

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam bidang keilmuan biokimia dan farmakologi.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

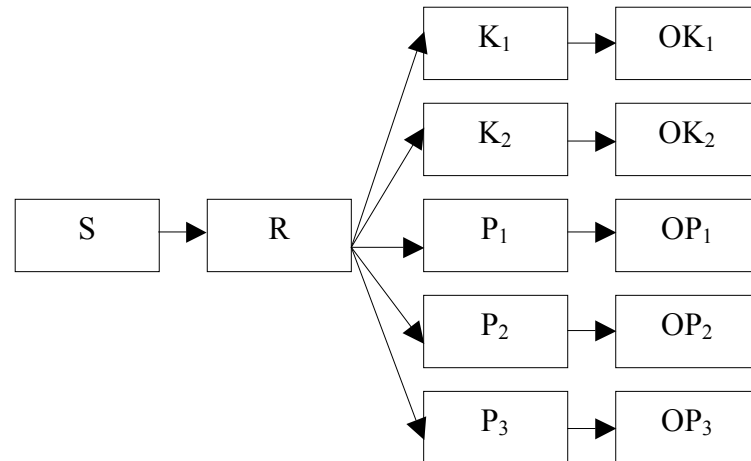
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu - Layanan Penelitian Praklinik dan Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta mulai dari pemeliharaan hewan coba, perlakuan/intervensi penelitian, sampai dengan pengambilan data. Waktu yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 8 minggu, dimulai pada bulan April sampai Juni 2014.

#### **4.3 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan *true experimental* dengan rancangan *Post-test Only Control Group Design*. Subyek penelitian adalah tikus *Sprague dawley* jantan. Dalam penelitian ini digunakan lima kelompok hewan coba yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif mendapat diet standar, kelompok kontrol positif mendapat diet tinggi lemak, dan kelompok perlakuan mendapat diet tinggi lemak, ekstrak kulit buah manggis, dan atau simvastatin. Lama intervensi untuk kelompok kontrol adalah 4 minggu sedangkan kelompok

perlakuan adalah 8 minggu. Waktu tersebut diluar masa adaptasi selama 1 minggu.

Tabel 4. Desain penelitian



Keterangan :

S : Tikus jantan *Sprague dawley*

R : Randomisasi sederhana

K<sub>1</sub> : Kelompok kontrol negatif yang mendapat diet standar

K<sub>2</sub> : Kelompok kontrol positif yang mendapat diet tinggi lemak

P<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan 1 yang mendapat diet tinggi lemak dan ekstrak kulit buah manggis

P<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan 2 yang mendapat diet tinggi lemak dan simvastatin

P<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan 3 yang mendapat diet tinggi lemak, ekstrak kulit buah manggis, dan simvastatin

OK<sub>1</sub> : Kadar trigliserid serum kelompok kontrol negatif

OK<sub>2</sub> : Kadar trigliserid serum kelompok kontrol positif

- OP<sub>1</sub> : Kadar trigliserid serum kelompok perlakuan 1
- OP<sub>2</sub> : Kadar trigliserid serum kelompok perlakuan 2
- OP<sub>3</sub> : Kadar trigliserid serum kelompok perlakuan 3

#### 4.4 Populasi dan Sampel

##### 4.4.1 Populasi

Populasi yang diteliti dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* jantan.

##### 4.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague dawley* jantan yang diperoleh dari LPPT-LP3HP Universitas Gadjah Mada dan telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus *Sprague dawley* jantan dipilih karena minimal pengaruh hormonal terutama hormon estrogen yang dapat mempengaruhi kadar profil lipid serum.

Kriteria inklusi dan eksklusi dijabarkan sebagai berikut :

##### 4.4.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus normal
- Berat badan tikus 100-175 gram
- Usia tikus 8 minggu sebelum adaptasi
- Tikus terlihat sehat dan tidak cacat fisik
- Tikus aktif bergerak

#### 4.4.2.2 Kriteria Ekslusi

- Tikus terlihat sakit dan tidak aktif bergerak
- Tikus tidak mau makan dan minum yang disediakan
- Tikus mengalami diare dengan melihat peningkatan kuantitas dan keenceran feses
- Tikus mati selama penelitian

#### 4.4.3 Jumlah Sampel dan Cara Pengambilan Sampel

Menurut kriteria *World Health Organization* (WHO), jumlah sampel minimal tiap kelompok hewan coba adalah 5 ekor. Dalam penelitian ini digunakan 7 ekor tikus tiap kelompok hewan coba yaitu 5 ekor tikus sebagai jumlah minimal ditambah 2 ekor tikus sebagai cadangan, sehingga didapatkan jumlah total 35 ekor tikus dari 5 kelompok hewan coba. Untuk cara pengambilan sampel dilakukan dengan metode randomisasi sederhana (*simple random sampling*).

### 4.5 Variabel Penelitian

#### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar pemberian ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dan kadar pemberian simvastatin.

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar trigliserid serum tikus *Sprague dawley* jantan.

#### 4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi	Unit	Skala
1.	Ekstrak kulit buah manggis	Kapsul yang berisi ekstrak kulit buah manggis dibuka dan kemudian dikeluarkan isinya serta ditimbang dengan timbangan mikro sebesar 400 mg/kgBB.	mg/kgBB	nominal
2.	Simvastatin	Tablet simvastatin generik dihancurkan menggunakan mortir dan stamper kemudian ditimbang dengan timbangan mikro sebesar 0,18 mg/200gBB.	mg/gBB	nominal
3.	Diet tinggi lemak	Pakan standar AD II <i>comfeed</i> sebesar 90% dengan komposisi bahan pada Lampiran 1 ditambah lemak sebesar 10%. Lemak yang digunakan adalah minyak babi dan kuning telur ayam dengan perbandingan 1 : 2. Pakan campuran ini diberikan sebanyak 20 gram per hari secara <i>ad libitum</i> ditambah dengan minum air putih.	gram	nominal

Tabel 6. Definisi operasional (Lanjutan)

No.	Variabel	Definisi	Unit	Skala
4.	Diet standar	Pakan standar AD II <i>comfeed</i> dengan komposisi bahan pada Lampiran 1. Pakan ini diberikan sebanyak 20 gram per hari secara <i>ad libitum</i> ditambah dengan minum air putih.	gram	nominal
5.	Trigliserid serum	Pengukuran kadar trigliserid serum dilakukan menggunakan alat spektrofotometer dengan metode fotometrik dan enzimatik GPO-PAP. Serum yang digunakan berasal dari darah vena yang diambil pada pleksus retroorbital tikus.	mg/dl	numerik

## 4.7 Cara Pengumpulan Data

### 4.7.1 Bahan

- Tikus *Sprague dawley* jantan
- Pakan standar AD II *comfeed*
- Ekstrak kulit buah manggis
- Simvastatin
- Minyak babi
- Kuning telur ayam
- Air minum *reverse osmosis*
- Larutan carboxymethyl cellulose
- Kit reagen pemeriksaan trigliserid

- Ketamin

#### **4.7.2 Alat**

- Kandang tikus
- Timbangan tikus
- Tabung reaksi
- Sonde lambung
- Timbangan mikro
- Tabung kapiler
- Centrifuge
- Spektrofotometer Stat Fax 3300
- Cuvet
- Mikropipet
- Mortir dan stamper

#### **4.7.3 Jenis Data**

Pemeriksaan kadar trigliserid serum tikus *Sprague dawley* jantan pada penelitian ini menghasilkan data primer.

#### **4.7.4 Cara Kerja**

##### 1) Adaptasi

Setelah mendapatkan tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi (sampel), tikus-tikus tersebut kemudian dirawat dalam

kandang bersama yang cukup luas dengan dimensi panjang 41 cm, lebar 29 cm, dan tinggi 26 cm agar dapat bergerak bebas dan tidak stres serta diberikan diet standar setiap hari selama 1 minggu. Periode ini disebut masa adaptasi. Kandang diletakan dalam ruangan yang memiliki ventilasi cukup dengan temperatur berkisar antara 25-28°C dan kelembaban berkisar antara 70-75%. Penerimaan cahaya diatur 12 jam terang serta 12 jam gelap. Semua kondisi kandang dicatat dan dibersihkan secara berkala oleh petugas laboratorium.

