

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan hewan uji menggunakan rancangan penelitian *Pre Test and Post Test Randomized Controlled Group Design*.

B. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas (PAU) dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) selama kurang lebih 6 bulan (Maret-Agustus 2011).

C. SAMPEL PENELITIAN

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *sprague dawley* jantan yang berumur 2 bulan, berat badan antara 200-250 gram serta sehat dilihat dari agresifitas gerakannya.

Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Besarnya sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus federe, dimana banyaknya kelompok perlakuan dilambangkan dengan t dan jumlah perlakuan dilambangkan dengan n . Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) > 15$$

$$(5-1)(n-1) > 15$$

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75 \quad (n = 5)$$

Dari perhitungan besar sampel di atas, maka besarnya sampel tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus putih (Supranto, 2000).

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah biji buah rambutan (*Nephelium lapaaceum*) dengan berbagai dosis.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar trigliserida dalam darah masing-masing sampel.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali atau kontrol pada penelitian ini adalah tikus putih berumur 2 bulan, dengan berat badan 200- 250 gram, jenis makanan, tempat, dan waktu pemeliharaan dengan keseluruhan dari varian tersebut harus dikendalikan dalam keadaan yang sama, baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan.

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) yang digunakan pada penelitian ini adalah biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) yang diperoleh dari kebun warga di Semarang. Biji buah rambutan dihaluskan dan dilarutkan dalam 2 ml akuades.
2. Trigliserida adalah lemak netral yang berasal dari makanan yang terdiri dari 3 molekul asam lemak yang teresterifikasi sebagai simpanan dan untuk transportasi. Trigliserida akan disimpan di dalam jaringan adiposa yang akan melepaskan asam-asam lemak didalam darah (Dorland, 2008).
3. Pakan atau ransum tinggi kolesterol adalah campuran dari pakan tikus dan minyak tinggi kolesterol. Minyak tinggi kolesterol sebanyak 10% dari ransum (2 miligram) yang digunakan untuk menginduksi hewan uji agar mengalami hiperlipidemia.
4. Hewan uji coba adalah 25 ekor tikus putih jantan berumur 2 bulan dengan berat badan 200-250 gram diperoleh dari kandang LPPT UGM.
5. Simvastatin adalah obat antikolesterol untuk mengurangi kadar trigliserida dalam darah, yang diperoleh dari apotek di daerah Yogyakarta.

F. INSTRUMEN PENELITIAN

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 5 buah kandang tikus putih, atap dan penutup kandang, tempat minum dan tempat pakan tikus putih, sonde, sarung tangan, timbangan, 25 buah endorff, pipet mikrohematokrit,

sentrifugator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pencatat waktu, label, dan spektrofotometer, *blender*, gelas ukur, batang pengaduk, vortex.

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain darah tikus putih, obat simvastatin, biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*), ransum tinggi kolesterol, air minum tikus, reagen presipitan trigliserida, dan akuades.

G. CARA KERJA

Tahap- tahap yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi :

1. Persiapan alat dan bahan penelitian

2. Pelaksanaan penelitian

a. Pengelompokan objek penelitian

Dua puluh lima ekor tikus putih (*Rattus norvergicus*) galur *Sprague Dawley* sebagai hewan uji dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, masing- masing 5 ekor. Lima kelompok tersebut sebagai berikut :

- (1) Kelompok kontrol negatif, tikus hiperlipidemia yang hanya diberi air putih,
- (2) Kelompok kontrol positif, tikus hiperlipidemia yang diberi obat simvastatin,
- (3) Kelompok perlakuan I, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis I,
- (4) Kelompok perlakuan II, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis II,
- (5) Kelompok perlakuan III, tikus hiperlipidemia yang diberi biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan dosis III.

b. Penetapan dosis biji buah rambutan dan obat simvastatin.

Biji buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) untuk tikus putih dalam penelitian ini diberikan berdasarkan hasil konversi kadar untuk manusia ke tikus putih. Satuan dosis konversi manusia dengan berat badan 70kg ke tikus putih berat badan 200gram adalah 0,018 (Ngatidjan, 1991). Hasil konversi dosis pada penelitian sebagai berikut:

- (1) Dosis obat simvastatin yaitu 10 mg/ hari untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah $10 \text{ mg} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg}$ (0,18 mg/ 200 gramBB),
 - (2) Dosis I merupakan kadar minimal yaitu 2,5 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2 gram perbiji (5 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah $5 \text{ gram} \times 0,018 = 0,09 \text{ gram}$ (90 mg/200 gramBB),
 - (3) Dosis II menggunakan dosis biji buah rambutan yang digunakan untuk menurunkan glukosa darah yaitu 5 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2 gram perbiji (10 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg (Dalimartha, 2003), sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah $10 \text{ gram} \times 0,018 = 0,18 \text{ gram}$ (180 mg/200 gramBB),
 - (4) Dosis III, merupakan kadar maksimal yaitu 10 buah biji rambutan dengan berat sekitar 2 gram perbiji (20 gram) untuk manusia dengan berat badan 70 kg, sehingga kadar untuk tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah $20 \text{ gram} \times 0,018 = 0,36 \text{ gram}$ (360 mg/ 200 gramBB),
3. Perlakuan hewan uji

- a. Kandang tikus putih dipersiapkan dalam keadaan bersih dan diberi label terlebih dahulu, satu kandang terdiri dari 5 ekor tikus, dan tikus di adaptasikan dengan lingkungan selama 3 hari,
- b. Dua puluh lima ekor tikus putih diberi tanda, ditimbang dan dicatat berat badannya, dan dibagi menjadi 5 kelompok sebagai berikut :
 - (1) Kelompok kontrol negatif hanya mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu dan air minum setiap hari,
 - (2) Kelompok kontrol positif mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 0, 18 mg/ 200 grBB/ hari obat simvastatin yang dilarutkan dengan 2 ml akuades selama 10 hari,
 - (3) Kelompok perlakuan I mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 90 mg/ 200 grBB/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml akuades selama 10 hari,
 - (4) Kelompok perlakuan II mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 180 mg/ 200 grBB/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml akuades selama 10 hari,
 - (5) Kelompok perlakuan III mendapat ransum tinggi kolesterol 20 gram/ ekor/ hari selama 1 minggu, air minum setiap hari, dan setelah tikus hiperlipidemia, tikus diberi 360 mg/ 200 grBB/ hari serbuk biji buah rambutan yang dilarutkan dengan 2 ml akuades selama 10 hari.

- c. Pakan dan air minum diganti setiap hari, selain itu sisa pakan juga ditimbang setiap hari. Perhitungan sisa pakan dilakukan dengan menjumlah sisa pakan dalam tempat pakan dan pakan yang tercecer dalam kandang,
- d. Kandang dibersihkan setiap hari agar hewan uji tetap dalam kondisi sehat,
- e. Semua tikus ditimbang dan dicatat berat badannya seminggu sekali. Penimbangan dilaksanakan saat mengganti makanan yang baru.
- f. Pemberian dosis disesuaikan dengan berat badan rata-rata untuk masing-masing kelompok tikus dan diubah sesuai dengan perubahan berat badan tikus setelah dilakukan penimbangan setiap minggu.

4. Pengamatan

Dua lima puluh ekor tikus putih diambil darahnya kemudian diperiksa kadar trigliseridanya. Ada 3 kali pemeriksaan kadar trigliseridanya yaitu sebelum 25 ekor tikus mendapatkan perlakuan apapun, setelah diinduksi ransum tinggi kolesterol selama 7 hari, dan setelah hari ke-10 perlakuan. Setiap sebelum pengambilan sampel darah, semua tikus dipuasakan dahulu selama 12 jam. Pengambilan sampel darah tikus dilakukan dengan menusukkan pipet mikrohematokrit ke bagian medial dari mata (*sinus orbitalis*) tikus. Darah yang keluar ditampung dalam ependorf. Darah tersebut kemudian diambil serumnya. Pengambilan serum dilakukan kurang lebih 30 menit sampai 1 jam setelah pengambilan darah.

Langkah-langkah pengambilan serum adalah pertama, darah disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit kemudian cairan bening bagian atas (serum) diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru yang akan menjadi sampel

yang digunakan pada tahap berikutnya. Serum tersebut diperiksa kadar trigliserida diukur menggunakan metode *enzymatic colorimetric test, Glycerol Phospatase-Oxidase* (GPO). Setelah itu, semua bahan tadi dicampurkan dengan komposisi berdasarkan tabel 4 di bawah.

Semua bahan dicampur seperti tabel 4 di bawah ini dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C atau 10 menit pada suhu 37°C. Kemudian langkah selanjutnya adalah membaca absorbansinya pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 546 nm pada suhu 20-25°C.

Tabel 4. Cara pencampuran bahan

Elemen	Tabung blanko	Tabung standard	Tabung sampel
Larutan standar	-	10 µl	-
Larutan sampel	-	-	10µl
Larutan reagen	1000µl	1000µl	1000µl

Hasil pengukuran kemudian dihitung untuk mendapatkan angka trigliserida plasma dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Trigliserida (mg/dl)} = \frac{\Delta A_{Sp}}{\Delta A_{St}} \times \text{Konsetrasi TG standar (mg/dl)}$$

Keterangan : Trigliserida = kandungan trigliserida plasma yang diukur

ΔA_{Sp} = Absorbansi sampel – absorbansi blanko

ΔA_{St} = Absorbansi standar – absorbansi blanko

Bagan diagram cara kerja bisa dilihat pada gambar 2 di bawah ini.

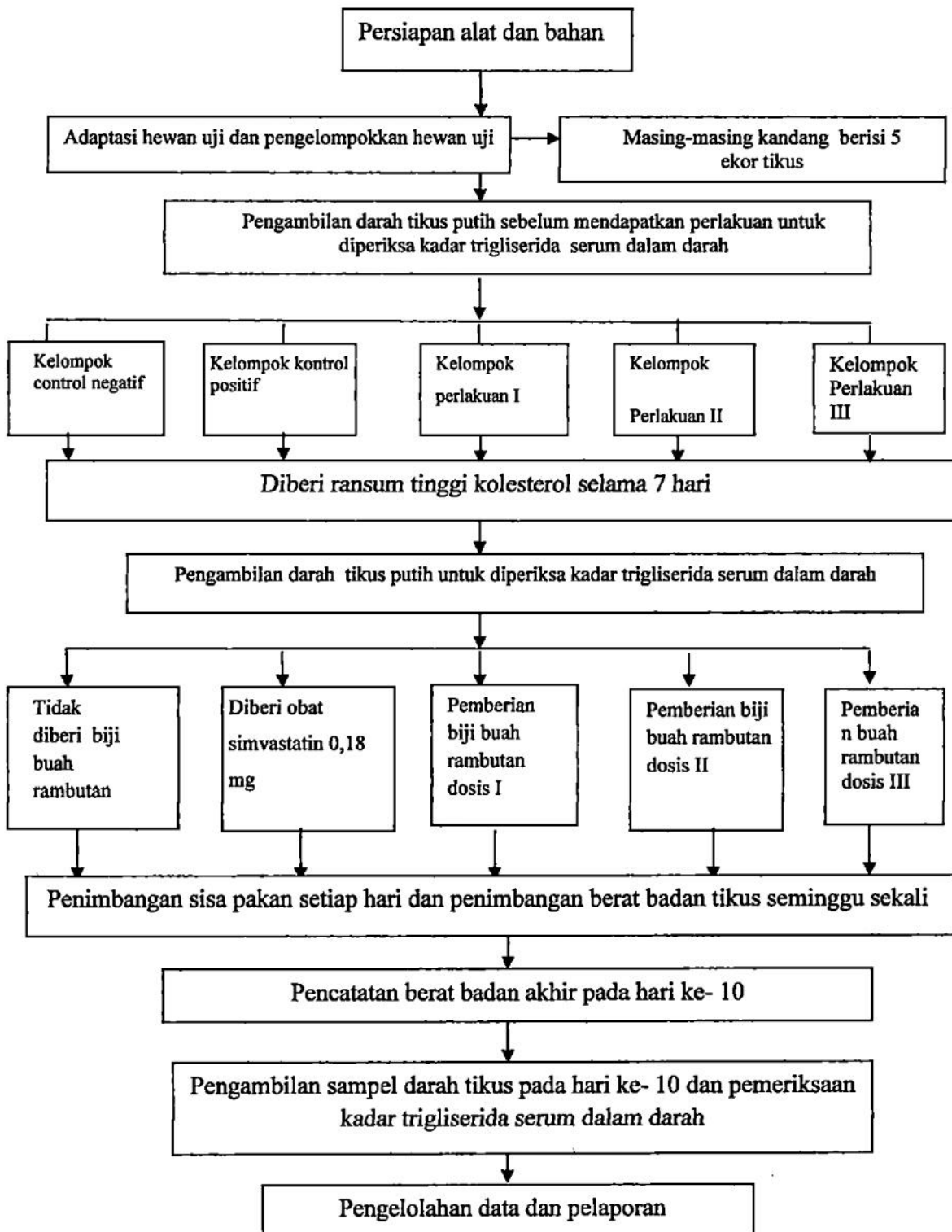
H. ANALISIS DATA

Data hasil pengukuran dianalisis menggunakan seperangkat komputer dengan uji *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *post hock- tuckey*, dengan

ketentuan jika $p < 0,05$, maka ada perbedaan yang bermakna. Data sebelum di analisis, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro- Wilk*.

Untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar trigliserida darah sebelum dan sesudah perlakuan, data hasil pengukuran dianalisis menggunakan uji *paired t- test*. Jika data tidak berdistribusi normal, dianalisis menggunakan uji *wilcoxon*.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing- masing kelompok perlakuan, data dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *post hock- tuckey* antar kelompok. Jika data tidak berdistribusi normal, dianalisis menggunakan uji *kruskal wallis* dan dilanjutkan dengan uji *post hock- tuckey*.



Gambar 2. Diagram cara kerja