

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain penelitian pre and post test group design.

##### *Pre Test Post Test*

Kelompok	7 hari	22 hari	Induksi	35 Hari	Perlakuan
	Adaptasi				
	↑		↑		↑
	KELOMPOK	INDUKSI	PERLAKUAN		
<b>KNo</b>	PS				PS
<b>Kneg</b>	PTK				PTK
<b>KP</b>	PTK			PTK+ Simvastatin 0,36 mg/200gramBB/Hari	
<b>P1</b>	PTK			PTK+ EDMA 100mg/Kg/BB	
<b>P2</b>	PTK			PTK+ EDMA 200mg/Kg/BB	
<b>P3</b>	PTK			PTK+ EDMA 400mg/Kg/BB	

Tabel 3.1 Desain Penelitian selama 35 hari

Keterangan

PTK : Pakan Tinggi Kolesterol

PS : Pakan Standar

EDMA : Ekstrak Daun Semanggi Air

P : Perlakuan

KNo : Kelompok Normal

KP : Kelompok Positif

KNeg: Kelompok Negatif

## B. Lokasi dan Waktu Penelitian

### 1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak daun semanggi air di Laboratorium Fitokimia dan Instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

### 2. Waktu: Bulan April – Agustus 2020

## C. Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun semanggi air (*marsilea crenata*) yang diperoleh dari daerah Surabaya, Jawa Timur. Teknik sampling 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 6 kelompok, sehingga :

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

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

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

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

$$\begin{aligned} (n-1) &\geq 3,75 \\ n &\geq 3,75+1 \\ n &\geq 5 \end{aligned}$$

pada penelitian ini digunakan 6 kelompok (t-5). berdasarkan perhitungan rumus Federer maka digunakan minimal 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus jantan
- 2) Berat badan tikus 180-200 gram
- 3) Umur 2-3 bulan dengan kondisi sehat

b. Kriteria eksklusi

- 1) Tikus mati atau sakit selama masa penelitian

**D. Definisi Operasional**

- a. Ekstrak daun semanggi air (*marsilea crenata*) adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Pada penelitian ini dengan dosis yang diberikan 100 mg/kgBB tikus, 200 mg/kgBB tikus, dan 400 mg/kgBB..
- b. Trigliserida ester dari alkohol gliserol dengan asam lemak. Merupakan bentuk simpanan lemak didalam tubuh yang yang berfungsi sebagai sumber energi. diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun semanggi air (*marselea crenata*).

Alat Ukur : Spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm

Hasil Ukur : mg/dl

Skala : Rasio

- c. Kolesterol total adalah keseluruhan jumlah kolesterol yang ditemukan dalam darah, terdiri dari kolesterol LDL, kolesterol HDL, dan 20 % Trigliserida diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun semanggi air (*marselea crenata*).

Alat Ukur : Spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm

Hasil Ukur : mg/dl

Skala : Rasio

## **E. Pengumpulan Data**

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Rotary evaporator* RE 100-Pro, waterbath Memmert, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240, kuvet semimikro, sentrifugator (Hettich EBA), pipet ukur, spuit, sonde oral, mikro pipet, neraca analitik OHAUS, timbangan hewan, vortex (Fisson), alat-alat gelas (Pyrex), kertas saring kandang hewan, tempat makan dan minum hewan.

### 2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Semanggi Air. Bahan utama lainnya yaitu : makanan diet lemak tinggi (MDLT), reagen kit kolesterol total (DIASYS), reagen kit trigliserida (DIASYS), Etil Asetat, Simvastatin, makanan standar tikus putih, CMC-Na 0,1%, aquadest dan pereaksi kimia (serbuk magnesium, asam klorida, amil alkohol, kloroform, asam asetat anhidrida, asam sulfat pekat )

### 3. Determinasi tanaman

Determinasi Daun Semanggi Air (*Marselea Crenata* ) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro.

