

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian *true-eksperimen* dengan rancangan *pre-post test randomized control group design*.

Tabel 3.1 Desain Penelitian

| Kelompok | adaptasi | 7 | induksi | Pre test | Post test |
|----------|------------|---|---------|----------|--|
| | | ↑ | | 28 | 44 |
| | | | | ↑ | perlakuan ↑ |
| KN | Diet pakan | | DPLT | | DPLT |
| KP | Diet pakan | | DPLT | | DPLT+ Simvastatin 20mg/200KgBB/hari |
| P1 | Diet pakan | | DPLT | | DPLT + EDK 200mg/Kgbb |
| P2 | Diet pakan | | DPLT | | DPLT + EDK 400mg/KgBB. |
| P3 | Diet pakan | | DPLT | | DPLT + EDK 800mg/KgBB. |

Keterangan :

DPLT = Diet Pakan Lemak Tinggi

EDK = Ekstrak Daun Kitolod

KN = Kontrol Negatif

KP = Kontrol Positif

B. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

1. Lokasi Penelitian

- a. Penelitian mengenai uji aktivitas ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*) terhadap hiperlipidemia dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi & Biosistematik Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

c. Uji flavonoid total ekstrak daun kitolod akan dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan November-Januari 2019/2020

C. SUBJEK PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*) yang diperoleh dari daerah Ungaran, Jawa Tengah. Teknik sampling 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)

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

Keterangan : t = banyaknya kelompok

n = banyaknya hewan uji tiap kelompok

Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga :

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 5$$

Digunakan jumlah sampel hewan uji tikus jantan *putih* (*Rattus norvegicus strain wistar*) 5 kelompok, yang masing-masing kelompoknya berisi 5 ekor, 5 hewan uji yang lain digunakan sebagai cadangan apabila ada hewan uji yang

mati, sehingga total hewan uji sebanyak 30 ekor. Sampel yang digunakan adalah darah hewan uji yaitu tikus jantan putih 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
2. Kriteria eksklusi
 - a. Tikus mati atau sakit selama masa penelitian.

D. DEFINISI OPERASIONAL

1. Variabel bebas

Ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*) adalah sediaan yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut Etanol 96% yang diberikan pada tikus putih jantan dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB yang diberikan secara peroral.

2. Variabel tergantung

- a. Kolesterol total adalah keseluruhan jumlah kolesterol yang ditemukan dalam darah, terdiri dari kolesterol LDL, kolesterol HDL dan 20% trigliserida. Kadar kolesterol total diukur saat tikus sebelum diberi pakan tinggi lemak dan setelah diberi pakan tinggi lemak.

Alat ukur : spektrofotometer panjang gelombang 500 nm

Hasil ukur : mg/dL

Skala : Rasio

- b. Trigliserida adalah ester dari alkohol gliserol dengan asam lemak. Merupakan bentuk simpanan lemak di dalam tubuh yang berfungsi sebagai sumber energi. Kadar trigliserida pada tikus di ukur sebelum tikus diberi pakan tinggi lemak dan setelah tikus diberi pakan tinggi lemak

Alat ukur : spektrofotometer panjang gelombang 500 nm

Hasil ukur : mg/dL

Skala : Rasio

E. PENGUMPULAN DATA

1. 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, pipa kapiler, tabung eppendrop, mikropipet, sarung tangan, sentrifugator, spektrofotometri.

2. Bahan Penelitian :

a. Hewan uji

Tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat 180-200 gram.

b. Bahan :

Daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*), kuning telur puyuh, lemak sapi, minyak jelantah, simvastatin 20 mg, aquadest, CMC-Na 0,5%, reagen kit kolesterol total, reagen kit trigliserida, dan etanol 96%.

3. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi & Biosistematik Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*) yang akan digunakan dalam penelitian.

4. Penyiapan Bahan

Daun kitolod (*Isotoma longiflora L.*) diperoleh dari daerah Semarang , Jawa Tengah. Bahan dikumpulkan, dicuci bersih, ditiriskan, diangin-anginkan atau tidak terkena sinar matahari langsung sampai kering.

