

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan penelitian *pretest-posttest control group design*.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* jantan, umur 2 bulan, berat rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada.

Jumlah sampel penelitian dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus federer. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 5:

1. Kelompok kontrol negatif: hewan uji yang diberi makan normal dan air putih saja.
2. Kelompok kontrol positif: hewan uji yang telah diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia.
3. Kelompok uji kadar I: hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi kombinasi jus biji pepaya 100 mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari,
4. Kelompok uji kadar II: hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi kombinasi jus biji pepaya 200 mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari.

5. Kelompok uji kadar III: hewan uji yang diberi diet tinggi kolesterol sehingga mengalami hiperkolesterolemia kemudian diberi kombinasi jus biji pepaya 400 mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari.

Rumus federer yang digunakan adalah $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana :

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel tiap kelompok

diketahui : t = 5

ditanya : n = ?

jawab : $(t-1)(n-1) \geq 15$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah sampel minimal tiap kelompok adalah 5. Dari hasil tersebut jumlah sampel penelitian adalah 25 ekor tikus putih *Rattus norvegicus*.

C. Tempat dan Waktu

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium PAU (Pusat Antar Universitas) Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan selama 1 bulan, mulai bulan Desember 2016.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

Variabel dalam penelitian ini antara lain:

- a. Variabel bebas : kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit.
- b. Variabel tergantung : penurunan rasio kolesterol LDL:HDL
- c. Variabel terkontrol : ratur, umur, jenis kelamin, dan berat badan tikus.

2. Definisi Operasional

- a. Kolesterol: senyawa metabolit yang mengandung lemak sterol ditemukan pada membran sel di dalam jaringan dan lipoprotein plasma dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan dengan asam lemak rantai panjang sebagai ester kolesterol. Kadar normal kolesterol LDL adalah <130 mg/dL dan kadar normal kolesterol HDL adalah >60 mg/dL.
- b. Kadar kolesterol LDL dan HDL: kadar LDL dan HDL yang diperoleh dari rata-rata hasil pengukuran kadar LDL dan HDL I yaitu setelah tikus diadaptasi selama 2 hari.
- c. Tikus hiperkolesterolemia: tikus yang mengalami kenaikan kadar kolesterol setelah diberi diet tinggi kolesterol selama 7 hari. Diketahui setelah dilakukan pengukuran kadar kolesterol total II, hiperkolesterolemia jika kadar kolesterol dalam darah lebih dari 240 mg/dL.
- d. kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit: biji pepaya matang yang telah dihaluskan dan dihomogenisasikan kemudian disaring serta kunyit yang telah dihaluskan menggunakan blender lalu disaring.

- e. Pemberian kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit: kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit sesuai dosis, diberikan selama 21 hari, 1x sehari setiap pagi pada kelompok uji.
- f. Diet tinggi kolesterol: pemberian kuning telur per oral sebanyak 2mL/hari selama 7 hari dan diberikann setiap hari.
- g. Perubahan rasio kolesterol LDL:HDL: selisih nilai rasio kolesterol LDL:HDL sebelum dan sesudah diberi kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test "CHOD-PAP"*.

Skala: rasio

E. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain: 25 buah kandang tikus, alas dan tutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus, sonde, sarung tangan, timbangan analitik, mikrohematokrit, rak tabung reaksi, tabung reaksi, 25 buah ependrof, label, pencatat waktu, vortex, pipet, blender, *homogenizer*, dan penyaring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: jus biji pepaya dan jus kunyit berbagai dosis, pakan BR 2, kuning telur, air minum tikus (air putih), reagen KIT kolesterol, dan akuades.

F. Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Tahap-tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi:

1. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

a. Pembuatan kombinasi jus biji pepaya dan jus kunyit

Biji buah pepaya matang dihaluskan dengan blender hingga halus kemudian ditimbang sesuai dengan kadar yang diinginkan. Setelah itu, ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 mL, kemudian dihomogenisasikan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 6612 rpm selama 2 menit lalu disaring.

Kunyit yang telah dipilih di haluskan menggunakan blender hingga halus kemudian ditimbang sesuai kadar yang diinginkan. Setelah itu ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 mL, kemudian di homogenasikan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 6612 rpm selama 2 menit lalu disaring.

2. Pelaksanaan Penelitian

a. Persiapan Subjek Penelitian

Jumlah sampel penelitian adalah 25 ekor tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok dengan metode random, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan tiap kandang untuk 1 ekor tikus.

b. Penetapan Kadar

- 1) kombinasi jus biji pepaya kadar I 100mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari.

Untuk kadar tikus putih dengan berat badan 200 g adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ g} = 20 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 70 \text{ g} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 20 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

- 2) kombinasi jus biji pepaya kadar II 200 mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari.

Untuk kadar tikus dengan berat badan 200 adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} = 40 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 70 \text{ g} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 40 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

- 3) kombinasi jus biji pepaya kadar III 400 mg/kg BB/hari dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari.

Untuk kadar tikus dengan berat badan 200 g adalah

Biji pepaya :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 400 \text{ g} = 80 \text{ mg}$$

Kunyit :

$$\frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 70 \text{ g} = 14 \text{ mg}$$

Jus biji pepaya 80 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL dan kunyit 14 mg dilarutkan dengan aquades 1 mL yang diberikan peroral pada tikus.

c. Perlakuan Hewan Uji

- 1) Kandang tikus yang bersih dipersiapkan dan diberi label terlebih dahulu, satu kandang untuk satu ekor tikus,
- 2) Dua puluh lima ekor tikus putih *Rattus norvegicus* ditimbang dan dicatat berat badannya, selanjutnya dibagi menjadi lima kelompok, setiap kelompok terdiri dari lima ekor tikus,
- 3) Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama 2 hari kemudian tiap kelompok diambil 2 ekor tikus untuk dilakukan pemeriksaan darah I,
- 4) Masing-masing kelompok tikus diberi diet tinggi kolesterol setiap hari selama 7 hari dan pakan 200 g BR2 serta satu botol air minum per hari,

- 5) Semua tikus dilakukan pemeriksaan darah II untuk mengetahui tikus sudah mengalami hiperkolesterolemia,
 - 6) Pakan dan air minum diganti setiap hari, kandang dibersihkan setiap hari agar hewan uji tetap kondisi sehat,
 - 7) Kelompok tikus yang telah mengalami hiperkolesterolemia mendapat perlakuan sebagai berikut:
 - a) Kelompok kontrol positif diberi pakan BR2 20mg serta air minum setiap hari selama 30 hari,
 - b) Kelompok uji I mendapat 20 g pakan BR 2, air minum, jus biji pepaya kadar I dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari setiap hari selama 30 hari,
 - c) Kelompok uji II mendapat 20 g pakan BR2, air minum, jus biji pepaya kadar II dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari setiap hari selama 30 hari,
 - d) Kelompok uji III mendapat 20 g pakan BR2, air minum, jus biji pepaya kadar III dan jus kunyit 70 mg/kg BB/hari setiap hari selama 30 hari,
 - 8) Semua tikus ditimbang dan dicatat berat badannya pada saat sebelum adaptasi, dan pemeriksaan darah I,II, dan III.
- d. Pengamatan

Setelah dilakukan perlakuan selama 21 hari, maka tiap obyek penelitian dilakukan pemeriksaan darah III. Pengambilan sampel darah tikus dilakukan dengan memasukkan mikrohematokrit ke bagian

medial dari mata (sinus orbitalis) tikus. Darah yang keluar ditampung dalam ependorf. Darah tersebut diambil serumnya. Pengambilan serum dilakukan kurang lebih 30 menit sampai 1 jam setelah pengambilan darah. Langkah-langkah penambilaan serum sebagai berikut:

- 1) Darah disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit
- 2) Cairan bening bagian atas (serum) diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru.

Serum tersebut diperiksa kadar kolesterol HDL dan LDLnya menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test "CHOD-PAP"*. Tahap-tahap yang dikerjakan untuk masing-masing pemeriksaan kolesterol meliputi:

- 1) Pemeriksaan kolesterol HDL:
 - a) Pengambilan sampel 200 μ L,
 - b) Ditambahkan reagen HDL 500 μ L,
 - c) Dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar (20° C – 25° C) selama 15 menit,
 - d) Disentrifugasikan selama 20menit pada 2500rpm,
 - e) Diukur absorbansinya pada λ 546 mikrolab 500 pada suhu $20-25^{\circ}$ selama 10 menit,
 - f) Diukur absorbansi Standar 200 mg/dL dan absorbansi blanko selama 45 menit,

g) Dilakukan perhitungan,

$$\text{HDL} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$\text{Konsentrasi standar} = 200 \text{ mg/dL}$$

2) Pemeriksaan kolesterol LDL:

a) Pengambilan sampel 100 μL ,

b) Ditambahkan reagen LDL 1000 μL ,

c) Dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar ($20^{\circ} \text{C} - 25^{\circ} \text{C}$) selama 15 menit,

d) Disentrifugasikan selama 20menit pada 2500rpm,

e) Diukur absorbansinya pada $\lambda 546$ mikrolab 500 pada suhu $20-25^{\circ}$ selama 10 menit,

f) Diukur absorbansi Standar 200 mg/dL dan absorbansi blanko selama 45 menit,

g) Dilakukan perhitungan,

$$\text{LDL} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$\text{Konsentrasi standar} = 200 \text{ mg/dL}$$

G. Analisis Data

Metode analisis statistik yang digunakan adalah

1. Uji normalitas data dan Uji variansi data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena sampel berjumlah <50 . Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil

berdasarkan dari populasi yang terdistribusi secara normal. Uji homogenitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang digunakan mempunyai variansi yang sama.

2. Untuk mengetahui perbedaan rasio kolesterol LDL:HDL 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).
3. 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.
4. Dilakukan uji statistik dengan *Paired T Test* (untuk data berdistribusi normal) atau dengan uji *Wilcoxon test* (jika data tidak berdistribusi normal).