

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Design Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan peneliti adalah studi eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *pretest and posttest with control group design* yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar jantan yang diperoleh dari Laboraturium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada. Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang memenuhi kriteria sebagai berikut ini:

1. Kriteria inklusi
  - a. Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan
  - b. Umur 2 bulan
  - c. Berat  $\pm$  200 gram
  - d. Sehat (tikus bergerak aktif)
2. Kriteria eksklusi:
  - a. Terdapat abnormalitas anatomi yang nampak
  - b. Tikus tampak sakit, tidak bergerak secara aktif

Besar sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer, dimana (t) merupakan jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dan (n) adalah jumlah perlakuan. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) > 15 \text{ (Federer, 1995 cit. Murti, 2006)}$$

Sehingga dalam percobaan ini jumlah sampel minimal yang dibutuhkan per kelompok adalah sebagai berikut:

$$(n-1)(5-1) \geq 15; t = 5$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n > 4,75; (n \geq 5)$$

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor tikus (*Rattus novergicus*) yang terbagi dalam 5 kelompok kontrol, yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif (P1): diberi pakan selama 14 hari
2. Kelompok kontrol positif (P2): diinduksi asap rokok, diberi air dan makanan (pakan) biasa tanpa pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) selama 14 hari.
3. Kelompok perlakuan 1 (P3): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 37,5 mg/KgBB dan tetap mendapatkan air dan makanan biasa selama 14 hari.
4. Kelompok perlakuan 2 (P4): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 75 mg/KgBB dan tetap mendapatkan air dan makanan biasa selama 14 hari.
5. Kelompok perlakuan 3 (P5): diinduksi asap rokok, diberi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sekali sehari selama 14 hari dengan dosis 112,5 mg/KgBB dan tetap mendapatkan air dan makanan biasa selama 14 hari.

## C. Variabel dan Definisi Operasional

### 1. Variabel

- a. Variabel bebas: ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)
- b. Variabel tergantung: kadar kolesterol dan trigliserida pada tikus putih jantan galur *wistar*.
- c. Variabel terkendali: Ras, jenis kelamin, umur, berat badan, makanan, kandang tikus putih (*Rattus novergicus*) dan induksi asap rokok.

### 2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*)

Pembuatan ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada dengan metode maserasi dilanjutkan dengan metode rotary evaporator. Kulit buah diperoleh di Supermarket Superindo.

- b. Kadar kolesterol dan trigliserida

Penelitian ini mengukur kadar kolesterol dan trigliserida normal dengan satuan mg/dL pada darah tikus putih (*Rattus novergicus*) diambil 10  $\mu$ L melalui *saccus medianus orbitalis*.

- c. Paparan asap rokok

Asap rokok berasal dari rokok kretek arus samping yang diinduksi dengan dosis 2 batang dalam sehari selama 14 hari. Setiap kelompok terdiri dari 5 tikus dalam kandang pengasapan yang sama. Bagian bawah kandang diberi lubang untuk pengasapan, dan bagian atas kandang diberi lubang supaya asap bisa keluar, pengasapan dilakukan hingga 2 batang rokok habis terbakar.

#### **D. Instrumen Penelitian**

##### 1. Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain, kandang hewan percobaan, kandang pengasapan, *bekker glass*, *rotary evaporator*, *blender*, *timbangan digital*, pipet sonde, *micro hematokrit*, *sentrifuge*, tabung reaksi, *micro pipet*, *vortex*, *eppendorf*, spektrofotometer.

##### 2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian antara lain: ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*), pakan tikus, akuades, etanol 70%, monoreagent kit kolesterol dan trigliserida.

#### **E. Cara Pengumpulan Data**

##### 1. Persiapan

- a. Pemilihan subjek penelitian sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan.
- b. Subjek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok pertama untuk kontrol negatif, kelompok ke dua untuk kelompok kontrol positif, kelompok ke tiga untuk perlakuan 1 (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 1 = 37,5 mg/KgBB), kelompok ke empat untuk perlakuan ke 2 (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 2 = 75 mg/KgBB), kelompok ke lima untuk perlakuan ke tiga (pemberian ekstrak kulit jeruk dosis 3 = 112,5 mg/KgBB).
- c. Pembuatan ekstrak kulit jeruk manis dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada. Kulit jeruk dicuci

bersih lalu dikeringkan dengan suhu 40<sup>0</sup> C hingga kering, setelah kulit jeruk kering, maka selanjutnya diblender atau dihancurkan hingga menjadi serbuk atau menjadi simplisia. Simplisia sebanyak 100 gram dicampur dengan pelarut etanol 70% 800 mL lalu dimaserasi selama 48 jam sambil sesekali diaduk, selanjutnya disaring dan didapatkan dua hasil yaitu berupa ampas dan maserat. Hasil maserasi tersebut dimasukkan ke *rotary evaporator* dan akan menjadi ekstrak kental.

- d. Kandang tikus individu dengan pakan dan minum. Tikus putih *Rattus norvegicus* sebanyak 25 ekor diaklimatisasi selama 3 hari dan diberi pakan serta akuades secara *ad libitum*.
- e. Pengukuran awal kadar kolesterol dan trigliserida dengan cara mengambil darah tikus putih sebanyak 1 mL.
- f. Pemeriksaan kadar kolesterol dimulai dengan pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* tikus sebanyak 1 mL, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh plasma. 10  $\mu$ L sampel plasma dicampurkan dengan monoreagent 1000  $\mu$ L dari KIT CHOD-PAP lalu diinkubasi pada suhu 20<sup>0</sup>–25<sup>0</sup>C. Letakkan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm. Segera lakukan perhitungan waktu dengan menggunakan stopwatch, Pembacaan absorbansi dilakukan setelah 1 menit, 2 menit, dan 3 menit. Cara kerja pemeriksaan kadar trigliserida sama dengan pemeriksaan kadar

kolesterol, yang membedakan adalah untuk pemeriksaan kadar trigliserida menggunakan monoreagent KIT GPO.

- g. Selama 14 hari tikus diinduksi asap rokok dan diberi ekstrak kulit jeruk sesuai pembagian kelompok.

## 2. Pemberian Perlakuan

- a. Kelompok P1: kelompok kontrol negatif

Selama 14 hari diberi pakan dan air secara *ad libitum*.

- b. Kelompok P2: Kelompok kontrol positif

Selama 14 hari diberi air dan pakan dan pemberian induksi asap rokok.

- c. Kelompok P3: Kelompok perlakuan 1 (dosis 1 = 37,5 mg/KgBB).

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 1 sebanyak 1 mL diberikan dengan sonde lambung pada pagi hari kemudian diberi induksi asap rokok dua batang perhari.

- d. Kelompok P4: Kelompok perlakuan 2 (dosis 2 = 75 mg/KgBB)

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 2 sebanyak 1 mL diberikan dengan sonde lambung pada pagi dan diberi induksi asap rokok dua batang perhari.

- e. Kelompok P5: Kelompok perlakuan 3 (dosis 3 = 112,5 mg/KgBB)

Selama 14 hari diberi pakan secara *ad libitum* dan ekstrak kulit jeruk (*Citrus sinensis*) dosis 3 sebanyak 1 mL diberikan dengan sonde lambung pada pagi hari dan rokok dua batang perhari.

### 3. Sesudah perlakuan

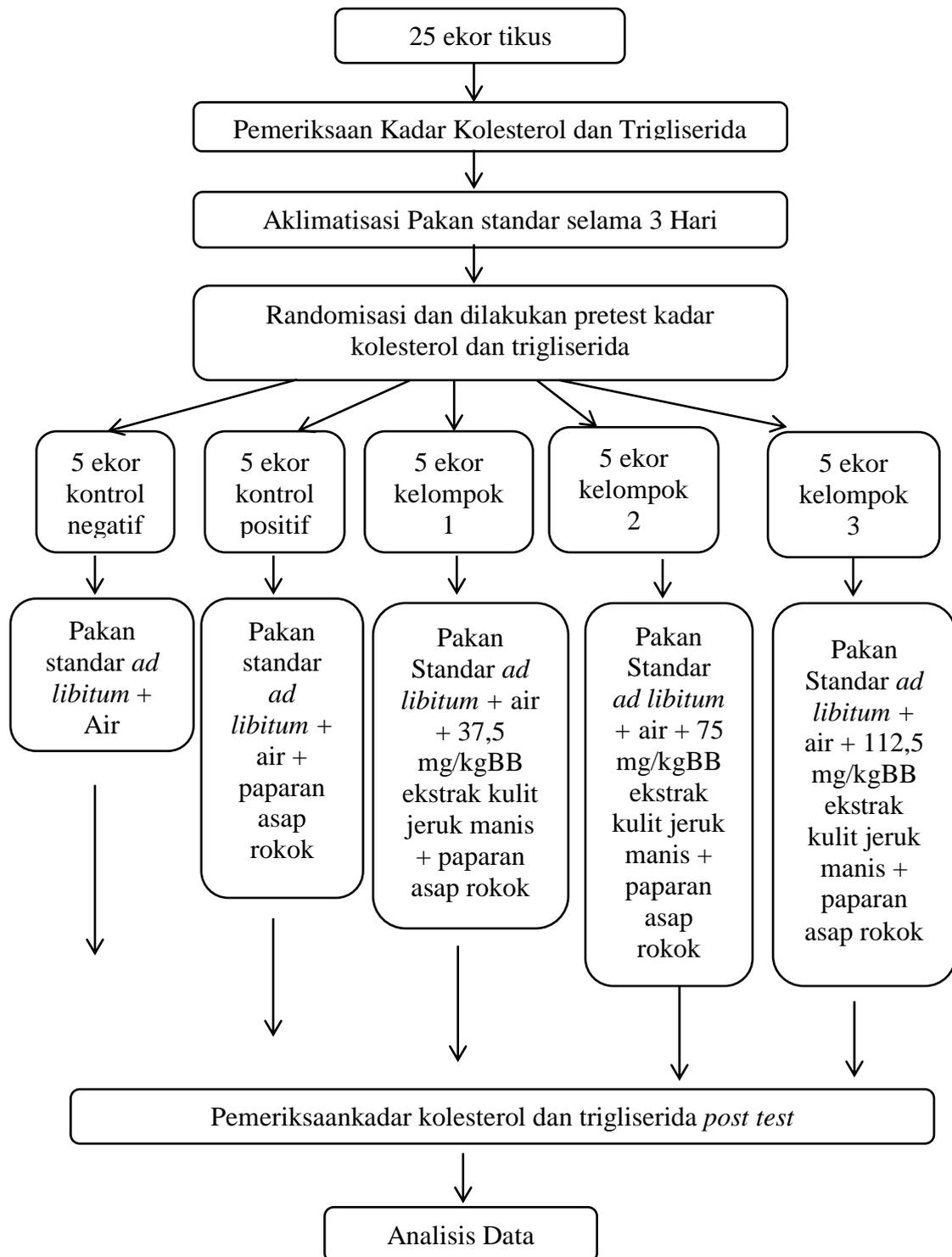
Pada hari ke 15, darah diambil lalu diperiksa kadar kolesterol dan trigliserida masing-masing tikus tiap kelompok. Kadar kolesterol dan trigliserida diperiksa dengan cara berikut:

- a. Pemeriksaan kadar kolesterol dimulai dengan pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* tikus sebanyak 10  $\mu$ L plasma.
- b. 10  $\mu$ L sampel dicampurkan dengan monoreagent 1000  $\mu$ L dari KIT CHOD-PAP lalu diinkubasi pada suhu 20<sup>o</sup>–25<sup>o</sup>C.
- c. Letakkan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.
- d. Segera lakukan perhitungan waktu dengan menggunakan stopwatch,
- e. Pembacaan absorbansi dilakukan setelah 1 menit, 2 menit, dan 3 menit.
- f. Cara kerja pemeriksaan kadar trigliserida sama dengan pemeriksaan kadar kolesterol, yang membedakan adalah untuk pemeriksaan kadar trigliserida menggunakan monoreagent KIT GPO.
- g. Dilakukan perhitungan dengan rumus

$$\frac{\Delta \text{ Sampel}}{\Delta \text{ Standar}} \times \text{Cst (200mg/dL)}$$

- h. Mengolah data hasil masing-masing pemeriksaan kadar kolesterol dan trigliserida darah tikus putih (*Rattus novergicus*) *pretest* dan *posttest* tiap kelompok.

## F. Bagan dan Alur Penelitian



Gambar 4. Bagan Alur Penelitian

## G. Analisis Data

1. Pengolahan statistik dari data hasil penelitian kolesterol dan trigliserida plasma dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas data.
2. Dilakukan uji statistik dengan *Paired T Test* (untuk data berdistribusi normal) atau dengan uji *Wilcoxon test* (jika data tidak berdistribusi normal).
3. Untuk mengetahui perbedaan kadar kolesterol dan trigliserida plasma pada kelompok sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus putih dilakukan uji *One Way Anova* (jika data berdistribusi normal) atau *Kruskal-Wallis* (jika data tidak berdistribusi normal).
4. Sampel yang digunakan berjumlah 25, sehingga uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk*. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah varian populasi homogen atau tidak.
5. Jika hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai yang signifikan maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*. Uji *One Way Anova* adalah uji untuk membandingkan perbedaan rerata lebih dari dua kelompok, sedangkan *Post Hoc Test* membandingkan antar kelompok.