

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 dan diberi perlakuan serta ada kelompok pengontrolnya (Dahlan, 2010).

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang berumur 4-5 bulan dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok. Pemilihan tikus putih jenis ini dikarenakan memiliki sifat yang lebih tenang dan mudah dikondisikan hiperkolesterolemia.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada November – Desember 2013 selama 15 hari dengan masa adaptasi 7 hari sebelum perlakuan yang bertempat di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Perawatan dan perlakuan sampel bertempat

di *pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pemeriksaan kadar kolesterol HDL dilakukan di laboratorium *Gladish Medical Center* (GMC) Pesawaran.

C. Alat dan bahan penelitian

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

- a. Kandang tikus;
- b. Botol minum tikus;
- c. sonde untuk pemberian oral;
- d. spuit oral;
- e. minor set;
- f. timbangan analitik;
- g. kapas;
- h. kamera digital.

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

- a. *Extra Virgin olive oil* (EVOO) dengan merek dagang *pietro coricelli* yang di produksi oleh Italia sebagai negara kedua penghasil minyak zaitun dan diimpor oleh Indonesia, EVOO ini dibeli di salah satu supermarket di kota Bandar Lampung;
- b. Madu kelengkeng yang didapatkan dari madu kelengkeng perhutani yang sudah memenuhi mutu Standar Nasional Indonesia (SNI).

- c. tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 4-5 bulan yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor;
- d. aquades;
- e. makanan standar tikus (pelet dan gabah);
- f. Pakan tinggi kolesterol yang diberikan adalah berupa otak sapi dengan dosis 3 ml/hari ;
- g. Obat anestesi ketamine+xylazine sebagai narkosis sebelum pengambilan darah tikus.

D. Populasi dan Sampel

1. 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.

2. Sampel penelitian

Hewan penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* umur 4-5 bulan dengan berat badan rata-rata antara 200-250 gram. Sampel penelitian dipilih secara simple random sampling berjumlah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*. Dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

Selama penelitian selain perlakuan utama, semua tikus tetap diberi makan campuran pelet dan gabah dan diberi minum secukupnya.

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 1 tikus putih sebagai cadangan pada masing-masing kelompok sehingga jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor.

3. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*;
- b. Berat badan rata-rata antara 150-250 gram;
- c. Tikus berumur 4-5 bulan
- d. Didapatkan dari tempat pembiakan yang sama dan pakan yang sama.

4. Kriteria eklusi

Kriteria eklusi dari penelitian ini adalah:

- a. 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);
- b. Penurunan berat badan selama adaptasi lebih dari 10%;
- c. Mati selama pemberian perlakuan.

E. Metode Penelitian

Metode penelitian meliputi tipe penelitian, variabel penelitian, definisi operasional variabel, instrumen penelitian, prosedur penelitian, rancangan analisis data, waktu, dan tempat penelitian serta implikasi etik penelitian.

1. Tipe penelitian

Tipe penelitian adalah studi eksperimental laboratorium dalam bidang ilmu biokimia. Adapun tipe penelitian ini adalah *post test only with control group-design*. Sebelum penelitian berlangsung 30 ekor tikus putih diadaptasikan dahulu selama 7 hari dengan diberikan pakan *standard* dan air minum *ad libitum*. Kemudian tikus putih dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor. Kelompok A diberikan pakan *standard* seperti adaptasi tanpa diberikan perlakuan sebagai kontrol negatif, kelompok B diberikan diet tinggi kolesterol sebagai kontrol positif, kelompok C diberikan diet tinggi kolesterol dan EVOO selama 15 hari, kelompok D diberikan diet tinggi kolesterol dan madu selama 15 hari, sedangkan kelompok E diberikan diet tinggi

kolesterol dan kombinasi EVOO dan madu selama 15 hari. Perlakuan yang diberikan sebagai berikut :

- a. Kelompok A sebagai kontrol negatif tikus hanya diberi makan dan minum seperti biasa;
- b. Kelompok B sebagai kelompok kontrol positif diberikan diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung;
- c. Kelompok C diberikan diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan EVOO sebanyak 1 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung;
- d. Kelompok D diberikan diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung;
- e. Kelompok E diberikan 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 menggunakan sonde lambung.

Pengukuran kadar HDL darah dilakukan setelah pemberian diet tinggi kolesterol dan perlakuan dalam jumlah yang ditentukan selama 15 hari.

2. Identifikasi Variabel Penelitian

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

- a. Variabel perlakuan (*independen*) adalah pemberian EVOO, madu dan kombinasi EVOO dan madu.

- b. Variabel respon (*dependen*) adalah kadar HDL dalam darah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

3. Definisi Operasional Variabel Penelitian

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

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Skala
Extra Virgin Olive Oil (EVOO)	EVOO diberikan kepada tikus.	Numerik
Madu	Madu yang diberikan kepada tikus	
Kelengkeng	Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades	
	Kelompok II (kontrol positif) = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari	
	Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan EVOO sebanyak 1 ml/ekor/hari	
	Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian diet tinggi kolesterol dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari	
	Kelompok V (perlakuan coba) = 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 HDL darah tikus	Lipoprotein berdensitas tinggi yang mengambil kolesterol dari seluruh tubuh diperoleh dari serum darah tikus. Kadar optimal HDL pada tikus yaitu > 25 mg/dl atau sama dengan kadar HDL tikus normal (kontrol negatif)	Numerik

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur pemberian dosis EVOO

Extra virgin olive oil atau minyak zaitun murni yang digunakan pada penelitian ini yaitu EVOO 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 galur *sprague dawley* ini berpedoman pada dosis rata-rata EVOO yang dikonsumsi masyarakat mediterania yaitu 25-50 ml per hari. Dalam penelitian yang dilakukan Nugraheni (2012), dosis yang paling efektif adalah 50 ml/hari yang dikonversikan kepada dosis tikus dengan berat rata-rata 200 gram menjadi 0,9 ml/hari, pada penelitian ini peneliti memutuskan untuk mengambil dosis 1 ml/hari.

2. 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 Standard Nasional Indonesia (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/hari (Bagdanov, 2012). Pada penelitian ini dilakukan pengkonversian dosis 75 ml/hari kepada tikus dengan 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.

3. Prosedur pemberian dosis kombinasi EVOO dan Madu

Dosis kombinasi pemberian EVOO dan madu adalah sesuai dengan dosis pada masing-masing dosis yang telah diberikan pada kelompok sebelumnya, kemudian digabungkan menjadi satu.

4. 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 kolesterol darah tikus secara bermakna. Pada penelitian ini digunakan suspensi otak sebanyak 3 ml dengan perbandingan otak sapi dengan air 2:1 sehingga mengandung 40 mg kolesterol untuk memberi efek hiperkolesterolemia yang lebih tinggi pada tikus selama 15 hari.

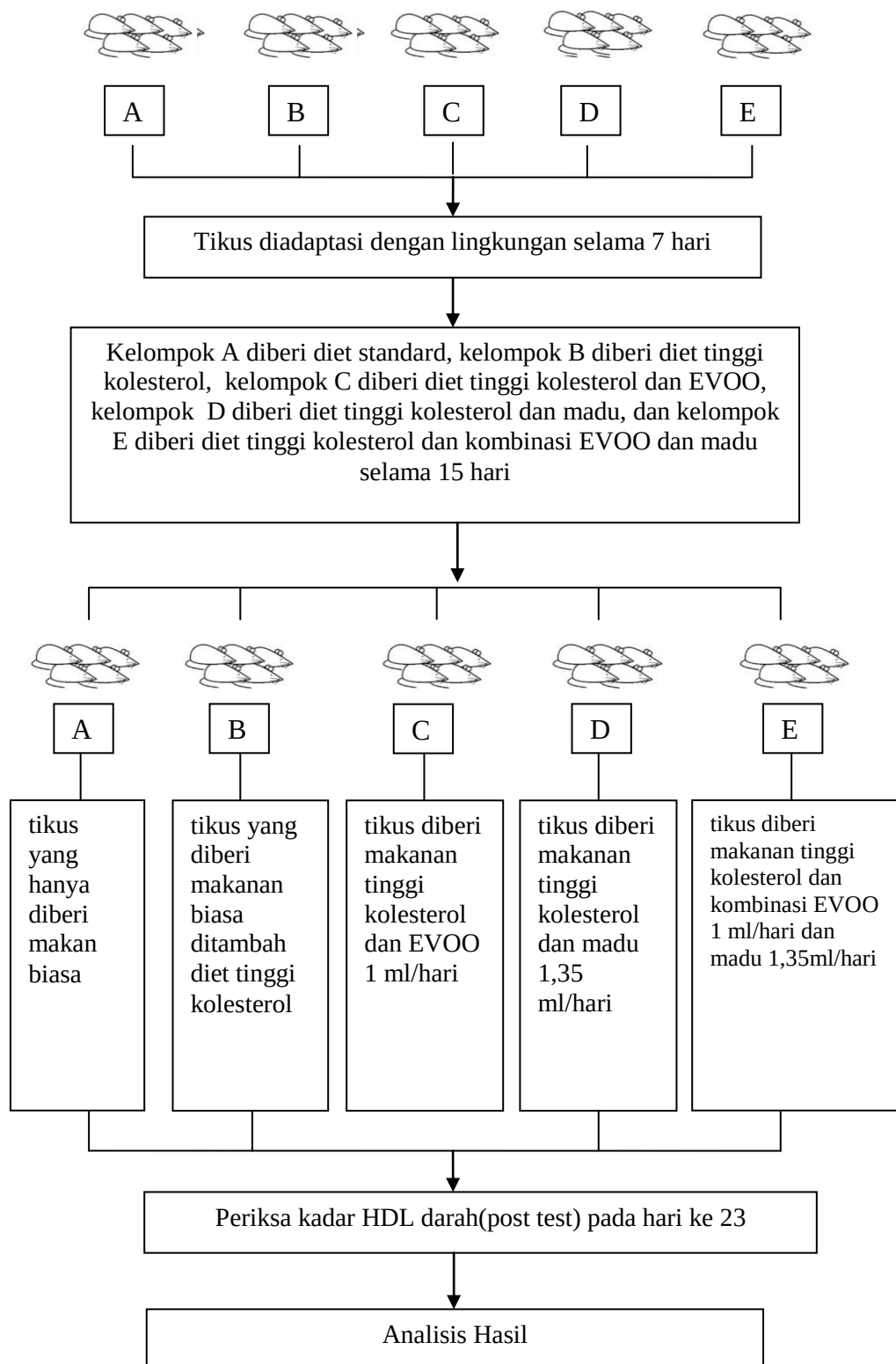
5. Alur penelitian

- a. Mengukur berat badan 30 ekor tikus percobaan (25 yang diuji, 5 sebagai cadangan) sebelum perlakuan;

- b. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian EVOO, madu, dan kombinasi EVOO dan madu dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok A, B, C, D dan E. Tikus-tikus tersebut dipelihara dalam suhu kamar dan pencahayaan yang cukup pada siang hari selama 7 hari dan diberi pakan pelet dicampur gabah dan minum *ad libitum*;
- c. Kemudian kelompok A diberi diet standard sebagai kontrol negatif sedangkan kelompok B diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari sebagai kontrol positif.
- d. Pada waktu yang bersamaan kelompok C diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan EVOO dengan dosis 1 ml/ekor/hari, kelompok D diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan madu dengan dosis 1,35 ml/ekor/hari, dan kelompok E diberi diet tinggi kolesterol yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan kombinasi EVOO dengan dosis 1 ml/ekor/hari dan madu dengan dosis 1,35 ml/ekor/hari setiap hari selama 15 hari.
- e. Pada hari ke 23 sampel dipuasakan terlebih dulu selama 10 jam kemudian dinarkosis 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 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 1ml sebanyak 2ml, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST(Yellow Top)* yang sudah berisi *Clot activator* dan *Inner separator*.

- f. Darah sebanyak 2 ml didiamkan terlebih dahulu selama 30 menit, kemudian disentrifugasi menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serumnya. Pengukuran kadar kolesterol HDL tikus dilakukan di laboratorium *Gladish Medical Center* (GMC) Pesawaran. Kemudian data ditabulasi untuk menganalisis secara statistik pengaruh pemberian EVOO, madu dan kombinasi EVOO dan madu terhadap kadar kolesterol HDL darah dan selanjutnya hasil pemeriksaan ditabulasi dan dianalisis statistik.



Gambar 5. Diagram alur penelitian.

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diuji analisis statistik menggunakan aplikasi pengolah data. Data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Jika data berdistribusi normal serta homogen ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji beda lebih dari dua sampel, yaitu uji analisis varian satu arah (*one way ANOVA*) dengan taraf kepercayaan 95% sehingga dapat diketahui apakah perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Uji *ANOVA* akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$ dan selanjutnya dilakukan uji *post hoc*. Jika salah satu syarat untuk uji *ANOVA* tidak terpenuhi, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan. Apabila terdapat perbedaan bermakna, dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar tiap kelompok perlakuan (Dahlan, 2010).

H. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *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.

2. *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.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu:
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, 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.
 - c. 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 kenyamanan dan mengurangi rasa sakit pada hewan dengan memberikan *anesthesia* serta *euthanasia* oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) (Ridwan, 2013).