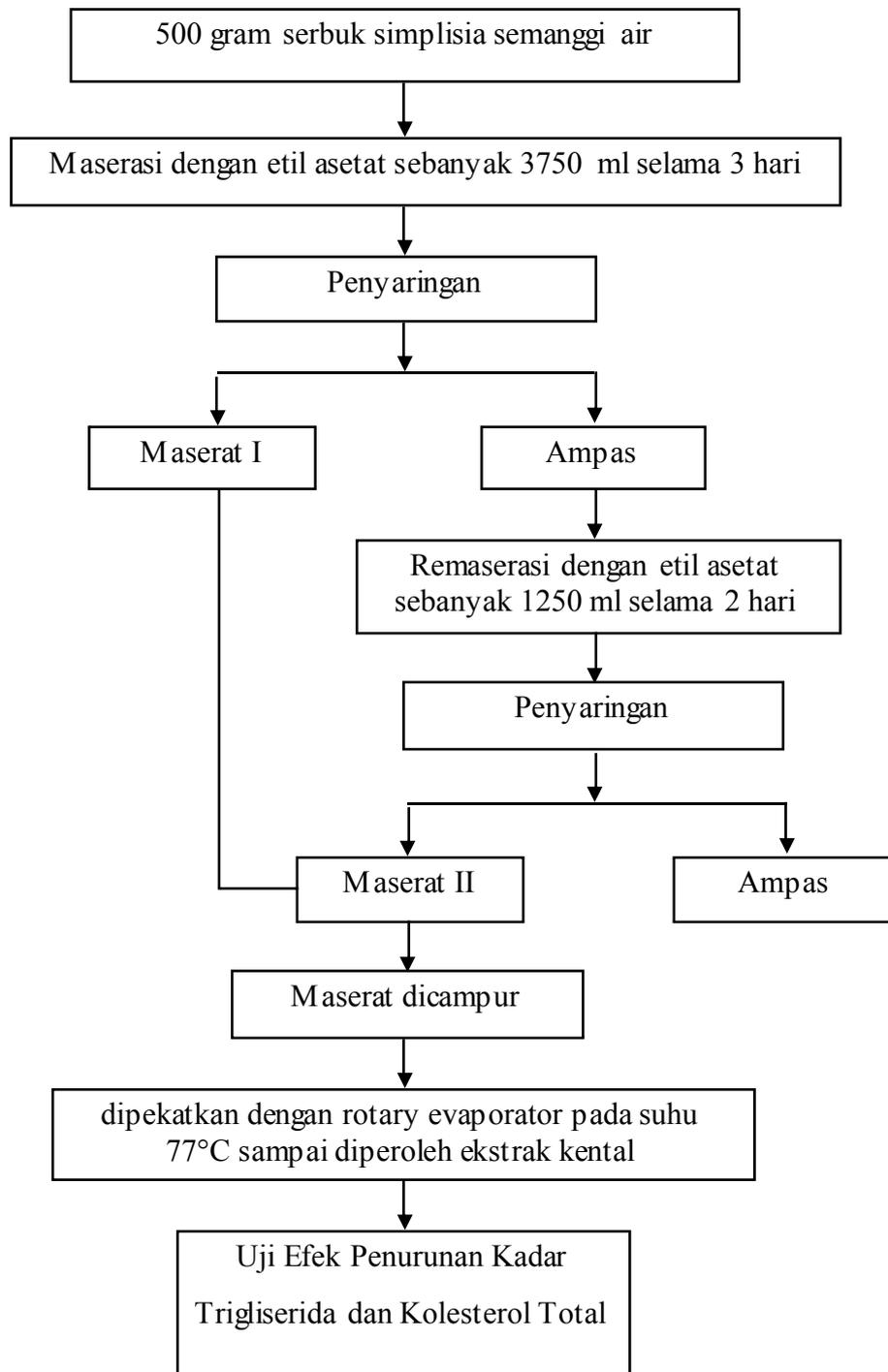
#### 4. Penyiapan bahan

Daun Semanggi Air yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. Setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian dilakukan ekstraksi (Karyati,2013).

