

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *pre and post test group design*.

B. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

- a. Pengujian aktivitas ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober-Desember 2019.

C. Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) yang diperoleh dari daerah Ungaran, Jawa Tengah. Teknik sampling yang digunakan adalah cara acak (*Random sampling*).

Penentuan jumlah sampel hewan uji menggunakan rumus Federer (1991)

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

Keterangan : t = banyaknya kelompok

n = banyaknya hewan uji tiap kelompok

Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga :

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Digunakan jumlah sampel hewan uji masing-masing kelompok sebanyak 5 ekor pada 5 kelompok, sehingga total hewan uji sebanyak 25 ekor, untuk menghindari terjadinya kematian maka dilebihkan satu tiap masing-masing kelompok sehingga digunakan 30 ekor tikus. Sampel yang digunakan adalah darah hewan uji tikus putih jantan galur wistar yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus Putih jantan galur wistar
- b. Berat badan tikus 180-200 gram
- c. Umur 2-3 bulan dengan kondisi sehat

2. Kriteria eksklusi

- a. Tikus mati atau sakit selama masa penelitian

D. Definisi Operasional

1. Variabel Bebas

Variabel Bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah Ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) dengan dosis 100 mg/kgBB tikus, 200 mg/kgBB tikus, dan 400 mg/kgBB tikus secara per oral menggunakan sonde pada tikus putih jantan.

2. Variabel Tergantung

Variabel Tergantung adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi terikat karena variabel bebas. Variabel Tergantung pada penelitian ini berupa kadar kolesterol HDL (*High Dencity Lipoprotein*) dan LDL (*Low Dencity Lipoprotein*) tikus putih jantan galur wistar.

a. Kolesterol HDL (*High Dencity Lipoprotein*)

Kolesterol HDL (*High Dencity Lipoprotein*) adalah kolesterol baik karena dapat melarutkan kolesterol yang mengendap di dinding pembuluh darah. Kadar HDL (*High Dencity Lipoprotein*) diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*).

Alat Ukur : Spektrofotometer

Hasil Ukur : mg/dL

Skala : Rasio

b. Kolesterol LDL (*Low Dencity Lipoprotein*)

Kolesterol LDL (*Low Dencity Lipoprotein*) adalah kolesterol jahat karena mudah melekat pada dinding pembuluh darah. Kadar LDL (*Low Dencity Lipoprotein*) diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*).

Alat Ukur : Menggunakan rumus Friedewald

Hasil Ukur : mg/dL

Skala : Rasio

3. Variabel Terkendali

Variabel Terkendali adalah variabel yang mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel tergantung.

Variabel Terkendali pada penelitian ini meliputi :

- a. Jenis Kelamin, galur, umur, dan berat badan hewan uji sama yaitu jantan, galur wistar, 2-3 bulan, dan 150-200 gram.
- b. Jenis dan jumlah pakan kelompok perlakuan sama antara semua kelompok.
- c. Tempat dan pemeliharaan dikondisikan sama antara semua kelompok
- d. Waktu perlakuan secara bersamaan

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat Penelitian

Wadah penampung, gelas ukur, ayakan, *rotary evaporator*, neraca analitik, batang pengaduk, kertas saring, labu takar, cawan penguap, toples kaca, kandang tikus, tutup kandang tikus, botol air, timbangan hewan, sonde oral, mikrohematokrit, tabung *eppendrop*, mikro pipet, sarung tangan, *sentrifugator*, spektrofotometri.

b. Bahan Penelitian

1) Hewan Uji :

Tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 150-200 gram.

2) Bahan :

Daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*), kuning telur puyuh, lemak sapi, minyak jelantah, simvastatin 20 mg, CMC-Na 0,5%, etanol 96%, aquadest, reagen kit kolesterol HDL (*High Dencity Lipoprotein*) dan reagen kit kolesterol total.

2. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri

Semarang untuk mengetahui kebenaran dari daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) yang akan digunakan dalam penelitian.

b. Penyiapan Bahan

Daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) diperoleh dari daerah Ungaran, Jawa Tengah. Bahan yang telah diperoleh dari pengumpulan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, tiriskan, kemudian diangin-anginkan di tempat yang teduh atau tidak terkena sinar matahari langsung sampai kering. Daun yang sudah kering digiling hingga menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan nomor mesh 30/40. Sampel dibuat dalam bentuk serbuk dengan tujuan memperluas permukaan bidang sentuh antara pelarut dengan serbuk sampel, dengan demikian penyarian atau penarikan senyawa dapat lebih efektif.

c. Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*)

Ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) dibuat menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Ekstraksi dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak kurang lebih 300 gram serbuk simplisia kering dan kemudian dimasukkan ke dalam toples, lalu direndam dengan 7,5 bagian pelarut etanol 96% yaitu 2250 ml, dilakukan pengadukan sebanyak 1 kali 24 jam selama 5 hari dan disimpan dalam toples tertutup dan terlindung dari cahaya, setelah 5 hari ekstrak disaring menggunakan kain flanel, kemudian residu dilakukan remaserasi dengan 2,5 bagian pelarut etanol 96% yaitu 750

ml selama 2 hari. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disaring. Fungsi penyaringan adalah untuk memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 58⁰C dan kecepatan 70 rpm dan dikentalkan diatas *waterbath* pada suhu 58⁰C.

Kemudian untuk rendemen dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$

d. Uji Bebas Etanol 96%

Ekstrak diuji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan.

e. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan metode wilstater dimana sampel diambil sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4ml etanol, dikocok dan dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit. Setelah itu dikocok kembali kemudian disaring dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Magnesium serta 3 tetes HCl pekat pada filtrate. Campuran dikocok dan didiamkan hingga memisah. Kandungan Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan etanol.

f. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak sampel daun sebanyak 1 gram ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

g. Uji Triterpenoid dan Steroid

Uji triterpenoid dilakukan dengan cara melarutkan uji sebanyak 2 mL diuapkan. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid.

h. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan pereaksi Dragendorff, dan Mayer. Ekstrak daun petai sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 tetes HCl 2 N, kemudian dipanaskan selama 2 menit diatas penangas air. Setelah dingin, dibagi menjadi 3 bagian. Bagian A ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff (sebanyak 8 g KI dilarutkan dalam 20 ml air suling, sedangkan pada bagian lain 0,85 g bismuth sub nitrat dilarutkan dalam 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml air suling, kedua larutan

dicampurkan), jika terbentuk endapan dan berwarna jingga maka positif mengandung alkaloid. Bagian B ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer (1,36 g dilarutkan dalam 60 ml air suling). Pada bagian lain dilarutkan pula 5 g KI dalam 10 ml air suling. Kedua larutan ini kemudian dicampurkan dan diencerkan dengan air suling sampai 100 ml), jika terbentuk endapan dan berwarna putih maka positif mengandung alkaloid.

