

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan ini merupakan suatu penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan setelah akhir penelitian sesudah 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**

Penelitian ini dilakukan pada bulan November sampai Desember 2013 selama 24 hari. Perawatan dan perlakuan sampel bertempat di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## C. Populasi dan Sampel

### 1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* berumur 3-4 bulan dengan berat badan 200-250 gram, yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB) .

### 2. Sampel Penelitian

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

Rumus Frederer :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel setiap kelompok dan t = jumlah kelompok perlakuan.

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

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

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

$$n \geq 1 + 15 / 4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Jadi sampel yang akan 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 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 kedalam 5 kelompok.

## **D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

### **1. Kriteria Inklusi**

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley.
- b. Sehat (Aktif bergerak).
- c. Memiliki berat badan antara 200-250 gram.
- d. Berusia sekitar 3-4 bulan.

### **2. Kriteria Eksklusi**

- a. Terlihat sakit pada masa adaptasi (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.
- c. Mati selama pemberian perlakuan.

## **E. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat penelitian**

- a. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:
  - 1) Kandang tikus.
  - 2) Botol minum untuk tikus.
  - 3) Timbangan analitik, untuk menimbang berat tikus.
  - 4) Glukometer dan strip Glukotest untuk mengukur kadar gula darah.
  - 5) Sonde lambung, untuk pemberian ekstrak etnol biji jengkol.

- 6) *Vacutainer red top*, untuk menyimpan darah tikus.
- 7) *Hemmatocrit tube*, untuk mengambil darah tikus dari jantung.
- 8) *Handschoen*, kapas dan alkohol.
- 9) Tabung reaksi.

b. Alat pembuat ekstrak

Alat yang digunakan 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) *Rotary Evaporator*, untuk memekatkan ekstrak.
- 10) Corong *Buchner*, untuk menyaring hasil maserasi.

## 2. Bahan penelitian

- a. Hewan coba berupa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berasal dari IPB 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.)**

- a. Cara pembuatan ekstrak etanol biji jengkol

Biji jengkol yang digunakan pada penelitian ini adalah biji jengkol tua yang masih segar (kulit dan bijinya masi dapat digunakan) dan dikumpulkan, pada bagian yang tidak diperlukan dapat dibuang (sortasi basah), dicuci bersih dan ditiriskan. Untuk mempermudah ekstrasi maka biji jengkol selanjutnya dirajang kecil-kecil dan dikeringkan di bawah matahari hingga kering, untuk benda-benda asing atau pengotoran-pengotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia kering (sortasi kering) dapat dibuang, agar menjadi halus, maka diblender dan disimpan ditempat yang bersih. Serbuk biji jengkol (simplisia) ditimbang dengan seksama dan selanjutnya dilakukan ekstraksi (Candra, 2012). Metode perkolasi adalah metode untuk pembuatan ekstrak etanol biji jengkol. Perkolasi adalah penarikan memakai alat yang disebut perkolator dimana simplisia terendam dalam cairan penyari, zat-zat akan terlarut dan larutan tersebut akan menetes secara beraturan (Syamsuni, 2006). Serbuk simplisia direndam dengan etanol 96%, selanjutnya dipindahkan tersebut sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, campurkan etanol 96% secukupnya hingga simplisia terendam dan terdapat cairan penyari di atasnya, perkolator ditutup dengan alumunium 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 dan secukupnya dan diatur kecepatan penetesannya cairan penyari sama dengan kecepatan tetesan perkolat, sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Perkolasi dihentikan jika 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 (Depkes, 2000).

## 2. Prosedur Penelitian

- a. Sebelum penelitian berlangsung 25 ekor tikus diadaptasikan dahulu selama 7 hari dengan diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum*. Kemudian tikus sebanyak 25 ekor, dibagi menjadi 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Grup-1 adalah kontrol negatif (-) dimana tidak diberikan aloksan. Grup ke-2 adalah kontrol positif (+) dimana grup ini diberikan aloksan secara intraperitoneal. Berdasarkan penelitian (ellysa, 2011) bahwa dosis 600 mg/kgbb ekstrak etanol biji jengkol merupakan dosis efektif menurunkan kadar glukosa darah. Grup ke-3 adalah grup I dengan pemberian dosis I (600mg/kg bb) ekstrak etanol biji jengkol dengan pemberian aloksan intraperitoneal selama 14 hari. Grup ke-4 adalah grup dengan pemberian dosis II (900mg/kgbb) ekstrak etanol biji jengkol dan diberikan aloksan intraperitoneal selama 14 hari. Grup ke-

5 adalah grup dengan pemberian dosis III (1200mg/kgbb) ekstrak etanol biji jengkol dan diberikan aloksan 150 mg/kgbb secara intraperitoneal selama 14 hari.

- b. Mengukur kadar glukosa darah puasa tikus sebelum perlakuan.
- c. Pemberian aloksan monohidrat secara intraperitoneal. Setelah diinduksi dan tikus tetap diberikan makanan dan minuman *ad libitum*, tunggu dalam 3 hari, dan ukur kadar glukosa darahnya. Tikus dianggap diabetes apabila kadar glukosa darah  $\geq 200$  mg/dl (Triplitt *et al.*, 2008) dan telah dapat digunakan untuk pengujian. Selanjutnya disebut sebagai tikus diabetes.
- d. Tikus dipuasakan selama 12 jam, kemudian mengukur kadar glukosa darah tikus.
- e. tikus diberikan ekstrak etanol biji jengkol selama 14 hari, satu kali setiap hari dan tetap tikus diberikan makan *ad libitum*.
- f. Mengukur kadar HDL darah tikus setelah 14 hari pemberian ekstrak etanol biji jengkol.
- g. Pada akhir hari ke-14 sampel dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam dan pengambilan sampel darah dilakukan, Tikus dikeluarkan dari kandang untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara intraperitoneal, kemudian tikus di *euthanasia* 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 spuit sebanyak  $\pm 2$  cc untuk pemeriksaan kadar HDL, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer red top*.

#### h. Pengukuran kadar HDL

Pada penelitian ini untuk mendapatkan hasil kadar HDL dilakukan dengan dengan metode ezimatik CHOD-PAP. Sampel darah yang sudah didapat dimasukan kedalam tabung *vacutainer* dan didiamkan terlebih dahulu selama 10-15 menit. Kemudian di sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Serum yang dihasilkan dari proses sentrifus diletakan di tabung dan dicampurkan :

**Tabel 2.** Cara pengukuran kadar HDL prosedur 1

	<b>Standar/ kontrol</b>	<b>Sampel</b>
<b>Reagen HDL</b>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<b>Standar</b>	100 $\mu$ l	-----
<b>Serum</b>	-----	100 $\mu$ l

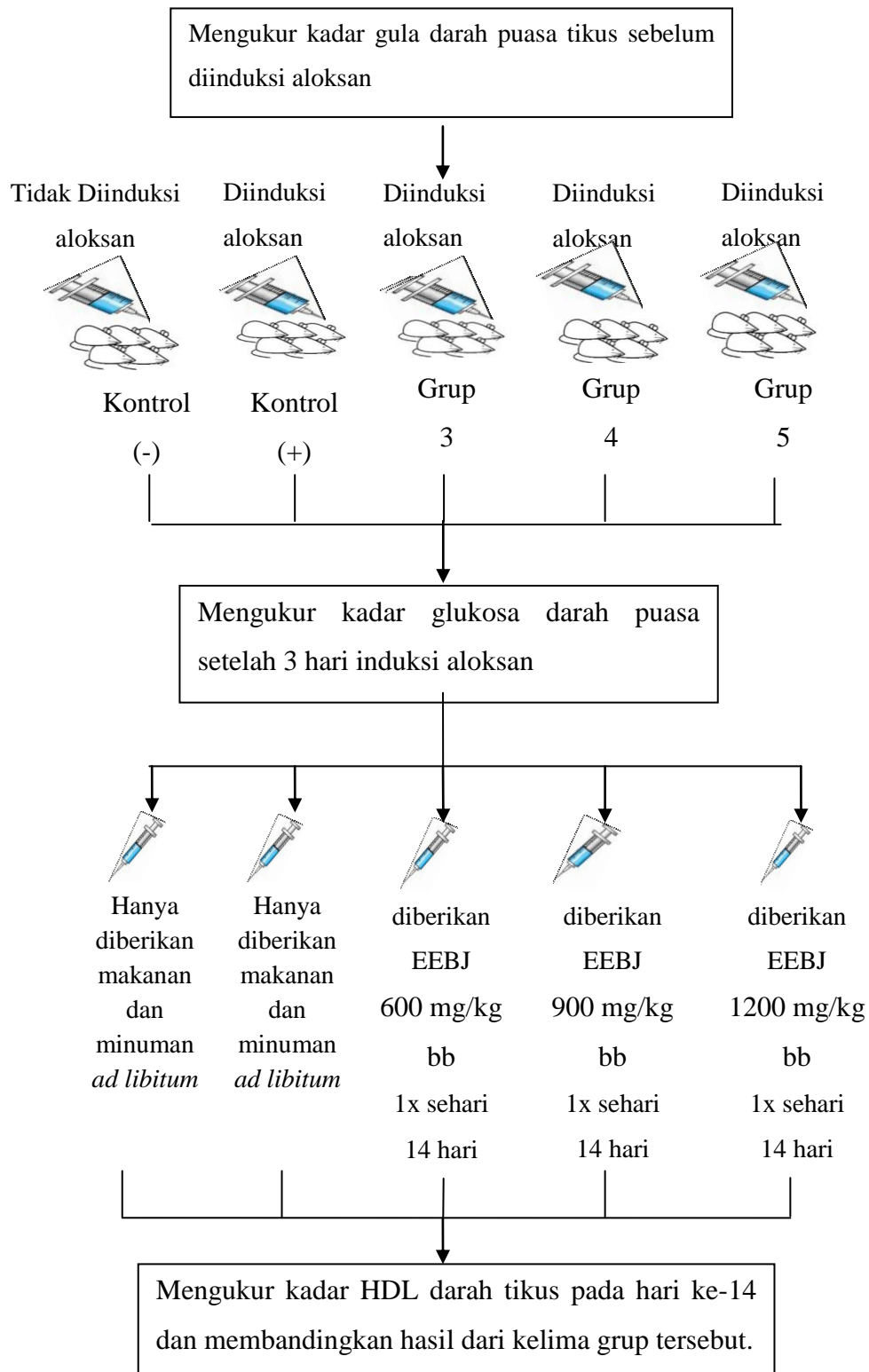
Dicampurkan 100  $\mu$ l ditambah 200  $\mu$ l reagen presipitan dimasukkan ke dalam sentrifuge, mencampurnya baik-baik, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Filtrat dipakai untuk

pemeriksaan kadar kolesterol-HDL. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran menggunakan alat Spektrofotometer :

**Tabel 3.** Cara pengukuran kadar HDL prosedur 2

	<b>Blanko</b>	<b>Standar/ control</b>	<b>Sampel</b>
<b>Reagen kerja</b>	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
<b>Standar</b>	-----	50 $\mu$ l	-----
<b>Serum</b>	-----	-----	50 $\mu$ l

## i. Alur Prosedur Penelitian



**Gambar 6.** Ilustrasi prosedur penelitian.

## G. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

### 1. Identifikasi

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

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

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar HDL dalam darah tikus.

### 2. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 4.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Jenis Variabel
Ekstrak Etanol biji jengkol	Ekstrak Etanol Biji Jengkol (EEBJ) diberikan pada tikus berupa suspensi dengan dosis 600 mg/kg bb (dosis I), 900 mg/kg bb (dosis II), dan 1.200 mg/kg bb (dosis III).	Timbangan	mg/kgbb	Numerik
Kadar HDL	Kadar HDL darah tikus putih jantan galur <i>Sprague Dawley</i> yang diukur setelah 14 hari pemberian EEBJ	Metode enzimatik CHODPAP	mg/dl	Numerik

## H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diuji analisis statistik menggunakan program SPSS versi 22.0 Analisis data penelitian diproses dengan program pengolahan data dengan tingkat signifikansi  $p=0.05$ . Data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Analisis data menggunakan uji parameteik *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan ketiga kelompok perlakuan dengan syarat data berdistribusi normal dan homogen ( $p>0,01$ ). Tetapi, jika distribusi data tidak normal (hasilnya  $p<0.05$ ) maka digunakan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis* dan hasilnya bermakna dan untuk mengetahui perbedaan kelompok yang bermakna dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

## I. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah untuk memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, sesuai pengalaman terdahulu maupun literatur yang ada untuk menjadi bahan pertimbangan penelitian, sehingga 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.
3. *Refinement*, adalah cara memperlakukan hewan percobaan secara dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam kondisi tidak nyaman.
  - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
  - b. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba. Pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 2-4 ekor tiap kandang.
  - c. Bebas dari nyeri dan penyakit, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan sonde lambung dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel darah kadar HDL pada akhir penelitian 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).