

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Eksperimental Laboratorium dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*, dimana menggunakan 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (Notoatmodjo, 2005).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) berjenis kelamin jantan. Tikus putih jantan dipilih karena dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus betina. Tikus putih jantan juga mempunyai kondisi biologis yang lebih stabil dibanding tikus betina (Manurung dkk, 2010).

4.2.2 Besar Sampel

Besarnya sampel ditentukan menggunakan rumus Federer sebagai berikut yang menunjukkan replikasi yang dibutuhkan dalam penelitian:

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

t = banyaknya perlakuan

(Kemas, 2004)

Besar minimal sampel untuk setiap perlakuan adalah 5 ekor tikus, yang menandakan jumlah replikasi/perulangan minimal yang digunakan dalam penelitian, yaitu 5 kali. Namun pada penelitian ini, ditambahkan 1 ekor tikus untuk setiap perlakuan sebagai sampel cadangan sehingga besarnya sampel keseluruhan adalah 30 ekor tikus.

4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan metode *Simple Random Sampling*. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok sampel yaitu kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (P_0) yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif (P_1) yang diberi diet aterogenik, kelompok perlakuan dosis 1 (P_2) yang diberi diet aterogenik lalu diberi tepung

sorgum 7 gram, kelompok perlakuan dosis 2 (P_3) yang diberi diet aterogenik lalu diberi tepung sorgum 14 gram, kelompok dosis 3 (P_4) yang diberi diet aterogenik lalu diberi tepung sorgum 28 gram. Teknik pengambilan sampel dengan metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan tabel angka acak (Eriyanto, 2007).

4.2.4 Kriteria Sampel :

1. Tikus jenis *Rattus norvegicus* strain wistar
2. Jenis kelamin jantan
3. Warna bulu putih bersih
4. Usia 2 – 3 bulan
5. Berat badan 100 – 250 gram
6. Mata jernih
7. Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

4.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini yang merupakan variabel terkait (*dependent*) adalah kadar Triglicerida pada tikus, sedangkan variabel tidak terkait (*independent*) adalah dosis tepung sorgum.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di 3 tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan.

2. Laboratorium Kawi 31 Malang sebagai tempat pengukuran kadar trigliserida darah tikus, dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2013.
3. Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang sebagai tempat proses penepungan biji sorgum.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

Bahan yang dipergunakan adalah pakan standar, diet aterogenik, tepung sorgum dan air secukupnya. Sedangkan alat yang digunakan adalah kandang, tutupkandang dari anyaman kawat, botol airdan rak untuk menaruh kandang tikus.

1. Diet Normal

Diet normal berupa comfeed PARS dan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1. Adapun kandungan zat gizi dalam 100 gram bahan dari komposisi diet normal tikus adalah :

Tabel 4.1 Komposisi Gizi Diet Normal Tikus per 100 Gram Pakan

Zat gizi	Comfeed PARS	Tepung terigu
Energi (kkal)	344	364
Protein (gram)	19	10.3
Lemak (gram)	4	1
Karbohidrat (gram)	58	76.3

Sumber : Adi,Prasetyo dkk., 2008

Dengan komposisi diatas, maka dapat dibuat pakan tikus sebanyak 40 gram setiap hari per tikus dengan komposisi comfeed PARS 21,2 gram (53%) dan tepung terigu 9,4 gram serta air 9,4 ml (23,5%) sehingga menghasilkan energy sebanyak 107 kkal.

2. Diet Aterogenik

Diet aterogenik merupakan diet berkomporsi zat gizi tinggi lemak dan tinggi kolesterol. Diet aterogenik diberikan 40 gram setiap hari per tikus dengan komposisi pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Komposisi Diet Aterogenik

No	Bahan	Presentase (%)	Berat (gram)
1	PARS	50	20
2	Tepung terigu	25	10
3	Kuning telur bebek	5	2
4	Asam kolat	0,1	0,05
5	Minyak Babi	8,9	3,55
6	Minyak kelapa	1	0,4
7	Lemak kambing	10	4
Total		100	40
Total kalori		188 kkal	

Sumber: Mulyohadi Ali dkk., 2006.

