

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

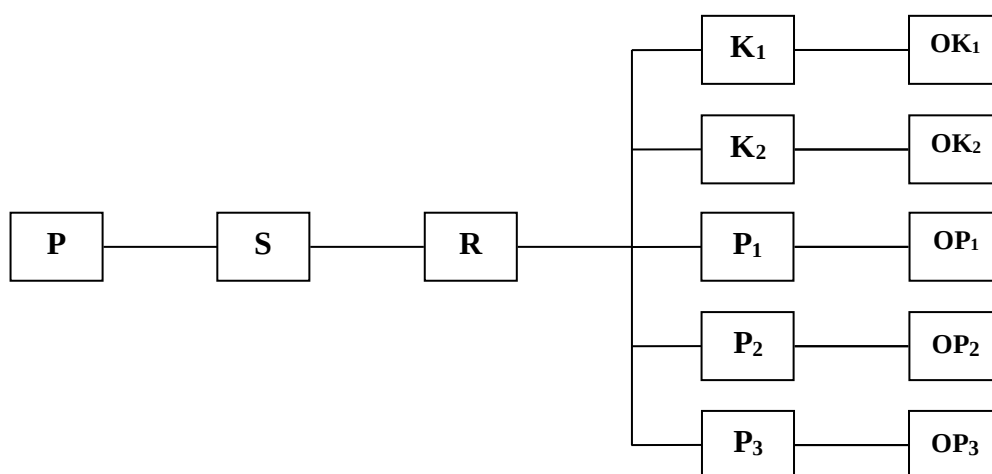
3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Biokimia dan Ilmu Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Laboratorium Obat Tradisional kawasan Laboratorium Sentral RSND, dan di Laboratorium klinik IBL Semarang. Waktu penelitian mulai dilaksanakan pada 30 April 2018- 7 Juni 2018.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian



Gambar 3. Skema rancangan penelitian

Keterangan rancangan penelitian :

P : Persiapan sampel

S : Sampel setelah diadaptasi

R : Randomisasi

K₁ : Kelompok kontrol negatif yang diberikan pakan standart

K₂ :Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari.

P₁ : Perlakuan kelompok 1 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standart dan simvastatin selama 10 hari.

P₂:Perlakuan kelompok 2 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standart dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis 250 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 2 ml aquades selama 10 hari.

P₃: Perlakuan kelompok 3 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standart dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis 500 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 2 ml aquades selama 10 hari.

OK₁,OK₂,OP₁,OP₂,OP₃ : Pengukuran kadar kolesterol LDL setelah diberi perlakuan

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Sampel

3.4.2.1.1 Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jantan
- Umur 8 minggu
- Berat badan 150-200 gram

3.4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

- Terdapat kelainan anatomis
- Tikus tampak sakit dan tidak aktif

3.4.2.1.3 Kriteria Drop Out

- Tikus tidak mau makan dan minum
- Tikus mengalami diare
- Tikus mati selama penelitian berlangsung

3.4.3 Cara Sampling

Cara sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah *simple random sampling*.

3.4.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO yaitu jumlah sampel minimal tiap kelompok hewan coba adalah 5 ekor. Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus wistar jantan tiap kelompok perlakuan untuk

mengantisipasi *drop out* dengan jumlah kelompok perlakuan sebanyak 5 kelompok sehingga jumlah seluruh sampel penelitian sebanyak 30 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Kadar ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

3.5.2 Variabel Terikat

Kadar kolesterol LDL serum tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Satuan	Skala
1	Ekstrak daun belimbing wuluh	Ekstrak berasal dari daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba (P2) dosis 250 mg/kgBB, (P3) 500 mg/kgBB, dan (dengan sonde peroral sebanyak satu kali sehari selama 14 hari.	mg/kg BB	Nominal

2	Simvastatin	Simvastatin tablet generik dengan dosis 10 mg. Tablet dihancurkan dan ditimbang lagi untuk penyesuaian dosis dengan timbangan mikro menjadi 0,18mg/200gr BB dan dibulatkan menjadi 0,2 mg	mg/gram BB	Nominal
3	Kadar Kolesterol LDL	Sampel darah diukur diambil di vena retro orbitalis untuk kemudian diproses dengan reaksi enzimatis dengan metode CHOD-PAP	mg/dl	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini:

- 1) Kandanghewan
- 2) Timbangan hewan
- 3) Sondelambung
- 4) *Sprit* injeksi 1ml
- 5) Mortir dan stemper
- 6) Alat-alat gelas (gelas beker, gelas ukur, dan batangpengaduk)
- 7) Pipetkapiler
- 8) Alatsentrifus
- 9) Spektofotometer Stat Fx 3300
- 10) Cuvet
- 11) Tabungreaksi

12) Tabungsentrifus

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini :

- 1) Tikus wistar jantan sebanyak 30 ekor
- 2) Ekstrak daun belimbing wuluh
- 3) Pakan hiperkolesterolemik terdiri dari kuning telur ayam, lemak kambing dan minyak kelapa
- 4) Makanan dan minuman hewan uji (pelet dan aquades)
- 5) Simvastatin generic
- 6) Aquades
- 7) Larutan EDTA
- 8) Kit Reagen kolesterol LDL

3.7.2 Jenis Data

Data yang didapatkan oleh peneliti ini merupakan data primer berupa pengukuran kadar serum LDL tikus wistar yang diinduksi pakan hiperkolesterolemik sesudah pemberian ekstrak daun belimbing wuluh.

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Perlakuan pada HewanCoba

Seluruh sampel dikandangkan secara berkelompok di Laboratorium Hewan Coba FK UNDIP. Selama penelitian berlangsung tikus Wistar mendapatkan pakan dan air minum standar yang sama. Adaptasi dilakukan selama 7 hari dan diberikan

pakan standard dan air minum *ad libitum*. Selanjutnya sampel dibagi kedalam lima kelompok secara acak yaitu:

- K₁ : Kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama 21 hari.
- K₂ :Kelompok kontrol positif yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 21 hari.
- P₁ : Perlakuan kelompok 1 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standar dan simvastatin dengan dosis 0,18mg/200grBB per hari selama 10 hari.
- P₂ : Perlakuan kelompok 2 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standar dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis 250 mg/kgBB per hari selama selama 10 hari yang dilarutkan dalam 2 ml aquades dan disonde.
- P₃: Perlakuan kelompok 3 yang diberikan pakan hiperkolesterolemik selama 11 hari, kemudian diberikan pakan standart dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis 500 mg/kgBB per hari selama 10 hari yang dilarutkan dalam 2 ml aquades dan disonde.

Perlakuan dilakukan per hari mulai hari ke 18 selama 38 hari dan dipuasakan selama 12 jam lalu dilanjutkan dengan pengambilan sampel darah vena dari pleksus retroorbitalis.

3.7.3.2 Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh

Daun belimbing wuluh dibersihkan dan dipotong-potong lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80°C selama 2 hari. Daun yang sudah kering ditimbang lalu diletakkan dalam tabung erlenmeyer yang telah terisi etanol 70% kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam dengan pengulangan 2-3 kali, lalu menyaring campuran tersebut dengan kertas saring untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dilakukan penguapan dengan *waterbath* pada suhu 60-70°C. Setelah itu akan didapatkan berupa ekstrak kental.

3.7.3.3 Perhitungan dosis terapi

Melalui penelitian terdahulu, ditemukan bahwa pemberian ekstrak daun belimbing wuluh pada tikus sebesar 250 mg/kgBB/hari selama 14 hari dapat menunjukkan efek terapeutik.²⁷ Dengan demikian dosis yang dipilih dalam penelitian ini adalah kelompok perlakuan 2 ekstrak daun belimbing wuluh 250 mg/KgBB dan kelompok perlakuan 3 ekstrak daun belimbing wuluh 500 mg/KgBB. (prosedur ada pada lampiran 1).

Dosis simvastatin yang digunakan untuk manusia hiperkolestroleemia adalah 10 mg/hari. Konversi dosis manusia ke tikus berdasarkan tabel konversi Laurence dan Bacharach yang dikutip oleh Haznam (1976) yaitu: $10 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg/hari/200 g BB}$. Suspensi simvastatin diperoleh dengan melarutkan 0,18 mg simvastatin dalam bentuk bubuk ke dalam 1 mL aquades. Agar memudahkan pengukuran simvastatin dan memberikan kepastian dosis simvastatin terhadap tikus maka dibulatkan menjadi 0,2 mg. Simvastatin yang digunakan dalam percobaan berupa simvastatin dalam bentuk tablet 10 mg yang

diberikan melalui sonde lambung. Alat ukur yang digunakan adalah timbangan digital dengan satuan miligram.

3.7.3.4 Pembuatan pakan hiperkolesterolemik

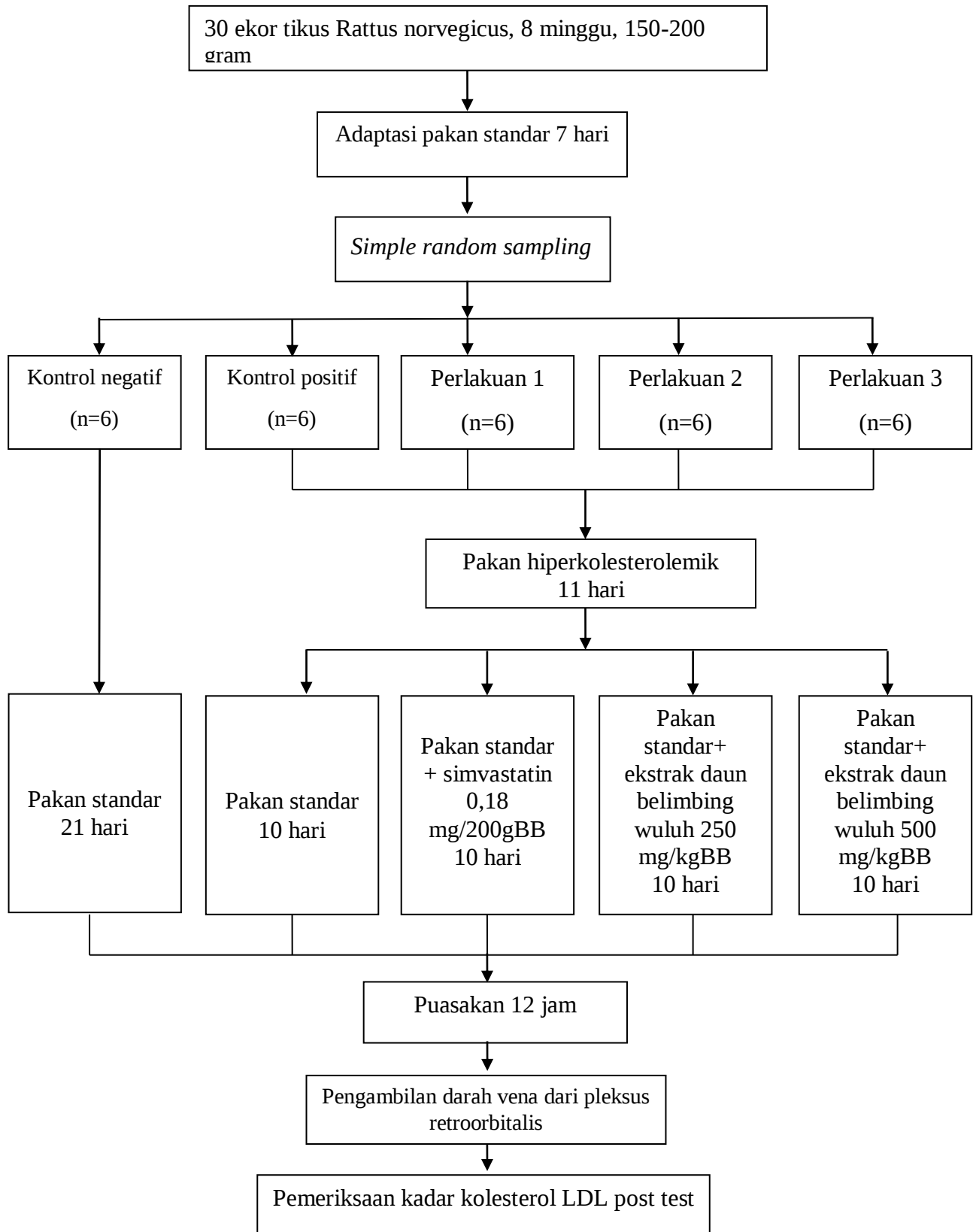
Untuk meningkatkan kadar kolesterol darah hewan percobaan maka diberikan pakan hiperkolesterolemia yang dibuat dengan menambahkan 1,5% dari kuning telur ayam, lemak kambing 10%, dan minyak kelapa 1% pada pakan standart yang diberikan setiap hari selama 2 minggu.³⁷

3.7.3.5 Pengambilan Data

Seluruh tikus pada masing-masing kelompok diambil darah vena pada pleksus retro orbitalis (prosedur pada lampiran 2) untuk pemeriksaan kadar kolesterol LDL serum untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun belimbing wuluh terhadap kadar kolesterol LDL serum. Serum ini digunakan untuk pemeriksaan kadar kolesterol LDL (prosedur ada pada lampiran 3) lewat proses enzimatik dengan metode CHOD-PAP (*Cholesterol oxydase-phenyl aminopyrazolon*). Kadar kolesterol LDL diperiksa dengan rumus :

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

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data primer yang didapatkan dilakukan uji *Saphiro-Wilk* untuk mengetahui sebaran distribusi data dan uji *Levene's test* untuk melihat homogenitas data. Data yang didapatkan berdistribusi normal, sehingga dapat dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Hasil dari uji *one way Anova* tidak terdapat perbedaan yang bermakna, maka tidak dilakukan uji *post hoc* untuk uji perbedaan dua kelompok.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dan kelayakan etik berupa *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr.Kariadi Semarang dengan nomor *ethical clearance* yaitu 29/EC/H/FK-RSDK/IV/2018 yang diterbitkan pada tanggal 30 April 2018. Seluruh biaya yang terkait dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan Februari				Bulan Maret				Bulan April				Bulan Mei				Bulan Juni			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Studi literatur																				
2	Pembuatan 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																				