

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental design* dengan menggunakan jenis *Post Test Only Control Group Design*. Dalam pemilihan subyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini karena hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen sehingga setiap sampel yang digunakan penelitian memiliki peluang yang sama untuk masuk pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan (Kemas, 2005).

#### 4.2 Penentuan Perlakuan

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

- |                      |  |
|----------------------|--|
| Kontrol negatif (P0) | = diet normal                                  |
| Kontrol positif (P1) | = diet aterogenik                              |
| Perlakuan 1 (P2)     | = diet aterogenik + bubuk tempe kacang dosis I |
| Perlakuan 2 (P3)     | = diet aterogenik+bubuk tempe kacang dosis II  |
| Perlakuan 3 (P4)     | = diet aterogenik+bubuk tempe kacang dosis III |

#### 4.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar* yang dipelihara di Laboratorium Parasitologi FKUB di mana sampel yang

diambil adalah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

#### 4.3.1 Kriteria Inklusi

- Jenis kelamin jantan
- Usia 8-12 minggu
- Berat badan 150-250 gram
- Warna bulu putih bersih
- Anggota badan lengkap, dan tidak cacat, gerakan aktif, mata jernih
- Tikus sehat dan tidak menderita penyakit
- Tidak mendapat pengobatan sebelumnya

#### 4.3.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang tidak mau makan selama penelitian berlangsung
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

#### 4.3.3 Estimasi Jumlah Subjek Penelitian

Menurut Hanifah (2008), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut :

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

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, 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 di atas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 5 kali. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $(5 \times 5) = 25$  hewan coba.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.1.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas adalah bubuk tempe kacang tanah berbagai dosis

##### 4.1.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat adalah kadar LDL kolesterol tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar*.

#### 4.5 Lokasi Dan Waktu Penelitian

##### 4.5.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan dan pengambilan serum hewan coba dilakukan di laboratorium Parasitologi FKUB. Pemeriksaan kadar LDL tikus dilakukan di laboratorium Kawi 31 Malang.

##### 4.5.2 Waktu Penelitian

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

## 4.6 Instrumen Penelitian

### 4.6.1 Bubuk Tempe Kacang

#### 4.6.1.1 Perhitungan Dosis

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 (Safrida, 2008). Faktor konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200 gram) adalah 0,018 (Laurence and Bacharach, 1964), perhitungannya adalah sebagai berikut:

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

Penentuan dosis menggunakan deret ukur ( $\frac{1}{2}n$ ,  $n$ ,  $1\frac{1}{2}n$ ).

$$\text{Perlakuan 1} = \frac{1}{2} \times 100,8 \text{ mg} = 50,4 \text{ mg/ hari/ ekor}$$

$$\text{Perlakuan 2} = 1 \times 100,8 \text{ mg} = 100,8 \text{ mg/ hari/ ekor}$$

$$\text{Perlakuan 3} = 1\frac{1}{2} \times 100,8 \text{ mg} = 151,2 \text{ mg/ hari/ ekor}$$

Tabel 4.1 konversi perhitungan dosis (Laurence and Bacharach, 1964)

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1.5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1.5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0,16	0.32	1.0

#### 4.6.1.2 Tahapan Pembuatan Tempe Kacang Tanah

Kacang tanah mentah yang telah dibersihkan kulitnya direndam dalam air selama 12 jam, lalu tiriskan sampai kering. Kemudian kacang tanah dikukus selama 60 menit. Selanjutnya kacang tanah yang telah dikukus didinginkan. Kemudian diberikan ragi, dibungkus dengan plastik dan diletakkan pada tempat yang tidak terlalu lembab. 1 kg kacang tanah diberi 20 gram ragi. Kacang tanah difermentasi selama 36 jam.

#### 4.6.1.3 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%

#### 4.6.2 Bahan Makanan Tikus

Selama penelitian digunakan diet normal, diet aterogenik dan diet aterogenik dengan bubuk tempe kacang tanah untuk makanan tikus.

