

BAB III METODE PENELITIAN

III.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only controlled group design*.

III.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Hewan coba dipelihara di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dalam periode Oktober – November 2014. Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Pengambilan darah tikus dilakukan di Balai Veterinarian Bandar Lampung dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Perhitungan kadar LDL hewan coba dilakukan di Laboratorium Klinik Duta Medika.

III.3 Populasi dan Subyek Penelitian

III.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus

putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague Dawley*

III.3.2 Sampel Penelitian

III.3.2.1 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

III.3.2.2 Kriteria Eksklusi

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

III.3.2.3 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini akan menggunakan rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu :

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

Hasil perhitungan di atas menunjukkan bahwa dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak lima ekor tikus setiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus yang akan dibagi dalam tiga kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (N) yang diberikan pakan standar. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif (KT). Tikus pada kelompok ini diberikan pakan standar ditambah dengan pakan tinggi lemak, sedangkan kelompok ketiga (P1), keempat (P2) dan kelima (P3) adalah kelompok perlakuan. Tikus pada kelompok ini akan diberikan pakan standar ditambah pakan tinggi lemak kemudian ditambahkan pemberian ekstrak etanol 96% bawang putih (*Allium sativum* L.). Kelompok ketiga diberikan dosis sebesar 0,05 ml. Kelompok keempat dan kelima diberikan ekstrak etanol 96% bawang putih dengan dosis masing-masing 0,025 dan 0,1.

III.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

III.4.1 Identifikasi Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Variabel Bebas (Independen) adalah Ekstrak etanol 96% bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diberikan kepada tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague Dawley*
- b. Variabel Tergantung (Dependen) adalah kadar LDL tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague Dawley*

III.4.2 Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Hasil ukur	Skala
1	Ekstrak etanol 96% bawang putih (<i>Allium sativum</i> L.)	Sediaan bawang putih yang dibuat dengan metode maserasi cara dingin dengan suhu 25°C	mg	numerik
2	Kadar kolesterol LDL	Nilai LDL tikus putih jantan (<i>Rattus novergicus</i>) galur <i>Sprague Dawley</i> hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer	Mg/dl	numerik

III.5 Alat dan Bahan Penelitian

III.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Kandang hewan
- b. Tempat pakan hewan
- c. Tempat minum hewan
- d. Alat tulis
- e. *Rotary evaporator*
- f. Sonde lambung
- g. *Disposable spuit*
- h. *Handschoen*
- i. Pipet tetes
- j. Pipet mikro
- k. Sentrifuge
- l. Tabung *vacuum venojact*
- m. Spektrofotometer

III.5.2 Bahan Penelitian

- a. Hewan coba berupa tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague Dawley* yang berasal dari Institut Pertanian Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Hewan coba diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
- b. Bahan perlakuan berupa :
 1. Pakan standar tikus
 2. Pakan tinggi lemak yang berasal dari kuning telur
 3. Ekstrak etanol 96% bawang putih

c. Bahan untuk tindakan terminasi berupa :

1. Ketamine 75-100 mg/kg
2. Xylazine 5-10 mg/kg

d. Bahan pemeriksaan kadar kolesterol LDL berupa :

Reagen untuk pemeriksaan kadar kolesterol LDL dan sampel darah tikus

III.6 Prosedur Penelitian

III.6.1 Prosedur Pemberian Pakan Tinggi Lemak

Pemberian diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari yang diberikan secara intermiten dapat meningkatkan kadar kolesterol total pada tikus putih. Pernyataan tersebut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Prasetyo, 2002). Pakan standar diletakkan di tempat pakan tikus pada penelitian ini. Pakan tinggi lemak berupa kuning telur diberikan secara *ad libitum* dengan terlebih dahulu dihomogenkan. Kuning telur diberikan pada hari pertama, ketiga, kelima, dan seterusnya sedangkan ekstrak bawang putih diberikan satu kali sehari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

III.6.2 Prosedur Pemberian Ekstrak Bawang Putih

III.6.2.1 Cara Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Umbi bawang putih 3,6 kg kulitnya dicuci bersih kemudian dihaluskan. Lalu bawang putih yang telah dihaluskan tersebut ditambah 6000 mL etanol teknis dingin, diaduk selama 15 menit, kemudian didiamkan selama 24 jam, lalu disaring. Proses tersebut diulang sebanyak 3 kali. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Hasil proses pemanasan tersebut dihasilkan ekstrak kental yang kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan pemanas water bath sambil terus diaduk, sehingga dihasilkan ekstrak bawang putih.

