

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen, karena terdapat manipulasi pada objek penelitian dan terdapat kelompok kontrol (Nazir, 2003). Adapun objek penelitian adalah mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster jantan. Berat badan mencit dihitung setiap hari. Kadar lipid darah dicek sebanyak tiga kali yaitu, sebelum induksi lemak, sebelum perlakuan, dan setelah perlakuan. Berat organ serta berat lemak perut pada mencit dihitung setelah pemberian bubuk rimpang temu putih.

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Pada penelitian terdapat tujuh kelompok mencit yang terdiri atas kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan diberikan bubuk rimpang temu putih masing-masing: 6, 12, 24, dan 48 mg/30 g BB setiap hari pada pagi hari. Kelompok kontrol, terdiri dari tiga yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan kontrol obat. Kontrol negatif yaitu kelompok mencit normal yang tidak mengalami hiperlipidemia. Kontrol positif yaitu kelompok mencit yang mengalami hiperlipidemia tetapi tidak diberi perlakuan bubuk rimpang temu putih. Kontrol obat yaitu kelompok mencit yang mengalami hiperlipidemia dan diberi perlakuan dengan obat simvastatin. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Gomez & Gomez (1995) yaitu:

$$\begin{aligned}(T - 1) (n - 1) &\geq 20 \\(7 - 1) (n - 1) &\geq 20 \\6 (n - 1) &\geq 20 \\6n - 6 &\geq 20 \\n &\geq 26/6 \\n &\geq 4, 3 \sim 5 \text{ ekor} \\ \text{Keterangan } n &= \text{jumlah replikasi} \\ T &= \text{jumlah perlakuan}\end{aligned}$$

Jumlah pengulangan adalah lima ekor mencit sehingga mencit yang digunakan sebanyak 35 ekor yang dibagi ke dalam tujuh kelompok. Penempatan

Rahmi Maulidia, 2016

PENGARUH BUBUK RIMPANG TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria*) TERHADAP KADAR LIPID DARAH MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN HIPERLIPIDEMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

mencit dalam kandang dilakukan berdasarkan pengacakan yang dilakukan untuk menghilangkan bias. Setelah dilakukan pengacakan diperoleh pemetaan kandang seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Hasil Pemetaan Kandang Mencit

Kandang	Nomor Mencit				
A	1	9	12	17	29
B	3	4	16	24	30
C	2	11	20	21	31
D	19	14	22	23	25
E	5	6	10	18	28
F	8	15	27	33	35
G	7	13	26	32	34

Keterangan:

A: Kontrol negatif

B: Kontrol positif

C: Kontrol obat simvastatin 0,00375 mg/30 g BB/hari.

D: Dosis bubuk rimpang temu putih 6 mg/30 g BB/hari.

E: Dosis bubuk rimpang temu putih 12 mg/30 g BB/hari.

F: Dosis bubuk rimpang temu putih 24 mg/30 g BB/hari.

G: Dosis bubuk rimpang temu putih 48 mg/30 g BB/hari.

1, 2, 3,... : Nomor mencit

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimasi selama tujuh hari. Mencit diaklimasi dengan lingkungan sekitar yang bersifat konstan yaitu suhu ruangan berkisar 23-27°C dan pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap dengan pemberian makan dan minum dilakukan secara *ad libitum*. Setelah tujuh hari diaklimasi lalu dilakukan induksi pakan berlemak tinggi selama 30 hari.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit jantan (*Mus musculus* L.) galur Swiss Webster di rumah mencit Kebun Botani Departemen Pendidikan Biologi UPI. Sampel penelitian adalah mencit jantan (*Mus musculus* L.) galur Swiss Webster berjumlah 35 ekor yang sudah dikondisikan hingga mengalami hiperlipidemia beserta kontrolnya. Pengamatan dilakukan terhadap

Rahmi Maulidia, 2016

PENGARUH BUBUK RIMPANG TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria*) TERHADAP KADAR LIPID DARAH MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN HIPERLIPIDEMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

kadar lipid darah yaitu kadar kolesterol, trigliserida, HDL, dan LDL, berat badan, dan berat organ setelah diberikan bubuk rimpang temu putih.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan mulai dari bulan Maret sampai Juni 2016. Pembuatan bubuk rimpang temu putih dan pembedahan mencit untuk mengukur berat organ dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan mencit dilakukan di rumah mencit Kebun Botani Departemen Pendidikan Biologi UPI. Pengecekan kadar lipid darah mencit di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu pra-penelitian, penelitian, dan pasca penelitian. Penjabaran dari ketiga tahap tersebut adalah sebagai berikut:

1. Tahap Pra-penelitian

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan adalah perlengkapan untuk menunjang kehidupan mencit, membuat bubuk rimpang temu putih, membuat pakan, dan melakukan perhitungan kadar lipid darah. Untuk menunjang kehidupan mencit alat yang diperlukan seperti kandang berukuran 28 x 30 x 12 cm dengan dilengkapi tutup kawat dan botol minum mencit. Pembuatan bubuk rimpang temu putih memerlukan peralatan seperti pisau, *oven*, *blender*, dan saringan. Pembuatan pakan baik normal atau berlemak tinggi memerlukan tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, *premix*, garam, dan minyak kelapa. Perbedaan pakan normal dan yang berlemak tinggi adalah komposisi serta penambahan kuning telur pada pakan berlemak tinggi. Perhitungan kadar lipid darah mencit memerlukan peralatan seperti tabung endorff, *tips* kuning, *tips* putih, pipet berskala, *centrifuge*, spektrofotometer, dan KIT lipid darah.

b. Pembuatan Bubuk Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) dan Penentuan Dosis

Rimpang temu putih didapatkan dari Badan Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Kebun Percobaan Manoko Lembang, Jawa Barat. Rimpang temu putih dicuci dua kali di bawah air mengalir lalu diiris tipis dan dibiarkan kering di dalam oven pada suhu 70°C. Pengeringan tidak dilakukan di bawah terik sinar matahari secara langsung karena curcumin yang terkandung dalam temu putih jumlahnya akan berkurang akibat degradasi setelah dipaparkan dengan cahaya UV dan *daylight* atau sinar matahari (Cahyono *et al.*, 2011). Setelah kering rimpang temu putih dihancurkan menggunakan *blender* sampai bubuk lalu disaring hingga terpisah bagian yang halus dan kasar.

Dosis bubuk rimpang temu putih yang diberikan sebanyak 6, 12, 24, dan 48 mg/30 g BB. Dosis tersebut merupakan hasil modifikasi dari dosis yang sebelumnya dipakai oleh Srividya *et al.* (2012) dengan dilakukan modifikasi. Kontrol dibagi menjadi tiga kelompok kontrol yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol obat. Pada kelompok kontrol obat digunakan simvastatin dengan dosis 0,00375 mg/30 g BB (Suralaga *et al.*, 2013). Waktu pemberian dosis dilakukan selama 30 hari setelah selama 20 hari sebelumnya dilakukan induksi lemak yaitu mencit diberikan pakan berlemak tinggi.

c. Persiapan Mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster Jantan

Hewan penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster jantan dengan usia sekitar 3-4 bulan dan berat sekitar 20-30 gram. Lima ekor mencit dipelihara dalam satu kandang plastik berukuran 40 x 30 x 12 cm. Suhu ruangan di rumah mencit Kebun Botani Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA sekitar 23-26°C. Tahap aklimasi dilakukan supaya mencit terbiasa dengan lingkungan sekitar saat penelitian dan tidak mengalami stres.

d. Pembuatan Pakan Normal dan Berlemak Tinggi

Pakan berlemak tinggi dibuat berdasarkan penelitian Hernawati *et al.* (2013) (Tabel 3.2). Komposisi pakan terdiri atas tepung jagung, bungkil kedelai, tepung ikan, garam, *premix*, CaCO₃, minyak kelapa, dan kuning telur.

Sumber lemak didapatkan dari penambahan jumlah minyak kelapa dan kuning telur.

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 ₃	1

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

2. Tahap Penelitian

a. Induksi Pakan Berlemak Tinggi

Pakan berlemak tinggi diperlukan untuk membuat mencit mengalami hiperlipidemia. Tambahan pakan yang dapat membuat konsentrasi kolesterol darah tikus meningkat terdiri atas seperti 1,5% dari kuning telur ayam, lemak 10%, dan minyak kelapa 1% (Rismawati *et al.*, 2012). Mencit diinduksi dengan pemberian pakan berlemak tinggi kecuali pada kontrol negatif sebanyak 50 gram per hari.

b. Perlakuan

Selama perlakuan, mencit dibagi menjadi lima kelompok yaitu :

