

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental yaitu penelitian yang didalamnya terdapat perlakuan untuk memanipulasi variabel terhadap objek penelitian (Nazir, 2003).

2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan terdapat mencit kelompok perlakuan dan mencitl control dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Purbowanti (2006) mengenai perbandingan berbagai konsentrasi ekstrak temulawak terpurifikasi dalam menurunkan kadar kolesterol total dalam serum tikus putih yang diberi pakan diet lemak tinggi dengan perlakuan selama 70 hari. Pada penelitian tersebut dosis yang dapat menurunkan kadar kolesterol total adalah 45 mg/200 g BB (0,225 mg/g BB). Penelitian lain menunjukkan ekstrak ethanol temulawak dapat menurunkan kadar kolesterol total darah tikus putih hiperlipidemia >20 % pada dosis 100 mg/Kg BB (0,1 mg/g BB) dan pada dosis 400 mg/Kg BB (0,4 mg/g BB) (Anggraini, 2012). Oleh karena itu penelitian ini memodifikasi dosis menjadi 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, dan 0,75 mg/gBB serta menambah parameter pemeriksaan menjadi profil lipid yang lengkap yaitu kadar kolesterol total, kadar trigliserida, kadar LDL dan kadar HDL agar mendapat gambaran yang cukup menyeluruh terhadap profil lipid dalam darah.

Mencit jantan yang digunakan adalah 25 ekor yang dibagi ke dalam 5 kelompok dengan banyaknya pengulangan yang dilakukan untuk setiap kelompok perlakuan menggunakan rumus Gomez and Gomez (1995), yaitu

$$(T - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq \frac{19}{4}$$

$$n \geq 4,75 \sim 5 \text{ ekor}$$

Keterangan :

T = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan adalah $n \geq 5$. 25 ekor mencit tersebut dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing perlakuan dilakukan 5 pengulangan.

Tabel 3.1 Hasil pengocokan acak mencit

K-	K+	H1	H2	H3
12	24	04	08	20
19	03	05	17	11
06	13	02	21	14
22	16	10	01	25
23	07	15	09	18

Keterangan :

K- = Kontrol Negatif

K+ = Kontrol Positif

H1 = Perlakuan ke 1 dengan perlakuan ekstrak 0,25 mg/g BB.

H2 = Perlakuan ke 2 dengan perlakuan ekstrak 0,5 mg/g BB.

H3 = Perlakuan ke 3 dengan perlakuan ekstrak 0,75 mg/g BB.

Kelompok pertama (K-) adalah mencit normolipidemia yang diberi diet standar tanpa perlakuan diet lemak tinggi. Kelompok kedua (K+) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak. Kelompok ketiga (H1) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,25 mg/g BB. Kelompok keempat (H2) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,5 mg/g BB. Kelompok kelima (H3) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,75 mg/g BB.

3. Pemeriksaan parameter uji

Pemeriksaan beberapa parameter dilakukan dengan berbagai metode. Untuk kolesterol total dan HDL menggunakan metode *cholesterol oxidase-p-aminophenozone* (CHOD-PAP) dan trigliserida dengan menggunakan metode *glycerol phosphate oxidase-p aminophenozone* (GPO-PAP). Untuk perhitungan LDL digunakan formula *Friedewald*:

$$\text{LDL} = \text{kolesterol total} - \text{HDL} - (\text{trigliserida}/5)$$

4. Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juli 2014 bertempat di Laboratorium Struktur Hewan, Laboratorium Fisiologi FPMIPA dan Kebun Botani UPI

B. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah mencit jantan galur *Swiss webster* yang memiliki berat badan sekitar 25-35 gram berusia 3 bulan. Sedangkan sampel pada penelitian ini adalah mencit jantan galur *Swiss webster* yang memiliki berat badan sekitar 25-35 gram berusia 3 bulan yang diberi ekstrak temulawak dengan dosis 0,25 mg/g BB, 0,5 mg/g BB, 0,75 mg/g BB.

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Pra-Penelitian

a. Penyiapan Kandang dan Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan dengan berat sekitar (20-30 gram) yang dipelihara dalam 5 kandang. Keadaan selama aklimatisasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap. Kondisi berat badan selama aklimasi dan perlakuan diukur setiap hari. Setiap hewan percobaan diberi tanda.

b. Pembuatan Ekstrak Temulawak

Ekstrak temulawak dibuat dengan cara rimpang temulawak dicacah kecil kemudian dihancurkan dengan mesin penghancur kemudian cairan ekstrak temulawak diperas dan disaring. Hasil penyaringan dikeringkan dengan cara didiamkan angin-angin hingga diperoleh serbuk ekstrak temulawak. Penentuan dosis dilakukan dengan cara serbuk temulawak ditimbang sesuai penentuan dosisnya, yaitu 0,25 mg/g BB, 0,5 mg/g BB, 0,75 mg/g BB. Apabila ekstrak temulawak ini akan digunakan, serbuk akan dilarutkan dengan aquadest.

c. Pembuatan Pakan Tambahan Tinggi Lemak

Bahan utama dalam pembuatan pakan diet tambahan tinggi lemak ini adalah kuning telur dan minyak kelapa. Cara pembuatan pakan berlemak tinggi dilakukan dengan membuat dua adonan terlebih dahulu. Adonan pertama yaitu campuran dedak, tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai. Adonan yang kedua yaitu campuran premix, garam, dan CaCO₃. Dua adonan tersebut dicampur menjadi satu adonan kemudian ditambahkan kuning telur dan minyak kelapa sampai membentuk adonan yang kalis dan mudah dibentuk. Hasil adonan yang didapat dibentuk dan ditimbang 30 gram/ekor/hari dan diberikan pada mencit secara *ad libitum* pada pagi dan sore hari.

