

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan penelitian *pre and post test with control group design*.

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

Objek penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar umur 2-3 bulan, jenis kelamin jantan, dengan berat  $\pm 200$  gram berjumlah 30 ekor. Besar sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer, dimana (t) adalah jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dan (n) adalah jumlah perlakuan. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

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

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

$$(n-1) (6-1) \geq 15 ; t = 6$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Sampel penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria penelitian berikut ini :

- Kriteria inklusi
  1. Tikus putih jantan galur Wistar
  2. Umur 2-3 bulan
  3. Berat badan  $\pm$  200 gram
  4. Sehat
- Kriteria eksklusi
  1. Terdapat abnormalitas anatomi yang tampak
  2. Tikus tampak sakit
  3. Tikus tidak bergerak secara aktif

Sampel dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus hiperkolesterolemia adalah tikus yang diberi diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh sebanyak 1,4 mL/200 gram BB/ hari selama 7 hari (Kusmiati, 2017).

Kelompok kontrol negatif yaitu tikus tanpa diberi perlakuan. Kelompok kontrol positif yaitu tikus hiperkolesterolemia. Kelompok standar yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi simvastatin 0,72 mg/200 gram BB (PERKENI, 2015). Kelompok P1 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis I (buah Okra sebanyak 0,18 gram yang direndam dalam 3,6 mL air). Kelompok P2 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis II (buah

Okra sebanyak 0,36 gram yang direndam dalam 3,6 mL air). Kelompok P3 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis III (buah Okra sebanyak 0,72 gram yang direndam dalam 3,6 mL air) (Fauziana, 2015).

### C. Variabel dan Definisi Operasional

#### 1. Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a) Variabel bebas : air rendaman buah Okra  
(*Abelmoschus esculentus L.*).
- b) Variabel terikat : kadar kolesterol total darah tikus Wistar jantan.
- c) Variabel terkendali : strain, umur, jenis kelamin, dan berat badan tikus.

#### 2. Definisi Operasional

- a) Kadar kolesterol total : normalnya  $< 200$  mg/dL, digunakan sebagai acuan untuk mengetahui adanya penyakit kardiovaskuler.
- b) Tikus hiperkolesterolemia : tikus yang mengalami kenaikan kadar kolesterol total dalam darah setelah diberi diet tinggi lemak selama 7 hari. Diketahui setelah dilakukan pengukuran kadar kolesterol total kedua, hiperkolesterolemia bila kadar kolesterol total dalam darah di atas normal ( $> 200$  mg/dL).

- c) Simvastatin : senyawa penghambat enzim HMG KoA reduktase yang merupakan katalis pembentukan mevalolat dari HMG KoA pada tahap awal pembentukan kolesterol.
- d) Air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) : berasal dari buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) yang dipotong kecil-kecil dan direndam dalam air bersuhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam.
- e) Perubahan kadar kolesterol total : selisih nilai kadar kolesterol total sebelum dan sesudah diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*). Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test* (CHOD-PAP) dan menggunakan skala pengukuran rasio. Prinsip dari metode ini adalah pemeriksaan kolesterol setelah hidrolisis dan oksidasi enzimatik. Indikator kolorimetri adalah quinonimin yang terbentuk dari 4-aminoantipirin dan fenol oleh hidrogen peroksidase dengan adanya reaksi katalitik dari peroksidase. Menurut Widada (2017), kadar kolesterol total ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Kolesterol Total} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{Konsentrasi standar}$$

Dengan konsentrasi standar = 200 mg/dL.

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

1. Alat :

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain : 30 buah kandang tikus, alas dan tutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus, sonde, sarung tangan, timbangan analitik, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet, alat suntik dan jarum *disposable*, tabung ependorf, spektrofotometer, *sentrifuge*, label, dan pencatat waktu.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : 30 ekor tikus wistar jantan, air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dengan berbagai dosis, pakan standar tikus, air minum tikus, aquades, simvastatin, kuning telur puyuh, serum darah tikus, dan reagen kit kolesterol CHOD-PAP.

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

Pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

1. Perizinan.
2. Menetapkan sampel menjadi 6 kelompok. Kelompok kontrol negatif yaitu tikus tanpa diberi perlakuan. Kelompok kontrol positif yaitu tikus hiperkolesterolemia. Kelompok standar yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi simvastatin 0,72 mL/200 gram BB. Kelompok P1 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis I (buah Okra sebanyak 0,18 gram

yang direndam dalam 3,6 mL air). Kelompok P2 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis II (buah Okra sebanyak 0,36 gram yang direndam dalam 3,6 mL air). Kelompok P3 yaitu tikus hiperkolesterolemia yang diberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) dosis III (buah Okra sebanyak 0,72 gram yang direndam dalam 3,6 mL air).

3. Memberi pakan sampel (hewan coba) kelompok kontrol positif, kelompok standar, kelompok P1, kelompok P2, dan kelompok P3 dengan diet tinggi lemak yaitu kuning telur puyuh sebanyak 1,4 mL/200 gram BB/ hari selama 7 hari.
4. Melakukan pengukuran kadar kolesterol total yang pertama (*pre-test*) pada tikus dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test* (CHOD-PAP).
5. Memberi air rendaman buah Okra (*Abelmoschus esculentus L.*) per oral pada sampel kelompok P1, kelompok P2 dan kelompok P3 sesuai dengan dosis masing-masing selama 28 hari.
6. Memberi simvastatin pada sampel kelompok standar sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan selama 28 hari.
7. Melakukan pengukuran kadar kolesterol total yang kedua (*post-test*) pada tikus dengan menggunakan metode *Enzymatic Colorimetric Test* (CHOD-PAP).
8. Melakukan pengolahan dan analisis data.
9. Penyusunan laporan hasil penelitian.

## **F. Uji validitas dan Reliabilitas**

Uji validitas dilakukan dengan menera semua alat penelitian yang digunakan, sedangkan uji reliabilitas dilakukan dengan menggunakan alat yang sama dalam setiap penelitian.

## **G. Analisa Data**

Data yang diperoleh akan dianalisa secara statistik dengan *Paired Sample t Test* (jika data yang berdistribusi normal) atau dengan *Wilcoxon Test* (jika data tidak berdistribusi normal) untuk membandingkan hasil *pre-test* dan *post-test*. Selanjutnya dilakukan uji *Anova* (jika data berdistribusi normal) atau uji *Kruskal-Wallis* (jika data tidak berdistribusi normal) untuk membandingkan *mean* masing-masing kelompok sampel. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk*, karena sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus. Jika hasil uji *Anova* menunjukkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk membandingkan *mean* antar kelompok sampel.

## **H. Etika Penelitian**

Penelitian ini akan diajukan ke Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.