

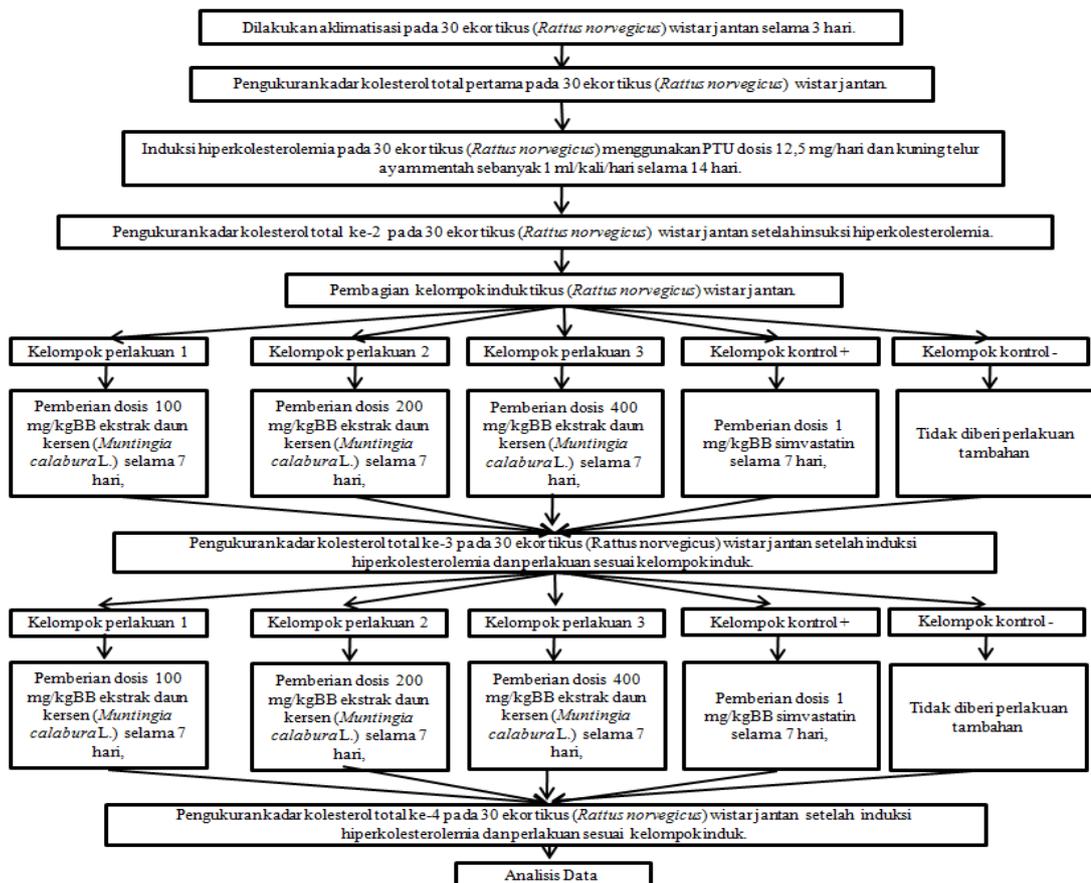
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *eksperimental laboratories* guna mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura L.*) terhadap kadar kolesterol total tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia. Desain penelitian ini adalah *pre post test control group design*.

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan dengan berat ± 200 gram yang berusia 3-4 bulan.

2. Sampel

Perhitungan jumlah sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah kelompok induk dan n adalah jumlah hewan uji tiap kelompok induk. Jumlah kelompok induk dalam penelitian ini adalah 5 (terdiri dari 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol) maka $t = 5$, $(5-1)(n-1) \geq 15$ sehingga diperoleh $n \geq 5$.

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, jumlah minimal sampel tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan dalam penelitian ini adalah 5 ekor per kelompok induk. Untuk mengantisipasi adanya kemungkinan *drop out* maka ditambahkan 1 ekor tikus wistar jantan pada tiap kelompok induk. Jumlah kelompok induk adalah 5, maka jumlah tikus wistar seluruhnya adalah 30 ekor yang dikelompokkan secara random.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium farmakaologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dan Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada. Waktu penelitian dimulai dari bulan Juli 2016 hingga November 2017.

E. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini diklasifikasikan menjadi 3 yaitu :

1. Variabel bebas : ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sebagai terapi pada kelompok perlakuan dan obat simvastatin sebagai terapi pada kelompok kontrol positif.
2. Variabel tergantung : kadar kolesterol total tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia.
3. Variabel terkendali : jenis kelamin tikus, usia tikus, berat badan tikus, diet tinggi kolesterol, dan kondisi lingkungan.

F. Definisi Operasional

1. Ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut ethanol. Dosis ekstrak daun kersen yang diberikan pada penelitian ini adalah 100mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.
2. Kadar kolesterol total adalah jumlah kolesterol LDL, kolesterol HDL dan 1/5 trigliserida yang diukur dengan metode CHOD-PAP (enzymatic photometric test). Kadar kolesterol total normal tikus wistar jantan adalah 40-130 mg/dL (Malole & Sri, 1989 dalam Fauzana, 2015).

3. Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan adalah spesies tikus yang berusia 3-4 bulan dengan berat badan \pm 200 gram. Jumlah hewan uji dalam penelitian ini adalah 30 ekor.
4. Hiperkolesterolemia adalah kondisi peningkatan kadar kolesterol total pada tikus setelah pemberian induksi PTU dan diet tinggi lemak.
5. Induksi hiperkolesterolemia dengan PTU dalam penelitian ini adalah menggunakan dosis 12,5 mg/hari dalam 1 kali pemberian.
6. Induksi diet tinggi lemak adalah dengan memberikan pakan kuning telur ayam mentah 1 ml/hari/kali dalam 1 kali pemberian.
7. Simvastatin adalah obat yang digunakan sebagai terapi hiperkolesterolemia. Kelompok kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan simvastatin dengan dosis 1 mg/kgBB/hari.
8. Kontrol negatif adalah kelompok tikus yang diinduksi hiperkolesterolemia tanpa diberi perlakuan lain.

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *grinding*, oven, saringan penyerbuk, timbangan, gelas dan tabung ukur, pengaduk, kain flanel, kertas saring, tabung erlenmeyer 500 mL, corong, wadah toples, Vacuum Rotary Evaporator, cawan porselin, kemasan untuk penyimpanan ekstrak, timbangan hewan uji, kandang hewan uji, wadah makan dan minum hewan uji, sonde lambung, spuit, pipet ukur, tabung

mikrohematokrit, kertas label, spidol, referigator, Spectrophotometer (micolab type 300).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.), ethanol 96%, es batu, tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan, sekam, pakan standar (pelet), aquades, simvastatin, kuning telur ayam mentah , PTU, dan reagen kolesterol.

H. Persiapan Penelitian

1. Melakukan identifikasi daun kersen yang akan digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian ini.
2. Membuat ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan cara maserasi.

Pada awal proses pembuatan ekstrak, daun kersen segar dianginkankan. Setelah kering, daun kersen ditumbuk kemudian dihaluskan menggunakan *grinding* hingga menjadi serbuk. Serbuk daun kersen sebanyak 150 gram dilarutkan dengan ethanol 96% sebanyak 600 mL. Perbandingan larutan ethanol dengan serbuk daun kersen adalah 4:1. Hasil campuran tersebut kemudian diendapkan selama 7 hari. Campuran serbuk daun kersen dan larutan ethanol diaduk menggunakan sendok pengaduk setiap hari pada suhu ruang. Selanjutnya campuran disaring menggunakan kain flanel. Hasil saringan dari kain flanel selanjutnya disaring lagi menggunakan kertas saring. Tahap selanjutnya adalah evaporasi yang

bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang diperoleh dari pelarut ethanol. Hasil ekstrak kemudian dibuat larutan stok.

