

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk melihat pengaruh pemberian teh Daun Tapak dara terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) pada tikus wistar jantan dengan induksi *dietilnitrosamin* (DEN). Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali.

Tabel 1. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Replikasi						
	1	2	3	4	5	6	7
P ₁	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
P ₂	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇
P ₃	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇
P ₄	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆	X ₄₇

Keterangan:

- P₁ : kontrol negatif (air 20 ml)
- P₂ : kontrol positif (air 20 ml+ DEN)
- P₃ : teh Daun Tapak dara 3 ml+ 17 ml air + DEN
- P₄ : teh Daun Tapak dara 6 ml+ 14 ml air + DEN
- X₁₁, X₁₂, X₁₃ X₄₇ unit percobaan

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September-Oktober 2020.

2. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium *Center of Excellent* (COE) untuk proses pembuatan teh Daun Tapak dara.
- b. Laboratorium Pemeliharaan Hewan Coba Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk pemeliharaan tikus wistar jantan.
- c. Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk analisis kadar *malondialdehyde* (MDA) serum.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus wistar*). Besar sampel dalam penelitian ini menggunakan 4 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dibutuhkan 7 ekor tikus dengan jumlah sampel 28 ekor tikus.

Besar sampel tikus pada masing-masing taraf perlakuan dihitung dengan rumus Federer, yaitu :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ subjek penelitian}$$

$$n = 7 \text{ subjek penelitian}$$

Keterangan :

t = perlakuan

n = jumlah subjek penelitian

15,00 = nilai deviasi

Tikus wistar jantan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus wistar jantan, berbulu putih, sehat dan aktif.
- b. Umur 45-75 hari.
- c. Berat 105-110 gram.
- d. Tikus dalam kondisi sehat : gerakan-gerakan makan, minum, keadaan tenang, tidak ada luka dan cacat.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang selama 2-3 hari berturut-turut tidak mau makan.
- b. Tikus yang kondisinya menurun dan mati selama penelitian berlangsung.

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Alat pembuatan pakan tikus
Baskom, sendok, dan timbangan elektrik.

- b. Alat pembuatan teh Daun Tapak dara
Panci, kompor, gelas ukur, timbangan elektrik, botol laboratorium plastik.
- c. Alat penyuntikan DEN
Jarum suntik 1 ml, masker, dan sarung tangan.
- d. Alat pemeliharaan tikus
Kandang tikus sebanyak 28 kandang dengan ukuran , tempat pakan, dan botol air, spuit 12 ml, masker, dan sarung tangan.
- e. Alat penimbangan tikus dan sisa pakan tikus
Timbangan elektrik.
- f. Alat pembedahan tikus
Meja bedah, gunting bedah, pinset, jarum suntik, toples anestesi, masker, dan sarung tangan.
- g. Alat pengambilan dan penyimpanan sampel darah
Spuit disposable, jarum suntik 3 ml, jarum suntik 1 ml, tabung vacutainer warna merah, tabung *ependof* untuk penyimpanan serum, dan *sentrifuge*.
- h. Alat preparasi dan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) serum
Spuit 5 ml, alkohol swab, kapas, dan tabung EDTA.

2. Bahan :

- a. Pakan tikus :
 - 1) Tepung jagung
 - 2) Tepung ikan
 - 3) Tepung tulang
 - 4) Tepung kedelai
 - 5) Tepung kacang tanah
 - 6) Mineral mix
 - 7) Vitamin B kompleks
 - 8) Minyak goreng
 - 9) Garam
- b. Teh daun Tapak dara :
 - 1) Bubuk daun tapak dara
 - 2) Air
- c. Pemeliharaan tikus :

- 1) Air
 - 2) Sekam
- d. Pembedahan tikus :
- Kloform
- e. Bahan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) serum :
- 1) Reagen TBA 0,67%
 - 2) Reagen TCA 20%

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian Teh Daun Tapak dara.
2. Variabel Terikat : Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar *malondialdehyde* (MDA).

F. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur
Pemberian teh Daun Tapak dara	Pemberian teh Daun Tapak dara pada 2 taraf perlakuan yaitu P ₃ dan P ₄ selama 7 minggu. Pemberian minum berupa campuran teh daun tapak dara dan aqua sebanyak 20 ml untuk 24 jam setiap pukul 13.00.	Mengukur pemberian teh daun tapak dara (P ₃ = 3 ml teh daun tapak dara + 17 ml aqua, P ₄ = 6 ml teh daun tapak dara + 14 ml aqua) dalam satuan ml dengan gelas ukur dan spuit 12 ml.	Rasio
Kadar MDA	Senyawa aldehida dari tikus wistar jantan yang merupakan hasil akhir dari peroksida lipid yang dapat digunakan sebagai biomarker tingkat stress oksidatif.	Jumlah <i>malondialdehyde</i> (MDA) di dalam serum (nmol/ml) yang diuji menggunakan spektrofotometer.	Rasio

G. Prosedur Penelitian

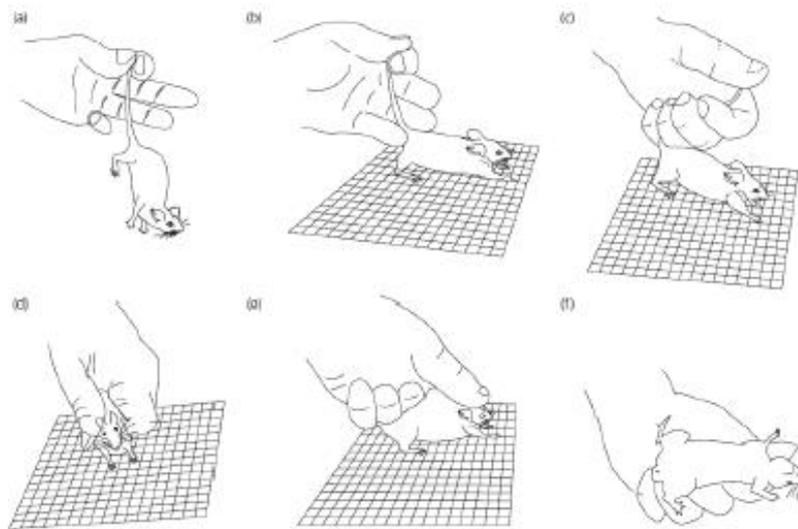
Penelitian ini menggunakan 28 tikus wistar jantan. Sebelum diberikan perlakuan, tikus diseleksi sesuai kriteria inklusi, bila tidak sesuai dengan kriteria maka tikus akan diganti. Tikus dibagi secara acak dalam 4 taraf perlakuan. Tikus di aklimatisasi dalam kandang pada laboratorium hewan coba selama 7 hari, dilanjutkan dengan pengkondisian kanker pada tikus berupa 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-7. Pada minggu ke-4 dan ke-7 dilakukan pengambilan sampel secara berturut-turut yaitu 12 tikus pada pembedahan pertama dan 16 tikus pada pembedahan kedua untuk analisi kadar *malondialdehyde* (MDA) pada tikus wistar jantan.

1. Persiapan Peneliti saat Menangani Hewan Coba

- a. Mengenakan jas labiratorium
- b. Mencuci tangan dengan sabun
- c. Memakai masker dan penutup kepala

2. Prosedur Pemegangan Tikus

- a. Gunakan alat pelindung diri antara lain jas lab, masker, penutup kepala dan sarung tangan.
- b. Selalu mencuci tangan sebelum dan setelah melakukan praktikum.
- c. Cara memegangnya yaitu, mengangkat tikus dengan cara memegang ekornya kearah atas dengan tangan kiri, dimiringkan 45° .
- d. Kemudian, tangan kiri, ibu jari dan jari telunjuk menjepit kulit tengkuk tikus seerat/setegang mungkin.
- e. Lalu, menjepit ekor diantara jari kelingking dan jari manis tangan kiri.
- f. Tikus telah terpegang oleh tangan kiri dan siap untuk diberi perlakuan (induksi Dietilnitrosamin).