- 1) Kelompok A: Kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan, yaitu mencit diberi pakan normal dan tidak diberi bubuk rimpang temu putih atau obat simvastatin.
- 2) Kelompok B: Kontrol positif, yaitu mencit diberi pakan berlemak tinggi hingga mengalami hiperlipidemia tetapi tidak diberi bubuk rimpang temu putih atau obat simvastatin.
- 3) Kelompok C: Kontrol obat, yaitu mencit diberi pakan berlemak tinggi hingga mengalami hiperlipidemia dan diberi perlakuan obat simvastatin dengan dosis 0,00375 mg/30 g BB/hari.
- 4) Kelompok D: Perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu putih sebanyak 6 mg/30 g BB/hari.

Rahmi Maulidia, 2016

PENGARUH BUBUK RIMPANG TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria*) TERHADAP KADAR LIPID DARAH MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN HIPERLIPIDEMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

- 5) Kelompok E: Perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu putih sebanyak 12 mg/30 g BB/hari.
- 6) Kelompok F: Perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu putih sebanyak 24 mg/30 g BB/hari.
- 7) Kelompok G: Perlakuan dengan dosis pemberian bubuk rimpang temu putih sebanyak 48 mg/30 g BB/hari.

c. Pengambilan Sampel dan Pengukuran Kadar Lipid Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan sebanyak tiga kali. Sampel darah diambil dengan cara diberi sayatan di bagian *vena caudalis*. Darah yang diambil sekitar 0,5-1,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung endorf. Tabung endorf yang berisi sampel darah lalu disentrifugasi pada kecepatan putaran 10000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi diambil bagian fasa supernatan menggunakan pipet berskala lalu bisa diuji kadar lipid darahnya.

Metode yang dilakukan untuk menguji kadar darah 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 kadar LDL dilakukan dengan formula Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972).

1) Uji kolesterol dengan metode CHOD-PAP (Trinder, 1969)

Larutan blanko disiapkan dengan cara mencampurkan 0,5 mL reagen dan 5 μ L ddH₂O. Sementara pada larutan standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dan 5 μ L standard. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dan 5 μ L serum. Ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus:

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

2) Uji trigliserida dengan metode GPO-PAP (Trinder, 1969)

Larutan blanko disiapkan dengan cara mencampurkan 0,5 mL reagen dan 5 μ L ddH₂O. Sementara pada larutan standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dan 5 μ L standard. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dan 5 μ L serum. Ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus:

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

3) Uji HDL

Uji HDL dilakukan dengan cara *micro-method* yaitu diambil 0,1 ml serum dan dicampur dengan *precipitant* sebanyak 10 μ L. Campuran lalu didiamkan selama 10 menit di suhu ruangan. Setelah itu campuran disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan putar 4000 rpm dan diambil bagian supernatan. Supernatan tersebut yang nantinya digunakan sebagai pengganti serum. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL reagen HDL dengan 12,5 μ L ddH₂O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen dengan 12,5 μ L standard. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 12,5 μ L supernatan. Setelah dicampur ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus:

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

4) Uji LDL dengan metode Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972)

Setelah semua pengujian dilakukan, nilai LDL baru dapat dihitung dengan rumus: Kolesterol total - (HDL + 1/5 trigiserida) = LDL

d. Pengukuran Berat Organ

Setelah 30 hari perlakuan mencit diambil sampel darah terakhirnya lalu dibedah dan dihitung berat organnya. Organ yang dihitung beratnya seperti hati, ginjal, limpa, lambung dan saluran pencernaan dilakukan untuk mengetahui efek lain dari pemberian bubuk rimpang temu putih terhadap kondisi organ.

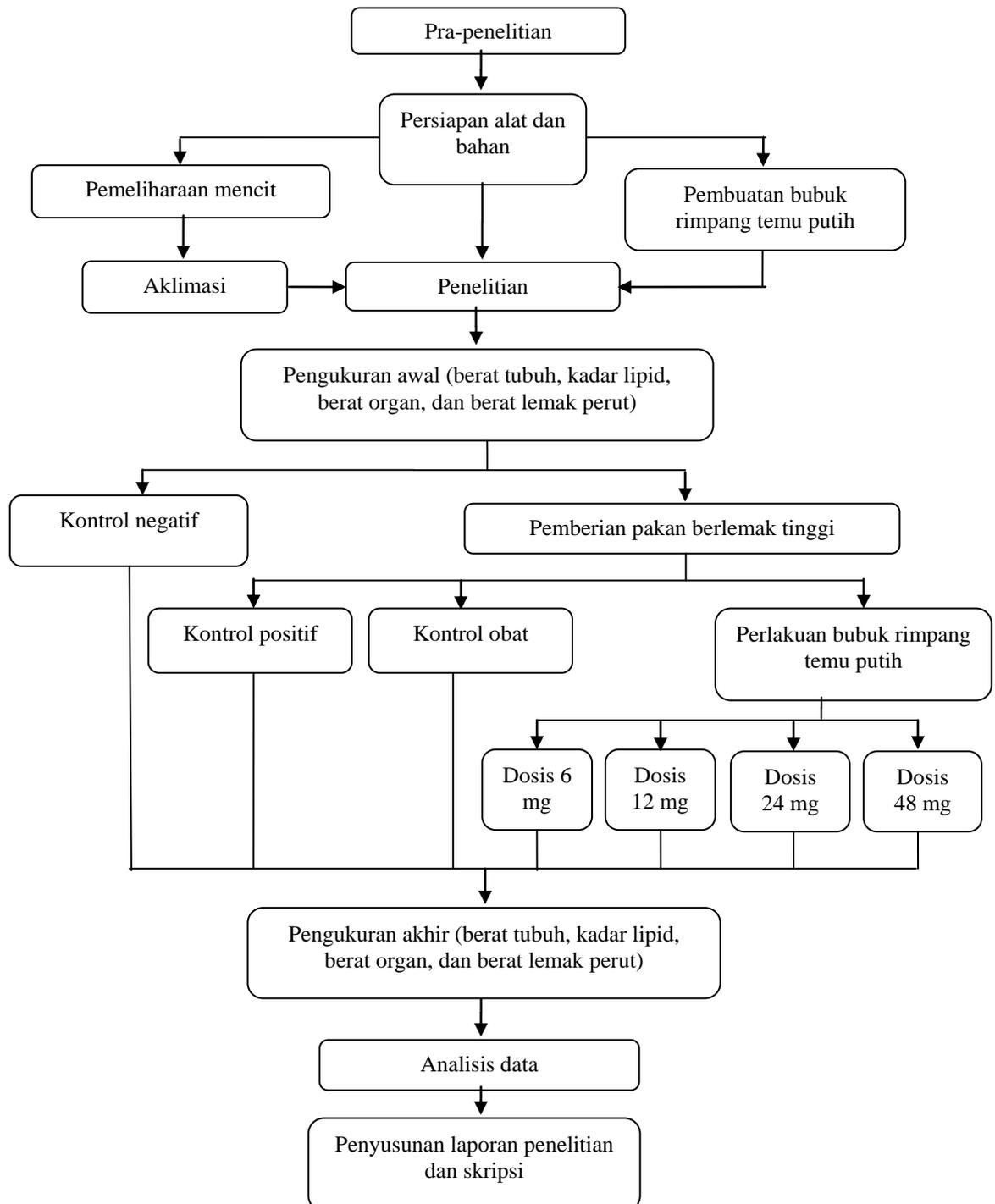
3. Tahap Pasca Penelitian

Analisis data dilakukan menggunakan program aplikasi *SPSS 16 for Windows*. Tahap pengujiannya pertama dilakukan uji homogenitas dengan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)* setelah itu dilakukan uji normalitas menggunakan *Test of Normality (Kolmogorov-Smirnov)*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji parametrik menggunakan uji analisis varian (ANOVA) *one way*. Data yang perbedaannya signifikan lalu dilakukan uji lanjutan dengan uji *Duncan* menggunakan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji T berpasangan atau *paired samples T test* dilakukan untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan.

Jika data yang diperoleh tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis*. Data yang perbedaannya tidak signifikan tidak diuji lebih lanjut sementara data yang perbedaannya signifikan diuji dengan uji *Mann-Whitney*. Selanjutnya dilakukan uji *Wilcoxon* untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan.

F. Alur Penelitian

Berdasarkan prosedur yang sudah dijelaskan sebelumnya di *point E*, secara singkat alur langkah kerja penelitian dapat dijelaskan sesuai dengan Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

Rahmi Maulidia, 2016

PENGARUH BUBUK RIMPANG TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria*) TERHADAP KADAR LIPID DARAH MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN HIPERLIPIDEMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu