

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorik pada hewan coba tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* dengan menggunakan desain penelitian *Post Test Only One Control Group Design* (Sastroasmoro, 2002), dimana pada desain penelitian ini peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan hasil pengukuran kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol, namun tidak ada pengukuran indikator sebelum perlakuan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah randomisasi dengan rancangan acak lengkap karena menggunakan hewan coba, bahan ransum, tempat percobaan, dan bahan penelitian lainnya yang homogen (Adji, 2005), sehingga setiap sampel yang digunakan penelitian memiliki peluang yang sama untuk masuk pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

4.2 Penentuan Perlakuan

Pada penelitian ini, terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subjek penelitian, yaitu :

1. Kontrol negative (P0) = diet normal
2. Kontrol positive (P1) = diet aterogenik
3. Perlakuan 1 (P2) = diet aterogenik + bubuk tempe kacang tanah dosis I

4. Perlakuan 2 (P3) = diet aterogenik + bubuk tempe kacang tanah dosis II
5. Perlakuan 3 (P4) = diet aterogenik + bubuk tempe kacang tanah dosis III

4.3 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* yang dipelihara di Laboratorium Parasitologi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

4.3.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Jenis kelamin jantan.
2. Usia 8-12 minggu.
3. Berat badan 100-200 gram.
4. Warna bulu putih bersih.
5. Anggota badan lengkap, dan tidak cacat, gerakan aktif, mata jernih.
6. Tikus sehat dan tidak menderita penyakit.
7. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya.

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang selama penelitian berlangsung tidak mau makan.
2. Tikus mati selama penelitian berlangsung.

3. Tikus mengalami diare yang ditandai dengan feses tidak berbentuk dan atau mengalami penurunan berat badan.

4.3.2 Estimasi Jumlah Subyek Penelitian

Besar sampel berdasarkan ketentuan WHO dengan jumlah sampel minimal 5 ekor per kelompok.

Rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut :

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus diatas, maka perhitungan sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 5 kali. Penambahan hewan coba cadangan

adalah 1 ekor untuk setiap perlakuan untuk mengantisipasi apabila terdapat tikus dalam kelompok perlakuan yang mati selama percobaan. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $(5 \times 5) + 5 = 30$ hewan coba.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Terikat (Dependent Variable)

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar trigliserida

4.4.2 Variabel Bebas (Independent Variable)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah bubuk tempe kacang tanah dengan berbagai dosis

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengambilan serum dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan untuk pemeriksaan trigliserida darah dilakukan di Laboratorium Kawi 31 Malang.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 bulan, yaitu dimulai sekitar awal bulan Januari 2013 sampai dengan awal bulan Maret 2013.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

4.6.1.1 Bahan Makanan Untuk Hewan Coba

- a. Diet Normal : Diberikan sebanyak 40 g/hari dalam bentuk ransum dengan komposisi yaitu PARS sebanyak 21,2 g (53%), tepung terigu sebanyak 9,4 g (23,5%) dan air sebanyak 9,4 ml (23,5%).
- b. Diet aterogenik : Diberikan sebanyak 40 g/hari dalam bentuk ransum dengan komposisi yaitu PARS sebanyak 20 gram (50 %), Tepung terigu sebanyak 10 gram (25 %), Kuning telur bebek 2 gram (5%), Lemak kambing 4 gram (10%), Minyak kelapa 0,4 gram (1%), Minyak babi 3,55 gram (8,9 %) ,dan Asam kolat 0,05 gram (0,1%)
- c. Bubuk tempe kacang tanah terbagi menjadi 3 dosis yaitu :
 - Bubuk tempe kacang tanah dosis I
 - Bubuk tempe kacang tanah dosis II
 - Bubuk tempe kacang tanah III

4.6.1.2 Bahan Pemeriksaan Trigliserida

Bahan pemeriksaan trigliserida menggunakan larutan reagen exel dan sampel serum yang diperoleh dari Laboratorium Kawi Malang.

4.6.2 Alat Penelitian

4.6.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan rak tempat meletakkan kandang, dan sekam. Tikus wistar dipelihara dalam kandang yang bebas dari patogen penyakit.

4.6.2.2 Alat Pembuatan Makanan Hewan Coba

Baskom plastik, timbangan ketelitian 0,1 kg, handgloves, pengaduk, nampan.

4.6.2.3 Alat Pembuatan Bubuk Tempe Kacang Tanah

Alat untuk pembuatan bubuk tempe kacang adalah plastik, loyang, panci air, baskom, oven, pengayak.

4.6.2.4 Alat Pemberian Bubuk Tempe Kacang Tanah

Sonde, beaker glass

4.6.2.5 Alat Pengambilan Sampel Serum Triglicerida

Alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah adalah seperangkat alat bedah, mikro pipet 10 μ l, jarum suntik 10 ml dan spluit disposable, tabung valkon 15 ml, tabung untuk penyimpanan serum.

4.6.2.6 Alat Pemeriksaan Serum Triglisierida

Alat untuk pemeriksaan kadar trigliserida darah adalah mesin COBAS MIRA, cuvet disposable, cup dan rak reagent, cup dan rak sampel, mikro pipet 100 μ l, mikro pipet 500 μ l, yellow tip, dan blue tip.

4.7 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi
1.	Bubuk Tempe Kacang Tanah	Bubuk ini dihasilkan dari penghalusan dari tempe kacang tanah yang diiris tipis - tipis yang sebelumnya dikukus selama 10 menit dengan suhu 100°C , kemudian tempe kacang tanah dijemur selama 6 jam dengan intensitas sinar matahari tinggi, kemudian tempe kacang tanah kembali dikeringkan dengan oven selama 1 jam dengan suhu 60°C , kemudian diblender lalu dilakukan pengayakan untuk mendapatkan bubuk tempe kacang tanah dengan

		ukuran butiran yang seragam. Ukuran pengayak yang digunakan adalah 60 mesh.	
2.	Kadar Trigliserida	Kadar trigliserida darah pada tikus putih (<i>Rattus Novergicus Galur Wistar</i>) adalah kadar trigliserida yang diukur dengan menggunakan COBAS MIRA dari darah tikus masing-masing sampel saat akhir penelitian. Kadar trigliserida merupakan skala data interval dalam satuan mg/dl.	

4.8 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.8.1 Pra Penelitian

4.8.1.1 Tahapan Pembuatan Tempe Kacang Tanah

Kacang tanah yang digunakan adalah kacang tanah jenis gajah dan kacang tanah tersebut diperoleh dari membeli di Pasar Blimbing, Malang. Kacang tanah yang telah dibersihkan kulitnya direndam dalam air selama 6 jam, lalu tiriskan selama 1 jam. Kemudian kacang tanah dikukus selama 30 menit. Selanjutnya kacang tanah yang telah dikukus didinginkan selama 1 jam. Kemudian diberikan

ragi, dibungkus dengan plastik dan diletakkan pada tempat yang tidak terlalu lembab. Kacang tanah difermentasi selama 36 jam (Amandasari, 2010).

4.8.1.2 Tahapan Pembuatan Bubuk Tempe Kacang Tanah

Bubuk yang berasal dari tempe kacang tanah mentah yang diiris tipis. Dimasukkan ke dalam oven, suhu 60° C dan dipanaskan sampai kering (\pm 20 jam). Setelah kering diblender kemudian di screen (ayak) dengan ukuran 0,355 mm dengan vibrating. Hasil screen ditampung, dikumpulkan lalu ditimbang.

Total berat tempe awal 1,12 kg \rightarrow 669,7 gram

Rendemen 669,7 gram : 1120 gram x 100 % = 59,79%

4.8.1.3 Penghitungan Dosis Bubuk Tempe Kacang Tanah

Indonesia memiliki berbagai macam tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai pengganti kedelai, misalnya kacang tanah. Tempe yang dibuat dari bahan baku kacang tanah terkenal dengan nama tempe kacang (Karti dan Rosida, 2009; Grundy, 2005). Konsumsi tempe rata-rata per orang per tahun di Indonesia saat ini diduga sekitar 7,30 kg (20 gram/ orang/ hari) (Deptan, 2011). Diketahui 34,6 kg tempe menghasilkan 9,68 kg bubuk tempe, sehingga 1 gram tempe menghasilkan 0,28 gram bubuk tempe (Kusumawati, 2004). Faktor konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200 gram) adalah 0,018 (Laurence and Bacharach, 1964). Dimana mana perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= 20 \text{ gram} \times 0,28 \text{ gram bubuk tempe} \times 0,018 \\ &= 0,1008 \text{ gram/hari/ekor} = 100,8 \text{ mg/hari/ekor} \end{aligned}$$

Penentuan dosis menggunakan deret ukur :

$$P1 = \frac{1}{2} \times 100,8 \text{ mg} = 50,4 \text{ mg}$$

$$P2 = 1 \times 100,8 \text{ mg} = 100,8 \text{ mg}$$

$$P3 = 1 \frac{1}{2} \times 100,8 \text{ mg} = 151,2 \text{ mg}$$

4.8.2 Penelitian utama

4.8.2.1 Perlakuan Hewan Coba Sebelum Penelitian

Hewan coba diletakkan dalam kandang (jumlah unit penelitian/kandang menyesuaikan dengan kapasitas kandang) dengan suhu terkontrol dan cahaya yang cukup (siklus 12 jam gelap/terang; pencahayaan dilakukan antara pukul 06.00 sampai 18.00) dan diberikan kebebasan dalam mengakses makanan standar dan minuman. Setelah 7 hari periode adaptasi, dilakukan randomisasi untuk membagi tikus menjadi 5 kelompok dan diberikan tambahan intervensi berupa bubuk tempe kacang tanah pada kelompok perlakuan (P2, P3, dan P4) selain pakan standar (PARS), sedangkan kelompok kontrol negatif dan positif hanya menerima pakan standar (PARS) saja.

4.8.2.2 Perlakuan Hewan Coba Selama Penelitian

Setelah tikus dirandomisasi maka pada kelompok tikus kontrol positif (P1) dan perlakuan (P2, P3, dan P4) diukur berat badannya. Kelompok negatif akan diberikan diet normal berupa komposisi comfeed PARS, tepung terigu dan air. Kelompok positif akan diberikan diet aterogenik berupa komposisi kuning telur, lemak kambing, minyak, minyak babi, asam kolat, PARS dan terigu. Diet normal dan diet aterogenik serta minuman diberikan secara *ad libitum*. Pada kelompok

perlakuan P2 sampai P4 akan diberikan diet atherogenik yang disertai pemberian bubuk tempe kacang tanah melalui sonde. Untuk kelompok kontrol negatif dan positif dilakukan sonde placebo 2 ml untuk menyamakan tingkat stress akibat sonde pada semua kelompok perlakuan. Pemberian bubuk tempe kacang tanah sesuai dengan dosis yang telah ditentukan yaitu 50,4 mg/ hari/ ekor, 100,8 mg/ hari/ ekor, dan 151,2 mg/ hari/ ekor dan dengan memperhatikan kapasitas lambung tikus.

