

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Subjek, Bahan, dan Alat Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Swiss Webster*, jenis kelamin jantan, berat antara 25-35 gram dan berumur 2-3 bulan, yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Teknologi Bandung (ITB) dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

1. Mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss Webster*
2. Berat badan 25-35 gram
3. Sehat (bergerak aktif, tidak ada luka, bulu bersih)
4. Usia 2-3 bulan

Kriteria eksklusi :

1. Penurunan berat badan $\geq 10\%$ pada saat adaptasi
2. Pernah dijadikan hewan percobaan sebelumnya

3.1.2 Sampel Penelitian

Jumlah sampel minimal yang akan digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Frederer seperti terlihat dibawah ini :

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

$$(r-1)(5-1) \geq 15$$

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan :

r = jumlah sampel

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas maka diperoleh hasil bahwa jumlah minimal hewan coba yang akan digunakan disetiap kelompok adalah 5 ekor, untuk mengantisipasi terjadi *drop out* maka tiap kelompok perlakuan ditambahkan sebanyak 10% menjadi 6 ekor. Jumlah total keseluruhan hewan coba yang akan digunakan pada 5 kelompok perlakuan yaitu 30 ekor.

3.1.3 Bahan Penelitian

- a. Daun sirsak (*Annona muricata Linn*) yang diambil adalah dari perkebunan sirsak Arborium Universitas Padjajaran. Daun yang diambil adalah daun yang

tidak terlalu tua dan tidak juga terlalu muda, yaitu daun yang terletak pada lembar keempat dari pucuk ke arah daun yang lebih tua.

- b. Kalium oksonat sebagai penginduksi hiperurisemia
- c. Jus hati ayam sebagai penginduksi hiperurisemia
- d. Allopurinol
- e. Aquadest
- f. Makanan standar mencit seperti pelet serta air minum
- g. Reagen *uric acid* FS TBHBA (2,4,6-tribromo-3hydroxybenzoic acid)

3.1.4 Alat Penelitian

- a. Kandang, tempat makan dan minum mencit
- b. Timbangan mencit
- c. Spuit injeksi
- d. Spuit oral
- e. Mikropipet ukuran 5-40 μ l
- f. Kompor
- g. Pisau
- h. Blender
- i. Ayakan
- j. NGT dan syringe
- k. Masker
- l. Sarung tangan

m. *Sentrifuge*



Gambar 3.1 Sentrifugasi

Dikutip dari: www.medicus-health.com

n. *Mikrotube sentrifuge*



Gambar 3.2 Microtub

Dikutip dari: www.djblabcare.co.uk

o. *Spektrofotometer*



Gambar 3.3 Spektrofotometer UV-VIS

Dikutip dari: www.wanibesak.wordpress.com

p. Panci



Gambar 3.4 Panci infusa

3.2 Metodologi Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Setelah mencit mengalami adaptasi dan masuk ke dalam kriteria inklusi dikelompokkan menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol, kelompok pembanding, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Fokus dari penelitian ini adalah untuk membandingkan efek pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dan allopurinol terhadap penurunan kadar asam urat dalam darah pada mencit model hiperurisemia.

3.3 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

3.3.1 Definisi Konsep Variabel

Variabel yang digunakan pada penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu:

- Variabel bebas (*independent*): infusa daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan allopurinol
- Variabel tidak bebas (*dependent*): kadar asam urat dalam darah mencit
- Variabel terkendali (*controlled*): jenis kelamin, umur, berat badan serta makanan dan minuman

3.3.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
1.	Asam urat	Produk akhir katabolisme purin atau degradasi asam nukleat dari sisa makanan yang kita konsumsi, normalnya untuk laki-laki 6,8 mg/dl dan untuk wanita 0,6 mg/dl.	Alat ukur asam urat	Nominal
2.	Hiperurisemia	Keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat darah diatas normal (>6,8 mg/dL). Hiperurisemia bisa terjadi karena peningkatan metabolisme asam urat (<i>overproduction</i>), penurunan pengeluaran asam urat urin (<i>underexcretion</i>), atau gabungan keduanya.	Alat ukur asam urat	Interval
3.	Allopurinol	Obat penyakit pirai (gout) yang dapat menurunkan kadar asam urat dalam darah. Dosis yang digunakan 100-300 mg/hari		Nominal
4.	Infusa daun sirsak (<i>Annona muricata</i> Linn)	Sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia (serbuk daun sirsak) dengan air pada suhu 90 ⁰ C selama 15 menit	Perbandingan	Interval
5.	Model hewan hiperurisemia	Sampel penelitian yang diinduksi kadium oksonat dan jus hati ayam		Nominal

