

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian dasar yang menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimen merupakan penelitian dimana variabel yang hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan (Nazir, 2003). Adapun yang menjadi objek penelitian adalah mengenai peran daun Simpur terhadap penyakit hiperlipidemia pada mencit jantan yang diinduksi dengan pakan tambahan lemak.

#### B. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana ada kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Kumar (2011), menyatakan bahwa pada dosis 250 mg/kg BB/hari dan 500 mg/kg BB/hari dapat menurunkan kadar lipid darah tikus. Oleh karena itu, pada penelitian ini dosis *Dillenia indica* dikonversi pada hewan uji mencit menggunakan rumus konversi Laurence & Bacharach (1964).

Kelompok perlakuan dibagi menjadi tiga, yaitu kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok pemberian daun *Dillenia indica*. Kelompok kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak tanpa diberi daun *Dillenia indica*. Kelompok kontrol negatif terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi pakan dan minum normal setiap harinya. Kelompok yang diberi perlakuan daun *Dillenia indica* diberikan dengan dosis sebanyak 4,2 mg/30 g/BB/hari; 10,5 mg/30 g/BB/hari; 21 mg/30 g/BB/hari dan 31,5 mg/30 g/BB/hari.

Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) menggunakan rumus Gomez and Gomez (1995), yaitu:

$$\begin{aligned}
 t-(r-1) &\geq 20 && \text{Keterangan: } t = \text{Jumlah perlakuan} \\
 6(r-1) &\geq 20 && r = \text{Jumlah replikasi} \\
 6r-6 &\geq 20 \\
 6r &\geq 20 + 6 \\
 6r &\geq 26 \\
 r &\geq 4,33 \approx 5
 \end{aligned}$$

Berdasarkan penghitungan diatas, jumlah pengulangan yang akan dilakukan untuk setiap perlakuan adalah sebanyak 5 kali. Mencit yang digunakan dibagi menjadi enam kelompok perlakuan, yaitu empat kelompok perlakuan pemberian daun Simpbur, satu kelompok kontrol positif, dan satu kelompok kontrol negatif. Pengacakan mencit yang digunakan dilakukan untuk menghindari bias (Sudjana, 1995).

Tabel 3.1 Penempatan Mencit (*Mus musculus*) pada Setiap Kelompok

Kandang	Dosis pemberian <i>Dillenia indica</i> (mg)	Nomor mencit				
A	0	11	8	6	21	14
B	0	7	5	1	10	17
C	4,2	18	13	24	29	25
D	10,5	2	15	28	9	19
E	21	27	4	30	3	16
F	31,5	20	26	23	22	12

Keterangan:

- A : Kontrol negatif
- B : Kontrol positif
- C : Diberi daun Simpbur dengan dosis 4,2 mg/30 g/BB/hari
- D : Diberi daun Simpbur dengan dosis 10,5 mg/30 g/BB/hari
- E : Diberi daun Simpbur dengan dosis 21 mg/30 g/BB/hari
- F : Diberi daun Simpbur dengan dosis 31,5 mg/30 g/BB/hari

Sebelum ke tahap perlakuan, hewan uji yang didapatkan diaklimatisasi beberapa hari. Hewan uji di timbang berat badannya selama aklimatisasi dan selama perlakuan. Frekuensi pemberian daun Simpbur (*Dillenia indica*) sebanyak satu kali setiap harinya secara oral pada pagi hari. Setelah 21 hari pemberian bubuk *Dillenia indica* mencit diambil darahnya melalui vena caudalis (ekor).

### C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan dan Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2015 sampai dengan Mei 2015.

### D. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan hiperlipidemia dan sampel pada penelitian ini adalah mencit Swiss Webster jantan hiperlipidemia yang diberi daun simpur (*Dillenia indica*).

### E. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yang dibagi ke dalam tiga kelompok besar, yaitu: tahap pra-penelitian, tahap penelitian dan tahap pasca penelitian.

#### 1. Tahap pra-penelitian

##### a. Penyiapan hewan Percobaan

Hewan yang digunakan adalah 30 ekor mencit jantan dengan berat sekitar (25-35 gram) yang dipelihara dalam 6 kandang yang terbuat dari bak plastik berukuran 28 cm x 30 cm x 12 cm dengan ditutupi kawat pada bagian atas. Keadaan selama aklimatisasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap, yaitu pada ruangan yang memiliki kondisi pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap dengan suhu ruangan berkisar 23 °C-27 °C dengan tujuan hewan uji dapat beradaptasi sesuai waktu biologis hewan tersebut serta kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Kondisi berat badan selama tahap aklimatisasi, induksi pakan tinggi lemak dan pemberian daun *Dillenia indica* dilakukan sebanyak dua kali dalam satu minggu.

