

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Subjek dan Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini menggunakan hewan percobaan yaitu mencit (*mus musculus*) jantan galur *swiss webster*³⁰ yang didapatkan dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB yang terpapar pakan standar. Subjek penelitian yang dipilih adalah mencit yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

3.1.1.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi :
 - a. Jenis kelamin jantan
 - b. Berusia 2-3 bulan
 - c. Berat badan 20-30 gram
2. Kriteria Eksklusi :
 - a. Sakit atau mati selama masa adaptasi

3.1.1.2 Besaran Sampel

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan alokasi random. Maka, jumlah mencit yang diberikan perlakuan menggunakan rumus *Frederer*

$$(r-1) \times (t-1) > 15$$

Keterangan:

r (*replication*) : jumlah pengulangan

t (*treatment*) : jumlah pengelompokan (perlakuan)

Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit jantan, sehingga total mencit yang harus disiapkan sebanyak $r \times t = 4 \times 8 = 32$ ekor mencit. Jumlah ini kemudian ditambah 10% setiap kelompoknya untuk mengantisipasi mencit yang mengalami *dropout* serta masuk dalam kriteria eksklusi. Sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 40 ekor mencit.

3.1.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.3.1 Alat Penelitian

1. Kandang berkapasitas 5 ekor
2. Alat timbang
3. Tempat makan
4. Botol minum
5. Alat-alat pembuatan ekstrak biji jintan hitam
6. Alat-alat pembuatan ekstrak teh hijau
7. Spektrofotometri

3.1.3.2 Bahan Penelitian

1. Ekstrak daun teh hijau
2. Ekstrak biji jintan hitam
3. Pakan Tinggi Lemak (PTL/DTL)
4. Aquades
5. Serbuk kayu
6. PTU
7. Botol penyimpanan
8. Jarum spuit
9. *Alcohol swab*

10. Handgloves

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni secara *in vivo* karena memberikan intervensi kepada hewan coba. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan eksperimental ulang (*pretest – posttest control group design*), yaitu melakukan observasi sebelum dan sesudah perlakuan

3.2.2 Variabel Penelitian

3.2.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dua macam ekstrak yang diberikan untuk perlakuan. Masing-masing ekstrak akan dibedakan menjadi tiga konsentrasi disesuaikan dengan penelitian terdahulu Wijaya dan Dian Sundari^{30,31} dan uji toksisitasnya.. Ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) akan diberikan dalam konsentrasi 0,168g/kgBB/hari, 0,336g/kgBB/hari, dan konsentrasi 0,672 g/kgBB/hari.³² Di sisi lain, ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) akan diberikan dalam konsentrasi 0,9 mg/kgBB/hari, 1,8 mg/kgBB/hari, dan konsentrasi 2,7 mg/kgBB/hari.

3.2.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kolesterol total sesudah perlakuan yang diukur menggunakan dengan menggunakan alat spektrofotometri, alat dikalibrasi terlebih dahulu dengan nomor kode yang disesuaikan lalu darah mencit yang telah dimasukkan kedalam tabung reaksi didiamkan beberapa menit

setelah itu dilakukan sentrifugasi beberapa menit dan setelahnya dilakukan pengukuran kadar kolesterol total dengan alat spektrofotometri tersebut dengan memasukkan selang kecil sensor dari alat tersebut.³³

3.2.2.2 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Biji Jintan Hitam	Ekstrak air biji jintan hitam yang diberikan pada mencit dengan tiga variasi konsentrasi	Alat Timbang	1/2n : 0,168 g/KgBB/hari; n : 0,336 g/KgBB/hari; 2n: 0,672 g/KgBB/hari	Numerik Diskrit
Ekstrak Daun Teh Hijau	Ekstrak air biji daun teh hijau yang diberikan pada mencit dengan tiga variasi konsentrasi	Alat Timbang	1/2n: 0,9 mg/KgBB/hari; n: 1,8 mg/KgBB/hari; 2n: 2,7 mg/KgBB/hari	Numerik Diskrit
Kadar Kolesterol Total	Kolesterol total	Spektrofotometri	mg/dL	Numerik Kontinyu

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Pembuatan Ekstrak Biji Jintan Hitam

Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Jatingangor. Prosedur pembuatan ekstrak disesuaikan dengan penelitian Bensiamer-Touati yang sedikit dimodifikasi.³² Biji jintan hitam didapatkan dari Solo melalui toko obat PD Berkas Baru. Pengambilan dari wilayah ini didasari pada penelitian sebelumnya bahwa pertumbuhan biji jintan

hitam asli Indonesia terdapat di Yogyakarta dan sekitarnya. Determinasi dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor. Prosedur pembuatan ekstrak air biji jintan hitam sebagai berikut,

1. Tumbuk biji jintan hitam sampai berbentuk bubuk
2. Timbang bubuk biji jintan hitam sebanyak 7kg
3. Campurkan dengan 500 ml air untuk setiap 150 gram biji jintan hitam (3:1) dan biarkan selama 12 jam dalam pengaduk dengan suhu 95°C
4. Evaporasi dilakukan untuk menguapkan pelarut sampai didapatkan pasta kental
5. Pindahkan pada tempat penyimpanan dan dibiarkan dalam suhu 4 °C sebelum digunakan

Hasil ekstraksi didapatkan 500gr ekstrak biji jintan hitam. Rendemen ekstrak sebesar 7%.

3.2.3.2 Penetapan Konsentrasi Ekstrak Biji Jintan Hitam

Dosis yang digunakan disamakan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wijaya. Pada penelitian sebelumnya dilakukan pemberian ekstrak jintan hitam dengan dosis yang diberikan pada mencit secara peroral sebanyak 0,168 g/hari. Dosis tersebut telah terbukti menurunkan kadar kolesterol total. Pada penelitian ini akan diberikan dosis terendah 0,168 g/KgBB/hari disamakan berdasarkan penelitian sebelumnya, 0,336 g/KgBB/hari sebagai dosis kedua dan 0,672 g/KgBB/hari sebagai dosis ketiga. Pemberian ekstrak air jintan hitam diberikan selama 21 hari.³²

3.2.3.3 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Jatingangor. Prosedur pembuatan ekstrak disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan Olayink³⁰ yang dikonverikan sesuai kebutuhan peneliti. Proses ini akan mendapatkan ekstraksi sebesar 8,3%. Sebelum dilakukan pembuatan ekstrak, daun teh hijau dilakukan determinasi tanaman yang dilakukan di Sekolah Ilmu Teknik Hayati Institut Teknologi Bandung dengan nomor surat 2380/11.CO2.2/PL/2019 menerangkan bahwa sampel secara makroskopis sesuai dengan karakteristi *Camellia Sinensis L* (Kuntze). Daun teh hijau didapatkan dari Toko Obat Manoko, Lembang, Bandung.

1. *Camellia sinensis* ditimbang (7,5kg) dan direndam dalam air sulingan.
2. Ekstrak dilakukan dengan cara maserasi pada suhu 28 °C selama 72 jam.
3. Supernatan terkonsentrasi di bawah suhu 40 °C menggunakan rotary evaporator sampai bentuk pasta
4. Ekstrak disimpan pada suhu 4 °C dalam bentuk pasta basah sampai sebelum digunakan.

Ekstrak didapatkan sebanyak 1,2kg, sehingga total rendemen sebesar 12%

3.2.3.4 Penetapan Konsentrasi Ekstrak Daun Teh Hijau

Penelitian sebelumnya terdapat uji toksisitas pada ekstrak daun teh hijau yang menyebabkan kematian pada mencit dijadikan sebagai dosis tertinggi, dan diturunkan dosis selanjutnya untuk menghasilkan rumus dosis paling rendah yakni sepertiga nya, dan dosis ditengahnya sehingga didapatkan dosis yang akan diujikan yaitu 2,7 mg/KgBB, 1,8 mg/KgBB, dan 0,9/KgBB.³¹

3.2.3.5 Penetapan Kadar simvastatin untuk Hewan Coba

Dosis simvastatin yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari konversi dosis manusia ke mencit dengan menggunakan tabel konversi Paget dan Bernes 1964 yaitu sebesar 0,026 mg/hari. Dosis simvastatin pada manusia adalah 10 mg. Angka ini kemudian dikonversikan ke dalam dosis untuk mencit seberat 20 gram sehingga didapatkan rumus $0,0026 \times 10 \text{ mg} = 0,026 \text{ mg/ hari.}^2$

3.2.3.6 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini diawali dengan pemberian adaptasi pada hewan coba selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar dan aquades. Selama proses itu, berat badan mencit dipantau setiap hari agar tidak ada *dropout*. Setelah tiga hari, mencit diberikan pakan tinggi lemak yang berisi kuning telur puyuh sebanyak 30mg yang dicampurkan untuk meningkatkan kadar lemak dalam mencit juga dengan PTU (propiltiourasil) 0,1% selama 14 hari sebanyak setengah milliliter per mencit untuk membuat terhambatnya pembentukan reseptor LDL sehingga LDL di plasma akan terus tinggi.² Selanjutnya, dilakukan pengecekan seluruh mencit untuk diketahui kolesterol total mencit setelah diberikan pakan tinggi lemak (mencit dipuaskan 10-12 jam) masing-masing kelompok diberikan:

1. Kelompok kontrol negatif, diberikan PTL dan PTU (**K1**)
2. Kelompok kontrol positif, diberikan pakan PTL, PTU, dan simvastatin sebanyak 0,026mg/20grBB/hari (**K2**)
3. Kelompok perlakuan I, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 0,168g/KgBB/hari (**K3**)
4. Kelompok perlakuan II, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 0,336g/KgBB/hari (**K4**)

5. Kelompok perlakuan III, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 0,672g/KgBB/hari (**K5**)
6. Kelompok perlakuan I, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air teh hijau dengan konsentrasi 0.9mg/20grBB/hari (**K6**)
7. Kelompok perlakuan II, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air teh hijau dengan konsentrasi 1.8mg/20grBB/hari (**K7**)
8. Kelompok perlakuan III, diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air teh hijau dengan konsentrasi 2.7mg/20grBB/hari (**K8**)

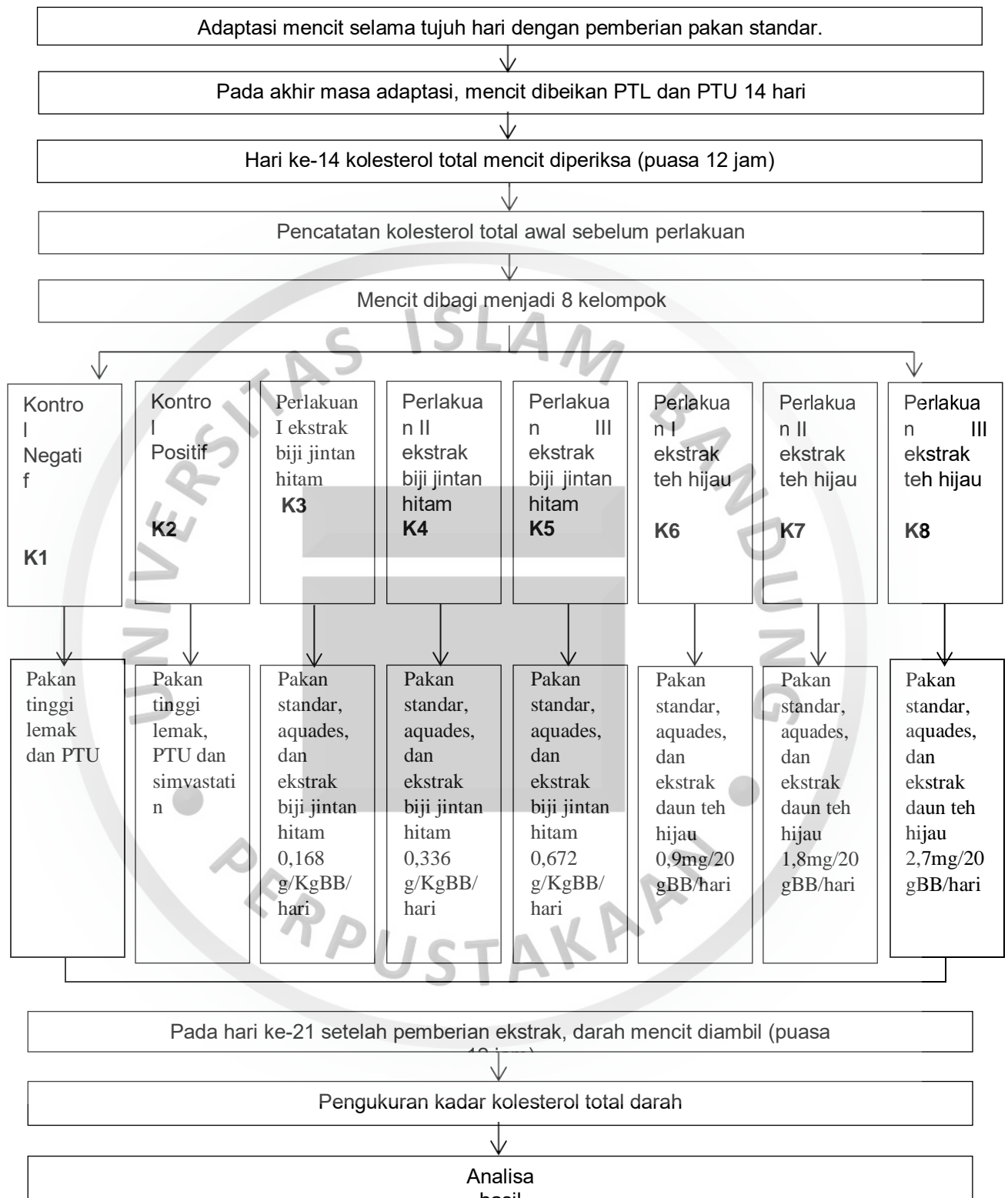
3.2.3.7 Pengambilan Darah Mencit

Pengambilan darah dilakukan oleh peneliti dan petugas dalam bidang penelitian hewan. Pengambilan dilakukan dengan mengambil sampel darah dari vena lateral ekor mencit dengan (*tail-tip amputation*). Darah kemudian dimasukkan ke strip kolesterol sesuai kebutuhan dan diukur. Data kadar kolesterol total dicatat berdasarkan kelompok mencit dan berdasarkan waktu pengambilan.³³

3.2.3.8 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometri. Alat dikalibrasi terlebih dahulu dengan nomor kode yang disesuaikan lalu darah mencit yang telah dimasukkan kedalam tabung reaksi didiamkan beberapa menit setelah itu dilakukan *sentrifuge* beberapa menit dan setelahnya dilakukan pengukuran kadar kolesterol total dengan alat spektrofotometri tersebut dengan memasukkan selang kecil sensor dari alat tersebut.

3.2.3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.2.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan harus sesuai dengan tujuan penelitian. Data diperoleh dengan proses pengolahan menggunakan *SPSS for Windows*. Uji homogenitas *Saphiro-Wilk* digunakan untuk melihat normalitas distribusi data. Pengujian ini digunakan untuk melihat distribusi data normal atau tidak. Apabila didapatkan nilai $p > 0,05$, maka data tersebut berdistribusi normal, digunakan uji parametrik yaitu uji T-dependen pada setiap kelompok perlakuan untuk melihat perubahan kadar kolesterol total sebelum dan sesudah perlakuan. Apabila data berdistribusi tidak normal, maka digunakan uji *Wilcoxon* untuk mengukur hal yang sama. Selanjutnya, pengukuran dilakukan pada selisih perubahan kadar gula darah sebelum dan sesudah dibandingkan pada seluruh kelompok perlakuan menggunakan uji *One-way ANOVA*, apabila berdistribusi normal. Jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji *Kruskall Wallis*. Bila terdapat perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan Uji Post Hoc Test (LSD) untuk distribusi normal atau Uji *Mann-whitney* untuk distribusi tidak normal. Pengujian post-hoc untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.5.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilangsungkan di Lab Sentral Universitas Padjajaran, Jatinangor untuk pembuatan ekstrak daun teh hijau dan ekstrak biji jintan hitam dan Lab Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung untuk perlakuan hewan coba .

3.2.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2019 – Januari 2020.

3.2.6 Aspek Etika Penelitian

Penelitian ini dapat menimbulkan dampak negatif pada subjek penelitian, yakni mencit sebagai hewan coba. Hal ini dikarenakan selama proses penelitian, akan dilakukan hal-hal yang menimbulkan ketidaknyamanan. Oleh sebab itu, prinsip etik pemanfaatan hewan harus terpenuhi agar mengurangi ketidaknyamanan yang akan diderita subjek (mencit). Prinsip tersebut terdiri dari 5F yaitu *freedom from pain* (bebas dari rasa nyeri) *freedom from distress and feeling discomfort* (bebas dari stres dan rasa tidak nyaman) *freedom from injury and diseases* (bebas dari luka dan penyakit) *freedom to express their normal behavior* (bebas berperilaku normal untuk hewan) prinsip selanjutnya adalah 3R yaitu *reduction* (pengurangan), *replacement* (penggantian), dan *refinement* (penghalusan) sesuai dengan pedoman nasional etik penelitian kesehatan.

3.2.6.1 Reduction

Jumlah hewan coba yang digunakan harus dihitung sedemikian rupa sehingga hanya menggunakan hewan coba dalam jumlah sedikit. Pada penelitian ini digunakan rumus frederer untuk menghitung jumlah hewan coba yang digunakan dalam setiap perlakuan hanya sebanyak 4 hewan coba. Sehingga, dengan terdapat 8 kelompok perlakuan akan digunakan 32 hewan coba dan ditambah 8 hewan sebagai 10% dari total keseluruhan hewan yang digunakan akan digunakan untukantisipasi hewan yang *dropout* ditengah-tengah penelitian.

3.2.6.2 Replacement

Penggunaan hewan coba diganti dengan teknik *in vitro* (biakan sel atau jaringan) atau simulasi komputer. Namun apabila tidak dapat dilakukan penggantian tanpa hewan coba dikarenakan hasil yang akan berbeda, maka hewan coba yang digunakan harus hewan dengan derajat paling rendah. Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit. Mencit merupakan hewan pengerat dengan derajat lebih rendah dibandingkan tikus juga hewan coba lainnya (kera, anjing, babi, dll)

3.2.6.3 Refinement

Perlakuan pada hewan coba harus sedemikian rupa agar memenuhi azas kesejahteraan hewan (*animal welfare*) yakni,

- a) Bebas dari lapar dan haus

Mencit akan rutin diberikan makan berupa pakan standar dan minuman aquades *ad libitum* pada tempat yang telah disediakan di dalam kandang. Selain itu makanan akan disebar di lantai kandang agar mirip dengan kondisi alamiah mencit mencari makanan.

- b) Bebas dari nyeri

Rasa nyeri akan diminimalisir selama perlakuan terhadap subjek. Nyeri ini diminimalisir di berbagai tahapan proses penelitian. Tahap pertama adalah pada pemberian injeksi alloxan secara intraperitoneal. Selain itu minimalisir rasa nyeri juga dilakukan ketika pemberian ekstrak dengan cara *handling* yang sesuai dan diberikan dengan sonde oral. Tahapan terakhir dalam minimalisir rasa nyeri

adalah saat pengambilan darah mencit untuk pemeriksaan glukosa, rute vena lateral ekor mencit dipilih.

c) Bebas dari stres dan rasa tidak aman

Stress yang dialami mencit akan dikurangi dengan cara memberikan ruang yang cukup dalam kandang, yakni hanya terdiri 5 ekor mencit per kandang. Selain itu dilakukan pula aklimatisasi selama 7 hari untuk membiasakan mencit di lingkungan baru. Terakhir, stress dikurangi dengan pemberian dosis alloksan yang sudah dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan dosis yang tepat dengan prinsip dosis terkecil namun tetap efektif.

d) Bebas dari luka dan penyakit

Subjek penelitian memiliki kemungkinan mengalami luka dalam penelitian. Sehingga untuk meminimalisir luka tersebut, *handling* mencit dilakukan oleh tenaga ahli. Selain itu untuk membebaskan subjek dari penyakit dengan cara melakukan prosedur septik-aseptik dan menggunakan alat dan bahan yang tidak terkontaminasi antara satu mencit ke mencit lainnya. Hal yang dilakukan adalah 1)membersihkan area injeksi alloksa dengan *alcohol swab*, 2)mengganti jarum suntik yang digunakan untuk injeksi alloksan setiap kali sudah digunakan, 3)membersihkan *gavage oral* setiap kali sudah digunakan oleh satu mencit, 4)membersihkan area ekor mencit untuk pengambilan darah, 5)peneliti menggunakan masker dan *handgloves* sebagai alat pelindung diri dan mencegah adanya penularan, 6)kandang dibersihkan setiap tiga hari sekali, 7)botol minuman diberikan setiap tiga hari sekali, 8)serbuk kayu diganti setiap tiga hari sekali

e) Bebas berperilaku normal untuk hewan

Perilaku normal hewan dijaga dengan cara memberikan ruang yang cukup dalam kandang. Kandang hanya berisi 5 mencit dengan ukuran minimal kandang terpenuhi. Selain itu, mencit dikondisikan untuk diberikan cahaya dalam siklus 12 jam agar menyesuaikan siklus harian. Makanan mencit selain disimpan di tempat makan juga ditaburkan di lantai kandang untuk membiarkan mencit berperilaku normal dalam mencari makanan. Terakhir, didalam kandang disediakan pula tempat bersembunyi untuk membiarkan mencit melakukan naluri berdiam diri dan bersembunyi.