III.6.2.2 Cara Perhitungan Dosis Ekstrak Bawang Putih

Dosis penggunaan bawang putih segar pada manusia dewasa adalah 1/2 sampai 2 siung (2-6 gram) sekali sampai 4 kali sehari (Priskila, 2008). Dalam penelitian ini digunakan dosis bawang putih sebesar 6 gram, 4 kali sehari.

Dosis bawang putih: $6 \text{ gram} \times 4 = 24 \text{ gram/hari}$

Dosis untuk tikus seberat 200 gram = $0,018 \times 24 \text{ gram/hari} = 0,432 \text{ gram/hari}$

3,6 kg umbi bawang putih menghasilkan 450 ml ekstrak bawang putih. 1 gram umbi bawang putih segar setara dengan 0,125 ml ekstrak bawang putih. Dosis : 0,432 gram umbi bawang putih segar setara dengan 0,05 ml ekstrak bawang putih.

Tabel 6. Konversi Perhitungan Dosis untuk Berbagai Jenis Hewan dan Manusia (Harmita dan Radji, 2008).

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmut 400 gr	Kelinci 2 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 2 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

III.6.2.3 Pemberian Ekstrak

Ekstrak etanol 96% bawang putih diberikan satu kali sehari secara *ad libitum* dengan menggunakan sonde lambung dengan dosis yang telah ditentukan.

III.6.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar LDL

III.6.3.1 Prosedur Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 29 penelitian. Tikus dipuasakan selama 8-10 jam. Setelah itu, dilakukan terminasi pada tikus dengan cara anestesi tikus menggunakan *Ketamine-xylazine* 75-100 mg/Kg dan 5–10 mg/Kg secara intra peritoneal (IP) lalu dengan 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 antar tulang leher dan tengkorak (Leary dkk., 2013). Setelah itu ambil darah sekitar 2-3 ml diambil dari bagian jantung dengan menggunakan alat suntik, kemudian langsung dimasukkan ke dalam tabung *vacuum venojact*. Bangkai tikus langsung dikremasi setelah diambil darahnya.

III.6.3.2 Prosedur Pengambilan Serum

Darah yang telah didapat disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Serum yang terbentuk dipisahkan dari endapan sel-sel darah dengan

menggunakan pipet mikro.

III.6.3.3 Prosedur Pemeriksaan LDL

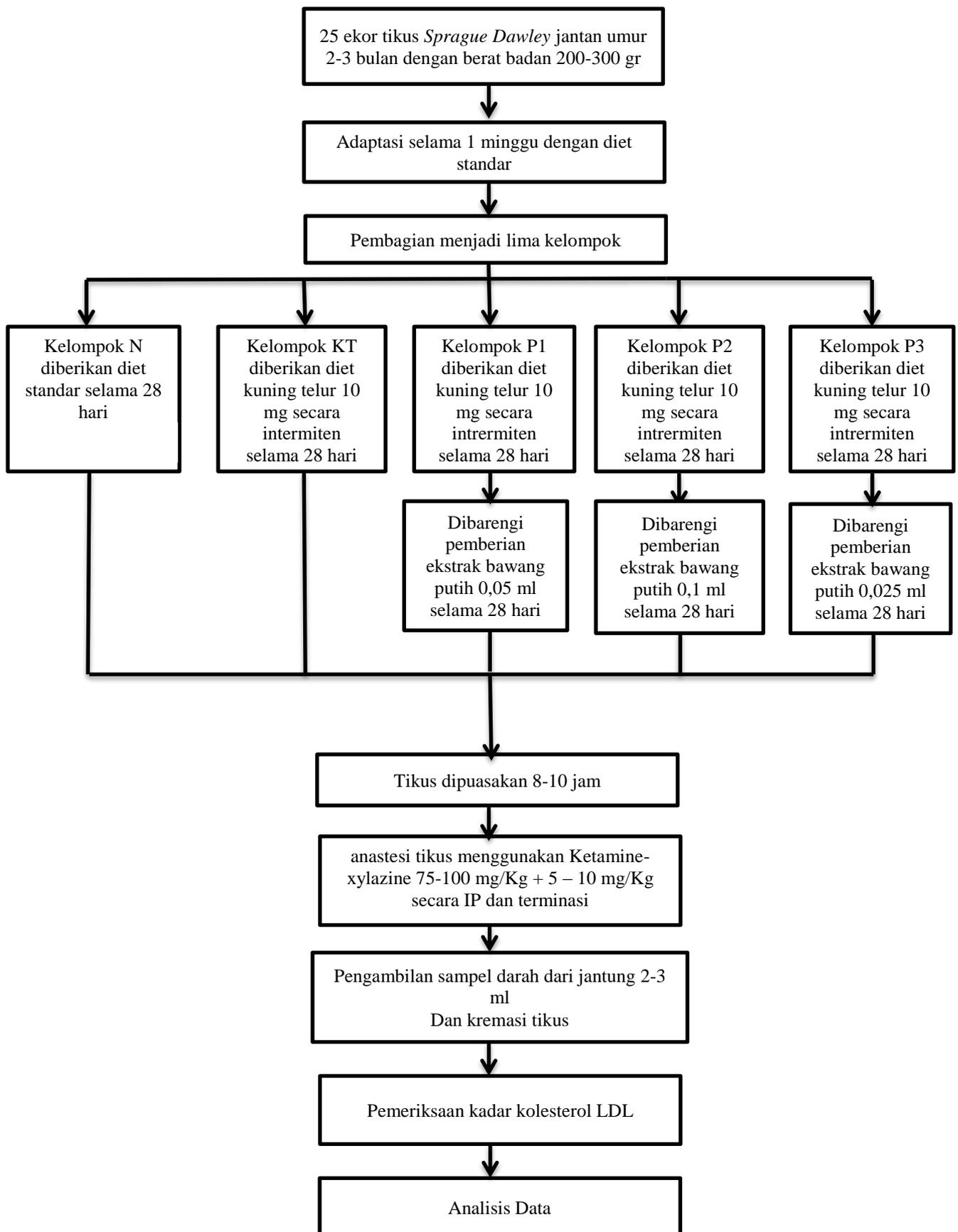
Pemeriksaan kadar kolesterol LDL menggunakan rumus *Friedwald* yaitu $LDL = \text{Kolesterol total} - HDL - \text{Trigliserida}/5$ dengan $\text{Trigliserida}/5$ merupakan asumsi jumlah VLDL. Sebelumnya dilakukan pemeriksaan kadar trigliserida, HDL dan kolesterol total metode langsung dengan reagen masing-masing.

