

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) yang diperoleh dari daerah Kabupaten Madiun, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit putih yang dipilih secara acak dengan memilih rimpang yang masih bagus dari daerah Kabupaten Madiun, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah menggunakan ekstrak etanol rimpang kunyit putih yang diperoleh dari simplisia kering yang diserbuk. Variabel utama yang kedua adalah efek penurunan kadar kolesterol total dan kadar trigliserida yang diamati pada mencit putih jantan yang diinduksi PTU.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama mengidentifikasi dari semua variabel yang akan diteliti secara langsung. Variabel yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam

berbagai macam variabel yaitu, variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang diinginkan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis dari ekstrak etanol rimpang kunyit putih variasi dosis 5,6 mg/20g BB mencit, 11,4 mg/20g BB mencit, 16,8 mg/20g BB mencit, kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol normal.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik dari hewan uji mencit putih jantan meliputi berat badan, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, kondisi percobaan, laboratorium dan peniliti. Seorang peneliti dalam melakukan penelitian harus mempertimbangkan banyak hal agar mendapatkan hasil yang baik dalam membuktikan hipotesa dan mencari solusi atas kasus yang diteliti.

Variabel tergantung dalam penelitian ini merupakan kadar kolesterol total dan kadar trigliserida yang terdapat pada mencit putih jantan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol rimpang kunyit putih dengan berbagai konsentrasi yang terbagi dalam kelompok uji.

3. Definisi operasional variabel utama

3.1 Rimpang kunyit putih adalah tanaman yang diperoleh dari Kabupaten Madiun, Jawa Timur.

3.2 Ekstrak etanol kunyit putih adalah diperoleh dari pengeringan rimpang kunyit putih dengan cara ekstraksi metode maserasi menggunakan penyari etanol 96% yang diuapkan sampai pekat.

3.3 Suspensi etanol kunyit putih dibuat dengan konsentrasi 3% dengan variasi dosis yang diberikan 5,6 mg/20g BB mencit, 11,4 mg/20g BB mencit, 16,8 mg/20g BB mencit.

3.4 Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan yang memiliki berat badan 20 gram diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

3.5 Penginduksi PTU digunakan pada mencit putih jantan untuk meningkatkan kadar kolesterol dan trigliserida.

3.6 Metode Strip test *Multicheck* adalah metode yang digunakan untuk pengukuran kadar kolesterol total.

3.7 Metode enzimatis kolorimetri (GPO-PAP) adalah metode yang digunakan untuk pengukuran kadar trigliserida.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik *electronic scale* T luton GM-501, oven, evaporator *Ika Werke* (Heidolph), kandang mencit, tempat air minum mencit, jarum sonde, sputin injeksi, alat pengukur kolesterol strip test *Multicheck*, alat *sentrifuge*, spektrofotometri UV-

Vis (*Stardust Diasys FC*), kuvet, tabung *sentrifuge*, mikrohematokrit dan alat-alat gelas.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan sampel rimpang kunyit putih, etanol 96%, propiltiorasil, NaCMC 0,5%, pakan mencit, dan tablet simvastatin 10 mg.

3. Binatang percobaan

Binatang percobaan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat 20 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi rimpang kunyit putih

Dalam penelitian ini yang pertama dilakukan yaitu melakukan determinasi tanaman kunyit putih yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman secara makroskopis dari rimpang kunyit putih yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Tanaman rimpang kunyit putih diambil dari daerah Kabupaten Madiun, Jawa Timur. Diambil dari tanah dan dikumpulkan lalu dibersihkan dari kotoran dengan air dan dikeringkan.

3. Persiapan bahan

Tanaman rimpang kunyit putih diambil dari daerah Kabupaten Madiun, Jawa Timur. Rimpang kunyit putih yang dipilih adalah rimpang yang masih segar. Rimpang kunyit putih dipanen dan dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran dan cemaran kemudian dikeringkan.

4. Penetapan kelembaban serbuk rimpang kunyit putih

Penetapan kelembaban serbuk rimpang kunyit putih yang dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta, dengan cara serbuk masing-masing di timbang 2 gram, kemudian diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*. Waktu yang diperlukan dalam pengukuran adalah 4 menit untuk setiap pengukuran dan ditunggu sampai muncul angka dalam persen.

5. Pembuatan serbuk rimpang kunyit putih

Rimpang kunyit putih setelah pencucian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Setelah kering rimpang dihaluskan dengan alat penggiling, kemudian diayak menggunakan ayakan no 60. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat lalu dilakukan penelitian.

6. Pembuatan ekstrak etanol 96% rimpang kunyit putih

Serbuk kering yang sudah dibuat ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan dalam wadah maserasi. Metode maserasi dipilih karena prosesnya tidak perlu melakukan pemanasan sehingga dapat menghindari rusaknya kandungan kimia yang terdapat pada tumbuhan tersebut. Tambahkan etanol 96%

hingga terendam. Pelarut etanol 96% digunakan karena dapat menghasilkan ekstrak yang kental sehingga mempermudah untuk proses identifikasi. Jenis pelarut mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Etanol merupakan pelarut pengekstraksi yang terbaik untuk hampir semua senyawa seperti saponin dan flavonoid (Wijesekara, 1991). Wadah maserasi ditutup dan dibiarkan selama 24 jam sambil diaduk 2 kali sehari dan terlindung dari sinar matahari langsung. Dipisahkan ampas dan filtratnya. Ampas dimaserasi kembali dengan menggunakan cairan penyari etanol yang baru. Hal ini dilakukan selama 3 kali 24 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian di evap dengan alat evaporator dan setelah itu dimasukkan ke dalam oven hingga diperoleh ekstrak etanol kental. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dengan menggunakan neraca analitik. Setelah ditimbang hitung rendemen yang diperoleh yaitu presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendeman harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak.

7. Pembuatan suspensi NaCMC 0,5%

Ditimbang serbuk Na-CMC sebanyak 500 mg, dilarutkan dalam air panas 100 mL kemudian dihomogenkan.

8. Pembuatan suspensi simvastatin

Obat penurun kolesterol yang digunakan untuk penelitian ini adalah obat simvastatin 10 mg. Dengan dosis pada manusia dewasa adalah 10 mg/hari. Ditentukan bobot tablet simvastatin sebanyak 20 tablet. Tablet dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga halus dan homogen. Ditimbang serbuk Simvastatin, dimasukkan kembali ke dalam mortir, ditambahkan sedikit demi sedikit larutan kolodial Na-CMC 0,005% b/v sambil diaduk hingga homogen. Hasilnya dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan dicukupkan volumenya dengan larutan kolodial NaCMC 0,005% b/v hingga 100 mL.

9. Pembuatan induksi propiltiourasil

Penginduksi untuk meningkatkan kadar kolesterol digunakan obat propiltiourasil. Dosis PTU yang digunakan yaitu 100g/70kg BB manusia. Ditentukan bobot tablet PTU sebanyak 20 tablet. Tablet dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga halus dan homogen. Ditimbang serbuk PTU, dimasukkan kembali ke dalam mortir, ditambahkan sedikit demi sedikit larutan kolodial Na-CMC 0,5% b/v sambil diaduk hingga homogen. Hasilnya dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan dicukupkan volumenya dengan larutan kolodial NaCMC 0,5% b/v hingga 100 mL.

10. Pembuatan suspensi ekstrak kunyit putih

Ekstrak rimpang kunyit putih tadi yang sudah jadi ditimbang ekstrak sebanyak 300 mg/10 mL

11. Identifikasi kualitatif kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol 96% rimpang kunyit putih

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk mengetahui dan mendapatkan kebenaran bahwa kandungan kimia yang terkandung dalam rimpang kunyit putih. Identifikasi kandungan senyawa kimia yang dilakukan terhadap flavonoid dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

11.1 Identifikasi flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak rimpang kunyit putih ditambah HCl pekat sebanyak 2 tetes dan kocok kuat. Setelah itu ditambah serbuk magnesium (Mg) dikocok kembali. Sampel positif mengandung flavonoid bila mengalami perubahan warna menjadi warna jingga (Huliselan *et al.*, 2015).

11.2 Identifikasi tanin

Sampel ekstrak direaksikan dengan feriklorida 5% (FeCl) sebanyak 3 tetes, amati perubahan warna menjadi biru kehijauan, hijau kebiruan atau adanya endapan (Mojab, 2003).

11.3 Identifikasi saponin

Sampel ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL air panas dan ditambahkan 2 tetes HCl 2N dan dikocok kuat. Sampel positif mengandung saponin bila terdapat buih dengan intensitas banyak dan konsisten selama 10 menit (Huliselan *et al.*, 2015).

12. Uji hiperlipidemia

12.1 Persiapan hewan uji

Hewan uji mencit ditempatkan pada kandang selama 7 hari untuk diaklimatisasi. Selama itu mencit diberi makan dan minum hewan yang berat badannya turun 5% dari berat badan semula tidak digunakan untuk penelitian.

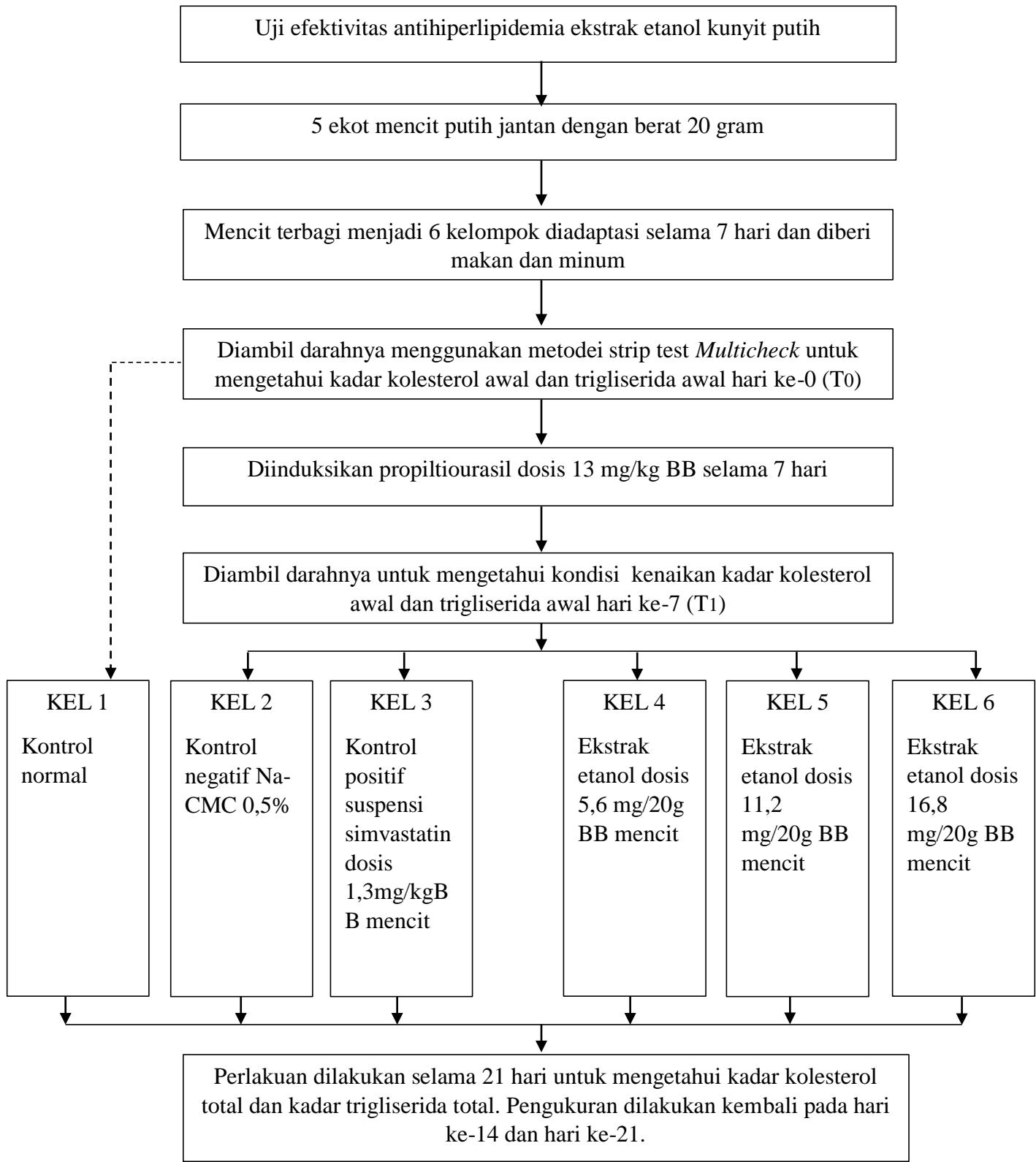
12.2 Pemeliharaan hewan uji

Hewan uji ditempatkan di dalam kandang berisi 5 ekor mencit dan diberi alas berupa sekam padi diganti sesering mungkin yaitu 2x sehari. Diganti pada pagi hari pukul 07.00 dan sore hari pukul 16.00. Pengantian sekam dilakukan secara rutin agar hewan uji terjaga kualitasnya.

12.3 Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini dengan berat 20 gram. Setelah memenuhi persyaratan berat badan hewan uji dikelompokan secara acak meliputi kelompok kontrol negatif NaCMC 0,5%, kontrol positif suspensi simvastatin dan kontrol normal air minum matang. Sebelum dilakukan pengambilan darah pada hewan uji semua hewan uji dipuaskan terlebih dahulu lalu baru diambil darahnya melalui ekor dan mulai diukur kadar kolesterol darah awal (hari ke-0). Kemudian hewan uji diinduksikan dengan propiltiourasil selama 1 minggu, pada hari ke-7 diukur kenaikan kadar kolesterol dan trigliserida kemudian diukur penurunan kadar kolesterol dan trigliserida pada hari ke-14, setelah itu diukur kadar kolesterol dan trigliseridanya kembali pada hari ke-21. Bagan prosedur uji antihiperlipidemia dapat dilihat pada gambar 2.

BAGAN PROSEDUR UJI ANTIHIPERLIPIDEMIA



Gambar 1 Bagan prosedur uji antihiperlipidemia

Kelompok 1 : diberikan air minum matang sebagai kontrol normal.

Kelompok 2 : diberikan larutan suspensi Na-CMC 0,5%

Kelompok 3 : diberikan sediaan pembanding yaitu suspensi simvastatin dosis 13mg/kg BB mencit sebagai kontrol positif.

Kelompok 4 : diberikan ekstrak etanol rimpang kunyit putih dengan dosis 5,6 mg/20g BB mencit

Kelompok 5 : diberikan ekstrak etanol rimpang kunyit putih dengan dosis 11,2 mg/20g BB mencit

Kelompok 6 : diberikan ekstrak etanol rimpang kunyit putih dengan dosis 16,8 mg/20g BB mencit.

12.4 Pemeriksaan kadar kolesterol total

Pengukuran kadar kolesterol total dengan cara mengukur dengan menggunakan metode strip test *Multicheck* dengan cara mengambil darah mencit melalui ekornya, kemudian diteteskan pada strip alat pengukur kolesterol dan kadar kolesterol darah mencit akan terukur secara otomatis. Hasilnya ditampilkan pada monitor berupa angka.

12.5 Pemeriksaan kadar trigliserida

Pengukuran kadar trigliserida dapat dilakukan dengan mengambil serum darah dari hewan uji melalui vena mata (*vena orbitalis plexus*) pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Pengukuran kadar trigliserida pada serum darah mencit putih dilakukan dalam tiga periode. Periode I (hari ke-0) merupakan pengukuran kadar trigliserida awal masing-masing hewan uji. Periode II (hari ke-

7) merupakan pengukuran kadar trigliserida hewan uji setelah penginduksian PTU untuk melihat kondisi hiperlipidemia dari hewan uji. Periode III (hari ke-14) merupakan pengukuran kadar trigliserida setelah pemberian perlakuan dengan diberikan kontrol normal, kontrol negatif Na-CMC 0,5%, kontrol positif simvastatin, serta ekstrak etanol rimpang kunyit putih dengan beberapa varian dosis selama 7 hari. Untuk melihat penurunannya menggunakan metode GPO-PAP. Metode ini berlangsung dalam satu tahap yaitu darah diambil dari vena mata menggunakan mikrohematokrit \pm 1 mL lalu *disentrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Kemudian serum darah yang terbentuk dipipet 10 μ L ditambah 1000 μ L reagen trigliserida. Campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C, lalu diamati serapannya menggunakan alat fotometer stardust FC sehingga didapat kadar trigliserida serum darah tikus.

Tabel 1. Prosedur pengujian Trigliserida

	Blanko	Standart	Sampel
Sampel	-	-	10 μ L
Standart	-	10 μ L	-
Aquadest	10 μ L	-	-
Reagen	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

E. Analisis Hasil

Dari data yang diperoleh dianalisis secara statistika menggunakan uji statistik *Kolmogrov-Smirnov*. Data distribusi normal, dilanjutkan dengan uji Analisa Varian (ANOVA) satu arah berdasarkan rancangan acak kelompok. Uji ANOVA yaitu uji analisis varian satu arah dengan taraf kepercayaan 95% sehingga dapat diketahui perbedaan bermakna atau tidak. Uji ANOVA akan

dianggap bermakna apabila ($p<0,05$) dan selanjutnya jika hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna diantara masing-masing kelompok maka dilanjutkan uji *Post Hoc Test* . Analisa data pada penelitian ini menggunakan program SPSS *Statistic 21*.