

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini membutuhkan alat dan bahan sebagai berikut :

3.1.1 Alat Penelitian

- Kandang tikus
- Tempat makanan dan minuman
- Timbangan analitik digital
- *Govage oral*
- Tabung *Eppendorf*
- *Mortir dan Stamfer*
- Inkubator
- Gelas ukur
- Sentrifugal
- *Micropipette*
- Stiker label
- *Fotometer Sumifin Chemistry Analyzer SF-1904C*

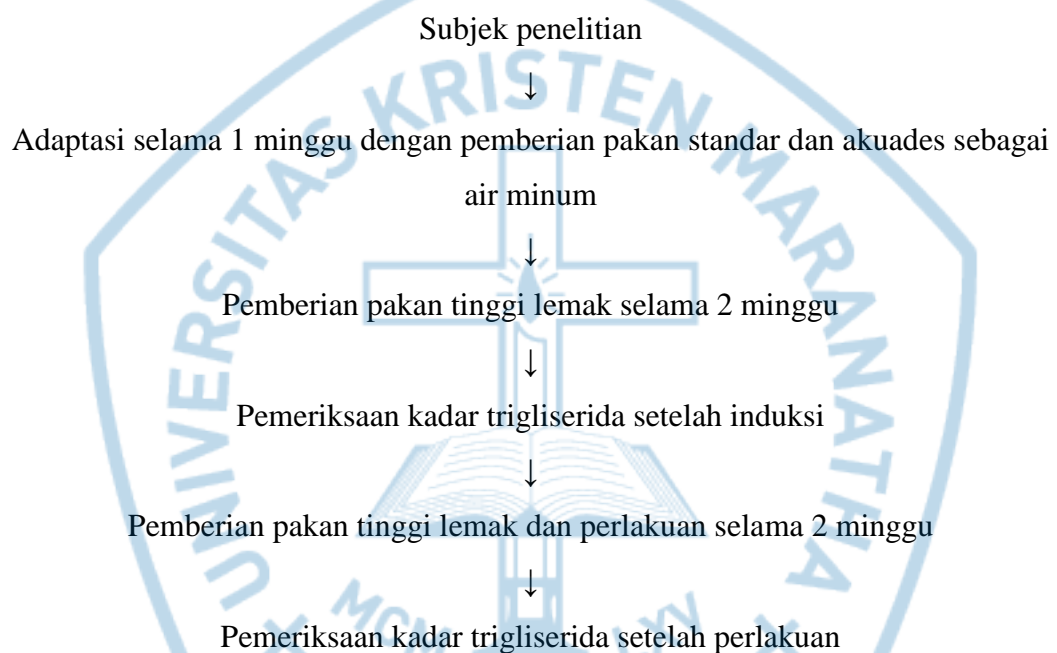
3.1.2 Bahan – Bahan Penelitian

- Ekstrak etanol daun yakon (*Smalanthus sonchifolius*)
- Akuades
- Makanan standar tikus (pellet)
- Makanan tinggi lemak
- *Carboxymethyl Cellulose (CMC) 1%*
- Gemfibrozil

3.2 Subjek/Objek Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* berumur 2-3 bulan, dengan berat rata-rata 150-200 gram yang diperoleh dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

Alur Penelitian



3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

- Lokasi : Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Bandung, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung
- Waktu : Desember 2017-Juni 2018

3.4 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer.³⁸

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

Keterangan :

t : banyaknya perlakuan pada penelitian

r : pengulangan (*replication*) atau n (jumlah sampel minimal yang dibutuhkan dalam tiap kelompok perlakuan)

Jadi :

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

$$(6 - 1)(r - 1) \geq 15$$

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4 \rightarrow (\text{drop out } 10\%) = 5$$

Maka, berdasarkan hasil perhitungan sampel, didapatkan minimal untuk setiap kelompok perlakuan adalah lima ekor tikus dalam tiap kelompok tikus.

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain eksperimental laboratorik, dengan menggunakan metode induksi secara eksogen dengan diet tinggi lemak.

3.5.2 Variabel Penelitian

Definisi Konsepsional Variabel

- Variable perlakuan

- Dosis ekstrak yakon dalam 3 varian dosis
- Kontrol positif
- Kontrol pembanding
- Kontrol negatif
- Variable respon
 - Kadar trigliserida tikus

3.5.3 Definisi Operasional

Beberapa definisi atau batasan operasional yang digunakan pada penelitian ini antara lain :

- Variable perlakuan
 - Tikus *Wistar* jantan model dislipidemia adalah tikus jantan galur *Wistar* yang telah diberikan pakan tinggi lemak selama 2 minggu.
 - Perlakuan diberikan makan selama 2 minggu. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 6 kelompok sebagai berikut:
 - EEDY dosis 1 : 45mg/kgBB/hari
 - EEDY dosis 2 : 67,5mg/kgBB/hari
 - EEDY dosis 3 : 90mg/kgBB/hari

Semua dosis dilarutkan dalam CMC 1%

 - Kontrol pembanding : Gemfibrozil dosis 108 mg/kgBB
 - Kontrol positif : akuades
 - Kontrol negatif : Pakan standard dan akuades
- Variable respon
 - Kadar trigliserida sebelum pemberian EEDY.
 - Kadar trigliserida setelah pemberian EEDY

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun yakon (*Smallanthus sonchifolius*) yang diperoleh dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut

Teknologi Bandung. Selanjutnya, pembuatan ekstraksi dilakukan dengan cara simplisia daun kering 1 kg direndam di dalam perkulator kemudian dihaluskan lalu dicampurkan dengan pelarut etanol 95% direndam selama semalam, kemudian hasil campuran tersebut difiltrasi menggunakan kertas saring, lalu diuapkan menggunakan alat rotavapor, dan dikeringkan dengan *waterbath* pada suhu 60°-70°C sampai ekstrak kental dan siap digunakan.

3.6.2 Persiapan Hewan Coba

Subjek penelitian adalah 24 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan dengan berat rata-rata 150-200 gram dengan umur rata-rata 2-3 bulan. Tikus-tikus tersebut diadaptasi dalam suasana laboratorium selama 7 hari sebelum percobaan dilakukan dan diberi pakan standar dan akuades sebagai air minum. Selanjutnya diinduksi pakan tinggi kolesterol selama 2 minggu, dengan kandungan sebagai berikut :³⁹

- Kuning telur bebek 5%
- Lemak kambing 10%
- Kolesterol 1%
- Minyak goreng 1%
- Makanan standar sampai 100%

Cara pembuatan pakan tinggi kolesterol: ³⁹

- Siapkan terlebih dahulu bahan pakan tinggi kolesterol.
- Telur bebek direbus sampai setengah jam. Setelah matang, bagian kuning telur dan putihnya dipisahkan. Kuning telur dihancurkan, lalu ditambahkan makanan standar, kolesterol, minyak goreng, dan dicampur merata.
- Air panas ditambahkan secukupnya kemudian diaduk merata.
- Lemak kambing lalu dipanaskan hingga meleleh lalu dicampurkan dengan adonan diatas, aduk secara merata kemudian digiling menjadi pelet.
- Pelet dibagi menjadi satu gelas untuk setiap kandang (setiap kandang terisi 4 ekor tikus *Wistar* jantan).

3.6.3 Pelaksanaan Penelitian

- Hewan coba akan diadaptasikan selama satu minggu dalam suasana laboratorium.
- Berat badan hewan coba ditimbang
- Sesudah diadaptasi, induksi tikus dengan pakan tinggi kolesterol selama 14 hari dan tetap diberikan air minum.
- Ukur kadar trigliserida setelah induksi pakan tinggi lemak.
- Setelah induksi, tikus (n total=24) dibagi secara acak menjadi 6 kelompok (n=4) dan masing-masing kelompok diberikan perlakuan secara acak sebagai berikut:
Dosis Ekstak Etanol Daun Yakon (EEDY):
 - Kelompok I (Kontrol negatif) : Pakan standar dan akuades
 - Kelompok II (EEDY dosis 1) : 45mg/kgBB/hari + CMC 1%
 - Kelompok III (EEDY dosis 2) : 67,5mg/kgBB/hari + CMC 1%
 - Kelompok IV (EEDY dosis 3) : 90mg/kgBB/hari + CMC 1%
 - Kelompok V (Kontrol positif) : Akuades
 - Kelompok VI (Kontrol pembanding) : Gemfibrozil dosis 108mg/kgBB
- Perlakuan diberikan setiap hari secara per oral sebanyak satu kali peroral setiap jam 9 pagi, dan malam sebelumnya diberikan pakan tinggi lemak terlebih dahulu, perlakuan dilakukan selama 14 hari. Hewan coba tetap diberi pakan tinggi lemak dan air minum selama perlakuan.
- Pemeriksaan kadar trigliserida setelah perlakuan diperiksa dengan alat *Fotometer Sumifin Chemistry Analyzer SF-1904C*, metode spektrofotometri. Pemeriksaan kadar Trigliserida dilakukan sebanyak 2 kali yaitu sebelum dan sesudah perlakuan pemberian EEDY selama 14 hari.
Prosedur pemeriksaan kadar trigliserida adalah sebagai berikut:
 - Tikus Wistar dipuasakan selama 12 jam sebelum pengumpulan sampel darah vena, dan hanya diberi minum akuades saja.
 - Sampel darah diambil dari vena ekor Tikus 3-5 ml dengan cara mengiris ujung ekor tikus.dan ditampung dalam tabung eppendrof.
 - Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit lalu serum darah dipisahkan untuk dipemeriksa kadar trigliseridanya.

- Kadar trigliserida darah diukur menggunakan alat *Fotometer Sumifin Chemistry Analyzer SF-1904C*.
- Cara kerja alat ini dilakukan untuk semua kelompok perlakuan

3.7 Analisis Data

3.7.1 Metode Analisis

Uji analisis data statistik dengan menggunakan metode *one way ANOVA* dengan menggunakan perangkat lunak komputer, kemudian dilanjutkan dengan uji beda rata-rata *Fisher LSD (Least Significant Difference)* berdasarkan nilai $\alpha \leq 0,05$. Kemaknaan ditentukan dengan $p < 0,05$.

3.7.2 Hipotesis Statistik

- H_0 = Tidak terdapat perbedaan persentase penurunan kadar trigliserida antar kelompok perlakuan.
- H_1 = Minimal terdapat sepasang kelompok memiliki penurunan kadar trigliserida yang sama.

3.7.3 Kriteria Uji

Hasil percobaan tersebut diuji dengan menggunakan kriteria uji sebagai berikut:

- Berdasarkan F_{hitung} dan F_{tabel} :
 - Jika $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ maka H_0 ditolak dan H_1 gagal ditolak
 - Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ maka H_0 gagal ditolak dan H_1 ditolak
- Berdasarkan perbandingan nilai p :
 - Jika $p < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 gagal ditolak
 - Jika $p \geq 0,05$ maka H_0 gagal ditolak dan H_1 ditolak

3.8 Etik Penelitian

Penelitian terhadap hewan coba ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha-Rumah Sakit Immanuel dengan surat keputusan NO: 077/KEP/III/2018 dan memperhatikan prinsip 3R, yaitu, *refinement*, *reduction*, *replacement* untuk mengetahui pengaruh konsumsi EEDY terhadap kontrol trigliserida pada tikus *Wistar* jantan model dislipidemia.