III.6.4 Jalannya Penelitian

1. Pada minggu pertama tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* diadaptasikan sebelum diberikan perlakuan. Hewan coba diberi pakan standar pada masa adaptasi ini.
2. Tikus dibagi dalam 5 kelompok yaitu Kelompok N (kontrol negatif) diberi pakan standar, Kelompok KT (kontrol positif) diberi diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari secara intermiten. Kelompok P1, P2, dan P3 (kelompok perlakuan) diberi diet kuning telur sebanyak 10 mg per hari secara intermiten dengan pemberian ekstrak etanol 96% bawang putih (*Allium sativum* L.) masing-masing 0,05 ml, 0,1 ml, dan 0,025 ml. Tiap kelompok terdapat 5 ekor tikus. Selama 28 hari

perlakuan diberikan kepada tiap kelompok.

3. Hari ke 29 tikus dianastesi menggunakan Ketamine-xylazine 75-100 mg/Kg dan 5–10 mg/Kg secara IP kemudian diterminasi.
4. Pengambilan sampel darah diambil dari jantung tikus sebanyak 2-3 ml kemudian tikus di kremasi.
5. Dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol LDL
6. Dilakukan analisis data dengan menggunakan perangkat lunak pengolah statistik



III.6.5 Analisis Data

Analisis data menggunakan perangkat lunak pengolah data statistik. Pengolahan menggunakan uji parametrik. Langkah pertama dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 dan uji homogenitas *Levene*. Setelah memenuhi kedua syarat uji parametrik tersebut, dilakukan uji *One-Way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat varians data yang berbeda secara bermakna atau tidak. Uji ini dianggap bermakna bila nilai $p < 0,05$. Setelah itu dilakukan uji *post hoc* LSD. Jika tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka dilakukan uji alternatif menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

III.7 Etika Penelitian

Penelitian ini akan menerapkan prinsip etik 3R yaitu :

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah di perhitungkan secara seksama, dari pengalaman terdahulu maupun literatur.
2. *Reduction*, adalah dalam penelitian jumlah hewan harus dikaji dengan menggunakan berbagai macam perhitungan sehingga digunakan hewan dalam jumlah sedikit tanpa menghilangkan arti suatu penelitian.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan coba secara manusiawi

dengan memperhatikan :

- a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba akan diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitium*.
- b. Bebas dari ketidaknyamanan, pada penelitian ini hewan coba akan ditempatkan di *animal house* yang berada jauh dari bising dan aktivitas manusia dengan suhu 20-25°C.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan.