

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan oleh peneliti adalah eskperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *pre test & post test control group design* yang menggunakan hewan uji sebagai subjek penelitian.

B. Populasi dan Sampel

Subjek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jenis kelamin jantan
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan ± 200 gram
4. Sehat (tikus bergerak aktif)

Kriteria eksklusi :

1. Terdapat abnormalitas anatomi yang nampak
2. Tikus tampak sakit, tidak bergerak secara aktif.

Besar sampel dihitung menggunakan rumus Federer, dimana (t) merupakan jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dan (n) adalah jumlah perlakuan. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

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

Sehingga dalam percobaan ini jumlah sampel minimal yang dibutuhkan per kelompok adalah sebagai berikut :

$$(n-1) \quad (t-1) \geq 15 \quad ; t = 5$$

$$(n-1) \quad (5-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 ; (n = 5)$$

Jumlah sampel yang digunakan peneliti minimal 5 ekor tikus putih per kelompok. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor tikus (*Rattus novergicus*) yang terbagi dalam 5 kelompok kontrol, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (P1): diberi makanan dan air selama 14 hari.
2. Kelompok kontrol positif (P2): diinduksi asap rokok, diberi air dan makanan tanpa pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) selama 14 hari.
3. Kelompok perlakuan 1 (P3): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 37,5 mg/kgBB dan tetap diberi air dan makanan selama 14 hari.

4. Kelompok perlakuan 2 (P4): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 75 mg/kgBB dan diberi air dan makanan selama 14 hari.
5. Kelompok perlakuan 3 (P5): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 112,5 mg/kgBB dan diberi air dan pakan standar selama 14 hari.

C. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

a. Variabel bebas

Ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)

b. Variabel tergantung

Kadar MDA Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jenis kelamin jantan

c. Variabel terkontrol

Ras, jenis kelamin, umur, berat badan, makanan, kandang tikus, dan induksi asap rokok.

2. Definisi Operasional

a. Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*)

Pembuatan ekstrak kulit buah jeruk (*Citrus sinensis*) di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dengan metode maserasi dilanjutkan dengan metode *rotary evaporator*. Buah yang digunakan adalah buah jeruk yang berasal dari supermarket Superindo.

b. MDA

Kadar MDA dapat dideteksi menggunakan *Tiobarbituric Acid* (TBA) dalam suasana asam berbentuk kromogen berwarna merah muda. Jumlah kromogen MDA-TBA yang terbentuk sangat tergantung pada jumlah deoksiribosa yang didegradasi. Semakin tinggi kadar deoksiribosa maka akan semakin tinggi pula absorbansi kromogen MDA-TBA. Absorbansi diukur menggunakan alat spektrofotometer.

c. Asap Rokok

Asap rokok berasal dari rokok kretek arus samping yang diinduksi dengan dosis 2 batang dalam sehari, selama 14 hari. Setiap kelompok terdiri dari 5 tikus dalam tempat pengasapan yang sama. Bagian bawah terdapat lubang sebagai tempat dimasukkannya rokok yang dibakar, pada bagian atas tempat pengasapan ditutup namun terdapat lubang untuk jalan keluarnya asap. Pengasapan dilakukan sampai dua batang rokok habis terbakar.

3. Instrumen Penelitian

a. Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain, kandang hewan percobaan, *bekker glass*, *rotary evaporator*, blender, timbangan digital, pipet sonde, *micro hematocrit*, *sentrifuge*, *eppendorf*, tabung reaksi, *micro pipet*, vortex, spektrofotometer.

b. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan penelitian antara lain : ekstrak kulit jeruk (Citrus sinensis), pakan tikus , akuades, etanol 70 % dan larutan *Thiobarbituric Acid (TBA)*.

D. Cara Pengumpulan Data

1. Pemilihan Subjek penelitian sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan.
2. Subjek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok pertama untuk kontrol negatif, kelompok ke dua untuk kelompok kontrol positif, kelompok ke tiga untuk perlakuan 1 (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 1 = 37,5 mg/kgBB), kelompok ke empat untuk perlakuan ke 2 (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 2 = 75 mg/kgBB), kelompok ke lima untuk perlakuan ke 3 (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 3 = 112,5 mg/kgBB).
3. Pembuatan ekstrak kulit jeruk manis dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Kulit jeruk dicuci bersih lalu dikeringkan dengan suhu 40⁰ C hingga kering, setelah kulit jeruk kering, maka selanjutnya diblender atau dihancurkan hingga menjadi serbuk atau menjadi simplisia. Simplisia sebanyak 100 gram dicampur dengan pelarut etanol 70% 800 ml lalu dimaserasi selama 48 jam sambil sesekali diaduk, selanjutnya disaring dan didapatkan dua hasil berupa ampas dan maserat, hasil maserasi atau maserat tersebut dimasukkan ke *rotary evaporator* dan akan menjadi ekstrak kental.

4. Kandang tikus individu dengan tempat pakan dan minum. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasi selama 3 hari dan diberi makan secara *ad libitum*.
5. Setelah dikontrol selama 3 hari induksi asap rokok dimulai pada hari ke 4. Selama 14 hari tikus diinduksi asap rokok dan diberi ekstrak kulit jeruk sesuai pembagian kelompok.
6. Pada hari ke 15, diambil darah lalu diperiksa kadar MDA masing-masing tikus tiap kelompok. Kadar MDA diperiksa dengan cara berikut :
 - a. Pemeriksaan kadar MDA setelah 14 hari perlakuan dimulai dengan pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* tikus sebanyak 1 ml, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* kemudian *disentrifuge* dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh plasma.
 - b. Kadar MDA ditentukan dengan metode *Thiobarbituric acidreactive substances* (TBARs).
 - c. Pemeriksaan darah MDA mengikuti metode yang dijabarkan Wuryastuti (1996) dalam *Indonesian food and nutrition progress, 2000 Vol. 7 no. 2*. Sebanyak 0,75 ml asam fosfat dimasukkan ke dalam tabung *polypropylene* yang telah beri 0,25 ml larutan *thiobarbituric acid* (TBA).
 - d. Selanjutnya 0,05 ml sampel plasma darah dimasukkan ke dalam tabung.
 - e. Ditambah dengan 0,45 ml air.

- f. Campuran di *vortex* selama 2 menit.
- g. Campuran dipanaskan dalam *water bath* selama 60 menit 100⁰C.
- h. Dinginkan campuran selama 1-2 jam hingga suhunya mencapai 30⁰C.
- i. Kemudian dimasukkan ke dalam *Sep-Park* C-18 dan dicuci dengan 5 ml methanol dan air.
- j. Tambahkan 4 ml methanol ke dalam campuran lalu masukkan ke *cuvet*.
- k. Supernatant dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.
- l. Dilakukan perhitungan dengan rumus :

$$\text{Kadar MDA Plasma} = (\Delta \text{ sampel} - a) : b$$

a dan b diperoleh dari fungsi linier $y = a + bx$ dari larutan standar. Sedangkan Δ sampel adalah hasil pembacaan absorbansi.

7. Setelah pemeriksaan kadar MDA *pre test*, dilakukan randomisasi pada hewan uji, dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan.

8. Pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok :

a. Kelompok I : kelompok kontrol negatif.

Selama 14 hari diberi pakan pelet dan air secara *ad libitum* tanpa pemberian induksi asap rokok dan ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*).

b. Kelompok II : Kelompok kontrol positif.

Selama 14 hari diberi air dan makanan (pakan) biasa dan 3 jam kemudian diberi induksi asap rokok dua batang perhari..

c. Kelompok III : Kelompok perlakuan 1 (dosis 1 = 37,5 mg/kgBB).

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 1 sebanyak 1 ml diberikan dengan sonde lambung diberi induksi asap rokok dua batang perhari.

d. Kelompok IV : Kelompok perlakuan 2 (dosis 2 = 75mg/kgBB).

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan suspensi ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 2 sebanyak 1 ml diberikan dengan sonde kemudian diberi induksi asap rokok dua batang perhari.

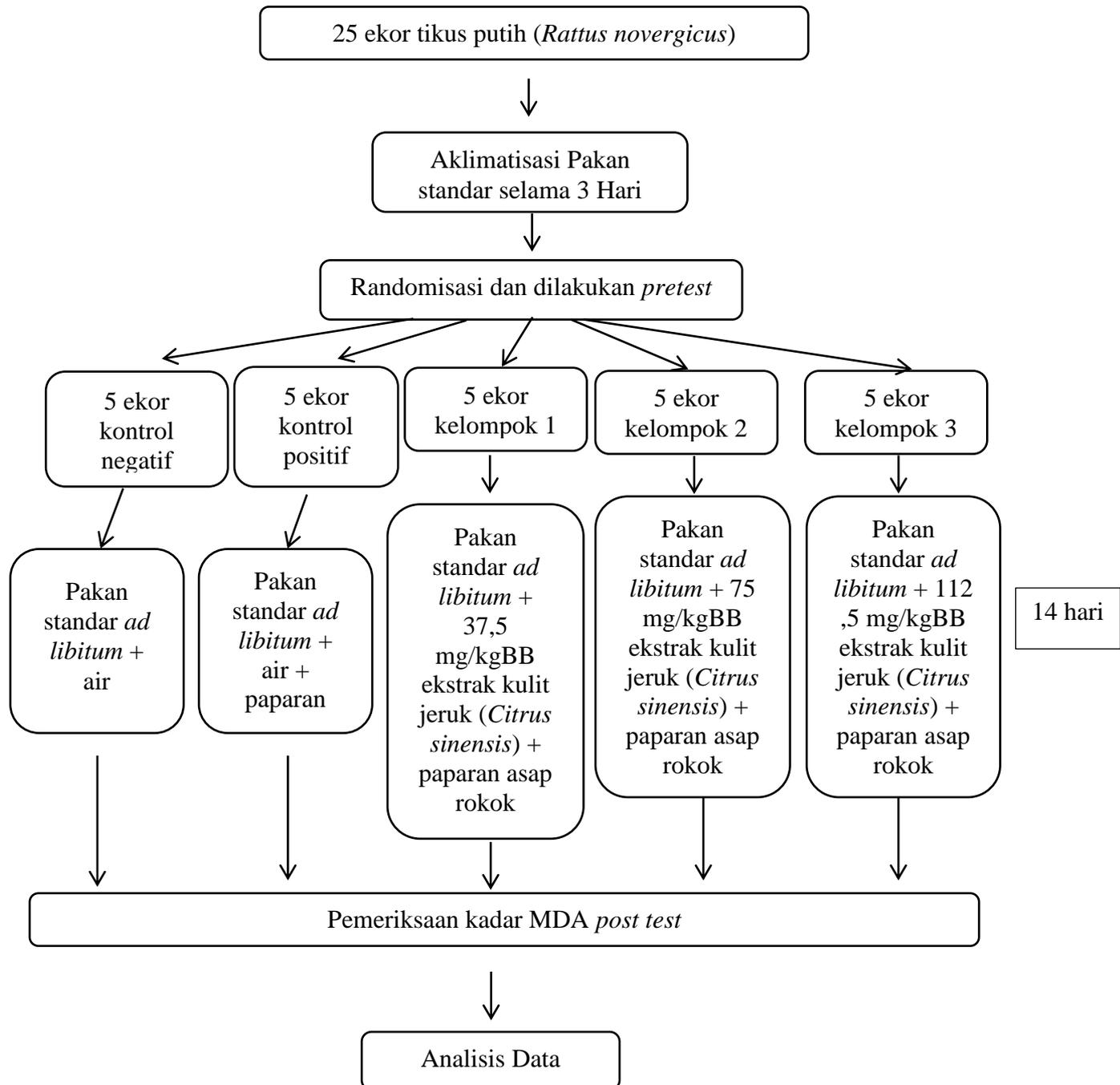
e. Kelompok V : Kelompok perlakuan 3 (dosis 3 = 112,5 mg/kgBB)

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan suspensi ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 3 sebanyak 1 ml diberikan dengan sonde lambung kemudian diberi induksi asap rokok dua batang perhari.

9. Pemeriksaan kadar MDA *post test*, darah setiap hewan uji diambil untuk mengetahui kadar MDA setelah diinduksi asap rokok.

10. Melakukan analisis data.

E. Bagan Alur Penelitian



Gambar 7. Bagan Alur Penelitian

F. Analisis Data

1. Pengolahan statistik dari data hasil penelitian kadar MDA plasma dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas data.
2. Selanjutnya, dilakukan uji statistik menggunakan uji *Wilcoxon* (karena data tidak terdistribusi normal) untuk mengetahui makna perbedaan kadar MDA plasma pada kelompok sebelum dan sesudah perlakuan.
3. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 25 sehingga uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk*. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah varian populasi homogen atau tidak.
4. Data diuji menggunakan *Mann-Whitney* untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

G. Kesulitan Penelitian

Kesulitan yang ditemui peneliti terkait dengan penelitian ini adalah mencari tempat penelitian yang mempunyai peralatan lengkap. Penelitian ini membutuhkan peralatan guna pembuatan ekstrak serta untuk hewan uji dibutuhkan kandang yang tepat, sehingga untuk mengatasi kesulitan tersebut peneliti memutuskan untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.