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun. Daun tanaman sirsak diambil pada pukul 10.00-12.00 WIB di bawah sinar matahari yang cukup. Hal ini dikarenakan proses fotosintesis yang maksimal terjadi pada waktu tersebut. Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua dan tidak juga terlalu muda, yaitu daun yang terletak pada lembar keempat dari pucuk ke arah daun yang lebih tua. Hal ini bertujuan agar daun yang diperoleh dapat menghasilkan metabolit sekunder yang lebih banyak.²³

Daun yang rusak dan ditumbuhi jamur dipisahkan dari daun yang segar. Daun yang telah dipilih tersebut dicuci dengan air bersih dan mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran, selanjutnya daun dirajang untuk membantu mempercepat proses pengeringan. Rajangan dikeringkan di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam untuk mencegah kerusakan kandungan kimia tanaman yang disebabkan sinar UV dari matahari. Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat di simpan dalam waktu yang lebih lama. Pengeringan ini dapat mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga penurunan mutu atau perusakan simplisia dapat dicegah.²³

Pembuatan infusa menggunakan dua buah panci yang saling bertumpuk. Panci pertama diisi bahan yang akan diekstraksi, yaitu simplisia daun sirsak dan zat penyarinya, yaitu akuades. Panci pertama ini berada di dalam panci yang kedua. Panci kedua yang berkontak langsung dengan api hanya diisi air, sehingga panas yang

diterima oleh panci pertama hanya bersuhu 90°C saja ketika air pada panci kedua mendidih hingga 100°C. Kondisi ini diperlukan agar zat aktif dalam bahan yang diekstraksi tidak rusak oleh panas yang berlebihan. Infusa dibuat sesaat sebelum penelitian karena penyarian dengan cara infundasi menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan jamur.²³

3.4.2 Dosis Pemberian Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Berdasarkan penelitian Yora Florinda, 2012 tentang pengaruh pemberian air rebusan daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap kadar asam urat darah mencit putih jantan, volume pemberian air rebusan adalah 0,065 ml/20g BB, 0,13 ml/20g BB, dan 0,26 ml/20g BB sekali sehari secara per-oral selama 7 hari. Volume tersebut berasal dari daun sirsak segar sebanyak 3 lembar, 5 lembar, dan 10 lembar yang direbus dengan 150 ml aquadest menjadi 50 ml. 3,5,10 lembar daun sirsak, masing-masing di rebus dengan menggunakan air 36 ml. Rebusan air daun sirsak tersebut diberikan untuk 6 ekor mencit selama 3 hari, dengan setiap kali pemberian sebanyak 1 ml.²⁴

3.4.3 Pembuatan Jus Hati Ayam 50% ^b/_v

Hati ayam adalah salah satu jenis makanan yang tinggi protein yang dapat mengakibatkan peningkatan kadar asam urat di dalam darah, jus hati ayam pada penelitian kali ini di gunakan sebagai induksi hiperurisemia eksogen. Konsentrasi jus hati ayam dibuat dengan perbandingan 50% ^b/_v dengan cara mencampurkan 50 gram hati ayam, kemudian ditambahkan air hingga volumenya 100 ml.²⁴

3.4.4 Dosis Pemberian Kalium Oksonat

Kalium oksonat adalah suatu sediaan serbuk yang biasa digunakan sebagai induksi hiperurisemia endogen pada penelitian dengan menggunakan hewan coba mencit. Berdasarkan penelitian Rina Aryanti, 2007 tentang pengaruh infusa daun salam terhadap penurunan kadar asam urat, dosis kalium oksonat yang dapat menaikkan kadar asam urat darah yang tertinggi pada dosis 300 mg/kg BB atau 6 mg/20g BB.¹⁹ Dibuat larutan kalium oksonat 6 mg/0,6 ml dengan cara menimbang 300 mg kalium oksonat dilarutkan dalam NaCl 0,9% hingga volume 30 ml.¹⁹

