

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

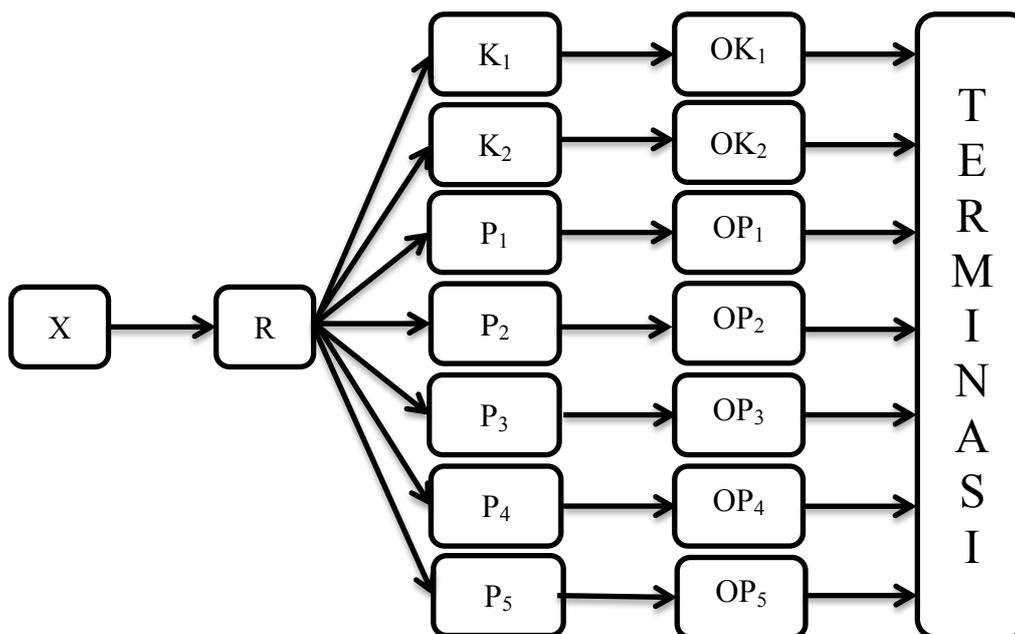
Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu kedokteran dan farmasi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang, Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang, dan Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Waktu yang diperlukan untuk penelitian dan pengumpulan data sekitar 4-5 bulan dari bulan April- Agustus 2017.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium, menggunakan *Post Test Only Control Group Design* dengan hewan coba tikus jantan albino strain *Sprague Dawley*. Dalam penelitian ini digunakan tujuh kelompok hewan coba yang terdiri dari dua kelompok kontrol dan lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar, kelompok kontrol negatif yang diberi diet tinggi kolesterol, kelompok perlakuan mendapat diet tinggi kolesterol ditambah pemberian kitosan, ekstrak bawang putih, dan nanomeulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dengan 3 macam dosis yang berbeda.



Gambar 14. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

X : Tikus jantan *Sprague Dawley*

R : Randomisasi sederhana

K₁ : Kelompok kontrol diberi diet pakan standar

K₂ : Kelompok kontrol diberi diet tinggi kolesterol dan diet pakan standar

P₁ : Kelompok perlakuan I diberi pakan standar, diet tinggi kolesterol dan ekstrak bawang putih dosis 400 mg/kgBB⁹⁴

P₂ : Kelompok perlakuan II diberi pakan standar, diet tinggi kolesterol dan kitosan dosis 400 mg/kgBB⁹⁵

P₃ : Kelompok perlakuan III diberi pakan standar, diet tinggi kolesterol dan nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dosis 50 mg/kgBB (campuran 2 gr ekstrak bawang putih dan 1 gr kitosan dalam bentuk sediaan nanoemulsi)¹¹

P₄ : Kelompok perlakuan IV diberi pakan standar, diet tinggi kolesterol dan nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dosis 75 mg/kgBB (campuran 2 gr ekstrak bawang putih dan 1 gr kitosan dalam bentuk sediaan nanoemulsi)¹¹

P₅ : Kelompok perlakuan V diberi pakan standar, diet tinggi kolesterol dan nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dosis 100 mg/kgBB (campuran 2 gr ekstrak bawang putih dan 1 gr kitosan dalam bentuk sediaan nanoemulsi)¹¹

OK₁ : Kadar profil lipid kelompok kontrol diet pakan standar

OK₂ : Kadar profil lipid kelompok kontrol diet tinggi kolesterol

OP₁ : Kadar profil lipid kelompok perlakuan 1

OP₂ : Kadar profil lipid kelompok perlakuan 2

OP₃ : Kadar profil lipid kelompok perlakuan 3

OP₄ : Kadar profil lipid kelompok perlakuan 4

OP₅ : Kadar profil lipid kelompok perlakuan 5

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian meliputi tikus jantan albino strain *Sprague Dawley*.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini meliputi tikus *Sprague Dawley* jantan yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley* jantan yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus *Sprague Dawley* jantan dipilih karena minimal pengaruh hormonal terutama hormon estrogen yang dapat mempengaruhi kadar profil lipid serum. Kriteria inklusi dan eksklusi dijabarkan sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- Tikus normal
- Tikus terlihat sehat dan tidak cacat fisik
- Tikus aktif bergerak
- Usia tikus 8-12 minggu sebelum adaptasi
- Berat badan tikus 150-300 gram

b. Kriteria Eksklusi

- Tikus sakit
- Tikus mengalami diare dengan melihat peningkatan kuantitas dan keenceran feses

- Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

3.4.4 Jumlah Sampel dan Cara Pengambilan Sampel

Jumlah sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu setiap kelompok terdiri atas minimal 5 ekor tikus. Dalam penelitian ini digunakan 6 ekor tikus tiap kelompok hewan coba yaitu 5 ekor tikus sebagai jumlah minimal dan 1 ekor tikus sebagai cadangan, sehingga didapatkan jumlah total 42 ekor tikus dari 7 kelompok hewan coba. Untuk cara pengambilan sampel dilakukan dengan metode randomisasi sederhana (*simple random sampling*).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar pemberian kitosan, ekstrak bawang putih, dan nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dengan 3 macam dosis bertingkat.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar profil lipid serum tikus *Sprague Dawley*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No	Nama Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Ekstrak Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	Larutan ekstrak bawang putih (<i>Allium sativum</i>) yang diberikan kepada kelompok perlakuan tikus jantan albino strain <i>Sprague Dawley</i> melalui sonde oral dengan dosis 400 mg/kgBB/hari	Timbang	mg	Rasio

		selama 4 minggu.			
2	Kitosan	Pemberian kitosan dengan dosis 400 mg/kgBB. Pakan tinggi kolesterol dengan campuran kitosan diberikan satu kali sehari selama 4 minggu.	Timbang	Mg	Rasio
3	Nanoemulsi Kitosan dan Ekstrak Bawang Putih	Sebanyak 2 gr ekstrak bawang putih dan 1 gr kitosan dicampur serta dibentuk dalam sediaan nanoemulsi kemudian ditimbang dan diberikan dengan cara sonde oral dengan dosis pada kelompok perlakuan 3, 4, dan 5 berturut turut adalah 50 mg/kgBB/hari, 75 mg/kgBB/hari, dan 100 mg/kgBB/hari selama 4 minggu.	Timbang	Mg	Rasio
4	Pakan Standar	Pakan yang mengandung air, protein kasar, lemak kasar, serat kasar, abu, kalsium, dan fosfor sebanyak 20 gram per hari dan diberikan secara <i>ad libitum</i> (komposisi pakan pada lampiran 1)	Timbang	Mg	Rasio
5	Pakan Tinggi Kolesterol	Pakan tinggi kolesterol yang diberikan berupa minyak babi 2 ml/200grBB tikus dan kuning telur puyuh 1 ml/200grBB yang diberikan dengan sonde oral.	Timbang	Mg	Rasio
6	LDL	LDL ialah serum (atau Plasma) yang diambil dari vena retroorbitalis tikus dan diukur menggunakan metode CHOD PAP.	Pengukuran kadar dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode fotometrik dan enzimatik CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio

7	Trigliserida	Trigliserida ialah serum (atau Plasma) yang diambil dari vena retroorbitalis tikus dan diukur menggunakan metode GPO-PAP	Pengukuran kadar dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode fotometrik dan enzimatik GPO-PAP.	mg/dl	Rasio
8	HDL	HDL ialah serum (atau Plasma) yang diambil dari vena retroorbitalis tikus dan diukur menggunakan metode CHOD PAP	Pengukuran kadar dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode fotometrik dan enzimatik CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio
9	Kolesterol Total	Kolesterol total ialah serum (atau Plasma) yang diambil dari vena retroorbitalis tikus dan diukur menggunakan metode CHOD PAP	Pengukuran kadar dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode fotometrik dan enzimatik CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat dan Bahan

Alat:

1. Blender
2. Oven
3. Tabung elemeyer
4. Gelas ukur
5. Kertas saring
6. Rotatory Evaporator
7. Homogenizer Ultrasonik (Ultra Turrax T25)
8. Mikropipet

9. Magnetic Stirer
10. Tabung Sentrifuge
11. Alat sentrifuge
12. Tabung EDTA
13. Spuit
14. Spektrofotometer stat fax 3300
15. Kandang tikus
16. Sonde lambung
17. *Syringe*
18. Botol

Bahan:

1. Tikus jantan *Sprague Dawley* sebanyak 42 ekor
2. Pakan Standar
3. Bawang putih
4. Kitosan
5. Etanol 96%
6. Aquades
7. Tween 80
8. Minyak kelapa sawit
9. Propylen glikol
10. Maltodekstrin
11. Minyak babi dan kuning telur
12. Larutan EDTA
13. Kit reagen HDL, Kolesterol, dan trigliserida

3.7.2 Jenis Data

Jenis data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data primer.

3.7.3 Cara Kerja

Aklimatisasi

Adaptasi kepada tikus diberikan dengan perawatan di kandang kelompok dengan ukuran 41 x 29 x 26 cm agar dapat bergerak dengan bebas dan tidak stres, juga diberikan pakan standar dalam 1 minggu.

Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Bahan dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Kemudian dihaluskan dengan blender (dibuat simplisia). Bahan ditimbang sebanyak 500 gram (sampel kering). Selanjutnya dimasukkan 500 gram hasil blender ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter (wadah tertutup). Lalu ditambahkan dengan hasil etanol 96% sampai volume 1000 cc. Campuran kemudian dikocok/diaduk sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan didiamkan sampai mengendap. Bahan yang telah tercampur ditutup dan diinkubasi selama 5 x 24 jam dalam suhu ruangan. Setiap hari dikocok/diaduk selama 30 menit. Setelah itu, lapisan paling atas dari larutan campuran etanol 96% diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan rotary evaporator. Setelah evaporasi selesai, maka ekstrak bawang putih dapat digunakan.

Pembuatan Nanoemulsi Kitosan dan Ekstrak Bawang Putih

Pada fase minyak, dilakukan pencampuran 2 gr ekstrak bawang putih dalam 1000 ml etanol 96%. Pada fase air (larutan buffer fosfat, pH 7) dilakukan pencampuran dengan Tween 80 10% (v/v) dan maltodekstrin

1:1 (b/v) dengan minyak. Kemudian dilakukan pencampuran fase minyak 20% dan 30% (v/v) dalam fase air⁶¹ serta dicampur dengan 1 gr kitosan. Campuran yang terbentuk kemudian dihomogenisasi secara kasar dengan Magnetic stirrer selama 10 menit. Kemudian campuran dihomogenisasi dengan Homogenizer Ultra Turrax dengan kecepatan 24.000 rpm selama 30 menit atau hingga jernih. Nanoemulsi yang terbentuk ditampung dalam botol gelap untuk menghindari kerusakan akibat cahaya. Alur pembuatan dijelaskan dalam Lampiran 3.

Pengelompokan

Setelah masa adaptasi selama 1 minggu, pada hari ke 8 tikus akan dibagi secara acak dalam 7 kelompok sehingga masing – masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Kelompok yang ada yakni kontrol negatif pakan standar (K₁), kontrol negatif tinggi kolesterol (K₂), perlakuan 1 (P₁), perlakuan 2 (P₂), perlakuan 3 (P₃), perlakuan 4 (P₄), dan perlakuan 5 (P₅).

Pemberian Perlakuan

Seluruh tikus dibagi menjadi 7 kelompok masing-masing kelompok tikus berjumlah 6 ekor menggunakan sistem *simple random sampling* dengan perlakuan yang berbeda. Sebelum melakukan intervensi, beberapa kriteria yang harus diperhatikan untuk menghindari adanya bias. Kriteria harus sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Setelah didapatkan 7 kelompok besar, intervensi dilakukan selama 6 minggu dan dibagi menjadi:

- Kelompok K1 hanya mendapat diet pakan standar selama 6 minggu
- Kelompok K2 mendapat diet tinggi kolesterol selama 2 minggu kemudian dilanjutkan diet pakan standar pada 4 minggu berikutnya.

- Kelompok P1 mendapat diet tinggi kolesterol pada 2 minggu pertama dan kemudian dilanjutkan dengan diet pakan standar dan ekstrak bawang putih dengan dosis 400 mg/kgBB dengan sonde oral per hari untuk 4 minggu berikutnya.
- Kelompok P2 mendapat diet tinggi kolesterol pada 2 minggu pertama dan kemudian dilanjutkan dengan diet pakan standar dan kitosan dengan dosis 400 mg/kgBB dengan sonde oral per hari untuk 4 minggu berikutnya.
- Kelompok P3 mendapat diet tinggi kolesterol pada 2 minggu pertama dan dilanjutkan dengan diet pakan standar, nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dengan dosis 50 mg/kgBB/hari pada 4 minggu berikutnya.
- Kelompok P4 mendapat diet tinggi kolesterol pada 2 minggu pertama dan dilanjutkan dengan diet pakan standar, nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dengan dosis 75 mg/kgBB/hari pada 4 minggu berikutnya.
- Kelompok P5 mendapat diet tinggi kolesterol pada 2 minggu pertama dan dilanjutkan dengan diet pakan standar, nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih dengan dosis 100 mg/kgBB/hari pada 4 minggu berikutnya.

Pengambilan Data

Seluruh tikus pada masing-masing kelompok diambil darah pada vena pleksus retroorbitalis untuk diperiksa kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL dalam serum dan dilihat pengaruh kitosan, ekstrak

bawang putih, serta nanoemulsi kitosan dan ekstrak bawang putih terhadap profil lipid tikus.

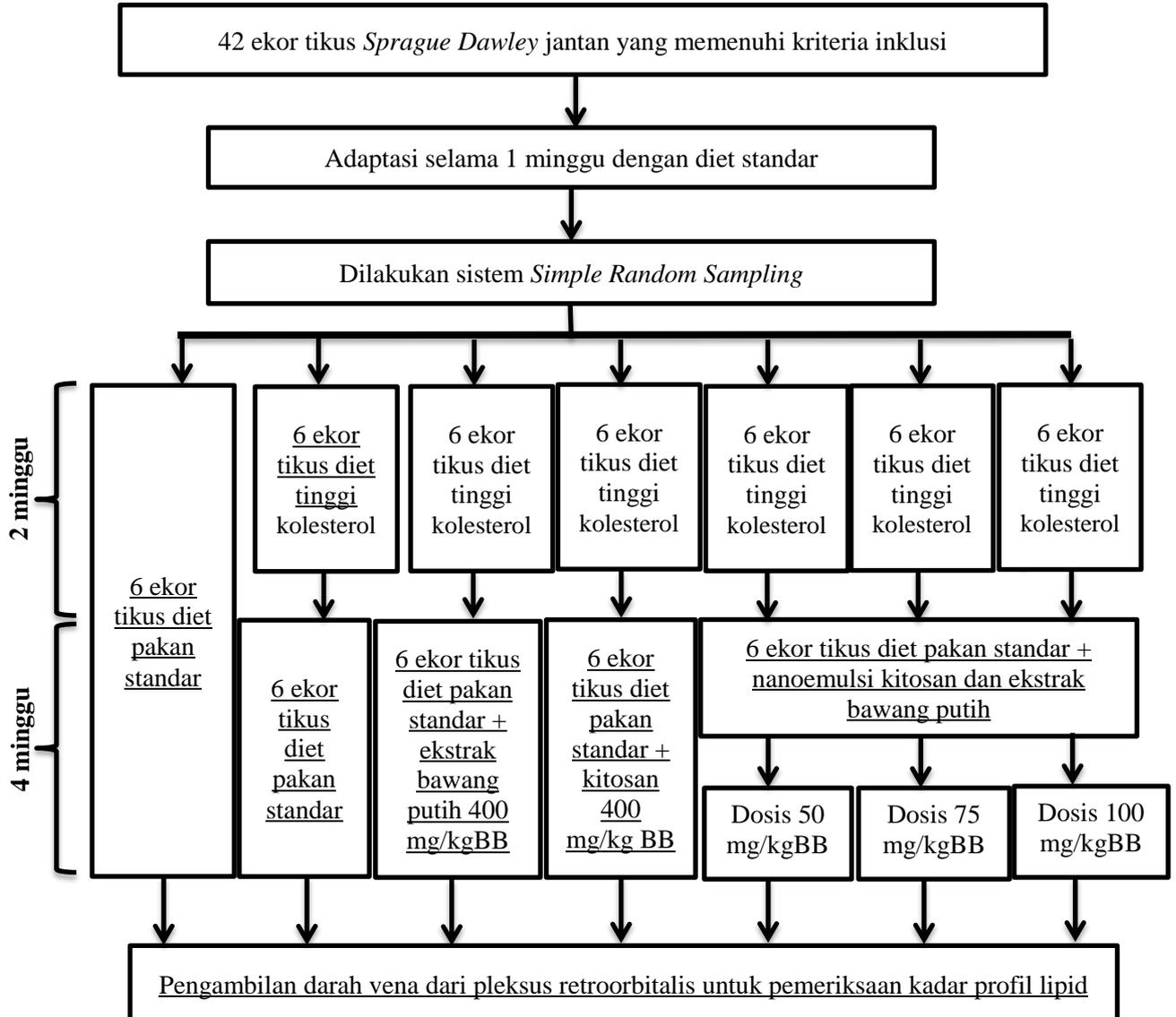
Prosedur pengambilan darah dijelaskan dalam lampiran 2. Darah diambil sebanyak 3cc pada hari pertama minggu ke-4 untuk dinyatakan tikus dalam keadaan hiperkolesterol. Keadaan hiperkolesterolemia pada hewan terjadi jika kadar kolesterol total dalam darah melebihi normal. Tikus memiliki kadar kolesterol total normal dengan nilai 10-54mg/dl.⁹⁶ Hiperkolesterolemia juga menyebabkan kadar HDL dalam darah menurun. Kadar kolesterol HDL plasma darah tikus yang normal yaitu ≥ 35 mg/dL.⁹⁷ Ambang batas normal LDL pada tikus adalah 7-27,2 mg/dl.⁹⁸

Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diambil darah vena pada hari pertama minggu ke-8.

Serum ini akan digunakan untuk pemeriksaan kolesterol total, LDL, dan HDL lewat proses enzimatik dengan metode CHOD-PAP (Kolesterol *oxydase-phenol aminophenazone*). Prinsipnya, kolesterol ditentukan akibat adanya hidrolisis enzimatik oleh kolesterol esterase, dan oksidasi oleh kolesterol oxidase dengan hasil akhir berupa hidrogen peroksida. Selanjutnya akan bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan phenol membentuk quinonemine yang dapat terdeteksi dengan spektrofotometer. Trigliserida diperiksa dengan metode GPO-PAP (*Glycerol 3 Phosphate oxidase-phenol aminophenazone*) yang ditentukan setelah hidrolisis enzim dengan lemak. Indikator quinoneimine dibentuk dari hidrogen peroksida,

4-*aminoantypirine* dan 4-*klorofenol* dibawah pengaruh katalisis peroksidase.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 15. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang didapat diolah dengan program komputer. Data yang didapat memiliki skala pengukuran katagorik nominal untuk variabel bebas dan skala numerik/ non katagorikal/ kuantitatif berupa rasio (*scale* menurut program komputer SPSS karena program ini tidak dapat membedakan rasio dan interval) untuk variabel tergantung. Sebelum dilakukan analisis data, terlebih dahulu data di uji normalitasnya dengan *Shapiro – Wilk* karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Data yang digunakan adalah data kadar profil lipid. Uji beda dilakukan dengan menggunakan uji *One way ANOVA* karena data berdistribusi normal dan dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk mencari 2 kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna..

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance telah mendapatkan izin dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan No.52/EC/H/FK-RSDK/VII/2017 tanggal 4 Agustus 2017. Semua hewan coba diperlakukan dengan baik sesuai dengan ketentuan *Helsinki*. Setelah perlakuan pada hewan coba selesai, tikus diterminasi dengan mendislokasi sendi atlantooccipital dan dikubur oleh ahli dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.