

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan jenis penelitian *Experimental Laboratories* sesuai dengan tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diekstraksi menggunakan etanol terhadap kadar kolesterol total dan pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan diet tinggi kolesterol. Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah *Pre-Post Test Control Group Design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat :

1. Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Laboratorium Farmasi Universitas Gajah Mada

Waktu : dilakukan dari bulan Oktober 2018 hingga Mei 2019

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini digolongkan menjadi 3, antara lain:

- a. Variabel bebas : ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) sebagai terapi pada kelompok perlakuan dengan dosis 25mg/kgBB, 50mg/kgBB dan 100mg/kgBB.

- b. Variabel tergantung : Kadar kolesterol total pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan hiperkolesterolemia.
- c. Variabel terkendali : Jenis kelamin tikus, berat badan tikus, usia tikus, hiperkolesterolemia, dan kondisi lingkungan.

2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah ekstrak yang dihasilkan dengan cara metode sokletasi menggunakan pelarut etanol 96%. Dosis ekstrak daun kersen yang akan diberikan pada tikus adalah 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB.
- b. Kadar kolesterol total adalah jumlah kolesterol HDL, kolesterol LDL, dan trigliserida yang diukur menggunakan metode CHOD-PAP (enzymatic photometric test).
- c. Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan adalah spesies tikus dengan berat sekitar ± 300 gram dan usia sekitar 3-4 bulan
- d. Hiperkolesterolemia adalah kondisi peningkatan kadar kolesterol total pada tikus yang telah diinduksi dengan minyak babi. Disebut hiperkolesterolemia jika kadar kolesterol darah ≥ 200 mg/dl.

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan, gelas ukur, rak & tabung reaksi, labu ukur, labu *Erlenmeyer*, gelas beker, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, mortir & alue, gelas arloji,

pengaduk, kertas saring, corong, *vacuum rotary evaporator*, cawan porselin, wadah penyimpanan ekstrak, timbangan hewan uji, kandang untuk hewan uji, wadah makan dan wadah minum hewan uji, sonde lambung, spuit, kertas label, tabung mikrohematokrit, *refrigator*, spektrofotometer, dan seperangkat alat sokhlet.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kersen, etanol 96%, es batu, serum tikus, sekam, pakan, akuades, simvastatin, minyak babi, dan reagen kolesterol.

E. Cara Kerja

1. Persiapan Penelitian

a. Pengolahan Daun Kersen

Daun kersen diperoleh di daerah Bantul. Daun kersen segar disortasi basah dengan pemilihan daun yang berwarna hijau dan sudah tua, kemudian dipetik. Daun dicuci hingga bersih dan pada air mengalir dengan waktu sesingkat mungkin, dan dilakukan pelayuan daun selama kurang lebih 16-24 jam. Setelah layu, daun dikeringkan dengan cara pengeringan alami menggunakan sinar matahari. Setelah kering dilakukan sortasi kering dengan memisahkan benda-benda asing, kemudian daun tersebut diblender hingga membentuk partikel-partikel kecil dan disimpan pada wadah yang kering.

b. Pembuatan Ekstrak Daun Kersen Secara Sokhletasi

Alat sokhletasi dipasang kemudian serbuk daun kersen sebanyak 100 gram dibungkus menggunakan kertas saring, diikat dengan benang dan dimasukkan pada labu alas bulat pada sokhlet. Proses sokhletasi dilakukan pada suhu 70° C hingga tetesan berwarna bening. Ekstrak cair yang telah dihasilkan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak yang kental.

c. Persiapan dan Pemeliharaan Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, umur sekitar 3-4 bulan dengan berat badan ± 300 gram. Seluruh tikus diberikan tanda pembeda dan diaklimatisasi selama 3 hari agar dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Tikus dipelihara dikandang besi berisi sekam, diberi pakan berupa pelet dan air minum setiap hari.

d. Melakukan Perlakuan Diet Kolesterol

Perlakuan ini dilakukan dengan induksi minyak babi 3 ml/ekor sekali sehari. Induksi dilakukan selama 24 hari.

e. Membuat Larutan Stok Bahan Uji

Larutan suspensi dibuat dengan cara melarutkan CMC Na sebagai pengental dan penstabil suspensi sebanyak 1% kedalam 100 ml akuades panas. Sebanyak 1 gram CMC Na mula-mula dilarutkan dalam 50 ml akuades panas, kemudian ditambahkan hingga 100 ml.

Ekstrak ditimbang sesuai hasil perhitungan, kemudian dilarutkan dalam larutan CMC Na dalam labu takar 25 ml, campur hingga homogen. Larutan dipindahkan kedalam wadah yang telah tersedia.

f. Pembuatan Suspensi Simvastatin

Dosis simvastatin untuk manusia adalah 20 mg/hari sehingga apabila akan diberikan kepada hewan uji perlu adanya konversi dosis. Dosis simvastatin untuk tikus putih adalah $0,018 \times 20/\text{hari/ekor} = 0,36 \text{ mg/hari/ekor}$.

Serbuk simvastatin kemudian dimasukkan labu takar dan ditambahkan larutan CMC Na hingga 25 ml, campur hingga homogen. Larutan dipindahkan kedalam wadah yang telah tersedia.

2. Pelaksanaan Percobaan

a. Kelompok perlakuan

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji tikus dengan jumlah 24 ekor yang telah diaklimatisasi, jumlah minimal tikus dihitung menggunakan rumus Federer, berikut perhitungannya:

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel per kelompok perlakuan

Hewan uji dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus. Sistematika perlakuan dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Perlakuan Masing-Masing Kelompok

| No | Kelompok | Perlakuan |
|----|-----------------|-----------------------------------------------------|
| 1. | Kontrol normal | Tanpa perlakuan |
| 2. | Kontrol negatif | Minyak babi 3 ml/kali/hari |
| 3. | Kontrol positif | Simvastatin 0,36 mg/kali/hari |
| 4. | Dosis I | Ekstrak etanol daun kersen dosis 25 mg/kgBB |
| 5. | Dosis II | Ekstrak etanol daun kersen dengan dosis 50 mg/kgBB |
| 6. | Dosis III | Ekstrak etanol daun kersen dengan dosis 100 mg/kgBB |

b. Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Sebelum diberikan perlakuan induksi kolesterol, kadar kolesterol total tikus diukur terlebih dahulu untuk mengetahui kadar kolesterol awal tikus dan memastikan bahwa tikus dalam keadaan normal/sehat. Pengujian awal dilakukan dengan menggunakan kit kolesterol dan alat easy touch pada 2 ekor tikus perkelompok.

Setelah dilakukan induksi minyak babi dan proses terapi, kadar kolesterol total diukur menggunakan metode *Enzymatic Photometric Test* Cholesterol Oxidase – Para Aminophenazone (CHOD-PAP).

Pengambilan darah tikus dilakukan pada vena orbitalis. Pengambilan darah menggunakan tabung hematokrit dan ditampung kedalam tabung eppendrof. Darah kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. serum yang terpisah kemudian di pipet kedalam tabung *Eppendrof*. Kemudian di pipetkan :

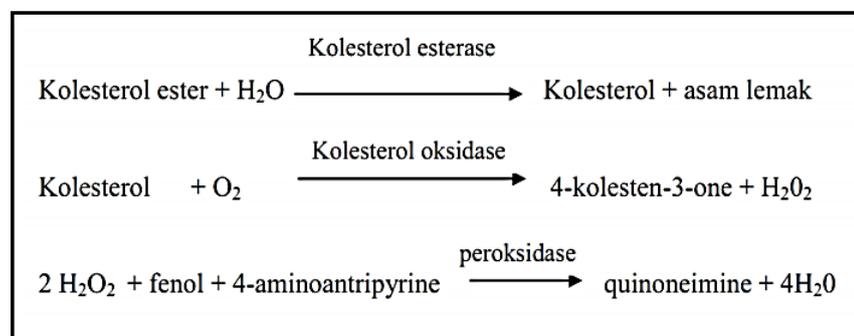
Tabel 4. Konsentrasi Larutan

| Jenis | Konsentrasi | | |
|--------------|-------------|---------------|-------------|
| | Blanko (µl) | Standart (µl) | Sampel (µl) |
| Standart | - | 10 | - |
| Serum | - | - | 10 |
| Reagen kerja | 1000 | 1000 | 1000 |

Campur masing-masing hingga homogen, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (20°-25°C) selama 30 menit. Kemudian serapan sampel dan standar diukur pada panjang gelombang 546 nm. Perhitungan kadar kolesterol total (KTT) adalah sebagai berikut:

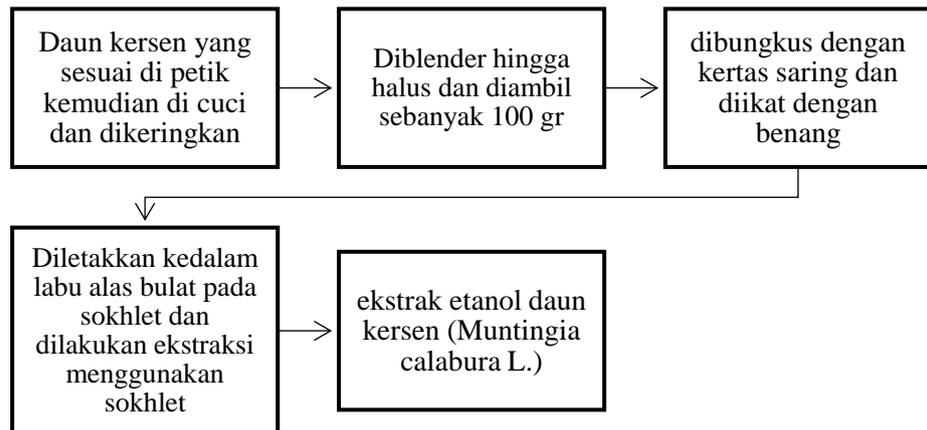
$$\text{KTT (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standart}} \times \text{konsentrasi standart (200mg/dl)}$$

Prinsip dari reaksi CHOD-PAP adalah sebagai berikut :



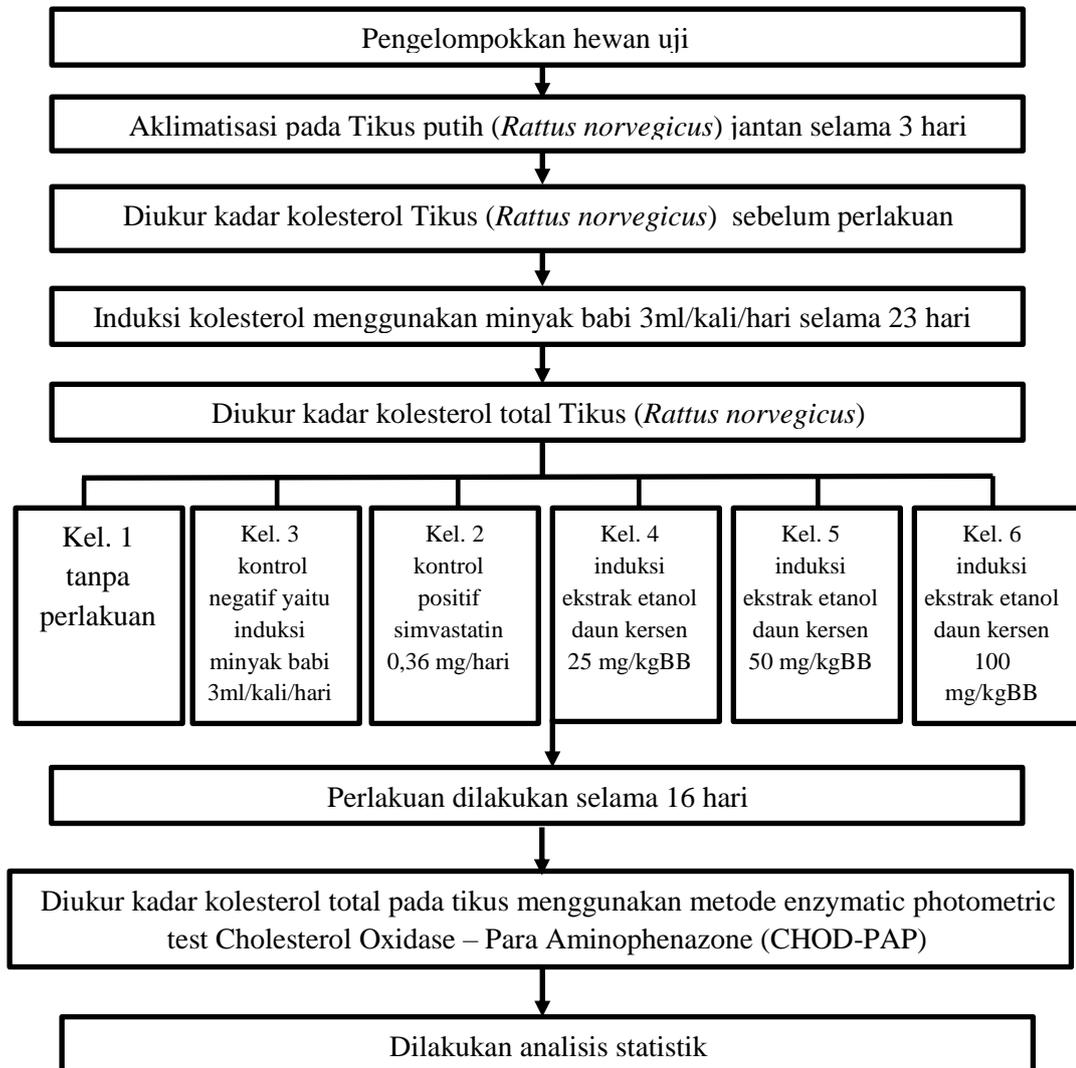
F. Skema Langkah Kerja

1. Pengolahan dan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)



Gambar 3. Skema Pengolahan dan Pembuatan Ekstrak

2. Skema Langkah Kerja Penelitian



Gambar 4. Skema Langkah Kerja Penelitian

G. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji statistik SPSS dengan seperangkat komputer. Uji normalitas data menggunakan metode *Shapiro Wilk*. Data Uji kadar kolesterol total sebelum dan setelah terapi menggunakan metode *Paired Sample T-test*. Untuk membandingkan antar kelompok, data diuji dengan metode *Kruskal Wallis*.