

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan desain penelitian pre and post test group design. Metode eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari perlakuan dalam kondisi terkendali (Sugiyono, 2012).

KELOMPOK	PERLAKUAN
Kontrol Normal	Pakan Biasa ( BR)
Kontrol Negatif	PTL + BR
<b>P1</b>	BR + PTL + ekstrak daun semanggi air 100mg/Kg/BB
<b>P2</b>	BR + PTL + ekstrak daun semanggi air 200mg/Kg/BB
<b>P3</b>	BR + PTL + ekstrak daun semanggi air 400mg/Kg/BB

#### B. Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 1. Lokasi

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

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

### C. Sampel dan Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah cara acak (Random sampling). Penentuan jumlah sampel hewan uji menggunakan rumus Federer (1991), sebagai berikut:

$$\text{Rumus Federer: } (n-1)(t-1) \geq 15$$

Ket: n = jumlah tikus per kelompok

t = jumlah kelompok

$$(n-1)(t-1) \geq 15 \rightarrow (t=5)$$

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

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

$$4n-4 \geq 15 \rightarrow 4n \geq 19 \rightarrow 4,75 \rightarrow n = 5 \text{ ekor}$$

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

#### a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus jantan
- 2) Berat badan tikus 140-200 gram
- 3) Umur 2-3 bulan dengan kondisi sehat

#### b. Kriteria eksklusi

- 1) Tikus mati atau sakit selama masa penelitian

#### D. Definisi Oprasional

1. Ekstrak Daun Semanggi Air adalah Ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi. Pada penelitian ini dosis yang diberikan adalah 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400mg/kgBB.
2. Kolesterol HDL adalah Lipoprotein berdensitas tinggi. HDL dikenal sebagai kolesterol baik karena membawa kolesterol LDL, trigliserida, dan lemak yang berbahaya dan mengembalikannya ke dalam hati untuk diproses. Saat HDL mencapai hati, hati akan mengurai LDL mengubahnya menjadi empedu dan mengeluarkannya dari tubuh. Kadar HDL diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun semanggi air (*Marsilea crenata*).

Alat ukur : Spektrofotometer

Hasil ukur : mg/dL

Skala : Rasio

3. Kolesterol LDL adalah kolesterol yang dapat melekat pada dinding pembuluh darah arteri, membentuk plak yang membuat arteri menjadi sempit dan kurang fleksibel (ateroklerosis). Kondisi inilah yang sering menyebabkan penyakit jantung koroner dan stroke. Kadar LDL diukur setelah tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak daun semanggi air (*Marsilea crenata*)

Alat Ukur : Menggunakan rumus Friedewald

$$Kolesterol_{LDL} = Kolesterol_{total} - \frac{Trigliserida}{5} - Kolesterol_{HDL}$$

Hasil Ukur : mg/dL

Skala : Rasio

## **E. Alat dan bahan**

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah wadah penampung, Gelas ukur, ayakan, rotary evaporator, neraca analitik, batang pengaduk, kertas saring, labu takar, cawan penguap, sentrifugator, spektrofotometri, toples kaca, kandang tikus, tutup kandang tikus, botol air, timbangan hewan, sonde oral, mikro pipet, sarung tangan.

### 2. Bahan

- a. Hewan Uji : Tikus putih jantan galur wistar yang berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 150-200 gram
- b. Bahan : Daun semanggi air (*Marsilea crenata*), kuning telur puyuh, lemak sapi, minyak jelantah, CMC-Na 0,1%, etil asetat, Aquadest, Reagen kit kolesterol total, Reagen presipitasi HDL.

## **F. Prosedur penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Program Studi Biologi Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dari tanaman semanggi air (*Marsilea crenata*) yang akan digunakan dalam penelitian.

## 2. Penyiapan Bahan

Daun semanggi air (*Marsilea crenata*) diperoleh dari daerah Surabaya. Bahan yang telah diperoleh dari pengumpulan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, tiriskan, kemudian diangin-anginkan ditempat 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.

## 3. Pembuatan ekstrak etil asetat serbuk semanggi

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etil asetat. Pada penelitian yang dilakukan Handoko *et al.* (2019) daun semanggi air yang diekstrak menggunakan rasio pelarut etil asetat 100% mempunyai total flavonoid paling tinggi yaitu  $29.47 \pm 0.30$  mg. Pada penelitian yang dilakukan Pradyasub dan Pimsamarn (2011) ekstrak etil asetat Semanggi Air memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (70.19 mg/L) dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan etanol dari tumbuhan paku lainnya.

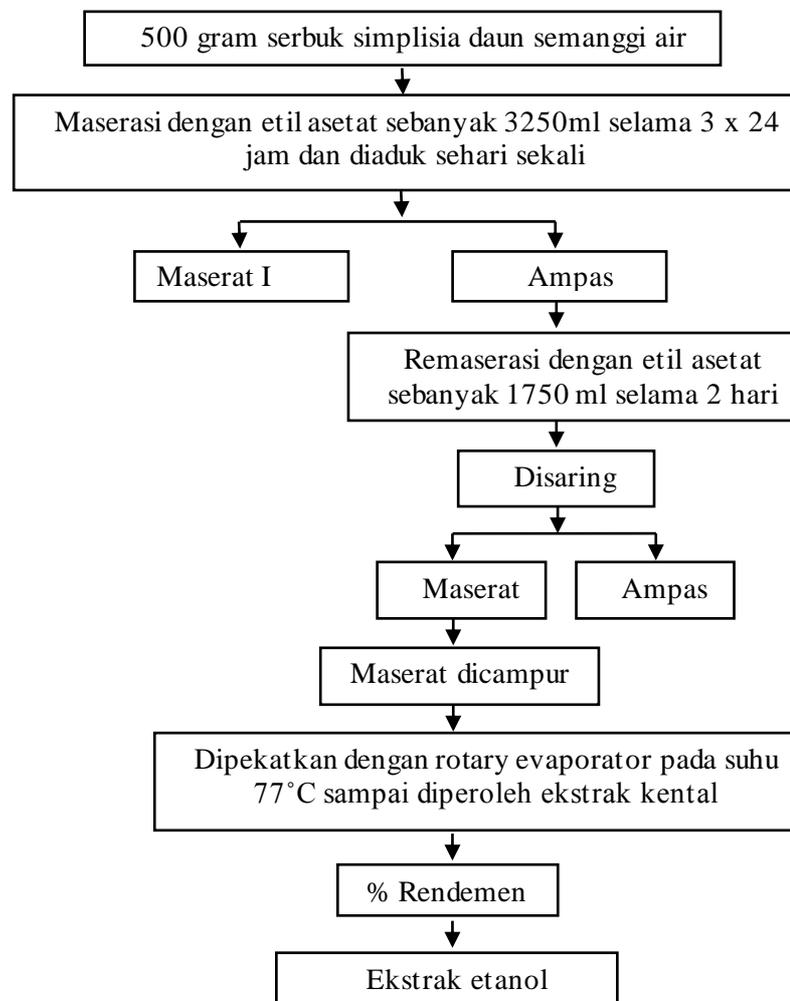
Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi (Wijaya *et al.*, 2014). Sampel yang telah dihaluskan dalam bentuk serbuk ditimbang 500 gram kemudian dimaserasi dengan etil asetat sebanyak 5000 mL dengan rasio sampel:pelarut adalah 1:10 selama 24 jam. Selanjutnya filtrate

dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 77°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh dilakukan perhitungan.

Kemudian untuk rendemen dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

#### 4. Skema Ekstraksi Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*)



Gambar 3.1 Skema Ekstrak Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*)

#### G. Uji fitokimia

1. 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).

2. 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).

## H. Prosedur Kerja

1. Pembuatan Pakan Tinggi Lemak (PTL)

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 120 ml untuk tiap tikus yang diberikan secara oral (Gunawan *et al.* 2018)

Perhitungan :

Perbandingan pakan lemak sapi : minyak jelantah : kuning telur puyuh =  
10% : 20% : 20%

Pemberian lemak sapi	$= \frac{10\%}{50\%} \times 5 \text{ ml}$
	$= 1 \text{ ml}$
Pemberian minyak jelantah	$= \frac{20\%}{50\%} \times 5 \text{ ml}$
	$= 1 \text{ ml}$
Pemberian kuning telur puyuh	$= \frac{20\%}{50\%} \times 5 \text{ ml}$
	$= 1 \text{ ml}$
Pemberian Aquadest	$= \frac{50\%}{50\%} \times 5 \text{ ml}$
	$= 5 \text{ ml}$
Volume pemberian	$= 5 \text{ ml}/200 \text{ gram tikus}$

Pembuatan larutan stok 125 ml :

lemak sapi	$= \frac{10\%}{50\%} \times 125 \text{ ml}$
	$= 25 \text{ ml}$
Minyak jelantah	$= \frac{20\%}{50\%} \times 125 \text{ ml}$
	$= 50 \text{ ml}$
Kuning telur	$= \frac{20\%}{50\%} \times 125 \text{ ml}$
	$= 50 \text{ ml}$
Aquadest	$= \frac{50\%}{50\%} \times 125 \text{ ml}$
	$= 125 \text{ ml}$

Diet tinggi lemak dibuat dengan cara memanaskan lemak sapi yang berbentuk padatan sehingga diperoleh bentuk cair (minyak lemak sapi). Minyak sapi, minyak jelantah, kuning telur burung puyuh dan diaduk sampai terbentuk korpus emulsi selanjutnya ditambahkan air sampai dengan volume 125 ml 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).

## 2. Penetapan dosis ekstrak semanggi

Pemberian maksimal peroral pada tikus 100 gram adalah 5 ml (kusumawati,2004). Disarankan takaran dosis tidak sampai melebihi awtwngah kali dosis maksimalnya (Setiawan dan Saryono, 2010) , karena apabila volume bahan uji melebihi volume lambung, maka bisa menyebabkan dilatasi lambung secara akut yang dapat membuat robeknya saluran cerna. Berat rata-rata tikus yang digunakan adalah 200 gram, 200 gram/100 gram x 5ml = 10 ml. Volume pemberian peroral adalah setengah dari pemberian maksimal yaitu diberikan 5 ml. Dalam penelitian ini akan menggunakan dosis 100 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, dan 400 mg/Kg BB.

Dosis ekstrak semanggi air:

1. Dosis ekstrak = 100 mg/KgBB
- Berat tikus di asumsikan = 200 gram
- Dosis pemberian tikus 200 gram = 100 mg x 0,2 kg
- = 20mg/200 gram
- Volume pemberian tikus 200 gram = 5ml

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

$$= \frac{20\text{mg}}{5\text{ml}}$$

$$= 4\text{mg/ml}$$

Volume stok = 30 ml

Maka = 4 mg x 30 ml

$$= 120 \text{ mg}$$

Sebanyak 120mg ekstrak semanggi air dilarutkan suspense CMC-Na 0,1% ad 30ml.

2. Dosis ekstrak = 200 mg/KgBB/Hari  
 Berat tikus di asumsikan = 200 gram  
 Dosis pemberian tikus 200 gram = 200 mg x 0,2 kg/hari  
 = 40/200 gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram = 5 ml

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}} \\ &= \frac{40\text{mg}}{5\text{ml}} \\ &= 8\text{mg/ml} \end{aligned}$$

Volume stok = 30 ml

Maka = 8 mg x 30 ml  
 = 240 mg

Sebanyak 240mg ekstrak semanggi air dilarutkan suspense CMC-Na 0,1% ad 30ml.

3. Dosis ekstrak = 400 mg/KgBB  
 Berat tikus di asumsikan = 200 gram  
 Dosis pemberian tikus 200 gram = 400 mg x 0,2 kg  
 = 80/200 gram/hari

Volume pemberian tikus 200 gram = 5 ml

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}} \\ &= \frac{80\text{mg}}{5\text{ml}} \end{aligned}$$

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

$$\text{Volume stok} = 30 \text{ ml}$$

$$\text{Maka} = 16\text{mg} \times 30 \text{ ml}$$

$$= 480 \text{ mg}$$

Sebanyak 480mg ekstrak semanggi air dilarutkan suspensi CMC-Na 0,1% ad 50ml.

