III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November – Desember 2013.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi menurut Notoadmodjo (2012) adalah keseluruhan objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* berumur 3–4 bulan yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor.

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, sesuai dengan rumus Frederer, (Supranto, 2007).

Rumus Frederer :

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

Keterangan :

n = besar sampel tiap perlakuan

t = banyaknya perlakuan

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

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

$$4\,(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4{,}75$$

$$n \approx 5$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus dari populasi yang ada.

Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi dengan:

$$N = n/(1-f)$$

Keterangan:

N = Besar sampel koreksi

n = Besar sampel awal

f = Perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

Sehingga,

$$N = n/(1-f)$$

$$N = 5/(1-10\%)$$

$$N = 5/(1-0{,}1)$$

$$N = 5/0{,}9$$

$$N = 5{,}55$$

$$N = 6$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor. Oleh karena itu, penelitian kali ini menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif. Kelompok yang kedua adalah kelompok kontrol positif. Kelompok yang ketiga, keempat, dan kelima adalah kelompok perlakuan.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

a. Sehat.

b. Memiliki berat badan antara 200–250 gram.

c. Jenis kelamin jantan.

d. Berusia sekitar ± 3–4 bulan.

2. Kriteria Eksklusi

a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus atau genital).

b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

a. Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah:

1) Timbangan elektronik AND, untuk menimbang berat tikus.
2) Sonde lambung, untuk mencekoki ekstrak biji jengkol
3) Glukometer dan Glukotest strip, untuk mengukur kadar gula darah.
4) Spuit 1cc, untuk mengambil darah tikus.
5) *Handschoen*, kapas dan alkohol.
6) Kandang hewan, tempat pakan hewan dan tempat minum hewan.

b. Alat pembuat ekstrak etanol biji jengkol

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol biji jengkol adalah:

1) Neraca digital / *micro analytical balance*, dengan ketelitian 0,001 mg untuk menimbang biji jengkol.
2) Mortar dan stamper, untuk menumbuk dan menghaluskan biji jengkol.
3) Termometer
4) Mikropipet
5) Panci penangas, untuk merebus ekstrak.
6) *Hot plate.*
7) *Baker glass*.
8) Kertas saring, untuk menyaring ekstrak.

9) Corong *buchner* untuk menyaring hasil maserasi.

10) *Rotary evaporator* untuk memekatkan ekstrak.

2. Bahan penelitian

a. Hewan coba berupa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley berasal dari IPB Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Mendapat pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

b. Ekstrak etanol 96% biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.).

c. Aloksan monohidrat

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.)

Bahan baku biji jengkol tua yang masih segar dikumpulkan, dibuang bagian yang tidak diperlukan (sortasi basah), dicuci bersih di bawah air mengalir, dan ditiriskan. Biji jengkol selanjutnya dirajang kecil-kecil dan dikeringkan di bawah matahari hingga kering, dibuang benda-benda asing atau pengotoran-pengotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia kering (sortasi kering), kemudian ditimbang berat keringnya dan diblender hingga agak halus dan disimpan dalam wadah plastik yang tertutup rapat. Pembuatan ekstrak etanol biji jengkol dilakukan dengan metode perkolasi. Caranya 500 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan etanol 96% selama 3 jam. Selanjutnya dipindahkan massa tersebut sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, tambahkan etanol 96% secukupnya hingga simplisia

terendam dan terdapat cairan penyari di atasnya, perkolator ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian kran perkolator dibuka dan dibiarkan cairan ekstrak menetes dengan kecepatan 1 ml per menit dan ditambahkan etanol 96% berulang-ulang secukupnya dengan meletakkan corong pisah di atas perkolator dan diatur kecepatan penetesan cairan penyari sama dengan kecepatan tetesan perkolat,sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Perkolasi dihentikan jika 500 mg perkolat yang keluar terakhir diuapkan, tidak meninggalkan sisa. Perkolat kemudian disuling dan diuapkan dengan tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari 50°C menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dipekatkan dengan bantuan alat *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 97 gram (Depkes, 1986).

2. Prosedur Penelitian

a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 grup. Grup pertama adalah kontrol negatif (-) dimana grup ini hanya akan diberi makanan dan tidak diberi aloksan secara intraperitoneal. Grup kedua adalah kontol positif (+) dimana grup ini akan mendapatkan perlakuan berupa pemberian aloksan secara intraperitoneal. Berdasarkan penelitian Elysa pada tahun 2011 menyatakan bahwa dosis 600 mg/kgbb ektrak etanol biji jengkol merupakan dosis efektif menurunkan kadar glukosa darah. Grup ketiga adalah grup dengan pemberian aloksan intraperitoneal dan pemberian dosis I (600 mg/kgbb) ekstrak etanol biji jengkol. Grup keempat adalah grup dengan pemberian aloksan intraperitoneal dan pemberian dosis II (900 mg/kgbb) ekstrak etanol biji jengkol. Grup

kelima adalah grup dengan pemberian aloksan intraperitoneal dan pemberian dosis III (1.200 mg/kgbb) ekstrak etanol biji jengkol. Kemudian tikus akan ditaruh di laboratorium selama satu minggu sebagai adaptasi.

b. Memeriksa kadar glukosa darah puasa tikus sebelum perlakuan menggunakan glukometer. Tikus dipuasakan selama 8-12 jam. Pengambilan darah dilakukan melalui ekor tikus.
c. Setelah kadar glukosa darah tikus-tikus dinyatakan normal maka dilanjutkan dengan penginduksian aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kgbb secara intraperitoneal. Setelah diinduksi tikus tetap diberikan makanan dan minuman *ad libitum* selama 3 hari. Kemudian dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah puasa kembali. Tikus dianggap diabetes apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl (Triplitt, dkk., 2008) dan tikus diabetes tersebut telah dapat digunakan untuk pengujian.
d. Melakukan pemberian ekstrak etanol biji jengkol selama 14 hari, satu kali setiap hari. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.
e. Melakukan pemeriksaan kadar LDL darah tikus setelah 14 hari perlakuan.

G. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. Tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempat terpisah dengan tikus lainnya

kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain, pemindahan, penanganan, gangguan antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institusional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan mati, darah di ambil melalui jantung dengan menggunakan alat suntik sebanyak ±2 cc, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer (Red Top).*

H. Penentuan Kadar LDL

Pada penelitian ini dilakukan penentuan kadar LDL darah tikus dengan menggunakan metode pengukuran LDL secara tidak langsung (*indirectly measured*). Konsentrasi kolesterol LDL dihitung dari kadar kolesterol total, HDL, dan trigliserida menurut rumus Friedewald (1972):

LDL = Kolesterol Total – HDL – Trigliserida/5 mg/dl

LDL = Kolesterol Total – HDL – Trigliserida/2.2 mmol/l

Diasumsikan bahwa Trigliserida/5 merupakan kadar VLDL.

Rumus Friedewald ini memiliki keterbatasan yaitu sebelum pemeriksaan subjek yang akan diperiksa dipuasakan selama 12-14 jam terlebih dahulu. Selain itu, rumus ini tidak berlaku bila kadar trigliserida >400 mg/dl, terdapat dislipoproteinemia, kelainan tipe I/III (Frederickson *et al*., 1972).

Apabila tidak dapat dilakukan pemeriksaan kadar LDL dengan menggukan rumus Friedewald tidak dapat dilakukan, maka menggunakan metoda pemeriksaan LDL secara tidak langsung, yaitu metoda *hemogenous* dengan alat spetrofotometer. Adapun prinsip pemeriksaannya adalah sebagai berikut:

HDL, VLDL, CM—$^{\text{detergen 1}}\rightarrow$ *Micellary* Kolesterol —$^{\text{kol. esterase dan kol. perolsidase}}\rightarrow H_2O_2$

H_2O_2 + 4 aminoantipirin —$^{\text{peroksidase}}\rightarrow$ *colousless product*

LDL –$^{\text{detergen 1}}\rightarrow$ LDL

LDL –$^{\text{detergen 2}}\rightarrow$ Micellary Kolesterol —$^{\text{kol.l esterase dan kol. peroksidase}}\rightarrow$ H_2O_2

H_2O_2 + 4 aminoantipirin + DSBmT —$^{\text{kol.l esterase dan kol. peroksidase}}\rightarrow$ colour product

Warna yang dihasilkan adalah biru. Intensitas warna, menunjukkan kadar kolesterol LDL. Pemeriksaan ini dipengaruhi oleh bilirubin 20 mg/dl, hemoglobin 500 mg/dl, dan trigliserida 1500 mg/dl. Diukur dengan panjang gelombang 550 nm.

Pada peneltian ini, pemeriksaan menggunakan rumus Friedewald sehingga terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan kolesterol total, trigliserida, dan kolesterol HDL. Adapun cara pemeriksaan dari ketiganya, adalah sebagai berikut:

1. Pengukuran kadar kolesterol total

Penukuran kadar kolesterol total ini menggunakan alat ukur spektofotometer, dengan metoda CHOD-PAP yang merupakan tes warna enzimatik. Adapun prinsip pada metoda pemeriksaan CHOD-PAP adalah sebagai berikut:

Kolesterol Ester + H_2O—$^{Kol.esterase}\rightarrow$ Kolesterol + Asam lemak

Kolesterol + O_2 – $^{Kol.\ oksidase}\rightarrow$ 4-kolestone-3-one + H_2O_2

$2H_2O_2$ + 4-aminophenozone + phenol – $^{peroksidase}\rightarrow$ 4-(p-benzoquinone-monoimino)- phenazone + $4H_2O_2$

Pada proses pengukuran ini darah yang diperoleh didiamkan selama 10-15 menit kemudian di sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Kemudian serum yang dihasilkan dari proses sentrifus diambil menggunakan mikropipet dan diletakan di tabung.

Prosedur analisis yaitu sampel atau standar diambil sebanyak 10 µl dan dicampurkan dengan 1000 µl pereaksi kit (mengandung kolesterol esterase, kolesterol oksidase, fenol, 4-aminoantipyrine, peroksidase dan bufer) kemudian dimasukkan ke dalam tabung lalu dicampurkan sampai

homogen. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

Tabel 1. Prosedur pencampuran reagen kolesterol total

	Blanko	**Standar/ control**	**Sampel**
Reagen kerja	1000µl	1000µl	1000µl
Standar	--------	10µl	--------
Serum	--------	---------	10µl

2. Pengukuran kadar trigeliserida

Trigliserida ditentukan setelah hidrolisis enzimatis dengan lipase.

Trigliserida + H_2O - $\xrightarrow{\text{lipase}}$ gliserol + asam lemak

Gliserol + ATP - $\xrightarrow{\text{gliserol kinase}}$ gliserol-3-fosfat + ADP

Gliserol-3-fosfat + O_2 - $\xrightarrow{\text{gliserol-3-fosfat oksidase}}$ dihidroksiaseton fosfat + H_2O_2

$2H_2O_2$ + 4-aminofenazon + 4 klorofenol - $\xrightarrow{\text{peroksidase}}$ quinoneimine + HCl + 4 H_2O

Darah sebanyak 2 ml kemudian didiamkan 10 menit kemudian di*sentrifuge* menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serumnya. Sampel atau standar diambil sebanyak 10 µl dan dicampurkan dengan 1000 µl pereaksi kit, kemudian dimasukkan ke dalam tabung lalu dicampurkan sampal homogen.

Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

Tabel 2. Prosedur pencampuran reagen trigliserida

	Blanko	**Standar/ control**	**Sampel**
Reagen kerja	1000µl	1000µl	1000µl
Standar	--------	10µl	--------
Serum	--------	---------	10µl

3. Pengukuran kadar HDL

Pada proses pengukuran ini darah yang diperoleh didiamkan selama 10-15 menit, kemudian di sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Kemudian serum yang dihasilkan dari proses sentrifus diambil menggunakan mikropipet dan diletakan di tabung.

Pengukuran HDL dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan presipitasi terhadap lipoprotein densitas rendah (LDL dan VLDL) dan kilomikron. Presipitasi dilakukan dengan penambahan asam fosfotungstat dan kehadiran ion magnesium ($MgCl_2$). Setelah sentrifugasi, HDL dalam supernatan diukur menggunakan pereaksi kit yang sama dengan pengukuran total kolesterol (CHOD-PAP).

Tabel 3. Prosedur pencampuran reagen HDL

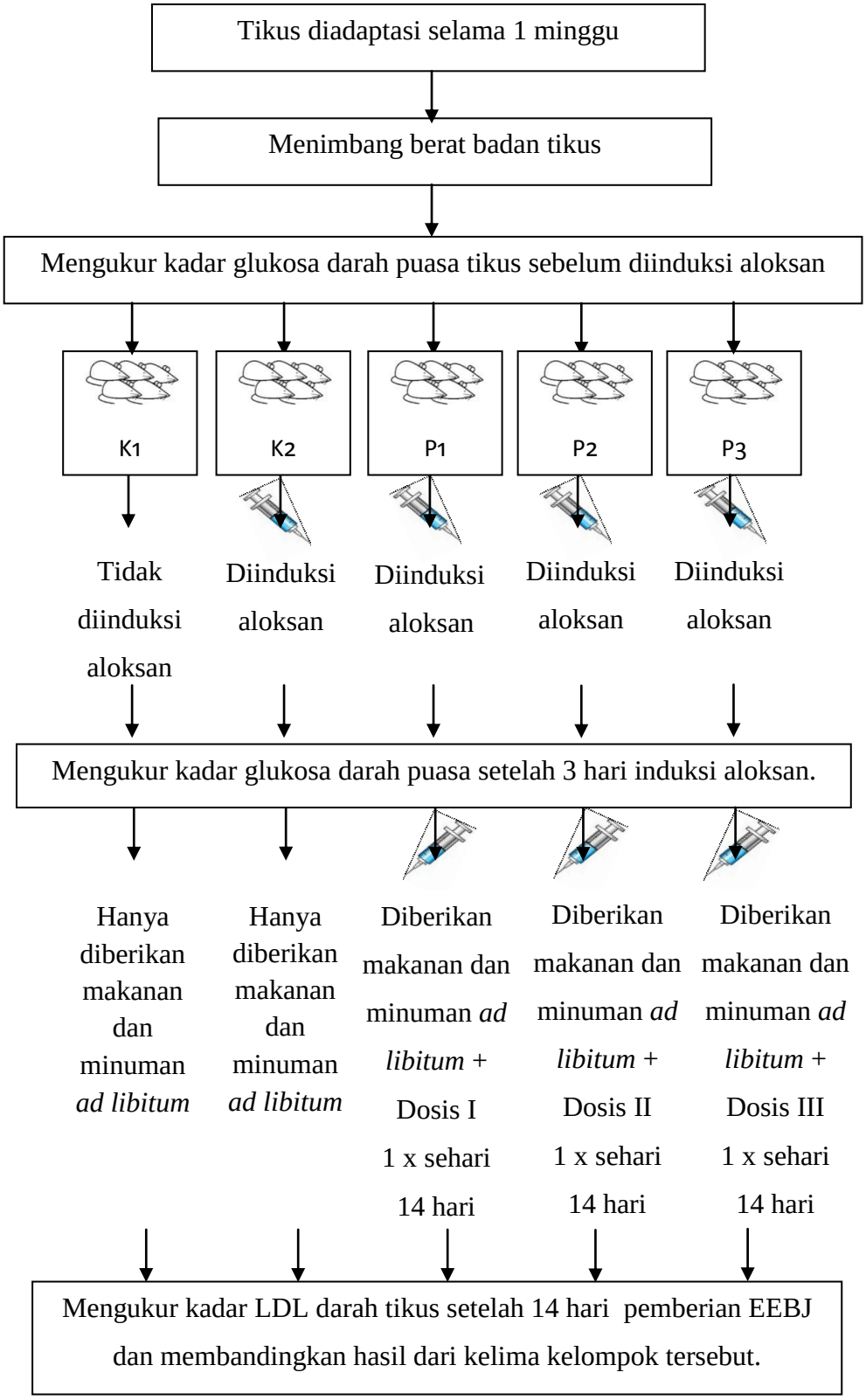
	Standar/ kontrol	**Sampel**
Reagen HDL	200µl	200µl
Standar	100µl	----------
Serum	----------	100µl

Prosedur presipitasi adalah sebanyak 100 µl serum darah dicampurkan dengan 200 µl, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit, dihasilkan supernatan yang siap untuk dianalisis sama seperti analisis total kolesterol di atas.

Serum sebanyak 100 µl ditambah 200 µl reagen presipitan dicampur baik-baik, kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit sehingga menghasilkan filtrat. Filtrat didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit, dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

Tabel 4. Prosedur pencampuran reagen HDL dengan presipitan

	Blanko	**Standar/ control**	**Sampel**
Reagen kerja	1000µl	1000µl	1000µl
Standar	--------	50µl	--------
Serum	--------	---------	50µl



Gambar 7. Ilustrasi prosedur penelitian

I. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas *(Independent Variable)*

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.).

b. Variabel Terikat *(Dependent Variable)*

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar LDL dalam darah tikus (mg/dl).

2. Defenisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Jenis Variabel
Ektrak etanol biji jengkol	Ekstrak Biji Jengkol diberikan pada tikus berupa suspensi dengan dosis I 600 mg/kg bb dosis II 900 mg/kg bb dosis III dan 1.200 mg/kg bb.	Timbangan	mg/kgbb	Numerik
Kadar LDL	Kadar LDL dalam darah tikus yang diukur setelah 14 hari pemberian ekstrak biji jengkol.	Menggunakan rumus	mg/dl	Numerik

J. Analisis Data

Analisis data penelitian diproses dengan program pengolahan data dengan tingkat signifkansi p = 0,05. Langkah pertama adalah dengan melakukan uji normalitas data yaitu dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Selanjutnya didapatkan hasil p > 0,05 maka distribusi data normal. Setelah itu dapat digunakan uji parametrik *one way* ANOVA. Tetapi, jika distribusi data tidak normal (hasilnya p < 0,05) maka digunakan uji alternatif yaitu uji Kruskal-Wallis. Jika didapatkan perbedaan signifikan pada *one way* ANOVA (p < 0,05), maka dapat dilanjutkan uji lanjutan *Post Hoc Test* dengan *Least Significant Difference* (LSD) antar kelompok untuk mengetahui secara spesifik perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol serta antar kelompok perlakuan. Sehingga didapatkan kelompok perlakuan mana yang mempunyai efek menurunkan LDL paling baik.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu (n-1) (t-1) ≥ 15, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.

    a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

    b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 2-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.

    c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).