

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah *post test only control group design*. Objek diambil secara random ke dalam kelompok-kelompok yang diekspos sebagai variabel independen dan kemudian diukur kadar kolesterol total serumnya. Nilai-nilai kadar kolesterol total serumnya kemudian dibandingkan untuk menentukan efektivitas perlakuan. Objek penelitian adalah tikus wistar berjenis kelamin jantan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan.

**4.2 Sampel Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel**

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1 (DM + ekstrak daun kemiri 100 mg/kgBB), kelompok perlakuan 2 (DM + ekstrak daun kemiri 200 mg/kgBB), kelompok perlakuan 3 (DM + ekstrak daun kemiri 400 mg/kgBB).

Jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus Solimun yaitu:  $p(n-1) \geq 15$ , dengan  $n$  = jumlah pengulangan tiap perlakuan;  $p$  = jumlah perlakuan.

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

(Solimun, 2001)

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah sampel yang dibutuhkan untuk setiap kelompok perlakuan adalah lebih besar dari atau sama dengan 4. Sebagai cadangan, 2 ekor tikus ditambahkan pada setiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi kemungkinan yang tidak diinginkan seperti kematian, kegagalan pengambilan sampel dan lain-lain. Jadi untuk 5 kelompok perlakuan dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus.

#### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Juni 2015 di 2 tempat sebagai berikut:

- Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus, pembuatan ekstrak dan pemberian perlakuan.
- Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pengukuran kadar serum kolesterol total.

#### 4. 4 Variabel Penelitian

##### 4. 4. 1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kemiri dengan dosis 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari dan 400 mg/kgBB/hari.

##### 4. 4. 2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol serum tikus wistar model diabetes mellitus tipe 2.

##### 4. 4. 3 Variabel Luar

Variabel luar adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel luar dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Jenis kelamin → Jantan
- b. Umur tikus → 2 bulan
- c. Berat badan tikus → 150 gram – 170 gram
- d. Waktu pengujian → lama paparan ekstrak daun kemiri
- e. Faktor lingkungan laboratorium

#### 4. 5 Definisi Operasional

- a. Pemberian ekstrak daun kemiri per oral

Daun kemiri yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemiri yang didapat dari perkebunan di Wonosalam Jombang. Ekstrak daun kemiri yang digunakan adalah dosis 100, 200 dan 400 mg/kgBB/hari.

#### b. Kadar kolesterol total serum tikus

Pengukuran kadar kolesterol total dalam serum dilakukan dengan metode enzimatis menggunakan spektrofotometer. Pengukuran ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4. 6. 1 Bahan

##### 4. 6. 1.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* Strain Wistar, berumur 2 bulan, jenis kelamin jantan, berat badan 150-170 gram dengan kondisi umum sehat yang dapat ditandai dengan gerakan tikus yang aktif. Tikus-tikus percobaan diperoleh dari ITB, dipelihara dalam bak plastik dengan tutup kandang terbuat dari kawat. Makanan hewan coba adalah makanan tinggi lemak yang digunakan untuk menginduksi diabetes mellitus tipe 2 dan pakan normal untuk kelompok kontrol negatif. Minuman yang diberikan diambil dari PDAM.

##### 4. 6. 1. 2 Bahan untuk Perlakuan

Bahan yang digunakan adalah daun kemiri (*Aleurites moluccana*) yang diperoleh dari perkebunan di Wonosalam Jombang.

##### 4. 6. 1. 3 Bahan untuk Perlakuan Model Tikus Diabetik

a. Pakan tikus diet tinggi lemak, terdiri dari:

- Asam kolat
- Kuning telur
- Minyak kambing
- Minyak babi
- PARS-terigu

b. Streptozotocin (STZ) yang diperlukan dilarutkan dalam akuades sesuai volume yang dibutuhkan dengan pengasaman pH 4,4 menggunakan asam sitrat.

#### 4. 6. 1. 4 Bahan untuk Pengukuran Gula Darah Tikus

- Kapas
- Alkohol 70%

#### 4. 6. 1. 5 Bahan untuk Pemeriksaan Kolesterol Total

- Serum
- Reagen
- Standar

#### 4. 6. 2 Alat

##### 4. 6. 2. 1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang tikus
- Tempat makan tikus
- Tempat minum tikus
- Kawat kassa
- Sekam

##### 4. 6. 2. 2 Alat untuk Pengukuran Berat Badan Tikus

- Neraca Sartorius

#### 4. 6. 2. 3 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

- Alat penimbang
- Kertas saring
- Corong pengestrak
- *Rotary evaporator*
- Blender
- Oven

#### 4. 6. 2. 4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Daun Kemiri

Pemberian ekstrak daun kemiri kepada tikus DM menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde.

#### 4. 6. 2. 5 Alat untuk Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

- Glucose blood monitoring
- Glucose test strip
- Jarum

#### 4. 6. 2. 6 Alat untuk Pengambilan Sampel Darah

- Gunting bedah
- Pinset
- Set jarum pentul
- Sterofoam
- Kapas
- Spuit 5 cc

#### 4. 6. 2. 7 Alat untuk Pengukuran Kadar Kolesterol Total Serum

- Spuit 5 cc
- Falkon 15 ml
- Tabung apendof
- Kuvet
- Yellow tip
- Blue tip
- Rak tabung
- Tabung reaksi
- Spektrofotometer
- Mikropipet 1000 mikroliter
- Mikropipet 10 mikroliter

#### 4. 7 Prosedur Kerja Penelitian

##### 4. 7. 1 Pengkondisian hewan coba

Tikus wistar jantan dengan berat badan awal sekitar 200 gram ditempatkan dalam kandang plastik berukuran pada suhu ruang  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  yang dilengkapi dengan tempat makan, tempat minum, sekam, serta penutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat. Diet normal terdiri dari 67% PAR-S, 33% terigu, dan air secukupnya. Minum yang digunakan adalah air PDAM. Makan diberikan sebanyak 40 gram/hari dan minum sebanyak 60-75 ml/hari. Tikus-tikus ini diadaptasikan di laboratorium farmakologi selama 11 hari.

#### 4. 7. 2 Pembagian kelompok hewan coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan dengan pengobatan ekstrak daun kemiri dalam 3 dosis yang berbeda (100, 200, 400 mg/kgBB/ hari secara per oral).

- Kelompok 1 : Normal
- Kelompok 2 : Kontrol DM
- Kelompok 3 : DM + Ekstrak daun kemiri 100 mg/kgBB/hari
- Kelompok 4 : DM + Ekstrak daun kemiri 200 mg/kgBB/hari
- Kelompok 5 : DM + Ekstrak daun kemiri 400 mg/kgBB/hari

#### 4. 7. 3 Prosedur permodelan tikus model DM tipe 2

Pembuatan model tikus DM adalah dengan memberi diet tinggi lemak serta injeksi streptozotocin (STZ) secara intraperitoneal (Zhang *et al.*, 2008).

1. Tikus diberi pakan diet tinggi lemak. Diet tinggi lemak yang diberikan pada tikus terdiri dari:
  - Asam folat 0,06 gram
  - Kuning telur 2 gram
  - Minyak kambing 4 gram
  - Minyak babi 3,22 gram
  - PARS-terigu 30 gram
2. Diet tinggi lemak dipertahankan selama 28 hari.
3. Tikus yang akan dibuat model DM diinjeksi dengan streptozotocin dengan dosis 25-30 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam akuades dengan pH 4,4 secara intraperitoneal.

4. Pengecekan kadar glukosa darah dilakukan 3x24 jam setelah injeksi STZ.
5. Tikus dinyatakan DM jika glukosa darah acak > 200 mg/dL atau glukosa darah puasa > 140 mg/dL (Zhang, 2008).
6. Tikus yang dinyatakan DM dipertahankan selama 28 hari sebelum diberi perlakuan.

#### 4. 7. 4 Pemeriksaan glukosa darah tikus

Tikus dipegang dengan tangan. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum. Ekor diurut ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka. Darah ditempelkan pada stik yang ditempelkan pada alat ukur digital. Baca hasilnya.

#### 4. 7. 5 Proses ekstraksi daun kemiri

Daun segar dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan di suhu ruang. Daun kering dihaluskan dengan blender. Sebelum diekstrak, serbuk dioven dahulu pada suhu 60°C. Lalu simplisia (bubuk kering) daun kemiri ditimbang, dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam corong pengestrak. Simplisia kemiri direndam dengan pelarut etanol untuk mengeluarkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun kemiri. Seratus gram serbuk daun kemiri ditambahkan dengan 1 liter etanol 90%, kemudian dikocok-kocok dan direndam selama 3 hari. Hasil rendaman disaring dengan kertas *Whatman*. Kemudian hasil filtrasi diletakkan pada labu yang dipasang pada *rotary evaporator* untuk menguapkan etanol. Setelah itu, hasil ekstraksi diletakkan dalam oven dengan suhu 60°C selama semalam untuk proses penguapan etanol lebih lanjut. Diyakinkan bahwa benar-benar tidak ada etanol dalam ekstrak secara berkala.

Apabila berat sudah tidak berubah, maka etanol telah menguap sempurna. Kemudian ekstrak disimpan di dalam botol dan diletakkan di dalam *freezer* dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. 7. 6 Pemberian ekstrak daun kemiri

Pemberian ekstrak daun kemiri diberikan secara intragastric dengan menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde sehingga dapat dimasukkan langsung ke dalam lambung tikus. Pemberian ekstrak daun kemiri dilakukan selama 28 hari.

#### 4. 7. 7 Pengambilan sampel

1. Tikus di euthanasia dengan injeksi ketamin dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal.
2. Sampel darah diambil melalui jantung setelah dilakukan pembedahan.
3. Sampel dimasukkan ke dalam vacutainer tanpa antikoagulan.
4. Vacutainer yang telah berisi darah tanpa antikoagulan disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit.
5. Serum darah diambil dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf.

#### 4. 7. 8 Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total Serum

Sampel dibius dengan injeksi ketamin dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal hingga mati atau pingsan, kemudian dibedah dan diambil darahnya dari jantung bagian ventrikel. Serum darah sampel diperiksa

menggunakan spektrofotometer. Prosedur penghitungan kadar kolesterol total serum menggunakan metode CHOD-PAP.

Prinsip pengukuran total kolesterol secara enzimatis berdasarkan reaksi di bawah ini :

- a. kolesterol ester + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{kolesterol esterase}}$  kolesterol + asam lemak
- b. kolesterol + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{kolesterol oksidase}}$  4-kolesten-trione + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- c. 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + fenol + 4-aminoantipyrine  $\xrightarrow{\text{peroksidase}}$  red quinone + 4 H<sub>2</sub>O
- (Sihombing, 2003)

Prosedur analisis :

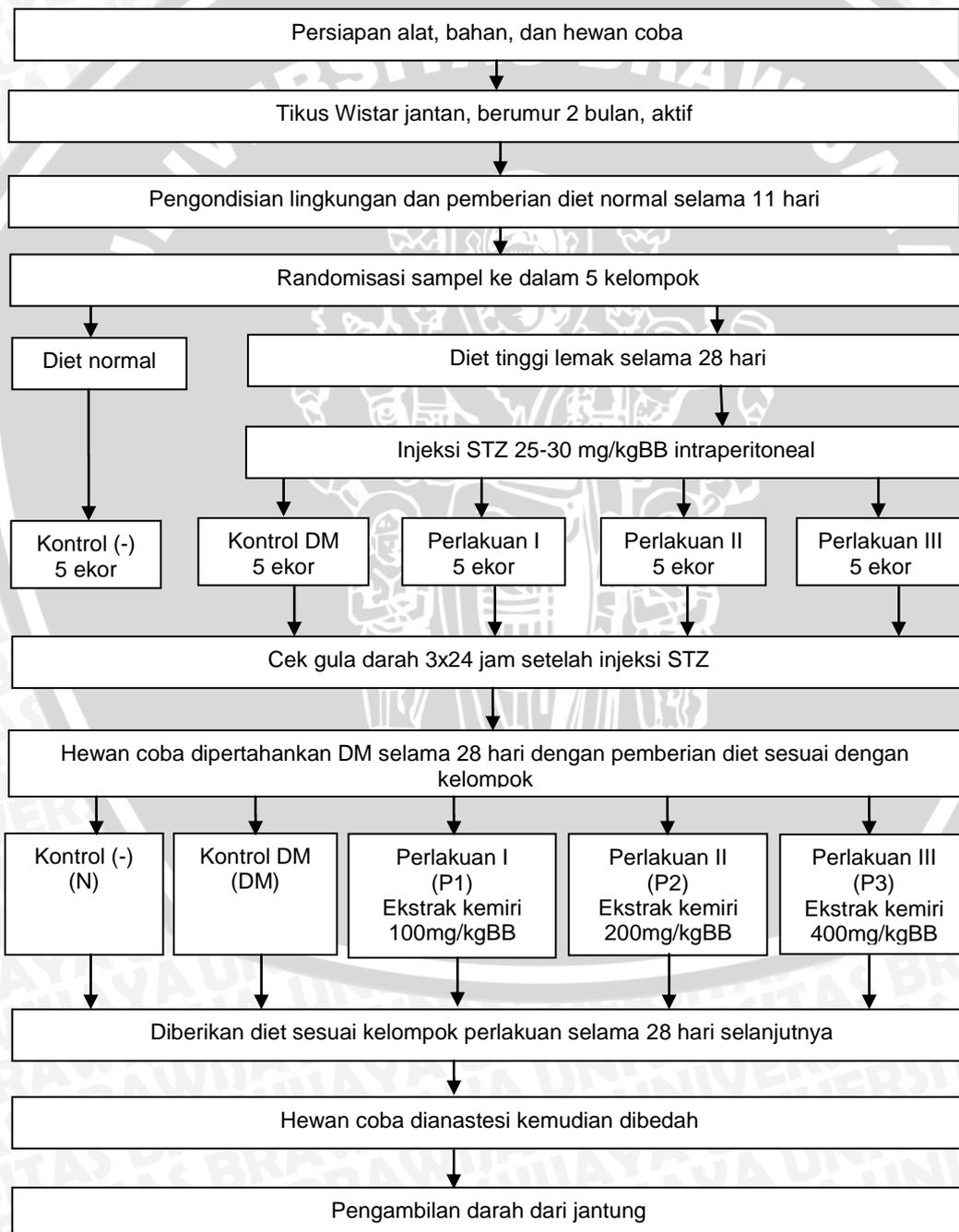
1. Mula-mula campurkan 0,01 ml standar dengan 1,00 ml reagen ke dalam kuvet kemudian diamkan pada suhu kamar ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) selama 20 menit.
2. Campurkan pula 0,01 ml sampel serum dengan 1,00 ml reagen ke dalam kuvet, kemudian diamkan pada suhu kamar ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) selama 20 menit. Ulangi prosedur yang sama untuk setiap sampel.
3. Operasikan alat spektrofotometer dan atur gelombangnya pada panjang gelombang 500 nm.
4. Persiapkan kuvet blanko yang berisi 1,00 ml reagen.
5. Bersihkan kuvet blanko dengan tisu lalu masukkan ke dalam spektrofotometer untuk menghitung absorbansi standar.
6. Bersihkan kuvet sampel dengan tisu kemudian masukkan ke dalam spektrofotometer untuk menghitung absorbansi sampelnya.
7. Ulangi prosedur yang sama pada kuvet sampel yang lain hingga semua absorbansi sampel terhitung.

Penghitungan konsentrasi kolesterol total :

$$\text{Kolesterol Total} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{kadar standar (200 mg/dL)}$$

(Sihombing, 2003)

#### 4.8 Alur Penelitian





Gambar 4.1 Alur Penelitian

#### 4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh sesuai dengan pembagian kelompok dianalisis menggunakan:

##### 1. Uji Homogenitas Varian dan Distribusi Normal

Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data yang telah diperoleh memenuhi syarat untuk uji ANOVA.

##### 2. Uji Statistik dengan Metode One-way ANOVA

Bertujuan untuk menilai apakah terdapat perbedaan yang bermakna pada kadar kolesterol total serum antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

##### 3. Analisis Post-Hoc LSD

Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna.

##### 4. Uji korelasi *Pearson*

Bertujuan untuk menilai apakah terdapat hubungan yang nyata antara perbedaan dosis dengan kadar kolesterol total serum tikus.

##### 5. Uji Regresi Linier

Bertujuan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh perubahan dosis terhadap kadar kolesterol total serum tikus.