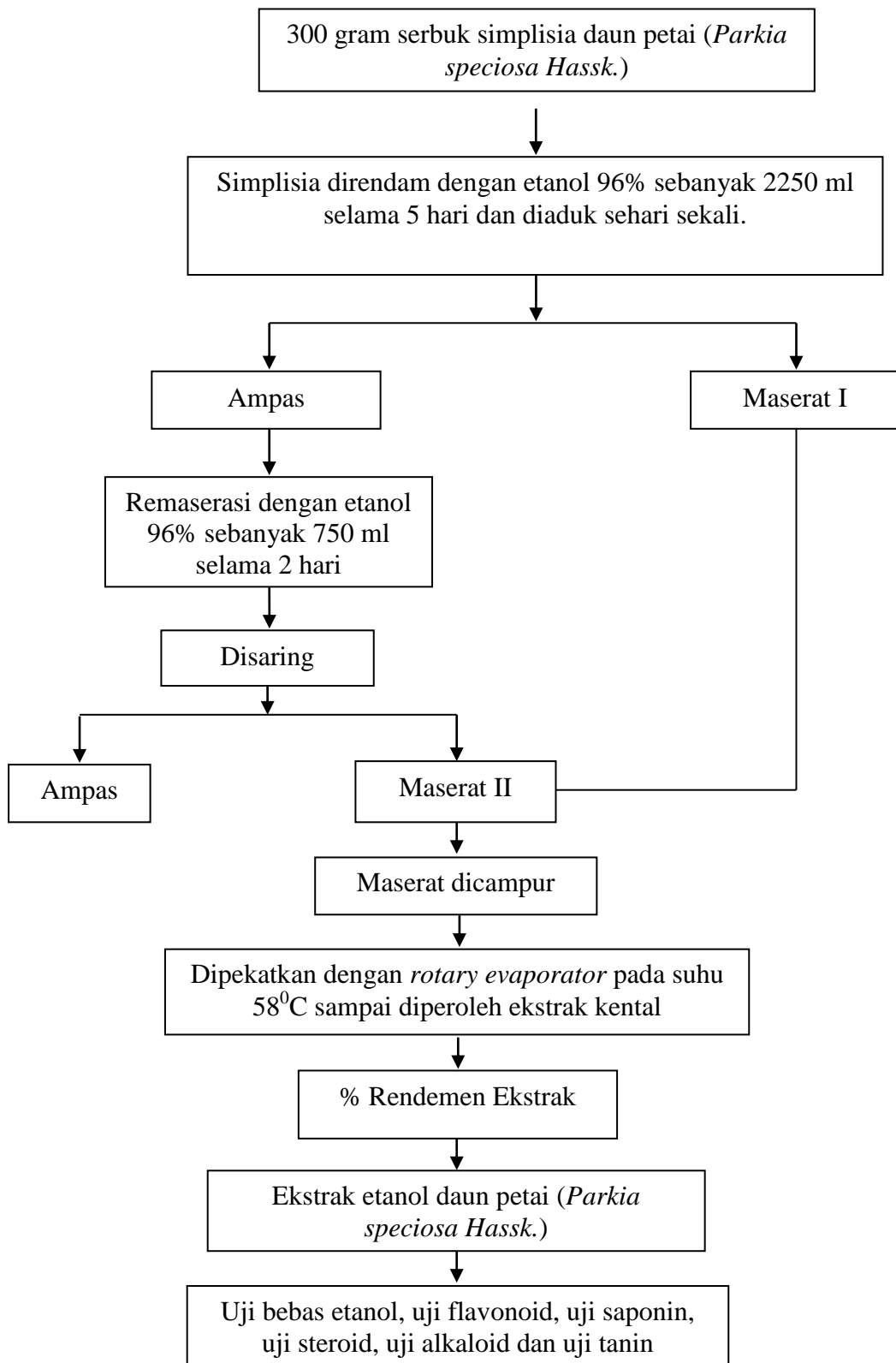
i. Uji Tanin

Sampel diambil sebanyak 0,1 gram ditambahkan dengan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebagian filtrate yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl_3 3-4 tetes. Jika berwarna hijau biru (hijau hitam) berarti positif adanya tannin kolikol, sedangkan jika berwarna biru hitam berarti positif adanya tannin pleglikol.

j. Uji Total Flavonoid

Uji total flavonoid dilakukan dengan cara menentukan panjang gelombang maksimum kuersetin yang digunakan, selanjutnya dilakukan penentuan Operating time kuersetin. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Setelah itu menentukan kurva baku kuersetin yang hasilnya dibaca pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Langkah terakhir yaitu menentukan kadar flavonoid total dari ekstrak daun petai.

3. Skema Ekstraksi Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*)



Gambar 3.1 Skema Ekstraksi Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*)

4. Penentuan Dosis

a. Pemberian Dosis Ekstrak Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*)

Pemberian maksimal per-oral pada tikus 100 gram adalah 5 ml (Kusumawati, 2004). Berat rata-rata tikus yang digunakan adalah 200 gram, jadi $200/100 \times 5 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$. Volume pemberian peroral adalah setengah dari pemberian maksimal, jadi $\frac{1}{2} \times 10 \text{ ml} = 5 \text{ ml}$.

Penelitian ini menggunakan dosis 100 mg/KgBB tikus, 200 mg/KgBB tikus, 400 mg/KgBB tikus diberikan secara per-oral menggunakan sonde pada tikus putih jantan.

a. Ekstrak daun petai dengan dosis 100 mg/KgBB tikus.

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak} &= 100 \text{ mg/KgBB/Hari} \\ \text{Berat tikus diasumsikan} &= 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ Kg} \\ \text{Dosis pemberian tikus 200 gram} &= \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus} \\ &= 100 \text{ mg/Kg} \times 0,2 \text{ Kg} \\ &= 20 \text{ mg} \\ \text{Dosis stok} &= \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}} \\ &= \frac{20 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\ &= 4 \text{ mg/ml} \\ \text{Maka, sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{stok ekstrak} \times \text{volume} \\ &= 4 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\ &= 200 \text{ mg} \\ &= 0,2 \text{ gram} \end{aligned}$$

Cara pembuatan ekstrak daun petai dengan dosis 100 mg/KgBB tikus, yaitu :

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,2 gram dibuat dalam larutan dengan cara melarutkan ekstrak yang ditambah dengan suspensi CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml

b. Ekstrak daun petai dengan dosis 200 mg/KgBB tikus.

Dosis ekstrak = 200 mg/KgBB/Hari

Berat tikus diasumsikan = 200 gram = 0,2 Kg

Dosis pemberian tikus 200 gram = Dosis ekstrak x Berat tikus

= 200 mg/Kg x 0,2 Kg

= 40 mg

Dosis stok = $\frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}}$

= $\frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$

= 8 mg/ml

Maka, sediaan sebanyak 50 ml = stok ekstrak x volume

= 8 mg/ml x 50 ml

= 400 mg

= 0,4 gram

Cara pembuatan ekstrak daun petai dengan dosis 200 mg/KgBB tikus, yaitu :

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,4 gram dibuat dalam larutan dengan cara melarutkan ekstrak yang ditambah dengan suspensi CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml

c. Ekstrak daun petai dengan dosis 400 mg/KgBB tikus.

$$\text{Dosis ekstrak} = 400 \text{ mg/KgBB/Hari}$$

$$\text{Berat tikus diasumsikan} = 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ Kg}$$

$$\text{Dosis pemberian tikus 200 gram} = \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus}$$

$$= 400 \text{ mg/Kg} \times 0,2 \text{ Kg}$$

$$= 80 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis stok} = \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}}$$

$$= \frac{80 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 16 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Maka, sediaan sebanyak 50 ml} = \text{stok ekstrak} \times \text{volume}$$

$$= 16 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$= 800 \text{ mg}$$

$$= 0,8 \text{ gram}$$

Cara pembuatan ekstrak daun petai dengan dosis 400 mg/KgBB tikus, yaitu :

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,8 gram dibuat dalam larutan dengan cara melarutkan ekstrak yang ditambah dengan suspensi CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml

b. Dosis Simvastatin

Dosis yang digunakan untuk manusia dengan berat badan 70 kg adalah 20 mg/hari. Nilai konversi dosis manusia ke tikus adalah 0,018 (Kusumawati, 2004).

$$\begin{aligned} \text{Dosis manusia 70 kg} &= 20 \text{ mg/hari} \\ \text{Dosis simvastatin pada tikus} &= 0,018 \times \text{Dosis manusia} \\ &= 0,018 \times 20 \text{ mg/hari} \\ &= 0,36 \text{ mg/200 gramBB/hari} \\ &= 1,8 \text{ mg/KgBB/hari} \end{aligned}$$

$$\text{Volume pemberian tikus 200 gram} = 5 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi stok simvastatin} &= \frac{\text{Dosis tikus}}{\text{Volume pemberian}} \\ &= \frac{0,36 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\ &= 0,072 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Maka sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{Stok simvastatin} \times \text{volume} \\ &= 0,072 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\ &= 3,6 \text{ mg} \end{aligned}$$

Berat 1 tablet simvastatin 20 mg adalah 160 mg

Berat tablet yang dibutuhkan untuk membuat sediaan 50 ml

$$\begin{aligned} \frac{3,6 \text{ mg}}{x} &= \frac{20 \text{ mg}}{160 \text{ mg}} \\ X &= \frac{3,6 \text{ mg} \times 160 \text{ mg}}{20 \text{ mg}} \\ X &= 28,8 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan simvastatin, yaitu :

Simvastatin 28,8 mg dengan cara melarutkan simvastatin yang ditambah dengan CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml.

c. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,5% sebanyak 100 ml

$$\begin{aligned}\text{CMC-Na } 0,5\% &= \frac{0,5 \text{ gram}}{100} \times 100 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ gram}\end{aligned}$$

CMC-Na 0,5 gram dimasukkan ke dalam mortir yang berisi aquadest hangat 10 ml dan didiamkan selama 15 menit hingga memperoleh massa yang transparan lalu digerus sampai homogen. Selanjutnya diencerkan dengan menggunakan aquadest dan dimasukkan kedalam labu ukur. Volume dicukupkan sampai 100 ml (Soriton, Yamlem, & Widya Astuti Lolo, 2014).

d. Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Untuk menginduksi kenaikan kadar lipid pada tikus maka diberikan asupan tambahan berupa pakan diet tinggi lemak. Pakan diet tinggi lemak yang digunakan terdiri dari 10% lemak sapi, 20% minyak jelantah, dan 20% kuning telur burung puyuh yang dicampur dalam 120 ml untuk tiap tikus yang diberikan secara oral (Gunawan *et al.*, 2018).

Perhitungan :

$$\text{Volume pemberian} = 5 \text{ ml}/200 \text{ gram tikus}$$

$$\begin{aligned}\text{Perbandingan pakan} &= \text{lemak sapi} : \text{minyak jelantah} : \text{kuning telur} \\ &= 10\% \text{ b/v} : 20\% \text{ b/v} : 20\% \text{ b/v}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Lemak Sapi} &= \frac{10}{100} \times 5 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\text{Minyak jelantah} = \frac{20}{100} \times 5 \text{ ml}$$

$$= 1 \text{ gram}$$

$$\text{Kuning telur} = \frac{20}{100} \times 5 \text{ ml}$$

$$= 1 \text{ gram}$$

Aquadest ad 5 ml

Pembuatan larutan stok 150 ml :

$$\text{Lemak Sapi} = \frac{10}{100} \times 150 \text{ ml}$$

$$= 15 \text{ gram}$$

$$\text{Minyak jelantah} = \frac{20}{100} \times 150 \text{ ml}$$

$$= 30 \text{ gram}$$

$$\text{Kuning telur} = \frac{20}{100} \times 150 \text{ ml}$$

$$= 30 \text{ gram}$$

Aquadest ad 150 ml

Maka pakan tinggi lemak dibuat dengan cara memanaskan lemak sapi yang berupa padatan sehingga diperoleh bentuk cair (minyak lemak sapi), kemudian campurkan minyak sapi, minyak jelantah, kuning telur puyuh dan diaduk cepat sampai terbentuk korpus emulsi, yang kemudian ditambahkan air sampai dengan volume 150 ml ke dalam korpus emulsi tetap sambil diaduk cepat sehingga terbentuk emulsi yang halus. Pakan penginduksi ini selalu dibuat baru setiap harinya dan diberikan secepatnya untuk menghindari penggumpalan minyak lemak sapi (Gunawan *et al.*, 2018).

5. Uji Peningkatan HDL dan Penurunan LDL Tikus Putih Jantan

Tabel 3.1 Perlakuan terhadap seluruh kelompok hewan uji.

Kelompok Hewan Uji	Perlakuan Hari ke-				
	0 – 7	8 – 30	31	32 – 44	45
Kelompok positif	Adaptasi	PTL	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>pre test</i>)	PTL + simvastatin 0,36 mg/200 gramBB/hari	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>Post test</i>)
Kelompok negatif	Adaptasi	PTL	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>pre test</i>)	PTL + Aquadest + Lar. CMC-Na 0,5%	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>Post test</i>)
Kelompok dosis 100 mg/KgBB	Adaptasi	PTL	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>pre test</i>)	PTL + EEDP 100 mg/KgBB	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>Post test</i>)
Kelompok dosis 200 mg/KgBB	Adaptasi	PTL	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>pre test</i>)	PTL + EEDP 200 mg/KgBB	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>Post test</i>)
Kelompok dosis 400 mg/KgBB	Adaptasi	PTL	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>pre test</i>)	PTL + EEDP 400 mg/KgBB	Pengukuran kadar HDL & LDL (<i>Post test</i>)

1. Tahap pertama

Pada tahap pertama seluruh tikus mengalami adaptasi selama 7 hari dan dilakukan pengelompokan secara acak dan ditimbang berat badannya (Gunawan et al., 2018).

2. Tahap Kedua

Pada hari ke-8 sampai hari ke-22 induksi pakan tinggi lemak dengan cara sonde pada kelompok positif, kelompok negatif, kelompok P1, kelompok P2, dan kelompok P3. Pemberian pakan tinggi lemak

diberikan sebanyak satu kali saat menjelang malam. Kemudian seluruh tikus ditimbang berat badannya (Gunawan et al., 2018).

3. Tahap Ketiga

Pada hari ke-23 dilakukan pengambilan sampel darah tikus setelah induksi pakan tinggi lemak untuk mengetahui kadar HDL dan LDL, jika peningkatan kadar HDL dan LDL banyak yang belum mencapai target yaitu kadar HDL < 35 mg/dL dan kadar LDL $> 27,2$ mg/dL maka induksi pakan tinggi lemak ditambah 1 minggu, namun jika kadar HDL dan LDL sudah mencapai targetnya maka sebagai data *pre test*.

1) Pengukuran kadar HDL

Pengukuran kadar HDL dilakukan dengan metode presipitasi langsung yaitu mengendapkan kilomikron, VLDL, dan LDL menggunakan asam fosfotungstik dan magnesium klorida. Setelah disentrifugasi supernatant yang mengandung HDL ditetapkan kadarnya menggunakan reagen kit kolesterol total. Pengukuran kadar HDL (HDL Cholesterol, 2007) dilakukan dengan cara sampel plasma dan standar HDL masing-masing dipipet 200 μ L ke dalam mikrotube dan ditambahkan 500 μ L reagen kit HDL, diinkubasi selama 10 menit pada temperature ruang, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatan jernih dipipet dan dilakukan penetapan kadar HDL, menggunakan reagen kit kolesterol total. Jumlah akuabides, sampel, standar, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan dalam

penetapan kadar HDL, untuk dimasukkan ke dalam kuvet sesuai dengan Tabel 3.2

Tabel 3.2 Jumlah aquadest, supernatan sampel plasma, supernatan standar HDL, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar HDL

Bahan	Kuvet		
	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Aquadest	100	-	-
Supernatan sampel plasma	-	-	100
Supernatan standar HDL	-	100	-
Larutan reagen kit kolesterol total	1000	1000	1000

Kuvet yang telah ditambahkan sesuai tabel, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25⁰C. Serapan sampel (*A sampel*) dan standar (*A standar*) diukur terhadap blanko pada panjang gelombang 500 nm.

