

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian *trueeksperimental* dengan metode *pre and post test control groupdesign* terhadap 30 ekor tikus putih jantan galur *sprague dawley* yang dibagi dalam 6 kelompok.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Farmakologi dan Steril Universitas Muhammadiyah Mataram dan Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi (BLKPK) Dinas Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Barat dan Laboratorium Klinik Dahlia Kota Mataram. Penelitian ini dilaksanakan pada periode Juni sampai Juli 2019.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

##### **a. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah beras merah yang difermentasi dengan *Monascus purpureus* (angkak) dengan dosis 15 mg/200gBB, 40 mg/200gBB, dan 65 mg/200gBB.

##### **b. Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah efek kolesterol pemberian angkak terhadap penurunan kadar kolesterol total pada tikus putih jantan galur *sprague dawley*.

### c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *sprague dawley* umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram sebanyak 30 ekor serta makanan dan minuman yang diberikan kepada tikus.

## 3.4 Definisi Operasional

### a. Beras Merah

Beras merah merupakan bahan makanan sebagai sumber energi bagi manusia. Beras merah dalam penelitian ini diperoleh dari Pasar Pagasangan Kota Mataram Provinsi NTB.

### b. Fermentasi Angkak

Fermentasi angkak adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil fermentasi beras merah menggunakan kapang *Monascus purpureus* yang diberikan pada tikus.

### c. Simvastatin

Simvastatin adalah obat antikolesterol yang digunakan dalam penelitian ini sebagai pembanding dalam kontrol positif dosis 20 mg/200gBB.

### d. Kadar Kolesterol Total

Kolesterol adalah senyawa lemak kompleks, yang 80 % dihasilkan dari dalam tubuh (organ hati) dan 20 % sisanya dari luar tubuh (zat makanan) untuk bermacam-macam fungsi di dalam tubuh, antara lain membentuk dinding sel.

### 3.5 Populasi dan Sampel

#### a. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan galur *sprague dawley* umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram sebanyak 30 ekor yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan.

#### b. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras merah yang diperoleh dari Pasar Pagesangan Kota Mataram Provinsi NTB yang dibuat dalam bentuk ekstrak dengan metode fermentasi yang diberikan dalam 3 variasi dosis yaitu 15 mg/200gBB, 40 mg/200gBB, dan 65 mg/200gBB

### 3.6 Instrumen Penelitian

#### a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu penumbuk, mortir, ayakan, autoklaf, alat pengering (oven), pipet ukur, mikropipet, pro-pipet, hotplate, ose, erlenmeyer, pengaduk, gelas ukur, tabungan reaksi, vortex, timbangan analitik, kertas whatman, waterbath, cawan porselin, buret, gelas beker, pipet tetes.

#### b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat angkak yaitu beras merah, aquades, biakan *Monascus purpureus* dalam PDA miring. Adapun bahan-bahan yang digunakan untuk analisis efektivitas antikolesterol terhadap

penurunan kadar kolesterol total adalah asetonitril, dan bahan yang digunakan untuk diet tinggi lemak pada tikus adalah diet kuning telur.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### a. Produksi kapang *Monascus purpureus*

Biakan murni *Monascus purpureus* diperbanyak dengan memindahkan kultur kapang tersebut ke dalam beberapa tabung reaksi yang berisi media PDA miring dan diinkubasi selama 5-7 hari. Tahapan ini dilakukan dengan cara mengambil 1 ose kultur bakteri secara aseptis kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi.

#### b. Pembuatan suspensi *Monascus purpureus*

Pembuatan suspensi *Monascus purpureus* dilakukan dengan cara 2 ml akuades steril dituangkan ke dalam tabung reaksi berisi media miring dengan biakan murni *Monascus purpureus*, kemudian digojog sampai homogen selanjutnya dituangkan ke dalam erlenmeyer yang berisi substrat beras merah.

#### c. Pembuatan angkak

Pembuatan angkak dilakukan dengan cara memasukkan 100 gram beras merah rendaman selama 8 jam ke dalam erlenmeyer, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, bahan-bahan tersebut didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 36°C. Bahan hasil perendaman kemudian diinokulasi dengan 2 ml suspensi *Monascus purpureus*. Setelah itu, campuran tersebut diaduk hingga rata dan diinkubasi pada suhu 27-32°C selama kurang lebih 30 hari, hingga

terbentuknya pigmen merah yang menyelubungi beras yang disebut angkak. Angkak tersebut kemudian dikeringkan dengan alat pengering pada suhu 40°C selama 15 jam. Pengeringan ini bertujuan untuk mengeringkan angkak. Angkak yang sudah kering kemudian dibuat serbuk.

#### **d. Diet Lemak Tinggi**

Sebelum tikus diberi perlakuan diet tinggi lemak, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu. Diet tinggi lemak yang diberikan pada penelitian ini adalah diet kuning telur. Diet kuning telur diberikan sebanyak 10 gram secara intermitten kepada tikus.

#### **e. Perlakuan Hewan Uji**

- a. Kelompok I Normal : Pemberian pakan standar (base line)
- b. Kelompok II Kontrol Negatif : Diet tinggi lemak dengan kuning telur sebanyak 10 gram.
- c. Kelompok III Kontrol Positif : Diet tinggi lemak + Dosis Simvastatin 0.18 mg/200 g BB
- d. Kelompok IV Dosis : Diet tinggi lemak + Angkak Dosis 15 mg/200 g BB
- e. Kelompok V Dosis : Diet tinggi lemak + Angkak Dosis 40 mg/200 g BB
- f. Kelompok VI Dosis : Diet tinggi lemak + Angkak Dosis 65 mg/200 g BB

#### f. Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Setelah perlakuan mencit selama 7 hari, pengukuran kadar kolesterol total dilakukan pada hari ke-8 untuk setiap tikus pada masing-masing kelompok. Darah tikus ditampung dengan tabung sentrifius. Darah didiamkan selama 15 menit dan disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

Serum darah dipipet dengan pipet mikro sebanyak 0.01 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan pereaksi kolesterol sebanyak 1 ml lalu dicampur dengan menggunakan vortex dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang 500 nm terhadap blanko. Sebagai blanko digunakan pereaksi kolesterol 1 ml dan aquadest 0.01 ml. pengukuran serapan standar sama dengan pengukuran serapan kolesterol total tetapi serum darah diganti dengan standar kolesterol. Kadar kolesterol total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$C = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ s t}$$

Keterangan : C = Kadar kolesterol (mg/dl)

A = Serapan

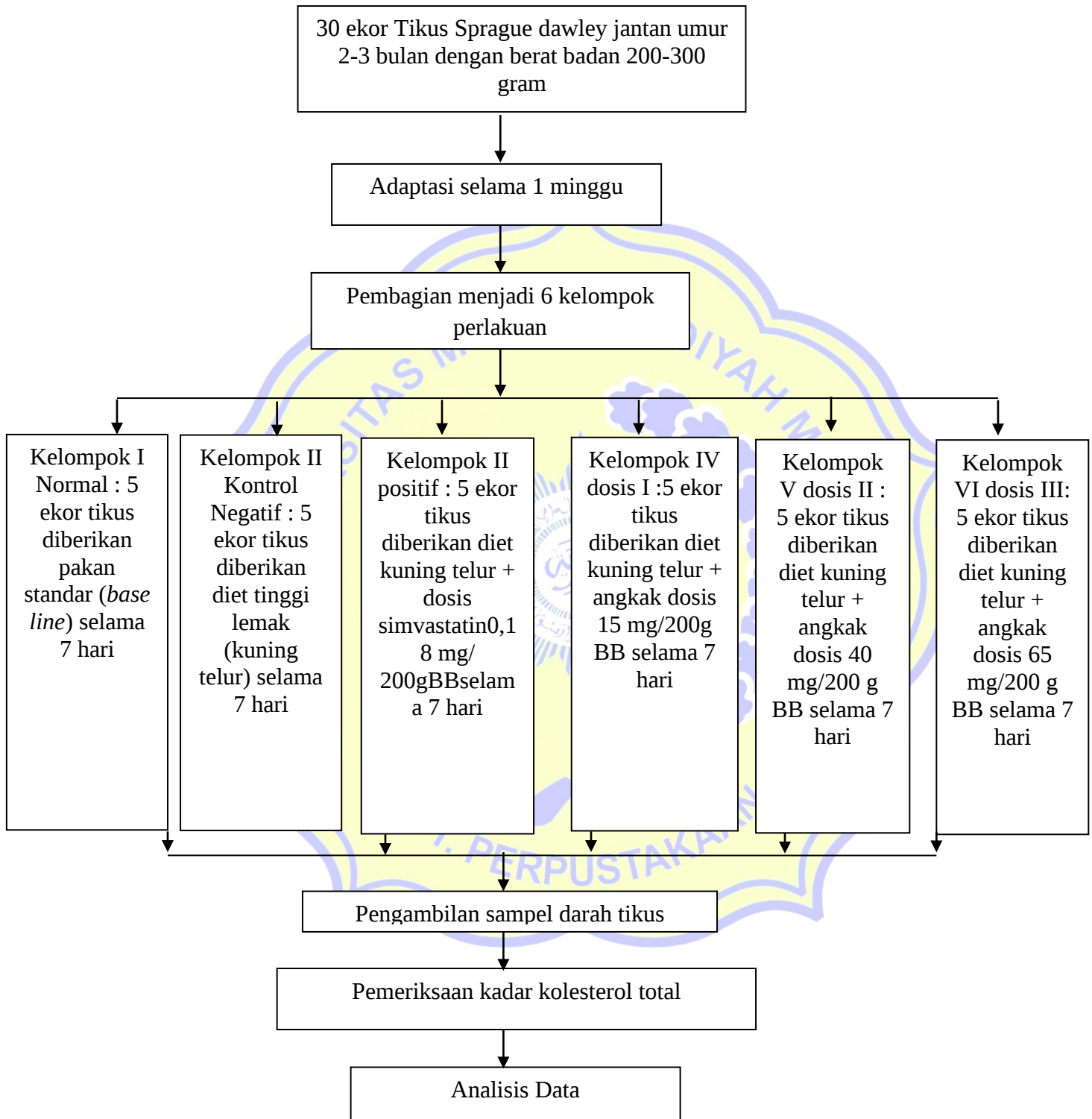
C St = Kadar kolesterol standar (200 mg/dl)

### 3.8 Analisi Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS dengan metode ANOVA dan apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil menggunakan LSD (*Least Significant Differences*) pada tingkat signifikansi  $\alpha=0,05$ .



### 3.9 Alur Penelitian



**Gambar 3.1** Alur Penelitian

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Fermentasi Beras Merah (Angkak)

Angkak merupakan salah satu produk beras yang di fermentasi oleh kapang *Monascus purpureus* sehingga berwarna merah. *Monascus purpureus* adalah kapang utama pada angkak (Ardiansyah, 2005). Angkak sering digunakan sebagai bahan bumbu, pewarna, dan obat karena mengandung bahan bioaktif yaitu lovastatin yang sangat berkhasiat sebagai antikolesterol. Kapang menghasilkan pigmen yang tidak toksik dan tidak mengganggu sistem kekebalan tubuh (Fardiaz dan Zakaria, 1996).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu beras merah yang diperoleh di Pasar Pagesangan Kota Mataram, Provinsi NTB. Beras merah terlebih dahulu di fermentasi dengan kapang *Monascus purpureus* sebelum diujikan ke tikus galur *Sprague dawley*. Proses fermentasi dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi (BLKPK). Fermentasi beras merah dilakukan dengan cara merendam sampel beras merah sebanyak 2 kg selama 8 jam, perendaman selama 8 jam dilakukan dengan tujuan agar kulit ari yang masih ada dalam beras merah terbuang. Hasil rendaman beras merah kemudian diinokulasi dengan suspensi *Monascus purpureus* yang telah di kembangbiakan pada PDA menggunakan aquadest steril sebanyak 2 ml, kemudian di fermentasi dengan cara di inkubasi pada suhu 27-32°C selama 14

hari. Tujuan diinokulasi agar beras merah dan kapang *monascus purpureus* tercampur rata. Hasil fermentasi dapat dilihat pada gambar di bawah.



**Gambar 1** Hasil fermentasi beras merah (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Selanjutnya dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C, pengeringan ini bertujuan untuk mengeringkan angkak. Kemudian didapatkan hasil fermentasi beras merah yang sudah kering, selanjutnya dibuat dalam bentuk serbuk dengan menggunakan blander hingga diperoleh serbuk angkak yang halus (Hadi Wiyoto, 2010). Hasil serbuk fermentasi beras merah dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Serbuk fermentasi beras merah (Sumber: Dokumentai Pribadi, 2019)

#### 4.2 Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Pada penelitian ini menggunakan tikus putih sebagai subjek penelitian. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur (*Sprague dawley*) yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 200-300 g. Penggunaan tikus putih sebagai hewan uji dikarenakan tikus putih telah dikenal sebagai model hewan percobaan yang baik dan mudah ditangani (Hafidzah dkk., 2014). Sebelum digunakan untuk penelitian tikus terlebih dahulu diadaptasikan selama satu minggu agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan (Berata *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini digunakan 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok normal sebagai pembanding, kelompok negatif yang diberikan diet tinggi lemak agar hiperkolesterol, kelompok positif menggunakan simvastatin 20 mg untuk melihat pengaruh obat antikolesterol yang telah terbukti khasiatnya untuk menurunkan kadar kolesterol total, dan kelompok dengan dosis 15 mg/200gBB, 40 mg/200gBB, dan 65 mg/200gBB yang diberikan angkak. Sebelum pemberian perlakuan pada tikus, dilakukan pengukuran kadar kolesterol total darah sebelum perlakuan (*pre* perlakuan).

Kadar Kolesterol total serum darah tikus sebelum perlakuan dapat dilihat pada tabel 1 bahwa rata-rata kadar kolesterol total serum darah tikus sebelum diberikan perlakuan masih normal yaitu <200 mg/dl (Witjaksono, 2009)

**Tabel 1.** Rerata Kadar Kolesterol Total Pada Serum Darah Tikus Sebelum Perlakuan(*Pre* Perlakuan)

| Kelompok Perlakuan    | Rata-Rata Kadar Kolesterol Total Sebelum Perlakuan (MEAN $\pm$ SD) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Normal                | 149.12 $\pm$ 55.39 <sup>b</sup>                                    |
| Negatif               | 121.20 $\pm$ 60.32 <sup>a,b</sup>                                  |
| Positif               | 86.78 $\pm$ 21.92 <sup>a</sup>                                     |
| Dosis 15 mg/200gramBB | 100.04 $\pm$ 38.70 <sup>a,b</sup>                                  |
| Dosis 40 mg/200gramBB | 74.54 $\pm$ 25.56 <sup>a</sup>                                     |
| Dosis 65 mg/200gramBB | 97.06 $\pm$ 41.36 <sup>a,b</sup>                                   |

**Keterangan :**tanda (a dan b) yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan ( $p>0,05$ ).

Tujuan dari pengukuran kadar kolesterol total sebelum perlakuan yaitu untuk memperoleh data kadar kolesterol total yang akan digunakan sebagai pembanding pada saat tikus telah di berikan perlakuan. Dari data diatas, menunjukan bahwakadar kolesterol total dengan masing-masing tikus sebelum perlakuan menunjukkan kategori normal yaitu  $<200$  mg/dl ( Witjaksono, 2009).

Setelah perlakuan *pre*, kemudian dilanjutkan dengan memberikan perlakuan *post* pada setiap kelompok hewan uji. Untuk kelompok dosisnegatif diinduksi dengan pemberian pakan diet tinggi lemak yaitu kuning telur sebanyak 10 gram secara oral. Pemberian kuning telur ini bertujuan untuk membuat tikus menjadi hiperkolesterol (Purwanti, 2012). Prasetyo (2000) menyebutkan bahwa pemberian kuning telur secara intermitten kepada tikus terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol total, trigleserida dan LDL serta dapat menurunkan kadar HDL pada tikus. Pemberian kuning telur dilakukan selama satu minggu terhadap semua kelompok perlakuan kecuali kelompok normal. Setelah pemberian kuning telur,

kemudian kontrol positif diberikan diet tinggi lemak + simvastatin sebagai pembanding antara kelompok yang diberikan perlakuan angkak. Simvastatin dibuat dengan cara dilarutkan dengan CMC-NA 1%. Selanjutnya tikus diberikan angkak dengan dosis yang berbeda yaitu 15 mg/gBB, 40 mg/gBB dan 65 mg/gBB selama 7 hari yang dilarutkan dengan aquadest dengan cara diseduh dan diberikan melalui oral, menurut Reni Silviani pada tahun 2010 dan Regan January Marliau pada tahun 2013 pada penelitian sebelumnya menyatakan bahwa, cara membuat angkak yaitu angkak yang sudah dihaluskan ditambahkan dengan aquadest kemudian angkak dipanaskan menggunakan penangas air dengan suhu 90°-98°C selama 30 menit. Setelah 7 hari dilakukan perlakuan dosis, pada hari ke-8 dilanjutkan dengan pengambilan darah melalui vena mata menggunakan pipa kapiler. Darah yang sudah diambil kemudian disentrifuse selama 20 menit. Hasil yang diperoleh dari sentrifuse ini yaitu berupa cairan yang bening yang disebut dengan serum. Tujuannya dapat lebih efektif dipakai dalam penelitian. Karena serum mengandung unsur figurative darah yang telah mengalami proses penggumpalan atau koagulasi spontan, sehingga terpisah dari unsur larutan yang bewarna kuning jernih (Sadikin 24). Fungsi sentrifuse yaitu memisahkan komponen sel darah dari cairannya sehingga cairannya bisa dipakai untuk pemeriksaan. Rerata kadar kolesterol total pada tikus dapat dilihat pada tabel di bawah (Tabel 2).

**Tabel 2.** Hasil analisis rata-rata kadar kolesterol total serum darah tikus setelah perlakuan (*post* perlakuan)

| Kelompok perlakuan    | Rata-rata Kadar Kolesterol Total Setelah Perlakuan (MEAN $\pm$ SD) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Normal                | 118.43 $\pm$ 27.68 <sup>a,b</sup>                                  |
| Negatif               | 175.29 $\pm$ 43.29 <sup>c</sup>                                    |
| Positif               | 84.30 $\pm$ 13.24 <sup>a</sup>                                     |
| Dosis 15 mg/200gramBB | 104.90 $\pm$ 20.24 <sup>a,b</sup>                                  |
| Dosis 40 mg/200gramBB | 144.90 $\pm$ 39.90 <sup>b,c</sup>                                  |
| Dosis 65 mg/200gramBB | 117.45 $\pm$ 15.11 <sup>a,b</sup>                                  |

**Keterangan :** tanda (a, dan b) yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan ( $p > 0,05$ ).

Analisis *Post Hoc* pada kelompok kadar kolesterol total *post* perlakuan dilakukan menggunakan metode LSD. Hasil analisis statistik kelompok negatif dengan kelompok normal terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ), hal ini dapat diartikan bahwa pemberian kuning telur sebanyak 10 gram mampu meningkatkan kadar kolesterol total. Menurut Prasetyo (2000) mengatakan bahwa pemberian kuning telur secara intermitten kepada tikus terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol total, trigleserida dan LDL serta dapat menurunkan kadar HDL pada tikus. Hasil analisis statistik kelompok positif dengan dosis 15 dan 65 mg/200gBB tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p > 0.05$ ), hal ini dapat diartikan bahwa antara kelompok positif dengan dosis 15 dan 65 mg/200gBB memiliki efektivitas antikolesterol yang sama dalam menurunkan kadar kolesterol total. Akan tetapi, antara kelompok positif dengan dosis 40 mg/200gBB terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ), dapat diartikan bahwa dosis 40 mg/200gBB memiliki efektivitas antikolesterol yang lebih besar dalam

menurunkan kadar kolesterol total dibandingkan dengan kelompok positif dan dosis 15 serta 65 mg/200gBB. Menurut Irfi Wahyuningrum (2016) pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa penurunan kadar kolesterol total yang tinggi terdapat pada angkak hal ini disebabkan bahwa kandungan lovastatin yang terdapat pada angkak mampu menghambat enzim HMG-CoA reduktase (Adam, 2010). Menurut Edijanti Goenarwo pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa pemberian ekstrak angkak dengan dosis 40 mg/200gBB mampu menurunkan kadar kolesterol total.

Hasil analisis statistik selanjutnya yaitu antar dosis perlakuan. Antara dosis 15 mg/200gramBB dengan dosis 40 dan 65 mg/200gramBB tidak memiliki perbedaan yang signifikan ( $p > 0.05$ ), dapat diartikan bahwa peningkatan dosis tidak memberikan efektivitas antikolesterol yang berbeda signifikan dalam menurunkan kadar kolesterol total. Menurut Nurmelis (2015) pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa dosis 250, 500, dan 1000 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang signifikan artinya peningkatan dosis tidak memberikan efektivitas yang berbeda. Setelah dilakukan analisis statistik, selanjutnya dilakukan perhitungan persentase penurunan pada masing-masing kelompok.

Persentase penurunan ini digunakan untuk mengetahui berapa persen penurunan kadar kolesterol setelah diberikan obat simvastatin dan angkak. Persentase penurunan kadar kolesterol total dapat dilihat dari tabel dibawah ini :

**Tabel 3. Persentase Penurunan Kadar Kolesterol total Serum Darah Tikus**

| No | Kelompok Uji          | Persentase Penurunan Kadar Kolesterol Total Serum Darah Tikus Setelah Perlakuan (%) |
|----|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Normal                | 73.05                                                                               |
| 2  | Positiif              | 51.90                                                                               |
| 3  | Dosis 15 mg/200gramBB | 40.15                                                                               |
| 4  | Dosis 40 mg/200gramBB | 17.33                                                                               |
| 5  | Dosis 65 mg/200gramBB | 32.99                                                                               |

Berdasarkan data hasil penurunan kadar kolesterol total pada tikus diketahui bahwa semua kelompok uji dosis angkak ( 15 mg/200gBB, 40 mg/200gBB dan 65 mg/200gBB) menunjukkan penurunan kadar kolesterol yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok normal. Namun jika dibandingkan dengan kontrol positif, kelompok uji dosis (15 mg/200gBB, 40 mg/200gBB dan 65 mg/200gBB) menunjukkan persentase penurunan yang berbeda, dosis yang paling efektif menurunkan kadar kolesterol total yaitu dosis simvastatin 0,18 mg/gBB sebesar 51,90%. Hal ini disebabkan karena simvastatin adalah obat yang bekerja dengan cara menghambat kerja enzim HMG-CoA Reductase yaitu suatu enzim di hati yang berperan dalam pembentukan kolesterol. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang oleh retnaningsih *et.al* menunjukkan penurunan kadar kolesterol total sebesar 48% dan harini *et.al* menunjukkan bahwa penurunan kadar kolesterol total pada pemberian simvastatin 0.18mg/200grbb sebesar 28,8%.

Rumus Persentase Penurunan Kadar Kolesterol total :

$$\frac{\text{Data awal} - \text{Data akhir}}{\text{Data awal}} \times 100\%$$

Misalnya:

$$\frac{\text{Post Negatif} - \text{Post positif}}{\text{Post negatif}} \times 100\%$$