Gambar 6. Prosedur Pemegangan Tikus Wistar (Stevani, 2016)

3. Pemeliharaan Hewan Percobaan

- a. Menyiapkan kandang tikus yang terbuat dari plastik dengan ukuran 40x60 cm dan diberi penutup yang terbuat dari kawat. Kemudian kandang tersebut diberi alas berupa sekam dan meletakkan wadah pakan dan minum.
- b. Adaptasi tikus dilakukan selama 7 hari dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan kondisi kandang untuk menghindari stress dan merasa nyaman.
- c. Pemberian pakan dan minum dilakukan setiap hari pada jam 13.00 selama 24 jam. Setiap tikus diberikan pakan 30g/hari dan minum 20 ml. Setelah 24 jam dilakukan penimbangan sisa pakan dan minum tikus. Wadah pakan dan botol minum dibersihkan setiap hari.
- d. Penimbangan berat badan tikus dilakukan seminggu sekali menggunakan timbangan digital. Hal ini dilakukan untuk mengontrol kesehatan dan berat badan tikus.
- e. Pembersihan kandang tikus dilakukan seminggu sekali setiap hari jumat agar terhindar dari penyakit serta dijaga kekeringannya.
- f. Suhu laboratorium berada pada suhu ruang yaitu 20-25 °C.

4. Induksi *Dietilnitrosamin* (DEN)

- a. Setelah aklimisasi selama 7 hari, tikus pada perlakuan P2, P3, dan P4 diinjeksi DEN oleh tenaga ahli dalam penyuntikan pada hewan.
- b. Penyuntikan DEN diberikan dosis yang diberikan yaitu 10-90 mg / Kg BB (Tolba dkk, 2015) sebanyak 2 cc secara intraperitoneal. Pemberian DEN dalam dosis 10 mg/kg berat badan tikus selama 3-4 minggu dapat menyebabkan perubahan fungsi hati dan terjadinya fibrosis.
- c. Penyuntikan DEN dilakukan selama 4 minggu dengan frekuensi 2 kali pemberian setiap minggu. Penyuntikan dilakukan pada setiap hari kamis dan senin.

5. Pemberian Perlakuan

- a. Kelompok kontrol negatif (P_1) : tikus wistar jantan normal dengan pemberian pakan 30 gram dan aqua 20 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 9 minggu.
- b. Kelompok kontrol positif (P_2) : tikus wistar jantan yang diinduksi 1 ml *dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram dan aqua sebanyak 20 ml.
- c. Kelompok perlakuan dosis rendah (P_3) : tikus wistar jantan yang diinduksi 1 ml *dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram dan 3 ml teh daun tapak dara.
- d. Kelompok perlakuan dosis tinggi (P_4) : tikus wistar jantan yang diinduksi 1 ml *dietilnitrosamin* (DEN) per pemberian dengan frekuensi 2 kali dalam 1 minggu. Pakan diberikan sebanyak 30 gram dan 6 ml teh daun tapak dara.

6. Proses Euthanasia Hewan Coba

Tikus wistar jantan dieuthanasia dengan metode anestesi inhalasi yaitu menggunakan bahan kimia berupa kloroform / ether. Euthanasia dilakukan dengan cara memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang berisi kapas yang sudah dicampur dengan kloroform (IACUC, 2015). Kloroform / ether dituang pada kapas sebanyak 10 ml, dan dimasukkan dalam toples kaca. Dilakukan pengamatan terhadap pernapasan dan denyut

jantung tikus + 15 detik, apabila tikus sudah tidak bernapas, maka sudah dapat dilakukan pembedahan dan pengambilan darah, dimana pada prinsipnya tikus harus terhindar dari rasa sakit (Ridwan, 2013).

7. Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah Hewan Coba

Pengambilan sampel darah akan dilakukan di minggu ke-4 dan ke-7 perlakuan terhadap hewan coba. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan pembedahan dan pengambilan darah dari jantung tikus wistar jantan menggunakan spuit. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dieuthanasia terlebih dahulu. Prosedur pembedahan dan pengambilan darah tikus wistar jantan serta sanitasi tikus akan disajikan pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Prosedur Pembedahan Dan Pengambilan Darah Tikus

No	Prosedur Kerja	Keterangan
1.	Tikus dibunuh dengan cara <i>cervical dislocation</i> (dislokasi leher), dengan <i>guillotine</i> ataupun dengan eter.	<ul style="list-style-type: none"> - Jika dengan cara <i>cervical dislocation</i> pastikan hewan uji terbunuh dengan cepat, jangan sampai menyiksa hewan uji. - Jika menggunakan eter, maka pastikan bahwa eter tidak menyebar keseluruh ruangan atau laboratorium.
2.	Posisikan tikus pada papan bedah menggunakan <i>pins</i> .	Pastikan tubuh tikus terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
3.	Bedah mulai dari bagian perut ataupun uterus menggunakan gunting bengkok.	Jika perlu, cukur bulu tikus pada bagian perut dan bersihkan sisa bulu dengan kapas yang dibasahi air.
4.	Setelah dibedah, ambil darah lewat jantung. Untuk pengambilan darah dapat dilakukan langsung dengan cara menusukkan jarum suntik langsung dan disedot perlahan (Yokozawa et al. 2002).	
5.	Dokumentasikan tiap tahap pembedahan.	

Tabel 3. Sanitasi Tikus

No.	Prosedur Kerja	Keterangan
1.	Masukkan semua sisa organ tikus yang tidak terpakai ke dalam kantong plastik.	Tutup rapat kantong plastik dan pastikan tidak ada bau yang keluar dari plastik.
2.	Sampah lain berupa plastik, kertas, dll yang tidak berhubungan dengan organ dibuang dalam kantong plastik tersendiri.	
3.	Bersihkan area kerja sisa pembedahan dengan sabun dan jika perlu semprot dengan alkohol.	Pastikan area kerja kembali bersih, bebas dari kotoran sisa pembedahan.

8. Penguburan Hewan Coba

Setelah hewan coba dibedah, harus dipastikan bahwa hewan coba tidak mengalami *recovery* (pemulihan). Sebelum dilakukan penguburan hewan coba, dipastikan bahwa denyut nadi sudah berhenti. Setelah dibedah, hewan coba akan dikuburkan dengan cara :

- a. Tikus dibungkus dengan polibag
- b. Tikus dimasukkan ke dalam lubang pada tanah yang kering dengan kedalaman 1 meter dan jarak minimal 250 meter dari sumber air.
- c. Masing-masing lubang berisi tidak lebih dari sepuluh ekor tikus

9. Pengukuran Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

Setelah dilakukan pengambilan darah pada tikus, darah disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lalu plasma darah dipisahkan dan diambil untuk analisis.

- a. Pembuatan kurva standar:
 - 1) Larutan stok pereaksi 1,1,3,3 tetrametoksiopropana (TMP) konsentrasi 6 M diencerkan menjadi 0,9; 0,8; 0,7; 0,5; 0,4; 0,3 ppm.
 - 2) Setiap konsentrasi TMP direaksikan dengan 1,0 mL TCA 20% dan 1,0 ml TBA 1% dalam pelarut asam glasial 50%.
 - 3) Semua larutan diinkubasi selama 45 menit pada suhu 95°C.
 - 4) Setelah didinginkan, larutan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 15 menit.

5) Supernatan pada lapisan atas diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofometer UV-Vis pada panjang gelombang 532,2 nm.

b. Pengukuran Sampel

1) Setiap konsentrasi sampel direaksikan dengan 1,0 mL TCA 20% dan 1,0 ml TBA 1% dalam pelarut asam glasial 50%.