Menurut Mulyohadi Ali dkk., 2006, penelitian pada tikus galur wistar sebagai hewan aterosklerosis dengan cara memberi pakan aterogenik (pakan yang ditambah kolesterol, minyak babi dan asam kolat). Asam kolat diberikan karena akan menurunkan kadar HDL dan meningkatkan kadar LDL plasma. Pemberian pakan aterogenik selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar kolesterol dan menginduksi terbentuknya sel busa secara bermakna.

3. Tepung sorgum

Tepung sorgum yang digunakan adalah tepung yang berasal dari biji sorgum, penggunaan dosis didasarkan akan kebutuhan serat manusia dengan kondisi dislipidemia yang kemudian dikonversikan ke kebutuhan serat tikus coba menggunakan persamaan sebagai berikut :

- Kebutuhan serat pangan manusia dengan kondisi hiperlipidemia per hari 30 gram

- Jumlah serat pangan dalam 100 gram tepung sorgum adalah 7.8 gram
- Berat badan rata-rata manusia 70 kg
- Berat badan rata-rata tikus 200 gram
- Kebutuhan serat pangan tikus

Kebutuhan serat pangan manusia x faktor konversi dosis untuk tikus (0,018)

Sehingga :

30 g/hari x 0,018= 0,54 g/hari untuk tikus dengan berat badan 200 gram.

$$\frac{\text{Kebutuhan serat tikus (g)}}{\text{Kadar serat tepung (g) 100 gram tepung sorgum}} = \frac{x \text{ jumlah tepung sorgum}}{100}$$

Perhitungan :

$$\frac{0,54}{7,8} = \frac{X}{100}$$

X = 7 gram/hari untuk tikus dengan berat badan 200 gram

Dalam penelitian, penentuan menggunakan deret ukur. Di pilih 3 dosis berdasarkan kebutuhan serat tikus perhari, yaitu:

- Dosis I : 7 gram per hari
- Dosis II : 14 gram per hari (2x dosis I)
- Dosis III : 28 gram per hari (4x dosis I)

Tepung sorgum diberikan melalui substitusi komposisi diet ategenik yaitu, PARS dan tepung terigu.

Tabel 4.3 Komposisi Diet Aterogenik dan Tepung Sorgum

No	Bahan	Dosis I		Dosis II		Dosis III	
		%	Berat (g)	%	Berat (g)	%	Berat (g)
1	PARS	49,6	20	40,2	16,2	5,7	2,3
2	Tepung terigu	8,1	3,3	-	-	-	-
3	Tepung sorgum	17,3	7	34,8	14	69,4	28
4	Kuning telur bebek	5	2	5	2	5	2
5	Asam kolat	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05
6	Minyak Babi	8,9	3,55	8,9	3,55	8,9	3,55
7	Minyak kelapa	1	0,4	1	0,4	1	0,4
8	Lemak kambing	10	4	10	4	10	4
Total		100	40,3	100	40,2	100	40,3
Total energi		188 kkal		188 kkal		188 kkal	
Total karbohidrat		19,59 gram		22,84 gram		23,74 gram	
Total lemak		9,75 gram		9,81 gram		9,64 gram	
Total protein		5,13 gram		4,6 gram		3,3 gram	

4.6 Definisi Istilah/Definisi Operasional

1. Diet normal

Diet dengan komposisi comfeed PARS 53%, tepung terigu 23,5% dan air 23,5%. Ini diberikan pada tikus kelompok kontrol yang merupakan pembandingan untuk mengetahui tingkat kadar trigliserida pada kelompok lainnya.

