

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan penelitian *pretest-posttest control group design*.

B. Obyek Penelitian

Objek penelitian ini adalah tikus putih *Rattus Norvegittus* , jantan, umur 2 bulan, berat rata-rata 184.36 ± 3.9 gr.

Jumlah sampel penelitian adalah 25 ekor tikus putih, tiap kelompok perlakuan dihitung dengan rumus federer, yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif: hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia, diberi makanan dan air putih saja.
2. Kelompok kontrol positif : hewan uji yang telah diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi lovastatin.
3. Kelompok uji dosis I : hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi jus biji pepaya 100 mg/Kgbb/hari dan juskunyit 70 mg/kbbb/hari.

4. Kelompok uji dosis II : hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi jus biji pepaya 200 mg/Kgbb/hari dan jus kunyit 70 mg/kbbb/hari.
5. Kelompok uji dosis III : hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi jus biji pepaya 400 mg/Kgbb/hari dan jus kunyit 70 mg/kbbb/hari.

Rumus federer yang digunakan adalah $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana

T = jumlah kelompok

N = jumlah sampel tiap kelompok

Deketahui : $t = 5$

Ditanya : $n = ?$

Jawab : $(t-1)(n-1) \geq 15$

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

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n=5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah sampel minimal tiap kelompok adalah 5. Dari hasil tersebut jumlah sampel penelitian adalah 25 ekor tikus putih *Rattus norvegicus*.

C. Tempat dan Waktu

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan selama 1 bulan, mulai bulan Desember 2016.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

Variabel dalam penelitian ini antara lain:

- a. Variabel bebas : kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit
- b. Variabel tergantung : kadar kolesterol total
- c. Variabel terkontrol : strain, umur, jenis kelamin, dan berat badan tikus.

2. Definisi Operasional

- a. Kolesterol: senyawa metabolit yang mengandung lemak sterol ditemukan pada membran sel di dalam jaringan dan lipoprotein plasma dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan dengan asam lemak rantai panjang sebagai ester kolesterol. Kadar normal kolesterol total untuk manusia adalah <200 mg/dL, sedangkan kadar normal kolesterol total tikus adalah $105,2 \pm 14,2$ mg/dL (Taguchi, 1985)
- b. Kadar kolesterol standar tikus: kadar kolesterol yang diperoleh dari rata-rata hasil pengukuran kadar kolesterol I yaitu setelah tikus diadaptasi selama 2 hari.
- c. Tikus hiperkolesterolemia : tikus yang mengalami kenaikan kadar kolesterol setelah diberi diet tinggi kolesterol selama 7 hari.

Diketahui setelah dilakukan pengukuran kadar kolesterol total II, hiperkolesterol jika kadar kolesterol dalam darah lebih dari 200 mg/dL.

- d. Lovastatin atau dikenal juga dengan nama mevinolin, sebagai agen ant hiperkolesterol, merupakan inhibitor kompetitif HMG-KoA reduktase yang akan menghambat sintesis kolesterol dalam hepar, pemberian 20 mg/hari (Mycek, dkk., 2001).
- e. Kombinasi jus biji pepaya dan juskunyit: biji pepaya matang yang telah dihaluskan dan dihomogenisasikan kemudian disaring, serta kunyit di haluskan menggunakan blender lalu disaring.
- f. Pemberian kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit: jus biji pepaya dan jus kunyit sesuai dosis, diberikan selama 30 hari, 1x sehari setiap pagi pada kelompok uji.
- g. Perubahan kadar kolesterol total : selisih nilai kadar kolesterol sebelum dan sesudah diberi jus biji pepaya. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test "CHOD-PAP"*.

Skala: rasio

E. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lainn: 25 buah kandang tikus, alas dan tutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus, sonde, sarung tangan, timbangan analitik, mikrohematokrit, rak

tabung reaksi, tabng reaksi, 25 buah ependrof, *centrifuge*, label, pencatat waktu, vortex, pipet, blender, homogenizer, dan penyaring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: jus biji pepaya berbagai dosis, jus kunyit, lovastatin, pakan BR 2, Kuning telur, etanol 70% air minum tikus (air putih), reagen KIT kolesterol, dan akuades.

F. Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Tahap-tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi:

1. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

a. Pembuatan jus biji pepaya dan jus kunyit

Biji buah pepaya matang dihaluskan dengan blender hingga halus kemudian ditimbang sesuai dengan kadar yang diinginkan. Setelah itu, ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 mL, kemudian dihomogenisasikan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 6612 rpm selama 2 menit .

b. Pembuatan jus kunyit

Kunyit yang telah dipilih di haluskan menggunakan blender hingga halus kemudian ditimbang sesuai kadar yang diinginkan. Setelah itu ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 mL, kemudian dihomogenisasikan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 6612 rpm selama 2 menit.

2. Pelaksanaan Penelitian

a. Persiapan objek Penelitian

Jumlah sampel penelitian adalah 25 ekor tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok dengan metode random, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan tiap kandang untuk 1 ekor tikus.

b. Penetapan Kadar

- 1) Kombinasi jus biji pepaya dosis 1, 100 mg/Kgbb/hari dan jus kunyit 70 mg/Kgbb/hari.

Untuk kadar tikus putih dengan berat badan 200 g adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 70 \text{ mg} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 20 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades sampai 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

- 2) Kombinasi jus biji pepaya dosis II 200 mg/Kgbb/hari dan jus kunyit 70 mg/Kgbb/hari.

Untuk kadar tikus dengan berat badan 200 adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ mg} = 40 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000} \times 70 \text{ mg} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 40 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades sampai 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

- 3) Kombinasi jus biji pepaya kadar III 400 mg/Kgbb/hari dan jus kunyit 70 mg/Kgbb/hari.

Untuk kadar tikus dengan berat badan 200 g adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 400 \text{ mg} = 80 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ g}}{1000} \times 70 \text{ mg} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 80 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades sampai 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

- a) Tikus dengan berat badan 200 g setara dengan manusia dengan berat 70 Kg,
- b) Satuan konversi adalah 0,018 (Ngatidjan, 2008),
- c. Perlakuan Hewan Uji
- 1) Kandang tikus yang bersih dipersiapkan dan diberi label terlebih dahulu, satu kandang untuk satu ekor tikus,

- 2) Dua puluh lima ekor tikus putih *rattus norvegicus* ditimbang dan dicatat berat badannya, selanjutnya dibagi menjadi lima kelompok, setiap kelompok terdiri dari lima ekor tikus,
- 3) Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama 2 hari kemudian tiap kelompok diambil 2 ekor tikus untuk dilakukan pemeriksaan darah I,
- 4) Masing-masing kelompok tikus diberi diet tinggi kolesterol setiap hari selama 7 hari dan pakan 20 g BR2 serta satu botol air minum per hari,
- 5) Semua tikus dilakukan pemeriksaan darah II untuk mengetahui tikus sudah mengalami hiperkolesterolemia,
- 6) Pakan dan air minum diganti setiap hari, kandang dibersihkan setiap hari agar hewan uji tetap kondisi sehat,
- 7) Kelompok tikus yang telah mengalami hiperkolesterolemia mendapat perlakuan sebagai berikut:
 - a) Kelompok kontrol positif, mendapat 20 g pakan BR 2, air minum setiap hari selama 30 hari,
 - b) Kelompok uji I mendapat 20 g pakan BR 2, air minum, jus biji pepaya 100mg dan jus kunyit 70 mg/Kg kadar I setiap hari selama 30 hari,
 - c) Kelompok uji II mendapat 20 g pakan BR2, air minum, jus biji pepaya 200mg dan jus kunyit 70 mg/Kg dosis II setiap hari selama 30 hari,

d) Kelompok uji III mendapat 20 g pakan BR2, minum, jus pepaya 400mg dan jus kunyit 70 mg/Kg dosis III setiap hari selama 30 hari.

8) Semua tikus ditimbang dan dicatat berat badannya pada saat sebelum adaptasi, dan pemeriksaan darah I,II, dan III.

d. Pengamatan

Setelah dilakukan perlakuan selama 30 hari, maka tiap obyek penelitian dilakukan pemeriksaan darah III. Pengambilan sampel darah tikus dilakukan dengan memasukkan mikrohematokrit ke bagian medial dari mata (sinus orbitalis) tikus. Darah yang keluar ditampung dalam ependorf. Darah tersebut diambil serumnya. Pengambilan serum dilakukan kurang lebih 30 menit sampai 1 jam setelah pengambilan darah. Langkah-langkah pengambilan serum sebagai berikut:

- 1) Darah disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit
- 2) Cairan bening bagian atas (serum) diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru.

Serum tersebut diperiksa kadar kolesterol totalnya menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test "CHOD-PAP"*. Tahap-tahap yang dikerjakan untuk masing-masing pemeriksaan kolesterol total meliputi:

- a) Pengambilan serum 10 μ L,
- b) Ditambahkan reagen kolesterol 1000 μ L,

- c) Dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar (20° C – 25° C) selama 20 menit,
- d) Diukur absorbansinya pada λ 546 mikrolab 300,
- e) Diukur absorbansi Standar 200 mg/dL dan absorbansi blanko,
- f) Dilakukan perhitungan,

$$\text{kadar kolesterol} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$\text{Konsentrasi standar} = 200 \text{ mg/dL}$$

G. Analisis Data

Skala pengukuran kolesterol total adalah skala interval. Analisis data dilakukan dengan seperangkat komputer dengan uji varians satu jalan (One Way Anova) yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*.