

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Randomized Control Group Design.*”

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah kombinasi ekstrak krokot (*Portulaca oleracea L.*) dan ekstrak jambu biji (*Psidium guajava*)

3.2.1.2. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar trigliserid dan kadar kolesterol total pada mencit yang diberi diet otak sapi.

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Ekstrak krokot dengan satuan mg yang diperoleh dari proses ekstraksi maserasi pada simplisia krokot. Ekstrak jambu biji dengan satuan mg yang diperoleh dari proses ekstraksi maserasi pada simplisia daging, biji dan kulit jambu biji. Kombinasi ekstrak krokot dan ekstrak jambu biji ditambahkan sesuai dosis masing-masing

yang prosesnya dibuat di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Unissula. Diberikan dengan dosis ekstrak kombinasi = ekstrak krokot 390 mg/kgBB + ekstrak jambu biji 280 mg/kgBB yang diberikan 1x sehari selama 14 hari secara peroral dengan sonde yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 ml.

Skala : Nominal

3.2.2.2. Kadar trigliserid dan kolesterol total

Kadar kolesterol total plasma didapatkan dari jumlah lipid pada serum darah dalam satuan mg/dL. Kadar trigliserid didapatkan dari jumlah trigliserid pada serum darah dalam satuan mg/dL, yang keduanya diketahui dengan menggunakan metode *enzymatic colorimetric-end point* diukur pada hari ke-22 yang sebelumnya dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam. Dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unissula.

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sample

3.3.1. Populasi

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) stain Balb/c yang diperoleh dari Unit pengembangan

Hewan Percobaan Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Unissula.

3.3.2. Sampel

Besar sampel yang digunakan sebanyak 35 ekor mencit (*Mus musculus*) stain Balb/c yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 7 ekor mencit yang diambil secara random. Jumlah sampel dihitung berdasarkan ketentuan dari WHO yang menyebutkan bahwa dalam penelitian eksperimental minimal menggunakan hewan coba sebanyak 5 ekor (WHO, 2000).

3.3.3. Subjek Uji

Subjek uji dalam penelitian ini adalah mencit jantan stain Balb/c yang sehat, berumur 1,5-2,5 bulan, berat badan 20-40 gram, tidak ada kelainan anatomis dan belum pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.

3.4. Instrumen Penelitian dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

- I. Kandang mencit lengkap dengan tempat makan dan minum
- II. Timbangan analitik
- III. Sonde oral
- IV. Mikrohematokrit
- V. Cup 1 ml penampung sampel darah
- VI. Mikropipet

VII. Sentrifuge

VIII. Rak dan tabung reaksi

3.4.2. Bahan Penelitian

3.4.2.1. Hewan percobaan

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) stain Balb/c yang sesuai kriteria inklusi.

3.4.2.2. Ekstrak

Ekstrak krokot dibuat dari daun krokot yang telah dipilih dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari tetapi terlebih dahulu ditutup menggunakan kain hitam. Setelah mendapatkan sediaan simplisia kemudian diblender hingga halus dan kemudian masuk ke proses maserasi.

Proses maserasi dimulai dari menimbang serbuk krokot kemudian masukan ke dalam toples dan tambahkan etanol dan diaduk. Tutup toples dan diamkan selama 1 hari. Setelah 1 hari, larutan tadi disaring dengan kertas saring dan ditampung. Ampas dari hasil hari pertama masukan ke toples dan diberi etanol sambil diaduk. Ditutup dan diamkan selama 1 hari. Lakukan hal yang sama sampai hari ke-3. Selanjutnya masukan hasil saringan ke tabung evaporator untuk mendapatkan ekstrak krokot.

Ekstrak buah jambu biji dibuat dari jambu biji yang telah dipilih dicuci sampai bersih kemudian diiris tipis dan dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari tetapi terlebih dahulu ditutup menggunakan kain hitam. Setelah mendapatkan sediaan simplisia kemudian diblender hingga halus dan kemudian masuk ke proses maserasi.

Proses maserasi dimulai dari menimbang serbuk jambu biji kemudian masukan ke dalam toples dan tambahkan etanol dan diaduk. Tutup toples dan diamkan selama 1 hari. Setelah 1 hari, larutan tadi disaring dengan kertas saring dan ditampung. Ampas dari hasil hari pertama masukkan ke toples dan diberi etanol sambil diaduk. Ditutup dan diamkan selama 1 hari. Lakukan hal yang sama sampai hari ke-3. Selanjutnya masukan hasil saringan ke tabung evaporator untuk mendapatkan ekstrak buah jambu biji (Afifah, 2005).

3.4.2.3. Pakan standart

Pakan standart yang digunakan adalah CP-12 dalam bentuk padat. Jumlah pakan staandard untuk mencit 3-5g/ekor/hari

3.4.2.4. Pakan tinggi kolesterol

Pakan tinggi kolesterol yang terbuat dari otak sapi kukus yang dihaluskan bersama aquades dengan

perbandingan otak sapi : aquades adalah 2:1. Suspensi diberikan sebanyak 0,5ml/ekor/hari yang diberikan peroral dengan sonde.

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Persiapan Penelitian

3.5.1.1. Menentukan dosis

3.5.1.1.1. Dosis krokot yang mampu menurunkan profil lipid pada penelitian Besong dkk (2011) adalah 6000 mg. Jadi dengan faktor konversi 0,0026, di dapatkan dosis ekstrak krokot pada mencit adalah 780 mg/kgBB. Dengan perhitungan :

$$0,0026 \times 6000 \text{ mg} = 15,6 \text{ mmg}/20 \text{ g mencit}$$

$$\frac{15,6 \text{ mg}}{20 \text{ g}} \times 50 = \frac{780 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{780 \text{ mg}}{1 \text{ kg}}$$

3.5.1.1.2. Dari penelitian Chao dkk (2013), didapatkan dosis ekstrak jambu biji pada tikus 400 mg/KgBB.

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

mg/tikus 200 g.

Faktor konversi dari tikus 200 g ke mencit 20 g
= 0,14

Pada mencit 20 g : 80 mg X 0,14 = 11,2 mg/
mencit 20 g

Untuk 1 kg BB mencit: $\frac{1000 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 11,2 \text{ mg} = 560$
mg/kgBB

3.5.1.1.3. Dosis Kombinasi ekstrak krokot dan buah jambu biji pada mencit 670 mg/kgBB dengan perbandingan ekstrak krokot dan ekstrak jambu biji sebanyak 50 : 50. Dengan rincian : ekstrak jambu biji sebanyak $= \frac{50}{100} \times 560 \text{ mg/kgBB} = 280 \text{ mg/KgBB}$. ekstrak krokot sebanyak $= \frac{50}{100} \times 780 \text{ mg/kgBB} = 390 \text{ mg/KgBB}$.

- 3.5.1.2. Menyiapkan hewan coba berupa mencit stain Balb/c jantan sebanyak 35 ekor
- 3.5.1.3. Menyiapkan kandang mencit lengkap dengan tempat pakan dan minumnya
- 3.5.1.4. Menyiapkan timbangan hewan dan timbangann analitik
- 3.5.1.5. Menyiapkan pakan standart CP-12
- 3.5.1.6. Menyiapkan sespensi otak sapi untuk menginduksi mencit
- 3.5.1.7. Menyiapkan ekstrak krokot, ekstrak jambu biji, dan ekstrak kombinasi krokot dan jambu biji untuk perlakuan sesuai dengan dosis yang dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1ml/ekor/hari.

- 3.5.1.8. Menyiapkan alat dan bahan untuk mengambil dan menampung darah.

3.5.2. Pelaksanaan Penelitian

- 3.5.2.1. Menimbang berat badan mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c.
- 3.5.2.2. Membagi mencit secara random menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit.
- 3.5.2.3. Menempatkan mencit pada kandang yang telah disediakan sesuai dengan kelompok masing-masing.
- 3.5.2.4. Memberikan pakan standart sebanyak 3-5g/ekor/hari dan minuman air mineral secara ad libitum selama 7 hari untuk penyesuaian.
- 3.5.2.5. Memberikan perlakuan sesuai dengan alur kerja penelitian disertai pemberian induksi otak sapi sebanyak 0,5 ml/ekor/hari dan minuman air mineral secara ad libitum.
- 3.5.2.6. Perlakuan diberikan selama 14 hari, dimana setelah perlakuan mencit dipuasakan selama 12 jam sebelum dilakukan pengambilan darah.
- 3.5.2.7. Pengambilan darah dan pemisahan serum untuk mendapatkan hasil post test.

3.5.3. Pengambilan Darah dan Pemisahan Serum

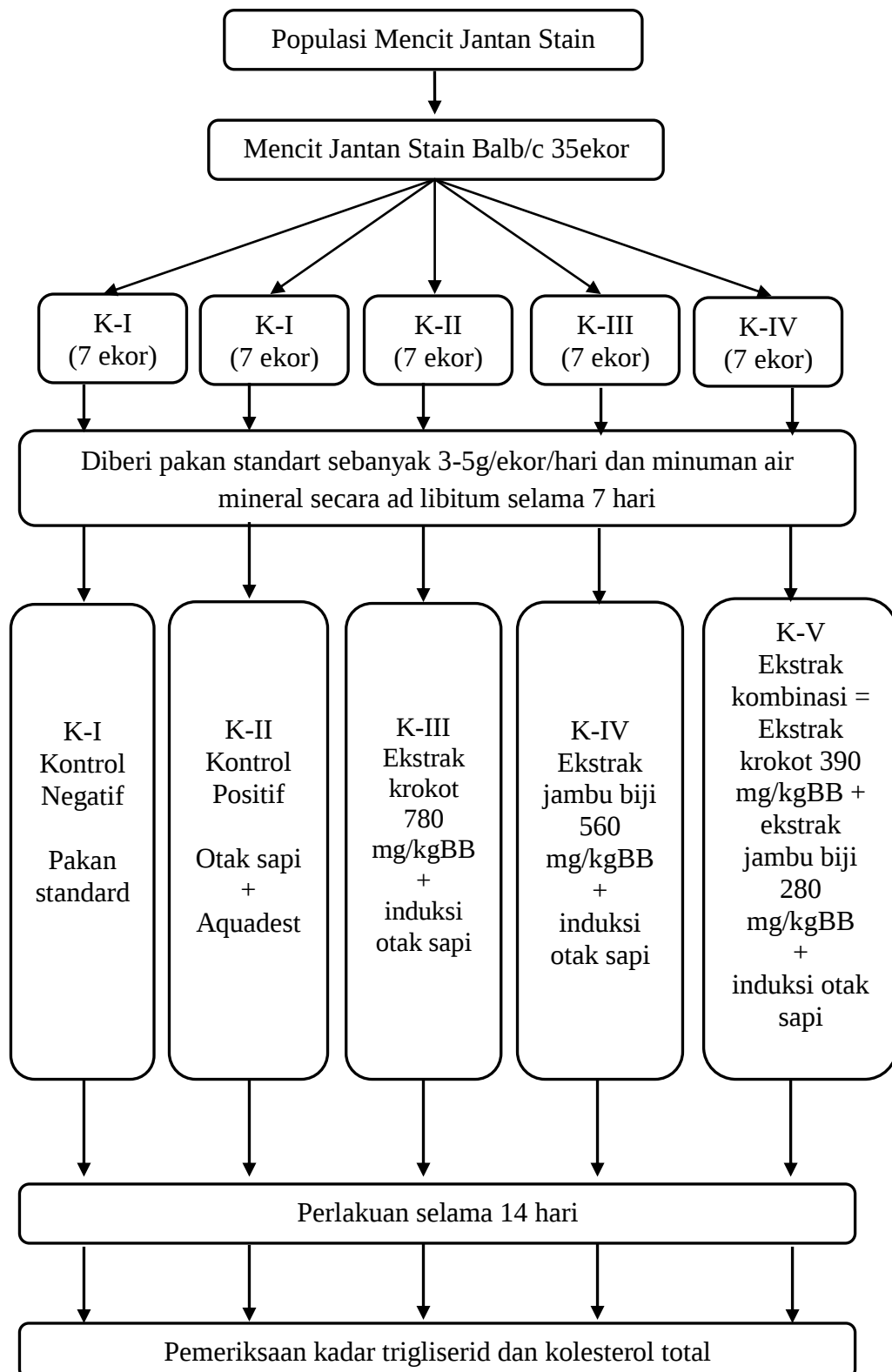
- 3.5.3.1. Mikropipet dan tabung penampung darah heparin diambil.

- 3.5.3.2. Mikropipet dimasukan perlahan-lahan pada vena optikus yang ada di sudut mata.
- 3.5.3.3. Mikropipet diputar perlahan-lahan hingga keluar darah.
- 3.5.3.4. Darah yang keluar ditampung pada krayo tube sebanyak 1 cc.
- 3.5.3.5. Setelah volume darah yang diperoleh dianggap cukup, cabut mikropipet dan bersihkan sisa darah yang terdapat di dekat mata dengan kapas steril
- 3.5.3.6. Darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge.
- 3.5.3.7. Ambil serum darah yang telah disentrifuge kemudian darah diperiksa.

3.5.4. Pemeriksaan kadar Triglisericid dan Kolesterol Total

Pengukuran kadar triglisericid dan kolesterol total ditentukan dengan metode *enzymatic colorimetric-end point* pada hari ke 15 dengan satuan mg/dL.

3.6. Alur Penelitian



3.7. Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1. Tempat Penelitian

Pemeliharaan, penelitian dan perlakuan hewan coba dilakukan di Unit pengembangan Hewan Percobaan Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Unissula. Pemeriksaan kadar kolesterol total dan trigliserid dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unissula.

3.7.2. Waktu Penelitian

Pelaksanaan dilakukan selama 21 hari. Pemeriksaan kadar kolesterol total dan trigliserid dilakukan pada hari ke 22 setelah diberikan perlakuan. Penelitian dilaksanakan pada tanggal 9 – 30 November 2015.

3.8. Analisa Hasil

Data dari hasil pengukuran kadar trigliserid dan kolesterol total masing-masing kelompok setelah perlakuan diedit, dicoding, dan ditabulasi. Analisis diskriptif disajikan dalam bentuk tabel. Data 25 sampel diuji normalitasnya dengan *Shapiro-wilk test* dan diuji homogenitasnya dengan *levene statistic*. Data kolesterol total menunjukkan terdistribusi normal ($p > 0,05$) tetapi tidak homogen ($p < 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Data trigliserid menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), kemudian dilakukan analisa uji *One-Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar

kelompok dan didapatkan hasil yang bermakna ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang berbeda. (Dahlan, 2011). Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan *SPSS 22.0 for windows*.