

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus galur Wistar, jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan dengan berat rata-rata 200 gram, sehat, aktif, dan tidak cacat yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok ditentukan dengan rumus *Federer*.

Rumus yang digunakan sebagai berikut :

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$n = 4$$

Keterangan :

t : banyaknya perlakuan

n : banyaknya sampel tiap kelompok

Sampel penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria penelitian berikut ini:

- Kriteria inklusi
 1. Tikus putih jantan galur Wistar
 2. Umur 2-3 bulan
 3. Berat badan ± 200 gram
 4. Sehat
- Kriteria eksklusi
 1. Terdapat abnormalitas anatomi yang tampak
 2. Tikus tampak sakit
 3. Tikus tidak bergerak secara aktif

Jumlah tikus galur wistar minimal yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 5 ekor tiap kelompok. Kemudian tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan secara acak yaitu:

1. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol negatif yaitu tikus tanpa diberi perlakuan khusus.
2. Kelompok 2 sebagai kelompok kontrol positif yaitu tikus hipertrigliserida.

3. Kelompok 3 sebagai kelompok standar yaitu tikus hipertrigliserida diberi simvastatin 0,72 mg/200 gram/BB.
4. Kelompok 4 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis I.
5. Kelompok 5 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis II.
6. Kelompok 6 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis III.

C. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

- 1) Variabel bebas : air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculentus L.*)
- 2) Variabel tergantung : kadar trigliserida
- 3) Variabel terkendali : strain, jenis kelamin, umur, berat badan, dan jenis makanan.

2. Definisi Operasional

- a) Trigliserida merupakan salah satu fraksi lipid dalam tubuh, kadar trigliserida yang dijadikan acuan nilai normal adalah < 150 mg/dL.
- b) Tikus hipertrigliserida pada penelitian ini merupakan tikus yang mengalami kenaikan kadar trigliserida setelah diberi diet tinggi lemak yaitu kuning telur puyuh secara oral 1,4 mL/200gram BB tikus/hari selama 7 hari (Meti *et al.*,

2017). Diketahui setelah dilakukan pengukuran kadar trigliserida kedua, hipertrigliserida jika kadar trigliserida darah > 150 mg/dL.

- c) Simvastatin merupakan obat golongan *HMG KoA reductase inhibitor* yang menghambat sintesis apolipoprotein B di hepar sehingga dapat menurunkan pengangkutan trigliserida ke pembuluh darah.
- d) Air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculentus L.*) berasal dari buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) yang dipotong kecil-kecil dan direndam dalam air bersuhu normal selama 3 jam.
- e) Perubahan kadar trigliserida merupakan selisih kadar trigliserida sebelum dan sesudah diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*). Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test GPO* dengan alat ukur standar spektrofotometer dan menggunakan skala pengukuran rasio.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain: 30 buah kandang tikus, alas dan tutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus, sonde, sarung tangan, timbangan analitik, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet, mikrohematokrit, inkubator, spektrofotometer, label, pencatat waktu.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: pakan tius BR2, air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dengan berbagai dosis, aquades, simvastatin, kuning telur puyuh, air minum tikus (air putih), larutan standar, dan reagen kit trigliserida.

E. Cara Pengumpulan Data

1) Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah 30 ekor tikus galur Wistar jenis kelamin jantan usia 1 bulan. Kemudian ditimbang dan dipilih yang memenuhi syarat berat badan kisaran 200 gram. Hewan uji diadaptasi selama 7 hari di kandang perawatan. Kemudian tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan secara acak yaitu:

1. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol negatif yaitu tikus tanpa diberi perlakuan khusus.
2. Kelompok 2 sebagai kelompok kontrol positif yaitu tikus hipertrigliserida.
3. Kelompok 3 sebagai kelompok standar yaitu tikus hipertrigliserida diberi simvastatin 0,72 mg/200 gram/BB.
4. Kelompok 4 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis I.
5. Kelompok 5 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis II.

