsentrasi standar.

3.9 Metode Pengumpulan Data

1. Asupan makanan

Asupan makanan tikus diperoleh dari selisih berat makanan, asupan makanan dihitung setiap hari sebelum pemberian makan dimulai pada hari kedua, dengan cara menghitung selisih berat makanan yang diberikan dengan berat makanan yang tersisa. Penghitungan asupan makan dilakukan selama 5 minggu pada 12 tikus, dan selama 9 minggu pada 16 tikus.

2. Asupan Minuman

Asupan minuman tikus dihitung setiap hari sebelum pemberian minuman dimulai pada hari kedua dengan cara menghitung selisih volume minuman yang diberikan dengan minuman yang tersisa.

3. Berat badan tikus

Berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan tikus setiap hari menggunakan timbangan analitik

4. Kadar albumin

Data kadar albumin serum diperoleh dari pemeriksaan laboratorium pada sampel serum tikus saat pembedahan minggu ke 4 dan di akhir penelitian yang dilakukan dengan metode spektrofotometri.

3.10 Pengolahan Data

Data yang terkumpul dilakukan editing, coding, dan tabulasi. Semua data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata \pm standar error (Mean \pm SD). Data diolah menggunakan program computer SPSS, kemudian dilakukan beberapa uji, antara lain :

1. Uji Normalitas Data

Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*, karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila distribusi data normal, maka didapatkan hasil $p > 0,05$

2. Uji Varians

Uji varians (*Levene's Test*) digunakan untuk mengetahui homogenitas dari dua atau lebih kelompok. Apabila homogenitas sama, maka didapatkan $p > 0,05$

3. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar albumin pada kelompok perlakuan yang terdistribusi normal dan varians data homogeny menggunakan uji parametric One Way ANOVA atau sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, maka sebagai alternative dapat digunakan uji Kruskal Wallis

4. Uji Post Hoc (Lanjutan)

Uji post hoc bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap kadar alnumin. Apabila terdapat perbedaan nyata dari uji One Way ANOVA dengan hasil $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji beda Duncan Multiple Range Tesr (DMRT). Namun untuk uji alternative digunakan Mann-Whitney

3.11 Instrumen Analisis Data

Instrument untuk analisis dara antara lain kalkulator scientific, computer dengan program Microsoft word, Microsoft excel dan, SPSS serta alat tulis