

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel perlakuan adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur Wistar. Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang sehat dengan berat \pm 150-180 gram. Karena pada tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol. Tikus yang digunakan berumur \pm 8 minggu. Penelitian ini membagi sampel dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu :

- a. Kelompok kontrol negatif : sampel tanpa diet tinggi lemak, tidak diinjeksi STZ dan tidak diberi ekstrak daun kemiri.
- b. Kelompok kontrol DM : sampel dengan diet tinggi lemak, diinjeksi STZ dan tidak diberikan ekstrak daun kemiri.
- c. Kelompok perlakuan D1 : sampel dengan diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ kemudian diberi ekstrak daun kemiri dosis 1 (100 mg/KgBB/hari).
- d. Kelompok perlakuan D2 : sampel dengan diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ kemudian diberi ekstrak daun kemiri dosis 2 (200 mg/KgBB/hari).
- e. Kelompok perlakuan D3 : sampel dengan diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ kemudian diberi ekstrak daun kemiri dosis 3 (400 mg/KgBB/hari).



Penelitian ini menggunakan lima kelompok perlakuan ($p=$), sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah (Solimun, 2001) :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

keterangan :

p : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel

Jadi jumlah sampel minimal sesuai rumus tersebut diatas adalah 4 ekor.

Tikus yang diinjeksi STZ beresiko tinggi untuk mengalami kematian, maka sampel ditambah menjadi 6 ekor tiap kelompok (2 tikus cadangan tiap kelompok). Jadi jumlah keseluruhan sampel adalah $6 \times 5 = 30$ ekor tikus

4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

- Rattus novergicus strain wistar
- Tikus jantan
- Usia \pm 8 minggu
- Berbadan sehat
- Tampak aktif

- Berat badan 150 – 180 gram
- Warna bulu putih
- Mata jernih

b. Kriteria eksklusi

- Tikus yang tidak mau makan
- Tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik (sakit / mati)

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun Kemiri (*Aleurites moluccana*). Dosis ekstrak yang diberikan adalah 100 mg/KgBB/hari, 200 mg/KgBB/hari, dan 400 mg/KgBB/hari.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar trigliserida serum.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

- Jenis tikus
- Umur tikus
- Jenis kelamin tikus
- Berat badan tikus

- Induksi dengan Streptozotocin (STZ)
- Pemberian diet tinggi lemak
- Kondisi lingkungan kandang

4.4 Definisi Operasional

1. Pemberian ekstrak daun kemiri (*Aleurites moluccana*) intragastrik.

Daun kemiri merupakan daun kemiri yang diambil dari kebun kemiri di Wonosalam, Jombang. Daun kemiri yang dipilih adalah daun kemiri dari pohon tua, yaitu daun kemiri yang berbentuk lanset. Flavanoid swertisin merupakan ekstrak dari daun kemiri yang digunakan dalam penelitian ini. Intervensi yang dilakukan adalah pemberian ekstrak daun kemiri (*Aleurites moluccana*) dengan dosis 100 mg/KgBB/hari, 200 mg/KgBB/hari dan 400 mg/KgBB/hari intragastrik menggunakan sonde lambung.

2. tikus wistar

Tikus yang digunakan adalah *Rattus norvegicus* galur wistar dengan jenis kelamin jantan, berumur \pm 8 minggu dan berat badan 150 – 180 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Brawijaya Malang.

3. Induksi diabetes mellitus

Induksi diabetes mellitus dilakukan dengan pemberian diet tinggi lemak selama 28 hari kemudian diinduksi Streptozotocin (STZ) dengan injeksi intraperitoneal dengan range dosis 27,5 mg/KgBB.

4. Tikus yang diberi diet tinggi lemak

Tikus wistar diberi 40 gr diet tinggi lemak dengan campuran PARS-terigu, kuning telur bebek 5%, asam cholat, minyak babi, dan minyak kambing 10% dan air selama 3 bulan.

5. Pengukuran kadar trigliserida

Kadar trigliserida masing-masing tikus diukur pada saat akhir percobaan lalu dianalisa dengan uji spektrofotometri dan dibaca dengan menggunakan analyzer Biosystem.

4.5 Bahan dan Alat (Instrumen Penelitian)

a) Perawatan Tikus

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang yang terbuat dari kawat, botol air minum, sekam, timbangan berat badan.

b) Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak

Alat : Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan.

Bahan :

Diet normal : terdiri dari PARS-terigu 30 gram dan air.

