

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian merupakan eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *Pre test - Post test Controlled Design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama kurang lebih dua bulan, yaitu bulan Juli sampai Agustus 2011.

C. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada. Jumlah sampel dalam penelitian adalah 24 ekor yang diambil secara *stratified random sampling*. Subjek yang diteliti memiliki kriteria inklusi sebagai

1. Usia sekitar 2 bulan.
2. Memiliki berat badan 200-270 gram.
3. Berjenis kelamin jantan.

Kriteria eksklusi adalah tikus yang tidak mau makan, minum atau mengalami penurunan keadaan fisik selama penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel-variabel dalam penelitian ini antara lain :

- a. Variabel bebas : air rebusan daun sukun (*Artocarpus altilis*).

- b. Variabel tergantung : kadar LDL serum tikus putih (*Rattus norvegicus*)

- c. Variabel pengganggu terkendali :

- 1) Ras. Perbedaan ras dapat mempengaruhi farmakokinetik dan efek samping dari suatu obat pada penelitian ini dipilih tikus dari galur yang sama, yaitu galur *Sprague Dawley*.

- 2) Usia. Penelitian ini menggunakan tikus putih berumur 2 bulan untuk membuat sampel homogen dan menghindari peningkatan serum LDL oleh faktor umur.

- 3) Jenis kelamin. Jenis kelamin tikus putih yang dipakai adalah tikus putih jantan karena tidak terpengaruh oleh hormon-hormon pada siklus menstruasi.

4) Berat badan. Berat badan akan mempengaruhi pemberian dosis air rebusan daun sukun sehingga dipilih tikus dengan berat badan yang hampir sama, yaitu antara 200-270 gram.

d. Variable pengganggu tak terkendali :

Faktor genetik. Faktor genetik tidak dapat dikendalikan secara mutlak. Hal ini diatasi dengan pemilihan subjek penelitian yang berasal dari galur yang sama (galur *Sprague Dawley*).

2. Definisi Operasional

- a. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur *Sprague Dawley* jantan berusia sekitar 2 bulan yang diberi perlakuan dengan pemberian air rebusan daun sukun, pakan tinggi lemak, dan aquades sebagai kontrol.
- b. Air rebusan daun sukun yang digunakan berasal dari daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang sudah dikeringkan dengan berbagai konsentrasi.
- c. Kadar LDL serum adalah kadar LDL yang diperiksa dari serum hewan uji sebanyak 3 kali, yaitu sebelum induksi pakan tinggi lemak, sebelum perlakuan (setelah 1 minggu diinduksi pakan tinggi lemak), dan setelah perlakuan selama 2 minggu.
- d. Minyak babi adalah minyak yang mengandung kadar lemak tinggi yang dapat dicampurkan dengan pakan ternak untuk meningkatkan kadar trigliserida dan kolesterol serum tikus putih.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain empat buah kandang tikus putih, tempat pakan dan minum tikus putih, sonde, sarung tangan, timbangan, seperangkat alat yang digunakan untuk pengambilan sampel dan penentuan kadar LDL serum tikus yang terdiri dari alat sentrifugasi, mikrohematokrit, tabung reaksi, pipet tetes, *eppendorf* (mikropipet), pipet tip, kuvet, dan spektrofotometer,

2. Bahan

a. Untuk perlakuan dan pemeliharaan

Bahan yang digunakan antara lain daun sukun, pakan BR 2, pakan tinggi lemak, air minum tikus putih.

b. Untuk pemeriksaan kadar LDL serum

1.) Reagen Presipitasi LDL dengan komposisi sebagai berikut:

Heparin	100.000 U/L
Sodium sitrat	64 mmol/L

2.) Reagen kolesterol standar dengan komposisi sebagai berikut:

Buffer	pH 6,7	50 mmol/l
Phenol		5 mmol/l
4-Aminoantipyrin		0,3 mmol/l
Cholesterol esterase	(CHE)	≥ 200 U/l
Cholesterol oxidase	(CHO)	≥ 50 U/l
Peroxidase	(POD)	≥ 3 KU/l

F. Cara Kerja

Tahap-tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi :

1. Persiapan alat dan bahan penelitian.
2. Penatalaksanaan penelitian :
 - a. Penetapan konsentrasi air rebusan daun sukun