#### 5. Pembuatan ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi (Wijaya *et al.*, 2014). Sampel yang telah dihaluskan dalam bentuk serbuk ditimbang 500 gram kemudian dimaserasi dengan etil asetat sebanyak 5000 mL dengan rasio sampel:pelarut adalah 1:10 selama 24 jam (digabung dari 2x ekstraksi). Selanjutnya filtrat dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*. Hasil ekstrak yang telah di evaporasi dipanaskan diatas Waterbath pada suhu 77°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh dilakukan perhitungan. Rendemen yang dihitung adalah persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan dengan rumus :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100 \%$$



Gambar 3.1 Pembuatan ekstrak daun semanggi air

## 6. Uji fitokimia

### a. Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan dengan cara sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan ambil filtratnya 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker, 2006).

### b. Identifikasi steroid

Pemeriksaan steroid dan triterpenoid dilakukan dengan reaksi Lieberman Burchard. Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan kloroform, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrida dan beberapa tetes asam sulfat pekat. Hasil uji positif triterpenoid bila terbentuk warna hijau gelap. Hasil uji positif dari steroid bila terbentuk warna merah muda atau merah (Ciulei, 1984).

## 7. Pembuatan pakan tinggi kolesterol

Untuk menginduksi kenaikan kadar lipid pada tikus maka diberikan asupan tambahan berupa pakan diet lemak tinggi. Pakan tinggi lemak yang digunakan terdiri dari 10% lemak sapi, 20% minyak jelantah, dan 20% kuning telur burung puyuh yang dicampurkan dalam 125 ml untuk tiap tikus yang diberikan secara oral (Gunawan, Sitorus, & Rosidah, 2018)

a) Perhitungan pembuatan pakan kolesterol sebagai berikut :

Volume pemberian = 5 ml/200 gram tikus

Perbandingan pakan = lemak sapi : minyak jelantah :

kuning telur puyuh = 10% : 20% : 20%

Pemberian lemak sapi =  $\frac{10\%}{50\%}$  X 5 ml

= 1 ml

Pemberian minyak jelantah =  $\frac{20\%}{50\%}$  X 5 ml

= 2 ml

Pemberian kuning telur puyuh =  $\frac{20\%}{50\%}$  X 5 ml = 2 ml

Pemberian Aquadest =  $\frac{50\%}{50\%}$  X 5 ml = 5 ml

b) Pembuatan larutan stok pakan tinggi kolesterol 150 ml :

lemak sapi =  $\frac{10\%}{50\%}$  X 150 ml

= 30 ml

Minyak jelantah =  $\frac{20\%}{50\%}$  X 150 ml

= 60 ml

Kuning telur =  $\frac{20\%}{50\%}$  X 150 ml

= 60 ml

Aquadest =  $\frac{50\%}{50\%}$  X 150 ml

= 150 ml

Maka diet tinggi lemak dibuat dengan cara memanaskan lemak sapi yang berbentuk padatan sehingga diperoleh bentuk cair (minyak lemak

sapi) kemudian campurkan minyak sapi, minyak jelantah, kuning telur burung puyuh dan diaduk cepat sampai terbentuk korpus emulsi yang kemudian ditambahkan air sampai dengan volume 150 ml kedalam korpus emulsi tetap sambil diaduk cepat sehingga terbentuk emulsi yang halus. pakan induksi selalu dibuat baru setiap harinya dan diberikan secepatnya untuk menghindari penggumpalan minyak lemak sapi (Gunawan, *et al.*, 2018).

a) Pemberian Variasi Dosis Ekstrak Daun Semanggi Air

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

1) Dosis Ekstrak Semanggi Air 100mg/KgBB/Hari :

Dosis ekstrak	= 100mg/KgBB/Hari
Berat tikus di asumsikan	= 200 gram
Dosis pemberian tikus 200 gram	= 100 mg x 0,2 kg/hari
	= 20 mg/200 gram/hari
Volume pemberian tikus 200 gram	= 5 ml
Stok	= $\frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}}$
	= $\frac{20 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$
	= 4 mg/ml

(4mg ekstrak per 1 ml suspensi)

Volume stok = 30 ml

Maka = 4 mg x 30 ml

= 120 mg

= 0,12 gram

Sebanyak 200mg ekstrak semanggi air dilarutkan dalam suspensi CMC-Na 0,1% ad 30 ml.

2) Dosis Ekstrak Semanggi Air 200mg/KgBB/Hari :

Dosis ekstrak = 200mg/KgBB/Hari

Berat tikus diasumsikan = 200 gram

Dosis pemberian tikus 200gram = 200mg x 0,2 kg/hari

= 40 mg/200gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram = 5ml

Stok =  $\frac{dosis}{volume\ pemberian}$

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

= 8 mg/ml

(8 mg ekstrak per 1 ml suspensi)

Volume stok = 30 ml

Maka = 8 mg x 30 ml

= 240 mg

= 0,24 gram

Sebanyak 400 mg ekstrak semanggi air dilarutkan dalam suspensi CMC-Na 0,1 % ad 30 ml.

3) Dosis Ekstrak Semanggi Air 400mg/KgBB/Hari :

Dosis ekstrak = 400 mg/KgBB/Hari

Berat tikus diasumsikan = 200 gram

Dosis pemberian tikus 200 gram = 4mg x 0,2 kg/hari  
= 80 mg/200gram/hari

Volume pemberian tikus 200gram = 5 ml

Stok =  $\frac{dosis}{volume\ pemberian}$   
=  $\frac{80\ mg}{5\ ml}$   
= 16 mg/ml (16 mg ekstrak per 1 ml suspensi)

Volume stok = 30 ml

Maka = 16mg x 30ml  
= 480 mg  
= 0,48 gram

Sebanyak 800mg ekstrak semanggi air dilarutkan dalam suspensi CMC-Na 0,1% ad 30 ml

b) Penetapan dosis simvastatin

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

Dosis manusia 70kg = 20mg/hari

Dosis simvastatin pada tikus = 0,018 x 20 mg

$$= 0,36\text{mg}/200\text{gramBB}/\text{Hari}$$

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

$$\text{Berat tikus diasumsikan} = 200 \text{ gram}$$

$$\text{Stok simvastatin} = \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}}$$

$$= \frac{0,36 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,072 \text{ mg/ml}$$

Maka pembuatan larutan stok 50 ml simvastatin :

$$\text{Volume stok} = 0,072 \text{ mg/ml} \times 50$$

$$= 3,6 \text{ mg}$$

$$= 0,0036 \text{ gram}$$

Sebanyak 3,6 mg simvastatin dilarutkan dalam CMC-Na 0,1 % ad 50 ml.

c) Pembuatan suspensi CMC-Na 0,1 % b/v

Pembuatan CMC-Na 0,1% sebanyak 100 ml

$$\text{CMC-Na } 0,1\% = \frac{0,1 \text{ gram}}{100} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,1 \text{ gram}$$

CMC-Na 0,1 gram dimasukkan ke dalam mortir yang berisi aquades hangat 10 ml dan didiamkan selama 15 menit hingga memperoleh massa yang transparan lalu digerus sampai homogen. Selanjutnya diencerkan dengan menggunakan aquades dan dimasukkan kedalam labu ukur. Volume dicukupkan sampai 100 ml (Soriton *et al.*, 2014)

d) Pembuatan suspensi simvastatin sbb :

1 tablet simvastatin digerus, kemudian ditimbang

Berat tablet simvastatin 20mg = 200 mg

Suspensi dengan dosis 3,6 mg/50ml

$$= \frac{3,6 \text{ mg}}{20 \text{ mg}} \times 200 \text{ mg}$$

$$= 36 \text{ mg/50ml}$$

$$= 0,036 \text{ gram/50ml}$$

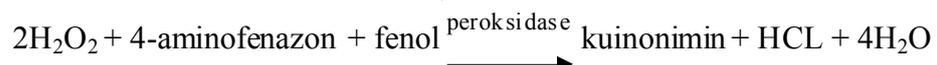
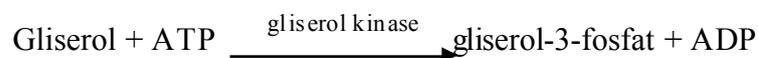
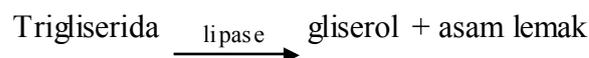
Serbuk simvastatin diambil sebanyak 0,036 gram dilarutkan dalam suspensi CMC-Na 0,1% dan dicukupkan dengan air ad 50 ml.

8. Pengukuran kadar trigliserida dan kolesterol total dalam plasma darah

a) 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 :

1. Darah yang telah dimasukan dalam tabung dibiarkan selama 10-20 menit.
2. Mensentrifuge dalam alat sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
3. Menyiapkan tiga buah tabung serologi dan memipet serum dengan prosedur seperti pada tabel.

Tabel 3.1 Jumlah sampel plasma, standar Kolesterol Total, dan reagen Kit Trigliserida yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar Trigliserida

<b>Kuvet</b>			
Bahan	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Sampel plasma standar	-	-	10
Kolesterol total	-	10	-
Larutan reagen kit trigliserida	1000	10000	1000

4. Mencampur masing-masing tabung dan menginkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25C atau 10 menit pada suhu 37C .
5. Membaca absorbansi sampel dan standar pada panjang gelombang 500 nm dalam waktu 60 menit.

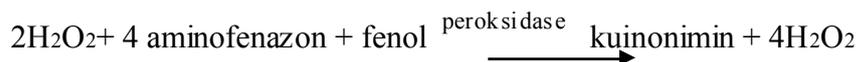
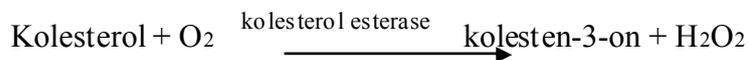
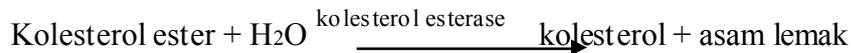
Kadar trigliserida dapat dihitung dengan rumus :

$$C \text{ Trigliserida } \left( \frac{mg}{dl} \right) = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ standar}$$

b) 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 Manua, 2013*) dilakukan dengan cara :

1. Darah yang telah dimasukkan dalam tabung dibiarkan selama 10-20 menit.
2. Mensentrifuge dalam alat sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
3. Memisahkan serum (bagian yang jernih) kemudian dimasukkan dalam tabung serologi yang bersih dan kering.

Tabel 3.2 jumlah Aquabides, sampel plasma, standar Kolesterol Total dan reagen kit Kolesterol Total yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar Kolesterol Total.

<b>Kuvet</b>			
Bahan	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Sampel plasma standar	-	-	10
Kolesterol total	-	10	-
Larutan reagen kit trigliserida	1000	10000	1000

Kadar kolesterol total dihitung dengan rumus :

