

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik pada hewan coba tikus wistar dengan *posttest with control group design*. Pemilihan obyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Hal ini karena hewan coba, bahan ransum, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen (dalam keadaan yang serba sama) (Yitnosumarto, 1991).

#### 4.2. Populasi dan Sampel

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

1. Jenis kelamin jantan dan aktif
2. Umur 8 – 12 minggu
3. Berat badan 120 – 200 gram
4. Warna bulu putih
5. Ditempatkan pada lingkungan laboratorium

Semua sampel mempunyai kemudahan akses mendapatkan air dan diet rendah protein yang diberikan selama 21 hari. Kriteria eksklusi yang ditetapkan adalah tikus yang memiliki kelainan anatomi.

Penelitian ini menggunakan tikus karena tikus merupakan sampel yang paling sering digunakan dan memiliki kedekatan dengan manusia antara lain : murah, cepat berkembang biak, sifat anatomis dan karakter fisiologisnya mirip mamalia lain seperti manusia (Pribadi, 2008)

#### 4.2.1. Estimasi Besar Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini, tikus dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Perlakuan dalam penelitian ini adalah pemberian tepung biji kecipir pada tikus yang telah diberi diet rendah protein. Dengan menghitung besaran sampel menggunakan rumus :

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

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

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$r \geq 6$$

$$r = 6$$

keterangan : r = jumlah minimal tikus  
t = banyaknya perlakuan

Jadi, jumlah minimal tikus untuk masing-masing perlakuan adalah 6 ekor. Namun, dibutuhkan cadangan 1 ekor sehingga terdapat 7 ekor setiap perlakuan. Jumlah subyek penelitian minimal adalah  $7 \times 4$  ekor tikus = 28 ekor tikus.

#### 4.2.2. Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Selanjutnya, desain ini disajikan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1 Rancangan Acak Lengkap**

Kelompok Perlakuan	Ulangan						
	1	2	3	4	5	6	7
K-: Kontrol (diberikan diet normal selama 49 hari dan tanpa pemberian diet rendah protein maupun tepung biji kecipir)	X <sub>01</sub>	X <sub>02</sub>	X <sub>03</sub>	X <sub>04</sub>	X <sub>05</sub>	X <sub>06</sub>	X <sub>07</sub>
K+ : diberi diet rendah protein selama 49 hari dan tanpa pemberian tepung biji kecipir	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>	X <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>
P1: diberi diet rendah protein selama 21 hari, kemudian diberi diet normal yang disubstitusi tepung biji kecipir (protein normal/sedang 21%) selama 28hari	X <sub>21</sub>	X <sub>22</sub>	X <sub>23</sub>	X <sub>24</sub>	X <sub>25</sub>	X <sub>26</sub>	X <sub>27</sub>
P2: diberi diet rendah protein selama 21hari, kemudian diberi diet normal yang disubstitusi tepung biji kecipir (protein tinggi 45%) selama 28 hari	X <sub>31</sub>	X <sub>32</sub>	X <sub>33</sub>	X <sub>34</sub>	X <sub>35</sub>	X <sub>36</sub>	X <sub>37</sub>

Keterangan:

1, 2, 3, ....., 30 : Satuan percobaan

X<sub>01</sub> : Kelompok perlakuan K- pada ulangan ke-1

X<sub>02</sub> : Kelompok perlakuan K- pada ulangan ke-2

⋮

X<sub>37</sub> : Kelompok perlakuan P2 pada ulangan ke-7

#### 4.2.3. Randomisasi dan *Design Lay Out*

Agar setiap percobaan mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan, maka dalam pengambilan sampel dilakukan pengacakan dengan langkah langkah sebagai berikut:

1. Berikan nomor urut 1-28 pada sampel.
2. Ambil bilangan random sebanyak sampel dengan menggunakan angka acak.
3. Beri ranking pada bilangan random yang diperoleh seperti pada Tabel 4.2 berikut :

