

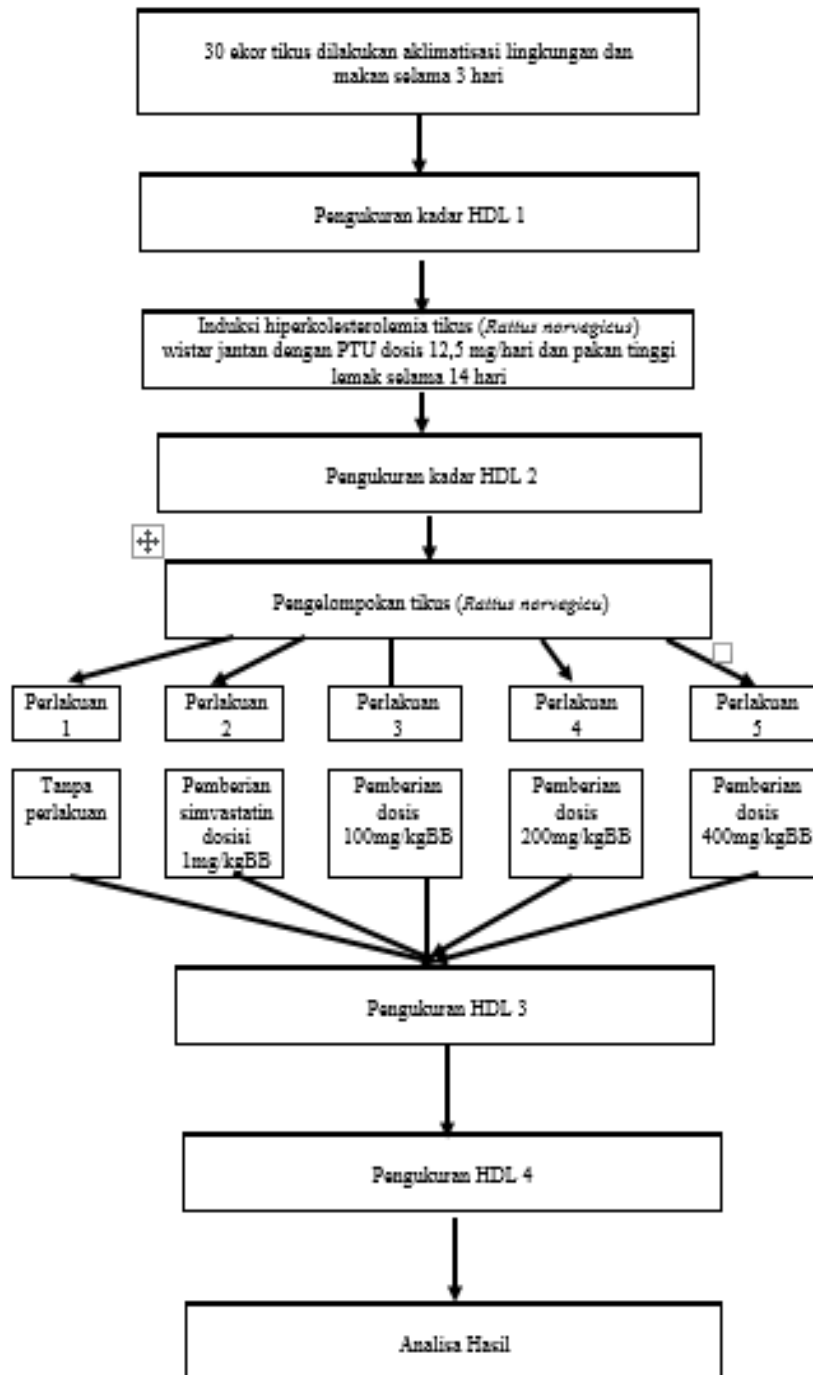
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis ini menggunakan desain *true eksperimental laboratorium* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) pada hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia dengan desain *pre-post testcontrol group design*.

B. Alur Penelitian



C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi:

Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan dengan berat ± 200 gram yang berumur 3-4 bulan.

2. Sampel:

Perhitungan jumlah sampel tikus wistar 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 tikus wistar dalam penelitian ini adalah 5 (terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan) maka $t = 5$, $(5-1)(n-1) \geq 15$ sehingga diperoleh $n \geq 5$.

