BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Hal ini karena pada penelitian ini terdapat manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003). Adapun objek penelitian adalah mencit jantan. Pengamatan dilakukan pada kadar lipid darah mencit yang diinduksi hiperlipidemia sebelum dan setelah diberikan bubuk rimpang temu giring.

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) di mana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan akan diberikan bubuk rhizoma temu giring masing-masing: 0; 40; 80; dan 120 mg/kg berat badan setiap hari pada pagi hari. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif yang diinduksi hiperlipidemia dan tidak beri perlakuan sedangkan kontrol negatif yang tidak diinduksi hiperlipidemia dan tidak diberi perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Gomez dan Gomez (1995) yaitu:

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

$(7 - 1)(n - 1) \geq 15$

$6(n - 1) \geq 15$

$6n - 6 \geq 15$

$n \geq 21/6$

$n \geq 3{,}5$

$n = 4$ ekor

Keterangan n = jumlah replikasi

T = jumlah perlakuan

Pengacakan kandang dan nomor mencit dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2006). Gambar denah pengacakan dan penempatan dalam kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Hasil Pengocokan Mencit dan Kandangnya.

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

Keterangan:
A: Kontrol positif
B: Kontrol negatif
C: Kontrol obat
D: Diberi bubuk rimpang temu giring dengan dosis 40 mg/kg BB/hari.
E: Diberi bubuk rimpang temu giring dengan dosis 80 mg/kg BB/hari.
F: Diberi bubuk rimpang temu giring dengan dosis 120 mg/kg BB/hari.
G: Diberi bubuk rimpang temu giring dengan dosis 160 mg/kg BB/hari
1, 2, 3,...: Nomor mencit

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 diinduksi hiperlipidemia. Pengamatan dilakukan terhadap kadar lipid darah sebelum dan setelah diberikan bubuk rimpang temu giring.

D. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama empat bulan. Pembuatan bubuk rimpang temu giring dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pemeliharaan dilakukan di rumah mencit Kebun Botani UPI. Pengecekan lipid darah mencit dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Pembedahan untuk

mengukur berat organ mencit dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Tahap Pra Penelitian

1. Persiapan alat dan 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 giring yang diberikan adalah sebanyak 40, 80, 120 dan 160 mg/kg BB. Dosis tersebut merupakan dosis yang telah dimodifikasi berdasarkan penelitian Widyaningsih (2011) yang berarti digunakan dosis 1,2 mg/30gBB, 2,4 mg/30gBB, 3,6 mg/30gBB dan 4,8 mg/30gBB. Terdapat tiga kontrol yaitu kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol obat. Pada kontrol positif mencit akan diinduksi hiperlipidemia. Pada kontrol negatif mencit tidak diinduksi hiperlipidemia dan mencit tidak diberi perlakuan dengan bubuk rimpang temu giring. Sedangkan pada kontrol obat mencit diinduksi hiperlipidemia kemudian diberikan obat simvastatin dengan dosis 0,00375 mg. Waktu pemberian dosis selama 30 hari.

3. Pembuatan bubuk rimpang Temu Giring

   Pada temu giring terdapat senyawa aktif yaitu kurkumin. Kurkumin merupakan senyawa yang tidak dapat larut dalam air. Maka rimpang temu giring dibuat dalam bentuk serbuk atau bubuk. Tahap pembuatan bubuk temu giring yaitu pertama rimpang dicuci dan dibersihkan dengan dari tanah. Setelah bersih, rimpang dikupas dan diiris tipis-tipis agar mudah kering. Rimpang dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50˚C hingga kering. Rimpang yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender dan disaring untuk memisahkan

serbuk kasar dan halus. Bubuk rimpang temu giring yang halus ditimbang sesuai dosis.

4. Persiapan hewan percobaan

Disiapkan mencit jantan berumur 8-10 minggu (25-30 g). Selama seminggu mencit dilakukan proses aklimasi 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. Pengambilan sampel, determinasi, seleksi tanaman

Pengambilan sampel *Curcuma heyneana* diambil dari Kebun Percobaan Manoko Lembang, Bandung, Jawa Barat. Kemudian dilakukan determinasi untuk meyakinkan bahwa tanaman yang digunakan benar-benar temu giring (*Curcuma heyneana*). Dilanjutkan dengan seleksi rimpang yang segar dan bebas penyakit.

F. Tahap Penelitian

1. Pemberian pakan tinggi lemak untuk induksi hiperlipidemia

Komposisi pakan yang digunakan untuk induksi hiperlipidemia adalah tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, kuning telur, CaCO3, premix, telur, garam, dan minyak kelapa (Tabel 3.2). Bahan-bahan dicampurkan dan dibentuk pelet. Pemberian pakan sebanyak 30 g/ekor/hari selama 20 hari sebanyak dua kali sehari tiap pagi dan sore hari (Hernawati *et al*., 2013).

Tabel 3.2 Komposisi Pakan Tinggi Lemak

No.	Bahan	Jumlah penambahan (%)
1.	Tepung jagung	60
2.	Tepung ikan	8
3.	Bungkil kedelai	20
4.	Kuning Telur	3
5.	Minyak kelapa	6
6.	*Premix*	1
7.	Garam	1
8.	$CaCO_3$	1

Sumber: Hernawati *et al*., 2013

2. Pemberian bubuk rimpang temu giring

Pemberian bubuk rimpang temu giring dengan dosis 40, 80, 120 dan 160 mg/kg berat badan dilakukan selama 30 hari setelah mencit mengalami hiperlipidemia. Bubuk dilarutkan dalam aquades dan diberikan secara oral dengan menggunakan gavage.

3. Pengambilan sampel darah dan pengukuran kadar lipid darah

Sampel darah diambil tiga kali yaitu di awal sebelum diinduksi hiperlipidemia, di tengah sebelum perlakuan dan di akhir setelah perlakuan dengan pemberian bubuk rimpang temu giring terhadap mencit. Sampel darah setiap mencit diambil dengan cara melukai bagian vena caudalis atau ujung ekornya. Sampel darah yang diambil sekitar 0,5 – 1,0 ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000rpm selama 10 menit untuk uji 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).

a. Uji kolesterol dengan metode CHOD-PAP

Pertama disiapkan blanko, standard, dan serum darah yang akan dihitung dengan perhitungan. Larutan blanko disiapkan dengan mencampurkan 0,5 mL reagen kolesterol dengan 5 μL ddH_2O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dengan 5 μL standard. Serum darah yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 5 μL serum. 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 di bawah ini (Allain *et al.*, 1974).

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

b. Uji trigliserida dengan metode GPO-PAP

Pertama disiapkan blanko, standard, dan serum darah yang akan dihitung dengan perhitungan. Larutan blanko disiapkan dengan mencampurkan 0,5 mL reagen dengan 5 μL ddH_2O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen trigliserida dengan 5 μL standard. Serum darah yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 5 μL serum. 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 di bawah ini (Fossati dan Prencipe, 1982; Trinder, 1969).

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

c. Uji HDL

Uji HDL dilakukan dengan cara *micro-method* yaitu diambil 0,1 ml serum darah dan dicampur dengan *precipitant* sebanyak 10 μL. 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. Disiapkan blanko, standard, dan supernatan yang akan dihitung. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL reagen kolesterol dengan 12,5 μL ddH_2O. Sementara pada standard yang dicampurkan adalah 0,5 mL reagen kolesterol dengan 12,5 μL standard. Ditambahkan reagen kolesterol 0,5 mL pada 12,5 μL supernatan. Campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit di suhu ruangan. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya dengan rumus di bawah ini (Burtis dan Ashwood, 1999).

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

d. Uji LDL dengan metode Friedewald

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

4. Pembedahan untuk mengukur berat organ

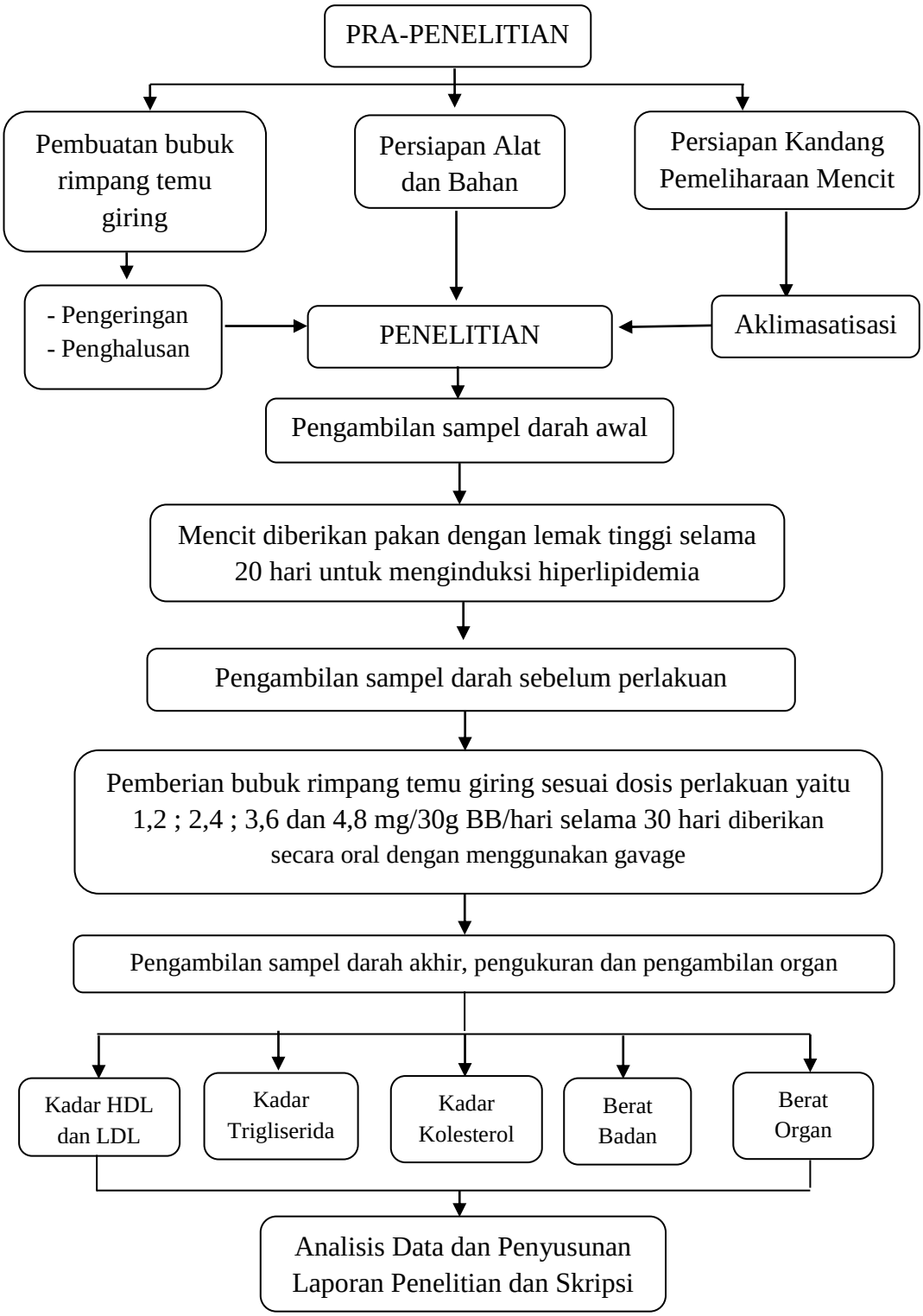
Mencit dikorbankan untuk dibedah dan diambil organ pencernaannya untuk melihat efek lain terhadap pemberian rimpang temu giring terhadap kondisi organ. Organ yang diambil dan diukur beratnya adalah hati, ginjal, limpa, lambung dan usus.

G. Tahap Pasca Penelitian (Analisis Statistik)

Data berat badan, kolesterol, trigliserida, HDL, LDL dan berat organ dianalisis menggunakan program SPSS versi 16 *for Windows*. 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 yang diperoleh homogen dan normal maka dilakukan uji parametrik ANOVA (*Analysis of Variance*) 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 Kruskall-Wallis.

H. ALUR PENELITIAN

Berdasarkan tahap penelitian yang telah dijelaskan dapat digambarkan alur penelitian seperti pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1. Alur Penelitian