2. Tahap Penelitian

a. Induksi hiperlipidemia

Hewan uji diinduksi kolesterol secara eksogen dengan pakan diet lemak tinggi dengan bahan utama kuning telur yang dapat meningkatkan kadar lipid darah sehingga dapat menciptakan keadaan hiperlipidemia pada hewan percobaan. Diketahui bahwa kolesterol kuning telur merupakan komponen lemak yang terdiri dari 65,5% trigliserida, 5,2% kolesterol dan 28,3% fosfolipid (Silalahi, 2000). Lebih dari 95% kuning telur bergabung dalam lipoprotein kaya trigliserida, sisanya mengelilingi lipovitelin sebagai protein atau lemak kompleks yang terdiri atas lebih kurang 20% lemak dan 4% kolesterol (Leeson & Summer, 1991). Pakan tambahan diberikan selama masa aklimatisasi dan masa perlakuan sebanyak 30 gram/ekor/hari yang diberikan secara *ad libitum* pada pagi dan sore hari (Hernawati dkk., 2013).

b. Perlakuan Hewan Percobaan

Perlakuan hewan percobaan dilakukan dengan membagi mencit menjadi 5 kelompok perlakuan.

- 1) Kelompok pertama (K-) adalah mencit normolipidemia yang diberi diet standar tanpa perlakuan diet lemak tinggi.
- 2) Kelompok kedua (K+) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak.
- 3) Kelompok ketiga (H1) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,25 mg/g BB.

- 4) Kelompok keempat (H2) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,5 mg/g BB.
- 5) Kelompok kelima (H3) adalah mencit hiperlipidemia yang diberi diet tinggi lemak dan perlakuan ekstrak temulawak 0,75 mg/g BB.

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian sebelumnya mengenai dosis optimal ekstrak temulawak dalam menurunkan kadar kolesterol.

c. Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Profil Lipid

Pemeriksaan profil lipid dilakukan dua kali yaitu sebelum dan sesudah perlakuan. Sesudah perlakuan dilakukan pada hari ke 61. Hewan percobaan diambil darahnya dengan membuat perlukaan di bagian vena caudalis menggunakan pisau bedah lalu darah yang keluar dari perlukaan tersebut dikumpulkan kemudian disentrifugasi dan diambil serumnya. Serum diperiksa untuk pemeriksaan kolesterol total, trigliserida dan HDL menggunakan reagen produksi BIOLABO, kemudian dilakukan perhitungan kadar LDL.

1) Pemeriksaan kadar kolesterol total

Serum hasil centrifugasi kemudian dibagi ke beberapa tabung dengan campuran reagen dan sampel sesuai Tabel di bawah ini.

	Blanko	Standart	Sampel
Reagen CHOD - PAP	1 mL	1 mL	1 mL
Aquadest	10 µL	-	-
Standart	-	10 µL	-
Sampel	-	-	10 µL

Campuran diatas diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C atau 10 menit pada suhu ruang. Diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (480-520)

Perhitungan hasil :

$$\text{Kadar kolesterol total} = \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standar}} \times \text{konsentrasi standart}$$

2) Pemeriksaan kadar trigliserida

Serum hasil centrifugasi kemudian dibagi ke beberapa tabung dengan campuran reagen dan sampel sesuai Tabel di bawah ini.

	Blanko	Standart	Sampel
Reagen GPO	1 mL	1 mL	1 mL
Aquadest	10 µL	-	-
Standart	-	10 µL	-
Sampel	-	-	10 µL

Campuran diatas diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C atau 10 menit pada suhu ruang. Diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (480-520 nm).

Perhitungan hasil :

$$\text{Kadar trigliserida} = \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standar}} \times \text{konsentrasi standart}$$

3) Pemeriksaan kadar HDL

Dilakukan tahap presipitasi sampel dengan cara di bawah ini

Pipet ke dalam tabung centrifuge	Metode mikro
Sampel	0,5 mL
Reagen Precipitant	50 µL

Campuran diatas dikocok perlahan hingga homogen kemudian diinkubasi 10 menit pada suhu ruangan. Campuran ini kemudian dicentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500-4000 rpm.

Dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan reagen kolesterol CHOD-PAP dengan cara :

	Blanko	Standart	Sampel
Reagen CHOD - PAP	1 mL	1 mL	1 mL
Aquadest	25 µL	-	-
Standart	-	25 µL	-
Supernatan	-	-	25 µL

Campuran diatas diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C atau 10 menit pada suhu ruang. Diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (480-520)

Perhitungan hasil :

$$\text{Kadar HDL} = \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standar}} \times \text{konsentrasi standart} \times 1,1 \text{ *)}$$

*) 1,1 merupakan faktor yang diperoleh dari proses pengenceran sampel pada tahap precipitasi

4) Penentuan kadar LDL

Untuk penentuan kadar LDL digunakan formula *Friedewald, 1972* :

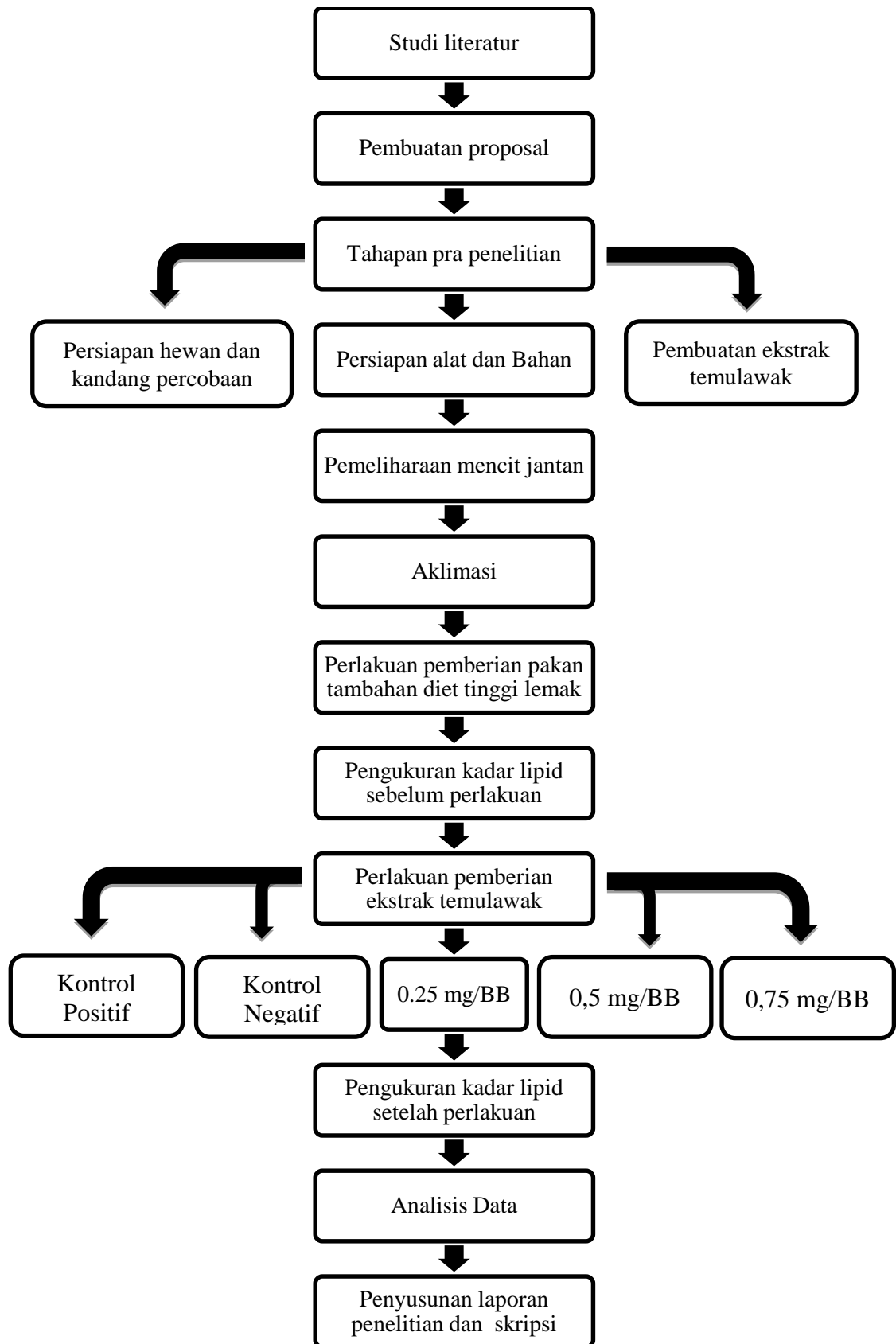
$$\text{LDL} = \text{kolesterol total} - \text{HDL} - (\text{trigliserida}/5)$$

3. Tahap Pasca Penelitian

Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan yaitu uji homogenitas dan uji normalitas untuk menentukan uji statistik yang digunakan. Uji homogenitas yang digunakan adalah *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*, sedangkan untuk uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)*. Data yang memenuhi syarat normalitas dan homogenitas dilakukan uji statistik parametrik yaitu Analysis of Varians (ANOVA). Data yang tidak memenuhi salah satu atau kedua syarat normalitas dan homogenitas data dianalisis dengan menggunakan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskall-Wallis*. Jika hasil uji *Kruskall-Wallis* menunjukkan signifikansi, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Semua analisis data ini menggunakan *Software SPSS For Windows versi 16.0*.

4. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian