

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **III.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan menggunakan pola *post test only control group design*. Rancangan acak lengkap 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)

#### **III.2 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 trigliserida darah dilakukan di Gladish Medical Center (GMC) Pesawaran Bandar Lampung.

### III.3. 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. Minyak zaitun
  - b. Madu kelengkeng
  - 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 lemak yang diberikan adalah berupa otak sapi dengan dosis 3 ml/hari (Pratama & Probosari, 2012)
  - g. Obat anestesi ketamine + xylazine sebagai narkosis sebelum pengambilan darah tikus.

### III.4. Populasi dan Sampel

#### III.4.1 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.

#### III.4.2 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 simpel 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 rumus Ferderer  $(t-1)(n-1) \geq 15$ . Dimana t adalah jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini akan menggunakan lima kelompok perlakuan sehingga penghitungan sampel menjadi :

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

Pada penelitian ini ditetapkan jumlah sampel yang akan digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor tikus putih masing-masing kelompok.

a. 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 rata-rata antara 150-250 gram;
4. didapatkan dari tempat pembiakan yang sama dan pakan yang sama.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi 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.

### III.5. 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.

### III.5.1 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 5 ekor. Kelompok A diberikan pakan *standard* seperti adaptasi tanpa diberikan perlakuan sebagai kontrol negatif, kelompok B diberikan diet tinggi lemak sebagai kontrol positif, kelompok C diberikan diet tinggi lemak dan minyak zaitun dengan rentang waktu pemberian 6 jam selama 15 hari, kelompok D diberikan diet tinggi lemak dan madu dengan rentang waktu pemberian 6 jam selama 15 hari, sedangkan kelompok E diberikan diet tinggi lemak dan kombinasi minyak zaitun dan madu dengan rentang waktu 6 jam selama 15 hari. 5 langkah kelompok perlakuan adalah

- a. Kelompok A sebagai kontrol negatif tikus hanya diberi makan dan minum seperti biasa;
- b. Kelompok B sebagai kelompok kontrol positif diberikan diet tinggi lemak dengan dosis 3 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung;
- c. Kelompok C diberikan diet tinggi lemak dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan minyak zaitun sebanyak 1 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung dengan rentang pemberian 6 jam;

- d. Kelompok D diberikan diet tinggi lemak dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung dengan rentang pemberian 6 jam;
- e. Kelompok E diberikan diet tinggi lemak dengan dosis 3 ml/ekor/hari dan kombinasi minyak zaitun sebanyak 1 ml/ekor/hari serta madu sebanyak 1,35 ml/ekor/hari menggunakan sonde lambung dengan rentang pemberian 6 jam;

### III.5.2 Identifikasi Variabel Penelitian

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

- a. Variabel perlakuan (*independen*) adalah pemberian minyak zaitun, madu dan kombinasi minyak zaitun dan madu.
- b. Variabel respon (*dependen*) adalah kadar Trigliserida pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*

### III.5.3 Definisi Operasional Variabel Penelitian

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

**Tabel 6.** Definisi operasional

variabel	Definisi		Alat Ukur	Hasil	Skala
	operasion al	Cara Ukur			
<b>Minyak zaitun</b>	Minyak zaitun yg diberikan pada klmpk C dan E dosis 1 ml	Minyak zaitun ditakar mencapai volume 1ml	Sput	0: ya 1: tidak	Numerik
<b>Madu</b>	Madu yang diberikan pada klmpk D dan E dosis 1,35 ml	Minyak zaitun ditakar mencapai volume 1,35 ml	Sput	0 : ya 1: tidak	Numerik
<b>Kadar Trigliser ida</b>	Kadar optimal trigliserida 46,89 mg/dl	Metoda GPO - PAP	Spekto fotome ter	0 : Normal 1: peningk atan 2: penuru nan	Numerik

### III.6 Prosedur Penelitian

#### III.6.1 Prosedur pemberian dosis minyak zaitun

Dosis pemberian minyak zaitun merupakan hasil perhitungan konversi dosis manusia ke hewan coba. Penentuan dosis minyak zaitun untuk tikus putih galur sprague dawley ini berpedoman pada dosis rata-rata minyak zaitun 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.

#### III.6.2 Prosedur pemberian dosis madu

Madu yang digunakan pada penelitian ini adalah madu kelengkeng. 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.



a. Prosedur pemberian dosis kombinasi minyak zaitun dan madu

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

b. Prosedur pemberian diet tinggi lemak

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.

c. Alur penelitian

1. Mengukur berat badan 30 ekor tikus percobaan (25 yang diuji, 5 sebagai cadangan) sebelum perlakuan;
2. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian minyak zaitun, madu, dan kombinasi minyak zaitun dan madu dibagi menjadi 5

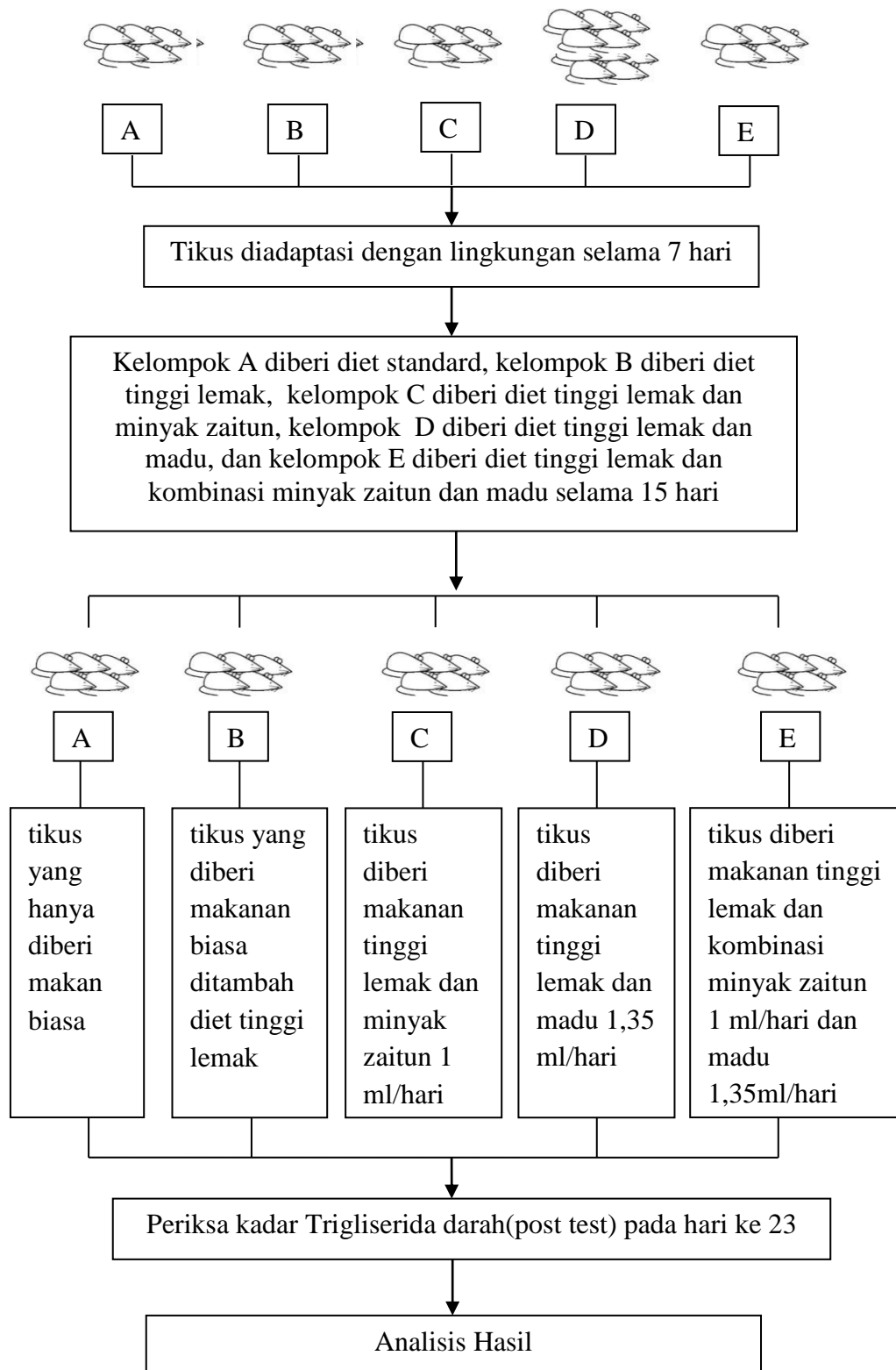
kelompok yaitu kelompok A, B, C, D dan E. Tikus-tikus tersebut dipelihara dalam suhu kamar dan pencahayaan yang cukup pada siang hari selama 7 hari dan diberi pakan pelet dicampur gabah dan minum *ad libitum*;

3. Kemudian kelompok A diberi diet standard sebagai kontrol negatif sedangkan kelompok B diberi diet tinggi lemak yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari sebagai kontrol positif.
4. Pada waktu yang bersamaan kelompok C diberi diet tinggi lemak yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan minyak zaitun dengan dosis 1 ml/ekor/hari, kelompok D diberi diet tinggi lemak 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 lemak yaitu suspensi otak sapi sebanyak 3 ml per tikus per hari dan kombinasi minyak zaitun dengan dosis 1 ml/ekor/hari dan madu dengan dosis 1,35 ml/ekor/hari setiap hari selama 15 hari.
5. 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 2 ml, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST(Yellow Top)* yang sudah berisi *Clot activator* dan *Inner separator*.

6. 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 trigliserida tikus dilakukan di laboratorium Gladish Medical Center (GMC) Pesawaran. Kemudian data ditabulasi untuk menganalisis secara statistik pengaruh pemberian minyak zaitun, madu, dan kombinasi minyak zaitun dan madu terhadap kadar trigliserida darah dan selanjutnya hasil pemeriksaan ditabulasi dan dianalisis statistik.





**Gambar 6.** Diagram alur penelitian.

### III.7 Pengolahan dan 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).

### III.8 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 tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai

dengan *International Animal Care and Use Committe* (IACUC) (Ridwan, 2013).