2. Diet aterogenik

Diet dengan komposisi confeed PARS 50%, tepung terigu 25%, kuning telur bebek 5% lemak kambing 10% minyak kelapa 1% minyak babi 8,9% dan asam kolat 0,1%. Diet ini diberikan pada tikus kelompok kontrol (+) serta kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 selama 8 minggu untuk memicu kenaikan profil lipid.

3. Trigliserida

Trigliserida yang lebih dikenal dengan triasilgliserol merupakan gliserida dimana gliserol diesterifikasi dengan 3 asam lemak. Dimana dinyatakan dalam satuan mg/dL.

4. Tepung Sorgum

Tepung yang diperoleh dari tanaman biji sorgum yang telah mengalami proses penggilingan. Tepung ini diberikan pada tikus kelompok perlakuan 2, 3 dan 4 dengan cara mensubsitusi komposisi diet aterogenik, yaitu PARS dan tepung terigu.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Tikus diberikan perlakuan dengan prosedur sebagai berikut:

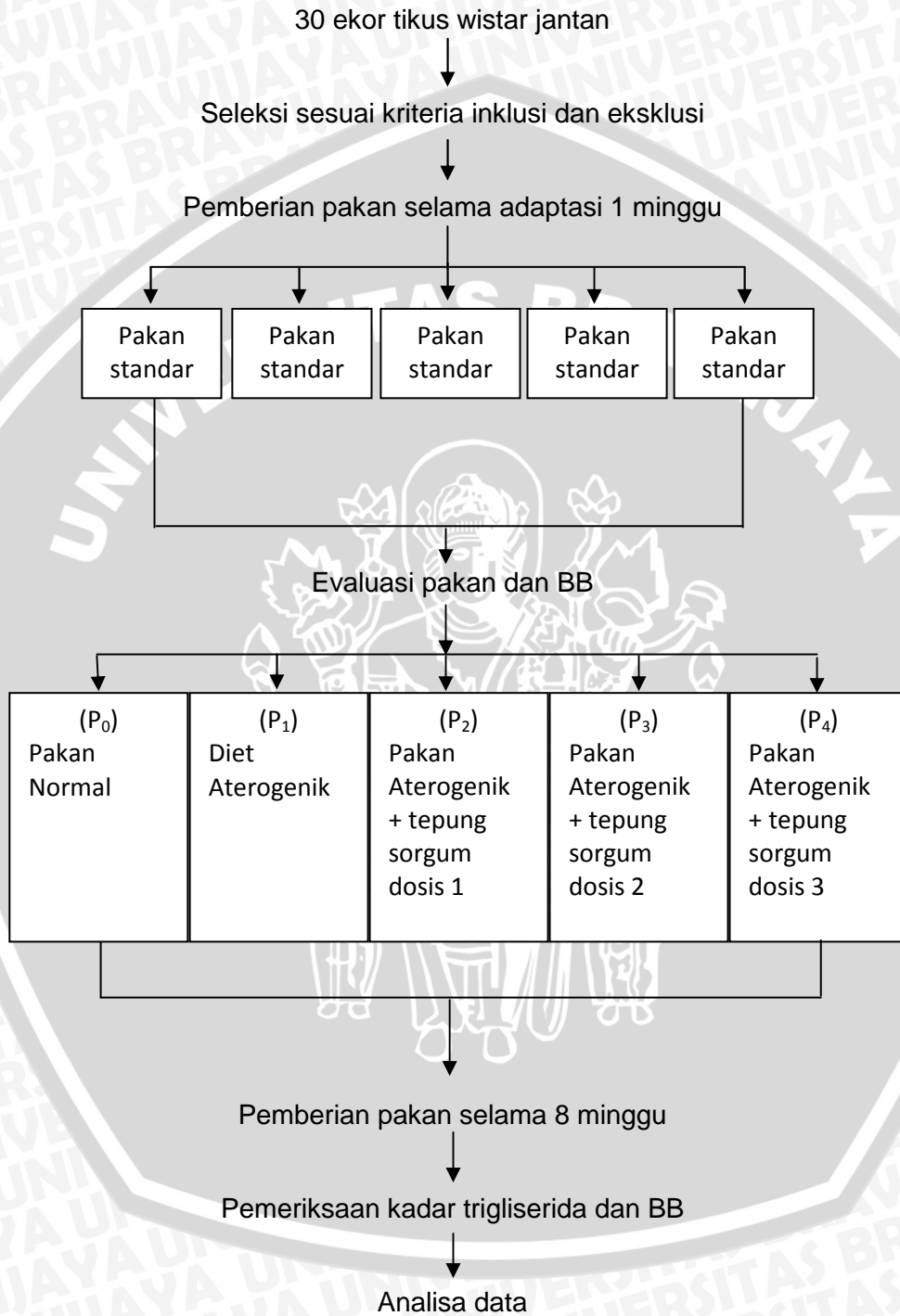
1. 25 ekor tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan dilakukan randomisasi agar setiap tikus coba mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus akan mengalami masa adaptasi selama 1 minggu pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makna. Selama adaptasi tikus diberikan pakan standar dan ditimbang berat badannya sebelum dan setelah adaptasi untuk memastikan tikus tidak mengalami perubahan yang berarti dan dapat digunakan dalam penelitian.
3. Pada saat perlakuan, pakan, diet perlakuan dan minuman tikus diberikan secara oral selama 8 minggu.
 - a. Kelompok perlakuan kontrol negatif (P_0), dimana tikus mendapatkan diet normal peroral tanpa tepung sorgum.

