

**BAB 4****METODOLOGI PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian percobaan laboratorik dengan desain “*Post Test Only Controlled Group Design*”, di mana pengambilan data dilakukan pada akhir perlakuan.

**4.2 Populasi dan Sampel****4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian yaitu tikus putih (*Rattus norvericus*) strain wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan 130-200 gram.

**4.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian ini 25 ekor tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

**4.2.3 Kriteria Inklusi**

1. tikus putih (*Rattus norvericus*) wistar jantan
2. berumur 2-3 bulan
3. berat badan 130-200 gram

**4.2.4 Kriteria Eksklusi**

1. Tikus yang mati saat penelitian berlangsung

2. Tikus sakit
3. Tikus yang tidak mau makan

#### 4.2.5 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini, *purposive sampling* sesuai dengan kriteria inklusi. Selanjutnya dikelompokkan menjadi lima kelompok yaitu: satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dua kelompok tikus dengan hiperlipidemia yang diberi ekstrak kulit semangka dua dosis berbeda (250 mg/KgBB/hari, 500 mg/KgBB/hari) dan satu kelompok tikus hiperlipidemia diberi obat simvastatin dengan dosis 0,9 mg/KgBB/hari. Penentuan kelompok secara *simple random sampling*.

Banyak sampel ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Djala, 2016):

$$(r-1)(t-1) > 15$$

$$(r-1)(5-1) > 15$$

$$(r-1)4 > 15$$

$$r-1 > 15/4$$

$$r > 3,75 + 1$$

$$r > 4.75$$

Keterangan: r : jumlah replikasi sampel

t : jumlah kelompok

Dari perhitungan diperoleh jumlah sampel minimal 5 ekor untuk masing-masing kelompok, sehingga total sampel 25 ekor tikus.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas : ekstrak kulit semangka

Variabel terikat : kadar trigliserida serum

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari sampai April 2015.

#### 4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

1. Kulit putih semangka (*Citrullus lanatus*)
2. Etanol 70%
3. Aquades
4. Eter
5. Kapas
6. Pakan standar diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya Malang, terdiri dari: pakan ayam/PAR-S (dengan kandungan air, protein, lemak, serat, abu, Ca, phosphor, antibiotika, cocodiostat 66,6%, dan tepung terigu 33,4%)
7. Pakan tinggi lemak diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya Malang, terdiri dari: PARS 30 gram, terigu 15 gram, asam kolat 0,06 gram, minyak babi 3,22 mL, minyak kambing 4 mL, minyak kelapa 0,4 mL, kuning telur 2 gram (Murwani dkk,2006).

#### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat untuk pemeliharaan tikus:

1. Kandang tikus
2. Wadah minum
3. Timbangan
4. Sonde

Alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah tikus:

1. Spuit 5 ml dan needle
2. Vaculab tube 3 ml
3. Ependorf
4. Mikro pipet
5. *Handscoon*

Alat untuk ekstraksi kulit semangka:

1. Gelas kimia (gelas beker)
2. Spatula
3. Neraca massa
4. Batang pengaduk
5. Kertas saring
6. Gelas ukur
7. Pipet tetes
8. Mikro pipet
9. Corong
10. Spektrofotometer



#### 4.5.3 Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan tikus berumur 2-3 bulan dengan berat badan 130-200 gram, diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya Malang, sebagai hewan coba. Tikus dipelihara di laboratorium farmakologi Universitas Brawijaya dengan persyaratan sesuai dengan penelitian eksperimental. Tikus ditempatkan di dalam kandang dari wadah plastik berukuran 23 cm x 17 cm x 9,5 cm dengan alas sekam padi dan ditutup anyaman kawat.

Pemilihan tikus sebagai hewan coba dikarenakan tikus merupakan hewan coba yang mendukung penelitian terkait percobaan nutrisi dibidang fisiologi dan farmakologi disebabkan struktur anatomi dan fisiologi tikus itu sendiri. Untuk membuat tikus hiperlipidemia tikus diberikan pakan tinggi lemak.

#### 4.6 Definisi Istilah/ Operasional

1. Ekstrak kulit putih semangka adalah hasil ekstraksi kulit semangka bagian putih menggunakan pelarut etanol dan diencerkan dengan menggunakan aquades sesuai dengan dosis yang diberlakukan yaitu 250 mg dan 500 mg
2. Kadar trigliserida adalah hasil pengukuran trigliserida serum tikus putih *Rattus norvegicus* jantan, setelah tikus diberi perlakuan selama 2 bulan kemudian diambil darah jantungnya dan dilakukan pemeriksaan berdasarkan metode enzimatik menggunakan spektrofotometer
3. Diet hiperlipidemia adalah diet tinggi lemak yang didapatkan dari pakan normal ditambah asam kolat 0,06 gram, minyak babi 3,22 mL, minyak kambing 4 mL, minyak kelapa 0,4 mL, kuning telur 2 gram

## 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 4.7.1 Ekstraksi Kulit Putih Semangka

#### Proses Pengeringan

- a. Memisahkan bagian putih kulit semangka dari buah semangka, cuci kemudian potong kecil-kecil
- b. Memasukkan ke dalam oven pengeringan dengan suhu 40-60°C

#### Proses Pembuatan Ekstrak

- a. Menghaluskan kulit putih semangka yang sudah kering dengan blender
- b. Menimbang sebanyak 100 gram sebagai sampel kering
- c. Memasukkan sampel kering ke dalam gelas erlemeyer ukuran satu liter
- d. Merendam dengan etanol sampai volume 1L dan aduk hingga larutan tercampur  $\pm$  30 menit
- e. Mendinginkan satu malam hingga mengendap
- f. Mengambil lapisan atas campuran etanol dengan menggunakan kertas saring
- g. Melakukan proses perendaman sebanyak tiga kali

#### Proses Evaporasi

- a. Memasukkan hasil ekstraksi ke dalam labu evaporasi ukuran satu liter
- b. Memasang labu evaporasi dalam evaporator
- c. Mengisi *water Bath* dengan air hingga penuh

- d. Memasang semua rangkaian alat, atur suhu sesuai titik didih pelarut, kemudian sambungkan dengan aliran listrik
- e. Menunggu hingga aliran etanol berhenti menetes pada labu penampungan.
- f. Memasukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik (ekstrak kental yang diperoleh dari 100 gram berat kering yaitu 22 gram)
- g. Menyimpan dalam lemari es hingga siap untuk digunakan

#### 4.7.2 Penghitungan Dosis Ekstrak Kulit Putih Semangka

Dosis ekstrak kulit putih semangka yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian oleh Sugyanta (2011) yaitu 250mg/kgBB/hari dan 500mg/kgBB/hari.

Selanjutnya dilakukan perhitungan dosis untuk tiap kelompok tikus dengan berat  $\pm 200$  gram (0,2 kg) sebagai berikut:

Dosis 250mg/kgBB	Dosis 500mg/kgBB
= 0,2 kg x 250mg/kgBB	= 0,2 kg x 500mg/kgBB
= 50 mg/tikus	= 100 mg/tikus

Volume ekstrak kulit putih semangka diberikan secara oral sebanyak 1 mL yang merupakan volume yang diperbolehkan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu (3-5 mL).

#### 4.7.3 Penghitungan Dosis Simvastatin

Dosis simvastatin yang diberikan dihitung menggunakan konfersi dosis manusia kepada hewan coba. Perbandingan dosis manusia dengan

tikus putih yaitu 1 : 0,018 (Laurence ,1964). Maka didapatkan dosis sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus} &= \text{dosis manusia} \times \text{koefisien dosis tikus} \\ &= 10 \text{ mg/KgBB/hari} \times 0,018/200 \text{ gram} \\ &= 10 \text{ mg/KgBB/hari} \times 0,018/0,2 \text{ Kg} \\ &= 0,9 \text{ mg/KgBB/hari} \end{aligned}$$

#### 4.7.4 Pembuatan Pakan Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak terdiri dari pakan standar yaitu pakan ayam (PARS) dan tepung terigu, yang ditambahkan asam kolat, kolesterol dan minyak babi. Semua bahan dicampurkan kemudian ditambahkan air secukupnya. Pemberian lemak, asam kolat dan minyak babi bertujuan untuk meningkatkan kadar lemak dalam darah.

#### 4.7.5 Pemeriksaan Kadar Trigliserida

Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan kadar trigliserida adalah darah jantung, dimasukkan ke dalam tabung vacutainer. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan serum dengan kecepatan 45 rpm selama 10 menit. Serum diambil menggunakan micro pipet dan dimasukkan ke dalam ependorf. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar trigliserida dengan metode GPO-PAP. Prinsip GPO-PAP yaitu penghidrolisisan trigliserida secara enzimatik, oleh enzim lipase khusus, menjadi gliserol dan asam lemak. Gliserol kemudian bereaksi lebih lanjut menurut skema berikut:



#### 4.7.6 Tahap Perlakuan Hewan Coba

##### 4.7.6.1 Tahap Adaptasi

Pada tahap adaptasi, semua tikus diadaptasikan pada kondisi lingkungan penelitian yaitu laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama satu minggu dengan pemberian pakan standar dan minum air secara *ad libitum*.

##### 4.7.6.2 Tahap Pengelompokan

Dilakukan pemilihan secara acak lima ekor tikus sebagai kelompok kontrol negatif (KN), lima ekor tikus sebagai kontrol positif (KP), lima ekor tikus sebagai kelompok perlakuan dengan 250 mg/kgBB ekstrak albedo (P1), lima ekor tikus kelompok perlakuan dengan 500 mg/kgBB ekstrak albedo (P2), dan lima ekor tikus sebagai kelompok dengan pemberian simvastatin 0,9 mg/KgBB/hari (P3).

##### 4.7.6.3 Tahap Induksi

Kelompok tikus KN selama penelitian diberi pakan standar dan air minum. Sementara ke empat kelompok lainnya diinduksi dengan pakan tinggi lemak 40mg/hari selama 4 minggu pertama untuk menginduksi hiperlipidemia. Selanjutnya 4 minggu kedua, dilakukan perlakuan sebagai berikut: KN diberi pakan standar dan air minum, KP diberi pakan tinggi lemak dan air minum, P1 diberi pakan tinggi lemak + ekstrak albedo 250mg/kgBB/hari + air minum, P2 diberi pakan tinggi lemak + ekstrak albedo 500mg/kgBB/hari + air minum, dan P3 diberikan pakan tinggi lemak + simvastatin 0,9mg/kgBB/hari + air minum.

#### 4.7.6.4 Tahap Pembedahan dan Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan secara intrakardial, sebelum pengambilan darah, tikus dipuasakan selama 10-12 jam. Pembedahan dilakukan oleh seseorang yang sudah berpengalaman. Prosedur pembedahan sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat untuk penampungan sampel berupa tabung darah yang sudah diberi label sesuai dengan nomor tikus yang akan dibedah.
2. Melapisi meja bedah menggunakan plastik, menyiapkan alat-alat bedah yang akan digunakan beserta perlengkapan pendukung pembedahan
3. Mematikan tikus dengan menggunakan anastesi eter, dengan cara dimasukkan ke dalam wadah kaca berisi kapas/kasa yang telah dibasahi eter
4. Menutup wadah kaca
5. Setelah tikus tidak bergerak/tidak sadar, tikus dipindahkan dan diposisikan pada papan bedah kemudian difiksasi dengan jarum pentul
6. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok secara hati-hati hingga jantung terlihat
7. Mengambil darah dari jantung menggunakan spuit kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah
8. Memasukkan semua sisa organ tikus yang tidak terpakai ke dalam kantong plastik dan diserahkan kepada petugas pemeliharaan tikus untuk dilakukan penguburan pada lokasi yang telah disediakan

9. Sampah lain berupa plastik, kertas, dll yang tidak berhubungan dengan organ dibuang dalam kantong plastik tersendiri
10. Membersihkan area kerja sisa pembedahan dengan sabun dan jika perlu semprot dengan alkohol.

Darah ditampung dalam tabung tanpa anti-koagulan dan dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum yang selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan kadar trigliserida di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

#### 4.7.7 Metode Pengumpulan Data

1. Data kadar trigliserida didapat dari hasil pemeriksaan laboratorium dengan metode *enzimatic colimetri* pada sampel serum tikus
2. Data berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan yang dilakukan satu minggu sekali
3. Data intake pakan tikus diperoleh dari selisih antara berat pakan awal dikurangi sisa pakan yang diukur setiap hari