Tabel 4.2. Randomisasi Rangka dari 28 Angka Acak

Angka Acak	Ranking	Urutan	
756	22	1	K-
317	11	2	
008	2	3	
003	1	4	
386	13	5	
773	23	6	
908	25	7	
594	18	8	K+
803	24	9	
659	20	10	
401	15	11	
952	27	12	
267	9	13	
143	8	14	
309	10	15	P <sub>1</sub>
648	19	16	
077	6	17	
697	21	18	
491	17	19	
068	5	20	
399	14	21	
039	4	22	P <sub>2</sub>
961	28	23	
951	26	24	
113	7	25	
029	3	26	
376	12	27	
415	16	28	

4. Untuk menentukan perlakuan untuk masing-masing plot, gunakan *rank* sebagai nomor plot sedangkan nomor urutan sebagai perlakuan. Karena terdapat 4 kelompok perlakuan, maka nomor urutan yang dimasukkan dalam satu perlakuan adalah sebagai berikut:

- K-: nomor urut 1-7
- K+: nomor urut 8-14
- P<sub>1</sub>: nomor urut 15-21
- P<sub>2</sub>: nomor urut 22-28



5. Dengan demikian hasil randomisasi menunjukkan kelompok kontrol (K-) terdiri dari peringkat 22, 11, 2, 1, 13, 23, 25; kelompok perlakuan (K+) terdiri dari peringkat 18, 24, 20, 15, 27, 9, 8; kelompok perlakuan (P1) terdiri dari peringkat 10, 19, 6, 21, 17, 5, 14; kelompok perlakuan (P2) terdiri dari peringkat 4, 28, 26, 7, 3, 12, 16.

#### **4.3. Variabel Penelitian**

##### **4.3.1. Variabel Bebas :**

Tepung biji kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) dengan berbagai dosis.

##### **4.3.2. Variabel Tergantung :**

Kadar Hb dalam darah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* jantan.

#### **4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **4.4.1. Lokasi Penelitian**

1. Pembuatan tepung biji kecipir dilakukan dengan memesan ke Laboratorium Politeknik Negeri Malang
2. Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Pemeriksaan kadar Hb dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### **4.4.2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan mulai bulan Januari 2013 – Februari 2013.

#### 4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Makanan Tikus

Kebutuhan makan tikus dewasa per ekor untuk diet normal adalah 30 g dan untuk diet rendah protein adalah 30 g dengan energi yang sama yaitu  $\pm$  102,8 kalori. Prinsip pemberian ransum pada beberapa perlakuan adalah isokalori, yaitu masing-masing jenis pakan tikus memiliki kandungan kalori yang hampir sama tetapi memiliki berat dan komposisi yang berbeda (Hardy, 1980). Komposisi diet tikus pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.4.

**Tabel 4.3. Komposisi Diet Tikus Pada Berbagai Perlakuan**

Bahan Makanan	K- (gr)	K+ (gr)	P1 (gr)	P2 (gr)
Comfeed PAR-S + tepung terigu	30	-	27	2,5
Minyak jagung	-	2.4	-	-
Mineral mix	-	1.5	-	-
Vitamin	-	0.3	-	-
Selulosa	-	0.3	-	-
Air	-	1.5	-	-
Pati	-	24	-	-
Tepung biji kecipir	-	-	3	27,5
Jumlah	30	30	30	30

##### a. Diet normal PARS

Kebutuhan makan tikus per ekor setiap harinya adalah 30 gram, sehingga kebutuhan energi tikus per hari adalah 102,8 kalori. Makanan tersebut yang terdiri dari tepung terigu gunung bromo dan Comfeed PARS dengan

perbandingan 1 : 2. Kebutuhan energi tikus per hari dapat diterjemahkan ke dalam bentuk makro nutrient sebagai berikut :

**Tabel 4.4 Komposisi Energi dan Zat Gizi Diet Normal Tikus per 30 g**

Zat Gizi	Persentase (%)	Jumlah
Energi	-	102, 8 kkal
Protein	19,07	4,9 g
Lemak	7,79	0,89 g
Karbohidrat	73,15	18,8 g

Sumber : Nikmah, 2007

b. Diet rendah protein

Diet rendah protein yang diberikan pada subjek penelitian untuk diet perlakuan adalah selama 21 hari, adapun kandungan dari diet rendah protein yaitu :

**Tabel 4.5. Komposisi Bahan Diet Rendah Protein per 30 gram**

No.	Komposisi Bahan	Jumlah (g)
1	Minyak jagung	2.4
2	Mineral mix	1.5
3	Vitamin	0.3
4	Pati	24
5	Selulosa	0.3
6	Air	1.5

Sumber : Olivia, 2008

**Tabel 4.6 Komposisi Diet Rendah Protein per 30 gram**

Zat Gizi	Persentase (%)	Jumlah
Energi	-	105,6 kkal
Protein	4%	1 g
Lemak	9%	1,1 g
Karbohidrat	86%	22,2 g

Sumber : Olivia, 2008

- c. Diet normal dengan tepung biji kecipir protein sedang (protein 21%)

Diet normal dengan tepung biji kecipir merupakan pemberian diet normal dengan mengganti sumber proteinnya dengan tepung biji kecipir. Tepung biji kecipir yang bebas lemak dan dibuat dari biji kecipir yang ditepungkan. Tepung biji kecipir dibuat bebas lemak untuk menghindari rasa dan bau langu. Untuk penghitungan diet menggunakan prinsip diet isokalori yaitu masing-masing jenis pakan tikus mempunyai berat yang berbeda tetapi kandungan energinya hampir sama, sehingga dapat disimpulkan komposisi dietnya sebagai berikut :

**Tabel 4.7. Kandungan Energi dan Zat Gizi Diet Normal dengan Tepung Biji Kecipir Protein 21%)**

Komposisi Bahan	Jumlah (g)	Kandungan Energi dan Zat Gizi			
		KH (g)	L (g)	P (g)	E (g)
PARS + terigu	27	17,3	0,4	4,15	92,4
Tepung biji kecipir	3	1,5	0,3	1,35	11,5
Jumlah	30	18,8	0,7	5,5	103,9
Persentase (%)		72,4	6	21,2	

- d. Diet normal dengan tepung biji kecipir protein tinggi (protein 45%)

Untuk penghitungan diet menggunakan prinsip diet isokalori yaitu masing-masing jenis pakan tikus mempunyai berat yang berbeda tetapi kandungan energinya hampir sama, sehingga dapat disimpulkan komposisi dietnya sebagai berikut :

**Tabel 4.8. Kandungan Energi dan Zat Gizi Diet Normal dengan Tepung Biji Kecipir (Protein 45%)**

Komposisi Bahan	Jumlah (g)	Kandungan Energi dan Zat Gizi			
		KH (g)	L (g)	P (g)	E (g)
PARS + terigu	2,5	1,5	0,1	2,85	8,7
Tepung biji kecipir	27,5	13,3	0,3	10,05	106,1
Jumlah	30	14,8	0,4	12,9	114,8
Persentase (%)		51,6	2,9	44,8	



#### 4.5.1. Alat yang Digunakan

1. Alat pemeliharaan binatang coba  
Kandang dari kotak plastik, kandang dari anyaman kawat yang diletakkan di atas kandang kotak plastik, tempat pakan, botol air dan rak tempat menaruh kandang.
2. Alat pembuat Makanan binatang coba  
Baskom plastik, timbangan, pengaduk, *hand scone*, gelas ukur.
3. Peralatan membuat tepung biji kecipir bebas lemak  
Panci, timbangan, *abrasive peeler*, oven, mesin pembuat tepung atau blender, saringan 60 mesh, penggilingan.
4. Alat ukur pengambilan dan penyimpanan sampel darah  
Jarum suntik 5 ml, tabung merk *ependof* untuk penyimpanan darah.
5. Alat untuk pemeriksaan kadar Hb darah  
Menggunakan metode spektrofotometri (*cobas micros*), yaitu pipet, tabung reaksi, cuvet tebal 1 cm.

#### 4.6. Definisi Operasional Variabel

1. Tepung Biji Kecipir  
Tepung rendah lemak yang dibuat dari biji kecipir yang ditepungkan.  
Tepung biji kecipir dibuat rendah lemak untuk menghindari rasa dan bau langu. Tepung ini diberikan secara oral pada kelompok perlakuan P1 dan P2 selama 28 hari dengan 2 dosis protein yang berbeda, yaitu 21% pada P1 dan 45% pada P2.

## 2. Hemoglobin

Hb adalah molekul protein pada sel darah merah yang berfungsi sebagai media transport oksigen dari paru paru ke seluruh jaringan tubuh dan membawa karbondioksida dari jaringan tubuh ke paru paru. Kandungan zat besi yang terdapat dalam Hb membuat darah berwarna merah. Kadar Hb darah pada tikus wistar diukur menggunakan metode spektrofotometri dengan alat *cobas micros* (indikator kadar normal : 12,48-14,63 g/dL). Sampel darah yang digunakan adalah darah yang diambil dari jantung hewan coba.

## 3. Diet Rendah Protein

Diet yang mengandung 4% protein dari kebutuhan energi total tikus per hari yang diberikan selama 21 hari dengan komposisi minyak jagung, mineral mix, vitamin, pati, selulosa dan air. Diet ini diberikan secara oral dengan kandungan energi dan zat gizi (per tikus/hari) sebagai berikut :