Diet tinggi lemak : terdiri dari PARS-terigu 30 gram, kuning telur bebek 5%, asam cholat 0,06 gram, minyak babi 3,22 gram, minyak kambing 10% dan air.

c) Induksi STZ

Alat : spuit, indikator universal (pengukur pH), glukometer, dan glukostik.

Bahan : streptozotocin 1g, aquabideset, asam sitrat 0,1 M

d) Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

Alat : Oven, blender, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung ethanol, evaporator, pendingin spiral/rotary evaporator, selang water pump, water bath, water pump, vacuum pump, dan botol hasil ekstraksi

Bahan : Daun kemiri, ethanol 90% (pelarut), aquabidesett

e) Pemberian Ekstrak Daun Kemiri : spuit dan sonde

f) Pembedahan Tikus

Alat : gunting bedah, sterofoam, pinset, kapas, jarum pentul 2 set.

Bahan : Ketamin 40 mg/kgBB, spuit terumo 10cc 1 box, vacutainer EDTA 1 box, tabung falcon 15 ml ,vacutainer plain 1 box, tabung organ, plastik zipper ukuran kecil.

g) Pengambilan dan penyimpanan sampel darah

Alat : spuit terumo 10 cc, mikro pipet dan tip disposable, vacutainer plain 1 box, Tabung eppendorf, dan sentrifuge

Bahan : darah tikus dan serum

h) Pengukuran Kadar Trigliserida

Alat : Analyzer Biosystem, tabung reaksi

Bahan : sampel darah, reagen trigliserida 4 × 50 ml.

4.6 Metode Pengumpulan Data

4.6.1 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak daun kemiri (*Aleurites moluccana*) terhadap kadar serum trigliserida tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar yang diinduksi DM. Alur penelitian dapat dilakukan seperti berikut :

a. Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan selama 11 hari. Jumlah awal tikus pada saat aklimatisasi adalah 30 ekor tikus. Selama proses aklimatisasi, semua tikus diberi pakan standar (Normal). Masing-masing tikus mendapat 40 gram dan diberikan secara ad libitum. Pada masa adaptasi berat badan tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.

b. Randomisasi

Dilakukan randomisasi tikus menjadi lima kelompok, agar setiap tikus mendapat peluang yang sama untuk diberi perlakuan.

c. Pemberian Diet Tinggi Lemak

Pemberian diet tinggi lemak dimulai tanggal 7 maret 2015 untuk 24 tikus. Pembuatan diet tinggi lemak dilakukan setiap hari. Kebutuhan pangan tikus perhari adalah 40 gram. Total waktu pemberian diet tinggi lemak adalah 3 bulan untuk kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3. Sisa pakan tikus ditimbang dan dicatat setiap harinya kemudian dikoreksi berat badan tikusnya. Untuk mengetahui apakah tikus mengkonsumsi makanannya atau tidak.

d. Pembersihan Kandang Dan Pengukuran Berat Badan

Penggantian sekam dilakukan 1 minggu sekali untuk tikus kelompok kontrol normal. Sedangkan untuk kelompok tikus dengan DM tipe 2 sekam diganti setiap hari. Berat badan tikus ditimbang 1 kali dalam seminggu.

e. Induksi DM

Induksi Diabetes Melitus diawali dengan pemberian diet tinggi lemak selama 28 hari (4 minggu), kemudian tikus diinjeksi STZ dengan dosis 27,5 mg/KgBB intraperitoneal. Gula darah tikus diperiksa 3 hari setelah injeksi streptozotocin dengan menggunakan glukometer dan glukostik. Jika gula darah acak tikus >200 mg/dL dan Gula darah puasa tikus >140 mg/dL maka tikus sudah menderita DM tipe 2. Jika tikus masih belum menderita DM tipe 2, 3 hari setelah injeksi STZ, maka injeksi STZ diulangi dengan dosis yang sama. Setelah tikus menderita diabetes melitus tipe 2, tikus di biarkan selama 28 hari. Maksud dibiarkan disini adalah tikus tetap di beri diet tinggi lemak namun tidak diberi ekstrak daun kemiri. Ekstrak daun kemiri baru diberikan

setelah 28 hari berikutnya secara intragastrik menggunakan sonde lambung. Kebutuhan STZ dan volume injeksi STZ dapat dihitung dengan rumus pada gambar di bawah ini :

$$\text{Kebutuhan STZ (mg)} = \text{BB}/1000 \times 27,5 \text{ mg}$$

$$\text{Vol inj. STZ (cc)} =$$

$$(\text{Kebutuhan STZ (mg)} \times 0,5)/9$$

Gambar 4.1 Perhitungan Kebutuhan STZ dan Volume Injeksi STZ

f. Pembuatan ekstrak daun kemiri (*Aleurites moluccana*)

Daun kemiri yang digunakan adalah daun kemiri tua yang berbentuk lanset.

