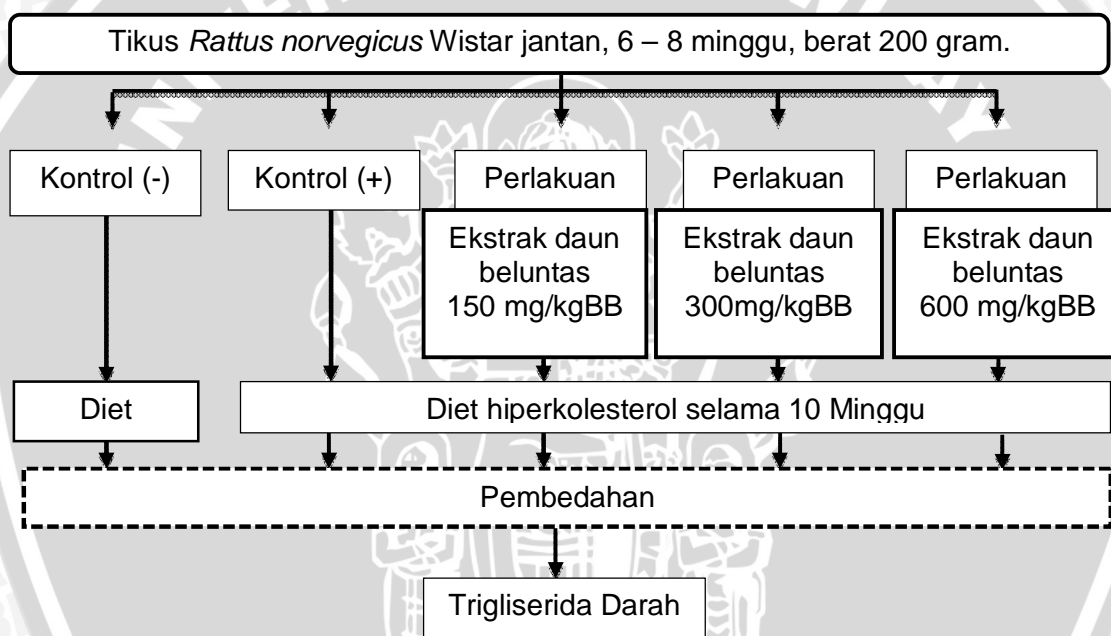


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) secara in vivo di laboratorium menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.



**Bagan 4.1. Rancangan penelitian**

Keterangan:

1. Kontrol negatif (n=6): tikus sehat (diet normal) tanpa diberikan perlakuan apapun.
2. Kontrol positif (n=6): tikus diberikan diet hiperkolesterol tanpa ekstrak daun beluntas
3. Perlakuan 1(n=6): tikus diberikan diet hiperkolesterol dan ekstrak daun beluntas 150 mg/kgBB.
4. Perlakuan 2 (n=6): tikus diberikan diet hiperkolesterol dan ekstrak daun beluntas 300 mg/kgBB
5. Perlakuan 3 (n=6): tikus diberikan diet hiperkolesterol dan ekstrak daun beluntas 600 mg/kgBB



Desain pemberian dosis ekstrak daun beluntas mengacu pada penelitian Pulio *et al.* (2014). Ekstrak daun beluntas diberikan setiap hari dan penelitian Roslida *et al.* (2008) dimana efek penghambatan prostaglandin efektif pada dosis 300mg/kgBB.

#### 4.2 Karakteristik dan Jumlah Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan usia 6-8 minggu dengan berat 200 gram dalam kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif. Diet hiperkolesterol yang diberikan adalah modifikasi diet pada hewan coba tikus putih untuk induksi sel busa (Murwani *et al.*, 2006). Minum yang diberikan berupa air keran Laboratorium Farmakologi FKUB yang diberikan dalam botol khusus untuk tikus. Lingkungan tempat tinggal 1 tikus 1 kandang sekam. Terbuat dari bak plastik ukuran 20x30cm dan tinggi 20 cm ditutup kawat dengan suhu ruang, pencahayaan, dan perawatan yang sama.

Jumlah sampel dicari menggunakan rumus Federer (1991) mengacu pada penelitian David dan Arkeman (2008):  $(n-1)(t-1) > 15$ ; di mana  $t$  = banyak kelompok perlakuan;  $n$  = jumlah sampel.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan ( $t$ ) = 5, sehingga didapat nilai  $n$  sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) \geq 15 ; (n-1)(5-1) \geq 15 ; (n-1)4 \geq 15 ; n-1 = 3,75 ; n = 4,75 \approx 5$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor tikus dan sampel total minimal sejumlah 25 ekor tikus. Namun, untuk menghindari *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati dilakukan koreksi. Rumus koreksi =  $1/(1-f)$ , di mana  $f$  adalah proporsi unit eksperimen yang hilang atau mengundurkan diri atau *drop out* (Budijanto, 2014).

Kemungkinan mati adalah  $1/5 = 20\% = 0,2$ . Sehingga  $1/(1-0,2) = 1/0,8 = 1,25$ . Maka untuk menghindari *lose of sample*, jumlah minimal per kelompok adalah  $4,75 + 1,25 = 6$  ekor per kelompok. Sampel total tikus yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus menggunakan *simple random sampling*.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian dibedakan menjadi variable dependen (variable terikat), variable kontrol, dan variable independen (variabel bebas)

##### **4.3.1 Variabel Dependen**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun beluntas dalam tiga kelompok yang berbeda. Kelompok I dengan dosis 150mg/kgBB. Kelompok II dengan dosis 300mg/kgBB. Kelompok III dengan dosis 600mg/kgBB selama 70 hari.

##### **4.3.2 Variabel Kontrol**

Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi selama 1 minggu dengan pemberian diet normal pada semua kelompok. Suhu, ruang, pencahayaan dikondisikan sama untuk menjaga homogenitas sampel.

##### **4.3.3 Variabel Independen**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar trigliserida pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai sejak lulus komisi etik dan berlangsung selama 10 minggu (Cortés-Ortiz, 2014).



#### **4.5 Alat dan Bahan**

##### **4.5.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba**

Alat : kandang berupa baskom dengan ukuran 20 cm x 30 cm x 20 cm dengan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat sebanyak 30 buah, botol minum tikus 30 buah, timbangan analitik, handscone, dan pembersih kandang. Bahan : sekam dan air minum untuk tikus.

##### **4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ransum Diet Hiperkolesterol**

Alat: timbangan analitik , baskom, gelas ukur. Bahan diet hiperkolesterol: pars terigu, lemak kambing, minyak kelapa, minyak babi, asam cholat dan 150 ml air.

##### **4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak**

Alat : timbangan analitik, penghitung waktu, wadah plastik 2 buah, blender, pengayak, rotary evaporator, oven, tabung reaksi, serial tube dilution 3 buah, pipet tetes, spatula. Bahan untuk 1x ekstraksi: daun beluntas 100 gram , 900 ml etanol 95 %.

##### **4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pemberian Ekstrak**

Alat : semprit injeksi 1 ml, NGT no 3,5. Bahan : ekstrak daun beluntas

##### **4.5.5 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus**

Alat : gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, dan vacuotainer 25 buah. Bahan : kloroform 20 ml, formalin 10 % 200 ml, alkohol, dan es.

##### **4.5.6 Alat dan Bahan untuk Pengecekan Trigliserida**

Alat :spuit disposable, rak tabung sentrifuse, tabung reaksi, mikropipet 1000µl, 100 µl, fotometer mikrolab 200, spektrofotometer. Bahan : serum, reagen trigliserida.

## 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel Independen: Ekstrak Daun Beluntas	Daun Beluntas ( <i>Pluchea indica</i> ) diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Daun beluntas diekstrak menjadi pasta kental dan didiamkan dalam suhu ruangan untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian disimpan dalam suhu 4 <sup>0</sup> (Roslida <i>et al.</i> , 2008). Dosis I 150mg/kgBB dan dosis II 300mg/kgBB masing-masing dilarutkan dalam 1cc aquades per administrasi. Sementara dosis III 600mg/kgBB dilarutkan dalam 2cc aquades per administrasi.	mg/cc	Kategorik
	Diet Hiperkolesterol	Diet diberikan setiap sore hari dengan komposisi pars terigu, lemak kambing, minyak babi, minyak kelapa dan asam cholat. Diet dicampur sedikit air dan dibentuk terlebih dahulu sebelum dimasukkan kedalam kandang sekam. Tiap tikus mendapatkan 40gr/hari	-	Kategorik
2	Variabel Dependen: Trigliserida	Perhitungan kadar trigliserida dilakukan dengan pengambilan spesimen darah pada hari pembedahan tikus di akhir perlakuan. Bersamaan dengan itu preparat yang lain juga diambil untuk penelitian histo-PA lainnya. Darah diambil melalui jantung sebanyak 5cc dan dimasukkan dalam tabung vakum dan dibiarkan sedikit menggumpal. Selanjutnya dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik untuk dilihat serum total kolesterolnya dengan metode enzimatik menggunakan spektrofotometri.	mg/dL	Numerik

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Perawatan Hewan Coba

Perawatan tikus mengacu pada penelitian Pulio *et al* (2014). Tikus wistar sebanyak 25 ekor dan 5 ekor sebagai cadangan (1 kelompok terdapat



1 ekor cadangan) dirawat dalam kandang masing–masing satu tikus satu kandang. Makan dan minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti 1 minggu 2x dan BB tikus ditimbang setiap minggunya.

#### 4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Ransum Diet Hiperkolesterol

Diet hiperkolesterol merupakan diet yang diberikan kepada kelompok perlakuan dan kontrol positif untuk mengkondisikan hewan coba terpapar kolesterol tinggi secara kronis dengan komposisi sebagai berikut:

**Tabel 4.2 Komposisi Diet Hiperkolesterol Lab. Farmakologi FKUB**

BAHAN	BERAT	KET.
Lemak Kambing	4 gram × 24 ekor = 96 gram	<b>Diet = 40 gram/ekor/hari</b>
Minyak Kelapa	2 gram × 24 ekor = 48 gram	
Minyak Babi	3,22 gram × 24 ekor = 77,28 gram	
Asam Cholat	0,06 gram × 24 ekor = 1,44 gram	
Pars Terigu	30 gram × 24 ekor = 720 gram	
<b>TOTAL</b>	<b>942,72 gram</b>	

Diet yang digunakan untuk kelompok normal adalah comfeed PARS 22,5 gr, terigu 10gr dan air 10 ml untuk 1 ekor tikus (Murwani *et al.*, 2006). Mekanisme pemberian diet tiap harinya tepat sebelum penyondean ekstrak dilakukan. Diet sebelumnya ditimbang sebesar 40gram/tikus dan dibentuk bulatan untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam kandang. Diet diberikan pada sore hari secara konsisten. Hal ini dikarenakan tikus lebih aktif pada malam hari.

#### 4.7.3 Pembuatan Ekstrak

Daun beluntas diambil sebanyak 2 kg. Daun diambil mulai daun ke-4 sampai dengan ke-15 dari puncak. Daun beluntas kemudian dicuci dengan

air bersih, lalu ditiriskan. Selanjutnya daun dikeringkan dalam oven pada suhu 37°C selama  $\pm 5$  hari. Daun yang telah kering dihaluskan dengan blender sampai menjadi tepung. Tepung daun beluntas ditimbang sebanyak 228 gram. Diambil 100 gram, kemudian direndam dengan 900 ml etanol 95% dikocok 10-15 menit dan dimaserasi selama 48 jam terlindung dari cahaya. Setelah direndam 48 jam, larutan tersebut disaring dengan kain penyaring lalu etanol diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga zat terlarutnya mengendap. Konsentrat yang masih mengandung air dikeringkan mulai suhu ruang sampai didapatkan ekstrak pekat. Selanjutnya diencerkan dengan aquades sesuai dosis yang diinginkan (Roslida *et al.*, 2008).

#### **4.7.4 Pengambilan Sampel Darah**

##### **4.7.4.1 Persiapan dan Pembedahan Tikus**

Sebelum pembedahan, tikus dipuasakan selama 12 jam. Pembedahan diawali dengan pemberian anastesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Hal ini bertujuan untuk mengurangi rasa nyeri tikus yang akan dilakukan pembedahan. Tikus dieutanasia dan setelah dipastikan sudah tidak sadar, tikus kemudian difiksasi dengan jarum di atas papan. Tikus dibedah dengan cepat. Darah diambil dengan spuit 3 cc melalui jantung dan organ-organ yang penting seperti hepar, limpa dan aorta diambil untuk penelitian histo-PA lainnya (Astawan *et al.*, 2011).

##### **4.7.4.2 Pertimbangan Etik**

Penggunaan hewan coba untuk penelitian diatur oleh Komisi Nasional Etik Penelitian Kesehatan (2003) harus memperhatikan prinsip 3R. Reduction: mengurangi pemanfaatan jumlah hewan sesedikit mungkin, tidak mengulangi penelitian hewan coba bila tidak perlu. Refinement: mengurangi



rasa nyeri, ketidaknyamanan dan kesusahan hewan coba sebelum, selama, dan setelah penelitian. Termasuk di dalamnya cara pembunuhan dan cara pemusnahan bangkai yang etis Replacement: Replacement relatif, memanfaatkan sebagai donor organ, jaringan atau sel. Replacement absolut, memanfaatkannya sebagai galur/cell line.

#### 4.7.5 Pemberian Ekstrak

Perlakuan kontrol negatif dan positif tidak diberi ekstrak. Perlakuan I diberi ekstrak daun beluntas 150 mg/kgBB. Perlakuan II diberi ekstrak daun beluntas 300 mg/kgBB. Perlakuan III diberi ekstrak daun beluntas 600 mg/kgBB (Pulio *et al.*, 2014).

#### 4.7.6 Pengecekan Triglisierida

Kadar Triglisierida darah ditetapkan serum darah sampel yang diperiksa dengan menggunakan metode Calorimetric Enzymatic test – Glycerol 3 Phosphate – oxidase (GPO) dengan satuan mg/dl, dibaca pada panjang gelombang 500 nm dengan menggunakan spektrofotometer Hitachi. Batas normal kadar triglisierida darah tikus adalah 26-145 mg/dl. (Bresnahan, J. 2004).

#### 4.7.7 Prosedur Analisa Data dan Penyajian Data

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS Statistics 16* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dengan menggunakan uji normalitas data dan homogenitas varian. Jika dua syarat ini terpenuhi, selanjutnya adalah uji *One-way ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok dan *Post hoc test* untuk melihat kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang bermakna. Data disajikan dengan tabel menggunakan mean dan standar deviasi (Dahlan, 2004).