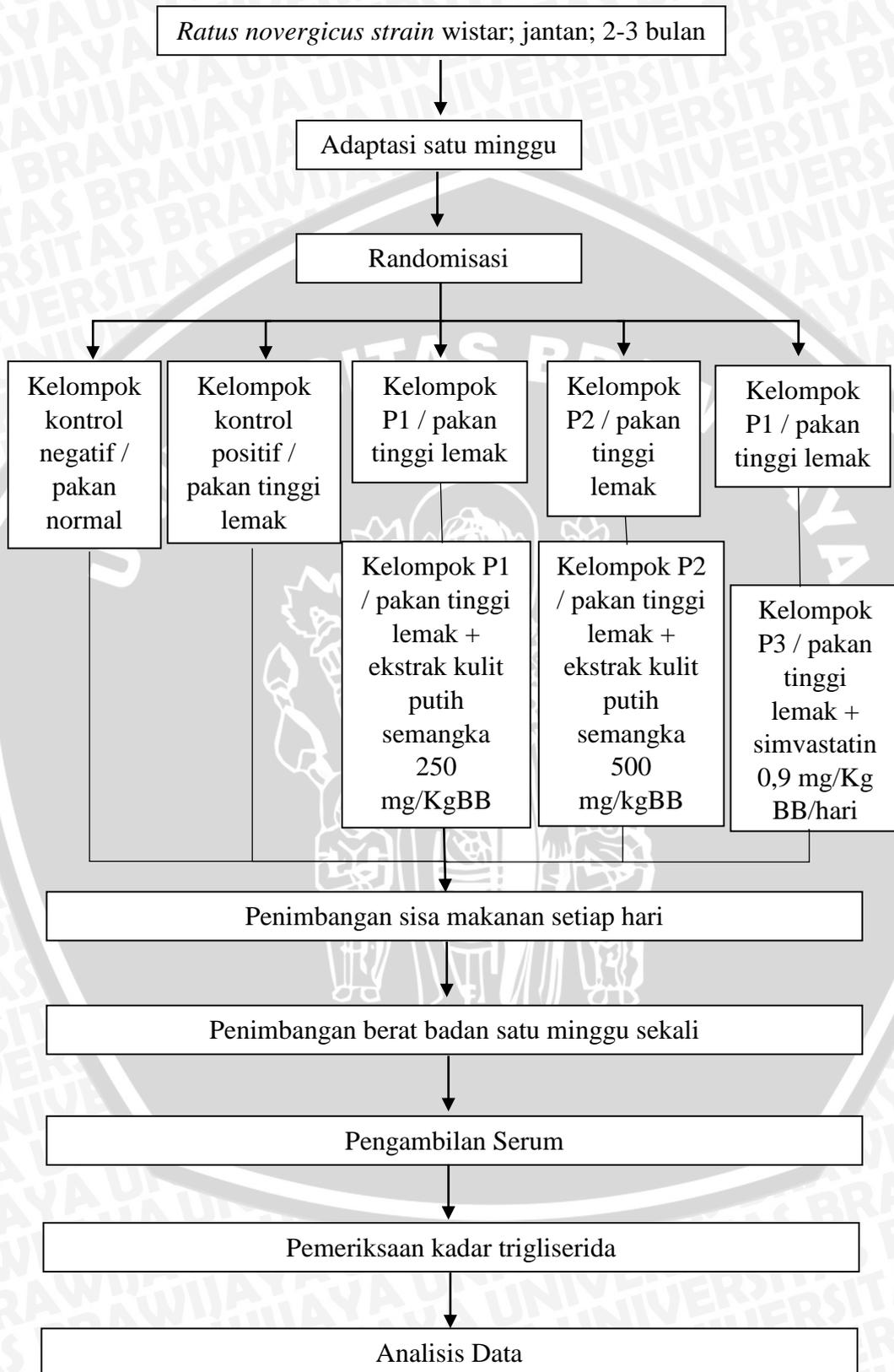
#### 4.8 Analisis Data

Data kadar trigliserida disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif. Data yang telah dikumpulkan dilakukan uji statistik menggunakan ANOVA satu arah untuk melihat perbedaan kadar trigliserida pada setiap perlakuan.

#### 4.9 Jadwal Kegiatan

Tabel 4.1 Jadwal kegiatan

No	Jenis Kegiatan	Bulan				
		1	2	3	4	5
1.	Persiapan pelaksanaan penelitian	X				
2.	Adaptasi tikus		X			
3.	Pemberian diet tinggi lemak		X	X		
4.	Pembuatan ekstrak kulit semangka		X			
5.	Pemberian ekstrak kulit semangka dan simvastatin			X	X	
6.	Pengumpulan data				X	
7.	Analisis data				X	X
8.	Penarikan kesimpulan					X
9.	Penyelesaian proposal					X



Gambar 4.1 : Alur Penelitian