

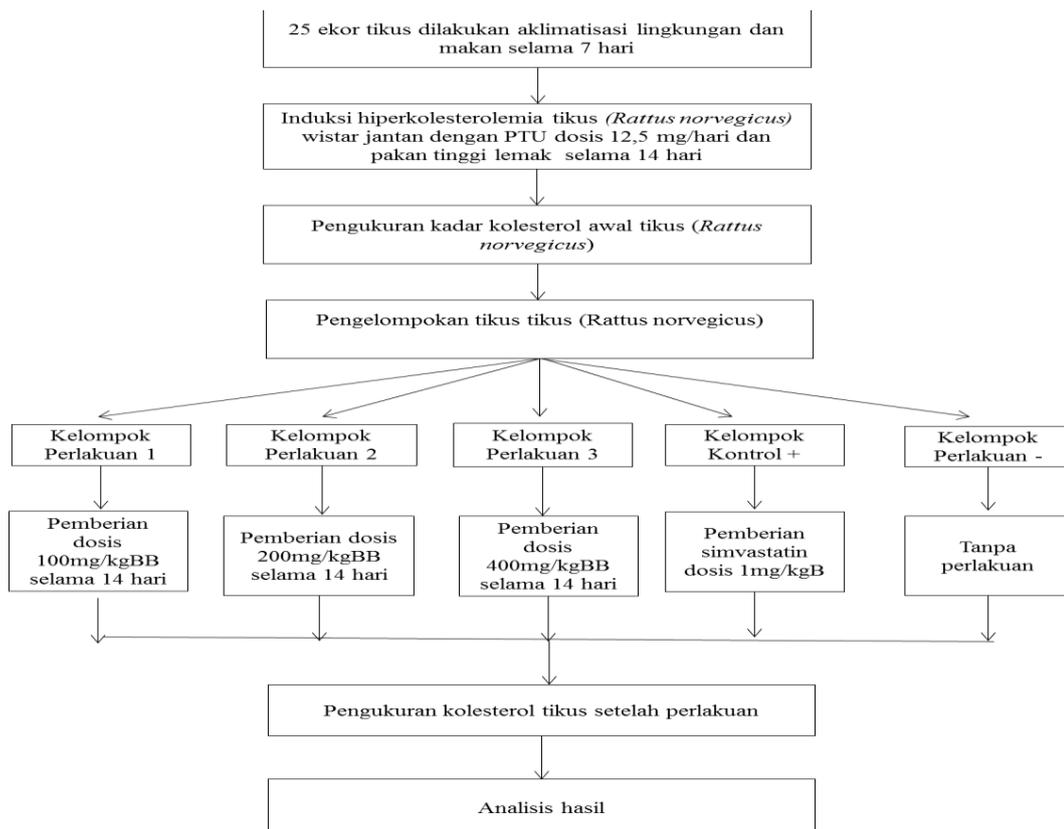
## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratories untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap kadar trigliserida tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia dengan desain penelitian *pre-post test control group design*.

#### B. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

## **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

### **C.1. Populasi**

Populasi dari penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan dengan berat  $\pm 200$  gram yang berusia 3-4 bulan.

### **C.2. Sampel**

Penentuan jumlah sampel yakni menggunakan rumus Federer yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , di mana  $t$  adalah jumlah perlakuan dan  $r$  adalah jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan. Jika jumlah perlakuan adalah 5 (3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol) maka  $t=5$ ,  $(5-1)(n-1) \geq 15 \rightarrow r \geq 5$ . Berdasarkan hasil perhitungan tersebut maka jumlah minimum tikus wistar jantan yang digunakan adalah sebanyak 25 ekor yang akan dirandomisasi ke dalam 5 kelompok. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor tikus wistar jantan yang dibagi ke dalam 5 kelompok secara randomisasi.

## **D. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di tiga laboratorium yang berbeda, yaitu Laboratorium Farmakologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, dan Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Waktu penelitian dimulai bulan Juli 2016 hingga Januari 2017.

## **E. Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas : ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sebagai terapi pada kelompok perlakuan dan obat simvastatin sebagai terapi pada kelompok kontrol positif.
- b. Variabel tergantung : kadar trigliserida tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia.
- c. Variabel terkendali : jenis kelamin tikus, berat badan tikus, umur tikus, diet tinggi kolesterol, dan kondisi lingkungan.

## **F. Definisi Operasional**

Peneliti memberikan pengertian untuk menjelaskan definisi operasional penelitian agar tidak menimbulkan pengertian ganda sebagai berikut:

- a. Ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah ekstrak daun kersen yang diperoleh dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut ethanol. Dosis ekstrak daun kersen yang diberikan pada penelitian ini adalah 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400 mg/kgBB.
- b. Kadar trigliserida adalah kadar trigliserida pada plasma darah tikus dengan metode *Colorimetric Enzimatic Test* (GPO\_PAP). Kadar trigliserida normal pada tikus wistar adalah 26 – 145 mg/dl (Kusumawati dalam Surnina, 2009).
- c. Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan adalah spesies tikus dengan berat  $\pm 200$  gram yang berumur 3-4 bulan.
- d. Hiperkolesterolemia adalah peningkatan kadar kolesterol pada tikus setelah pemberian induksi PTU dan diet tinggi lemak.

- e. Induksi hiperkolesterolemia dengan PTU pada penelitian ini menggunakan dosis sebesar 12,5 mg/hari yang terbagi dalam 1 kali pemberian.
- f. Diet tinggi lemak adalah dengan memberikan pakan kuning telur ayam mentah 1 ml/kali/hari.
- g. Simvastatin yang digunakan sebagai terapi pada kelompok kontrol positif menggunakan dosis 0,9 mg/kgBB/hari.
- h. Kontrol negatif adalah kelompok tikus yang diinduksi PTU dan diet tinggi lemak tanpa diberi perlakuan.

## **G. Alat dan Bahan Penelitian**

### **G.1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan uji, tempat makan dan minum tikus, timbangan hewan, sonde lambung, spuit, pipet ukur, gelas ukur, rak tabung reaksi, kertas label, spidol, almari pengering (*oven*), alu penumbuk, saringan, pengaduk, kertas penyaring, kain kasa, corong, tabung erlenmeyer 500 ml, *Vacuum Rotary Evaporator*, cawan porselin, kemasan untuk penyimpanan, timbangan serbuk, timbangan daun, tabung mikrohematokrit, pipet mikrohematokrit, sentrifuge, refrigerator, Spectrophotometer (micolab type 300).

### **G.2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan, daun kersen (*Muntingia calabura* L.), sekam,

simvastatin, aquabides, pakan standar (pelet), kuning telur ayam mentah, reagen trigliserida, ethanol 96 %.

#### **H. Persiapan Penelitian**

- a) Melakukan identifikasi daun kersen yang akan digunakan pada penelitian
- b) Membuat ekstrak daun kersen dengan cara maserasi

Daun kersen tersebut dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan selama 14 hari. Daun kersen yang telah kering dihaluskan dengan alu penumbuk. Pembuatan campuran kersen dan ethanol dengan menambahkan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 150 gram daun kersen dan 600 ml pelarut (daun kersen kering:etanol sebanyak 1:4). Hasil maksimal campuran kersen dan ethanol diendapkan selama tujuh hari dengan sekali pengadukan setiap harinya. Campuran selanjutnya disaring. Proses evaporasi selanjutnya dilakukan untuk memisahkan hasil ekstrak yang diperoleh dengan pelarut ethanolnya. Hasil ekstrak kemudian dibuat larutan stok.