##### b. Pengambilan sampel, determinasi dan seleksi tanaman

Pengambilan daun Simpur dilakukan dari Kebun Botani, UPI. Determinasi berdasarkan pada buku Conquist (1981) dengan tujuan

untuk meyakinkan dan memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar-benar tanaman *Dillenia indica*.

c. Pembuatan bubuk *Dillenia indica*

Pembuatan bubuk *Dillenia indica* dilakukan dengan metode sederhana. Daun segar disortir kemudian ditimbang dan dicuci sampai bersih dengan air mengalir kemudian daun dikeringkan dengan bantuan sinar matahari hingga kadar airnya hilang (simplisia). Daun Simpurn yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi bubuk. Bubuk daun Simpurn disimpan ke dalam wadah plastik kemasan yang transparan untuk menghindari kontaminan dan disimpan pada wadah tertutup (Mu'nisa *et al.*, 2008).

Penentuan dosis dilakukan dengan cara daun Simpurn ditimbang sesuai dengan penentuan dosisnya, yaitu 4,2 mg/30 g/BB/hari; 10,5 mg/30 g/BB/hari; 21 mg/30 g/BB/hari dan 31,5 mg/30 g/BB/hari. Ekstrak yang akan digunakan dilarutkan menggunakan akuades dan disimpan dalam botol vial gelap di lemari pendingin.

d. Pembuatan pakan tambahan tinggi lemak

Pembuatan pakan berlemak dilakukan dengan mencampurkan beberapa bahan dengan komposisi tertentu. Pembuatan pakan mengacu pada metode Hernawati *et al* (2013), dengan komposisi sebagai berikut.

Tabel 3.2 Komposisi Pakan Berlemak dalam 100 gram

No	Bahan	Jumlah
1	Dedak	16 gram
2	Jagung	50 gram
3	Tepung ikan	9 gram
4	Tepung kedelai	23 gram
5	Premix	1 gram
6	CaCo <sub>3</sub>	1 gram
7	Garam	1 gram
8	Telur	20 ml
9	Minyak kelapa	6 ml

Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan pakan tambahan tinggi lemak ini terdiri dari kuning telur dan minyak kelapa. Komposisi bahan berlemak tinggi mengandung kuning telur sebagai sumber lemak,

tepung jagung yang merupakan sumber karbohidrat, dedak, tepung ikan sebagai sumber protein hewani, bungkil kedelai sebagai sumber protein nabati, premix sebagai sumber nutrisi tambahan, garam,  $\text{CaCO}_3$ , dan minyak kelapa (Hernawati *et al.*, 2013).

Pembuatannya dilakukan dengan cara membuat dua kelompok adonan. Kelompok adonan pertama terdiri dari campuran dedak, tepung jagung, bungkil kedelai, dan tepung ikan. Kelompok adonan kedua terdiri dari campuran premix, garam dan  $\text{CaCO}_3$ . Kedua adonan selanjutnya dicampurkan hingga menjadi satu kemudian dicampurkan dengan kuning telur dan minyak kelapa hingga menjadi kalis dan mudah dibentuk. Hasil adonan yang didapatkan dibentuk bulat dan ditimbang 80 gram.

## 2. Tahap Penelitian

- a. Induksi pakan tambahan tinggi lemak untuk menciptakan keadaan hiperlipidemia

Pakan tambahan tinggi lemak adalah pakan yang terbuat dari bahan yang mengandung kuning telur sebagai bahan utama yang dapat meningkatkan kadar lipid dalam darah sehingga dapat menciptakan keadaan hiperlipidemia pada hewan uji. Kuning telur merupakan komponen lemak yang terdiri dari 65,5% trigliserida, 5,2% kolesterol, dan 28,3% fosfolipid (Silalahi, 2000). Selanjutnya hewan uji diinduksi pakan tinggi lemak selama masa aklimatisasi dan masa perlakuan sebanyak 80 g/kandang/hari pada waktu pagi hari pada mencit secara *ad libitum* (Hernawati *et al.*, 2013).

