

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen (*true experimental*) dengan metode desain Rancangan Acak Lengkap (RAL).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Besaran Sampel

Dalam penelitian ini, tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Maka jumlah untuk besaran sampel masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

r: jumlah minimal tikus

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

t: banyak perlakuan

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5 \text{ (Kemas, 2008)}$$

Jadi, jumlah minimal tikus untuk masing-masing perlakuan adalah 5 ekor.

Dengan menambahkan 1 tikus sebagai cadangan, maka jumlah tikus yang diperlukan adalah 5 perlakuan x 6 ekor tikus = 30 ekor tikus.

4.2.2 Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini kelompok perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok secara acak (P_0 , P_1 , P_2 , P_3 , P_4) yaitu:

- a. Kelompok kontrol negatif (P_0) : kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok dan tidak diberi *kombucha coffee* (KC).
- b. Kelompok kontrol positif (P_1) : kelompok tikus yang hanya dipapar asap rokok dan diperiksa kadar LDL-nya.
- c. Kelompok perlakuan (P_2) : kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi KC dengan Dosis 1 yaitu sebesar 2,7 ml/hari selama 30 hari.
- d. Kelompok perlakuan (P_3) : kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi KC dengan Dosis 2 yaitu sebesar 4,05 ml/hari selama 30 hari.
- e. Kelompok perlakuan (P_4) : kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi KC dengan Dosis 3 yaitu sebesar 5,4 ml/hari selama 30 hari.

Sebelum perlakuan, tikus diadaptasi pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan, dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama kurang lebih 7 hari untuk mengetahui apakah pakan tikus tersebut dapat diterima oleh tikus. Setelah itu tikus baru diberi perlakuan berupa paparan asap rokok selama 30 hari, disertai pemberian diet normal dengan atau tanpa *kombucha coffee*. Sampel tikus kemudian akan dibedah untuk diuji kadar LDL-nya.

4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Perlakuan dalam penelitian ini adalah pemberian cairan *kombucha coffee* pada tikus yang dipapar asap rokok, yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Selanjutnya, desain ini disajikan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Rancangan Acak Lengkap

Kelompok Perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
P ₀ : Kontrol negatif (Tanpa paparan asap rokok selama 30 hari dan tanpa pemberian KC 30 hari)	X ₀₁	X ₀₂	X ₀₃	X ₀₄	X ₀₅	X ₀₆
P ₁ : Paparan asap rokok 30 hari dan tanpa pemberian KC 30 hari	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆
P ₂ : Paparan asap rokok 30 hari + KC Dosis 1 selama 30 hari	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆
P ₃ : Paparan asap rokok 30 hari + KC Dosis 2 selama 30 hari	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆
P ₄ : Paparan asap rokok 30 hari + KC Dosis 3 selama 30 hari	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆

Keterangan:

KC= Kombucha Coffee

1, 2, 3, 30 : Satuan percobaan

X₀₁ : Kelompok perlakuan P₀ pada ulangan ke-1

X₀₂ : Kelompok perlakuan P₀ pada ulangan ke-2

⋮

X₄₆ : Kelompok perlakuan P₄ pada ulangan ke-6

4.2.4 Randomisasi dan Desain Layout

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokkan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap), hal ini karena hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogeny. Teknik randomisasi dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Teknik Randomisasi

Urutan	Ranking	Perlakuan
1	17	Kontrol negatif
2	8	Kontrol negatif
3	9	Kontrol negatif
4	28	Kontrol negatif
5	15	Kontrol negatif
6	21	Kontrol negatif
7	22	P ₁
8	18	P ₁
9	16	P ₁
10	24	P ₁
11	13	P ₁
12	29	P ₁
13	12	P ₂
14	23	P ₂
15	10	P ₂
16	11	P ₂
17	4	P ₂
18	14	P ₂
19	2	P ₃
20	26	P ₃
21	19	P ₃
22	27	P ₃
23	1	P ₃
24	3	P ₃
25	7	P ₄
26	5	P ₄
27	30	P ₄
28	6	P ₄
29	20	P ₄
30	25	P ₄

4.2.5 Kriteria Subjek

Subjek penelitian ini adalah tikus putih *Rattus novergicus strain wistar* yang diambil secara random, dengan kriteria sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

- a. Jenis kelamin jantan yang sehat dan aktif
- b. Umur 6-8 minggu
- c. Berat badan 150-220 gram
- d. Warna bulu putih

Kriteria eksklusi:

- a. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Penelitian hewan coba tikus karena tikus adalah hewan coba yang paling sering digunakan dan keterdekatan dengan manusia antara lain: mamalia, pemakan sembarang (omnivora), mudah berkembang biak dan mudah dalam perawatannya, dan mempunyai metabolisme mirip manusia.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Kombucha *coffee* dengan berbagai dosis pemberian.

4.3.2 Variabel Terikat

Kadar Low Density Lipid (LDL) tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* jantan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, Untuk pemeriksaan serum dilakukan di Poliklinik UB dan Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Desember 2012 – Februari 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

1. Bahan pakan tikus dengan diet normal

Dari beberapa penelitian sebelumnya, diketahui bahwa kebutuhan makan tikus per ekor setiap harinya adalah 30,5 gram yang terdiri dari:

- Comfeed PARS
- Terigu
- Air

Tabel 4.3 Komposisi Energi dan Zat Gizi Diet Normal Tikus

Zat Gizi	Comfeed PAR-S (100 gram)	Tepung Bromo (100 gram)
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11

Lemak (gram)	4	0,9
Karbohidrat (gram)	58	72

Total diet normal:

Protein = 190 gram + 11 gram
 = 201 gram
 = 804 kkal (21,6%)

Lemak = 40 gram + 0,9 gram
 = 40,9 gram
 = 368,1 kkal (9,73%)

Karbohidrat = 580 gram + 72 gram
 = 652 gram
 = 2608 kkal (68,99%)

Energi = 3780,1 kkal

Berat pakan = 1000 gram PAR-S + 100 gram tepung terigu
 = 1100 gram

Jumlah energy dalam 1 gram pakan = 3780,1 : 1100
 = 3,43 kkal

Pakan yang diberikan tiap hari = 30,5 gram

2. Bahan untuk fermentasi Kombucha *Coffee*:

- Kultur biakan *kombucha*
- Bubuk kopi jenis Java Arabika
- Gula pasir
- Air



3. Bahan untuk pemaparan asap rokok: rokok kretek
4. Bahan Untuk Pemeriksaan LDL :
 - a. Serum darah dari masing tikus perlakuan
 - b. Reagen uji

1.5.2 Alat

- a. Alat pemeliharaan hewan coba :kandang dari kotak plastik, tutup kandang yang terbuat dari kayu dilapisi kawat, sekam, botol air, dan rak tempat meletakkan kandang.
- b. Alat pembuatan makanan hewan coba :baskom plastik, timbangan, pengaduk, *hand scone*, gelas ukur.
- c. Alat untuk fermentasi kombucha *coffee*
 - Toples dari bahan plastik dengan ukuran 2 liter digunakan sebagai tempat *kombucha*, kain sebagai penutup toples,
 - Karet
 - Gelas ukur
 - Saringan plastik,
 - Pengaduk
 - Plastik
 - Panci
 - Kompor
- d. Alat untuk pemberian kombucha *coffee*: sonde.
- e. Alat ukur pengambilan dan penyimpanan sampel darah : Jarum suntik 5 ml dan spuit disposable, tabung Vial 15 ml
- f. Alat untuk pemeriksaan kolesterol LDL alat *biosystem*

4.6 Definisi Operasional Variabel

- Pemberian kombucha coffee adalah pemberian cairan kombucha coffee yang telah difermentasikan selama 12 hari. Kombucha coffee diberikan pada tikus melalui sonde.
- Paparan asap rokok adalah pemberian paparan asap rokok dari jenis rokok kretek yang sebanyak 1 batang/hari selama 5 menit dengan menggunakan *smoking pump* yang digerakkan oleh elektrik. Paparan asap rokok diberikan selama 1 bulan (model paparan subkronis [1-3 bulan]) (Khairani, 2008).
- Kadar LDL adalah kolesterol yang ada di dalam LDL plasma hewan coba yaitu tikus putih (*rattus norvegicus strain wistar*) yang diambil dari jantung hewan coba. LDL kolesterol merupakan salah satu komponen dari fosfolipid dalam plasma darah yang banyak mengandung kolesterol. Kadar LDL dinyatakan dalam mg/dl dan pemeriksaan serumnya menggunakan mesin *biosystem*.

4.7 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

4.7.1 Cara Pembuatan Kombucha Coffee

Tahapan pembuatan Kombucha Coffee adalah sebagai berikut:

- a. Memasukkan 5 gram kopi ke dalam 2 liter air mendidih kemudian ditambahkan gula pasir sebanyak 200 gram dan diaduk sampai rata. Cairan kopi disaring dan didinginkan sampai temperatur 30-40° C.
- b. Setelah dingin, cairan kopi manis tersebut dimasukkan ke dalam toples-toples steril masing-masing sebanyak 200 ml.

- c. Menginokulasi *kultur kombucha* ke dalam air kopi sebanyak 10 g/l media dengan posisi bagian yang lebih putih di atas dan yang coklat di bawah.
- d. Toples yang sudah diinokulasi ditutup dengan kain berpori dan menempatkannya di tempat yang tidak terkena sinar matahari, tidak digoyang dan dipindah-pindah.

4.7.2 Penentuan Dosis Kombucha coffee

Berdasarkan penelitian Rahayu (2005), dosis efektif *kombucha coffee* 150 ml dan setelah dikonversikan dengan berat badan tikus putih 200 g yaitu 2,7 ml menunjukkan bahwa pemberian *kombucha coffee* dengan dosis 2,7 ml menunjukkan hasil yang signifikan artinya dosis yang berbeda berpengaruh terhadap perubahan kadar kolesterol dalam darah tikus putih. Kemudian dosis yang digunakan sebagai dasar perhitungan adalah 150 ml dengan faktor konversi dosis dari manusia ke tikus adalah 0,018 (Harmita,2008).

Tabel 4.4 Konversi dosis antara jenis hewan dengan manusia (Laurence and Bacharach, 1964)

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,2 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,5	14,2
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1,0



Berdasarkan penelitian tersebut, dosis yang menjadi dasar perhitungan dalam penelitian ini adalah 2,7 ml. KC akan diberikan dalam 3 macam dosis dengan interval meningkat sebesar 1 kali, 1,5 kali, dan 2 kali, dengan perhitungan sebagai berikut :

- a. Dosis 1 : $1 \times 2,7 \text{ ml} = 2,7 \text{ ml}$
- b. Dosis 2 : $1,5 \times 2,7 \text{ ml} = 4,05 \text{ ml}$
- c. Dosis 3 : $2 \times 2,7 \text{ ml} = 5,4 \text{ ml}$

4.7.2 Cara Kerja Pemaparan Asap Rokok dan Pemberian *Kombucha Coffee*

Cairan *Kombucha Coffee* diberikan melalui sonde meskipun makanan dan minuman diberikan secara oral. Paparan asap rokok dengan menggunakan kotak yang dihubungkan dengan *smoking pump*, tiga ekor tikus dimasukkan dalam kotak *fiber glass* ukuran 26 x 38 x 12,5 cm dengan ukuran 12,5 x 12,5 x 26. Ruang kotak tersebut diberi asap dengan cara menghisap rokok dengan *smoking pump* sekaligus meniupkannya ke dalam kotak tersebut. Tikus dipapar dengan hembusan asap rokok kretek selama 5 menit sebanyak 1 batang/hari dengan menggunakan pompa hisap volume 20 ml, daya kecepatan hisap selama 18 kali tiap menit. Pemaparan asap rokok diberikan selama 30 hari. Kotak *smoking pump* dibuat dari bahan tembus pandang. Pompa penghisap adalah spuit injeksi 20 cc sedangkan pompa digerakkan oleh elektrik.

4.7.3 Proses Perlakuan pada Tikus

- a) 30 ekor tikus dipilih yang memenuhi kriteria inklusi kemudian dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan dilakukan randomisasi agar setiap

tikus coba mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.

Pembagian 5 kelompok perlakuan, yaitu:

- a. Kelompok kontrol yang tidak diberi paparan asap rokok maupun kumbuca *coffee*.
 - b. Kelompok tikus yang hanya dipapar asap rokok tanpa ada pemberian kumbuca *coffee*.
 - c. Kelompok perlakuan (P_2): kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi kumbuca *coffee* sebanyak 2,7 mL selama 30 hari.
 - d. Kelompok perlakuan (P_3): kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi kumbuca *coffee* sebanyak 4,05 mL selama 30 hari.
 - e. Kelompok perlakuan (P_4): kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi kumbuca *coffee* sebanyak 5,4 mL selama 30 hari.
- b) Sebelum perlakuan, tikus diadaptasi pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan, dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama kurang lebih 7 hari untuk mengetahui apakah pakan tikus tersebut dapat diterima oleh tikus.
 - c) Pada masa adaptasi berat badan tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.

- d) Setelah masa adaptasi, tikus dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan melalui metode rancangan acak lengkap (RAL).
- e) Hewan coba diperlakukan dengan 1 kandang berisi 6 ekor tikus. Makanan tikus diberikan dalam bentuk diet normal untuk semua perlakuan. Pada kelompok non-kontrol yaitu P₁ hingga P₄ diberikan paparan asap rokok. Untuk kelompok P₂, P₃, dan P₄, selain pemberian diet normal, juga diberikan cairan kombuca *coffee* melalui sonde.
- f) Pada hari ke-30, tikus dibedah untuk dilakukan pengukuran kadar LDL. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara tikus dibedah dan diambil serum darahnya dari jantung.

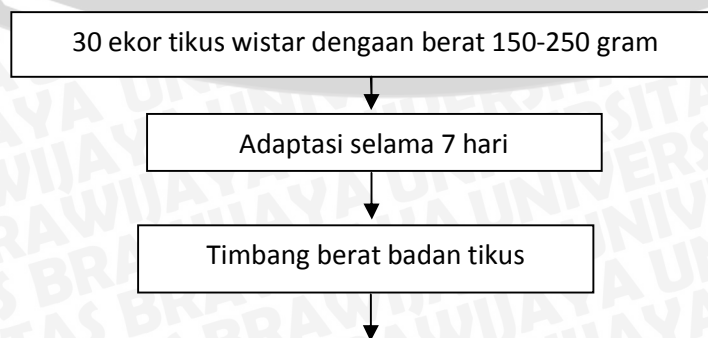
4.7.4 Pemeriksaan Kadar LDL

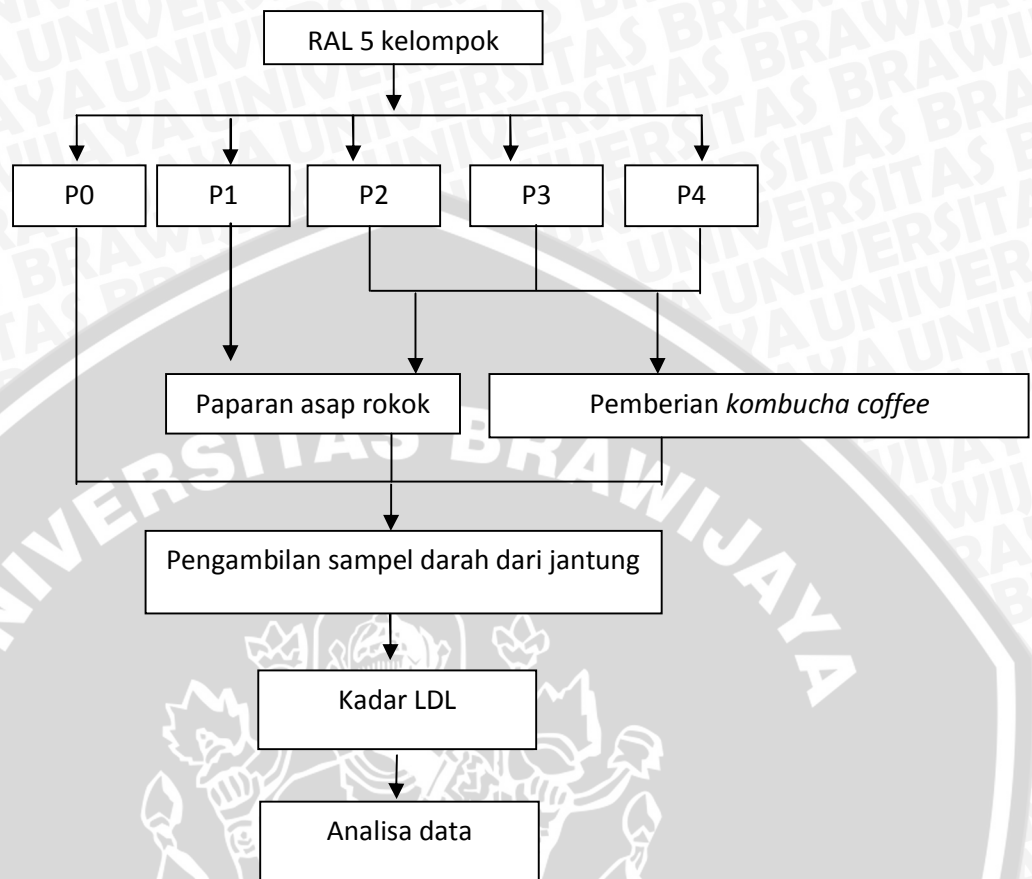
Pemeriksaan kadar kolesterol LDL menggunakan alat *Biosystem* dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Nyalakan UPS
2. Nyalakan komputer.
3. Periksalah pada A25/A15
 - a. Kondisi botol *system liquid* → jika volumenya sedikit → isi kembali
 - b. Kondisi botol limbah/ waste → jika volumenya mendekati penuh → buanglah limbahnya
 - c. Kondisi botol washing solution (besar dan kecil). Botol Aquabidest (untuk baseline), botol saline solution → jika volumenya kurang → isi kembali

- d. Reaction rotor → pastikan rotor sudah terpasang → pastikan rotor yang terpasang adalah rotor yang bersih
- e. Pastikan tidak ada botol yang atau benda apapun yang dapat membahayakan pergerakan ARM dan lainnya.
- f. Jika semuanya sudah benar → Nyalakan instrumen → lampu indicator ON → buzzer bunyi
- g. Pada program A25/A15 klik icon A25.usher.v.3.2.2.2.LNK
- 4. Jika alat sudah ON dan dalam status “ STAND BY” → lakukan prosedur “Warming UP” → klik W-Up → ikuti perintahnya
- 5. Setelah proses *Warming UP* selesai → lakukan proses “ Heating Rotor” (memanaskan rotor) → N-rotor ikuti prosesnya
 Catatan : untuk proses “ heating rotor” harus dilakukan setiap usai mengganti rotor dengan rotor bersih, untuk proses warming up dan heating rotor dilarang untuk di *BYPASS*
- 6. Kemudian lakukan “New system liquid (NSL)” → klik NSL
 Catatan : fungsi NSL adalah untuk menghindari kontaminasi dan gelembung udara sebaiknya lakukan lebih dari 1 kali
- 7. Alat sudah siap digunakan

4.7.4 Diagram Alur Penelitian





Gambar 4.1 Bagan alur penelitian

4.7.6 Data yang Dikumpulkan

- a. Berat badan tikus
- b. Kadar LDL tikus

4.7.7 Cara Pengumpulan Data

- a. Berat badan tikus

Berat badan tikus diperoleh dengan menimbang tikus menggunakan timbangan elektrik

- b. Kadar LDL

Kadar LDL didapat melalui hasil sentrifuse organ hepar tikus, kemudian sampel diuji dengan alat *biosystem*.

4.8 Analisa Data

Data kadar LDL tiap kelompok perlakuan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar LDL antara kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji *Kruskal- Wallis* . Hasil pengujian yang diperoleh digunakan untuk mengetahui apakah ada pengaruh pada 5 kelompok perlakuan secara bermakna atau tidak. Jika ada perbedaan, maka akan dilanjutkan dengan *Post Hoc mann-whitney* untuk melihat perbedaan dari tiap kelompok. Seluruh teknik pengolahan data dianalisis dengan menggunakan program SPSS 17 Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95%.