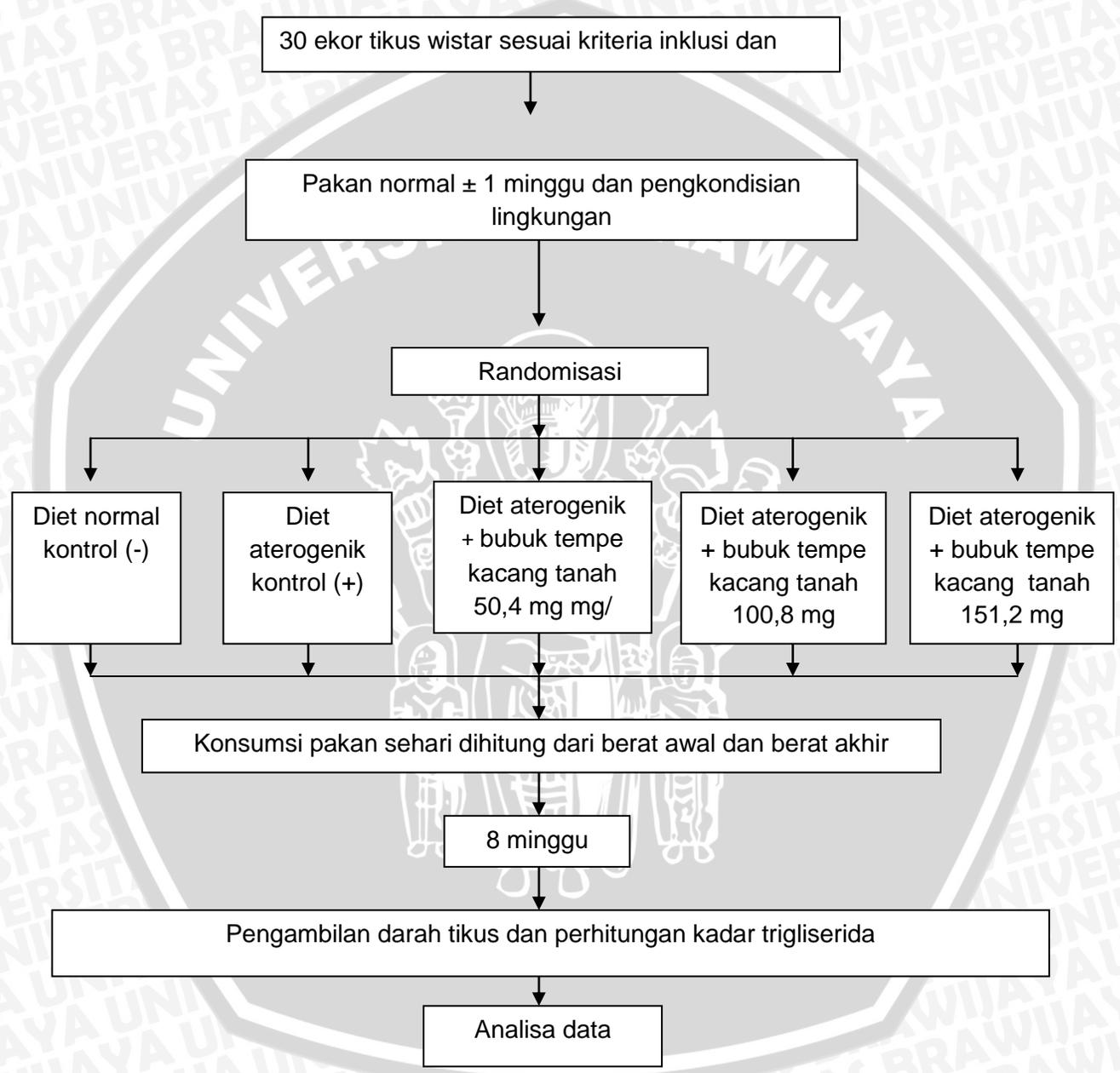
4.8.2.3 Pengambilan Sampel Serum Trigliserida di Akhir Penelitian

Pada minggu ke 9 tikus dimatikan dengan cara dibius kloroform kemudian dilakukan proses pengambilan sampel darah guna pemeriksaan lebih lanjut dengan menggunakan alat pengambilan dan penyimpanan sampel darah yaitu mikro pipet 10 μ l, jarum suntik 10 ml dan spluit disposable, tabung valkon 15 ml, tabung untuk penyimpanan serum. Bangkai tikus kemudian dipendam dalam tanah.

4.8.2.4 Pemeriksaan Serum Trigliserida

Kadar trigliserida diukur dengan menggunakan COBAS MIRA dari darah tikus masing-masing sampel saat akhir penelitian. Kadar trigliserida merupakan skala data interval dalam satuan mg/dl. Data rata – rata kadar trigliserida tikus diperoleh melalui pembagian jumlah seluruh kadar trigliserida semua tikus putih untuk masing – masing kelompok perlakuan dan ditabulasikan dalam bentuk tabel.

4.8.3 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data



4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis melalui beberapa tahap pengujian, yaitu :

1. Uji homogenitas varians

Uji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika varian homogen, analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA.

2. Uji One Way ANOVA

Untuk membandingkan rata – rata jumlah trigliserida serum disetiap kelompok perlakuan dan melihat apakah ada perbedaan signifikan.

3. Analisis Post-Hoc Tukey

Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan secara signifikan dari hasil uji One Way ANOVA dan membandingkan nilai rata – rata yang terdapat pada setiap kelompok.