## 2) Pengelompokan

Pada hari pertama minggu ke-2, tikus-tikus tersebut dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok hewan coba yang masing-masing terdiri dari 7 ekor tikus. Kelompok tersebut yaitu kontrol negatif ( $K_1$ ), kontrol positif ( $K_2$ ), perlakuan 1 ( $P_1$ ), perlakuan 2 ( $P_2$ ), dan perlakuan 3 ( $P_3$ ).

## 3) Perlakuan

Masing-masing kelompok yang sudah dibagi tadi mulai diberi perlakuan yang berbeda-beda yaitu :

- Kelompok  $K_1$  mendapat diet standar setiap hari selama 4 minggu



- Kelompok K<sub>2</sub> mendapat diet tinggi lemak setiap hari selama 4 minggu
- Kelompok P<sub>1</sub> mendapat diet tinggi lemak setiap hari selama 4 minggu kemudian dilanjutkan dengan diet standar ditambah ekstrak kulit buah manggis dosis 400 mg/kgBB setiap hari selama 4 minggu. Pemberian ekstrak kulit buah manggis dilakukan dengan cara dilarutkan dalam air dan disonde menuju lambung.
- Kelompok P<sub>2</sub> mendapat diet tinggi lemak setiap hari selama 4 minggu kemudian dilanjutkan dengan diet standar ditambah simvastatin dosis 0,18 mg/200gBB setiap hari selama 4 minggu. Perhitungan jumlah dosis ini berdasarkan rumus konversi :

$$\begin{aligned}\text{Dosis tikus} &= \text{dosis manusia} \times 0,018 \\ &= 10 \text{ mg/kgBB} \times 0,018 \\ &= 0,18 \text{ mg/200gBB}\end{aligned}$$

Pemberian simvastatin dilakukan dengan cara dilarutkan dalam air dan disonde menuju lambung.

- Kelompok P<sub>3</sub> mendapat diet tinggi lemak setiap hari selama 4 minggu kemudian dilanjutkan dengan diet standar ditambah ekstrak kulit buah manggis dosis 400 mg/kgBB dan simvastatin dosis 0,18 mg/200gBB setiap hari selama 4 minggu. Pemberian ekstrak kulit buah

manggis dan simvastatin dilakukan dengan cara dilarutkan dalam air dan disonde menuju lambung.

Kondisi lainnya seperti ukuran kandang, temperatur, kelembaban, pencahayaan, dan kebersihan tetap dipertahankan seperti pada masa adaptasi.

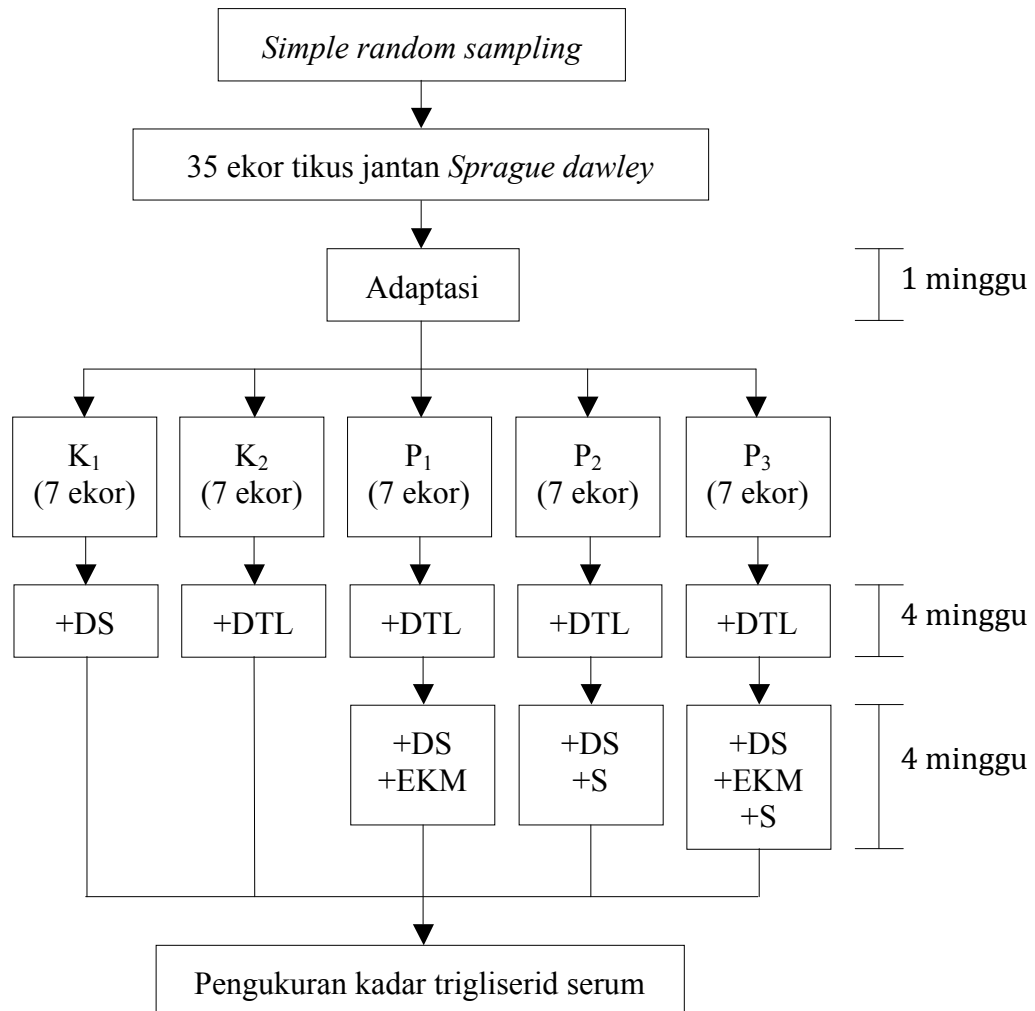
#### 4) Pengambilan Data

Pada hari pertama minggu ke-6 untuk kelompok kontrol dan minggu ke-10 untuk kelompok perlakuan, semua sampel diperiksa kondisinya dan dipilih yang masih memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel-sampel yang masih memenuhi kriteria tersebut diambil darah vena pada pleksus retroorbital untuk pemeriksaan kadar trigliserid serum. Prosedur pengambilan darah ini dijelaskan pada Lampiran 2.

Darah yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang masing-masing telah diberi tanda identitas dan kelompok sampel. Setelah itu darah tersebut disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit agar serum dan sel darah terpisah. Serum itulah yang digunakan untuk pemeriksaan kadar trigliserid melalui metode fotometrik dan enzimatik GPO-PAP. Metode ini dijelaskan pada Lampiran 3.

#### 4.8 Alur Penelitian

Tabel 7. Alur penelitian



Keterangan :

K<sub>1</sub> : Kelompok kontrol negatif

K<sub>2</sub> : Kelompok kontrol positif

P<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan 1

P<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan 2

P<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan 3

- DS : Diet standar
- DTL : Diet tinggi lemak
- EKM : Ekstrak kulit buah manggis
- S : Simvastatin

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data primer hasil pemeriksaan kadar trigliserid serum dari semua kelompok hewan coba. Data tersebut diolah dengan program komputer *IBM SPSS Statistic 21 for Windows*.

Data kadar trigliserid serum yang merupakan variabel tergantung ini memiliki skala pengukuran numerik/non-kategorikal/kuantitatif berupa rasio. Pertama-tama, data dianalisis secara deskriptif untuk mendapatkan mean, median, nilai maksimum, nilai minimum, standar deviasi, dan diagram box plot. Kemudian data tersebut diuji distribusi/normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50. Jika didapatkan distribusi data normal maka diuji dengan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok dan kemudian uji *Post Hoc (Tukey HSD)*. Jika didapatkan distribusi data abnormal maka dilakukan transformasi data supaya normal. Apabila data tetap terdistribusi abnormal maka diuji dengan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok dan kemudian uji *Mann Whitney U*. Ketentuan hasil uji tersebut adalah jika  $p \leq 0,05$  maka disimpulkan ada perbedaan yang bermakna atau jika  $p > 0,05$  maka disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna.

#### 4.10 Etika Penelitian

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

#### 4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 8. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan ke-																													
	1				2				3				4				5				6				7					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Studi teori	■																													
Proposal	■																													
Uji proposal								■																						
Persiapan								■																						
Adaptasi											■																			
Intervensi											■																			
Analisis data															■															
Lap hasil																			■											
Ujian hasil																							■							