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

## 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*

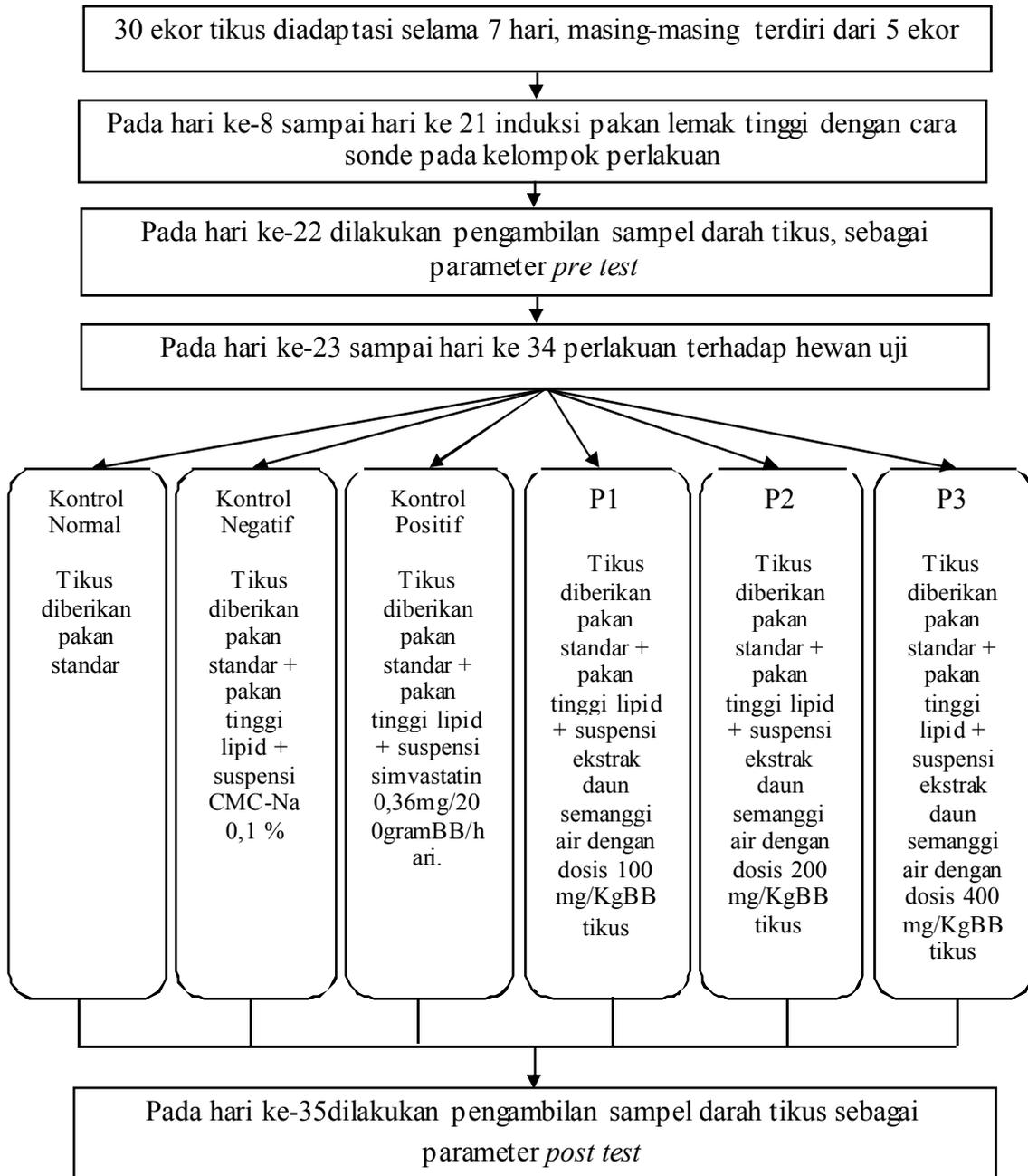
*Cleansing* merupakan bagian pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan untuk menghindari kesalahan pengetikan.

## **G. Analisa Data**

Data yang didapat dari hasil penelitian, dianalisis menggunakan SPSS for windows 25 dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang digunakan adalah hasil selisih, pre test dikurangkan dengan post test. Normalitas data diuji dengan menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel kecil (<50), dan diuji homogenitas dengan *Levene test*. Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji dengan Anova satu jalan kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui pengaruh perbedaan terhadap penurunan kadar trigliserida dan kolesterol total pada tikus putih jantan pada masing-masing kelompok perlakuan. Jika tidak homogen maka akan dilanjutkan dengan uji Post Hoc Test . (Dahlan, 2011).

## H. Skema uji penurunan kadar Trigliserida dan Kolesterol Total Tikus

### Putih Jantan.



Gambar 3.2 Skema Uji Penurunan Kadar Kolesterol Total Tikus Putih Jantan