

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test 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. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat badan 200-250 gram, berumur 2 - 3 bulan yang dibagi menjadi 5 grup untuk digunakan sebagai penelitian.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Oktober sampai November 2013.

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* dengan berat badan 200-250 gram, berumur 2 - 3 bulan yang diperoleh berasal dari IPB (Institut Pertanian Bogor).

2. Sampel Penelitian

Sampel menurut Notoadmodjo (2012) adalah sebagian yang diambil dari keseluruhan objek yang diteliti dan dianggap memiliki seluruh populasi. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

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

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ($n \geq 4,75$) 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 6 ekor. Oleh karena itu, penelitian kali ini menggunakan 30 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 2 – 3 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 Ekstraksi 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 penetesannya 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 aquades secara subkutan. Grup kedua adalah kontrol positif dimana grup ini akan mendapatkan perlakuan berupa pemberian aloksan secara subkutan dosis 120 mg/kg bb. Grup ketiga adalah grup dengan pemberian dosis I ekstrak biji jengkol dengan pemberian aloksan subkutan. Grup keempat adalah grup dengan pemberian dosis II ekstrak biji jengkol, dan diberikan pula aloksan subkutan. Grup kelima adalah grup dengan pemberian dosis III ekstrak biji

- jengkol dan diberikan pula aloksan subkutan. Kemudian tikus akan ditempatkan di laboratorium selama satu minggu untuk di adaptasikan
- b. Pemberian aloksan monohidrat secara subkutan. Setelah diinduksi tikus tetap diberikan makanan dan minuman *ad libitum*, tunggu dalam 48-72 jam, dan ukur kadar glukosa darahnya. Tikus dianggap diabetes apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl (Triplitt, dkk., 2008) telah dapat digunakan untuk pengujian. Selanjutnya disebut sebagai tikus diabetes.
 - c. Memuaskan mencit selama 8-12 jam, kemudian ukur kadar glukosa darah tikus.
 - d. Mencekoki tikus dengan ekstrak biji jengkol selama 14 hari, satu kali setiap hari.
 - e. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.
 - f. Mengukur kadar kolesterol total setelah 14 hari.

3. 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 *Institutional 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)*.

- Cara Pengambilan Serum

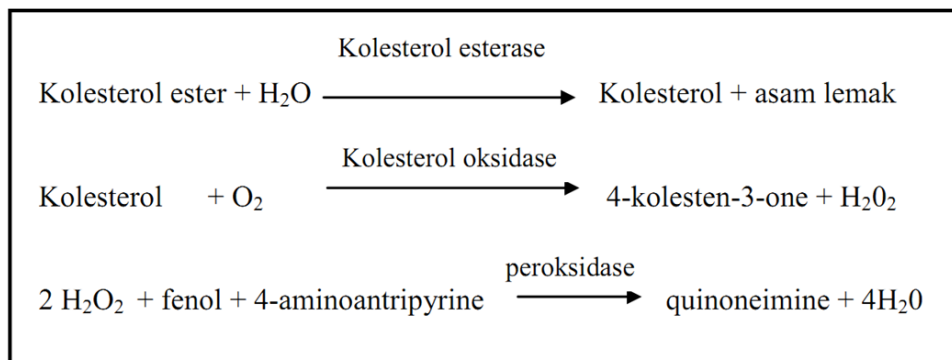
Darah yang sudah berhasil didapatkan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian dipusingkan selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel-sel darah dengan menggunakan pipet.

4. Prosedur Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total

Pemeriksaan kadar kolesterol total menggunakan metode CHOD-PAP. Metode ini menggunakan prinsip oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Serum yang sudah diperoleh direaksikan dengan reagen kolesterol. Kolesterol ester pada lipoprotein dipecah oleh enzim kolesterol esterase menjadi kolesterol dan asam lemak. Kolesterol kemudian mengalami oksidasi dengan enzim kolesterol oksidase sebagai katalis menghasilkan senyawa peroksida yang direaksikan bersamafenol dan 4-aminoantripyrine menghasilkan senyawa

quinoneimine yang berwarna merah dan dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Gambar 2. Reaksi yang terjadi pada pemeriksaan kadar kolesterol

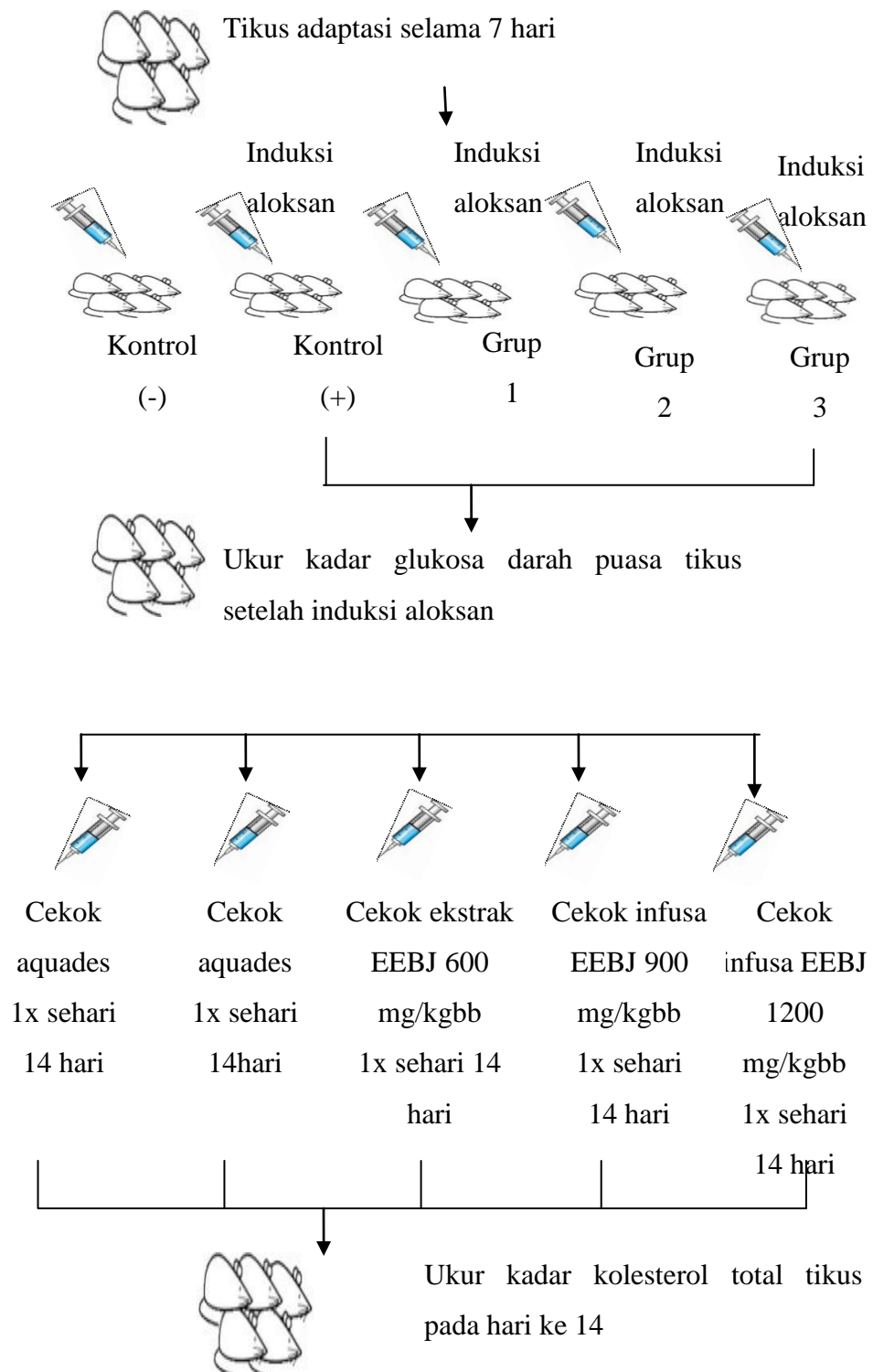
Penghitungan kadar kolesterol digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar kolesterol (mg/dl)} = (\text{A sampel} / \text{A standar}) \times 200 \text{ mg/dl}$$

Keterangan :

A = absorbansi

200 = standar kolesterol murni 200 mg/dl (5,2 mmol/l)



Gambar 3. Ilustrasi prosedur penelitian

Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

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

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol total dalam darah tikus.

2. Defenisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala	Jenis Variabel
Dosis	Ekstrak Etanol Biji Jengkol (EEBJ)	mg/kgbb	Numerik
Ekstrak Etanol Biji Jengkol	diberikan pada tikus berupa suspensi dengan dosis 600mg/ kgBB (dosis I), 900 mg/kgBB (dosis II) dan 1200 mg/kg BB(dosis III).		
Kadar Kolesterol Total	Kadar kolesterol total yang sebelumnya telah dipuaskan 8 – 12 jam, dengan cara tidak diberikan makan namun tetap diberikan minum <i>ad libitum</i> .	mg/dl	Numerik

G. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan meliputi :

a. Analisis Univariat

Analisis univariat digunakan presentasi, hasil dari setiap variabel ditampilkan dalam bentuk distribusi frekuensi, sehingga dapat mengetahui karakteristik atau gambaran dari setiap variabel (Notoatmodjo, 2012).

b. Analisis Bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk mencari hubungan dan membuktikan hipotesis dua variabel (Notoatmodjo, 2012). Uji statistik yang digunakan adalah *oneway* ANOVA, dengan derajat kemaknaan (taraf signifikansi) yang dipakai adalah $\{\alpha = 0,05\}$, sehingga bila $p < \alpha$ maka hasil perhitungan statistik bermakna dan bila $p > \alpha$ maka hasil perhitungan statistik tidak bermakna.

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