6. Kelompok 6 yaitu tikus hipertrigliserida diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis III.

2) Penetapan Dosis

1. Dosis simvastatin

Dosis simvastatin berdasarkan hasil konversi untuk manusia ke tikus. Hasil konversi tersebut adalah sebagai berikut :

- Tikus dengan berat badan 200 gram setara dengan manusia dengan berat 70 kg.
- Satuan konversi adalah 0,018.
- Dosis simvastatin jika diberikan pada manusia dengan berat badan 70 kg sebesar 40 mg (Erwinanto *et al.*, 2013), maka jika diberikan pada tikus dengan berat 200 gram sebesar $40 \text{ mg} \times 0,018 = 0,72 \text{ mg}/200\text{gBB}/\text{hari}$.

2. Dosis perlakuan dengan air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*)

Buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*) yang dapat dikonsumsi manusia sebanyak 20 gram dalam 1 hari. Jika di konversi ke tikus dengan berat badan 200 gram maka :

$$20 \text{ gram} \times 0,018 = 0,36 \text{ gram}/200\text{grBB}/\text{hari}.$$

Dosis air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*) yang akan diberikan ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah dosis bertingkat sebagai berikut :

a) Dosis I

Air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*) sejumlah 0,18 gram yang direndam dalam air 3,6mL bersuhu normal selama 3 jam.

b) Dosis II

Air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*) sejumlah 0,36 gram yang direndam dalam air 3,6mL bersuhu normal selama 3 jam.

c) Dosis III

Air rendaman buah okra (*Abelmoschus esculntus L.*) sejumlah 0,72 gram yang direndam dalam air 3,6mL bersuhu normal selama 3 jam.

3) Perlakuan Hewan Uji

1. Tikus yang telah dikelompokkan diukur kadar trigliserida yang pertama.
2. Pada sampel kelompok 2, 3,4, kelompok 5, dan kelompok 6 diberi diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh secara oral 2 mL/200gram BB tikus/hari selama 7 hari (Meti *et al.*, 2017).
3. Semua tikus dilakukan pemeriksaan darah yang kedua untuk mengetahui tikus sudah mengalami hipertrigliserida.
4. Pada sampel kelompok 4, kelompok 5, dan kelompok 6 diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) per oral sesuai dosis masing-masing selama 28 hari.

5. Pada sampel kelompok 2 diberi simvastatin sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan selama 28 hari.
6. Tikus yang telah mendapat perlakuan sesuai kelompok masing-masing diukur kadar trigliserida yang ketiga.

4) Cara Pengukuran Kadar Trigliserida

Setelah dilakukan perlakuan selama 28 hari, maka tiap obyek penelitian dilakukan pemeriksaan darah. 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 trigliserida menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test GPO* dengan alat ukur standar spektrofotometer. Tahap-tahap yang dikerjakan untuk pemeriksaan kadar trigliserida meliputi:

a. Pengukuran absorbansi standar:

- 1) Pengambilan larutan standar 10 μ l.

- 2) Ditambahkan reagen kit trigliserida 1000 μ l.
- 3) Dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar (20° C – 25° C) selama 20 menit.
- 4) Diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm (Kumar, 2013).

b. Pengukuran absorbansi sampel

- 1) Pengambilan serum 10 μ l.
- 2) Ditambahkan reagen kit trigliserida 1000 μ l.
- 3) Dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar (20° C – 25° C) selama 20 menit.
- 4) Diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm (Kumar, 2013).

c. Penghitungan kadar trigliserida

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

(Kumar, 2013)

Konsentrasi standar = 200 mg/dL.

5) Mengolah dan Menganalisis Data

F. Uji Validitas dan Reliabilitas

Pada penelitian ini tidak dilakukan uji validitas dan reliabilitas karena dalam pengukuran kadar trigliserida telah menggunakan alat ukur yang telah dibakukan.

G. Analisa Data

Analisis data dilakukan dengan perangkat komputer dengan *Paired Sample t Test* untuk mengetahui adanya perbedaan atau tidak antara kadar trigliserida *pretest* dan *posttes*.

H. Etika Penelitian

Penelitian ini akan diajukan ke Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY) dengan menerapkan prinsip 3 R dalam protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.