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, jumlah sampel tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan yang digunakan dalam penelitian ini 5 ekor pada setiap kelompok induk yang dipilih secara random. Jumlah kelompok induk tikus wistar adalah 5, dengan jumlah tikus wistar seluruhnya ada 30 ekor.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, dan Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Waktu penelitian dilaksanakan bulan Juli 2016 sampai Januari 2017.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sebagai terapi pada kelompok perlakuan dan obat simvastatin sebagai terapi pada kelompok perlakuan kontrol positif.
2. Variabel Tergantung : kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan hiperkolesterolemia.
3. Variabel terkontrol : jenis kelamin tikus, usia tikus, berat badan tikus, makanan diet tinggi kolesterol dan kondisi lingkungan.

F. Definisi Operasional

- a. Ekstrak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diperoleh dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut ethanol. Dosis ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang digunakan pada penelitian ini adalah 100mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB.

- b. Kadar HDL adalah kadar HDL pada plasma tikus wistar jantan dengan metode HDL-Cholesterol yang berisi Tungsten Phosphoric Acid 1,4 mmol/l dan Magnesium Chloride 8,6 mmol/l. (Merck, Germany)
- c. Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan

Tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan yang digunakan adalah spesies tikus dengan jenis kelamin jantan, berat badan ± 200 gram, usia 3-4 bulan.

d. Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterolemia merupakan peningkatan kadar kolesterol pada tikus setelah pemberian pakan dengan diet tinggi lemak dan ditambahkan induksi PTU.

e. Induksi hiperkolesterolemia dengan PTU pada penelitian ini menggunakan dosis 12,5 mg/hari yang diberikan 1 kali sehari.

f. Diet tinggi lemak

Diet tinggi lemak yang dipakai dalam penelitian ini adalah dengan memberikan pakan kuning telur ayam mentah sebanyak 1ml/hari/kali.

g. Simvastatin

Simvastatin merupakan obat yang digunakan sebagai terapi pada kelompok kontrol positif menggunakan dosis 0,9 mg/kgBB/hari.

h. Kontrol negatif

Kontrol negatif adalah kelompok tikus yang diinduksi hiperkolesterolemia tanpa diberi perlakuan.

G. Alat dan Bahan Penelitian

Alat Penelitian

Alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah timbangan tikus, kandang tikus, wadah makan dan minum tikus, sonde lambung, mesin penyerbuk, pengaduk, kertas saring, Vacuum Rotary Evaporator, cawan porselin, spidol, almari pengering atau oven, pipet ukur, gelas ukur, kemasan untuk

penyimpanan, timbangan, spuit 3 ml, tabung mikrohematokrit, tabung sentrifuge, tabung elenmeyer 1 liter, inkubator *shaker*, spectrophotometer. (Micolab type 300) . Cawan porselin, pengaduk, Vacuum rotary evaporator, kemasan untuk penyimpanan, timbangan serbuk, timbangan daun, tabung mikrohematokrit, pipet hematokrit, sentrifuge, refrigerator, kain flanel, kertas saring, tabung erlenmeyer 500 mL, gelas ukur, corong.

Bahan penelitian

Bahan pada penelitian ini menggunakan daun kersen (*Muntingia calabura* L.), tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan sebanyak 30 ekor, sekam, ethanol 96%, simvastatin, aquades, makanan standar tikus (pelet), makanan tinggi lemak (kuning telur ayam mentah) dan reagen HDL (DiaSys-HDL FS) secara spektrofotometrik.

H. Persiapan Penelitian

- a. Melakukan identifikasi daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang akan digunakan sebagai bahan uji pada penelitian ini.
- b. Membuat ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

Pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan dengan cara maserasi yaitu mengeringkan daun kersen segar yang sudah dipilih kemudian dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan selama satu jam. Masukkan daun kersen dalam oven pada suhu 60°C selama 24

jam. Daun kersen yang sudah dikering selanjutnya dihaluskan dengan mesin grinding ukuran partikel 0,75 mm. Daun kersen yang sudah dihalus, diambil dan ditimbang sebanyak 150 gram dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer berukuran 1 liter. Pencampuran kersen dan ethanol dengan menambahkan pelarut ethanol sebanyak 96% dengan perbandingan 150 gram daun kersen dan 600 ml pelarut (daun kersen kering : etanol sebanyak 1:4). Hasil dari campuran kersen dan ethanol kemudian diendapkan selama satu malam pada suhu ruangan. Pengocokan campuran daun kersen dan ethanol menggunakan inkubator *shaker* dengan kecepatan 180 rpm selama 60 menit pada suhu ruang. Campuran selanjutnya disaring, apabila campuran masih terlihat kental dilakukan pengocokan ulang. Biasanya campuran menjadi berwarna jernih setelah dilakukan lima kali pengocokan. Proses berikutnya adalah evaporasi, dilakukan untuk memisahkan hasil ekstrak yang diperoleh dengan pelarut ethanolnya. Hasil ekstrak diukur dan ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan di dalam refrigerator pada suhu 5-10 °C untuk pengawetan.

c. Persiapan dan Pemeliharaan Tikus

Hewan uji coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan dengan berat ± 200 gram usia 3-4 bulan. Tikus diaklimatisasi selama 3-4 hari, dan diberi pakan pelet dua kali sehari dan aquades setiap hari. Aklimatisasi

dilakukan agar tikus wistar jantan dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Setiap tikus diberi tanda pengenal pada bagian ekor. Tikus wistar dipelihara didalam kandang yang dikelilingi oleh kawat yang sudah diberi sekam. Pembersihan kandang dilakukang setiap tiga hari sekali untuk menciptakan lingkungan yang baik pada tikus wistar jantan.

d. Melakukan induksi hiperkolesterolemia

Untuk memperoleh tikus wistar hiperkolesterolemia, dilakukan induksi menggunakan MDTL (Makanan Diet Tinggi Lemak). MDTL dalam penitian ini menggunakan kuning telur ayam mentah yang diberikan selama 14 hari. Ditambahkan pemberian pakan dengan cara menambahkan PTU 12,5 mg/hari

e. Membuat larutan stok bahan uji eksrtak ethanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.)

Dengan menimbang sebanyak 500 mg kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 5 mg/ml. Dosis yang diberikan pada penelitian ini adalah 100 mg/kg BB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.

f. Membuat suspensi simvastatin

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

I. Pelaksanaan Pengujian Tikus (*Rattus norvegicus*)

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

1. Kelompok P1, lima tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 100 mg/kgBB.
2. Kelompok P2, lima tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 200 mg/kgBB.
3. Kelompok P3, lima tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 400 mg/kgBB.
4. Kelompok K (+), lima tikus dalam kelompok ini mendapatkan perlakuan suspensi simvastatin 1 mg/kgBB
5. Kelompok K (-), lima tikus dalam kelompok tikus wistar tidak diberi perlakuan.

Hari 1-3 •Aklimitasi

Hari 4 •Cek kadar HDL sebelum perlakuan

Hari 4-17 •Induksi hiperkolesterolemia
 •PTU
 •Kuning telur ayam mentah

Hari 18 •Cek kadar HDL awal

Hari 18-23 •Induksi hiperkolesterolemia
 •PTU
 •Kuning telur ayam mentah
 •Perlakuan : kelompok positif, kelompok negatif, ekstrak daun kersen dan simvastatin

Hari 24	<ul style="list-style-type: none"> •Cek kadar HDL awal
Hari 24-31	<ul style="list-style-type: none"> •Induksi hiperkolesterolemia •PTU •Kuning telur ayam mentah •Perlakuan : kelompok positif, kelompok negatif, ekstrak daun kersen dan simvastatin •Cek kadar HDL setelah 7 hari pemberian ekstrak daun kersen
Hari 32	<ul style="list-style-type: none"> • Cek kadar kolesterol akhir dan dikorbankan

J. Pengambilan Plasma Darah dan Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Darah Tikus

Pengambilan darah dilakukan dengan menggunakan tabung mikrohematokrit dengan menusukkan pada bagian ekor tikus wistar jantan. 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 padatan. Serum diambil menggunakan pipet sebanyak 5 μ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi reagen HDL sebanyak 100 μ l. Selanjutnya serum dan reagen HDL dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian kadar HDL diukur menggunakan metode HDL-Cholesterol.

K. Analisis Data

Data hasil pengukuran kadar kolesterol pada tikus wistar dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan SPSS versi 16. Uji statistik yang dilakukan adalah uji normalitas dengan menggunakan Shapiro Wilk, 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 ANOVA.