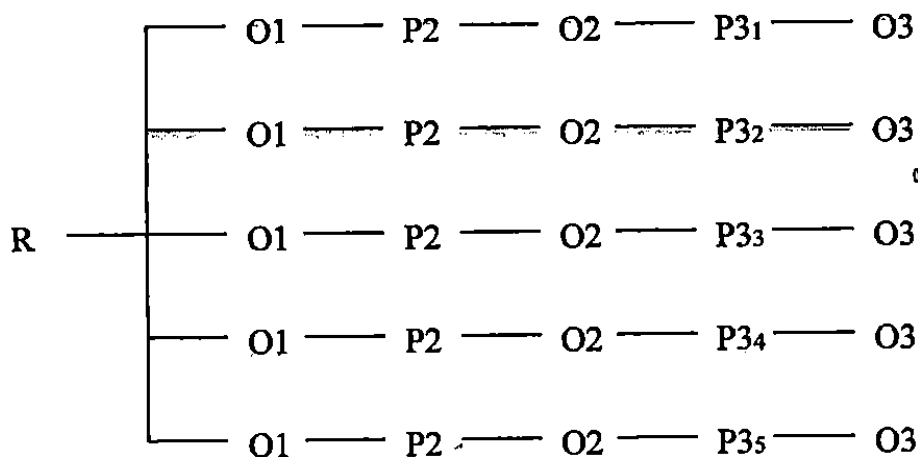


BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

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



Gambar 2. Rancangan Penelitian

Keterangan:

- R : Rancangan penelitian
- O1 : Observasi 1 → pengukuran kadar kolesterol total dan HDL darah pertama (sebelum diberi perlakuan)
- O2 : Observasi 2 → pengukuran kadar kolesterol total dan HDL darah ke-2 (setelah diet tinggi kolesterol)
- O3 : Observasi 3 → pengukuran kadar kolesterol total dan HDL darah ke-3 (setelah diberi perlakuan)
- P2 : Perlakuan 2 → pemberian diet tinggi kolesterol
- P3₁ : Perlakuan 3 ke-1 → kontrol negatif
- P3₂ : Perlakuan 3 ke-2 → kontrol positif
- P3₃ : Perlakuan 3 ke-3 → kelompok uji 1
- P3₄ : Perlakuan 3 ke-4 → kelompok uji 2

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FK UMY).

2. Waktu

Waktu penelitian dilaksanakan antara bulan Juli-Agustus 2008.

C. SUBYEK PENELITIAN

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dowley* (SD), berumur 2 bulan, dengan berat 175-225 g sebanyak 20 ekor.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas : tempe biji karet (*Hevea brasiliensis*)

2. Variabel Tergantung : Kadar kolesterol total dan HDL masing-masing subyek

3. Variabel Kendali

(a). Usia : diatasi dengan pemilihan subyek penelitian yang memiliki usia sekitar 2 bulan.

(b). Jenis kelamin : diatasi dengan pemilihan subyek dari jenis kelamin yang sama

(c). Berat badan : diatasi dengan pemilihan subyek yang memiliki berat badan antara 175-225 gram.

(d). Lama perlakuan dan takaran sampel yang diuji : diatasi dengan lama penelitian yang sama tiap kelompok yaitu 10 hari dan takaran sampel yang sama untuk tiap kelompoknya yaitu, kelompok kontrol negatif tidak mendapat perlakuan apa-apa, kelompok kontrol positif mendapat 0,1mg obat simvastatin, kelompok uji 1 mendapat 1,25 g tempe biji karet, kelompok uji 2 mendapat 2,5 g tempe biji karet, dan kelompok uji 3 mendapat 5 g tempe biji karet.

E. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain:

1. Alat yang digunakan

- a. Tabung reaksi
- b. Tabung centrifuge
- c. Spektrofotometer merek Spektronic 21D
- d. *Eppendorf*
- e. Neraca analitik
- f. Sonde mulut dan spuitnya

g. Blender merek Philips

2. Bahan yang digunakan

- a. *Magnesium clorida 25 mmol/l*
- b. *Phosphotungsic acid 0,55 mmol/l*
- c. Simvastatin 10 mg
- e. Tempe biji karet 1,25 g, 2,5 g, dan 5 g untuk masing-masing subyek sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan
- f. Larutan Reagen KIT kolesterol yang terdiri dari:

4-Aminoantipyrine	5 mmol/L
Cholesterol esterase (CF 1E)	0,3 mmol/L
Cholesterol oksidase	≥ 200 mmol/L
Peroxidase	≥ 50 mmol/L
Standard	200 mg/dL (5,2 mmol/L)

g. Minyak babi untuk semua subyek penelitian

h. Aquades

3. Bahan yang diperiksa

Bahan yang diperiksa adalah darah vena yang kemudian di centrifuge dan diambil serumnya.

F. JALANNYA PENELITIAN

Langkah-langkah dalam penelitian ini meliputi:

1. Pengelompokan tikus

Pada penelitian ini, tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok (masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus) :

Kelompok tikus I sebagai kontrol negatif dengan pemberian aquades pada masing-masing tikus.

Kelompok tikus II sebagai kontrol positif dengan pemberian obat simvastatin 0,1 mg selama 14 hari.

Kelompok tikus III, IV, V, sebagai kelompok uji dengan masing-masing tikus diberi tempe biji karet dengan dosis bertingkat selama 10 hari.

2. Pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL, TG

Pemeriksaan ini dilakukan sebelum tikus diberi perlakuan sesuai dengan yang telah ditentukan. Pemeriksaan ini hanya dilakukan terhadap 5 tikus diambil 1 subyek dari masing-masing kelompok karena tujuannya hanya untuk mengetahui kadar kolesterol total dan HDL subyek masing-masing kelompok sebelum diberi diet tinggi kolesterol kemudian dibandingkan dengan kadar kolesterol total dan HDL subyek setelah diberi diet tinggi kolesterol apakah terjadi perubahan yang diharapkan atau tidak.

Sebelum pengambilan darah, hewan uji dipuasakan selama 8-12 jam. Darah subyek diambil sebanyak 1,5 ml menggunakan gunting dan kapas alkohol dengan cara dipotong sedikit ekornya.

3. Pemberian diet tinggi kolesterol

Seluruh subyek penelitian diberi diet tinggi kolesterol selama 7 hari untuk menaikkan kadar kolesterol darah.

4. Pemeriksaan kadar kolesterol total dan HDL darah kedua

Pemeriksaan ini dilakukan setelah tikus diberi diet tinggi kolesterol. Pemeriksaan ini dilakukan terhadap seluruh subyek dan tujuannya adalah untuk mengetahui bagaimana perubahan kadar kolesterol total dan HDL subyek setelah diberi diet tinggi kolesterol. Sebelum pengambilan darah, hewan uji dipuasakan selama 8-12 jam. Darah subyek diambil sebanyak 1,5 ml menggunakan gunting dan kapas alkohol dengan cara dipotong sedikit ekornya.

Simvastatin diberikan pada kelompok tikus I sebagai kontrol positif. Perhitungan dosis simvastatin yang akan diberikan pada tikus putih dalam penelitian sebagai berikut:

- Dosis simvastatin untuk manusia yang mempunyai berat badan rata-rata 70 kg adalah 40 mg.
- Maka dosis simvastatin untuk tikus dengan berat badan rata-rata 200 g = $200/70.000 \times 40 \text{ mg} = 0,114 \text{ mg}$.

6. Pemberian tempe biji karet selama 10 hari

Tempe biji karet diberikan selama 10 hari dan diberikan pada kelompok tikus III, IV, V. Perhitungan dosis tempe biji karet yang akan diberikan pada tikus putih dalam penelitian sebagai berikut:

- Konversi dosis manusia yang berat badannya 70 kg ke tikus putih yang berat badannya 200 gram adalah 0,018.
- Dosis niasin untuk manusia yang mempunyai berat badan rata-rata 70 kg adalah 1,2 mg.
- Maka dosis niasin untuk tikus dengan berat badan rata-rata 200 g = $200/70.000 \times 1,2 \text{ mg} = 0,0034 \text{ mg}$
- Jadi dosis niasin untuk tikus putih dengan berat badan 200 g = $0,018 \times 0,0034 \text{ mg} = 0,0000612 \text{ mg/kg BB} = 0,0612 \text{ } \mu\text{g/BB}$

Sehingga dosis tempe biji karet untuk kelompok III, IV, V masing-masing sebesar 0,0306 $\mu\text{g/kg BB}$

- Setiap 100 g biji karet mengandung 2,5 μg , jadi dosis niasin 0,0612 maka=
 $0,0612/2,5 \times 100 \text{ g} = 2,5 \text{ g}$
- Jadi dosis tempe biji karet pada kelompok III, IV, V masing-masing sebesar 1,25 g, 2,5 g, dan 5 g.
- Pemberian tempe biji karet dengan cara di sonde, sebelumnya tempe biji karet dihaluskan terlebih dahulu dengan blender dengan penambahan 0,5 ml air untuk

Reagen	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
--------	--------------	--------------	--------------

Campur baik-baik, inkubasikan selama 20 menit pada suhu 20-25°C atau 10 menit pada suhu 37°C. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

Kadar kolesterol dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar kolesterol dalam} = \frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko}}} \times \text{Konsentrasi standar}$$

b. Pemeriksaan kadar kolesterol HDL

Kadar kolesterol HDL diperiksa menggunakan metode *precipitation of LDL VLDL and Chylomicrons*, cara kerjanya sebagai berikut:

(1). Presipitasi

Presipitasi untuk pemeriksaan ini menggunakan teknik *semi micro assays*, dengan cara sebagai berikut:

Sampel	HDL reagen diluted
200 μ l	500 μ l

Larutan dicampur dengan baik dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifuge selama 2 menit dengan kecepatan putaran 10.000 rpm atau 10 menit pada 4000 rpm. Setelah disentrifugasi memisahkan supernatan yang bening dengan presipitat, dalam waktu 1 jam penghitungan konsentrasi kolesterol

(2). Determinasi Kolesterol

Panjang gelombang spektrofotometer	546 nm
Optical Patch	1 cm
Temperatur	20-25° C

	Blanko	Sampel
Aquadest	100 µl	-
Supernatan	-	100 µl
Reagen	1000 µl	1000 µl

Larutan dicampur dengan baik , dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C atau 5 menit pada suhu 37°C, kemudian absorbansi masing-masing larutan dibaca pada panjang gelombang 546 nm.

