

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian merupakan eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *Pre test - Post test Controlled design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium PAU Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama kurang lebih dua bulan, yaitu bulan Juli sampai Agustus 2011.

C. Obyek Penelitian

Obyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari laboratorium PAU Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Jumlah sampel dalam penelitian adalah 24 ekor yang diambil secara *stratified random sampling*. Subjek yang diteliti memiliki kriteria

3. Berjenis kelamin jantan.

Kriteria eksklusi adalah tikus yang tidak mau makan, minum atau mengalami penurunan keadaan fisik selama penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel-variabel dalam penelitian ini antara lain :

- a. Variabel bebas : air rebusan daun sukun (*Artocarpus altilis*).
- b. Variabel tergantung : kadar trigliserida darah.
- c. Variabel pengganggu terkendali :

1) Ras. Perbedaan ras dapat mempengaruhi farmakokinetik dan efek samping dari suatu obat pada penelitian ini dipilih dari galur yang sama, yaitu galur wistar.

2) Usia. Penelitian ini menggunakan tikus putih berumur 2 bulan untuk membuat sampel homogen dan menghindari peningkatan serum trigliserida karena faktor umur.

3) Jenis kelamin. Jenis kelamin tikus putih yang dipakai adalah tikus putih jantan karena tidak terpengaruh oleh hormon-hormon pada siklus menstruasi.

4) Berat badan. Berat badan akan mempengaruhi pemberian dosis air rebusan daun sukun sehingga dipilih tikus dengan berat badan yang hampir sama yaitu antara 200-270 gram

d. Variable pengganggu tak terkendali :

Faktor genetik. Faktor genetik tidak dapat dikendalikan secara mutlak. Hal ini diatasi dengan pemilihan subjek penelitian yang berasal dari galur yang sama (*strain Sprague Dawley*).

2. Definisi Operasional

- a. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur *Sprague Dawley* jantan berusia sekitar 2 bulan yang diberi perlakuan dengan pemberian air rebusan daun sukun, minyak babi, dan aquades sebagai kontrol.
- b. Air rebusan daun sukun yang digunakan berasal dari daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang sudah dikeringkan dengan berbagai dosis.
- c. Kadar trigliserida darah adalah kadar trigliserida yang diambil dari serum darah hewan uji sebanyak 3 kali, yaitu sebelum induksi minyak babi, sebelum perlakuan (setelah 1 minggu diinduksi minyak babi), dan setelah perlakuan selama 2 minggu.
- d. Minyak babi adalah minyak yang berasal dari lemak babi yang mengandung kadar lemak tinggi sehingga menyebabkan tikus menjadi hiperlipidemia.
- e. Enzymatic colometric test, "GPO", yaitu prosedur pemeriksaan pada trigliserida dengan menggunakan reagen siap pakai kemudian hasilnya dihitung berdasarkan nilai absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain empat buah kandang tikus putih, tempat pakan tikus putih, sonde, sarung tangan, timbangan, spuit injeksi, spektrofotometer,

2. Bahan

a. Untuk perlakuan dan pemeliharaan

Bahan yang digunakan antara lain daun sukun, pakan BR 2, minyak babi, dan air minum tikus putih.

b. Untuk pemeriksaan kadar trigliserida darah

1) Plasma EDTA

2) Reagen, yang berisi :

a.) Good's buffer ph 7.2	: 50 mmol/l
b.) 4-chlorophenol	: 4 mmol/l
c.) ATP	: 2 mmol/l
d.) Mg^{2+}	: 15 mmol/l
e.) Glycerokinaase	: $\geq 0,4$ KU/l
f.) Peroxidase	: ≥ 2 KU/l
g.) Lipoprotein lipase	: ≥ 4 KU/l
h.) 4-aminotipyrine	: 0,5 mmol/l
i.) Glycerol-3-phosphate-oxidase	: $> 1,5$ KU/l

F. Cara Kerja

Tahap-tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi :

1. Persiapan alat dan bahan penelitian.

2. Penatalaksanaan penelitian :

a. Pengelompokan subjek penelitian

Dua puluh empat ekor tikus putih jantan sebagai hewan uji dibagi dalam empat kelompok secara acak masing-masing enam ekor. Enam ekor tersebut adalah sebagai berikut:

- 1) Kelompok kontrol, merupakan kelompok yang diberi minyak babi dan mendapatkan minum aquades murni.
- 2) Kelompok perlakuan I, merupakan kelompok yang diberi minyak babi dan mendapat minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18% sebanyak 1,4 ml.
- 3) Kelompok perlakuan II, merupakan kelompok yang diberi minyak babi dan mendapat minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18% sebanyak 2,8 ml.
- 4) Kelompok perlakuan III, merupakan kelompok yang diberi minyak babi dan mendapat minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18% sebanyak 4,2 ml.

b. Penetapan konsentrasi air rebusan daun sukun

Dua puluh gram daun sukun tua yang telah dikeringkan dipotong kecil-kecil untuk direbus bersama dua liter air. Tika angka

konversi tikus berdasarkan Laurence sebesar 0,018, maka perhitungan konsentrasi air rebusan dapat dihitung sebagai berikut

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi} &= \frac{\text{Angka konversi tikus} \times \text{berat bahan}}{2} \times 100\% \\ &= \frac{0,018 \times 20 \text{ gram}}{2} \times 100\% \\ &= 18\% \end{aligned}$$

c. Penentuan dosis rebusan daun sukun

Dosis yang dianjurkan adalah sekitar 500-1500 ml rebusan daun sukun dalam sehari untuk manusia yang dikonsumsi dengan berat badan 70 kg. Dosis yang digunakan pada tikus putih dengan berat badan ± 200 gr maka dikonversikan sebagai berikut :

$$1) \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB manusia}} \times 500 = \frac{0,2}{70} \times 500 = 1,4 \text{ ml}$$

$$2) \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB manusia}} \times 1000 = \frac{0,2}{70} \times 1000 = 2,8 \text{ ml}$$

$$3) \frac{\text{BB tikus}}{\text{BB manusia}} \times 1500 = \frac{0,2}{70} \times 1500 = 4,2 \text{ ml}$$

d. Perlakuan hewan uji

- 1) Kandang tikus putih dibersihkan, dipersiapkan dan diberi label
- 2) Dua puluh empat ekor tikus diberi tanda, ditimbang, dan dicatat berat badannya, selanjutnya dibagi menjadi empat kelompok.

Setian kelompok terdiri dari 6 tikus.

- 3) Masing-masing kelompok tikus mendapatkan pakan BR 2 dan satu botol air minum setiap hari sesuai dengan perlakuan kelompoknya.
- 4) Kandang dibersihkan setiap hari agar kondisi hewan uji tetap sehat.
- 5) Masing-masing kelompok tikus mendapat perlakuan sebagai berikut :
 - a) Kelompok kontrol tanpa perlakuan mendapat pakan BR 2 40gr/hari dan minum aquades selama jalannya penelitian, serta minyak babi selama 1 minggu.
 - b) Kelompok perlakuan 1 mendapat pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18 % sebanyak 1,4 ml setiap hari selama jalannya penelitian, serta minyak babi selama 1 minggu.
 - c) Kelompok perlakuan 2 mendapat pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18 % sebanyak 2,8 ml setiap hari selama jalannya penelitian, serta minyak babi selama 1 minggu.
 - d) Kelompok perlakuan 3 mendapat pakan BR 2 40gr/hari dan minum air rebusan daun sukun dengan konsentrasi 18 % sebanyak 4,2 ml setiap hari selama jalannya penelitian, serta minyak babi selama 1 minggu.
- 6) Pengambilan data

Pengambilan data dilakukan dengan cara mengukur kadar trigliserida darah tikus putih menggunakan metode enzymatic

colorimetric test, GPO (Glycerol-Phosphate-Oxidase). Caranya adalah dengan membuat sediaan plasma EDTA terlebih dahulu. Sediaan plasma dibuat dengan pemusingan (sentrifugasi) darah tikus kemudian diambil bagian jernihnya. Plasma yang ditambah dengan EDTA kemudian menjadi sampel yang akan digunakan berikutnya. Setelah itu, semua bahan dicampurkan komposisi sebagai berikut :

Tabel 3.1 Komposisi reagen

No	Bahan	Blangko	Sampel	Standar
1.	Sampel	-	10 μ l	-
2.	Standar	-	-	10 μ l
3.	Akuades	10 μ l	-	-
4.	Reagen	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l

Bahan-bahan tersebut dicampur ke dalam tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 5 menit, langkah selanjutnya adalah membaca absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

Hasil pengukuran dihitung dengan rumus :

$$\text{Trigliserida} = \frac{\Delta \text{ Asp}}{\Delta \text{ Ast}} \times \text{Cst}$$

Keterangan :

Trigliserida = kadar trigliserida yang diukur (mg/dl)

ΔAsp = absorbansi sampel – absorbansi blangko

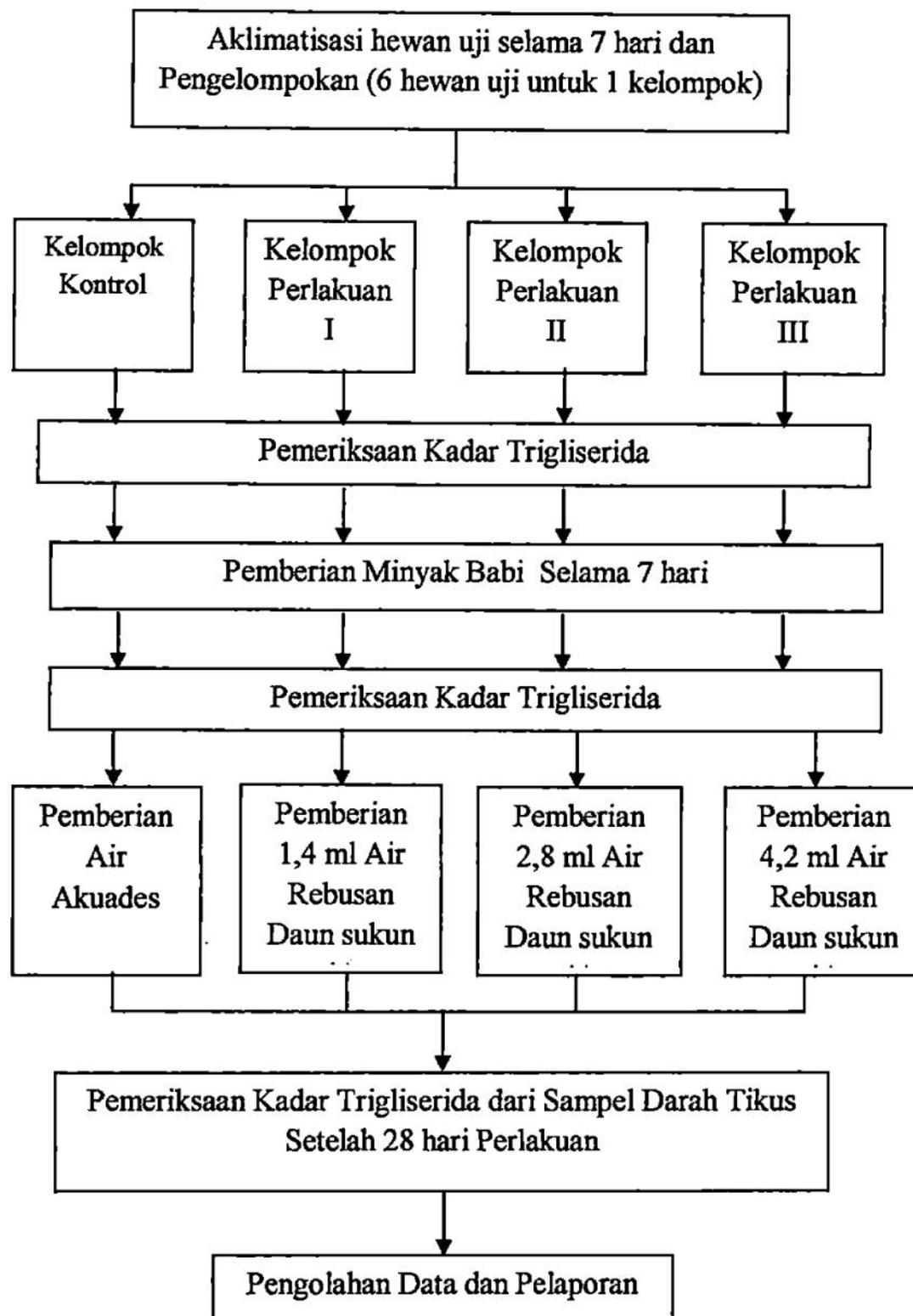
ΔAst = absorbansi standar – absorbansi blangko

Cst = konsentrasi standar

G. Analisis Data

Skala pengukuran kadar trigliserida menggunakan skala interval. Analisis data dilakukan dengan seperangkat komputer dengan analisis one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan dan menggunakan uji *paired T test* untuk membandingkan hasil

H. Mekanisme Kerja



Gambar 3 1 Mekanisme Kerja