

### BAB III

## METODOLOGI PENELITIAN

### A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *Pre and Post test Randomized Controlled Group Design* yang menggunakan hewan uji sebagai objek penelitian.

### B. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium gizi Pusat Antar Universitas (PAU) dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) selama kurang lebih 6 bulan (Maret-Agustus 2011).

### C. SAMPEL PENELITIAN

Sampel yang diteliti adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvergicus*) jantan galur *Sprague Dawley* berumur 2 bulan, sehat, aktif dan tidak cacat dengan berat badan antara 200-250 gram. Sampel penelitian diperoleh dari LPPT-UGM. Sampel diambil secara acak kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*).

Besarnya sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus *Federer*, dimana (t) merupakan banyaknya kelompok perlakuan dan (n) merupakan jumlah perlakuan. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) > 15$$

$$(5-1)(n-1) > 15$$

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75 \text{ (} n = 5 \text{)}$$

Besarnya tikus putih (*Rattus Novergicus*) galur *Sprague Dawley* yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 5 ekor tiap kelompok. (Supranto J, 2000). Ada 5 kelompok perlakuan, sehingga total tikus yang digunakan berjumlah 25 ekor.

#### **D. VARIABEL PENELITIAN**

##### **1. Variabel bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah biji buah rambutan (*Nephelium lapaaceum*) dengan berbagai dosis.

##### **2. Variabel tergantung**

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar HDL dalam darah tikus.

##### **3. Variabel terkendali**

Variabel terkendali atau kontrol pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berumur 2 bulan, dengan berat badan 200- 250 gram, jenis makanan, tempat dan waktu pemeliharaan dengan keseluruhan dari varian tersebut harus dikendalikan dalam keadaan yang sama, baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan.

## E. DEFINISI OPERATIONAL

1. Biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) yang digunakan pada penelitian ini adalah biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) yang diperoleh dari perkebunan rambutan, Semarang.
2. *High Density Lipoprotein* (HDL) adalah bahan yang digunakan untuk mengangkut kolesterol dalam darah, dikenal sebagai kolesterol "baik", HDL mengambil kelebihan kolesterol yang dibawa oleh lipoprotein densitas rendah dan ditransportasi ke hati.
3. Pakan atau ransum tinggi kolesterol adalah Campuran dari pakan tikus (pellet) dan minyak tinggi kolesterol. Minyak tinggi kolesterol yang dimaksud adalah lemak babi. Ransum tinggi kolesterol 20gr/ hari dengan komposisi 18 gr pakan tikus dan 2 ml minyak babi. Ransum tinggi kolesterol ini digunakan untuk menginduksi hewan uji agar mengalami hiperlipidemia.
4. Hewan uji coba adalah 25 ekor tikus putih *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* jantan berumur 2 bulan dan diperoleh dari kandang LPPT-UGM.
5. Simvastatin adalah obat antikolesterol untuk meningkatkan kadar HDL dalam darah, yang diperoleh dari apotek K-24 Gamping, Yogyakarta.

## F. INSTRUMEN PENELITIAN

### 1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 4 buah kandang tikus putih beserta alas dan tutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus putih, sonde, sarung tangan, timbangan, 20 buah endroft, pipet mikrohematokrit,

sentrifugator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pencatat waktu, label, mortir, vortex, blender, gelas ukur, batang pengaduk dan spektrofotometer.

## 2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain darah tikus putih, obat simvastatin, biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*), pakan BR2, minyak tinggi kolesterol, air minum tikus, akuades, larutan standart HDL dan reagen HDL.

## G. CARA KERJA

Tahap- tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi :

1. Persiapan alat dan bahan penelitian
2. Pelaksanaan penelitian
  - a. Pengelompokan objek penelitian

Dua puluh lima ekor tikus putih (*Rattus norvergicus*) jantan sebagai hewan uji dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing 5 ekor. Lima kelompok tersebut sebagai berikut :

- (1) Kelompok kontrol negatif, tikus hiperlipidemia yang hanya diberi air putih,
- (2) Kelompok kontrol positif, tikus hiperlipidemia yang diberi 0,1 mg obat simvastatin,
- (3) Kelompok perlakuan I, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis I,
- (4) Kelompok perlakuan II, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis II,

(5) Kelompok perlakuan III, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis III,

b. Penetapan dosis biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dan obat Simvastatin

Biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) untuk tikus putih dalam penelitian ini diberikan berdasarkan hasil konversi kadar untuk manusia ke tikus putih. Satuan dosis konversi manusia dengan berat badan 70kg ke tikus putih berat badan 200gram adalah 0,018 (Ngatidjan, 1991). Hasil konversi dosis pada penelitian sebagai berikut:

