

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak Kelompok (RAK).

4.2 Populasi dan Sampel

Mengacu pada penelitian Ranganathan *et al.*, (2000) maka hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar. Setiap satu tikus dipelihara dalam kandang plastik 40x40 cm dalam ruang hewan coba Lab. Farmakologi dengan ventilasi yang cukup.

4.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) dengan umur 2 bulan, berat badan \pm 200 gr, jenis kelamin jantan dan dalam keadaan sehat selama penelitian (Ranganathan *et al.*, 2000).

4.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus tidak bergerak aktif dan tampak sakit dalam masa penelitian.
2. Tikus mati dalam masa penelitian.
3. Tikus hilang dalam masa penelitian.

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Selanjutnya jumlah tikus dihitung dengan rumus (Andayani, 2003).
Dimana: $p(n-1) > 15$ n = jumlah sampel tiap perlakuan, p = jumlah perlakuan.
Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol

negative, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut: $5(n-1) > 15$; $n-1 > 3$; $n > 4$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 25 tikus. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan menjadi 30 tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Pemberian *Ocichips* dengan perbandingan persentase (kemangi: tepung terigu:tepung tapioka) dengan formula 1 (15:70:15); formula 2 (17,5:65:17,5); formula 3 (20:60:20).

4.3.2 Variabel Terikat Penelitian

Kadar Trigliserida dan HDL tikus

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Waktu : Maret – Mei 2012

Tempat : Laboratorium Diet FKUB, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium THP-UB, Laboratorium Kawi, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati UB

Tabel 4.1 Tahapan Pelaksanaan/Jadwal Faktual Pelaksanaan

No	Agenda	Tanggal	Tempat Pelaksanaan
1	Uji Pendahuluan	4, 13, 14 Mar	Lab. Diet FKUB
2	Produksi Ocicips	19, 25 Mar	Lab. Diet FKUB dan Lab. Pangan THP-UB
3	Perlakuan Pra DM	11-23 Apr	Lab Farmakologi FKUB
4	Induksi DM (dengan STZ)	24 Apr	Lab Farmakologi FKUB
5	Cek Glukosa	23 April	Lab Farmakologi FKUB
7	Pembedahan tikus	1 dan 4 Mei	Lab Farmakologi FKUB
8	Cek profil Lipid	2 dan 4 Mei	Lab Kawi
9	Uji Organoleptik	3 Mei	FKUB
10	Uji Kandungan zat gizi	21 Mei	Lab. Sentral Ilmu Hayati UB

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Pemeliharaan Tikus

Bahan dan alat yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan comfeed PARS dan tepung terigu (makanan standar tikus), serta alkohol 70% untuk memandikan tikus yang disemprotkan tiap hari.

4.5.2 Bahan dan Alat untuk Induksi Tikus Model Diabetes Mellitus

Sprit injeksi intraperitoneal, streptozotocin (STZ), nicotinamide.

4.5.3 Bahan dan Alat untuk Pembuatan *Ocichips* dengan Penggorengan Vakum

Food processor, penggoreng vakum, tepung kemangi, tepung terigu, telur, soda kue, bawang putih, merica, garam, minyak goreng.

4.5.4 Bahan dan Alat untuk Penimbangan Tikus

Timbangan digital

4.5.6 Bahan dan Alat untuk Pembedahan Tikus

Pisau bedah, papan bedah, pinset, Potter-*Homogenizer*, asam alkohol.

4.5.7 Bahan dan Alat untuk pengukuran profil lipid

Spektrofotometer, Sentrifuse, Tabung reaksi, Tabung endorf, Pipet metohematokrit.

4.5.8 Bahan dan Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi

Tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, alkohol dan *cotton ball*.

4.6 Definisi Operasional

1. *OciChips* adalah snack terbuat dari tepung daun kemangi, tepung terigu, telur, soda kue, bawang putih, merica dan garam yang diolah dengan menggunakan mesin penggoreng vakum.
2. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang mana tikus jenis ini memperagakan diabetes dan memproduksi lipid yang mirip dengan manusia (Ranganathan *et al.*, 2000). Tikus diperoleh dari pusat pengembangan hewan coba laboratorium biokima- biomol MIPA berumur 2 bulan (6-8) minggu dengan berat 200 gram.
3. STZ (SIGMA) didapat dari Lab. Biomedik, tikus diadaptasi selama 7 hari sebelum diinduksi STZ.
4. Profil lipid tikus diukur dengan spektrofotometer yang dilakukan setelah tikus diberi perlakuan selama 30 hari.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan Rancangan Acak Kelompok. Kemudian dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji tikus *Rattus norvegicus* dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama tujuh hari dan dibagi lima kelompok. Adapun diagram alur penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1.

4.7.2 Proses Pembuatan Pakan Tikus

Proses pembuatan pakan diet normal tikus dengan cara sebagai berikut:

1. Menimbang bahan (PARS dan terigu).
2. Mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata.
3. Membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.

4.7.3 Pembuatan *OciChips* dengan Penggorengan Vakum

Telur dikocok hingga mengembang, lalu bawang putih yang sudah dihaluskan, garam serta merica dimasukkan dan diaduk hingga merata. Setelah itu tepung kemangi, tepung terigu dan soda kue dimasukkan ke dalam adonan. Air dituangkan sedikit demi sedikit sambil diuleni hingga terbentuk adonan yang kalis dan bisa digiling. Adonan digiling setebal 2 mm dan dipotong-potong sesuai selera. Tahap terakhir adalah menggoreng adonan dalam mesin penggoreng vakum (tekanan 70 cmHg) dengan suhu 80° - 90° selama 55-75 menit. Metode penggorengan ini terbukti dapat digunakan untuk mempertahankan kandungan zat gizi, terutama vitamin serta senyawa aktif produk yang stabilitasnya rentan terhadap proses oksidasi dan pemanasan serta menghasilkan produk dengan

tekstur yang lebih renyah (lebih kering) dan warna yang lebih menarik. (IP2TP, 2000, Widaningrum *et al.*, 2008, Garayo dan Moreira, 2002, Shyu *et al.*, 1998)

Penelitian Rai *et al.*, (1997) menunjukkan bahwa pemberian tepung kemangi sebagai suplementasi dengan dosis sebesar 1 gr/hari dapat menurunkan gula darah puasa secara signifikan. Maka digunakan variasi formula 1 g/hari, 2 g/hari dan 3 g/hari. Jika 1 g tepung kemangi berasal dari ± 5 g kemangi segar serta mempertimbangkan pemberian *OciChips* dengan mencampurkan dalam pakan normal tikus (50:50) maka variasi formula *OciChips* yang digunakan yaitu formula 1 (15:70:15), formula 2 (17,5:65:17,5) dan formula 3 (20:60:20). Perbandingan berdasarkan komposisi utama ocichips yaitu kemangi: tepung terigu: tapioka.

4.7.3 Induksi Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe II

STZ (Streptozotocin) dimasukkan kedalam 50mM-*citric acid buffer* dan Nicotinamide dileburkan kedalam *normal saline* saat akan digunakan. Tikus dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal 15 menit setelah injeksi 240mg/kg nicotinamide. Diabetes ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemi pada hari ke-7 pasca induksi. Tikus dianggap mengalami diabetes apabila *non fasting blood glucose* mencapai 200mg/dl dalam dua hari berturut-turut (Amirshahrokhi *et al.*, 2008).

4.7.4 Penentuan Kadar HDL-Kolesterol Metode CHOD – PAP

Kilomikron, VLDL, dan LDL menggumpal bila bereaksi dengan asam fosfotungstat dan magnesium klorida. Setelah dilakukan sentrifugasi, cairan supernatant mengandung fraksi HDL, yang dapat diperiksa kadar HDL-kolesterolnya dengan menggunakan larutan pereaksi kolesterol. Pertama masukkan ke dalam tabung centrifuge : 200 μ l serum + 500 μ l reagen presipitan,

campur baik-baik, diamkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian centrifuge dengan kecepatan 2500 g selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk pemeriksaan kadar kolesterol-HDL.