Energi = 105,6 kkal

Karbohidrat = 22,2 g

Protein = 1,1 g

Lemak = 1 g

### 4.7 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

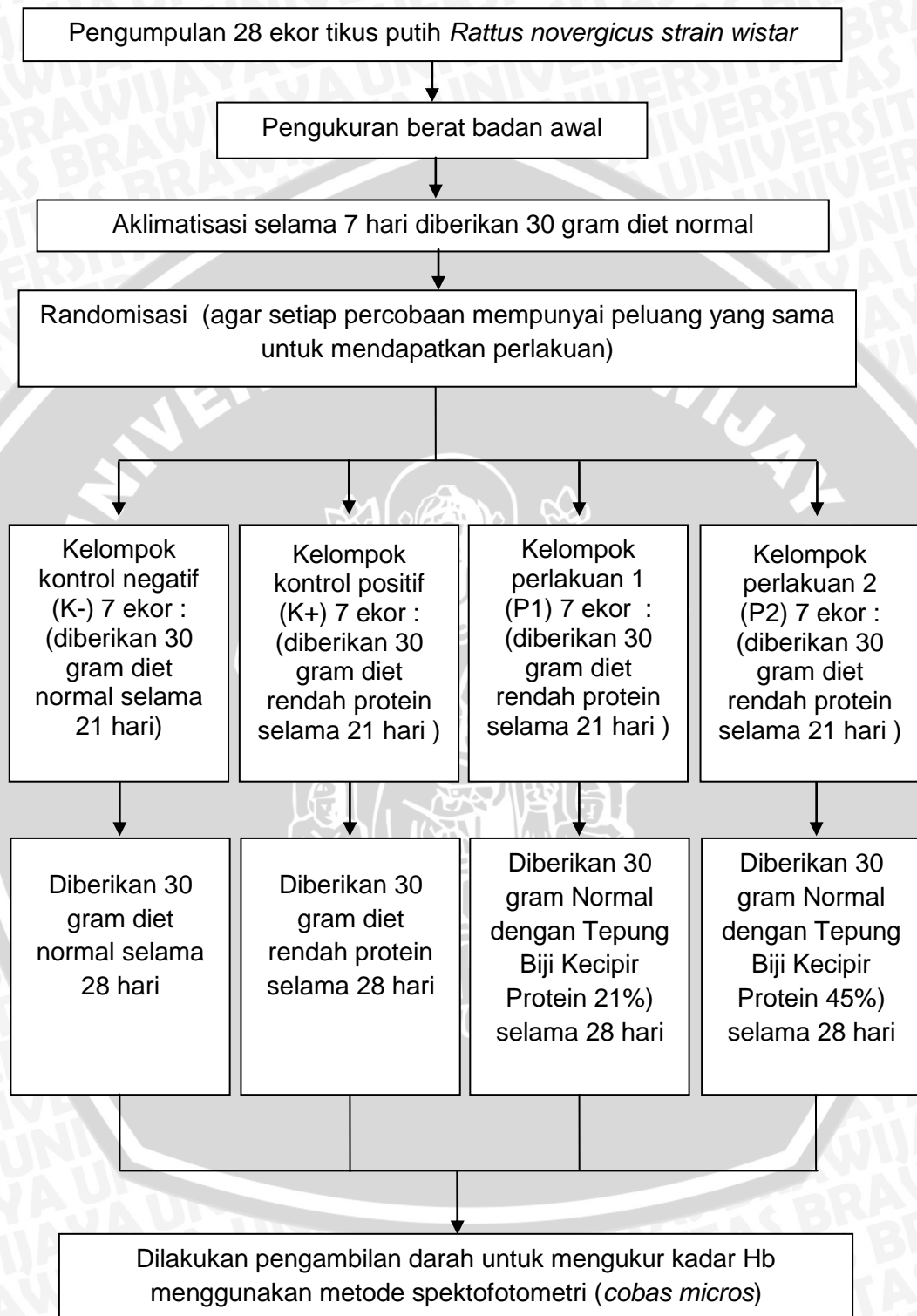
#### 4.7.1. Cara Kerja Pemberian Diet

Tikus diberikan ransum diet rendah protein, diet normal dan diet tepung biji kecipir yang sesuai dengan komposisi di atas dan diberikan secara oral.

#### 4.7.2. Proses Perlakuan pada Tikus

1. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok sampel, yaitu :
  - a. K- : Kelompok dengan perlakuan pemberian diet normal
  - b. K+ : Kelompok dengan perlakuan pemberian diet rendah protein
  - c. P1 : Kelompok dengan perlakuan pemberian diet tepung biji kecipir dengan protein normal/sedang (21%)
  - d. P2 : Kelompok dengan perlakuan pemberian diet tepung biji kecipir dengan protein tinggi (45%)
2. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium (aklimatisasi) selama 7 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan dan diberi diet normal.
3. Sebelum perlakuan, semua tikus ditimbang berat badannya kemudian diberikan diet rendah protein selama 21 hari.
4. Sampel diperlakukan dengan kandang terpisah (satu kandang/ekor). Makanan tikus ditimbang setiap hari. Selisih antara berat makanan sebelum dan sesudah dimakan dinyatakan sebagai intake harian. Intake harian kemudian dikonversikan ke dalam nilai gizi.
5. Pada akhir minggu ke-4 dilakukan pengambilan darah tikus untuk mengukur kadar Hb. Pengambilan darah dilakukan dengan cara binatang coba dibius dengan chloroform kemudian dibedah dan diambil darah dari jantung. Pemeriksaan dilakukan dengan mengirimkan sampel ke laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.7.3. Diagram Alir



#### 4.7.4. Data yang Dikumpulkan

1. Jumlah sisa makanan dari pakan tikus yang diberikan dan selisih jumlah makanan dinyatakan sebagai intake harian tikus.
2. Berat badan tikus di akhir perlakuan.
3. Kadar Hb.

#### 4.7.5. Cara Pengumpulan Data

1. Intake makanan: dihitung dari selisih berat makanan yang diberikan dengan berat makanan yang tersisa.
2. Berat badan tikus: diperoleh dengan menimbang tikus menggunakan timbangan elektrik.
3. Kadar Hb: diperoleh hasil pengukuran pada darah berdasarkan metode spektrofotometri (*cobas micros*).

#### 4.8. Analisis Data

Hasil pengukuran Hb dikumpulkan, diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistik dengan menggunakan SPSS, yaitu rata-rata dari perlakuan dengan menggunakan ANOVA satu arah (*One-way ANOVA*), untuk melihat perubahan kadar Hb pada tiap taraf perlakuan. Apabila dari uji *One Way ANOVA* terdapat hubungan, maka dilanjutkan dengan uji *Tuckey* untuk mengetahui dimana letak perbedaan dari perlakuan yang diberikan. Seluruh teknis pengolahan data dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan program SPSS 17.0 for windows.