

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 8 minggu hingga bulan November 2013 yang terdiri dari 1 minggu masa adaptasi dan 7 minggu masa perlakuan. Pembuatan ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Perhitungan kadar kolesterol total dan trigliserida hewan coba akan dilaksanakan di Laboratorium Klinik Duta Medika Bandar Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

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

3.3.2 Sampel Penelitian

3.3.2.1 Kriteria Sampel

3.2.2.1.1 Kriteria Inklusi

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

3.3.2.1.2 Kriteria Eksklusi

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

3.3.2.2 Besar Sampel

Untuk penelitian kali ini, besar sampel yang digunakan ditentukan menggunakan rumus Federer untuk uji eksperimental (Federer, 1967), yaitu:

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah:

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak enam ekor tikus untuk setiap kelompok. Dalam penelitian ini, tikus dibagi ke dalam jumlah sampel yang digunakan adalah sebanyak tujuh ekor tikus untuk setiap kelompok.

Penelitian kali ini menggunakan 21 ekor tikus yang dibagi ke dalam tiga kelompok. Kelompok yang pertama adalah kelompok kontrol positif. Pada kelompok ini tikus hanya diberikan pakan standar selama tujuh minggu. Kelompok yang kedua adalah kelompok kontrol negatif. Pada kelompok ini tikus diberikan pakan standar ditambah dengan diet tinggi lemak selama tujuh minggu. Kelompok yang ketiga adalah kelompok perlakuan. Pada kelompok ini tikus diberikan pakan standar ditambah dengan diet tinggi lemak selama empat minggu kemudian ditambahkan dengan ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) selama tiga minggu.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 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 *vacum venojact*
- p. Spektrofotometer manual

3.4.2 Bahan Penelitian

- a. Hewan coba berupa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley berasal dari Institut Pertanian Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

- b. Bahan perlakuan berupa :
 - 1) Diet standar tikus
 - 2) Diet tinggi lemak yang berasal dari kuning telur
 - 3) Ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)
- c. Bahan untuk tindakan *euthanasia* berupa:
 - 1) Ketamine 75-100 mg/Kg
 - 2) Xylazine 5-10 mg/Kg
- d. Bahan pemeriksaan kadar kolesterol total dan trigliserida berupa:
 - 1) Reagen untuk pemeriksaan kadar kolesterol total
 - 2) Reagen untuk pemeriksaan kadar trigliserida

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Pemberian Diet Tinggi Lemak

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diet tinggi lemak yang digunakan untuk meningkatkan kadar kolesterol total pada tikus putih adalah diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari yang diberikan secara intermiten (Prasetyo, 2002).

3.5.2 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol 95% Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)

3.5.2.1 Cara Pembuatan Ekstrak Etanol 95% Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)

- a. Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggiling sampai diperoleh serbuk halus cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) sejumlah 1 Kg.

- b. Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) atau simplisia (bahan yang sudah digiling halus) dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan etanol dengan kadar 95% dengan perbandingan 1:2 untuk dilakukan proses maserasi selama 24 jam.
- c. Setelah 24 jam dilakukan pemisahan antara filtrat dan residu yang terbentuk. Filtrat yang didapat akan diteruskan ke tahap yang selanjutnya yaitu tahap evaporasi hingga etanolnya habis. Proses evaporasi dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C – 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Warsiati dkk., 2010; Wahjoedi dkk., 2004).

3.5.2.2 Cara Perhitungan Dosis Ekstrak etanol 95% Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dosis piperin yang terbukti menurunkan kadar kolesterol total dan trigliserida adalah sebanyak 40 mg/Kgbb, sehingga dosis piperin yang diberikan untuk tikus dengan berat badan 250 g adalah sebanyak 10 mg (Shah dkk., 2011).

Perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$\frac{40 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{X}{250 \text{ g}}$$

$$X = 10 \text{ mg}$$

Kandungan piperin yang terdapat dalam ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) adalah sebanyak 25% (Usia, 2012), sehingga ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang diberikan untuk tikus dengan berat badan 250 g adalah 40 mg dengan perhitungan sebagai berikut:

$$10 \text{ mg} = X \times 25\%$$

$$X = 40 \text{ mg}$$

Dosis letal-50 atau *lethal dose-50* (LD-50) ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) adalah sebesar 2324 mg/Kgbb tikus atau sebesar 581 mg untuk tikus dengan berat badan 250 g. Berdasarkan hal tersebut, maka dosis yang digunakan pada penelitian kali ini merupakan dosis yang aman (Wahjoedi dkk., 2004).

Ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang diberikan terlebih dahulu dicampurkan dengan akuades. Perbandingannya adalah 400 mg ekstrak etanol 95% cabe jawa dicampurkan ke dalam 50 mL akuades sehingga di dalam 5 mL larutan terdapat 40 mg ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.).

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total dan Triglicerida

3.5.3.1 Prosedur Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. Tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempatkan terpisah dengan lainnya kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain, pemindahan, penanganan, gangguan antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. Sebelum diambil darahnya tikus dipuaskan selama 8 – 10 jam. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75 – 100 mg/Kg + 5 – 10 mg/Kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk

ditempatkan di kedua sisi leher di dasar tengkorak. Tangan lainnya ditempatkan pada pangkal ekor atau kaki belakang dan dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tongkorak (Leary dkk., 2013). Setelah tikus mati, darah sebanyak 3 mL diambil dari bagian jantung dengan menggunakan alat suntik, kemudian langsung dimasukkan ke dalam tabung *vacum venojact*.

3.5.3.2 Prosedur Pengambilan Serum

Darah yang sudah berhasil didapatkan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian dipusingkan selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel-sel darah dengan menggunakan pipet mikro.

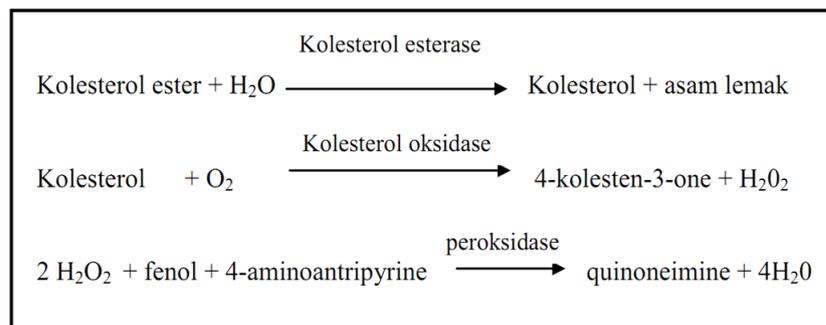
3.5.3.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total

Pemeriksaan kadar kolesterol total menggunakan metode *cholesterol oxidase – phenol aminophenazone* (CHOD-PAP). Metode ini menggunakan prinsip oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Sebanyak 10 μL serum direaksikan dengan reagen kolesterol sebanyak 1000 μL lalu di inkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Reagen kolesterol yang digunakan ada dua macam, yang pertama adalah reagen enzim dan yang kedua adalah reagen standar.

Kolesterol ester pada lipoprotein dipecah oleh enzim kolesterol esterase menjadi kolesterol dan asam lemak. Kolesterol kemudian mengalami oksidasi dengan enzim kolesterol oksidase sebagai katalis menghasilkan senyawa peroksida (H_2O_2) yang direaksikan bersama fenol dan 4-aminoantripyrine menghasilkan

senyawa quinoneimine yang berwarna merah dan dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran dilakukan terhadap *reagent blank / method blank*.

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :

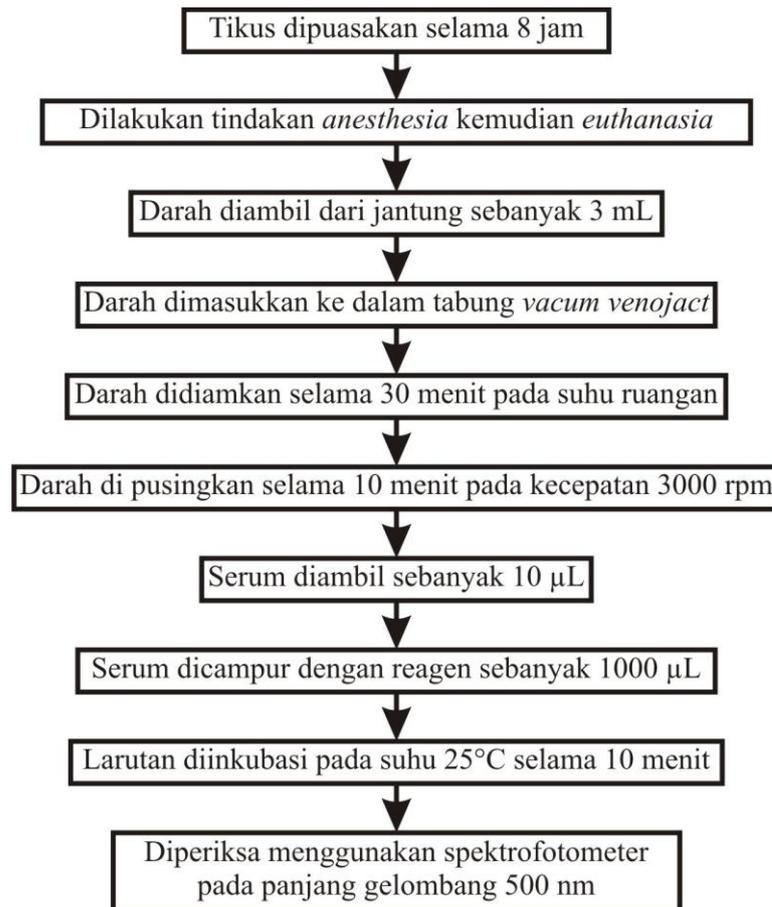


Gambar 8. Reaksi yang terjadi pada pemeriksaan kadar kolesterol total.

Pemeriksaan kadar kolesterol total menggunakan metode ini linear hingga kadar kolesterol total yang didapat mencapai kadar 750 mg/dL (19,3 mmol/L). Apabila didapatkan kadar kolesterol total melebihi batas linearitas, maka serum diencerkan dengan perbandingan 1:2, dengan 1 adalah jumlah serum dan 2 adalah larutan salin fisiologis (NaCl 0,9%). Setelah itu hasil pemeriksaan dikalikan dengan 3.

3.5.3.4 Prosedur Pemeriksaan Kadar Triglicerida

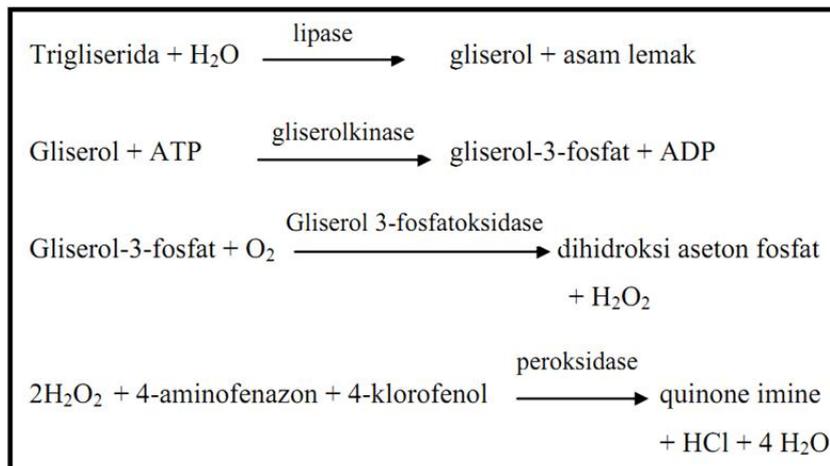
Pemeriksaan kadar triglicerida menggunakan metode *glycerol-3-phosphate oxidase – phenol aminophenazone* (GPO-PAP). Metode ini menggunakan prinsip oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Sebanyak 10 µL serum direaksikan dengan reagen triglicerida sebanyak 1000 µL lalu di inkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Reagen triglicerida yang digunakan ada dua macam, yang pertama adalah reagen enzim dan yang kedua adalah reagen standar.



Gambar 9. Prosedur pemeriksaan kadar kolesterol total dan trigliserida.