5. Ekstrak Etanol Daun Kitolod

Proses pembuatan ekstrak daun kitolod yaitu ditimbang 300 gram serbuk daun kitolod. Diayak dengan mesh No. 40, dimasukkan kedalam bejana maserasi. Dimaserasi dengan 1,5L pelarut etanol 96% selama 72 jam dan sesekali diaduk. Kemudian disaring (maserasi sebanyak 3 kali), maserasi pertama menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 0,75 L, maserasi kedua menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 0,75 L. Maserat yang didapat diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu kurang dari 60°C hingga didapat ekstrak kental berwarna coklat kehitaman.

Kemudian untuk menghitung rendemen dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{Bobot bahan sampel (g)}} \times 100\% \quad (3)$$

6. Uji Total Flavonoid

Uji Total flavonoid dilakukan di laboratorium biologi Universitas Ngudi Waluyo.

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan quercetin 100ppm diambil sebanyak 1ml ditambahkan dengan 1ml $AlCl_3$ 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450nm (Das *et al.*, 20013).

b. Penentuan Operating Time

Larutan quercetin 100 ppm diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1ml $AlCl_3$ 10% dan 8ml asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

c. Penentuan Kurva Baku Quercetin

Larutan quercetin sebagai baku standard dibuat kadar sebesar 50,60,70,80 dan 90ppm. Sebanyak 1ml larutan kadar dari masing-masing konsentrasi dimasukkan, direaksikan dengan 1 ml $AlCl_3$ 10% dan 8ml asam asetat 5%. Didiamkan selama 16 menit pembacaan absorbansi adar dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan Flavonoid Total

Larutan ekstrak 1000ppm diambil 1 ml, ditambahkan dengan 1 ml AlCl₃ 10% dan 8ml asam asetat 5% didiamkan selama 16menit. Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum..

7. Penetapan dosis ekstrak daun kitolod

Pemberian maksimal peroral 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 200 mg/KgBB tikus, 400 mg/KgBB tikus, dan 800 mg/KgBB tikus yang diberikan secara peroral menggunakan sonde pada tikus putih jantan.

a. Penentuan dosis ekstrak daun kitolod

1) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 200 mg/KgBB tikus

$$\text{Dosis ekstrak} = 200 \text{ mg/KgBB}$$

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

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

$$= 200 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg}$$

$$= 40 \text{ mg}$$

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

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

$$= 8 \text{ mg/ml}$$

$$\begin{aligned}
\text{Maka sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{Stok ekstrak} \times \text{volume} \\
&= 8\text{mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\
&= 400 \text{ mg} \\
&= 0,4 \text{ gram}
\end{aligned}$$

Cara pembuatan ekstrak daun kitolod 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 50ml.

2) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 400mg/KgBB tikus.

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

$$\text{Berat tikus diasumsikan} = 400\text{gram} = 0,2 \text{ Kg}$$

$$\begin{aligned}
\text{Dosis pemberian tikus 200 gram} &= \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus} \\
&= 400\text{mg/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg} \\
&= 80 \text{ mg}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{Dosis stok} &= \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume Pemberian}} \\
&= \frac{80 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\
&= 16\text{mg/ml}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{Maka, sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{stok ekstrak} \times \text{volume} \\
&= 16\text{mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\
&= 800 \text{ mg} \\
&= 0,8 \text{ gram}
\end{aligned}$$

Cara pembuatan ekstrak daun kitolod 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.

3) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 800 mg/KgBB tikus

Dosis ekstrak = 800 mg/KgBB

Berat badan tikus diasumsikan = 200 gram = 0,2 Kg

Dosis pemberian tikus 200 gram = Dosis ekstrak x Berat badan tikus

= 800 mg/KgBB x 0,2 Kg

= 160 mg

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

= $\frac{160 \text{ mg/KgBB}}{5 \text{ ml}}$

= 32 mg/ml

Maka sediaan sebanyak 50ml = Stok ekstrak x Volume

= 32 mg/ml x 50 ml

= 1600 mg

= 1,6 gram

Cara pembuatan ekstrak daun kitolod dengan dosis 800 mg/KgBB tikus yaitu:

Ekstrak daun kitolod ditimbang sebanyak 1,6 gram dibuat

dalam larutan dengan cara melarutkan ekstrak yang ditambah dengan CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml.

b. Penentuan dosis simvastatin

Dosis yang digunakan untuk manusia dengan berat badan 70 kg adalah 20mg/hari. Nilai konversi dosis manusia ke tikus adalah 0,018 (Kusumawati, 2004). Dosis lazim simvastatin 10-40mg 1x sehari, sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24,48m

$$\text{Dosis manusia 70kg} = 24,48\text{mg/hari}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis simvastatin pada tikus} &= 0,018 \times \text{Dosis manusia} \\ &= 0,018 \times 24,48 \text{ mg/hari} \\ &= 0,446 \text{ mg/200 gramBB/hari}\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi stok simvastatin} &= \frac{\text{Dosis tikus}}{\text{Volume pemberian}} \\ &= \frac{0,44 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\ &= 0,089 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Maka sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{Stok simvastatin} \times \text{volume} \\ &= 0,089 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\ &= 4,46 \text{ mg}\end{aligned}$$

Berat 1 tablet simvastatin dengan dosis 20 mg adalah 161 mg

Berat tablet yang dibutuhkan untuk membuat sediaan 50 ml :

$$\frac{4,46}{x} = \frac{20 \text{ mg}}{161 \text{ mg}}$$

$$x = \frac{4,4 \text{ mg} \times 161 \text{ mg}}{20 \text{ mg}}$$

$$x = 36 \text{ mg}$$

Cara pembuatan larutan simvastatin, yaitu :

Simvastatin 3,6 mg dibuat dalam bentuk larutan dengan cara melarutkan simvastatin yang ditambah dengan CMC-Na 0,5% secukupnya kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 50ml.

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

$$\text{CMC-Na } 0,55 = \frac{0,5 \text{ gram}}{100} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,5 \text{ gram}$$

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, 2014).

- d. Pembuatan Pakan 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 150 gram untuk tiap tikus yang diberikan secara oral. Diet 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, tambahkan air sampai volume 150 gram ke dalam korpus emulsi sambil di aduk cepat sehingga terbentuk emulsi yang halus. Pakan penginduksi ini selalu dibuat baru setiap harinya dan diberikan secepatnya untuk menghindari penggumpalan minyak lemak sapi.

Perhitungan :

$$\text{Volume pemberian} = 5 \text{ ml}/200 \text{ gram tikus, } 1 \text{ ml} = 1 \text{ gram}$$

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

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

$$\begin{aligned} \text{Minyak jelantah} &= \frac{20\%}{100\%} \times 5 \text{ gram} \\ &= 1 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuning telur} &= \frac{20\%}{100\%} \times 5 \text{ gram} \\ &= 1 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aquadest} &= \frac{50\%}{100\%} \times 5 \text{ gram} \\ &= 2,5 \text{ gram} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok 150 gram :

$$\begin{aligned} \text{Lemak sapi} &= \frac{10\%}{100\%} \times 150 \text{ gram} \\ &= 15 \text{ gram} \end{aligned}$$

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

$$= 30 \text{ gram}$$

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

$$= 30 \text{ gram}$$

$$\text{Aquadest} = \frac{50\%}{100\%} \times 150 \text{ gram}$$

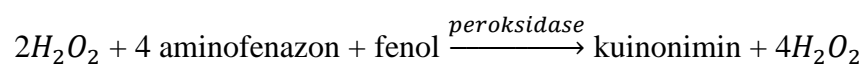
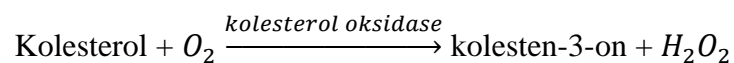
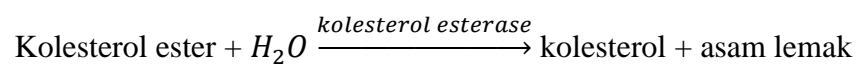
$$= 75 \text{ gram}$$

Maka 15 gram lemak sapi ditambah 30 gram minyak jelantah dan ditambah 30 gram telur puyuh diaduk hingga homogen, ditambah CMC-Na 0,5% secukupnya dan ditambah aquadest ad 150gram.

