

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*mus musculus*) jantan, yang didapatkan dari Biofarma. Subjek penelitian yang dipilih adalah mencit yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah:
 - a. Mencit dalam keadaan sehat
 - b. Mencit jenis kelamin jantan
 - c. Usia antara 2-3 bulan
 - d. Berat badan antara 20-30g
2. Kriteria eklusi dalam penelitian ini adalah:
 - a. Sakit atau *drop out* selama masa adaptasi
 - b. Sakit atau *drop out* selama masa perlakuan
 - c. Berat badan turun > 10%

3.2 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok. Jumlah mencit yang diberikan perlakuan dihitung berdasarkan rumus *Frederer*, yaitu:

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

Keterangan n = besar sampel setiap kelompok

 t = banyak kelompok

Berdasarkan rumus *Frederer* didapatkan jumlah pengulangan dalam setiap kelompok perlakuan sebagai berikut:

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

$$(n-1) \times (5-1) > 15$$

$$(n-1) \times (4) > 15$$

$$(n-1) > 3.75$$

$$n > 4.75$$

Hasil perhitungan diatas menunjukkan bahwa setiap kelompok terdapat 4,75 ekor mencit dibulatkan menjadi 5 mencit dalam satu kelompok. Total mencit yang harus disiapkan sebanyak $r \times t = 5 \times 5 = 25$ 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 30 ekor mencit

3.2.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1.1 Alat Penelitian

- a. Kandang berkapasitas 5 ekor
- b. Alat timbang
- c. Tempat makan
- d. Botol minum
- e. Alat-alat pembuatan ekstrak biji jintan hitam
- f. Sentrifugasi
- g. Spuit 1ml
- h. Gavage oral
- i. Serbuk kayu

- j. Botol penyimpanan
- k. Jarum spuit
- l. *Alcohol swab*
- m. *Handgloves*

3.2.1.2 Bahan Penelitian

- a. Biji jintan hitam
- b. Aquades
- c. Pakan tinggi lemak yang berisi kuning telur dan pakan standar
- d. Propiltiourasil 0,1%
- e. Na-CMC 1%

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

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

3.3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.3.2.1 Variabel

Variabel yang terdapat pada penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yakni variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

A. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak air jintan hitam.

B. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kolesterol total.

C. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah mencit (jenis kelamin, umur dan bobot tubuh), kandang mencit (temperatur, ventilasi, dan pencahayaan), serta asupan mencit (pakan tinggi lemak dan propiltiourasil)

3.3.2.2 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Air Biji Jintan Hitam	Ekstrak air biji jintan hitam yang diberikan pada mencit dengan tiga variasi konsentrasi	Alat Timbang	8.4g/KgBB; 16.8g/KgBB; 33.6g/KgBB	Ordinal
Kadar Kolesterol Total	Kolesterol total yang diperiksa dari darah mencit jantan yang diberi pakan tinggi lemak dengan menggunakan spektrofotometer	Spektrofotometer	mg/dL	Numerik

3.3.3 Prosedur Penelitian

3.3.3.1 Pembuatan Ekstrak Air Jintan Hitam

Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Jatinangor. Prosedur pembuatan ekstrak disesuaikan dengan penelitian Bensiamer-Touati yang sedikit dimodifikasi¹⁷. Biji jintan hitam didapatkan dari Yogyakarta, merupakan biji yang di tanam di Indonesia. Langkah-langkah pembuatan ekstrak air jintan hitam terdiri dari:

1. Tumbuk biji jintan hitam sampai berbentuk bubuk

2. Timbang bubuk jintan hitam sebanyak 3kg
3. Campurkan dengan 500 ml air untuk setiap 150 gram 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 dengan suhu 4 °C sebelum digunakan

3.3.3.2 Penetapan Konsentrasi

3.2.3.2.1 Penetapan Konsentrasi Ekstrak Air Jintan Hitam

Dosis yang digunakan sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wijaya.¹² Pada penelitian sebelumnya dilakukan pemberian ekstrak etanol jintan hitam dengan dosis yang diberikan pada mencit secara peroral sebanyak 8,4g/KgBB. Dosis tersebut telah terbukti menurunkan kadar kolesterol total. Pada penelitian ini akan diberikan dosis terendah 8,4g/KgBB disamakan berdasarkan penelitian sebelumnya, 16,8g/KgBB sebagai dosis kedua dan 33,6g/KgBB sebagai dosis ketiga. Pemberian ekstrak air jintan hitam diberikan selama 14 hari.¹⁸

