

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Termasuk ke dalam penelitian eksperimen karena terdapat manipulasi pada objek penelitian dan terdapat kontrol (Nazir, 2003). Adapun objek penelitian adalah mencit jantan. Pengamatan dilakukan terhadap berat badan mencit setiap harinya dan kadar lipid darahnya sebelum dan setelah diberikan bubuk rimpang temu kunci.

#### B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan akan diberikan bubuk rimpang temu kunci masing-masing: Dosis yang digunakan adalah 0; 200; 600; 800 mg/kg berat badan setiap hari pada pagi hari. Kelompok kontrol, terdiri dari dua kelompok mencit yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif adalah kelompok mencit yang hanya tidak mengalami hiperlipidemia dan hanya diberi aquades sebagai pengganti dosis bubuk rimpang temu kunci. Kontrol negatif adalah kelompok mencit yang dikondisikan mengalami hiperlipidemia dan di beri aquades sebagai pengganti dosis bubuk rimpang temu kunci.

Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Gomez & Gomez (1995) yaitu:

$$\begin{aligned}(T - 1) (n - 1) &\geq 20 \\ (6 - 1) (n - 1) &\geq 20 \\ 6 (n - 1) &\geq 20 \\ n &\geq 25/5 \\ n &\geq 5 \sim 5 \text{ ekor}\end{aligned}$$

Keterangan n = jumlah replikasi  
T = jumlah perlakuan

Pengacakan kandang dan nomor mencit dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002). Gambar denah pengacakan dan penempatan dalam kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1. di bawah ini.

Tabel 3.1 Hasil pengocokan mencit dan kandangnya.

Kandang	Nomor Mencit				
A	12	7	11	26	30
B	21	27	16	9	17
C	3	10	15	22	5
D	1	13	29	24	18
E	25	4	20	6	28
F	14	2	19	23	8

Keterangan:

- A: Kontrol positif, dikondisikan mengalami hiperlipidemia tetapi tidak diberi bubuk rimpang temu kunci melainkan diberi aquades.
- B: Kontrol negatif, tidak mengalami hiperlipidemia dan tidak diberi bubuk rimpang temu kunci.
- C: Kontrol obat Simvastatin dengan dosis 0,00375 mg/30gBB/hari
- D: Diberi bubuk rimpang temu kunci dengan dosis 6 mg/30 g BB/hari.
- E: Diberi bubuk rimpang temu kunci dengan dosis 18 mg/30 g BB/hari.
- F: Diberi bubuk rimpang temu kunci dengan dosis 24 mg/30 g BB/hari.

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama tujuh hari. Setiap hari mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

### C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit jantan yang ada di rumah mencit Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Sampel penelitian adalah mencit jantan yang sudah dikondisikan hingga mengalami hiperlipidemia. Pengamatan dilakukan terhadap kadar lipid darah setelah diberikan bubuk rimpang temu kunci.

#### D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama  $\pm$  tiga bulan. Pembuatan bubuk rimpang temu kunci dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan dilakukan di rumah mencit Kebun Botani UPI. Pengecekan lipid darah mencit dilakukan dan pembedahan untuk mengukur berat organ mencit dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

#### E. Tahap Pra-penelitian

##### 1. Persiapan Alat Bahan

Sebelum memulai penelitian perlu dipersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Pertama kandang untuk mencit dipersiapkan sebanyak 7 buah sesuai dengan jumlah perlakuan dan kontrol, kandang berukuran 40×30×12cm terbuat dari plastik dengan tutup kawat atau besi. Kemudian bahan untuk membuat pakan mencit dipersiapkan. Setelah itu rimpang temu giring yang akan digunakan untuk penelitian diolah agar mendapatkan bubuk yang siap digunakan.

