

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan design eksperimental jenis *post test only control group*. Post test only control group adalah salah satu jenis design eksperimental yang memungkinkan peneliti untuk mengukur pengaruh intervensi yang diberikan kepada kelompok perlakuan dengan membandingkan hasil pengukuran pada kelompok kontrol. Namun penggunaan Post test only control group memiliki beberapa kelemahan. Salah satunya adalah tidak adanya pengukuran sebelum perlakuan, sehingga perubahan yang terjadi setelah diberikan intervensi tidak dapat dilihat secara jelas signifikasinya (Montgomery,2001).

Metode penelitian ini tiap perlakuan dilakukan dengan metode randomisasi menggunakan rancangan acak lengkap sehingga setiap sampel yang digunakan dalam penelitian memiliki peluang yang sama untuk masuk pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Pada penelitian ini hewan coba dibagi dalam 5 kelompok dengan perlakuan yaitu N (kontrol negatif), DM (kontrol positif), DK.1 (kelompok perlakuan 1), DK.2 (Kelompok perlakuan 2), DK.3 (Kelompok perlakuan 3)

Tabel 4.1 Rancangan Acak Sampel

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
N	N1	N2	N3	N4
DM	DM1	DM2	DM3	DM4
DK.1	DK.1.1	DK.1.2	DK.1.3	DK.1.4
DK.2	DK.2.1	DK.2.2	DK.2.3	DK.2.4
DK.3	DK.3.1	DK.3.2	DK.3.3	DK.3.4

Keterangan :

N : kontrol normal

DM : Induksi diet tinggi lemak , steptozotosin

DK.1 : Induksi diet tinggi lemak ,steptozotosin , ekstrak daun kemiri dosis 100 mg/kgBB

DK.2 : Induksi diet tinggi lemak ,steptozotosin ,ekstrak daun kemiri dosis 200 mg/kgBB

DK.3 : Induksi diet tinggi lemak ,steptozotosin ,ekstrak daun kemiri dosis 400 mg/kgBB

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Untuk pemeriksaan darah dilakukan di Laboratorium Patologis Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan selama 4 bulan.

4.3 Populasi Sampel

4.3.1 Populasi Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) dengan jenis kelamin jantan.

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

- Strain wistar
- Jenis kelamin jantan
- Berbadan sehat tampak aktif
- Berat badan 180-200 gram
- Usia \pm 8 minggu
- Tidak pernah mengalami perlakuan sebelumnya

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang selama perlakuan tidak mau makan
- Tikus yang kondisinya menurun, sakit dalam masa persiapan atau adaptasi

4.3.3 Jumlah Sampel

Estimasi jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus solimun yakni :

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

$$Pn - p \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Apabila p = jumlah perlakuan, n = jumlah pengulangan, dan 15= nilai deviasi, maka jumlah pengulangan dalam satu kelompok dilakukan minimal sebanyak 4 kali dengan total jumlah sampel minimal sebanyak 20 ekor

hewan coba. Tikus cadangan ditambahkan setiap kelompok sebanyak 2 ekor, sehingga jumlah total tikus sebanyak 30 ekor.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas (*Independent Variabel*)

Variabel bebas yang diukur dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun kemiri yang diberikan yakni 100, 200, dan 400 mg/kgBB

4.4.2 Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)

Variabel terikat yang diukur dalam penelitian ini adalah kadar LDL pada tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) yang digunakan dalam penelitian.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Alat yang digunakan untuk memelihara tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) adalah :

- Kandang dari bak plastik
- Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
- Botol air untuk minum
- Timbangan analitik
- Sekam

4.5.1.2 Alat Pembuatan Makanan Tikus

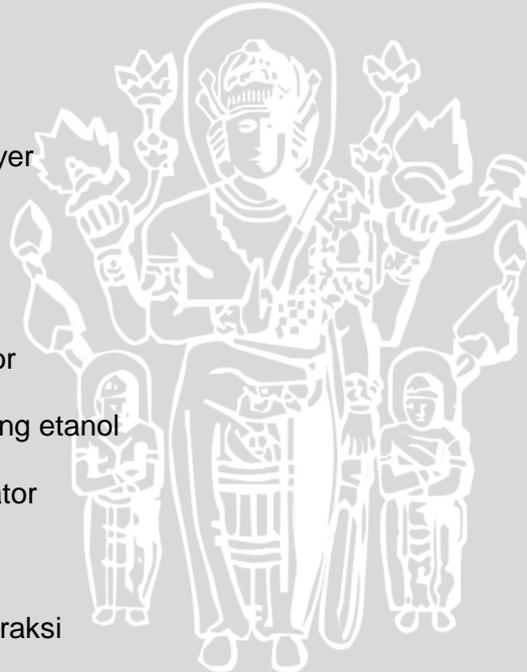
Alat yang digunakan untuk membuat adonan pakan tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) adalah :

- a. Sendok
- b. Timbangan analitik
- c. Baskom
- d. Pengaduk
- e. Sarung tangan

4.5.2.3 Alat ekstraksi daun kemiri :

Alat yang digunakan untuk membuat ekstraksi daun kemiri adalah :

- a. Oven
- b. Blender
- c. Timbangan
- d. Gelas erlenmeyer
- e. Corong gelas
- f. Kertas saring
- g. Labu evaporator
- h. Labu penampung etanol
- i. Rotary evaporator
- j. Water bath
- k. Botol hasil ekstraksi



4.5.1.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Daun Kemiri

Alat yang digunakan untuk memberikan ekstrak daun kemiri pada hewan

coba adalah :

- a. Spuit
- b. Sonde

4.5.1.5. Alat untuk Pembedahan Tikus

Alat yang digunakan dalam pembedahan tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) saat akan diambil darah yang dibutuhkan :

- a. Spuit
- b. Papan dan nampan bedah
- c. Pinset
- d. Scalpel
- e. Gunting
- f. Tabung plastik

4.5.1.6 Alat yang digunakan Pemeriksaan Kadar LDL

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan kadar LDL (*Rattus novergicus strain wistar*) adalah :

- a. Tabung endorff
- b. Mikropipet
- c. Sentrifuse
- d. Spektrofotometer (Biosystem type A15)
- e. Penjepit

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

Bahan pakan tikus yang digunakan adalah diet tinggi lemak dengan komposisi :

- a. PARS-tepung terigu 75%
- b. Asam Cholat 2%
- c. Kuning telur 5%

d. Minyak Kambing 10%

e. Minyak Babi 8%

4.5.2.2 Bahan Ekstraksi

Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak daun kemiri adalah :

a. Daun kemiri

b. Etanol 90%

4.5.2.3 Bahan Pembedahan Tikus

Bahan yang digunakan untuk pembedahan tikus adalah ketamin untuk anestesi.

4.5.2.4 Bahan Pemeriksaan kadar LDL

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan kadar LDL adalah

a. Reagen A

b. Reagen B

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah :

a. Ekstrak daun kemiri

Ekstrak daun kemiri adalah daun kemiri yang telah mengalami proses ekstraksi menggunakan larutan etanol 90%. Daun kemiri didapatkan dari perkebunan kemiri Wonosalam, Jombang, Jawa Timur.

b. Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin (STZ) adalah bahan yang merusak sel β - pankreas dan digunakan untuk menginduksi tikus menjadi kondisi DM. Dosis STZ yang digunakan adalah 27,5 mg/kgBB dan diberikan secara intraperitoneal.

c. Diet tinggi lemak

Diet tinggi lemak adalah pemberian diet atherogenik terhadap tikus untuk untuk menimbulkan kondisi obesitas yang merupakan faktor resiko dari penyakit DM.

d. Kadal LDL darah

Kolesterol LDL merupakan pengirim kolesterol utama dalam darah dan paling banyak mengandung kolesterol. LDL diambil dari darah hewan coba yang digunakan kemudian di sentrifuse dan diperiksa kadar LDL dari setiap hewan coba.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan persiapan hewan coba terlebih dahulu. Bahan diet, kandang, dan alat pemeliharaan hewan coba harus dipersiapkan. Sebelum perlakuan, hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium pada suhu kamar selama 16 hari.

4.7.2 Pemodelan Tikus Diabetik

Pemodelan Tikus DM tipe 2 (Zhang, 2008) :

- Setelah diadaptasikan, tikus diberi diet tinggi lemak selama 28 hari untuk mendapat model tikus yang hiperlipidemia.
- Tikus diinjeksi STZ dosis 27,5 mg/kgBB yang dilarutkan dengan akuades secara intraperitoneal.
- Tiga hari setelah diinjeksi STZ, cek kadar glukosa darah puasa. Tikus positif DM jika kadar glukosa darah puasa > 140 mg/dL.
- Jika kadar glukosa darah puasa tikus < 140 mg/dL, maka dilakukan kembali injeksi STZ dengan dosis yang sama.

4.7.3 Perlakuan

Kelima kelompok tikus dalam penelitian ini mendapat perlakuan yang berbeda. Pada kelompok kontrol negatif, tikus diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak daun kemiri selama penelitian berlangsung. Untuk kelompok kontrol positif, tikus diberi diet tinggi lemak saja tanpa pemberian ekstrak daun kemiri selama 84 hari. Pada kelompok perlakuan, tikus diberi diet tinggi lemak selama 56 hari. Setelah itu tikus diberi ekstrak daun kemiri sesuai dosis pada kelompok perlakuan DK.1 (100 mg/kgBB), kelompok DK.2 (200 mg/kgBB), dan kelompok DK.3 (400 mg/kgBB) selama 28 hari berikutnya dengan diet tinggi lemak masih berjalan.

4.7.4 Pembuatan ekstrak daun kemiri

- a. Siapkan dan bersihkan daun kemiri yang akan diekstraksi
- b. Keringkan daun kemiri pada suhu kamar selama 3-7 hari
- c. Masukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C hingga kering
- d. Setelah kering, haluskan dengan blender hingga menjadi serbuk
- e. Sampel yang sudah kering ditimbang sebanyak 90 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlemeyer ukuran 1 liter
- f. Rendam dengan etanol sampai volume 1000 ml
- g. Kocok hingga tercampur (kurang lebih 30 menit)
- h. Diamkan campuran daun kemiri dan etanol hingga mengendap
- i. Ambil lapisan atas dari campuran etanol
- j. Larutan yang sudah diambil tersebut dimasukkan ke dalam labu evaporasi ukuran 1 liter
- k. Pasang labu evaporasi pada evaporator

- l. Isi waterbath dengan air sampai penuh
- m. Pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas waterbath kemudian sambungkan dengan aliran listrik
- n. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
- o. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung
- p. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam oven dengan suhu 60°C, jika tidak ada pengurangan berat maka sudah tidak terdapat pelarut etanol dalam ekstrak tersebut.

4.7.5 Pemberian Ekstrak Daun Kemiri pada Tikus Putih

Pemberian ekstrak daun kemiri dilakukan secara peroral menggunakan spuit dan sonde sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan. Sonde dipasang pada ujung spuit kemudian dimasukkan ke dalam mulut tikus hingga ujung sonde mencapai esophagus bahkan lambung.

4.7.6 Pembedahan Tikus dan Pengambilan Darah

- a. Tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan ketamin. Tikus dibiarkan lemas dan tidak bergerak lagi.
- b. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang diberi alas steroform
- c. Dilakukan pembedahan dan diambil darah dari jantung sekitar 3-5 cc
- d. Darah kemudian disimpan dalam tabung sentrifuge ukuran 55 cc tanpa diberi EDTA atau antikoagulan.
- e. Sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit.

- f. Pisahkan serum dengan darah dan tempatkan pada tabung

4.7.7 Pemeriksaan kadar LDL darah

Pemeriksaan kadar LDL dilakukan dengan metode uji spektrofotometri colometri dengan menggunakan alat Cobas c 501. Langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Hidupkan alat dengan menekan tombol stop kontak
- b. Tunggu alat 15 menit hingga suhu dalam alat mencapai 37°C
- c. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- d. Mesin dioperasikan dengan langkah-langkah berikut :

- Pencucian alat

Tekan tombol info, tombol numeric 6 (wash), tombol numeric 1 (down), dan tombol F1 (start). Tunggu sekitar 2 menit hingga pencucian oleh alat sebanyak 3 kali. Tekan F1 (stop) untuk menghentikan pencucian.

Tekan tombol Status untuk kembali ke menu awal

- Penggunaan alat

Masukkan reagen LDL ke dalam cup reagen dan tempatkan di rak reagen yang telah disediakan. Masukkan sampel ke dalam cup sample dan diletakkan di rak sampel sesuai nomer urut. Letakkan masing-masing rak ke tempat Cobas yang telah tersedia dan alat siap digunakan.

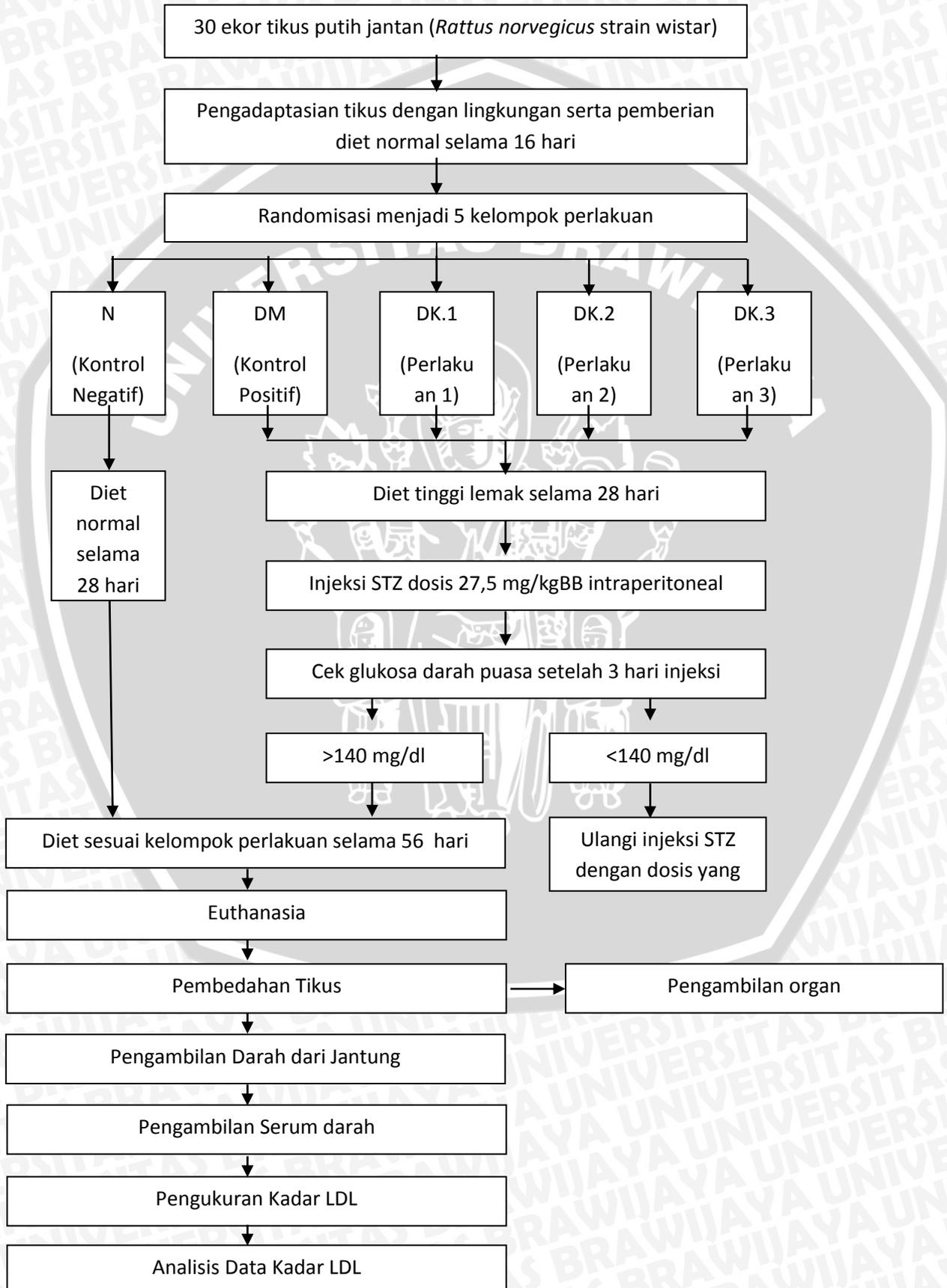
- Pemeriksaan sampel

Tekan tombol Routine-No sampel- Enter. Masukkan kode Sampel kemudian tekan tombol enter. Tekan tombol Tes/Parameter yang akan diperiksa yaitu LDL kemudian tekan Enter/Start. Tunggu alat hingga selesai memproses. Hasil yang telah dikerjakan akan keluar berupa

print out oleh alat, atau juga bisa melihat hasil dengan manual yaitu dengan menekan tombol Info kemudian tekan tombol numeric 2 (intern report). Setelah melakukan pemeriksaan cuci alat seperti langkah 1.



4.8 Alur Penelitian



4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Data-data yang diperoleh dikelompokkan dan disajikan dalam bentuk tabel dan dilakukan uji statistik menggunakan One Way ANOVA untuk membandingkan rata-rata jumlah sel endotel pada tiap kelompok perlakuan. Apabila pada hasil uji One Way ANOVA terdapat perbedaan, maka dapat dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tuckey untuk mengetahui dimana letak perbedaan dari lima perlakuan yang diberikan. Dilanjutkan Uji Korelasi Pearson untuk mengetahui apakah ada hubungan anatar dosis ekstrak daun kemiri dengan kadar LDL. Kemudian dilanjutkan dengan uji regresi untuk memprediksi penurunan kadar ldl setiap kenaikan dosis.