8. Pengukuran kadar kolesterol total

Kadar kolesterol total dilakukan dengan metode kolorimetri enzimatik, melalui proses hidrolisis dan oksidasi enzimatik, dengan kolesterol esterase, kolesterol oksidase dan peroksidase sebagai katalisator.

Prinsip :



Pengukuran kadar kolesterol total (*Cholesterol liquicolor CHOD-PAP*

Method Manual, 2013) dilakukan dengan cara:

Tabel 3.2. Jumlah aquabides, sampel plasma, standar kolesterol total, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar kolesterol total.

| Bahan | Kuvet | | |
|-------------------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | Blanko (μL) | Standar (μL) | Sampel (μL) |
| Sampel plasma | - | - | 10 |
| Standar kolesterol total | - | 10 | - |
| Larutan reagen kit kolesterol total | 1000 | 1000 | 1000 |

Kuvet yang telah ditambahkan sesuai dengan Tabel, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit, pada suhu 20-25°C. Serapan sampel (Asampel) dan standar (Astandar) diukur terhadap blanko pada panjang gelombang 500 nm.

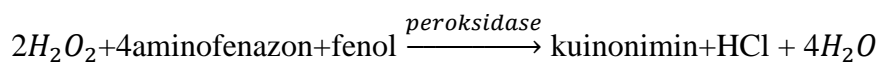
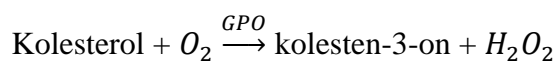
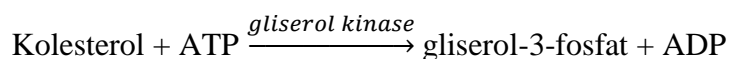
Kadar kolesterol total dihitung dengan rumus :

$$C \text{ kolesterol total (mg/dl)} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ standar (1)}$$

9. Pengukuran kadar trigliserida

Pengukuran kadar trigliserida dilakukan dengan metode kolorimetri enzimatik menggunakan gliserol-3-fosfat oksidase (GPO).

Prinsip :



Pengukuran kadar trigliserida (*Triglycerides GPO/PAP Method Manual, 2013*) dilakukan dengan cara :

Tabel 3.3. Jumlah sampel plasma, standar kolesterol total, dan reagen kit trigliserida yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar trigliserida

| Bahan | Kuvet | | |
|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | Blanko (μL) | Standar (μL) | Sampel (μL) |
| Sampel plasma | - | - | 10 |
| Standar kolesterol total | - | 10 | - |
| Larutan reagen kit trigliserida | 1000 | 10000 | 1000 |

Kuvet yang telah ditambahkan sesuai tabel, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C. Serapan sampel (Asampel) dan standar (Astandar) diukur terhadap blanko pada panjang gelombang 500nm.

Kadar trigliserida dapat dihitung dengan rumus :

$$C \text{ trigliserida (mg/dl)} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \times C \text{ standar} \dots(2)$$

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 isis, 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 memasukan data-data hasil penelitian kedalam program aplikasi statistik SPSS (*Satistical 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 yang didapat dari hasil penelitian, dianalisis menggunakan SPSS for windows 25 dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang digunakan adalah selisih *pre test* dan *post test*. Normalitas diuji dengan menggunakan uji Saphiro-wilk (sampel <50), dan uji homogenitas dengan Levene test. Data yang terdistribusi normal dan homogen dengan sig >0,05 diuji dengan anova satu jalan, dilakukan uji LSD jika sig < 0,05. Jika salah satu atau keduanya tidak normal dan tidak homogen (sig >0,05) maka dilakukan uji Kruskal Wallis, dilakukan uji Mann Withney jika sig <0,05(Dahlan, 2011).