Dalam penelitian ini digunakan air rebusan daun sukun sebagai perlakuan. Dua puluh gram daun sukun tua yang telah dikeringkan dipotong kecil-kecil untuk direbus bersama dua liter air. Jika angka konversi tikus berdasarkan Laurence sebesar 0,018, maka perhitungan konsentrasi air rebusan dapat dihitung sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentras} &= \frac{\text{Angka konversi tikus} \times \text{berat bahan} \times 100\%}{\text{Volume air}} \\
 &= \frac{0,018 \times 20 \text{ gram} \times 100\%}{2\text{liter}} \\
 &= 18\%
 \end{aligned}$$

- b. Penentuan dosis rebusan daun sukun

Dosis rebusan daun sukun yang dianjurkan untuk manusia adalah 500-1500ml dalam sehari. Dosis ini diberikan dengan asumsi berat badan manusia menurut Laurence 70 kg, sehingga dosis yang diberikan ke tikus putih dengan berat badan 200gr harus dikonversikan terlebih dahulu. Sediaan rebusan daun sukun dibagi menjadi tiga variasi dosis,

$$\checkmark \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB manusia}} \times 1000 = \frac{0,2}{70} \times 1000 = 2,8 \text{ ml}$$

$$\checkmark \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB manusia}} \times 1500 = \frac{0,2}{70} \times 1500 = 4,2 \text{ ml}$$

c. Perlakuan hewan uji

- 1) Kandang tikus putih dibersihkan, dipersiapkan dan diberi label
- 2) Dua puluh empat ekor tikus diberi tanda, ditimbang, dan dicatat berat badannya, selanjutnya dibagi menjadi empat kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus.
- 3) Masing-masing kelompok tikus mendapatkan pakan dan air minum setiap hari sesuai dengan perlakuan kelompoknya.
- 4) Kandang dibersihkan setiap hari agar kondisi hewan uji tetap sehat.
- 5) Masing-masing kelompok tikus mendapat perlakuan sebagai berikut:
 - a) Kelompok kontrol tanpa perlakuan mendapat pakan tinggi lemak 75gr/hr selama satu minggu pertama. Setelah itu, diberikan pakan BR 2 40gr/hari dan minum aquades selama dua minggu perlakuan.
 - b) Kelompok perlakuan 1 mendapat mendapat pakan tinggi lemak 75gr/hr selama satu minggu pertama. Setelah itu, diberikan pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun

sukun dengan konsentrasi 18% sebanyak 1,4ml selama dua minggu perlakuan.

c) Kelompok perlakuan 2 mendapat mendapat pakan tinggi lemak 75gr/hr selama satu minggu pertama. Setelah itu, diberikan pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18% selama sebanyak 2,8ml selama dua minggu perlakuan.

d) Kelompok perlakuan 3 mendapat mendapat pakan tinggi lemak 75gr/hr selama satu minggu pertama. Setelah itu, diberikan pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18% sebanyak 4,2ml selama dua minggu perlakuan.

d. Cara Kerja Penentuan Kadar LDL

Penentuan kadar LDL serum tikus menggunakan metode COHD-PAP DiaSys. 100 μ l sampel serum dicampur dengan 1000 μ l reagen presipitan. Selanjutnya campuran ini diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan (20°C-25°C) dan disentrifugasi selama 20menit. Pindahkan 100 μ l supernatan sebelum 1 jam, ke dalam tabung baru untuk dilakukan uji bersama reagen kolesterol

Tabel 3.1 Bahan Uji Supernatan

Bahan	Standar	Sampel	Blanko
Supernatan	-	100 μ l	-
Standar	100 μ l	-	-
Reagen kolesterol	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l
Akuades	-	-	100 μ l

Bahan bahan di atas dicampur dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan (20°C-25°C) atau selama 5 menit pada suhu 37°C. Baca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500nm sebelum 45 menit. Kadar LDL kolesterol ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{LDL kolesterol} &= \text{Kolesterol supernatan (mg/dl)} \\ &= \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar}} \times \text{Konsentrasi standar} \end{aligned}$$

Keterangan :

ΔA sampel = Absoransi sampel – Absorbansi blanko

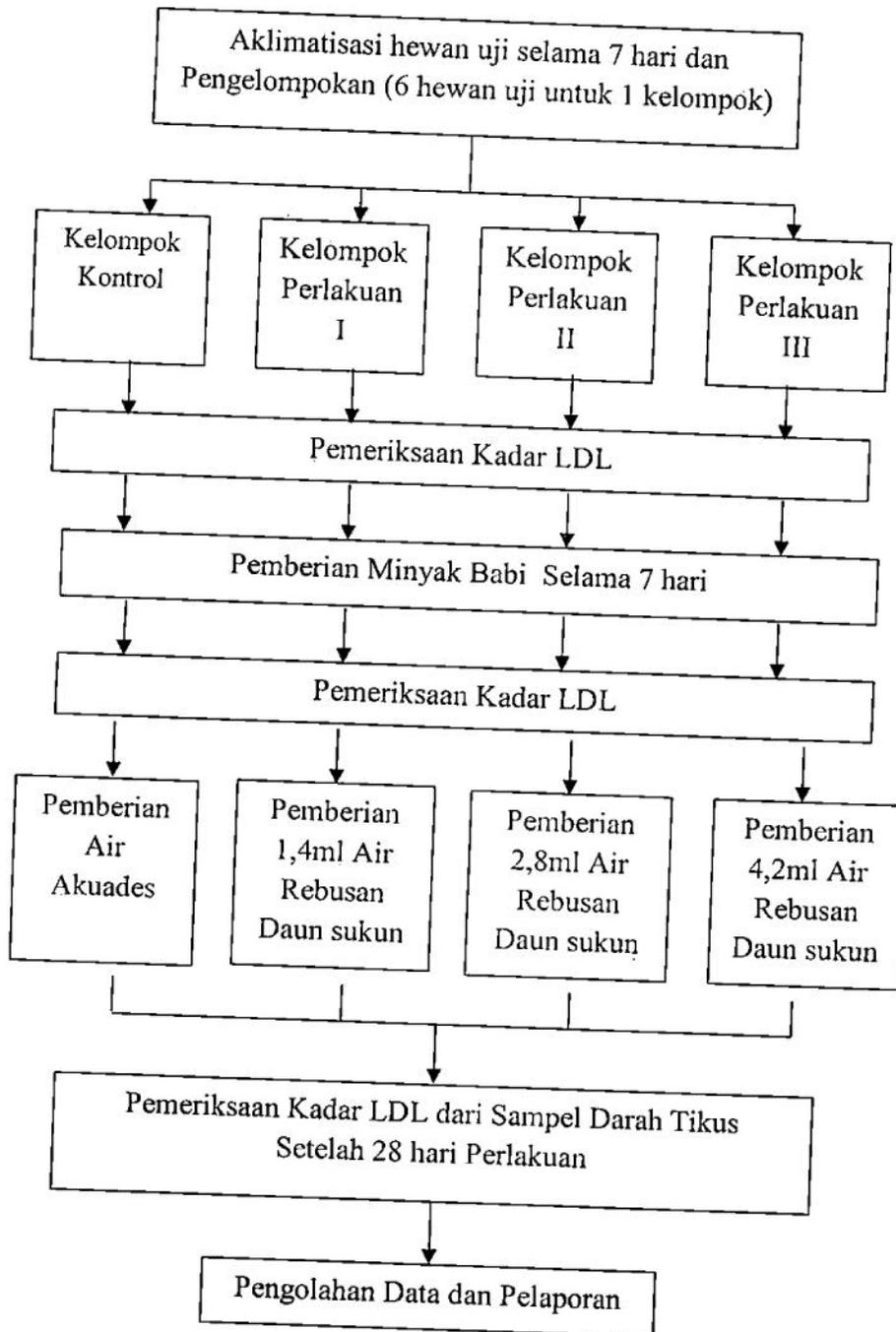
ΔA standar = Absoransi standar – Absorbansi blanko

Konsentrasi standar = 200 mg/dl atau 5.2 mmol/l

G. Analisis Data

Skala pengukuran LDL menggunakan skala interval. Analisis data dilakukan dengan seperangkat komputer dengan analisis *one way* ANOVA dilanjutkan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan dan menggunakan uji *paired T test* untuk membandingkan hasil sebelum dan

H. Mekanisme Kerja



Gambar 3.1 Mekanisme Kerja