3.4.5 Dosis pemberian Suspensi Allopurinol

Penelitian Rina Aryanti, 2007 tentang pengaruh infusa daun salam terhadap penurunan kadar asam urat, dosis allopurinol yang digunakan adalah 10 mg/kg BB atau 0,2 mg/20g BB.¹⁹

Dibuat konsentrasi 0,2 mg/0,5 ml dengan cara menimbang 80 mg serbuk allopurinol kemudian disuspensikan kedalam larutan Na CMC 0,5% sampai volume mencapai 200 ml.¹⁹

3.5 Alur Penelitian

Hewan percobaan pada penelitian ini adalah 30 ekor mencit jantan galur *Swiss Webster* yang sehat, berumur 2-3 bulan, dan beratnya 25-35 gram. Mencit yang digunakan adalah yang sehat, yaitu bila selama masa adaptasi berat badan mencit tidak berkurang lebih dari 10% dari berat badan awal dan perilakunya normal. Semua mencit ditimbang berat badannya. Sampel diambil dengan metode *simple random sampling* menjadi 5 kelompok sama banyak. Setiap masing-masing kelompok terdiri

dari 6 ekor mencit, sebelum dilakukan perlakuan semua mencit diadaptasikan selama 7 hari. Hari ke-8 semua kelompok mencit I-V diukur kadar asam urat darahnya sebagai indikator normal kadar asam urat pada mencit. Setelah pengambilan darah, pada hari ke-8 semua kelompok mencit diinduksi jus hati ayam dan kalium oksonat dosis 6mg/0,6ml selama 7 hari. Pada hari ke-15 semua kelompok mencit diukur kadar asam urat darahnya sebagai indikator peningkatan kadar asam urat. Pada hari ke-15 kelompok mencit I diberi pelet dan air, kelompok mencit II diberikan allopurinol dengan dosis 0,2 mg/0,5 ml, kelompok mencit III diberikan infusa daun sirsak dosis 0,065 mg/20g BB, kelompok mencit IV diberikan infusa daun sirsak dosis 0,13 mg/20g BB dan kelompok mencit V diberikan infusa daun sirsak dosis 0,26 mg/20g BB. Pada hari ke-22 semua kelompok mencit diukur kadar asam urat darahnya sebagai indikator penurunan asam urat.

Masing-masing kelompok yang sudah diinduksi kalium oksonat dan jus hati ayam selanjutnya diberikan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok I : Kelompok kontrol, pelet, dan aquades.
2. Kelompok II : Kelompok pembanding, diberi air, pelet, dan allopurinol dosis 0,2 mg/0,5 ml secara peroral.
3. Kelompok III : Kelompok perlakuan I, diberi air, pelet, dan infusa daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dosis 0,065 mg/20g BB 1x/hari.
4. Kelompok IV : Kelompok perlakuan II, diberi air, pelet, dan infusa daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dosis 0,13 mg/20g BB 1x/hari.

