

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan menggunakan pola *post test only control group design*. Rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group design* adalah desain yang paling sederhana dari desain eksperimental (*true experimental design*), karena sampel benar-benar dipilih secara random, diberi perlakuan serta ada kelompok pengontrolnya, dan dilakukan penilaian hanya pada hasil intervensi dengan membandingkan pada kelompok kontrol (Dahlan, 2010).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2013 selama 15 hari dengan masa adaptasi 7 hari sebelum perlakuan yang bertempat di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Perawatan dan perlakuan sampel bertempat di *animal house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pemeriksaan kadar LDL darah tikus putih dilakukan di laboratorium Gladish Medical Center, Pesawaran, Lampung.

C. Alat dan bahan penelitian

a. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kandang tikus;
2. botol minum tikus;
3. sonde untuk pemberian oral;
4. spuit oral;
5. minor set;
6. timbangan analitik;
7. kapas;
8. kamera digital.

b. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan persentase murni 100% minyak zaitun dengan merek dagang Pietro Coricelli yang di produksi oleh Italia sebagai negara ke dua penghasil minyak zaitun dan diimpor oleh Indonesia, EVOO ini dibeli di salah satu supermarket di kota Bandar Lampung;
2. Madu asli yang diproduksi oleh Perum Perhutani. Madu asli ini diproduksi dari perkebunan kelengkeng Perum Perhutani dan diolah berdasarkan mutu Standar Nasional Indonesia (SNI). Penjelasan SNI dapat dilihat di bab tinjauan pustaka ;
3. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 4-5 bulan yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor;

4. aquades;
5. makanan standar tikus (pelet);
6. pakan tinggi kolesterol yang diberikan adalah berupa otak sapi dengan dosis 3 ml/hari;
7. obat anestesi ketamine+xylazine sebagai narkosis sebelum pengambilan darah tikus.

D. Populasi dan Sampel

a. Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 4-5 bulan yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Pemilihan tikus putih jenis ini dikarenakan memiliki sifat yang lebih tenang dan mudah dikondisikan hiperkolesterolemia.

b. Sampel penelitian

Hewan penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* umur 4-5 bulan dengan berat badan 150-250 gram. Sampel penelitian dipilih secara simple random sampling berjumlah 35 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

Menurut Supranto J (2000) untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan: $(t-1)(r-1) > 15$. Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan r merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan

menggunakan lima kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi:

$$\begin{aligned}(t-1)(r-1) &\geq 15 \\ 4(r-1) &\geq 15 \\ 4r &\geq 19 \\ r &\geq 19/4 \\ r &\geq 4,75\end{aligned}$$

Jadi sampel yang akan digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor dengan 2 tikus putih sebagai cadangan pada masing-masing kelompok sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 35 ekor.

c. Kriteria Inklusi

Kriteria Inklusi dari penelitian ini adalah:

1. tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*;
2. berumur \pm 4-5 bulan;
3. berat badan 150-250 gram;
4. didapatkan dari tempat pembiakan yang sama, pakan yang sama, dan akses bebas pada air minum.

d. Kriteria Eklusi

Kriteria eklusi dari penelitian ini adalah:

1. terlihat sakit pada masa adaptasi (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus atau genital);
2. penurunan berat badan selama adaptasi lebih dari 10%;
3. mati selama pemberian perlakuan.

E. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari variabel perlakuan (independen) dan variabel respon (dependen).

- a. Variabel perlakuan (independen) adalah pemberian minyak zaitun murni dan madu.
- b. Variabel respon (dependen) adalah kadar LDL darah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

F. Definisi Operasional

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

Tabel 3.1. Definisi operasional variabel penelitian

Variabel	Definisi	Skala
<i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO)	Minyak zaitun murni diberikan kepada tikus.	Numerik
Madu	Madu kelengkeng yang diberikan kepada tikus	
	Kelompok K(-) (kontrol negatif) = pemberian aquades	
	Kelompok K(+) (kontrol positif) = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari	
	Kelompok P.EVOO = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan EVOO sebanyak 1 ml/ekor/hari	
	Kelompok P.madu = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari	
	Kelompok P.kombinasi = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan kombinasi EVOO sebanyak 1 ml/ekor/hari serta madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari	
Kadar LDL darah tikus	Kadar lipoprotein berdensitas rendah yang berfungsi mengedarkan kolesterol ke seluruh tubuh dan diperoleh dari serum darah tikus.	Numerik
	Kadar optimal LDL pada tikus yaitu LDL < 66 mg/dl atau sama dengan kadar LDL tikus normal (kontrol negatif)	

