

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Patologi Klinik, Farmakologi dan Biokimia.

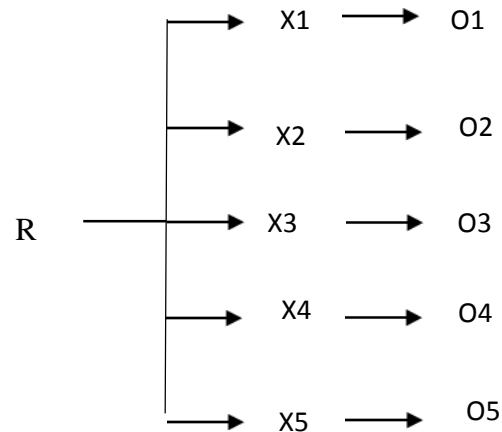
3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang, Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang, Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Proses pengandangan, pemeliharaan, pemberian intervensi serta pengukuran kadar kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL dan trigliserida dilakukan di PAU. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Agustus 2017.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan *randomized post-test only with control group design*, menggunakan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian ekstrak bawang putih (*Allium sativum L*), kitosan dan yogurt sinbiotik pisang tanduk, sedangkan luarnya (*outcome*) adalah kadar kolesterol

total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan trigliserida serum tikus *Sprague-Dawley* jantan hiperkolesterolemia



Gambar 3. Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Alokasi random

X1 : Kelompok kontrol positif, tikus diberi kemudian diet standar selama 42 hari

X2 : Kelompok kontrol positif, tikus diberi diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diet standar selama 28 hari

X3 : Kelompok tikus yang diberi diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diet standar dan ekstrak bawang putih selama 28 hari

X4 : Kelompok tikus yang diberi diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar dan kitosan selama 28 hari.

X5 :Kelompok tikus yang diberi diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar dan yogurt sinbiotik pisang tanduk selama 28 hari.

O1 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida serum tikus kelompok X1.

O2 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida serum tikus kelompok X2.

O3 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida serum tikus kelompok X3.

O4 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida serum tikus kelompok X4.

O5 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida serum tikus kelompok X5.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi hewan coba yaitu tikus jantan galur Sprague-Dawley yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Sprague-Dawley jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, yaitu :

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Jenis kelamin jantan
- 2) Usia tikus 8-12 minggu sebelum adaptasi
- 3) Berat badan tikus 150-300 gram
- 4) Tikus terlihat sehat (bergerak aktif) dan tidak cacat fisik

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Tikus terlihat sakit (tidak aktif bergerak)
- 2) Tikus cacat dan mati selama penelitian
- 3) Tikus tidak mau makan dan minum yang telah disediakan
- 4) Tikus sakit (mengalami diare)

3.4.3 Cara Sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

3.4.4 Besar Sampel

Jumlah sampel minimal menurut kriteria WHO adalah 5 tikus perkelompok. Pada penelitian ini terdapat 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 25 ekor tikus jantan Sprague-Dawley. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out* maka diberikan satu ekor tikus tambahan setiap kelompok.

Jadi, pada penelitian ini digunakan 30 ekor tikus jantan Sprague-Dawley yang terbagi dalam 5 kelompok.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

- 1) Ekstrak bawang putih
- 2) Kitosan
- 3) Yogurt sinbiotik pisang tanduk

3.5.2 Variabel Terikat

- 1) Kadar kolesterol total
- 2) Kadar kolesterol HDL
- 3) Kadar kolesterol LDL
- 4) Kadar trigliserida

3.5.3 Variabel terkontrol

- 1) Galur tikus hewan coba
- 2) Umur hewan coba
- 3) Jenis kelamin hewan coba
- 4) Pakan hewan coba
- 5) Kandang hewan coba

3.6 Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	Pakan standar	Pakan yang mengandung air, lemak kasar, protein kasar, serat, abu, kalsium dan fosfor. Diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran penyajian 20 gram/hari.	Gram	Nominal
2.	Pakan tinggi lemak	Terdiri dari minyak babi 2ml/200 gram BB / dan kuning telur puyuh 1ml/200 gr BB yang kemudian dihomogenisasi dan diberikan melalui sonde lambung.	Gram	Nominal
3.	Ekstrak bawang putih	Ekstrak yang didapat dari bawang putih dengan prosedur ekstraksi maserasi. Ekstrak dalam bentuk kental diberikan dengan cara disonde. Dosis pemberian 400 mg/kg BB.	mg	Rasio
4.	Kitosan	Kitosan cair dibuat dengan melarutkan 55 mg kitosan ke dalam 1,1 l asam asetat hingga tepat jenuh, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volumenya 100 ml. Kitosan cair diberikan dengan cara disonde. Dosis pemberian 400 mg/kgBB.	mg	Rasio
5.	Yogurt sinbiotik pisang tanduk	Pembuatan yogurt sinbiotik pisang tanduk menggunakan susu segar tanpa lemak "Diamond" dan susu skim bubuk "indoprime", dimana berdasarkan tabel informasi gizi, keduanya mengandung 0% lemak. Pembuatan yogurt menggunakan starter inokulum <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dan <i>Streptococcus thermophilus</i> dengan perbandingan 1:1 dan konsentrasi 2%. Dosis pemberian 0,018 ml/gram BB tikus.	ml	Rasio

6.	Kadar kolesterol total	Kandungan kolesterol total serum tikus <i>Sprague-Dawley</i> yang diambil melalui pleksus retroorbitalis tikus. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio
7.	Kadar kolesterol HDL	Kandungan kolesterol HDL serum tikus <i>Sprague-Dawley</i> yang diambil melalui pleksus retroorbitalis tikus. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio
8.	Kadar kolesterol LDL	Kandungan kolesterol LDL serum tikus <i>Sprague-Dawley</i> yang diambil melalui pleksus retroorbitalis tikus. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode CHOD-PAP.	mg/dl	Rasio
9.	Kadar trigliserida	Kandungan trigliserida serum tikus <i>Sprague-Dawley</i> yang diambil melalui pleksus retroorbitalis tikus. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode GPO-PAP.	mg/dl	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Pakan standar dengan kandungan sebagai berikut : air (maksimal 12 %), protein kasar (minimal 15%), lemak kasar (3-7%), serat kasar (maksimal 6%), abu (maksimal 7%), kalsium (0,9-1,1%), fosfor (0,6-0,9%). Pakan standar diberikan secara *ad libitum*.

- 2) Pakan tinggi lemak yang terdiri dari 90% pakan standar ditambah 10% lemak. Lemak yang digunakan minyak babi dan kuning telur dengan perbandingan 1:2.
- 3) Ekstrak bawang putih
- 4) Kitosan
- 5) Yogurt sinbiotik pisang tanduk

3.7.2 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Timbangan
- 3) Spuit
- 4) Sonde lambung
- 5) Timbangan
- 6) Tabung reaksi
- 7) COBAS INTEGRA *analyzer*
- 8) Oven
- 9) *Blender*
- 10) *Rotatory evaporator*
- 11) Gelas ekstraksi

3.7.3 Jenis data

Kadar kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL dan trigliserida serum setelah pemberian ekstrak bawang putih, kitosan dan yogurt sinbiotik pisang tanduk pada tikus Sprague-Dawley hiperkolesterolemia merupakan data primer.

3.7.4 Cara Kerja

1) Pembuatan ekstrak bawang putih

Bawang putih dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan oven suhu 50°C, kemudian haluskan dengan *blender*. Timbang sebanyak 500 gram, lalu tambahkan etanol 96% hingga volume 1L, masukan dalam gelas erlenmeyer ukuran 1L. Aduk sampai tercampur selama ± 30 menit dan diamkan sampai mengendap kemudian tutuplah. Inkubasi selama 5x24 jam dalam suhu ruangan. Setiap hari dikocok/diaduk selama 30 menit. Kemudian ambil lapisan paling atas dari campuran, letakan dalam gelas ekstraksi dan di evaporasi dengan *rotatory evaporator*. Ekstrak siap diberikan dengan menggunakan sonde pada Kelompok Perlakuan 1.

2) Pembuatan Kitosan Cair

Kitosan cair dibuat dengan melarutkan kitosan ke dalam asam asetat 1% hingga tepat jenuh, kemudian diencerkan hingga volumenya mencapai 100 ml menggunakan akuades. Kitosan sebanyak 1 gram memerlukan asam asetat 1% sebanyak 20 ml agar tepat jenuh, bila di konversikan maka untuk melarutkan kitosan sebanyak 55 mg diperlukan asam asetat 1% sebanyak 1,1 ml.

3) Pembuatan Yogurt sinbiotik pisang tanduk

Pembuatan yogurt sinbiotik pisang tanduk menggunakan susu segar tanpa lemak “Diamond” dan susu skim bubuk “indoprima”, dimana berdasarkan tabel informasi gizi, kedua nya mengandung 0% lemak. Pembuatan yogurt menggunakan starter inokulum *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dengan perbandingan 1:1 dan konsentrasi 2%.

Langkah awal pembuatan yogurt adalah mencampurkan susu segar tanpa lemak dan susu skim bubuk dengan tepung pisang tanduk. Campuran larutan tersebut dihomogenisasi, kemudian dipasteurisasi pada suhu 90°C selama 10 menit. Campuran kemudian didinginkan hingga suhu 43°C lalu ditambahkan inokulum *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* yang telah ditumbuhkan di media susu, dengan perbandingan 1:1 dan konsentrasi 2%. Inokulum dan campuran larutan diaduk hingga rata kemudian campuran larutan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 43°C hingga mencapai pH 4,6. Yogurt sinbiotik yang telah jadi disimpan di lemari pendingin pada suhu 4°C.³⁰

4) Intervensi terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangan di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada. Seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, dengan pembeian pakan dan minum standar *ad libitum*

Pada hari ke-8, tikus Sprague-Dawley dibagi secara acak kedalam 5 kelompok, yaitu :

K1 : Tikus Sprague-Dawley yang mendapat diet standar selama 42 hari.

K2 : Tikus Sprague-Dawley mendapat diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar selama 28 hari.

P1 : Tikus Sprague-Dawley mendapat diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar dan ekstrak bawang putih selama 28 hari.

P2 : Tikus Sprague-Dawley mendapat diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar dan kitosan selama 28 hari.

P3 : Tikus Sprague-Dawley mendapat diet tinggi lemak selama 14 hari, kemudian diberi diet standar dan yogurt sinbiotik pisang tanduk selama 28 hari.