$$\text{Perhitungan : Kadar kolesterol HDL} = \frac{As}{Ast} \times [St]$$

4.7.5 Penentuan Kadar Triglicerida (TG) dalam Darah Metode GPO-PAP

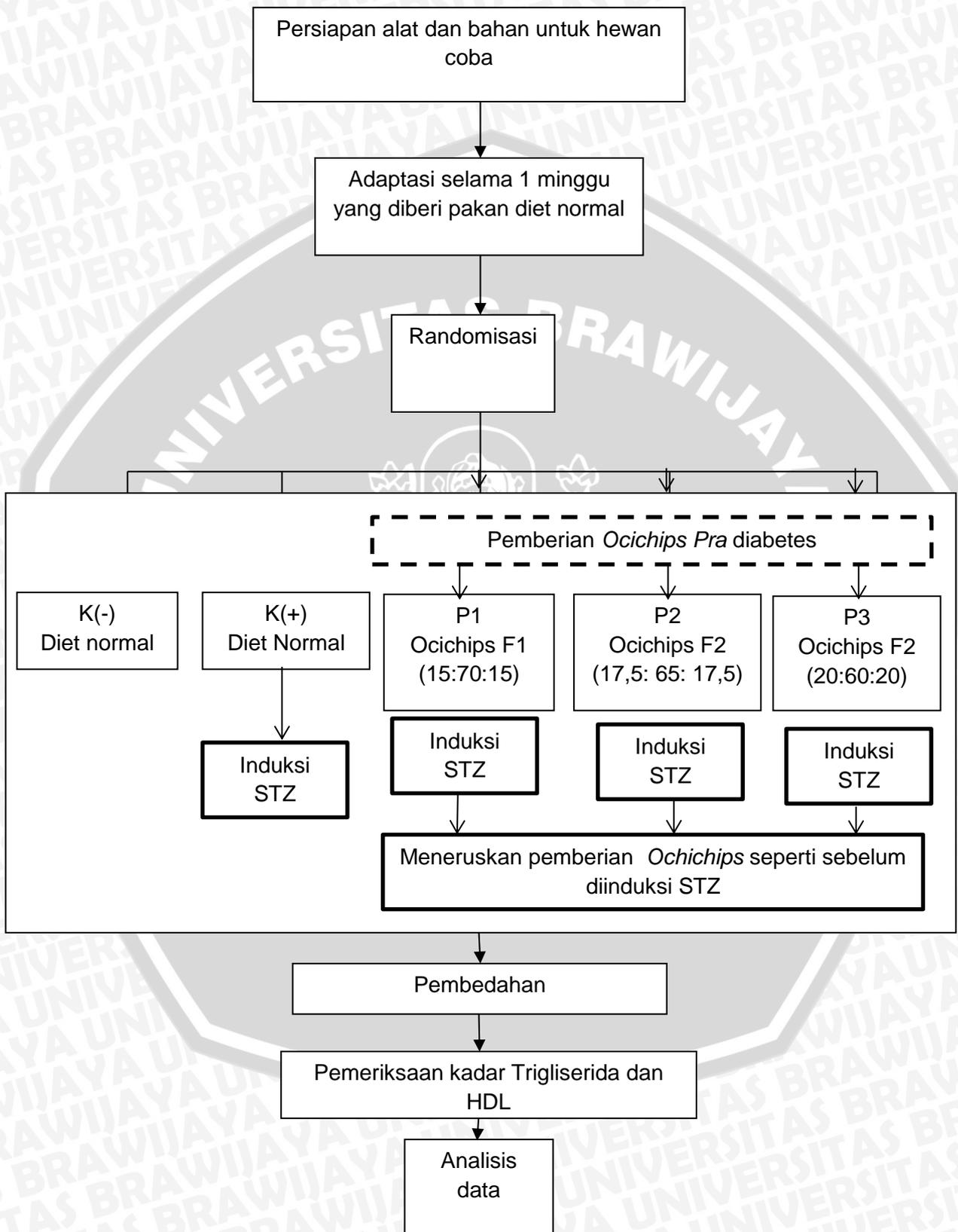
Prinsip percobaannya adalah triglicerida dihidrolisis secara enzimatis oleh enzim lipase khusus menjadi gliserol dan asam lemak. Campur dan diinkubasikan pada suhu 20⁰ - 25⁰C selama 20 menit. Ukur absorbansi sampel (As) dan standart (Ast) dengan spektrofotometer $\lambda=500$ nm

$$\text{Perhitungan: Konsentrasi triglicerida} = As \times \frac{[St]}{Ast} \text{ mg/l}$$

Pada triglicerida yang konsentrasinya tinggi, larutkan sampel tersebut satu bagian dengan 5 bagian larutan NaCl 0.9% dan ulangi penentuan kadarnya. Hasilnya dikalikan 6

4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran kadar triglicerida dan HDL) kontrol dan perlakuan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 17.0 for Windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji One-way ANOVA, Post hoc test (uji least significant difference) uji korelasi pearson dan uji regresi linier



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian