

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu suatu metode penelitian yang dilakukan dengan tujuan untuk menguji hipotesis sebab akibat dengan melakukan intervensi. Sedangkan rancangan atau desain penelitiannya menggunakan *Post Test Only Control Group Design*, dengan rancangan ini memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Tempat pemeliharaan hewan percobaan dilakukan di *pet house* yang berada di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak etanol 95% cabe jawa dilakukan di laboratorium kimia organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Pengukuran kadar LDL dilakukan di laboratorium Duta Medika Bandar Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 8 minggu dimulai dari bulan September-November 2013.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (*independent variable*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang diberikan kepada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur Sprague-dawley.

2. Variabel Terikat (*dependent variable*)

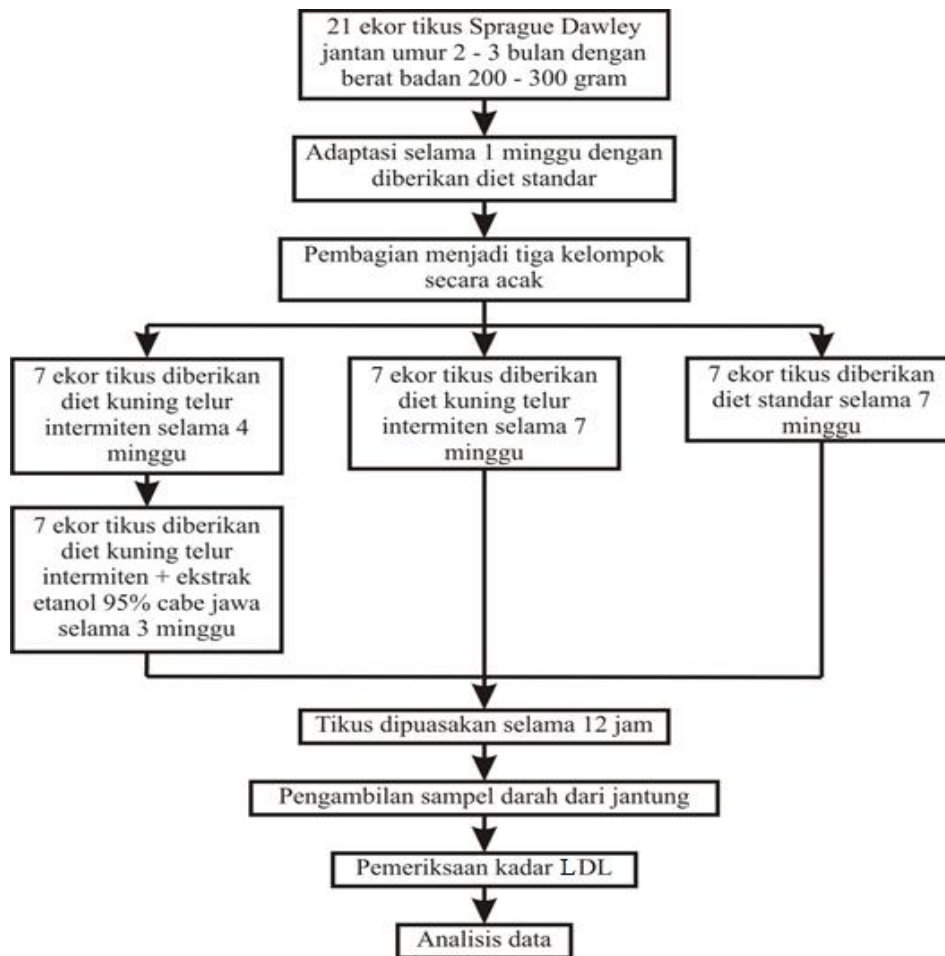
Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar LDL serum tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur Sprague-dawley.

D. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	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 per hari yang dilarutkan dalam 1cc aquades	Timbangan	mg/cc	Kategorik
2.	Kadar kolesterol LDL	Kadar kolesterol LDL tikus putih jantan (<i>Rattus novergicus</i>) galur Sprague Dawley	Spektrofotometer	mg/dl	Numerik

E. Prosedur Penelitian



Gambar 4. Prosedur penelitian

1. Lama Penelitian

Pada penelitian sebelumnya, lama penelitian yang dilakukan adalah selama 8 minggu, terdiri dari 1 minggu masa adaptasi dan 7 minggu masa perlakuan.

2. Diet Tinggi Lemak

Tikus putih dipilih sebagai objek penelitian karena memiliki homogenitas metabolik yang mirip manusia, tikus putih memiliki organ dan fisiologi sistemik yang sama, serta memiliki gen yang mirip dengan manusia. Tikus putih juga mempunyai kemiripan yang baik bagi

patogenesis suatu penyakit. Kemiripan inilah yang menjadi salah satu alasan mengapa Tikus putih digunakan dalam meneliti patogenesis penyakit pada manusia (Demetrius, 2005).

Diet tinggi lemak yang diberikan pada penelitian ini adalah diet kuning telur. Pemberian 10 gram diet kuning telur yang diberikan secara intermitten kepada tiap tikus terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol total, trigliserida dan kolesterol LDL serta menurunkan kadar kolesterol HDL (Prasetyo, 2000).

3. Prosedur Ekstraksi 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% 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 dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 50^oC hingga diperoleh ekstrak kering (Mutiarra, 2013).

4. Ekstrak etanol 95% Cabe Jawa (*Piper retrofractum Vahl.*)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dosis piperin yang terbukti menurunkan kadar LDL 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:

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

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

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.*).

5. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. Tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempatkan terpisah dengan tikus 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.

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 atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan 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, tikus dibedah kemudian diambil organ jantung. Kemudian pengambilan darah di ambil dari jantung tikus dengan menggunakan alat suntik sebanyak ± 3 cc dan dimasukkan ke dalam tabung *vacum tainer* kapasitas 10 cc.

6. Cara Pembuatan 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 (Bahaudin, 2008).

7. Penentuan Kadar LDL

a. Pengukuran kadar kolesterol total

Sampel dan reagen dicampur dan dimasukkan dalam inkubator 20–25°C selama 20 menit atau pada 37°C selama 10 menit Absorbsinya diukur pada sepektrofotometer dengan λ 500 nm dengan larutan blanko sebagai titik 0 nya. Perhitungan konsentrasi kolesterol total dengan rumus:

Kolesterol Total = $\text{absorbansi/absorbansi standar} \times \text{standar mg/dl atau mmol/l}$.

b. Pengukuran kadar trigeliserida

Serum dan larutan pereaksi dicampurkan dan diinkubasi pada suhu $+20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit. Absorbansi diukur sampai (As) dan absorbansi standart (Ast) dengan spektrofotometer λ 500 nm.

Perhitungan kadar trigeliserida dengan menggunakan rumus:

Konsentrasi trigliserida = $\text{Absorbansi} \times [\text{Standar}]/\text{Absorbansi standar}$
 mg/l atau Batas kelarutan = 100mg / dl atau 11.4 mmol/l

c. Pengukuran kadar HDL

Serum sebanyak 200 μl ditambah 500 μl reagen presipitan dimasukkan ke dalam sentrifuge, mencampurnya baik-baik, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 g selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk pemeriksaan kadar kolesterol-HDL. Pengukuran kadar kolesterol-HDL yaitu Supernatan dan pereaksi kolesterol dicampur baik-baik, didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian dibaca pada λ 500 nm dengan titik nol blanko. Dengan rumus perhitungan:

Kadar kolesterol-HDL = $\text{Absorbansi}/\text{Absorbansi standar} \times [\text{Standar}]$

d. Penentuan kadar LDL

Konsentrasi kolesterol LDL dihitung dari kadar kolesterol total, HDL, dan trigliserida menurut rumus Fried & Wald:

$\text{LDL} = \text{Kolesterol Total} - \text{HDL} - \text{Trigliserida}/5 \text{ mg/dl}$

$\text{LDL} = \text{Kolesterol Total} - \text{HDL} - \text{Trigliserida}/2.2 \text{ mmol/l}$

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan, tempat pakan hewan, tempat minum hewan, timbangan elektronik AND, sonde lambung, *disposable sputum*, *handschoen*, pipet tetes, tabung reaksi, pipet mikro, tip biru (untuk memindahkan reagen) dan kuning (untuk memindahkan serum), sentrifuge tabung, spektrofotometer sumifin 1904-f (*semi automatic*), teko, gelas kimia, gelas ukur, pipet tetes, elemeyer, rotary, dan alat tulis.

2. Bahan

- a. Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berasal dari Institut Pertanian Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Mendapat pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
- b. Bahan perlakuan berupa :
 - 1) Diet tinggi lemak yang berasal dari kuning telur
 - 2) Ekstrak etanol 95% cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)
- c. Bahan pemeriksaan kadar LDL berupa Reagen untuk pemeriksaan kadar HDL, kolesterol total, dan trigliserida.

G. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

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

2. Sampel Penelitian

a. Kriteria Inklusi

- 1) Sehat, ditandai dengan bergerak aktif.
- 2) Umur 2-3 bulan
- 3) Berat 200-300 gram

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus mati sebelum penelitian selesai
- 2) Tikus mengalami diare kronis

c. Besar Sampel

Untuk penelitian kali ini, besar sampel yang digunakan ditentukan menggunakan rumus Federer 1963

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

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Maka 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 6 ekor tikus untuk tiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah sebanyak 7 ekor tikus untuk setiap kelompok, sehingga seluruh jumlah sampel adalah 21 ekor. Rincian besar sampel yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Besar sampel penelitian

Kelompok	Besar Sampel
Kelompok A (Diet standar)	7 ekor
Kelompok B (Diet tinggi lemak)	7 ekor
Kelompok C (Diet tinggi lemak + cabe jawa)	7 ekor
Total Sampel	21 ekor

H. Pengumpulan Data

Data diperoleh dari pemeriksaan kolesterol LDL tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley pada akhir penelitian. Setelah itu data dimasukkan ke dalam tabel.

I. Pengolahan Data

Pengolahan data akan dilakukan dengan menggunakan *software* statistik. Langkah pertama adalah dengan melakukan uji normalitas data yaitu dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Bila sebaran data normal maka dilakukan analisis dengan menggunakan *oneway* ANOVA, namun bila sebaran data tidak normal, uji yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*. Bila pada uji *oneway* ANOVA atau uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil yang signifikan (bermakna), maka dilanjutkan analisis *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang bermakna. Analisis *post-hoc* untuk *oneway* ANOVA adalah *Bonferroni*, sedangkan untuk uji *Kruskal-Wallis* adalah *Mann Whitney*.

J. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 3 Januari 2014 melalui surat nomor 042/UN26/8/DT/2014 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 Freederer yaitu $t(n-1) \geq 15$, dengan n 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.

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 *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 IACUC (Ridwan, 2013).