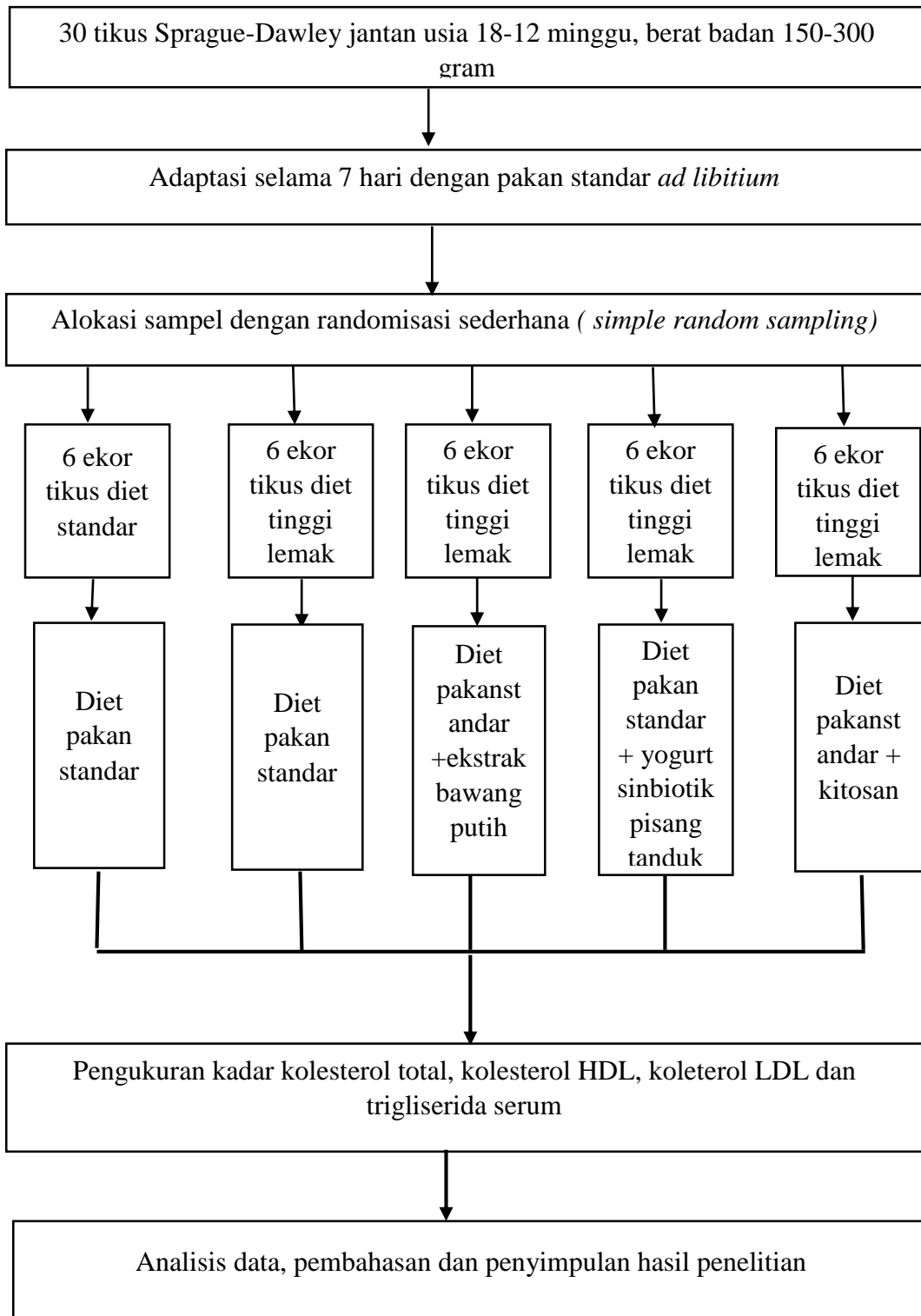
Setelah perlakuan selama 28 hari, diukur kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan trigliserida serum.

5) Pengambilan data

Pemeriksaan profil lipid diawali dengan pengambilan darah dari pleksus retroorbitalis sebanyak ± 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya darah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, dilanjutkan dengan pemusingan selama 30 menit sampai didapat serum kemudian dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total, kolesterol HDL, kolesterol LDL dan trigliserida. Pengukuran ditentukan secara enzimatik menggunakan metode CHOD-PAP dan GPO-PAP.

Setelah perlakuan pada hewan coba selesai, selanjutnya tikus akan di terminasi dengan mendislokasi sendi *atlantooccipital* dan dikubur oleh ahli dari Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data diolah dengan program komputer. Normalitas data diuji dengan uji *Saphiro-wilks*. Kesamaan varians data diuji dengan uji varian (*levens test*). Bila syarat uji parametrik terpenuhi, uji perbedaan pengaruh dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan uji *Post hoc Bonferroni* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ dan interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance didapat dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor No.65/EC/H/FK-RSDK/VIII/2017.

3.11 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan ke-									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Studi literatur	■	■	■							
Penyusunan proposal	■	■	■							
Seminar proposal				■						
Pelaksanaan penelitian				■	■	■	■	■		
Analisis data dan evaluasi								■		
Penyusunan laporan hasil								■	■	
Seminar hasil										■

Gambar 5. Jadwal Penelitian