#### 4. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,1 % <sup>b</sup>/<sub>v</sub>

Pembuatan CMC-Na 0,1% sebanyak 100 ml

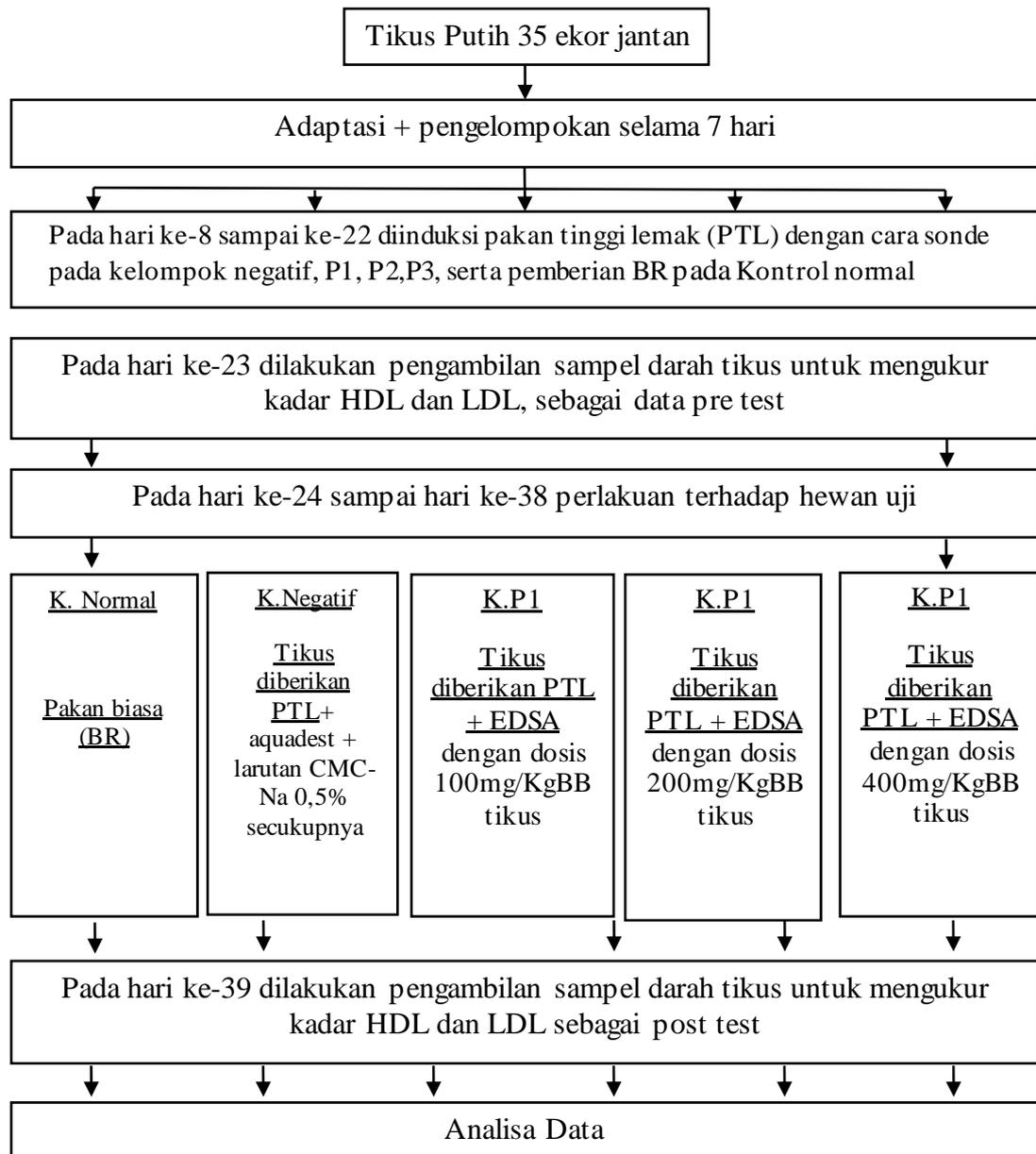
$$\text{CMC} - \text{Na } 0,1 \% = \frac{0,1 \text{ gram}}{100} \times 100\%$$

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

CMC-Na 0,1 gram dimasukkan kedalam 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 (Soritonskk,2014)

#### 5. **Skema Uji Penurunan Kadar Kolesterol LDL dan HDL tikus putih jantan**



Gambar 3.2 Skema Uji Peningkatan dan penurunan LDL dan HDL Tikus Putih Jantan

## 6. Uji Peningkatan dan Penurunan LDL dan HDL Tikus Putih Jantan

Kelompok Hewan Uji	Perlakuan Hari ke-				
	0-7	8-22	23	24-38	39
Kelompok Normal	Adaptasi	BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (pre test)	BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (Post test)
Kelompok negatif	Adaptasi	PTL + BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (pre test)	PTL + BR + Aquadest + Lar. CMC-Na 0,5 %	Pengukuran kadar HDL & LDL (Post test)
Kelompok dosis 100 mg/KgBB	Adaptasi	PTL + BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (pre test)	PTL + BR + EDSA 100mg/KgB	Pengukuran kadar HDL & LDL (Post test)
Kelompok dosis 200 mg/KgBB	Adaptasi	PTL + BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (pre test)	PTL + BR + EDSA 200mg/KgB	Pengukuran kadar HDL & LDL (Post test)
Kelompok dosis 400 mg/KgBB	Adaptasi	PTL + BR	Pengukuran kadar HDL & LDL (pre test)	PTL + BR + EDSA 400mg/KgB	Pengukuran kadar HDL & LDL (Post test)

Keterangan :

1. PLT = Pakan Tinggi Lemak
2. BR = Pakan biasa
3. EDSA = Ekstrak Daun Semanggi Air

Tabel 3.3 Perlakuan terhadap seluruh kelompok hewan uji

a. Prosedur uji peningkatan kadar LDL dan penurunan kadar HDL

1. Tahap pertama

Pada tahap pertama seluruh tikus mengalami adaptasi selama 7 hari dan dilakukan pengelompokan secara acak dan ditimbang berat badannya

2. Tahap kedua

- Pada hari ke-8 sampai hari ke-22 pemberian pakan biasa (BR) pada kontrol normal, dan induksi pakan tinggi lemak dengan cara sonde pada kelompok negatif, kelompok P1, kelompok P2, dan kelompok P3. Kemudian seluruh tikus ditimbang berat badannya
3. Pada hari ke-23 dilakukan pengambilan sampel darah tikus untuk mengetahui kadar HDL dan LDL sebagai data pre test.

- a. Pengukuran kadar HDL

Pengukuran kadar HDL dilakukan dengan terlebih dahulu 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 standart HDL masing-masing dipipet 200 $\mu$ L ke dalam mikrotube ruang, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatant jernih dipipet dan dilakukan penetapan kadar HDL, menggunakan reagen kit kolesterol total. Jumlah akuabides, sampel, standart, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan dalam penetapan HDL, untuk dimasukkan ke dalam kuvet sesuai dengan tabel 3.2

Tabel 3.4 Jumlah aquadest, supernatant sampel plasma, supernatant standart HDL, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan untuk pengukuran kadar HDL

Bahan	Kuvet		
	Blanko ( $\mu\text{L}$ )	Standar ( $\mu\text{L}$ )	Sampel ( $\mu\text{L}$ )
Akuabides	100	-	-
Supernatan sampel plasma	-	-	100
Supernatant standart HDL	-	100	-
Larutan reagen kit kolesterol	1000	1000	1000

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

$$CHDL \left( \frac{mg}{dl} \right) = \frac{Asampel}{Astandar} \times Cstandar$$

b. Pengukuran kadar LDL

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

$$Kolesterl LDL = Kolesterol total - \frac{\text{Trigliserida}}{5} - Kolesterol HDL$$

4. Tahap Keempat

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

- a. Kelompok normal : Tikus diberikan pakan biasa (BR)

- b. Kelompok negatif : Tikus diberikan PLT, aquadest ditambah larutan CMC-Na 0,5% secukupnya.
- c. Kelompok P1 : Tikus diberikan PLT dan ekstrak daun semanggi air dengan dosis 100 mg/KgBB tikus
- d. Kelompok P2 : Tikus diberikan PLT dan ekstrak daun semanggi air dengan dosis 200 mg/KgBB tikus
- e. Kelompok P3 : Tikus diberikan PLT dan ekstrak daun semanggi air 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 semanggi air sebagai post test.

**G. Analisa Data**

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental murni pre and post test group design. Data yang digunakan adalah hasil selisih pre test dengan post test. Data dianalisis dengan SPSS for windows 25 dengan taraf 95% kepercayaan. Normalitas data diuji dengan menggunakan uji Saphiro-wilk ( $< 0,05$ ). Data kemudian diuji homogenitas dengan *Levene test* ( $p > 0,05$ ). Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji dengan Anova satu jalan kemudian dilanjutkan dengan uji LSD, jika tidak homogen maka akan dilanjutkan dengan uji post hoc test (Dahlan, 2011)