- (1) Dosis biji buah rambutan I, merupakan kadar minimal yaitu 2,5 buah biji rambutan dengan berat 2 gram perbiji (5 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah  $5 \text{ gram} \times 0,018 = 0,09 \text{ gram}$  (90 mg/200gram BB),
- (2) Dosis biji buah rambutan II, menggunakan dosis biji buah rambutan yang digunakan untuk menurunkan glukosa darah yaitu 5 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2 gram perbiji (10 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg (Dalimartha, 2007), sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah  $10 \text{ gram} \times 0,018 = 0,18 \text{ gram}$  (180 mg/200 gramBB),
- (3) Dosis biji buah rambutan III, merupakan kadar maksimal yaitu 10 buah biji rambutan dengan berat 2 gram perbiji (20 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah  $20 \text{ gram} \times 0,018 = 0,36 \text{ gram}$  (360 mg/200 gram BB),

(4) Dosis obat simvastatin, yaitu 10 mg/ hari untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah  $10 \text{ mg} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg}$  (0,18 mg/ 200 gramBB).

### 3. Perlakuan hewan uji

a. Kandang tikus putih dipersiapkan dalam keadaan bersih dan diberi label terlebih dahulu, 1 kandang terdiri dari 5 ekor tikus, dan di adaptasikan dengan lingkungan selama 3 hari

b. Dua puluh lima ekor tikus putih diberi tanda, ditimbang dan dicatat berat badannya, selanjutnya dibagi menjadi 5 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus, masing- masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

- (1) Kelompok kontrol negatif hanya mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ekor/hari selama 1 minggu dan air minum setiap hari,
- (2) Kelompok kontrol positif mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 0,18 mg/ 200 grBB/ hari obat simvastatin dan dilarutkan dengan 2 ml air selama 10 hari,
- (3) Kelompok perlakuan I mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 90 mg/ 200 grBB serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml air sekali sehari selama 10 hari,
- (4) Kelompok perlakuan II mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia,

tikus diberi 180 mg/ 200 grBB serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml air sekali sehari selama 10 hari,

(5) Kelompok perlakuan III mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 360 mg/ 200 grBB serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml air sekali sehari selama 10 hari,

c. Pakan dan air minum diganti setiap hari, selain itu sisa pakan juga ditimbang setiap hari. Perhitungan sisa pakan dilakukan dengan menjumlah sisa pakan dalam tempat pakan dan pakan yang tercecer dalam kandang,

d. Kandang dibersihkan setiap hari agar hewan uji tetap dalam kondisi sehat,

e. Semua tikus ditimbang dan dicatat berat badannya seminggu sekali.

Penimbangan dilaksanakan saat mengganti makanan yang baru.

f. Pemberian dosis disesuaikan dengan berat badan rata-rata untuk masing-masing kelompok tikus dan diubah sesuai dengan perubahan berat badan tikus setelah dilakukan penimbangan setiap minggu.

#### 4. Pengamatan

Pengambilan darah tikus dilakukan 3 kali yaitu, sebelum mendapat perlakuan (hari ke-1), setelah diinduksi ransum tinggi kolesterol selama 7 hari sebelum mendapat perlakuan (hari ke-8), dan setelah perlakuan selama 10 hari (hari ke-18). Sampel darah tikus diambil dengan cara menusukkan pipet mikrohematokrit ke bagian medial dari mata (*sinus orbitalis*) tikus. Tikus dipuasakan kurang lebih 12 jam sebelum pengambilan darah. Darah yang keluar ditampung dalam endorff, kemudian diambil serumnya.

Langkah-langkah pengambilan serum adalah pertama, darah disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit kemudian cairan bening bagian atas (serum) diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru yang akan menjadi sampel yang digunakan pada tahap berikutnya. Serum tersebut diperiksa kadar HDL. Campuran blanko pada tabung 1 dibuat berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l air. Campuran standar HDL pada tabung 2 berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l larutan standar. Campuran sampel pada tabung 3 berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l sampel serum atau plasma.

Setelah semua bahan di atas selesai dicampur ke dalam masing-masing tabung reaksi, Langkah selanjutnya adalah membaca absorbansi pada spektrofotometri dengan menggunakan panjang gelombang 500nm pada suhu 20-25°C. Hasil pengukuran kemudian dihitung untuk mendapatkan angka HDL plasma dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{HDL (mg/dl)} = \frac{\text{Asp} - \text{Abl}}{\text{Ast} - \text{Abl}} \times \text{Cst}$$

Keterangan :

- HDL = kandungan HDL plasma yang diukur
  - Asp = Absorbansi sampel
  - Ast = Absorbansi standar
  - Abl = Absorbansi blanko
  - Cst = kandungan HDL standard yang diketahui (mg/dl)
- Bagan rancangan penelitian dapat dilihat pada gambar 2.