Trigliserida akan dihidrolisis oleh enzim lipase menghasilkan gliserol dan asam lemak. Gliserol kemudian diubah menjadi gliserol-3-fosfat oleh enzim gliserolkinase. Gliserol-3-fosfat yang dihasilkan dioksidasi menghasilkan dihidroksi aseton fosfat dan peroksida (H_2O_2). Peroksida yang dihasilkan akan bereaksi lebih lanjut dengan 4-aminofenazon dan 4-klorofenol menghasilkan senyawa quinoneimine yang berwarna merah dan dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran dilakukan terhadap *reagent blank / method blank*.

Reaksinya adalah sebagai berikut :



Gambar 10. Reaksi yang terjadi pada pemeriksaan kadar trigliserida.

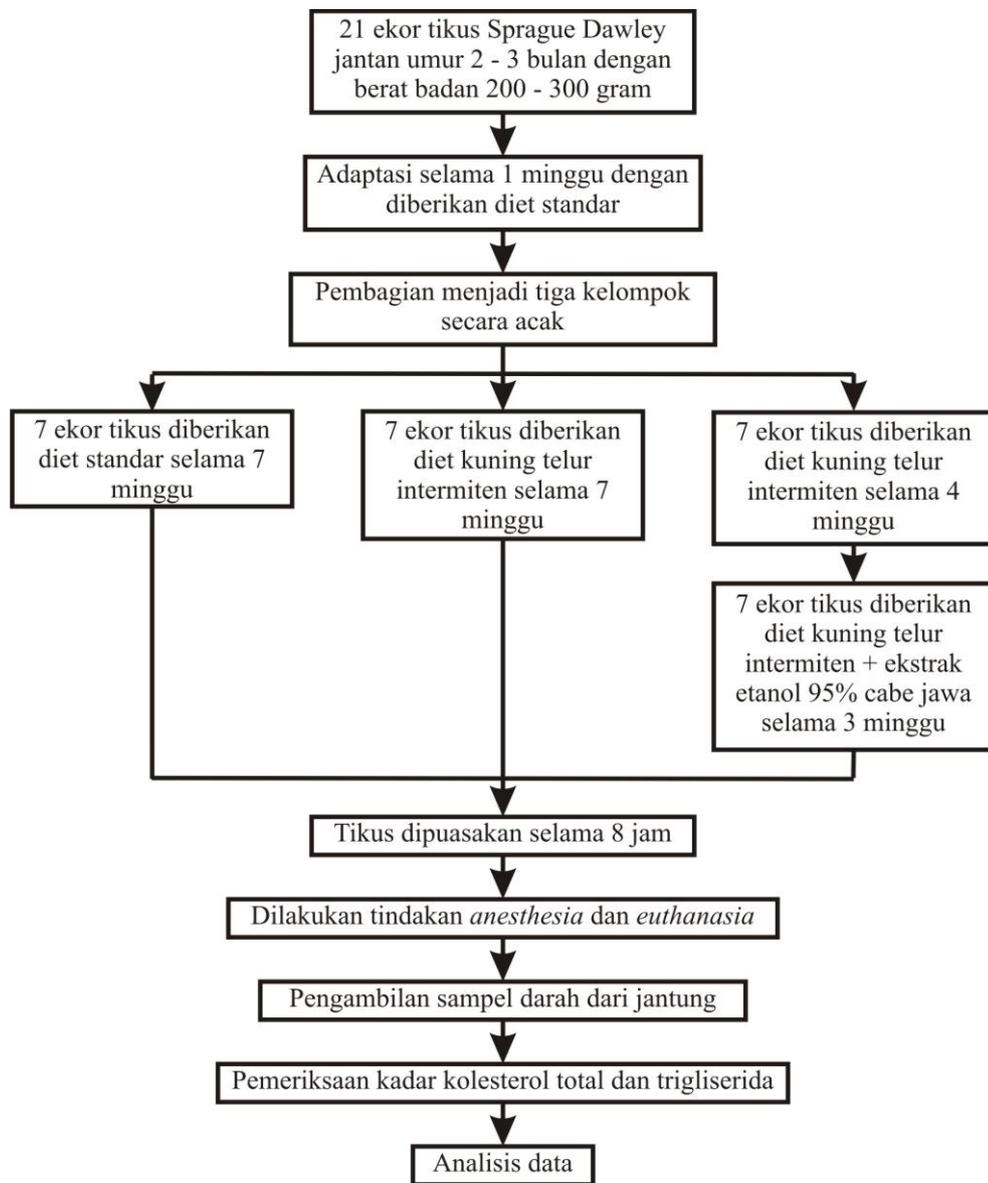
Pemeriksaan trigliserida menggunakan metode ini linear hingga kadar kolesterol total yang didapat mencapai kadar 1000 mg/dL (11,4 mmol/L). Apabila didapatkan kadar kolesterol total melebihi batas linearitas, maka serum diencerkan dengan perbandingan 1:4, dengan 1 adalah jumlah serum dan 4 adalah larutan salin fisiologis (NaCl 0,9%). Setelah itu hasil pemeriksaan dikalikan dengan 5.

3.5.4 Prosedur Penelitian

- a. 21 ekor tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan 200 – 300 gram diadaptasikan selama 1 minggu sebelum diberikan perlakuan. Selama masa adaptasi, hewan coba diberikan diet standar.
- b. Tikus dibagi ke dalam tiga kelompok
 - 1) Kelompok A (7 ekor tikus) sebagai kontrol negatif yang diberikan diet standar selama tujuh minggu

- 2) Kelompok B (7 ekor tikus) sebagai kontrol positif yang diberikan diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari yang diberikan secara intermiten selama tujuh minggu
- 3) Kelompok C (7 ekor tikus) sebagai kelompok perlakuan yang diberikan diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari yang diberikan secara intermiten selama 4 minggu kemudian ditambahkan dengan pemberian ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) sebanyak 40 mg selama 3 minggu
- 4) Pengambilan sampel darah tikus dilakukan pada akhir minggu ke-7. Darah diambil dari jantung tikus sebanyak 3 mL
- 5) Dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total dan trigliserida
- 6) Menganalisis data yang diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak pengolah data statistik

3.5.5 Alur Penelitian



Gambar 11. Alur penelitian.

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.6.1 Identifikasi Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Variabel bebas (*independent variable*) adalah ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang diberikan kepada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley
- b. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah kadar kolesterol total dan trigliserida tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur Sprague Dawley

3.6.2 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi operasional.

No.	Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala
1.	Ekstrak etanol 95% cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	Pemberian ekstrak etanol 95% cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.) sebanyak 40 mg/hari	mg	Numerik
2.	Kadar kolesterol total	Kadar kolesterol total tikus putih jantan (<i>Rattus novergicus</i>) galur Sprague Dawley	mg/dL	Numerik
3.	Kadar trigliserida	Kadar trigliserida tikus putih jantan (<i>Rattus novergicus</i>) galur Sprague Dawley	mg/dL	Numerik

3.7 Analisis Data

Data yang telah diperoleh diolah menggunakan perangkat lunak pengolah data statistik untuk mengetahui hubungan antar variabel. Langkah pertama adalah dengan melakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Selanjutnya, jika didapatkan hasil $p > 0,05$ maka distribusi data normal dan homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat varians data yang berbeda

secara bermakna atau tidak. Uji *One Way ANOVA* dianggap bermakna apabila didapatkan hasil $p < 0,05$. Setelah itu untuk mengetahui dimanakah letak perbedaan yang bermakna tersebut dilakukanlah analisis *Post Hoc LSD*. Jika distribusi data tidak normal ($p < 0,05$) maka untuk mengetahui apakah terdapat variansi data yang berbeda secara bermakna atau tidak dilakukan dengan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis* dan kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2011).

3.8 Ethical Clearance

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2795/UN26/8/DT/2013 pada tanggal 5 Desember 2013 dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

- a. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
- b. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus frederer yaitu $t(n-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah hewan coba yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
- c. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membedakan hewan hewan coba dalam beberapa kondisi.

- 1) Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
- 2) Bebas dari ketidaknyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20–25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 3–4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga mengurangi stress pada hewan coba.
- 3) Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) (Ridwan, 2013).