- b. Kelompok perlakuan kontrol positif (P_1), dimana tikus mendapatkan diet aterogenik peroral tanpa tepung sorgum.
- c. Kelompok perlakuan 1 (P_2), dimana tikus mendapatkan diet aterogenik yang komposisinya sudah dimodifikasi dan tepung sorgum 7 gram yang diberikan secara peroral.
- d. Kelompok perlakuan 2 (P_3), dimana tikus mendapatkan diet aterogenik yang komposisinya sudah dimodifikasi dan tepung sorgum 14 gram yang diberikan secara peroral.
- e. Kelompok perlakuan 3 (P_4), dimana tikus mendapatkan diet aterogenik yang komposisinya sudah dimodifikasi dan tepung sorgum 28 gram yang diberikan secara peroral.

Adanya kelompok kontrol negatif (P_0) adalah sebagai pembanding untuk memastikan bahwa akan terjadi peningkatan kadar trigliserida setelah diberikan aterogenik pada kelompok tikus kontrol positif P_1 , P_2 , P_3 dan P_4 .

4. Pada saat perlakuan, hewan coba tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (1 ekor dalam 1 kandang) untuk menghindari kemungkinan yang tidak diinginkan seperti sakit, kematian, kegagalan pengambilan sampel, dan lain-lain. Pakan ditimbang setiap hari selisih berat sebelum dan sesudah maka oleh tikus dinyatakan sebagai intake harian. Intake harian kemudian dikonversikan dalam nilai gizi.
5. Pada akhir percobaan dilakukan pengambilan serum darah pada tikus untuk mengetahui dan mengukur kadar trigliserida.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.1:



Gambar 4.1. Diagram Alir Penelitian

4.8 Analisa Data

Proses analisa data dilakukan terlebih dahulu menggunakan uji homogenitas, bila tidak terdapat perbedaan variasi data maka dikatakan homogendan dilanjutkan dengan uji normalitas. Data yang didapat kemudian dianalisa secara komputerisasi dengan menggunakan *Software Statiscal Program and Social Science 16.0 (SPSS 16)* dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan kadar trigliserida darah pada masing-masing kelompok perlakuan. Jika terdapat perbedaan makadapat dilanjutkan dengan uji komparatif *Post Hoc Tukey* antara kelompok perlakuan 1,2dan 3 untuk mengetahui dosis yang paling berpengaruh terhadap kadar trigliserida darah pada tikus. Uji statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dikatakan bermakna jika $\alpha < 0,05$.