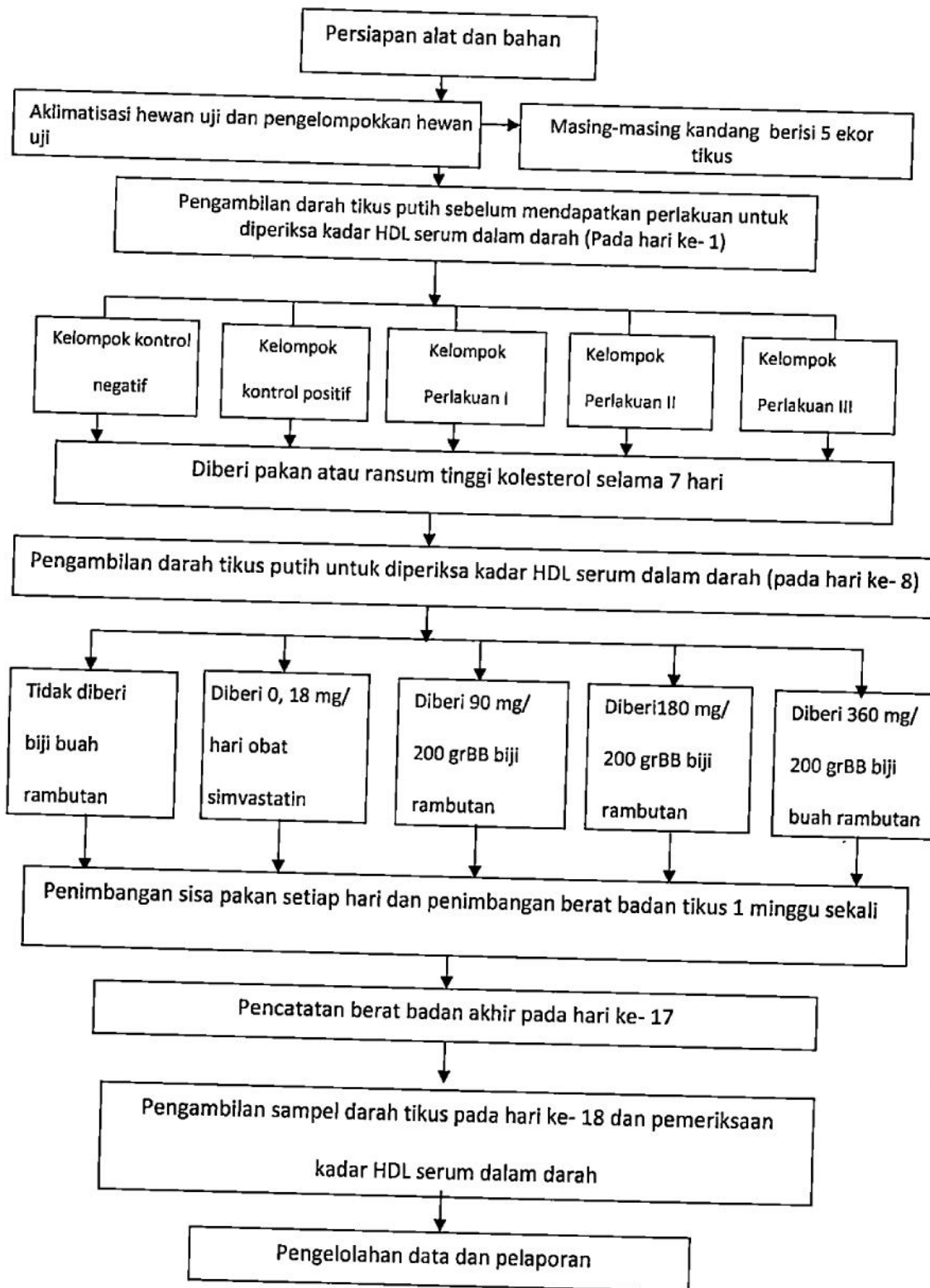
## H. ANALISIS DATA

Data hasil pengukuran dianalisis dengan seperangkat komputer menggunakan uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hock-tuckey* dan uji *paired t-test*.



Untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar kolesterol HDL darah sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok, data hasil pengukuran dianalisis menggunakan uji *paired t-test*. Jika data tidak berdistribusi normal maka dianalisis menggunakan uji *wilcoxon*.

Untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar kolesterol HDL darah antar kelompok, data dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *post hock tuckey* antar kelompok. Jika data tidak berdistribusi normal, dianalisis menggunakan uji *kruskal wallis* dan dilanjutkan dengan uji *post hock-tuckey*.



Gambar2. Rancangan cara kerja