

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. DESAIN PENELITIAN**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni 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 Pusat Antar Universitas (PAU) bioteknologi- pangan gizi dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), selama kurang lebih 6 bulan (maret-agustus 2011).

#### **C. SAMPEL PENELITIAN**

Sampel yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* karena mendekati organ tubuh pada manusia. Tikus jantan karena mempunyai kondisi hormonal yang relatif stabil sehingga sistem hormonal tidak banyak mempengaruhi metabolisme tubuhnya.

Tikus berumur 2 bulan karena organnya telah mampu bekerja secara optimal. Tikus sehat, aktif dan tidak cacat dengan berat badan awal antara 200-250 gram yang diperoleh dari LPPT- UGM.

Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok. Besarnya

banyaknya kelompok perlakuan dan (n) merupakan jumlah perlakuan. Rumus yang digunakan sebagai berikut :

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

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

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

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75 \quad (n = 5)$$

Besarnya tikus putih (*Rattus norvegicus*) 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 yaitu biji buah rambutan (*Nephelium Lappaceum*) dengan berbagai dosis.

##### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat yaitu kadar kolesterol- LDL darah hewan uji.

##### **3. Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan berumur 2 bulan dengan berat antara 200- 250 gram, jenis

dikendalikan dalam keadaan yang sama, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

## **E. DEFINISI OPERASIONAL**

1. Biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) yang digunakan untuk penelitian ini diperoleh dari perkebunan rambutan di Semarang, Jawa Tengah. Biji buah rambutan digiling halus menjadi serbuk, kemudian serbuk dilarutkan dengan 2 ml aquadest.
2. Kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) adalah lipoprotein yang digunakan untuk mengangkut kolesterol dari hati ke perifer, dikenal sebagai kolesterol "jahat".
3. Pakan atau ransum tinggi kolesterol adalah campuran dari 90 % pakan tikus (pakan BR2) dan 10% minyak tinggi kolesterol. Pakan tinggi kolesterol ini digunakan untuk menginduksi hewan uji agar mengalami hiperlipidemia. Minyak tinggi kolesterol yang dimaksud adalah lemak babi.
4. Hewan uji adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan berumur 2 bulan, berat badan antara 200- 250 gram, sehat, aktif dan tidak cacat, yang diperoleh dari LPPT- UGM.
5. Simvastatin adalah obat antikolesterol untuk mengurangi kadar LDL dalam

## F. INSTRUMEN PENELITIAN

### 1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 5 buah kandang tikus beserta alas dan penutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus putih, sonde, sarung tangan, timbangan, 25 buah tabung 'ependroft, pipet mikrohematokrit, sentrifugator, vortex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pencatat waktu, label, spektrofotometer, blender, gelas ukur, dan batang pengaduk.

### 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, aquadest, air minum tikus, larutan standart LDL, dan reagen kit LDL.

## 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*) galur *Sprague Dawley* 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 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 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 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),
- (2) Dosis I merupakan kadar minimal yaitu 2,5 buah biji rambutan dengan berat sekitar 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/200 gramBB),
- (3) Dosis II menggunakan dosis biji buah rambutan yang digunakan untuk menurunkan glukosa darah yaitu 5 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2

2003), 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),

(4) Dosis III, merupakan kadar maksimal yaitu 10 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2 gram per biji (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 gramBB),

### 3. Perlakuan hewan uji

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

b. Dua puluh lima ekor tikus putih diberi tanda, ditimbang dan dicatat berat badannya, dan dibagi menjadi 5 kelompok 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 yang dilarutkan dengan 2 ml aquadest 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/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan

(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/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml aquadest 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/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml aquadest 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

Pengukuran kadar kolesterol- LDL serum dalam darah tikus putih dilakukan tiga kali. Pertama, sebelum diberi pakan tinggi kolesterol (pada hari ke- 1), kedua setelah diberi pakan tinggi kolesterol dan sebelum mendapatkan perlakuan (pada hari ke- 8), dan ketiga setelah 10 hari mendapat perlakuan (pada hari ke- 18).

mikrohematokrit ke bagian medial dari mata (*simus orbitalis*) tikus. Sebelum pengambilan darah, tikus dipuasakan selama 12- 16 jam. Hal ini dilakukan agar penetapan kadar kolesterol- LDL tidak terpengaruh oleh asupan makanan. Darah tikus ditampung dalam tabung ependorf dan diambil serumnya. Pengambilan serum dilakukan kurang lebih 30 menit sampai 1 jam setelah pengambilan darah.

Langkah-langkah pembuatan 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. Sampel diperiksa kadar kolesterol LDL.

Langkah- langkah pemeriksaan kadar LDL adalah dibuat campuran blanko pada tabung 1 berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l aquadest, campuran standart pada tabung 2 berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l larutan standart, dan campuran sampel pada tabung 3 berupa 1000  $\mu$ l reagen ditambah 10  $\mu$ l sampel serum. Larutan pada masing- masing tabung dicampur dengan bantuan vortex, dan di inkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan (20- 25°C), kemudian dibaca absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm pada suhu 20- 25°C. Kadar LDL dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

Kadar LDL = Konsentrasi LDL plasma yang diukur

Asp = Absorbansi sampel

Ast = Absorbansi standar  
Abl = Absorbansi blanko  
Cst = Konsentrasi LDL standard yang diketahui (200mg/dl)

Bagan rancangan penelitian dapat dilihat pada gambar 4.

## H. ANALISIS DATA

Data hasil pengukuran dianalisis menggunakan seperangkat komputer dengan uji *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *post hock- tuckey*, dengan ketentuan jika  $p < 0,05$ , maka ada perbedaan yang bermakna. Data sebelum di analisis, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro- Wilk*.

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

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing- masing kelompok perlakuan, 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-*

