

BAB III

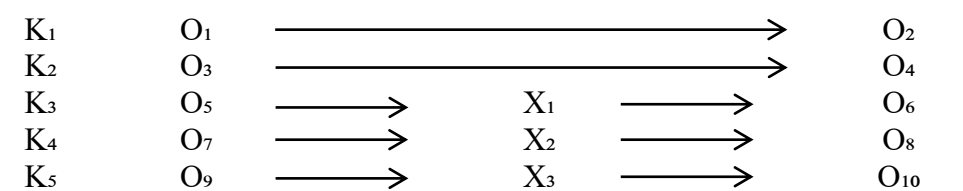
METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental murni dengan menggunakan hewan percobaan *in vivo* untuk mengetahui pengaruh pemberian jus nanas terhadap penurunan kadar asam urat pada tikus putih jantan hiperurisemia. Desain penelitian menggunakan *pre-post test with control group design* dengan menggunakan 5 kelompok yaitu kelompok tikus normal, kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2.

B. Rancangan Penelitian

Adapun gambaran dari rancangan penelitian ini dapat diilustrasikan sebagai berikut:



Gambar 6. Rancangan Percobaan *Pre-post Test with Control Group Design*

Keterangan:

- K₁ : Kelompok Tikus Normal
- K₂ : Kelompok Hiperurisemia Tanpa Perlakuan (Kontrol Negatif)
- K₃ : Kelompok Hiperurisemia + Pemberian Allopurinol (Kontrol Positif)
- K₄ : Kelompok Hiperurisemia + Perlakuan 1
- K₅ : Kelompok Hiperurisemia + Perlakuan 2
- O₁ : Kadar asam urat awal kelompok Normal (*pre-test*)
- O₂ : Kadar asam urat akhir kelompok Normal (*post-test*)

- O₃ : Kadar asam urat awal kelompok Hiperurisemia (*pre-test*)
 O₄ : Kadar asam urat akhir kelompok Hiperurisemia (*post-test*)
 O₅ : Kadar asam urat awal kelompok Hiperurisemia+Pemberian Allopurinol (*pre-test*)
 O₆ : Kadar asam urat akhir kelompok Hiperurisemia+ Pemberian Allopurinol (*post-test*)
 O₇ : Kadar asam urat awal kelompok Hiperurisemia+Perlakuan 1 (*pre-test*)
 O₈ : Kadar asam urat akhir kelompok Hiperurisemia+Perlakuan 1 (*post-test*)
 O₉ : Kadar asam urat awal kelompok Hiperurisemia+Perlakuan 2 (*pre-test*)
 O₁₀ : Kadar asam urat akhir kelompok Hiperurisemia+Perlakuan 2 (*post-test*)
 X₁ : Pemberian Allopurinol (1,8 mg/200g BB)
 X₂ : Perlakuan 1 (Pemberian jus nanas 3,6 ml/200 g BB)
 X₃ : Perlakuan 2 (Pemberian jus nanas 7,2 ml/200 g BB)

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Jumlah sampel setiap kelompok minimal 6 ekor tiap kelompok dan ditambahkan 10% untuk mengantisipasi adanya *drop out*. Penentuan sampel ditentukan dengan rumus Federer, sebagai berikut:

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

Keterangan:

n : Besar sampel tiap kelompok

t : Banyaknya kelompok perlakuan pada sampel

Berdasarkan rumus perhitungan jumlah sampel menurut Federer (1977), maka jumlah sampel yang dibutuhkan:

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Jumlah sampel tikus yang dibutuhkan pada setiap kelompok adalah sebanyak 6 ekor termasuk dari perhitungan 10%, sehingga total sampel tikus putih jantan galur wistar yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus untuk 5 kelompok. Tikus ditempatkan pada 5 kandang yang berbeda sesuai dengan kelompoknya kemudian diberi tanda yang berbeda untuk membedakan antar kelompok. Adapun kriteria sampel dalam penelitian ini antara lain:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus putih jantan galur Wistar sehat usia 2 bulan
- 2) Berat badan sebelum perlakuan 150-200 gram
- 3) Tingkah laku dan aktivitas normal

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Pasca induksi asam urat tidak sehat

c. Kriteria *Drop Out*

- 1) Tikus mati selama berlangsungnya penelitian

2. Objek Penelitian

Objek yang digunakan pada penelitian ini berupa jus nanas (*Ananas comosus L. Merr*). Buah nanas yang digunakan dalam

penelitian ini adalah nanas yang diperoleh dari pasar, kemudian nanas dibersihkan dan diolah menjadi jus.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Maret 2023. Penelitian hewan uji dilaksanakan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian jus nanas (*Ananas comosus L. Merr*)

2. Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar asam urat pada tikus putih jantan galur Wistar.

3. Variabel Kontrol

a. Pemeliharaan hewan uji

1. Faktor lingkungan
2. Pemberian pakan

b. Hewan uji

1. Faktor stress
2. Jenis kelamin
3. Berat badan

4. Umur

c. Proses pembuatan formula jus nanas

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Skala Data
Variabel Bebas	Pemberian jus nanas (<i>Ananas comosus L. Merr</i>) adalah sesuatu yang diberikan berupa cairan yang terdapat secara alami dalam buah-buahan yang diperoleh dengan cara di blender. Jus nanas yang dihasilkan kemudian akan diberikan pada tikus.	X ₂ : Perlakuan 1 (Pemberian jus nanas 3,6 ml/200 g BB) X ₃ : Perlakuan 2 (Pemberian jus nanas 7,2 ml/200 g BB)	Nominal
Variabel Terikat	Kadar asam urat adalah banyaknya asam urat dalam darah. Pemeriksaan kadar asam urat dilakukan pada tikus putih dengan menggunakan metode <i>enzymatic colorimetric test</i> di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kadar asam urat diambil sebelum perlakuan yaitu pada hari pertama setelah diinduksi kalium oksonat 50 mg/200 g BB dan setelah perlakuan pemberian jus nanas dan allopurinol pada hari ke 14.	mg/dl	Rasio

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Berdasarkan sumbernya, data primer adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan oleh peneliti yang didapat dari hasil penelitian yang dilakukan yakni:

1. Berat badan tikus diperoleh dengan cara menimbang tikus menggunakan timbangan berat badan.
2. Umur tikus yakni 2 bulan, dikarenakan pada umur tersebut tikus sudah memasuki fase dewasa.
3. Kadar asam urat tikus dengan menggunakan metode *enzymatic colorimetric test*.
4. Pemberian jus nanas diperoleh dari buah nanas yang diblender.

Teknik yang digunakan dalam pengumpulan data adalah dengan melakukan pemeriksaan kadar asam urat pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) hiperurisemia setelah diberikan jus nanas dan alluporinol.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

a. Pemeliharaan hewan uji

Kandang individu, peralatan pakan dan minum, timbangan digital.

b. Pengambilan darah

Mikrohematokrit, tabung mikrosentrifus, pipa kapiler

c. Pemeriksaan kadar asam urat darah

Spektrofotometer, mikropipet, sentrifus, tabung reaksi, rak tabung reaksi, reagen pemeriksaan kadar asam urat

d. Pembuatan jus nanas

Blender, telenan, pisau, timbangan digital

2. Bahan Penelitian

Kalium oksalat 50 mg/200 g BB, Allopurinol 1,8 mg/200 g BB, buah nanas varietas *queen* dari Bogor yang masak, dan tikus jantan putih galur wistar (*Rattus norvegicus*).

3. Cara Pembuatan Jus Nanas

a. Potong batang nanas terlebih dahulu

b. Kemudian kupas nanas, mulai dari atas nanas dan iris melalui kulit luar hingga mencapai bagian bawah

c. Buang mata nanas dalam garis diagonal

d. Kemudian cuci bersih buah nanas, dan potong-potong menjadi beberapa bagian

e. Masukkan 100 gram nanas ke dalam blender yang sudah dicuci bersih, tambah 100 ml aquades

f. Kemudian blender sampai halus

g. Tuang ke gelas penyimpanan

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium tempat penelitian dan diberi pakan standard AD II 20 gram tiap tikus serta minum 150 ml dengan sistem *ad libitum* selama 7 hari.

b. Penentuan Dosis Jus Nanas

Penetapan dosis jus nanas ini berdasarkan pada penelitian sebelumnya. Pada penelitian (Pratiwi, 2022) menggunakan buah nanas sebanyak 150 gram, dan terbukti dapat menurunkan kadar asam urat pada manusia. Dosis aman buah nanas yang dikonsumsi manusia yaitu 2x/hari x 100 gram setara dengan 200 gram/hari (Sabella, 2010). Konversi dosis manusia (70 kg) ke tikus putih (200 g) adalah 0,018 berdasarkan tabel konversi Laurence dan Bacharach (1964), sehingga peneliti memutuskan untuk menggunakan dosis sebesar:

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis 1 jus nanas} &= 100 \text{ g} \times \text{konversi} \\
 &= 100 \text{ g} \times 0,018 \\
 &= 1,8 \text{ g}/200 \text{ g BB} + \text{Aquades} \\
 &= 1,8 \text{ g}/200 \text{ g BB} + 1,8 \text{ ml} \\
 &= 3,6 \text{ ml}/200 \text{ g BB}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis 2 jus nanas} &= 1,8 \text{ g}/200 \text{ g BB} \times 2 \\ &= 3,6 \text{ g}/200 \text{ g BB} + \text{Aquades} \\ &= 3,6 \text{ g}/200 \text{ g BB} + 3,6 \text{ ml} \\ &= 7,2 \text{ ml}/200 \text{ g BB}\end{aligned}$$

c. Dosis Allopurinol

Dosis allopurinol untuk asam urat pada manusia dewasa adalah 100 mg (Sahensolar, 2023). Konversi dosis manusia (70 kg) ke tikus putih (200 g) adalah 0,018. Maka perhitungan dosisnya sebagai berikut:

$$0,018 \times 100 \text{ mg} = 1,8 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$$

Jadi, dosis allopurinol pada tikus adalah 1,8 mg/200 g BB.

Uji keseragaman bobot tablet dengan menimbang 20 tablet allopurinol 100 mg yang digerus, kemudian timbang berat serbuk dan dihitung bobot rata-ratanya (Depkes RI, 1995). Larutan stok allopurinol dibuat dengan menimbang allopurinol, kemudian dicampurkan dengan larutan CMC 1% sebanyak 10 mL di dalam labu ukur kemudian dihomogenkan dengan sonifikator selama 5 menit. Jika sudah homogen disimpan dalam wadah dan diberi tanda (Chintia, 2020).

d. Dosis Kalium Oksonat

Kondisi hiperurisemia dibuat dengan menginduksi masing-masing tikus putih menggunakan kalium oksonat. Dosis

kalium oksonat bagi manusia adalah 250 mg untuk tikus 200 gram (Chintia, 2020), maka dosis kalium oksonat:

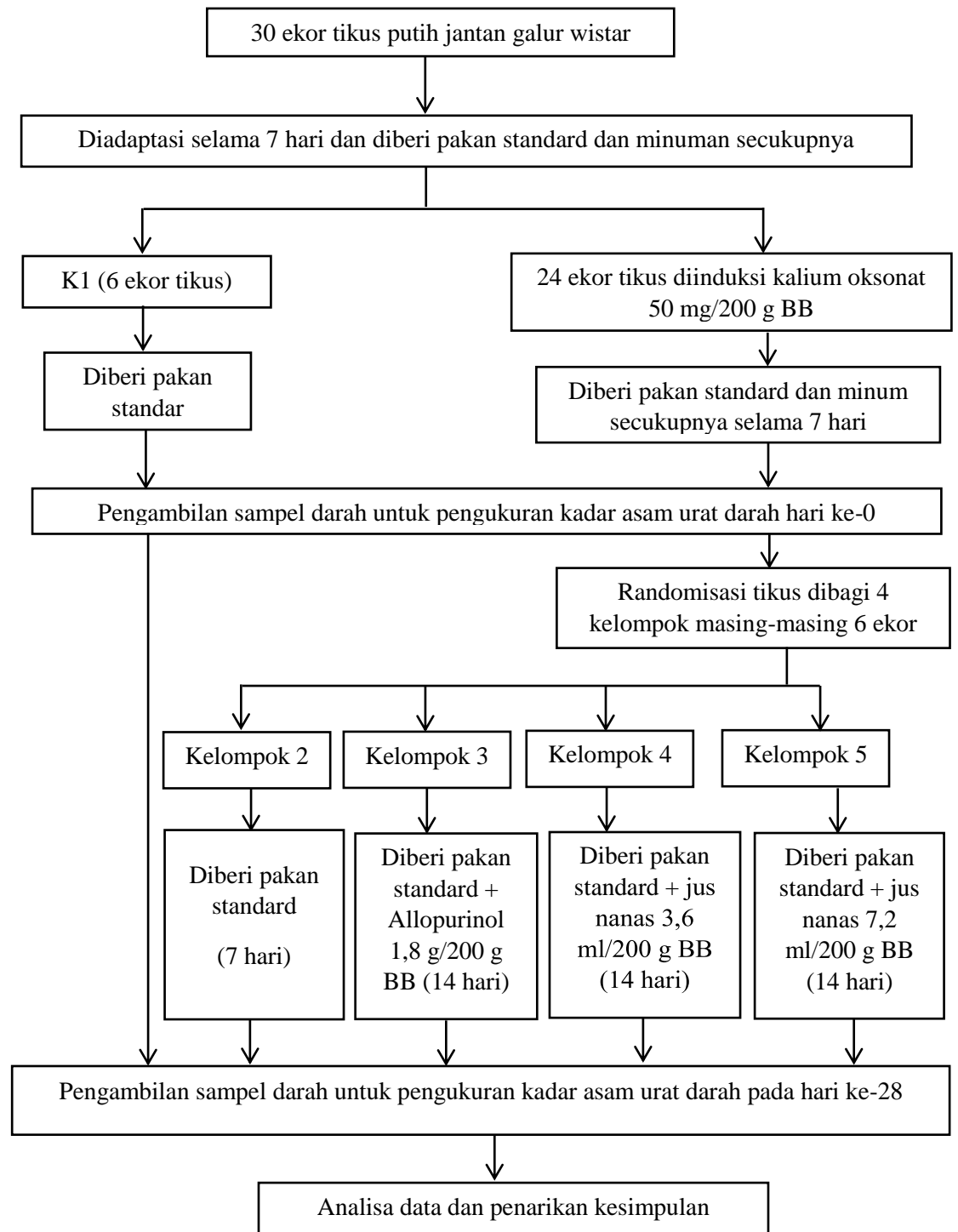
$$\frac{250 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} = \frac{250}{5} = 50 \text{ mg}$$

Jadi, dosis kalium oksonat pada tikus putih adalah 50 mg/200 g, kemudian ditambahkan kedalam 1 mL aquades steril dan diberikan secara intraperitoneal (Sahensolar, 2023).

2. Tahap Pelaksanaan

- a. Setelah tikus diadaptasi selama 7 hari, tikus dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok yang tidak diinduksi kalium oksonat sebanyak 6 ekor dan kelompok yang diinduksi kalium oksonat sebanyak 24 ekor. Kemudian diberikan pakan standard dan minum secukupnya selama 7 hari.
- b. Tikus yang tidak diinduksi kalium oksonat diberi kode sebagai kelompok 1 (kontrol normal).
- c. Tikus yang diinduksi kalium oksonat dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok 2,3,4, dan 5.
- d. Tikus dipisahkan di tiap kandang untuk mengendalikan faktor stress dan lingkungan. Pakan standard AD II 20 gram dan minum 150 ml diberikan dengan jumlah yang sama tiap tikus untuk mengendalikan faktor pakan.
- e. Darah diambil untuk sampel pengukuran kadar asam urat sebelum (*pre-test*) diberikan perlakuan pada setiap kelompok.

- f. Kelompok 2 hanya diberi pakan standar saja, kelompok 3 diberikan allopurinol 1,8 g/200g BB, kelompok 4 diberikan jus nanas 3,6 ml/200 g BB, dan kelompok 5 diberikan jus nanas 7,2 ml/200 g BB selama 14 hari. Selama 14 hari ini tetap diberikan pakan standard AD II dan minum *ad libitum*.
 - g. Darah diambil untuk sampel pengukuran kadar asam urat setelah pemberian jus nanas dan allopurinol selama 14 hari. Darah diambil melalui *vena orbitalis* ditampung dalam tabung mikrosentrifus, kemudian disentrifus untuk diambil serum.
3. Kadar asam urat dalam serum ditetapkan dengan metode *Enzymatic Colorimetric Test*.
 4. Prosedur Penelitian
Data diperoleh dengan prosedur seperti pada Gambar 7.



Gambar 7. Prosedur Penelitian

J. Manajemen Data

1. Pengolahan Data

a. Editing

Pada tahap ini dilakukan pengecekan terhadap data kadar asam urat sebelum dan sesudah perlakuan untuk mengetahui apakah ada kesalahan atau kekurangan.

b. Coding

Pada tahap ini memberikan kode dari masing-masing data sehingga memudahkan untuk memasukkan data ke dalam SPSS.

c. Entry Data

Pada tahap ini memasukkan data kadar asam urat sebelum dan sesudah perlakuan yang disajikan dalam bentuk tabel, dan gambar grafik dengan menggunakan aplikasi SPSS, dan Microsoft Excel.

d. Cleaning

Pada tahap ini melakukan pengecekan kelengkapan data untuk memastikan tidak ada kesalahan untuk selanjutnya dilakukan analisa data.

2. Analisis Data

Data penelitian dianalisis menggunakan program aplikasi IBM SPSS *Statistics* 21. Pengujian normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk* karena jumlah sampel dalam penelitian termasuk kecil yaitu 30 sampel atau <50 . Bila asumsi parametrik terpenuhi (data

terdistribusi normal), kemudian dilakukan uji *Paired T-test* untuk melihat beda kadar asam urat tikus putih hiperurisemia antar kelompok sebelum dan sesudah diberi perlakuan. Uji *One-way Anova* untuk melihat secara umum beda rerata kadar asam urat tikus putih hiperurisemia pada semua kelompok sesudah diberikan perlakuan, apabila hasil uji *One-way Anova* signifikan ($p < 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji *Post-hoc LSD* untuk melihat kelompok perlakuan yang paling efektif dengan tingkat kepercayaan 95%.

K. Etika Penelitian

Sesuai dengan *ethical clearance* terdapat pendekatan yang perlu dipertimbangkan. Adapun prinsip penelitian dengan hewan uji harus memenuhi 3R, yaitu:

1. *Replecement* merupakan penggunaan hewan uji yang sudah diperhitungkan secara seksama sesuai dari literature. Penggunaan hewan uji pada penelitian ini yaitu sebanyak 30 ekor tikus.
2. *Reduction* artinya dilakukan dengan meminimalisir hewan agar menciptakan lingkungan bebas dari ketakutan yang dapat mencegah stress, tikus diadaptasikan selama 3 hari sebelum diberikan perlakuan.
3. *Refinement* artinya memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti dan

meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan, sehingga menjamin kesejahteraan hewan uji sampai akhir penelitian dengan melakukan prosedur secara benar oleh tenaga/teknisi yang terlatih. Pada penelitian ini menggunakan hewan uji, dan penelitian ini sudah lulus kaji etik yang dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Poltekkes Kemenkes Yogyakarta No. DP.04.03/e-KEPK.2/564/2023 pada tanggal 17 Mei 2023 (Lampiran 1. Surat Layak Etik).