Proses pengeringan :

- Daun kemiri (*Aleurites moluccana*) dicuci sampai bersih
- Daun dikeringkan di suhu ruang (bukan di bawah sinar matahari) selama 3 – 7 hari. Kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 60°C agar kering maksimal.

Proses ekstraksi :

Terdapat 4 kali proses ekstraksi, yaitu :

- I. Tanggal 8 Mei : ekstraksi 200 gram serbuk daun kemiri

- II. Tanggal 15 Mei : ekstraksi 100 gram serbuk daun kemiri
- III. Tanggal 22 Mei : ekstraksi 100 gram serbuk daun kemiri
- IV. Tanggal 27 Mei : ekstraksi 200 gram serbuk daun kemiri

Prosedur ekstraksi :

- Setelah kering, dihaluskan dan dibuat serbuk dengan cara diblender. Serbuk ditimbang hingga 200 gram.
- Dilakukan ekstraksi 200 gram serbuk daun kemiri dengan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 90%.
- Serbuk daun kemiri (200 gram) direndam dalam 2L ekstrak etanol 90%. Aduk sampai benar-benar tercampur (selama ± 30 menit).
- Direndam selama 3 hari sampai mengendap.
- Rendaman disaring menggunakan kertas saring Whatman. Proses ini dilakukan sampai cairan menjadi jernih.

Proses evaporasi :

- Masukkan hasil saringan kedalam labu evaporasi.
- Pasang labu evaporasi pada rotatory evaporator.
- Water bath diisi dengan air sampai penuh.
- Semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (diatur sampai 90°) dipasang, kemudian disambung dengan aliran listrik.
- Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
- Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu)

- Hasil yang diperoleh kira-kira setengah dari bahan yang digunakan, dan ekstrak berupa pasta kental. Pastikan tidak ada pelarut etanol di dalamnya (Crude Extract). Hal ini dilakukan dengan cara, ekstrak dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C selama semalam dan tiap 3 menit beratnya ditimbang. Jika sudah tidak ada pengurangan berat maka bisa dipastikan pelarut etanol sudah tidak ada di dalamnya
 - Hasil ekstraksi kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik dan disimpan di dalam freezer dengan suhu -20°C .
 - Ekstrak daun kemiri diberikan kepada tikus secara Intragastrik.
- g. Pembedahan tikus

Cara pembedahan untuk pengukuran variabel penelitian adalah sebagai berikut :

Tikus yang akan dikorbankan dipuaskan sehari sebelum pembedahan. Tikus dieuthanasia terlebih dahulu dengan Ketamin 40 mg/kgBB melalui injeksi intraperitoneal. Setelah dieuthanasia tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi sterofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada sterofoam. Thorax dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral sehingga organ-organ dalam rongga abdomen terlihat. Kemudian dilakukan pengambilan whole blood tikus yang diambil dari bilik jantung dengan menggunakan spuit 10cc dan dimasukkan kedalam vacutainer. Organ-organ tikus yang dipakai oleh peneliti lainnya diambil dan dimasukkan kedalam

tabung organ maupun plastik zipper untuk dibuat sediaan. Kemudian tikus dikuburkan di tempat yang aman.

h. Pembuatan sediaan sample darah

Darah tikus diambil menggunakan spuit 10cc lalu dimasukkan ke dalam vacutainer Plain.

Cara melakukan sentrifugasi darah tikus menggunakan centrifuge :

Vacutainer plain dimasukkan kedalam centrifuge untuk disentrifugasi agar bagian darah yang padat (sel darah) dengan bagian darah yang cair (serum) dapat dipisahkan. Vacutainer plain yang berisi darah tikus diletakkan di dalam centrifuge dengan volume sama antara vacutainer satu dengan yang lainnya pada tempat yang berseberangan. Tutup penutup centrifuge sampai terkunci. Pilih kecepatan 2500 rpm pada tombol kecepatan dan pilih waktu pemutaran selama 10 menit pada tombol waktu. Lalu tekan start. Setelah proses sentrifugasi berhenti penutup dibuka dan ambil tabung dari centrifuge. Darah dalam vacutainer akan terpisah menjadi bagian yang padat mengendap di bawah dengan serum darah berada diatas.

Penyimpanan sampel darah :

Set volume yang ingin diambil pada mikro pipet. Pasang tip disposable pada mikropipet. Tekan penyedot sampai pembatas pertama, lalu masukkan tip ke dalam vacutainer plain, ambil sampel, Tahan, kemudian Tarik tip, Keluarkan sampel dari vacutainer plain dan masukkan ke dalam tabung eppendorf. Tarik pipet dan Lepaskan tekanan penyedot. Terakhir, Lepaskan tip yang sudah di pakai dari mikro pipet.

i. Pengukuran kadar trigliserida

Pemeriksaan kadar trigliserida menggunakan metode enzimatik GPO-PAP (Glycerol-3-phosphate oxidase – phenol+aminophenazone) dengan alat spektrofotometri colorimetri Biosystem. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut :

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

1. Lakukan pencucian alat

Tekan tombol INFO, tombol numerik 6 (wash), tombol numerik 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

2. Gunakan alat

Masukkan reagen trigliserida 4 x 50 ml ke dalam cup reagen dan tempatkan di rak reagen yang telah disediakan. Masukkan sampel ke dalam cup sample dan diletakkan di rak sampel sesuai nomor urut. Letakkan masing-masing rak ke tempat Biosystem yang telah tersedia dan alat siap untuk di gunakan.

3. Pemeriksaan sampel

Tekan tombol ROUTINE – NO SAMPLE – ENTER. Masukkan KODE SAMPEL kemudian tekan tombol ENTER. Tekan tombol TEST/PARAMETER yang akan diperiksa yaitu Trigliserida, ENTER/START. Tunggu alat hingga

memproses. Hasil yang telah dikerjakan akan di print out oleh alat, atau bisa juga melihat hasil dengan cara manual, yaitu dengan menekan tombol INFO kemudian numerik 2 (intern report). Setelah melakukan pemeriksaan cuci alat seperti langkah pada poin 1.

4. 6.2 Pengumpulan Data

1. Data kadar trigliserida diketahui dari hasil pemeriksaan laboratorium dengan metode enzimatik calorimetri pada sampel serum tikus pada akhir penelitian
2. Data berat badan tikus diambil dari hasil penimbangan berat badan tikus yang dilakukan 1 minggu sekali
3. Data intake pakan tikus di peroleh dari selisih antara berat pakan awal di kurangi sisa pakan yang dilakukan penimbangan setiap hari.

4.7 Pengolahan Data

Data yang diperoleh mengenai kadar trigliserida disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif. Data kadar trigliserida yang telah dikumpulkan, diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistik dengan menggunakan SPSS. Sebagai persyaratan untuk melakukan Uji One Way ANOVA pertama kali dilakukan uji Normalitas menggunakan Shapiro-Wilk untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak dan dilakukan uji homogenitas (Levene Test) untuk melihat apakah varian tiap sampel itu sama atau berbeda.

Setelah itu dilakukan tes parametrik dengan menggunakan One Way Anova (ANOVA satu arah) untuk melihat perbedaan kadar trigliserida antara satu

kelompok perlakuan dengan kelompok lainnya. Apabila dari uji One Way Anova terdapat perbedaan, maka dapat dilakukan dengan uji Post Hock Tuckey yaitu uji LSD untuk mengetahui dimana letak perbedaan dari 5 perlakuan yang di berikan. Uji statistik dilakukan dengan derajat kepercayaan 95% dengan $\alpha = 0,05$. Hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik dilanjutkan dengan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara dosis ekstrak daun kemiri dengan kadar trigliserida tikus wistar.

Analisis data dilanjutkan dengan koefisiensi determinasi atau R^2 untuk mengetahui seberapa besar kadar trigliserida tikus wistar yang dipengaruhi oleh ekstrak daun kemiri. Selanjutnya untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan dosis ekstrak daun kemiri dengan penurunan kadar trigliserida darah tikus wistar digunakan uji korelasi. Hubungan antara variabel dinyatakan cukup kuat bila $R > 0,5$.

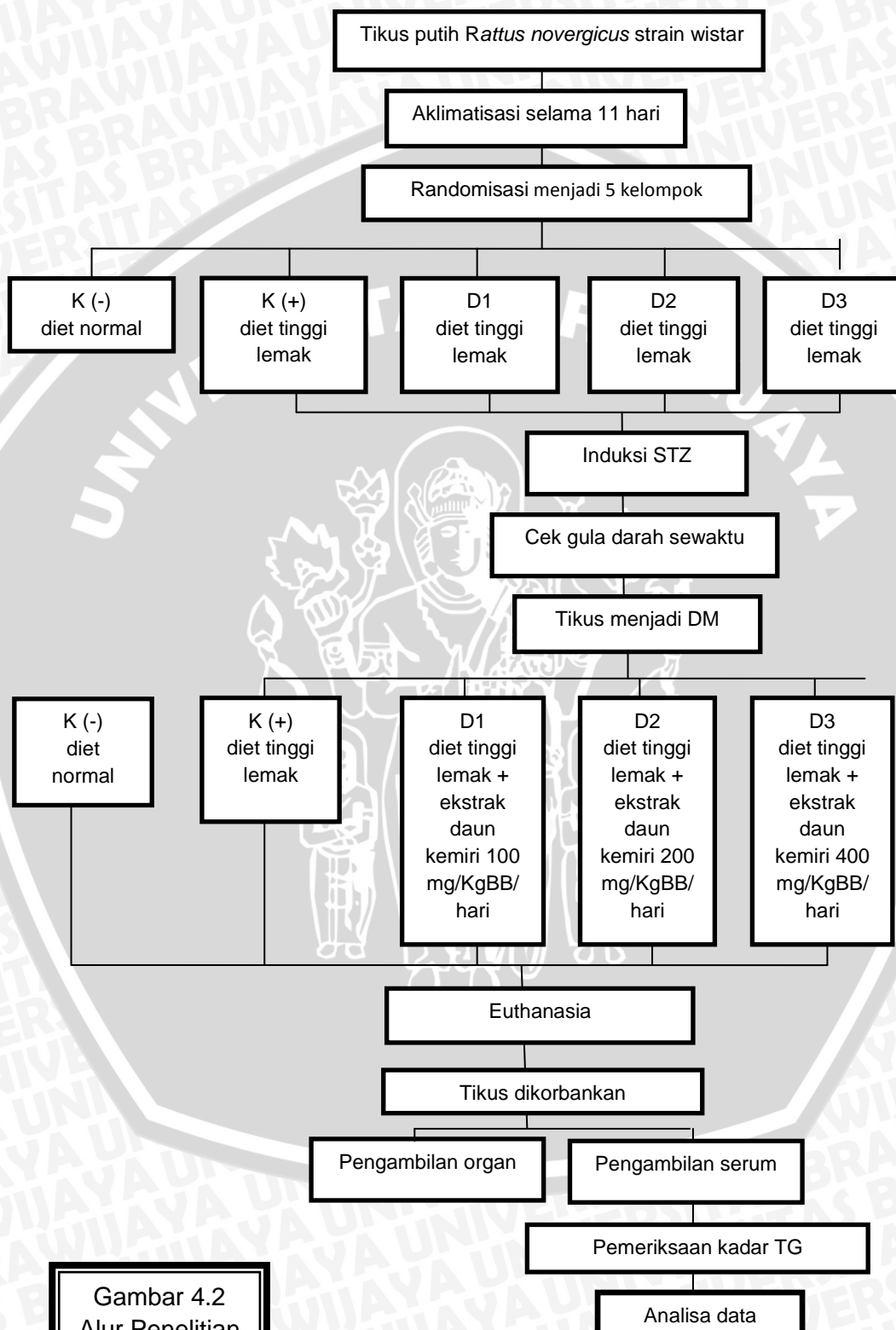
4.8 Jadwal Kegiatan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan 20 Februari 2015 sampai dengan 26 Juni 2015. Tabel kegiatan penelitian dapat dilihat pada tabel 4.1 dibawah ini :

Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan

N O	Jenis Kegiatan	Februari				Maret					April					Mei					Juni				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	Pengurusan <i>ethical</i> <i>clearance</i>	■																							
2	Persiapan alat dan bahan	■	■																						
3	Aklimatisasi			■	■																				
4	Diet tinggi lemak					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	Induksi STZ										■	■													
6	Pemberian Ekstrak															■	■	■	■						
7	Pembedahan																						■	■	■





Gambar 4.2
Alur Penelitian