- c) Persiapan dan pemeliharaan tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan

Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan, dengan berat  $\pm 200$  gram beumur 3-4 bulan. Tikus wistar diaklimatisasi selama 3 hari, diberi pakan standar yakni pelet dan air minum setiap hari. Tujuan aklimatisasi agar tikus wistar dapat beradaptasi pada lingkungan yang baru. Kemudian tikus-tikus wistar tersebut diberi tanda pengenalan pada bagian ekor. Tikus wistar dipelihara dalam kandang

dengan tutup kawat dan diberi sekam. Kandang tikus wistar dibersihkan setiap sehari sekali.

d) Melakukan induksi hiperkolesterolemia

Tikus wistar jantan diinduksi PTU 12,5 mg/kgBB/hari dalam 1 kali dosis. Pemberian induksi PTU bersamaan dengan pemberian kuning telur ayam mentah sebanyak 1 ml/kali/hari.

e) Membuat larutan stok bahan uji

Ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) ditimbang sebanyak 500 mg ekstrak kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 5mg/ml. Dosis yang diberikan pada penelitian ini adalah 100mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400mg/kgBB.

f) Membuat larutan stok simvastatin

Dua tablet simvastatin 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok simvastatin 0,2 mg/ml. Dosis yang diberikan pada penelitian ini adalah 1 mg/kgBB/hari.

### **I. Pelaksanaan Pengujian Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)**

Pada pengujian ini digunakan 35 ekor tikus wistar jantan. Tikus wistar dibagi menjadi 5 kelompok yakni sebagai berikut:

1. Kelompok P1 masing-masing tikus wistar mendapat perlakuan ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 100 mg/kgBB
2. Kelompok P2 masing-masing tikus wistar mendapat perlakuan ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 200 mg/kgBB

3. Kelompok P3 masing-masing tikus wistar mendapat perlakuan ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 400 mg/kgBB
4. Kelompok K (+) masing-masing tikus wistar diberi suspensi simvastatin 1 mg/kgBB
5. Kelompok K (-) masing-masing tikus wistar tidak diberi perlakuan.

Tabel 1.5. Perlakuan berdasarkan hari

| Hari  | Perlakuan  |
|-------|--|
| 1-3   | Aklimatisasi<br>Hari ke-3: cek kadar trigliserida awal   |
| 4-17  | Induksi hiperkolesterolemia (PTU + kuning telur ayam mentah)   |
| 18-24 | Hari ke-18: cek kadar trigliserida setelah pemberian induksi PTU dan kuning telur ayam mentah<br>Induksi hiperkolesterolemia+perlakuan(ekstrak,simvastatin,kontrol -)                                |
| 25-31 | Hari ke-25:cek kadar trigliserida setelah 7 hari pemberian perlakuan<br>Induksi hiperkolesterolemia+perlakuan(ekstrak,simvastatin,kontrol -)<br>Hari ke-31: cek kadar trigliserida akhir+dikorbankan |

#### J. Pengambilan Plasma Darah dan Pengukuran Trigliserida Tikus

Pengambilan darah menggunakan tabung mikrohematokrit dengan cara menusukkan di bagian sinus orbitalis. Darah diambil sekitar 0,4 ml dan dimasukkan ke dalam eppendorf dan didiamkan selama 1 jam. Darah dalam

eppendorf disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm, sehingga dihasilkan 2 lapisan, yaitu serum dan padatan. Serum dipipet sebanyak 5  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi reagensia trigliserida sebanyak 100  $\mu$ l. Selanjutnya serum dan reagen trigliserida dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37<sup>0</sup> C. Kemudian kadar trigliserida diukur menggunakan metode *Colorimetric Enzimatic Test* (GPO\_PAP).

#### **K. Analisis Data**

Data hasil pengukuran kadar trigliserida hewan uji dianalisis menggunakan uji statistik dengan menggunakan program SPSS versi 17. Uji statistik yang dilakukan adalah uji normalitas dengan Shaphiro-Wilk, uji homogenitas dengan uji Levene, uji kadar trigliserida sesudah diberi diet tinggi lemak dan pemberian simvastatin serta sesudah diberi diet tinggi lemak dan pemberian ekstrak ethanol daun kersen dengan uji ANOVA.