##### 2. Penentuan dosis

Dosis bubuk rimpang temu kunci yang diberikan adalah sebanyak 6; 18; dan 24 mg/30g BB (Lampiran 6). Dosis tersebut merupakan hasil konversi dari dosis yang sebelumnya dipakai oleh Young *et al.*, (2012) dengan dilakukan modifikasi. Kontrol terdapat 3 kontrol yaitu kontrol positif, kontrol negatif, kontrol obat. Waktu pemberian dosis dilakukan selama 30hari.

##### 3. Pembuatan bubuk rimpang temu kunci

Temu kunci yang berasal dari sumber yang sama yaitu Kebun Percobaan Manoko, pertama dicuci dengan air mengalir agar bebas dari kontaminasi. Temu kunci dipotong kecil dan tipis kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari atau bisa saja dikeringkan dengan menggunakan oven. Temu kunci (*Curcuma*

*rotunda*) yang telah benar-benar kering kemudian dihaluskan dengan blender sampai halus.

#### 4. Penyediaan hewan penelitian

Disiapkan mencit jantan berumur 8-10 minggu (25-30 g). Selama seminggu mencit dilakukan proses aklimatisasi terhadap lingkungan barunya agar mencit teradaptasi dengan kondisinya selama masa percobaan. Selama proses aklimatisasi mencit diberi pakan secara *ad libitum*. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 40x30x12 cm dan ditempatkan berkelompok berdasarkan perlakuan yang diberikan, yaitu masing-masing kandang sebanyak 5 ekor mencit.

#### 5. Pembuatan pakan berlemak tinggi

Pakan berlemak tinggi dibuat berdasarkan Hernawati *et al.*, (2013). Sumber lemak didapatkan dari penambahan minyak kelapa, tepung jagung, garam, tepung ikan, kuning telur, CaCO<sub>3</sub>, *premix*, dan bungkil kedelai. Berikut adalah komposisi pembuatan pakan berlemak (Tabel 3.2):

Tabel 3.2. Komposisi pakan berlemak

No.	Bahan	Jumlah penambahan (%)
1.	Tepung jagung	60
2.	Tepung ikan	8
3.	Bungkil kedelai	20
4.	Telur	3
5.	Minyak kelapa	6
6.	<i>Premix</i>	1
7.	Garam	1
8.	CaCO <sub>3</sub>	1

(Sumber : Hernawati *et al.*, 2013)

## F. Tahap Penelitian

### 1. Induksi pakan berlemak tinggi hingga menyebabkan kondisi hiperlipidemia

Pemberian pakan sebanyak 30 g/ekor/hari sebanyak 2 kali sehari tiap pagi dan sore hari selama 20hari.

2. Perlakuan pemberian bubuk rimpang temu kunci

Setelah dikonversi berdasarkan penelitian sebelumnya, mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

- a. Kelompok A: Merupakan kontrol positif, yaitu mencit diberi pakan berlemak tinggi hingga mengalami hiperlipidemia tetapi tidak diberi bubuk rimpang temu kunci.
- b. Kelompok B: Merupakan kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan, yaitu mencit diberi pakan normal dan tidak diberi bubuk rimpang temu kunci.
- c. Kelompok C: Merupakan kontrol obat Simvastatin dengan dosis sebanyak 0,00375 mg/30gBB/hari
- d. Kelompok D: Merupakan perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu kunci sebanyak 6 mg/30 g BB/ hari menggunakan *gavage*.
- e. Kelompok E: Merupakan perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu kunci sebanyak 18 mg/30 g BB/ hari menggunakan *gavage*.
- f. Kelompok F: Merupakan perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu kunci sebanyak 24 mg/30 g BB/ hari menggunakan *gavage*.

3. Pengambilan sampel darah dan pengujian kadar lipid darah

Pengambilan sampel darah dilakukan sebanyak tiga kali, sebelum diinduksi pakan berlemak, setelah diinduksi pakan berlemak, dan setelah diberi perlakuan. Sampel darah tiap mencit diambil dengan cara memotong sedikit bagian ujung ekor. Sampel darah yang diambil sekitar 0,5 – 1,0 ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung endorf lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000rpm selama 10 menit untuk menguji kolesterol, trigliserida, HDL, dan LDL darah. Metode yang dilakukan untuk menguji kadar darah tersebut menggunakan *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP) dan *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP)

secara spektrofotometri (Trinder, 1969). Dasar metode CHOD-PAP dan GPO-PAP adalah oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Pengukuran HDL dan LDL dengan metode Friedewald yang dinyatakan dalam satuan mg/dL (Friedewald *et al.*, 1972).

1) Uji kolesterol dengan metode CHOD-PAP

Pertama disiapkan blanko, standard, dan serum yang akan dihitung dengan perhitungan. Larutan blanko disiapkan dengan mencampurkan 0,5 mL reagen dengan 5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dengan 5  $\mu$ L standard. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay dibuat* dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 5  $\mu$ L serum. Setelah dicampur ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus (Friedewald *et al.*, 1972):

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 200 = \text{kolesterol total}$$

2) Uji trigliserida dengan metode GPO-PAP

Pertama disiapkan blanko, standard, dan serum yang akan dihitung dengan perhitungan. Larutan blanko disiapkan dengan mencampurkan 0,5 mL reagen dengan 5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dengan 5  $\mu$ L standard. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay dibuat* dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 5  $\mu$ L serum. Setelah dicampur ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus (Friedewald *et al.*, 1972):

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 200 = \text{trigliserida total}$$

### 3) Uji HDL

Uji HDL dilakukan dengan cara *micro-method* yaitu diambil 0,1 ml serum dan dicampur dengan *precipitant* sebanyak 10  $\mu$ L. Setelah itu campuran didiamkan selama 10 menit di suhu ruangan. Campuran lalu disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan putar 4000 rpm dan diambil bagian supernatan. Supernatan tersebut yang nantinya digunakan sebagai pengganti serum. Disiapkan blanko, standard, dan serum yang akan dihitung. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL reagen HDL dengan 12,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen dengan 12,5  $\mu$ L standard. Dibuat campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 12,5  $\mu$ L supernatan. Setelah dicampur ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus (Friedewald *et al.*, 1972):

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 100 = \text{HDL total}$$

### 4) Uji LDL dengan metode Friedewald

Setelah semua pengujian dilakukan, nilai LDL baru dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kolesterol total} - (\text{HDL} + 1/5 \text{ trigiserida}) = \text{LDL}$$

### 4. Pengambilan organ dan lemak abdomen

Setelah pengambilan sampel darah terakhir, mencit di bius dengan menggunakan eter. Kemudian digunting kulit pada bagian abdomen. Perut dibedah kemudian organ lemak yang menutupi rongga perut dan di ambil lalu dilakukan penimbangan.

#### 5. Pembedahan dan pengukuran berat organ

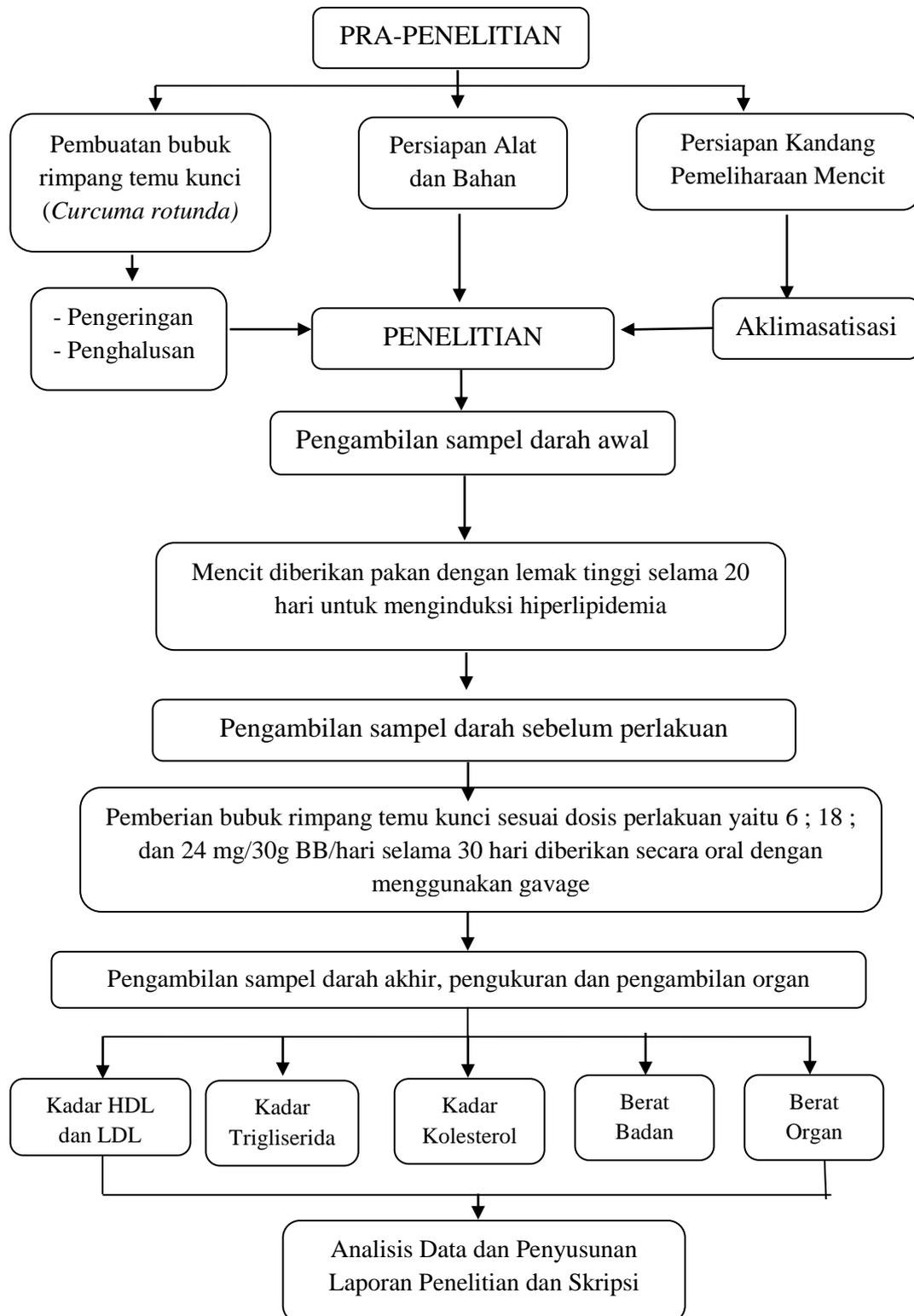
Mencit yang sudah diambil sampel darahnya akan dibedah dan dihitung berat organnya seperti hati, usus, ginjal untuk mengetahui efek lain dari pemberian bubuk rimpang temu kunci terhadap kondisi organ.

### **G. Tahap Pasca Penelitian (Analisis Statistik)**

Data dianalisis dengan uji parametrik *Analysis of Variance* (ANOVA). Tahap pengujiannya pertama dilakukan uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)*. Setelah itu dilakukan uji homogenitas menggunakan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)*. Jika data homogen dilakukan uji ANOVA. Tapi jika data yang diperoleh tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik Mann-Whitney. Data yang memiliki perbedaan signifikan diuji lebih lanjut dengan uji Duncan dengan derajat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ). Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka menggunakan pengolahan data non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis. Data dianalisis menggunakan program SPSS versi 16 *for Windows*.

## H. Alur Penelitian

Alur penelitian seperti pada Bagan 3.1 dibawah ini:



Bagan 3.1. Alur Penelitian