Kadar HDL dapat dihitung dengan rumus :

$$C \text{ HDL (mg/dl)} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ standar}$$

(Devi, Purnasari, Farmasi, & Indonesia, 2014)

2) Penentuan kadar LDL

Penentuan kadar kolesterol LDL dapat ditentukan secara tidak langsung dengan menggunakan rumus Friedewald (Fischbach, 1999):

$$\text{Kolesterol LDL} = \text{kolesterol total} - \left[\left(\frac{\text{Trigliserida}}{5} \right) + \text{Kolesterol HDL} \right]$$

(Devi et al., 2014)

4. Tahap Keempat

Pada hari ke-24 sampai hari ke-38 perlakuan hewan uji.

- 1) Kelompok negatif : Tikus diberikan PTL, aquadest ditambah larutan CMC-Na 0,5% secukupnya.
- 2) Kelompok positif : Tikus diberikan PTL dan simvastatin 0,36 mg/200 gramBB/hari
- 3) Kelompok P1 : Tikus diberikan PTL dan ekstrak daun petai dengan dosis 100 mg/KgBB tikus
- 4) Kelompok P2 : Tikus diberikan PTL dan ekstrak daun petai dengan dosis 200 mg/KgBB tikus
- 5) Kelompok P3 : Tikus diberikan PTL dan ekstrak daun petai dengan dosis 400 mg/KgBB tikus

5. Tahap kelima

Pada hari ke-39 dilakukan pengambilan sampel darah tikus melalui sinus orbital setelah induksi ekstrak daun petai sebagai data *post test*.

F. Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini akan dilakukan dengan tahap-tahap berikut ini :

1. Penyuntingan (*Editing*).

Penyuntingan teks merupakan kegiatan memperbaiki sebuah tulisan yang sudah disiapkan dengan memperhatikan penyajian isi, sistematika dan bahasa. Hasil yang didapatkan dari kegiatan menyunting adalah mendapatkan tulisan yang baik, baik dari cara penulisannya, maupun

secara konteks kalimatnya, sehingga menjadi sebuah tulisan yang menarik, dan berkualitas.

2. *Tabulating*

Tabulating ini merupakan proses penyusunan dan analisis data dalam bentuk tabel dengan cara memasukkan data ke dalam bentuk tabel sehingga peneliti akan mudah melakukan analisis.

3. Pemasukan Data (*Entry*)

Entry data adalah kegiatan atau langkah – langkah memasukkan data-data hasil penelitian kedalam program aplikasi statistik SPSS (*Statistical Product Service Solution*) untuk pengujian statistik.

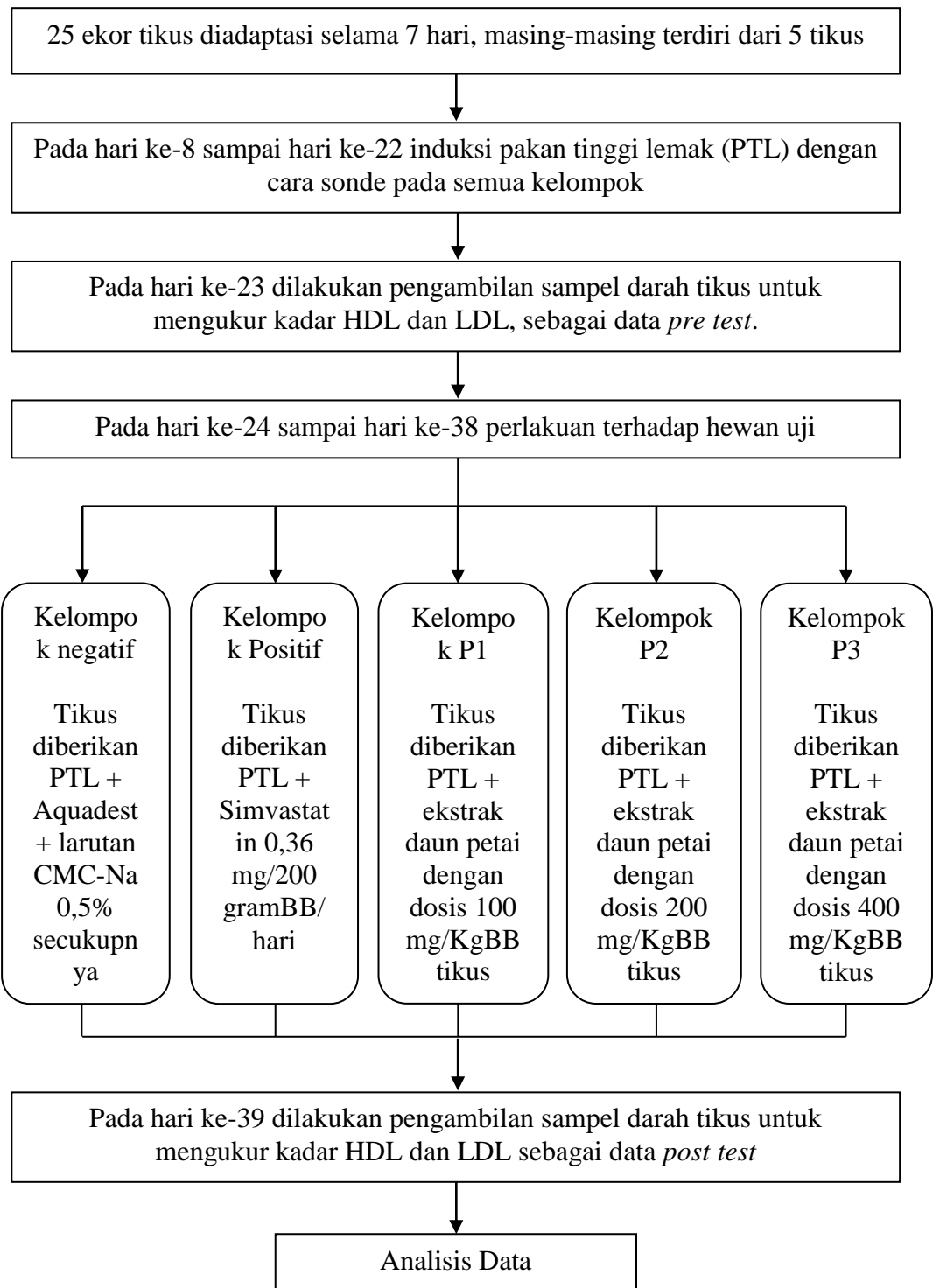
4. *Cleansing*

Cleansing merupakan bagian pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan untuk menghindari kesalahan pengetikan.

G. Analisis Data

Data kadar kolesterol HDL dan LDL yang diperoleh berupa selisih antara *pre test* dan *post test* terhadap peningkatan kadar kolesterol HDL dan penurunan kadar LDL. Selanjutnya dianalisis dengan SPSS *for Windows 25* sebelum dan sesudah diberi perlakuan dengan taraf kepercayaan 95%. Uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel kecil (<50). Berdasarkan hasil penelitian data terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Data kemudian diuji homogenitas dengan *Levene test*, hasil uji menunjukkan data terdistribusi homogen $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak homogen jika $p < 0,05$. Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya di uji dengan *One*

Way Anova (Analysis Of Varians). Data yang menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang artinya ada perbedaan secara signifikan maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different*), data dikatakan ada perbedaan signifikan jika $p < 0,05$.



Gambar 3.2 Skema Uji Peningkatan Kadar HDL dan Penurunan Kadar LDL Tikus Putih Jantan