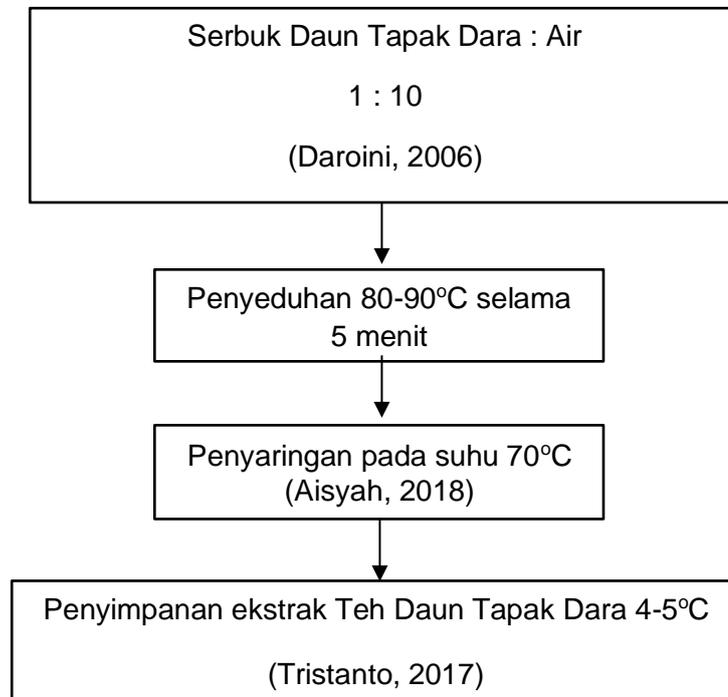
2) Kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu 95°C.

3) Setelah didinginkan, larutan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 15 menit.

4) Supernatan dipisahkan kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofometer UV-Vis pada panjang gelombang 532,2 nm.

5) Konsentrasi sampel diperoleh dengan memplot data absorbansi sampel kedalam kurva standar.

10. Pembuatan Teh Daun Tapak Dara



Gambar 7. Proses Pembuatan Teh Daun Tapak Dara

Kebutuhan teh Daun Tapak Dara adalah ± 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, simplisia 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.