G. Prosedur Penelitian

a. Prosedur pemberian dosis EVOO

Minyak zaitun murni yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Extra Virgin Olive Oil* dengan konsentrasi 100% minyak zaitun yang diproduksi

di Italia bermerek dagang Pietro Coricelli yang diimpor oleh Indonesia dan didapatkan dari salah satu supermarket di kota Bandar Lampung. Dosis pemberian EVOO merupakan hasil perhitungan konversi dosis manusia ke hewan coba. Penentuan dosis EVOO untuk tikus putih (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley* ini berpedoman pada dosis rata-rata VOO yang dikonsumsi masyarakat mediterania yaitu 25-50 ml per hari. Dosis paling efektif adalah 50ml/hari yang dikonversikan kepada dosis tikus dengan berat rata-rata 200 gram menjadi 0,9 ml/hari (Nugraheni, 2012). Pada penelitian ini peneliti memutuskan untuk menggunakan pembulatan dosis menjadi 1 ml/hari.

b. Prosedur pemberian dosis madu

Madu yang digunakan pada penelitian ini adalah madu yang diperoleh dari madu kelengkeng yang diproduksi Perum Perhutani yang sudah memenuhi mutu SNI. Dosis pemberian madu ini merupakan hasil perhitungan konversi dari manusia ke hewan coba. Penentuan dosis madu untuk tikus putih (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley* ini berpedoman pada dosis yang efektif yang sudah dilakukan penelitian ke manusia dan dapat menurunkan kolesterol total, LDL, dan trigliserida serta menaikkan kadar HDL yaitu 75 g/hari atau sama dengan 75 ml (Bagdanov, 2012). Pada penelitian ini dilakukan pengkonversian dosis 75 ml/hari kepada tikus (berat badan rata-rata 200 gram) dengan dikalikan faktor konversi dari manusia ke tikus yaitu 0,018 menurut Laurence & Bacharach 1964 (Ekawati, 2012), sehingga didapatkan dosis 1,35 ml/hari.

c. Prosedur pemberian diet tinggi kolesterol

Pada penelitian Pratama dan Probosari (2012) digunakan pakan tinggi kolesterol berupa suspensi otak sapi sebanyak 2 ml per hari. Otak sapi diolah dengan cara dikukus dan diblender dengan penambahan air dengan perbandingan 1:1. Dalam 100 gram otak sapi mengandung sekitar 2 gram kolesterol dan 2,9 gram asam lemak jenuh. Berdasarkan kandungan tersebut, suspensi otak sapi yang diberikan mengandung 20 mg kolesterol dalam 2 ml suspensi otak. Pemberian suspensi otak sapi tersebut selama 15 hari terbukti meningkatkan kadar LDL darah tikus secara bermakna. Pada penelitian ini digunakan suspensi otak sebanyak 3 ml dengan perbandingan otak sapi dengan air 2:1 sehingga diperkirakan mengandung 40 mg kolesterol dan 58 mg lemak jenuh untuk memberi efek hiperkolesterolemia yang lebih tinggi pada tikus selama 15 hari.

d. Alur penelitian

1. Mengukur berat badan 25 ekor tikus percobaan (yang diuji, 10 sebagai cadangan) sebelum perlakuan;
2. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian minyak zaitun murni dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K(-), K(+), P.EVOO, P.madu dan P.kombinasi. Tikus – tikus tersebut dipelihara dalam suhu kamar dan pencahayaan yang cukup pada siang hari selama 7 hari dan diberi pakan pelet standar dan minum *ad libitum*;
3. Kemudian kelompok K(-) diberi diet standar sebagai kontrol negatif sedangkan kelompok K(+) diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari sebagai kontrol positif;

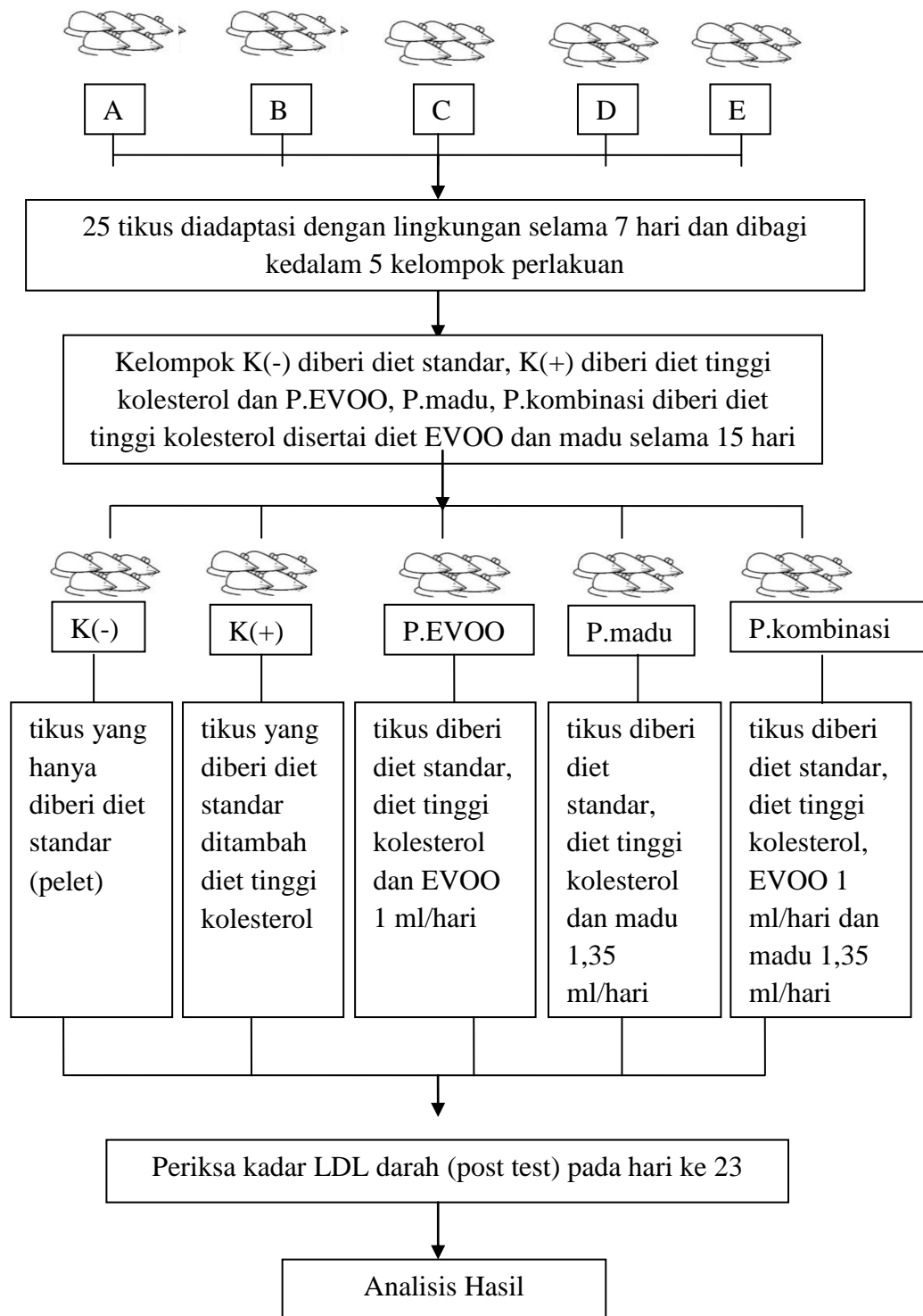
4. Pada waktu yang bersamaan kelompok P.EVOO diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan diet minyak zaitun dengan dosis 1 ml per hari setiap hari selama 15 hari;
5. Pada waktu yang bersamaan kelompok P.madu diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan diet madu dengan dosis 1,35 ml/hari setiap hari selama 15 hari;
6. Pada waktu yang bersamaan kelompok P.lombinasi diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan diet kombinasi madu + minyak zaitun dengan dosis 1,35 ml/hari dan 1 ml/hari selama 15 hari;
7. Pada hari ke 23 setelah waktu adaptasi dan perlakuan, sampel dipuaskan terlebih dulu selama 10 jam kemudian di-anestesi menggunakan ketamine+xylazine dengan dosis 75-100 mg/kgbb dan 5–10 mg/kgbb secara intraperitoneal. Setelah itu tikus di-*euthanasia* menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher, kemudian leher ditekan ke dasar tengkorak dan tangan lainnya pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan mati, darah di ambil melalui jantung dengan menggunakan spuit 1 ml sebanyak 2 ml, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST (Yellow Top)* yang sudah berisi *clot activator* dan *inner separator*.

8. Darah sebanyak 2 ml didiamkan selama 30 menit kemudian disentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serumnya. Pengukuran kadar LDL darah tikus dilakukan di Gladish Medical Center, Pesawaran, Bandar Lampung. Kemudian data hasil pemeriksaan LDL dianalisis secara statistik pengaruh pemberian EVOO dan madu terhadap kadar LDL darah.

Dalam praktik rutin, konsentrasi LDL (mg/dL) dihitung secara tidak langsung (*indirect*) dari pengukuran kadar trigliserida (TG), *High Density Lipoprotein* (HDL), dan kolesterol total (TC) dengan menggunakan persamaan Friedewald:

$$\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - (\text{TG} / 5)$$

Ketika konsentrasi dinyatakan dalam mmol/L, TG dibagi dengan 2,17 tidak dibagi 5. Persamaan atau rumus Friedewald hanya dapat digunakan jika kadar TG tidak melebihi 400 mg/dL (Ahmadi *et al*, 2008).



Gambar 3.1. Diagram alur penelitian

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan yang merupakan hasil penelitian diuji menggunakan program komputer yaitu dengan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene* untuk mengetahui apakah data pada masing-masing kelompok berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Data dari masing-masing kelompok kemudian dianalisis menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan kelompok perlakuan dengan syarat data berdistribusi normal dan homogen. Derajat kemaknaan (taraf signifikansi) yang dipakai adalah ($\alpha = 0,05$), sehingga bila $p < 0,05$ maka paling tidak terdapat dua kelompok data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna dan bila $p > 0,05$ maka kelompok data tidak mempunyai perbedaan rerata yang bermakna. Selanjutnya dilakukan analisis *Post Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan telah disetujui 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 tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $(r-1)(t-1) \geq 15$, dengan r adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
- c. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu:
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 sonde lambung 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* (Ridwan, 2013).