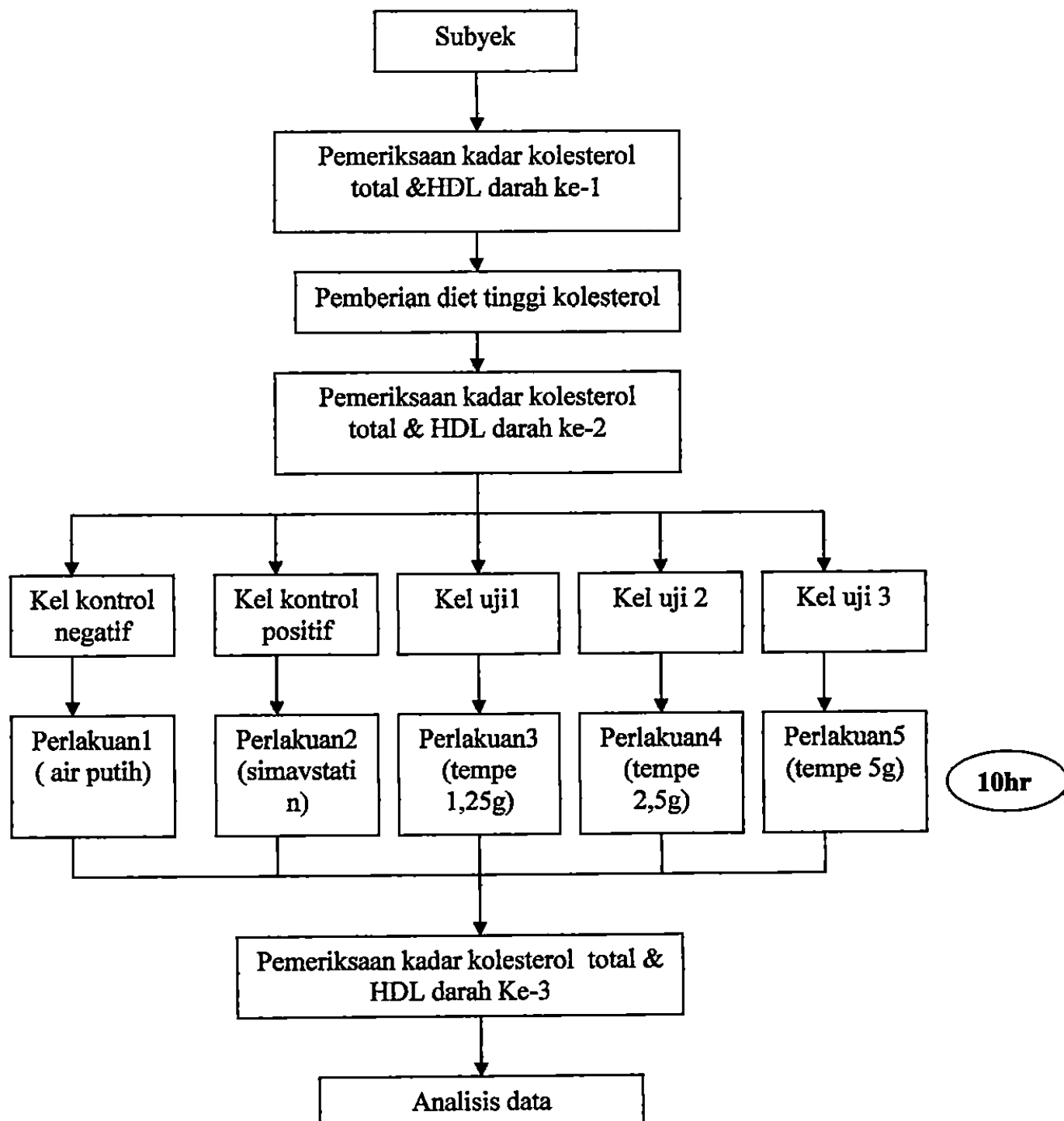
1. Kalkulasi dari kolesterol HDL

Rumus:

Kadar kolesterol HDL (mg/dl) : $\frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar}} \times \text{konsentrasi standar}$

G. ANALISIS DATA

Data berupa kadar kolesterol total dan HDL darah tikus sebelum perlakuan, setelah pemberian diet tinggi kolesterol, dan setelah pemberian perlakuan sesuai yang telah ditentukan dianalisis dengan uji statistik one way annova. Dilanjutkan dengan uji *Post Hock* antar kelompok dan *Paired T Test* inter kelompok. Apabila ditemukan



G. JADWAL PELAKSANAAN

KEGIATAN PENELITIAN	BULAN											
	JUNI				JULI				AGUSTUS			
	MI	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
Persiapan subyek penelitian	■	■										
Pemeriksaan darah I			■									
Pembuatan tempe			■	■								
Diet tinggi kolesterol			■	■								
Pemeriksaan darah II					■							
Pemberian perlakuan						■	■					
Pemeriksaan darah III								■				
Penyusunan laporan									■	■	■	■

H. PERSONALIA PENELITIAN

1. Ketua Pelaksana Penelitian

- a. Nama Lengkap** : Kristy Kumaladewi
- b. NIM** : 20050310158
- c. Fakultas/Program Studi** : Kedokteran/Pendidikan Dokter
- d. Perguruan Tinggi** : Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- e. Waktu untuk kegiatan PKM** : 35 jam/minggu

2. Anggota Pelaksana

- a. Nama Lengkap** : Yessi Susanti
- b. NIM** : 20050310152
- c. Fakultas/Program Studi** : Kedokteran/Pendidikan Dokter
- d. Perguruan Tinggi** : Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- e. Waktu untuk kegiatan PKM** : 35 jam/minggu

I. PERKIRAAN BIAYA PENELITIAN

PERINCIAN BIAYA PENELITIAN	JUMLAH (Rp)
1. Searching Bahan	100.000,-
2. Bahan Habis Pakai dan alat (<i>Material Penelitian</i>)	1.508.500,-
3. Biaya Pengeluaran Lain-lain (Penyusunan laporan)	50.000,-
JUMLAH	1.660.000,-

Rincian bahan dan alat penelitian

Nama Komponen	Volume	Harga Satuan	Jumlah (Rupiah)
Alat Penelitian			
Sputit sonde	15	2000	30.000,-
Eppendorf	60	500	30.000,-
Sonde	15	500	7.500,-
Mikropipet	60	300	18.000,-
Gloves	20	1500	30.000,-
Bahan Penelitian			
Simavstatin	10 mg	10.000	100.000,-
Pakan tikus	10 kg	5.000	50.000,-
Tikus	20 ekor	20.000	400.000,-
Sewa Lab	1	50000	50.000,-
Reagen Kit Kolesterol	65	6000	390.000,-
Reagen Kit HDL	65	6000	390.000,-
Ragi	1 pcs	1000	1000,-
Lemak babi	1 kg	12.000	12.000,-
JUMLAH			1.508.500,-