

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *pre post-test controlled group design* yang menggunakan hewan coba sebagai subyek penelitian.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 hingga bulan Mei 2019.

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan berumur 3-4 bulan, sehat, aktif dan tidak cacat dengan berat badan awal \pm 300 gram.

Subjek diambil secara acak dan dibagi menjadi 6 kelompok. Banyaknya sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana (t) merupakan banyaknya kelompok perlakuan dan (n) merupakan jumlah sampel per kelompok perlakuan.

Berikut perhitungannya:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Banyaknya tikus putih yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 4 ekor tiap kelompok. Ada 6 kelompok perlakuan, sehingga total tikus yang digunakan berjumlah 24 ekor.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Dosis ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) : dosis I yaitu 25 mg/KgBB, dosis II yaitu 50 mg/KgBB, dan dosis III yaitu 100 mg/KgBB.

2. Variabel tergantung

Kadar trigliserida darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* jantan yang berumur 3-4 bulan dengan berat 300 gram, jenis makanan, tempat pemeliharaan, waktu pemeliharaan. Semua varian tersebut dikendalikan dalam keadaan yang sama, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) di laboratorium teknologi farmasi FKIK UMY dengan metode sokletasi. Penyari yang digunakan etanol 96%. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan diatas *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental etanol.

2. Kadar Trigliserida

Penelitian ini mengukur kadar trigliserida dengan satuan mg/dL pada darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diambil \pm 1 ml melalui vena orbitalis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian : kandang tikus percobaan, timbangan digital, seperangkat alat sokletasi, rotary evaporator, oven, blender, ayakan mesh 40, pengaduk, kain flanel, kertas saring, tabung Erlenmeyer 500 ml, corong, wadah toples, sonde, sentrifuge, tabung reaksi, cawan porselin, wadah penyimpanan ekstrak,.
2. Bahan : ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.), minyak babi, pakan tikus, akuades, etanol 96%, Gemfibrozil, kit trigliserid.

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak

Daun kersen dicuci dengan air bersih mengalir kemudian ditiriskan lalu dikeringkan dengan panas matahari sampai kering. Daun kersen yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara diblender, diayak dengan menggunakan ayakan. Alat sokletasi dipasang, kemudian serbuk daun kersen 100 gram dibungkus dengan kertas saring, diikat dengan benang, dimasukkan kedalam labu alas bulat pada soklet. Sokletasi dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan di atas *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental etanol.

2. Pembuatan suspensi Gemfibrozil

Dosis yang akan diberikan pada tikus adalah 1,6 mg/KgBB. Sehingga jika berat tikus yang digunakan ± 300 gram maka diperlukan gemfibrozil 0,48 mg untuk tiap tikus. Larutan ini dibuat dengan cara menimbang Gemfibrozil sebanyak 12 mg kemudian disuspensikan dengan dalam larutan Na-CMC 1% sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml kemudian volumenya dicukupkan sampai 25 ml sehingga didapatkan konsentrasi 0,48 mg/ml.

3. Pengelompokan hewan uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 24 ekor tikus putih yang terbagi menjadi 6 kelompok. Kelompok 2- 6 (kecuali kelompok 1) diinduksi dengan minyak babi.

- a. Kelompok I : kontrol tanpa perlakuan, diberi pakan.
- b. Kelompok II : kontrol negatif : diberi minyak babi
- c. Kelompok III : kontrol positif : Gemfibrozil 1,6 mg/KgBB
- d. Kelompok IV : diberi minyak babi dan ekstrak *Muntingia calabura* dosis 25 mg/KgBB
- e. Kelompok V : diberi minyak babi dan ekstrak *Muntingia calabura* dosis 50 mg/KgBB
- f. Kelompok VI : diberi minyak babi dan ekstrak *Muntingia calabura* dosis 100 mg/KgBB

4. Induksi hiperlipidemia

Tikus kelompok kontrol positif, kontrol negatif dan *Muntingia calabura* diinduksi dengan cara diberi minyak babi sebanyak 3 ml per hari selama 23 hari.

5. Uji efek ekstrak daun kersen

Tikus yang sudah diinduksi dengan minyak babi dan sudah dinyatakan hipertrigliserid, diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Ekstrak *Muntingia calabura* diberikan secara oral menggunakan sonde tumpul. Terapi diberikan setiap hari selama 16 hari. Pada hari ke-17 setelah pemberian perlakuan berbeda, semua hewan coba diambil darahnya dan diukur kadar trigliseridanya menggunakan metode GPO-PAP.

6. Pengujian kadar trigliserida

Pertama darah tikus diambil sebanyak 1 ml. Selanjutnya darah tersebut ditampung dalam tabung sentrifugasi dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Setelah serum didapat, diambil sebanyak 10 μ L. Selanjutnya menyiapkan larutan blanko dan larutan standar dengan pembuatan seperti pada tabel

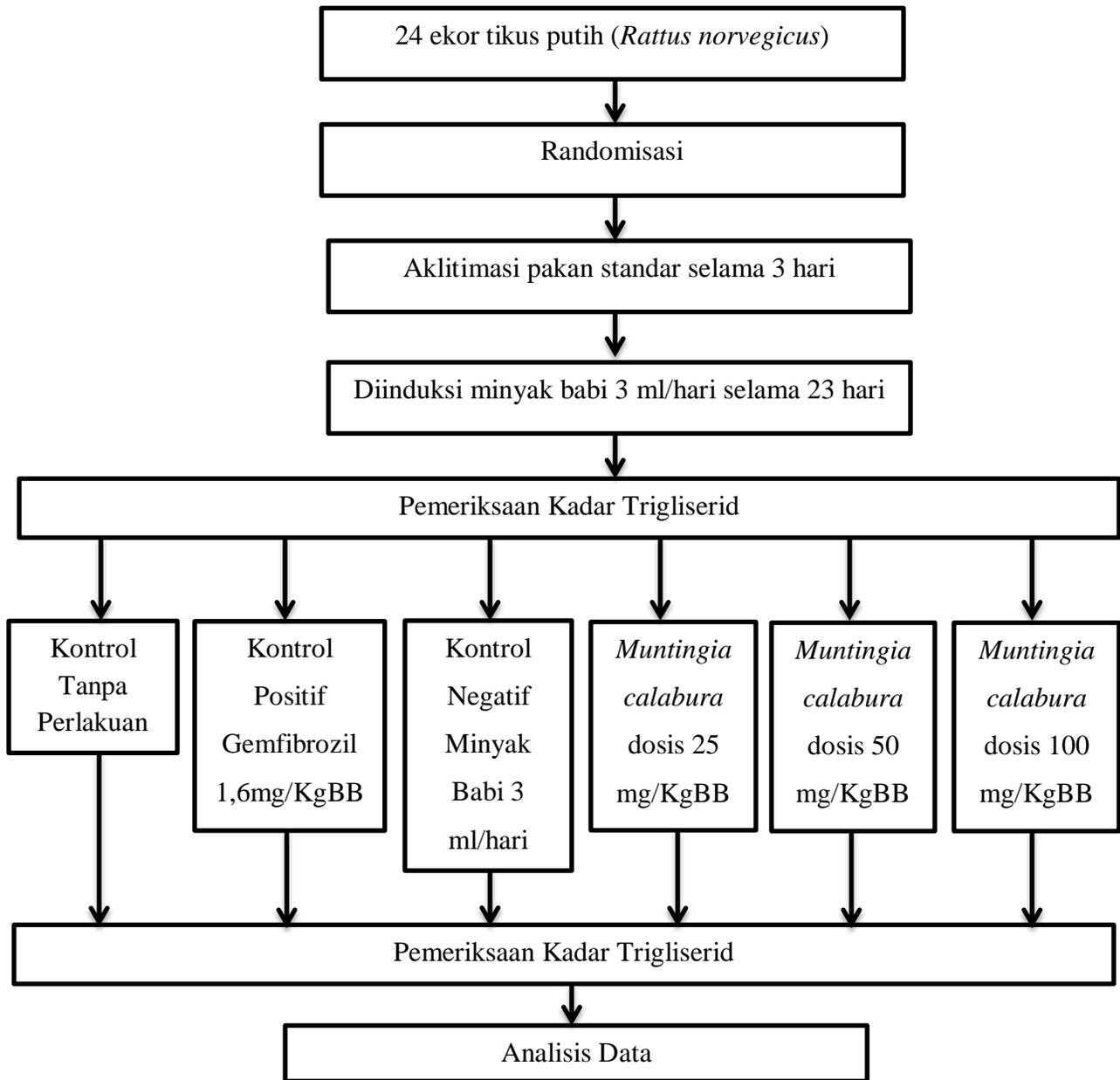
Tabel 1. Pengujian Kadar Trigliserida

	Blangko	Standar	Sampel
	Reagen (μl)	(μl)	(μl)
Aquadest	10	-	-
Standar	-	10	-
Serum	-	-	10
Reagen	1000	1000	1000

Kemudian sampel didiamkan selama 20 menit. Hal ini dimaksudkan agar didapatkan hasil yang optimal dimana reagen dan sampel bereaksi optimal karena reaksi yang terjadi merupakan reaksi enzimatik yang berjalan lambat.

Setelah itu dilakukan pengukuran aktivitas serum dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 546 nm. Pada panjang gelombang inilah diharapkan hasil yang didapat daya absorbansinya optimal. Pada saat menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, kuvet yang akan digunakan harus dicuci bersih agar tidak ada kontaminan.

H. Rancangan Penelitian



I. Analisis Data

Analisis kadar trigliserida dalam darah dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas digunakan *Levene test*. Kemudian dilakukan uji *one way Anova*. Uji Anova adalah uji untuk membandingkan perbedaan rata-rata lebih dari dua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji *paired T test* untuk mengetahui penurunan kadar trigliserid tiap kelompok.