

BAB III METODE PENELITIAN

III.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian “*Post Test Controlled Group Design*”.

III.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Hewan coba akan dipelihara di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dalam periode Oktober–November 2014. Pembuatan ekstrak etanol 96% bawang putih akan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Pengambilan darah tikus dilakukan di Balai Veterinarian Bandar Lampung dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pemeriksaan kadar kolesterol *High Density Lipoprotein* (HDL) hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Duta Medika Bandar Lampung.

III.3 Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi yang akan di gunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague-Dawley*.

2. Sampel Penelitian

2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* sehat (bergerak aktif).
- b. Tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* berumur 2-3 bulan.
- c. Tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* dengan berat badan 200-300 gram.

2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mati sebelum masa perlakuan berakhir.
- b. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, rambut kusam atau rontok).

2.3 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini akan menggunakan rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu :

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

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan.

n = Jumlah sampel tiap kelompok.

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4.75$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Penelitian ini membagi hewan coba dalam 5 kelompok perlakuan, sehingga hewan coba yang dibutuhkan untuk penelitian berjumlah 25 ekor tikus.

III.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Variabel Bebas (*independent*) adalah ekstrak etanol 96% bawang putih.
- b. Variabel Terikat (*dependent*) adalah kadar HDL tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley*

2. Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional.

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak etanol 96% bawang putih (<i>Allium sativum</i> L.)	Sediaan bawang putih yang dibuat dengan metode maserasi dingin pada suhu 25°C	Sprit 1 cc	ml	Numerik
2	Kadar HDL	Kadar HDL tikus putih jantan galur <i>Sprague-Dawley</i>	Spektrofotometri	mg/dl	Numerik

III.5 Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Kandang hewan
- b. Tempat pakan hewan
- c. Tempat minum hewan
- d. Timbangan
- e. Alat tulis

- f. *Rotary evaporator*
 - g. Sonde lambung
 - h. *Disposable spuit*
 - i. *Handschoen*
 - j. Pipet tetes
 - k. Pipet mikro
 - l. Tik biru untuk memindahkan reagen
 - m. Tik kuning untuk memindahkan serum
 - n. Sentrifuge
 - o. Tabung *vacuum venojact*
 - p. Spektrofotometer manual
2. Bahan Penelitian
- a. Hewan coba menggunakan tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* yang memenuhi kriteria inklusi.
 - b. Bahan perlakuan berupa;
 - 1. Pakan standar tikus
 - 2. Diet tinggi lemak yang berasal dari kuning telur
 - 3. Ekstrak etanol 96% bawang putih
 - c. Bahan untuk tindakan euthanasia berupa :
 - 1. Ketamine 75-100 mg/kg BB
 - 2. Xylazine 5-10 mg/kg BB
 - d. Bahan pemeriksaan kadar HDL berupa :
Reagen pemeriksaan kadar HDL

III.6 Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Diet Tinggi Lemak

Pemberian diet kuning telur diberikan sebesar 10 mg per hari secara intermiten untuk meningkatkan kadar kolesterol total pada tikus putih (Prasetyo *et al*, 2000).

2. Prosedur Pemberian Ekstrak Bawang Putih

2.1 Cara Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Bawang Putih

1.2 kg umbi bawang putih yang kulitnya sudah dikupas terlebih dahulu dicuci bersih lalu dihaluskan, kemudian ditambah dengan 2000 ml etanol teknis dingin, diaduk selama 15 menit, setelah itu didiamkan pada suhu ruangan (37°C) selama 24 jam, lalu disaring. Proses tersebut diulang sebanyak 3 kali. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Dari proses pemanasan tersebut dihasilkan ekstrak kental, yang kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan pemanas *water bath* dengan suhu 70°C sambil terus diaduk, sehingga dihasilkan ekstrak bawang putih.

2.2 Cara Perhitungan Dosis Ekstrak Bawang Putih

Dosis penggunaan bawang putih segar pada manusia dewasa adalah 1/2 sampai 2 siung (2-6 gram) sekali sampai 4 kali sehari (Handayani, 2006). Dalam penelitian ini digunakan dosis bawang putih sebesar 6 gram, 4 kali sehari.

Dosis bawang putih : 6 gram x 4 = 24 gram/hari. Dosis untuk tikus seberat 200 gram = 0.018 x 24 gram/hari = 0.432 gram/hari. 1 gram umbi bawang putih segar setara dengan 0,125 ml ekstrak umbi bawang putih. Dosis: 0.432 gram umbi bawang putih segar setara dengan 0.05 ml ekstrak bawang putih.

Tabel 6. Konversi Perhitungan Dosis untuk Berbagai Jenis Hewan dan Manusia

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmut 400 gr	Kelinci 2 Kg	Kucing 2 Kg	Kera 4 Kg	Anjing 12 Kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmut 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 2 Kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 Kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 Kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 Kg	0.008	0.06	0.10	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 Kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Sumber : Harmita & Radji, 2008.

3. Prosedur Pemeriksaan Kadar HDL

3.1. Prosedur Pengambilan Sampel Darah Tikus.

1. Tikus ditempatkan terpisah sesuai kelompok perlakuannya.
2. Tikus kemudian dipuaskan selama 8–10 jam.
3. Dilakukan anestesi pada tikus menggunakan ketamine-xylazine 75-100 mg/kg 5–10 mg/kg secara intraperitoneal.
4. Dilakukan euthanasia menggunakan metode *cervical dislocation*, dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan

di kedua sisi leher pada dasar tengkorak, dan tangan lainnya ditempatkan pada pangkal ekor atau kaki belakang, kemudian dilakukan penarikan dengan cepat sehingga terjadi pemisahan antara tulang leher dan tengkorak tikus.

5. Pengambilan darah sekitar 3 ml diambil dari jantung menggunakan *sputit*, dan darah langsung dimasukkan ke dalam tabung *vacuum venojact*.
6. Bangkai tikus kemudian dikumpulkan, lalu dikremasi. (Leary *et al*, 2013).

3.2. Prosedur Pengambilan Serum

Darah yang telah didapat dimasukkan dalam tabung *vacuum venojact* dan dibiarkan mengendap/membeku, sehingga plasma darah terpisah dari komponen darah lainnya. Kadar HDL plasma kemudian dihitung menggunakan spektrofotometri manual pada laboratorium patologi klinik.

4. Alur Penelitian

- a. Pada minggu pertama tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague-Dawley* diadaptasikan sebelum diberikan perlakuan, dan hanya diberikan pakan standar.
- b. Tikus dibagi dalam 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri atas 5 tikus, yaitu:
 1. Kelompok kontrol negatif, diberikan diet pakan standar.
 2. Kelompok kontrol positif, diberikan diet pakan standar ditambah

- kuning telur 10 mg per hari secara intermiten.
3. Kelompok perlakuan 1, diberikan diet pakan standar, kuning telur 10 mg per hari secara intermiten, dan pemberian ekstrak etanol 96% bawang putih sebanyak 0.025 ml/hewan coba.
 4. Kelompok perlakuan 2, diberikan diet pakan standar, kuning telur 10 mg per hari secara intermiten, dan pemberian ekstrak etanol 96% bawang putih sebanyak 0.05 ml/hewan coba.
 5. Kelompok perlakuan 3, diberikan diet pakan standar, kuning telur 10 mg per hari secara intermiten, dan pemberian ekstrak etanol 96% bawang putih sebanyak 0.1 ml/hewan coba.
- c. Pengambilan sampel darah diambil dari jantung tikus, sebanyak 3 ml.
 - d. Dilakukan pemeriksaan kadar HDL dengan spektrofotometer manual.
 - e. Dilakukan analisis data dengan menggunakan perangkat lunak pengolah data statistik.

III.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan uji statistik, sedangkan pengolahannya menggunakan uji parametrik.

Langkah pertama yaitu uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk jumlah sampel kurang dari 50, dilanjutkan dengan uji homogenitas *Levene*. Analisis data kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui apakah terdapat varian data yang berbeda secara bermakna atau tidak. Hasil dari uji ini dianggap bermakna bila nilai $p < 0.05$. Data kemudian diolah dengan dengan uji lanjutan *post hoc*.

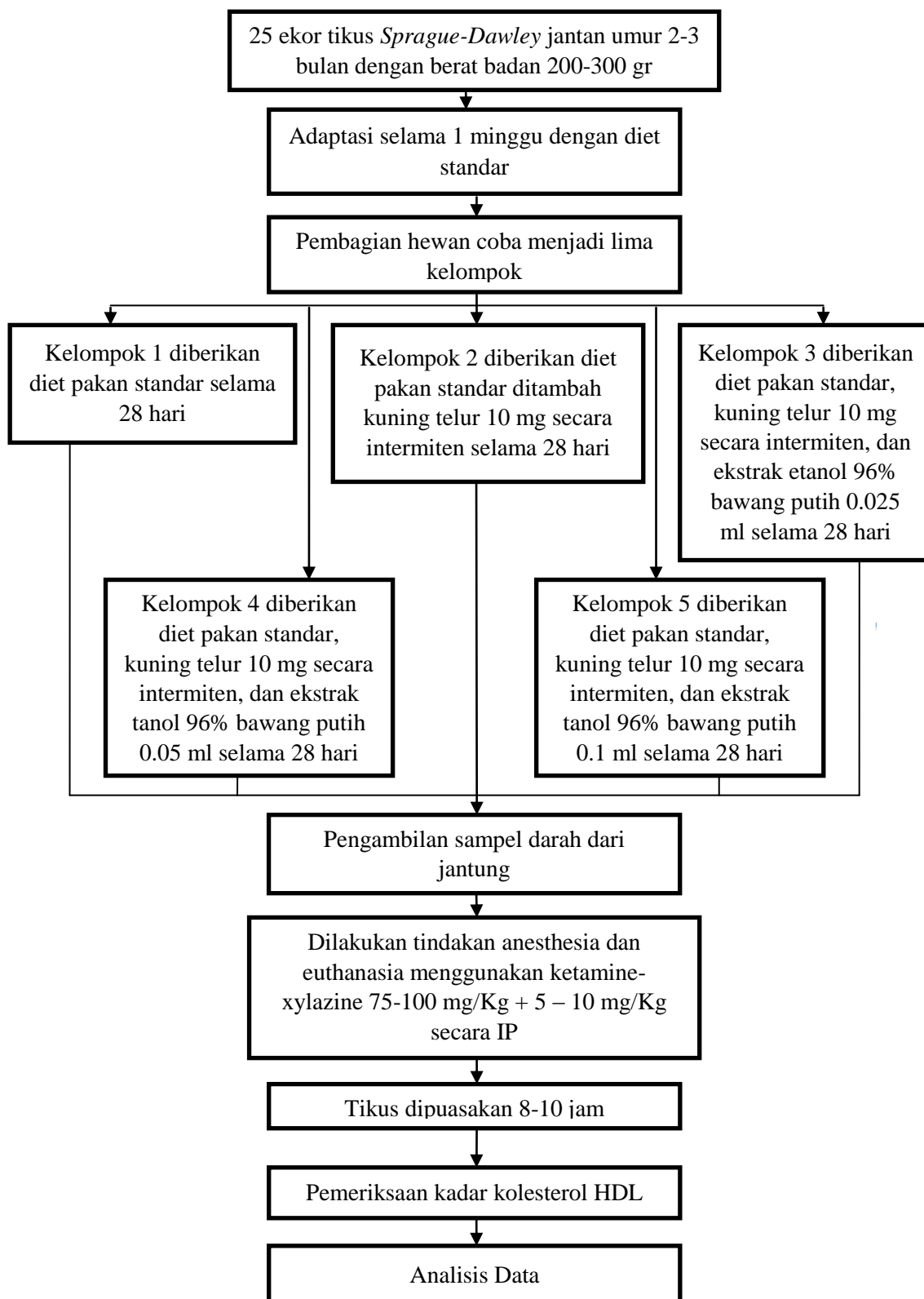
Apabila data tidak normal setelah diuji distribusinya, maka dilakukan uji alternatif menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

III.8 Etika Penelitian

Peneliti akan mengajukan penerapan prinsip etik 3R pada komite etika penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah di perhitungkan secara seksama, dari pengalaman terdahulu maupun literatur.
2. *Reduction*, adalah dalam penelitian jumlah hewan harus dikaji dengan menggunakan berbagai macam perhitungan sehingga digunakan hewan dalam jumlah sedikit tanpa menghilangkan arti suatu penelitian.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan coba secara manusiawi dengan memperhatikan beberapa aspek, antara lain;
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba akan diberikan pakan standard an minum secara *ad libitium*.
 - b. Bebas dari ketidaknyamanan, pada penelitian ini hewan coba akan di tempatkan di *animal house* yang berada jauh dari bising dan aktivitas manusia, dengan suhu 20-25°C.
 - c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan.

III.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 12. Diagram Alur Penelitian