- b. Perlakuan hewan percobaan

Jumlah mencit yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 30 ekor galur Swiss Webster dengan berat antara 25-35 g. Mencit dibagi menjadi enam kelompok perlakuan, terdiri dari dua kelompok kontrol dan empat kelompok pemberian bubuk daun *Dillenia indica*. Dalam kelompok ini masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Untuk lebih jelasnya mengenai kelompok yang diberi pakan tinggi lemak

dan diberi bubuk daun Simpbur dapat dilihat pada tabel kelompok hewan percobaan (Tabel 3.3).

Tabel 3.3 Kelompok Hewan Percobaan

Kelompok	Dosis <i>Dillenia indica</i> (mg)	Induksi Pakan Berlemak	Diberi Perlakuan Daun <i>Dillenia indica</i>
Kontrol -	0	-	-
Kontrol +	0	✓	-
Kelompok Perlakuan	4,2	✓	✓
	10,5	✓	✓
	21	✓	✓
	31,5	✓	✓

c. Pengambilan sampel darah dan pengukuran kadar lipid darah

Pengukuran kadar lipid dilakukan sebelum dan sesudah pemberian ekstrak daun Simpbur. Pengukuran sebelum tahap perlakuan bertujuan untuk melihat kadar lipid darah mencit setelah pemberian pakan tinggi lemak. Tahap perlakuan daun Simpbur diberikan secara *gavage* selama 21 hari dalam kondisi yang terkontrol. Hewan uji diambil sampel darahnya dengan melukai bagian *vena caudalis* (ekor) menggunakan pisau bedah lalu darah yang keluar dimasukkan ke dalam tabung endoff sebanyak  $\pm$  1 ml untuk tiga parameter uji, yaitu kolesterol total, trigliserida, dan HDL. Pengukuran kadar lipid dalam darah dilakukan dengan metode *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP), dan *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP) secara spektrofotometri, sedangkan pengukuran LDL diukur menggunakan Formula *Friedwald* dan dinyatakan dalam satuan mg/dL (Tangka, 2003). Berikut tahapan analisis pengukuran lipid darah mencit:

1). Uji Kolesterol Total

Darah yang sudah ditampung dalam tabung mikro disentrifugasi selama 10 menit. Sebanyak 5  $\mu$ l serum darah mencit dan 500  $\mu$ l reagen kolesterol dimasukkan ke dalam tabung mikro. Larutan dikocok hingga homogen. Kemudian larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Hasil nilai absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 200}{\text{Absorbansi standar}} = \text{Kolesterol total}$$

## 2). Uji Triglicerida

Sebanyak 5 µl serum darah mencit dan 500 µl reagen trigliserida dimasukkan ke dalam tabung mikro. Larutan dikocok hingga homogen. Kemudian larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Hasil nilai absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 200}{\text{Absorbansi standar}} = \text{Trigliserida}$$

## 3). Uji HDL

Sebanyak 2,5 µl serum darah mencit dan 25 µl reagen HDL dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian larutan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Hasil didapatkan berupa supernatan dan pelet. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru dan ditambahkan dengan 500 µl reagen kolesterol. Larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Hasil nilai absorbansi dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 100 \times 1,1}{\text{Absorbansi standar}} = \text{HDL}$$

## 4). Uji LDL

Pengukuran kadar LDL menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kolesterol total} - (\text{HDL} + \frac{1}{5} \text{Trigliserida}) = \text{LDL} \text{ (Warnick., et al, 1990).}$$

## 5). Uji kolesterol total hati

Hati segar dihaluskan menggunakan mortar, setelah hati menjadi halus ditambahkan dietil eter sebanyak 5 ml, kemudian ekstrak didiamkan selama 48 jam. Setelah 48 jam, ekstrak ditambahkan dengan PBS sebanyak 10 ml dan disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 2500 rpm. Kemudian diambil bagian paling atas dan dipindahkan di tabung mikro.

Uji kolesterol hati dilakukan dengan metode yang sama seperti pengukuran kolesterol total serum darah. Sebanyak 5 µl ekstrak hati yang telah disentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung mikro yang sebelumnya telah ditambahkan dengan 500 µl reagen kolesterol. Kemudian larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

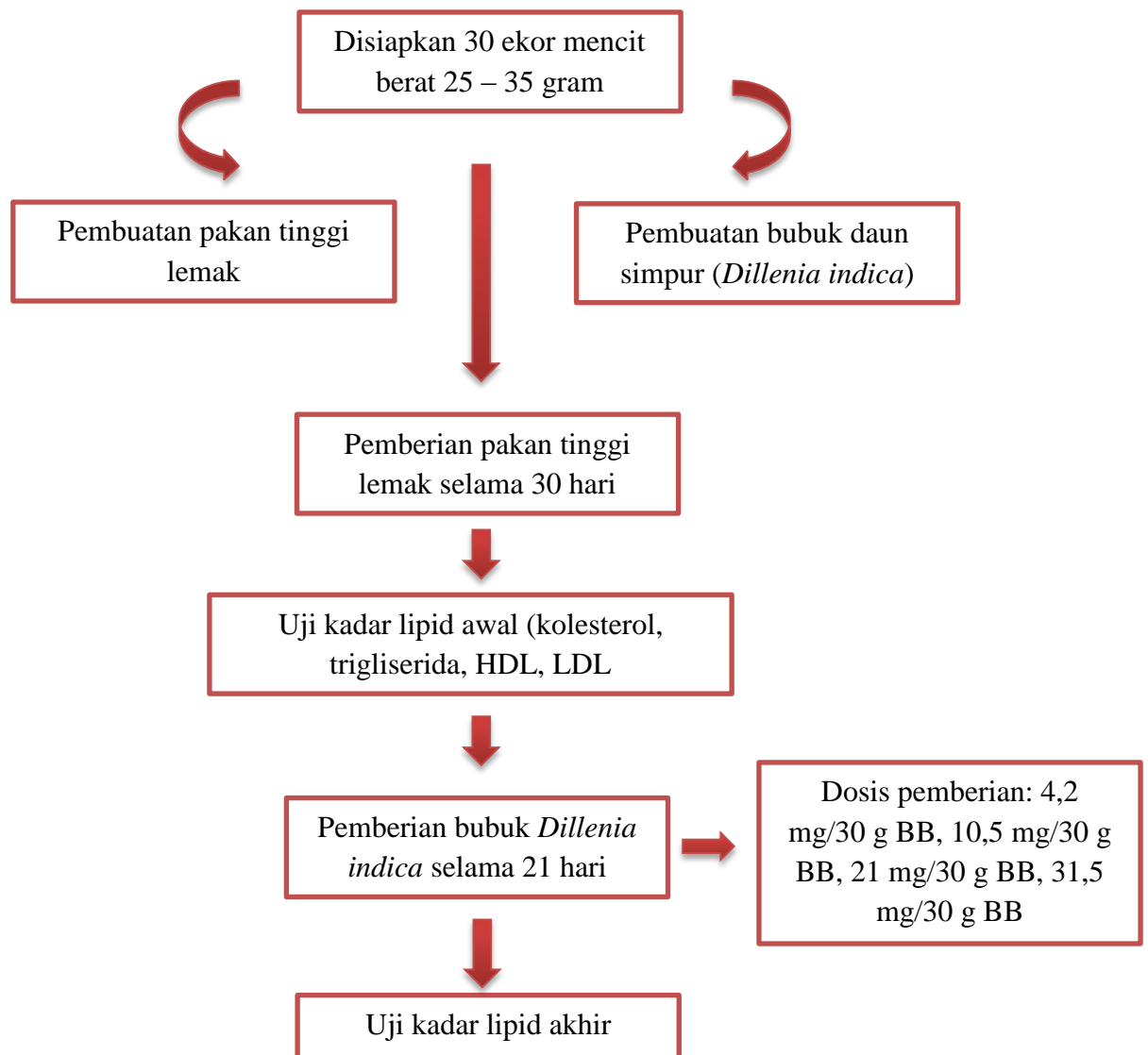
$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer} \times 200}{\text{Absorbansi standar}} = \text{Kolesterol total}$$

### 3. Tahap Pasca Penelitian (Analisis Data)

Semua data diuji normalitas dan homogenitasnya. Uji homogenitas yang digunakan adalah *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*, sedangkan uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)* dan *Shapiro-Wilk*. Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (ANOVA). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji Duncan dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka dianalisis dengan menggunakan pengolahan data non parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis*. Analisis data menggunakan *Software SPSS 16 for Windows*.



#### 4. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