3. Persiapan dan Pemeliharaan Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan sehat berusia 3-4 bulan dengan berat ± 200 gram. Tikus wistar diaklimatisasi selama 3 hari, diberi pakan pelet dan air minum setiap hari. Aklimatisasi dilakukan supaya tikus wistar dapat beradaptasi pada lingkungan yang baru. Semua tikus wistar diberi tanda pengenalan pada bagian ekor. Tikus wistar dipelihara dalam kandang bertutupkan kawat yang diberi sekam. Pembersihan kandang tikus wistar dilakukan setiap tiga hari sekali.

4. Melakukan induksi hiperkolesterolemia

Tikus wistar jantan menggunakan propylthiouracil (PTU) dan kuning telur ayam mentah. Dosis PTU yang digunakan adalah 12,5 mg/kgBB/hari. Kuning telur ayam mentah diberikan sebanyak 1 ml/kali/hari.

5. Membuat larutan stok bahan uji

Ekstrak ethanol daun kersen dengan menimbang ekstrak ethanol daun kersen sebanyak 500 mg kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 5 mg/ml. Dosis yang diberikan pada penelitian ini adalah 100mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

6. Pembuatan suspensi simvastatin

Membuat larutan stok simvastatin dengan melarutkan 2 tablet simvastatin 10 mg dalam 100 ml aquades sehingga didapat larutan stok simvastatin 0,2 mg/ml. Dosis simvastati yang digunakan pada penelitian ini adalah 1 mg/kgBB/hari.

I. Pelaksanaan pengujian tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan

Penelitian ini akan menguji 30 ekor tikus wistar jantan. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok induk, yaitu :

- a. Kelompok P1, keenam tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 100 mg/kgBB.
- b. Kelompok P2, keenam tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 200 mg/kgBB.
- c. Kelompok P3, keenam tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 400 mg/kgBB.
- d. Kelompok K (+), keenam tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan larutan simvastatin 1 mg/kgBB/hari.
- e. Kelompok K (-), keenam tikus dalam kelompok ini tidak mendapat perlakuan tambahan selain induksi hiperkolesterolemia.

Tabel 2. Pengelompokan perlakuan berdasarkan hari

Hari 1-3	•Aklimatisasi
Hari 4	•Cek kadar kolesterol sebelum induksi hiperkolesterolemia
Hari 4-17	•Induksi hiperkolesterolemia, berupa:

	PTU Kuning telur ayam mentah
Hari 18	•Cek kadar kolesterol setelah induksi hiperkolesterolemia
Hari 18-24	•Induksi hiperkolesterolemia, berupa: PTU Kuning telur ayam mentah •Perlakuan : kelompok ekstrak daun kersen, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif
Hari 25	•Cek kadar kolesterol setelah 7 hari perlakuan sesuai kelompok induk
Hari 25-31	•Induksi hiperkolesterolemia, berupa: PTU Kuning telur ayam mentah •Perlakuan: kelompok ekstrak daun kersen, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif
Hari 32	• Cek kadar kolesterol setelah 14 hari perlakuan sesuai kelompok induk

J. Pengambilan Darah dan Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah Tikus

Pengambilan darah menggunakan tabung mikrohematokrit dengan cara pengambilan sampel dari vena orbita tikus. Darah yang diambil sekitar 0,4 ml kemudian dimasukkan ke dalam eppendorf dan didiamkan selama satu jam. Darah dalam eppendorf selanjutnya disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Dari hasil sentrifugasi diperoleh 2 lapisan, yaitu serum dan endapan. Serum diambil menggunakan pipet sebanyak 5 µl kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi reagen kolesterol sebanyak 100 µl. Selanjutnya serum dan reagen kolesterol dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian kadar kolesterol diukur

menggunakan metodeenzymaticphotometric test Cholesterol Oxidase – Para Aminophenazone (CHOD-PAP).

K. Analisis Data

Data hasil pengukuran kadar kolesterol tikus wistar dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan SPSS versi 16. Uji statistik yang dilakukan adalah uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* dan *Wilcoxon*, uji homogenitas dengan uji *Levene*, uji kadar kolesterol total sesudah pemberian pakan hiperkolesterolemia dan pemberian simvastatin serta sesudah diberi diet tinggi lemak dan pemberian ekstrak ethanol daun kersen dengan uji *One Way ANOVA* dan *Paired Sample T Test*.