11. Komposisi Pakan Normal Hewan Coba

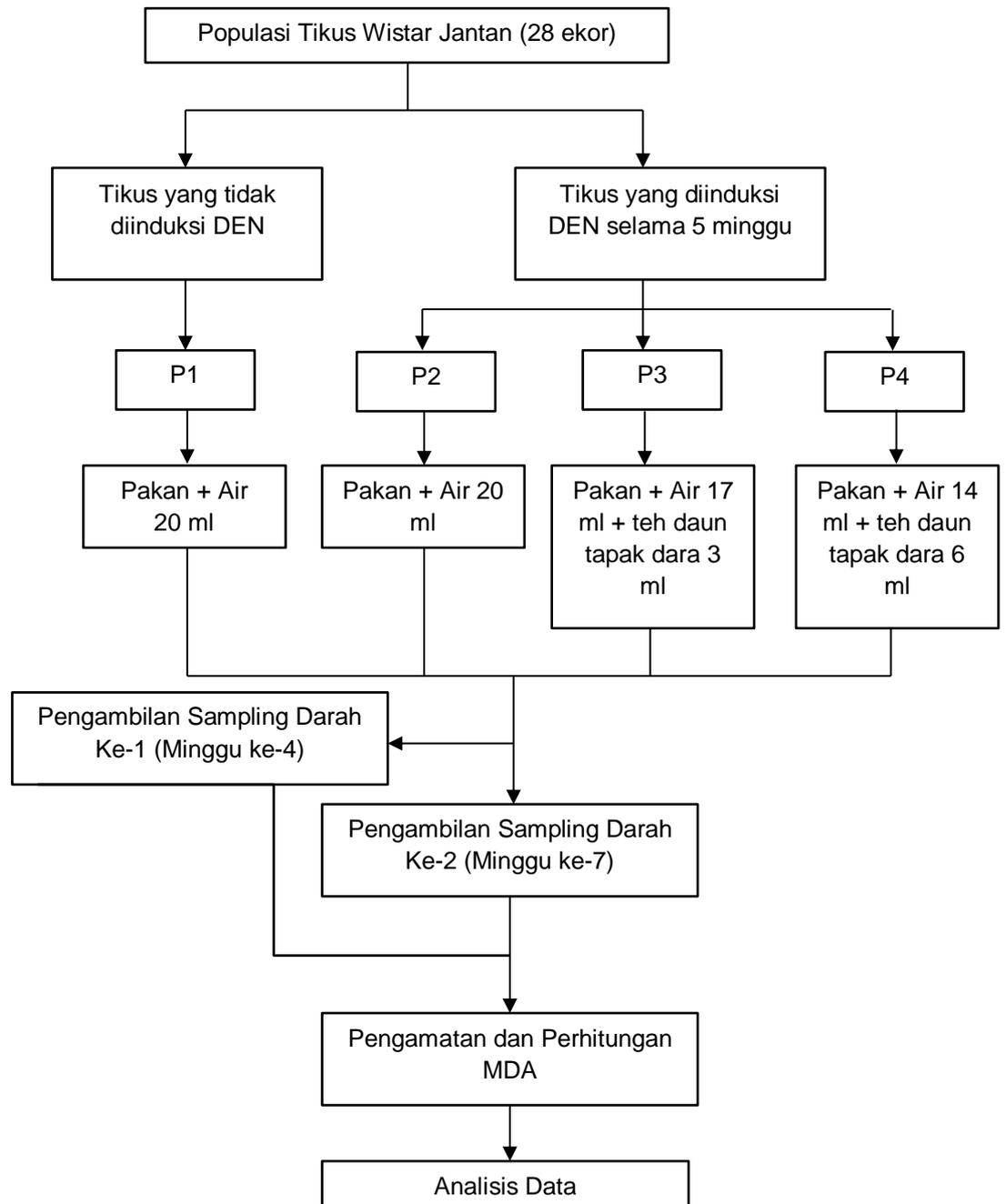
Pakan untuk tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan modifikasi yang berbahan dasar tepung jagung, tepung ikan, tepung tulang, tepung kedelai, tepung cang tanah, mineral mix, vitamin B kompleks, minyak goreng dan garam. Komposisi pakan tikus disajikan pada Tabel 2.

Tabel 4. 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
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.

H. Diagram Alir Penelitian



Gambar 8. Diagram Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Teh Daun Tapak Dara terhadap Kadar Malondialdehyde Tikus Wistar Jantan dengan Induksi *Diethylnitrosamin*.

I. Metode Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa kadar *Malondialdehyde* (MDA) tikus wistar jantan diperoleh melalui pemeriksaan laboratorium dari sampel darah tikus pada pembedahan minggu ke-5 dan minggu ke-9 melalui metode spektrofometri.

J. Metode Analisis Data

Semua data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata \pm standar error (Mean \pm SD). Data diolah dengan instrument penelitian berupa aplikasi SPSS 25 dan dilakukan beberapa uji yaitu :

1. Uji Normalitas Data

Data yang diperoleh akan dianalisis jika memiliki data berdistribusi normal dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila $p > 0,05$ maka akan didapatkan data berdistribusi normal.

2. Uji Varians

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

3. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar *malondialdehyde* (MDA) pada kelompok perlakuan yang berdistribusi normal dan varians data homogen menggunakan uji parametrik One Way ANOVA untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Namun jika data tidak berdistribusi normal dan varians tidak homogen, maka digunakan uji *Kruskal Wallis*.

4. Uji *Post Hoc* (Lanjutan)

Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh pada kadar *malondialdehyde* (MDA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata dari hasil uji One Way ANOVA yaitu $p < 0,05$, maka selanjutnya dilakukan uji beda *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

K. Instrumen Analisis Data Penelitian

Instrumen analisis data penelitian yaitu *Microsoft Word* 2010, *Microsoft Excel* 2010, SPSS 25, dan alat tulis.