

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang ilmu Biokimia dan Farmakologi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

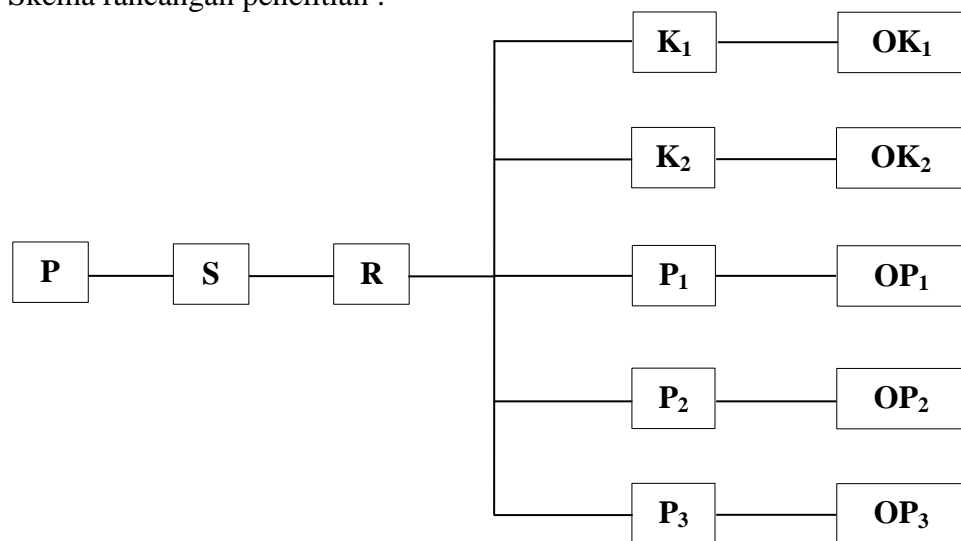
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) – Layanan Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LP3HP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Waktu yang diperlukan untuk penelitian adalah 8 minggu dan dilakukan pada bulan April – Juni 2014.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian berjenis *true experimental* dengan rancangan *Post Test Randomized Controlled Group Design*. Sampel penelitian ini menggunakan binatang coba tikus *Sprague-Dawley*. Penelitian ini menggunakan lima kelompok, satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif dan tiga kelompok eksperimental. Tiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Kelompok kontrol negatif mendapat pakan standar, kelompok kontrol positif mendapat pakan tinggi lemak dan kelompok percobaan mendapat pakan tinggi

lemak dengan ekstrak kulit manggis, pakan tinggi lemak dengan obat simvastatin, pakan tinggi lemak dengan ekstrak kulit manggis dan simvastatin. Percobaan ini dilakukan selama 8 minggu dengan masa adaptasi sebelumnya selama 1 minggu.

Skema rancangan penelitian :



Keterangan rancangan penelitian :

P : Persiapan sampel

S : Sampel setelah diadaptasi

R : Randomisasi

K₁ : Perlakuan kelompok kontrol : diet makanan standar

K₂ : Perlakuan kelompok 1 : diet makanan tinggi lemak

P₁ : Perlakuan kelompok 2 : diet makanan tinggi lemak selama 4 minggu, diet standar + ekstrak kulit manggis selama 4 minggu

- P₂ : Perlakuan kelompok 3 : diet makanan tinggi lemak selama 4 minggu, diet standar + simvastatin selama 4 minggu
- P₃ : Perlakuan kelompok 4 : diet makanan tinggi lemak selama 4 minggu , diet standar + simvastatin + ekstrak kulit manggis selama 4 minggu
- OK₁, OK₂, OP₁, OP₂, OP₃ : Pengukuran kadar kolesterol LDL setelah diberi perlakuan

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Sampel

Sample penelitian yang digunakan merupakan tikus jantan *Sprague Dawley* yang didapatkan dari LPPT – LP3HP Universitas Gadjah Mada, yang kemudian dipilih secara randomisasi dengan menggunakan kriteria-kriteria sebagai berikut:

4.4.1.1 Kriteria Inklusi

- Tikus Normal
- Berat badan 100-150 gram
- Umur 8 minggu sebelum diadaptasi
- Tikus dalam keadaan sehat dan aktif bergerak
- Tidak terdapat kelainan anatomik

4.4.1.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- Tikus mengalami diare
- Tikus tidak mau makan dan minum
- Tikus mati dalam masa penelitian

4.4.2 Cara Sampling

Sampel penelitian diperoleh secara *simple random sampling*.

4.4.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel dilakukan menurut ketentuan WHO, yakni minimal 5 ekor tikus tiap kelompok. Dalam penelitian ini tikus yang akan digunakan sebanyak 7 tikus per kelompok.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terdapat dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) dengan dosis 400 mg/ kgBB dan obat simvastatin kadar 0,18 mg/200 gr BB.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kolesterol LDL serum tikus *Sprague-Dawley* setelah pemberian ekstrak kulit manggis *Garcinia mangostana* dengan pakan tinggi lemak.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi	Unit	Skala
1	Ekstrak kulit manggis	Kulit buah manggis yang telah mengalami proses ekstraksi dikemas dalam kapsul. Kapsul ini dikeluarkan isinya kemudian dosisnya disesuaikan dan ditimbang lagi dengan timbangan mikro sebesar 400 mg/kgBB.	mg/ kgBB	nominal
2	Simvastatin	Simvastatin tablet generik dengan dosis 10 mg. Tablet ini dihancurkan dan ditimbang lagi untuk penyesuaian dosis dengan timbangan mikro menjadi 0,18 mg/200 gr BB.	mg/grBB	nominal
3	Pakan standar	Pakan comfeed yang mengandung air, protein kasar, lemak kasar, serat kasar, abu, kalsium, dan phosphor sebanyak 20 gram per harinya dan minum secara <i>ad libitum</i> (komposisi pakan pada lampiran 1)	gram	nominal

4	Pakan tinggi lemak	Pakan yang mengandung air, protein kasar, lemak kasar, serat kasar, abu, kalsium, dan phosphor ditambah dengan lemak dengan jumlah lemak 10% dari pakan standar. Lemak terdiri dari kuning telur dan minyak babi dengan perbandingan 2:1	gram	nominal
5	Kadar kolesterol LDL	Sample darah. diukur diambil di vena retro orbitalis untuk kemudian diproses dengan reaksi enzimatik dengan metode CHOD-PAP.	gram	numerik

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

- Tikus jantan Sprague Dawley sebanyak 35 ekor
- Ransum diet standar
- Ekstrak kulit manggis
- Simvastatin generik
- Minyak babi
- Kuning telur
- Aquades

- Larutan EDTA
- Kit reagen kolesterol, HDL kolesterol dan trgliserida

4.7.2 Alat

- Kandang hewan
- Timbangan hewan
- Sonde lambung dan *syringe*
- Tabung Eppendorf
- Tabung sentrifuge
- Tabung reaksi
- Spektrofotometer Stat Fx 3300
- Cuvet
- Alat sentrifuge
- Pipet kapiler
- Mortir dan stamper

4.7.3 Jenis data

Jenis data dalam penelitian ini termasuk jenis data primer.

4.7.4 Cara kerja

4.7.4.1 Aklimatisasi

Adaptasi kepada tikus diberikan dengan perawatan di kandang supaya dapat bergerak dengan bebas dan tidak stres, juga diberikan pakan standar dalam 1 minggu.

4.7.4.2 Pengelompokan

Setelah adaptasi selama 1 minggu, tikus dibagi secara random dalam 5 kelompok sehingga masing – masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Kelompok yang ada yakni kontrol negatif (K_1), kontrol positif (K_2), perlakuan 1 (P_1), perlakuan 2 (P_2), dan perlakuan 3 (P_3).

4.7.4.3 Pemberian Perlakuan

Seluruh tikus dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok tikus berjumlah 7 ekor menggunakan sistem *simple random sampling* dengan perlakuan yang berbeda. Sebelum melakukan intervensi, beberapa kriteria yang harus diperhatikan untuk menghindari adanya bias seperti tikus tidak sakit, tikus tidak mengalami diare, dan tikus tidak mengalami kelainan anatomi.

Setelah didapatkan 5 kelompok besar, intervensi dilakukan selama 8 minggu dan dibagi menjadi :

- Kelompok K_1 (kontrol negatif) yang mendapat diet standart
- Kelompok K_2 (kontrol positif) yang mendapat diet tinggi lemak

- Kelompok P₁ yang mendapat diet tinggi lemak selama 4 minggu lalu diberi diet standar ditambahkan dengan ekstrak kulit manggis dengan dosis 400 mg/kgBB per hari selama 4 minggu. Pemberian ekstrak kulit manggis dilakukan dengan cara diencerkan dalam 2 ml aquades dan disonde
- Kelompok P₂ yang mendapat diet tinggi lemak selama 4 minggu lalu diberi diet standar dan obat simvastatin dengan dosis 0,18 mg/200 gr BB per hari selama 4 minggu.
- Kelompok P₃ yang mendapat diet tinggi lemak selama 4 minggu lalu diet standar ditambah dengan ekstrak kulit manggis 400 mg/kgBB dan obat simvastatin 0,18 mg/kgBB per hari selama 4 minggu.

Perlakuan ini dilakukan selama 8 minggu pada semua kelompok setelah adaptasi sebelumnya selama 1 minggu,

4.7.4.4 Pengambilan data

Seluruh tikus pada masing-masing kelompok diambil darah vena pada pleksus retroorbitalis (prosedur ada pada

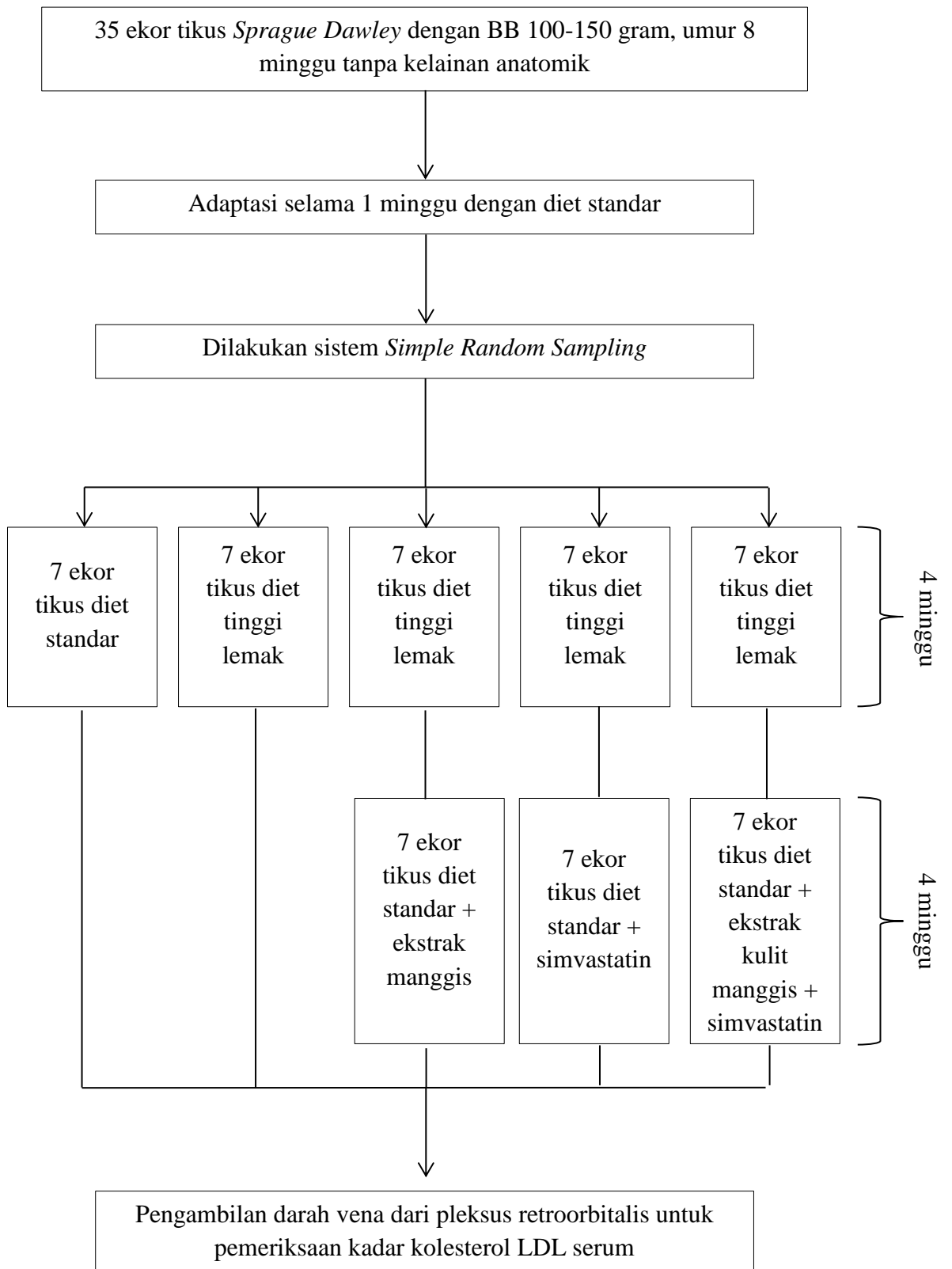
lampiran 2) untuk pemeriksaan kadar kolesterol LDL serum untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis dan simvastatin terhadap kadar kolesterol LDL serum. Serum ini digunakan untuk pemeriksaan kadar kolesterol LDL lewat proses enzimatik dengan metode CHOD-PAP (Cholesterol oxydase-phenyl aminopyrazolon).

Kadar kolesterol LDL diperiksa dengan rumus :

$$\text{Kadar cLDL} = \text{Kolesterol total} - \text{Presipitant LDL}$$

Satuan yang digunakan adalah mg/dl

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Data yang didapat diolah dengan program SPSS for Windows. Data yang didapat memiliki skala pengukuran katagorik nominal untuk variabel bebas dan skala numerik/ non katagorikal/ kuantitatif berupa rasio (scale menurut SPSS karena program ini tidak dapat membedakan rasio dan interval) untuk variabel tergantung. Uji normalitas dengan Shapiro – Wilk karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sample.

Untuk data normal, ukuran pemusatan dipakai mean dan standart deviasi sebagai penyebaran, kalau data tidak normal digunakan median sebagai ukuran pemusatan dan min maks menjadi ukuran penyebaran.

Sebagai uji analitik statistika, jika datanya normal akan dilakukan uji beda dengan uji statistik parametrik ANOVA. Jika datanya tidak normal menggunakan transformasi data supaya normal datanya, jika tetap ada data yang tidak normal, dilakukan uji non parametrik dengan uji Kruskal Wallis. Untuk mencari kemaknaan maka dapat dilanjutkan menggunakan uji Post Hoc untuk uji parametrik ANOVA dan uji Mann Whitney untuk uji parametrik Kruskal Wallis. Didapatkan perbedaan bermakna jika nilai $p < 0,05$ dan perbedaan dikatakan tidak bermakna jika nilai $p > 0,05$.

4.10 Etika Penelitian

Ethical clearance dimintakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEKP) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atau RSUP dr. Kariyadi Semarang.

Penelitian ini menggunakan 35 ekor tikus *Sprague Dawley* yang diberi pakan tinggi lemak dan diadaptasi di laboratorium selama 9 minggu. Setelah penelitian selesai, tikus akan dibunuh dengan cara dislokasi sendi atlanto occipital dan dikubur oleh ahli dari LPPT – LP3HP Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 5. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Waktu (Bulan ke)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Studi Literatur	■						
2	Penyusunan Proposal	■	■					
3	Seminar Proposal		■					
4	Persiapan Peminjaman Laboratorium			■				
5	Persiapan Alat dan Bahan			■	■			
6	Penelitian				■	■		
7	Analisis Data dan Evaluasi					■	■	
8	Penulisan Laporan						■	■
9	Seminar Hasil							■

Konflik Kepentingan

Penelitian ini tidak mendapatkan dana dari pihak manapun. Penelitian ini dilakukan dari dana pribadi.