3.2.3.2.2 Penetapan Kadar Simvastatin untuk Hewan Coba

Obat standar yang digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini adalah simvastatin. Tablet simvastatin yang digunakan dengan dosis manusia sebanyak 20 mg. Bila dikonversikan menggunakan tabel paget untuk pemakaian pada mencit yaitu 0,026g/kg BB (faktor konversi 0,0026). Dosis simvastatin yang diberikan pada mencit disamakan dengan penelitian Fauzia, Uthia, Musdar

sebanyak 0,026mg/kgBB.¹⁹

3.3.3.3 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini diawali dengan melakukan adaptasi terhadap 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 tujuh hari, dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3. Setelah pemeriksaan kadar kolesterol dilanjutkan dengan pemberian pakan tinggi lemak (PTL) dan propiltiourasil PTU (propiltiourasil) 0,1% selama 14 hari untuk meningkatkan kadar kolesterol darah.¹⁹ Setelah selesai fase induksi pada hari ke-14, dilakukan pengecekan kembali kadar kolesterol total.¹⁹ Selanjutnya masuk dalam fase perlakuan dengan pemberian ekstrak air jintan hitam dengan dosis yang berbeda pada masing-masing kelompok selama 10 hari. Diakhir fase perlakuan dilakukan kembali pengecekan kolesterol total mencit.

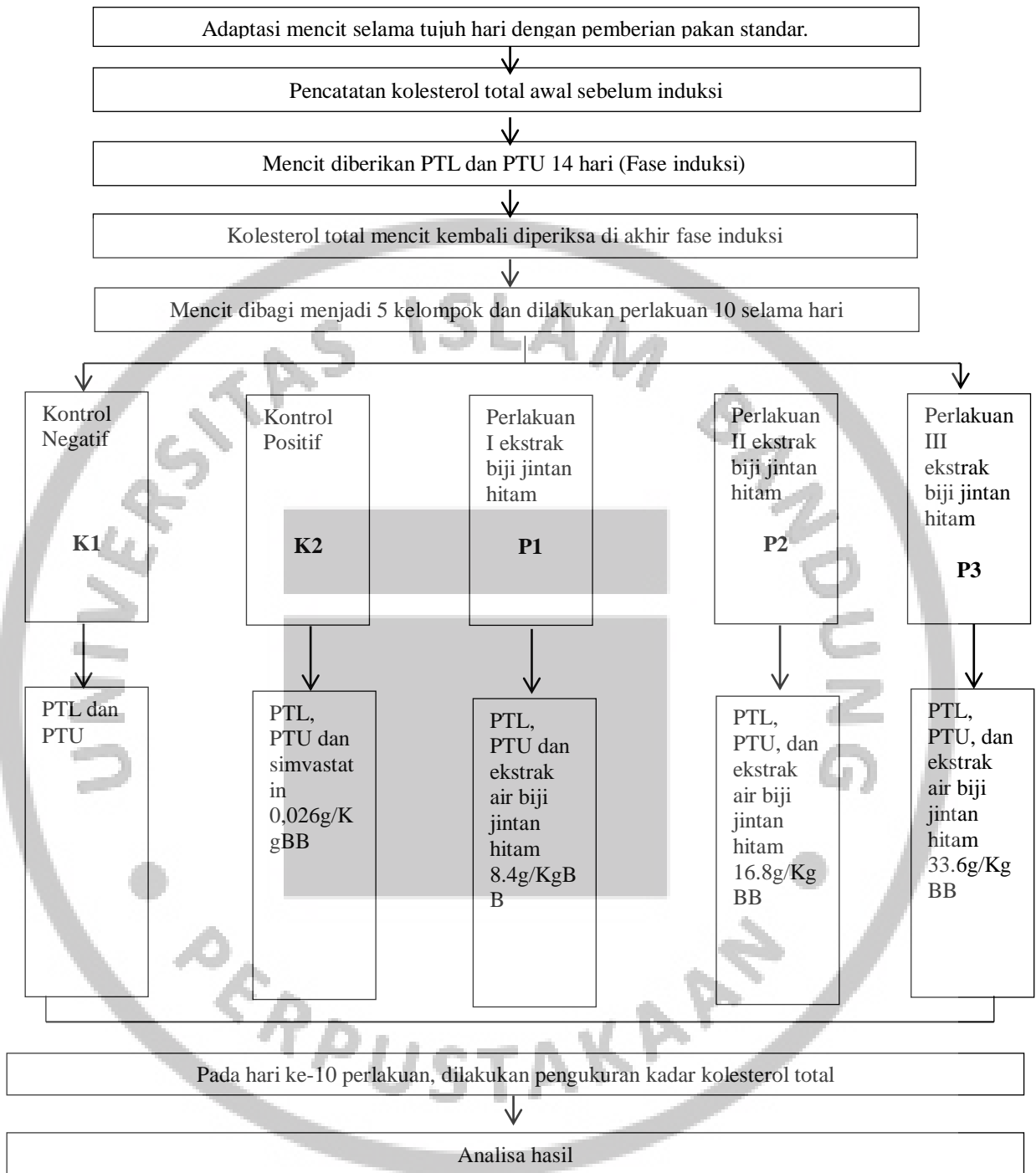
Subjek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari,

- a. Kelompok kontrol negatif (**K1**), diberikan PTL dan PTU
- b. Kelompok kontrol positif (**K2**), diberikan pakan PTL, PTU, dan simvastatin sebanyak 0,026g/KgBB
- c. Kelompok perlakuan I (**P1**), diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 8,4g/KgBB
- d. Kelompok perlakuan II (**P2**), diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 16,8g/KgBB
- e. Kelompok perlakuan III (**P3**), diberikan PTL, PTU, dan ekstrak air biji jintan hitam dengan konsentrasi 33,6g/KgBB

3.3.3.4 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah

Pengukuran dilakukan dengan mengambil sampel darah mencit melalui ekor yang telah didesinfektan dengan etanol 70%. Ujung ekor digunting lalu tetesan darah pertama dibuang dan tetesan berikutnya dimasukkan kedalam tabung *microcentrifuge* sebanyak 1 sampai 2 tetes atau kurang dari 0,3 ml. Tabung berisi darah lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm untuk mendapatkan serumnya. Serum kemudian dimasukkan kedalam spektrofotometer UV Vis. Prinsip dari pengukuran kadar kolesterol total ini yaitu dengan mengukur panjang gelombang cahaya yang didapat. Proses yang dilakukan dengan cara sampel darah yang telah diambil akan dilarutkan menggunakan reagen kit kolesterol sebanyak 10 mikroliter. Larutan kemudian akan diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 37°C untuk dihitung absorbansinya menggunakan spektrofotometer dan catat hasil yang tertera pada layar.

3.3.3.5 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.3.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan menggunakan *SPSS for Windows*. Uji homogenitas *Saphiro-Wilk* digunakan untuk melihat normalitas distribusi data. Pengujian ini digunakan untuk melihat distribusi data normal atau tidak. Penelitian ini didapatkan nilai $p > 0,05$ maka data tersebut berdistribusi normal, selanjutnya digunakan uji parametrik yaitu uji t dependen pada setiap kelompok perlakuan untuk melihat perubahan kadar kolesterol total sebelum dan sesudah perlakuan. Dikarenakan data berdistribusi normal pengukuran dilakukan pada selisih perubahan kadar kolesterol total sebelum dan sesudah dibandingkan pada seluruh kelompok perlakuan dengan menggunakan uji *One-way ANOVA*. Untuk dapat membedakan adanya perbedaan bermakna $p > 0,05$ atau perbedaan tidak bermakna $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Test* (LSD). Pengujian *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

3.3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Lab Sentral Universitas Padjajaran, Jatinangor untuk pembuatan ekstrak air jintan hitam dan Lab Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung untuk perlakuan hewan coba.

3.3.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Desember 2019.

3.3.6 Aspek Etik 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 3R yaitu *reduction* (pengurangan), *replacement* (penggantian), dan *refinement* (penghalusan) dan 5F (*freedom*) sesuai dengan pedoman nasional etik penelitian kesehatan.

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 dan didapatkan sebanyak 5 hewan coba perkelompok. Sehingga, dengan terdapat 5 kelompok perlakuan, hewan coba yang akan digunakan sebanyak 25. Kemudian ditambah 5 hewan sebagai 10% dari total keseluruhan hewan yang digunakan akan digunakan untuk antisipasi hewan yang *dropout* ditengah-tengah penelitian.

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. 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 pada masa aklimatisasi. Setelah itu mencit akan diberikan pakan tinggi lemak dan propiltiourasil sampai selesai masa perlakuan. 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 pakan tinggi lemak dan propiltiourasil secara peroral. Selain itu minimalisir rasa nyeri juga dilakukan ketika pemberian ekstrak dengan cara *handling* yang sesuai dan diberikan dengan sonde oral. Tahapan terkahir dalam minimalisir rasa nyeri adalah saat pengambilan darah mencit untuk pemeriksaan kolesterol, 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 pakan tinggi

lemak dan propiltiourasil 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.

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.