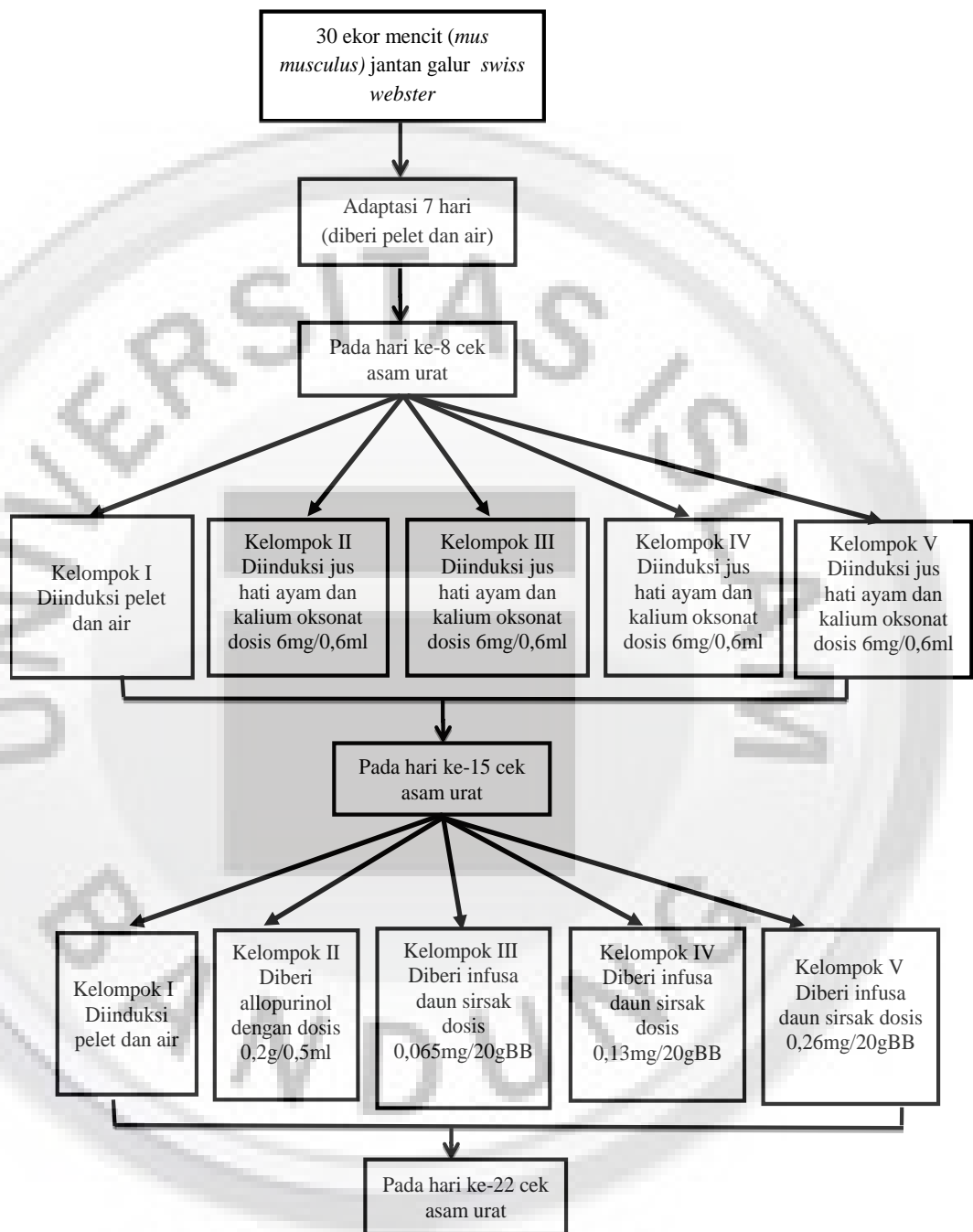
5. Kelompok V : Kelompok perlakuan III, diberi air, pelet, dan infusa daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dosis 0,26 mg/20g BB 1x/hari.

3.5.1 Pengambilan Darah Mencit

Pengambilan darah dengan cara memotong ekor mencit dilakukan sebanyak 3 kali yaitu, pertama setelah 7 hari adaptasi (Au0) sebagai indikator kadar normal asam urat pada mencit, kedua setelah diinduksi diet tinggi lemak seperti jus hati ayam dan kalium oksonat (Au1) sebagai indikator peningkatan asam urat, dan ketiga setelah pemberian allopurinol dan infusa daun sirsak (*Annona muricata Linn*) (Au2) sebagai indikator penurunan asam urat.

3.5.2 Pengukuran Asam Urat Darah Mencit

Pengambilan darah dilakukan dua jam setelah pemberian sediaan uji atau satu jam setelah induksi hiperurisemia, darah diambil dengan cara memotong ujung ekor mencit. Kadar asam urat ditetapkan berdasarkan reaksi enzimatik menggunakan reagen *uric acid* FS TBHBA, dengan cara 20 µl serum ditambah 1000 µl monoreagen yang dibuat dengan mencampurkan 4 bagian reagen 1 dan 1 bagian reagen 2. Serum darah yang telah dicampur homogen dengan pereaksi *uric acid* FS TBHBA diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37⁰C, kemudian larutan sampel, standar dan blanko dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.²⁰



Gambar 3.5 Bagan Alur Penelitian

3.6 Analisis Penelitian

Uji statistik yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 13*.

3.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Eyckman UNPAD pada bulan Maret sampai April tahun 2015.

3.8 Aspek Etik Penelitian

Ilmuwan penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip dalam protokol penelitian, yaitu: *replacement, reduction, dan refinement*.

Replacement adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).

Reduction diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa

dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistik yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.

Refinement adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.^{25,26}