##### 4.6.2.1 Diet Normal

Diet normal diberikan sebanyak 40 g pakan/ tikus/ hari dalam bentuk ransum yang komposisinya terdiri dari 75% PARS dan 25% tepung terigu.

#### 4.6.2.2 Diet Aterogenik

Diberikan sebanyak 40 g pakan/ tikus/ hari dalam bentuk ransum dengan komposisi 57% PARS, 32% tepung terigu, 2% kolesterol, 0,13% asam kolat, 8,8% minyak babi.

#### 4.6.3 Bahan Pemeriksaan kadar lipid LDL tikus

Serum darah tikus strain wistar jantan

#### 4.6.4 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang, tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat, dan botol air

#### 4.6.5 Alat Pembuatan Makanan Hewan Coba

Baskom plastik, timbangan, pengaduk, dan gelas ukur

#### 4.6.6 Alat Pemberian Bubuk Tempe

Sonde

#### 4.6.7 Alat Pengambilan Sampel serum

Jarum suntik 10 ml dan spuit disposable, tabung valcon 15 ml, tabung untuk penyimpanan serum, mikro pipet dan sentrifuge.

#### 4.6.8 Alat Pemeriksaan serum LDL

Seperangkat tabung reaksi, cuvet, sentrifuge, spektrofotometer.

#### 4.7 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Skala
1.	Diet Aterogenik	diet tinggi kolesterol dan lemak jenuh yang dapat menyebabkan asam lemak jenuh meningkat sehingga menyebabkan dislipidemia. Dimana ransum ini komposisinya terdiri dari	<i>Ratio</i>

		komposisi 57% PARS, 32% tepung terigu, 2% kolesterol, 0,13% asam kolat, 8,8% minyak babi.	
2.	Bubuk Tempe	<p>Bubuk yang berasal dari tempe kacang tanah mentah yang diiris tipis. Dimasukkan ke dalam oven, suhu 60° C dan dipanaskan sampai kering (<math>\pm</math> 20 jam). Setelah kering diblender kemudian di <i>screen</i> (ayak) dengan ukuran 0,355 mm dengan <i>vibrating</i>. Hasil <i>screen</i> ditampung, dikumpulkan lalu ditimbang.</p> <p>Total berat tempe awal 1,12 kg <math>\rightarrow</math> 669,7 gram</p> <p>Rendemen <math>669,7 \text{ gram} : 1120 \text{ gram} \times 100 \% = 59,79\%</math></p> <p>Untuk penepungan bubuk tempe kacang tanah dilakukan di Polinema.</p>	<i>Ratio</i>
3.	Kadar LDL	Kadar LDL serum masing-masing tikus (subyek penelitian) yang diukur pada saat akhir penelitian. Serum diambil di bagian jantung dan diperoleh dari darah subyek penelitian di sentrifuge, kemudian	<i>Ratio</i>

	dibaca dengan menggunakan analyzer Cobas Mira dan dinyatakan dalam mg/dl.	
--	---	--

## 4.8 Prosedur Penelitian Dan Pengumpulan Data

### 4.8.1 Prosedur Penelitian

- a. Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya. Tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama  $\pm 10$  hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan. Selain adaptasi, juga diberikan diat normal (standart).
- b. Kemudian dilakukan randomisasi agar setiap hewan coba mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.
- c. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (P0) yang diberi diet normal (standart), kelompok kontrol positif (P1) yang diberi diet aterogenik, dan kelompok perlakuan yang diberi diet aterogenik yang masing-masing ditambahkan bubuk tempe kacang dengan dosis 50.4 mg/ ekor/ hari, 100.8 mg/ ekor/ hari dan 151.2 mg/ ekor/hari. Pemberian bubuk tempe kacang dilakukan dengan sonde serta penambahan air sebanyak 2 ml pada masing-masing perlakuan. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif hanya mendapat sonde placebo berupa air sebanyak 2 ml.
- d. Hewan coba diperlakukan dengan kandang terpisah (satu kandang per ekor). Makanan tikus ditimbang setiap hari. Selisih antara berat makanan sebelum dan sesudah dimakan dinyatakan sebagai intake harian kemudian dikonversikan ke dalam nilai gizi.

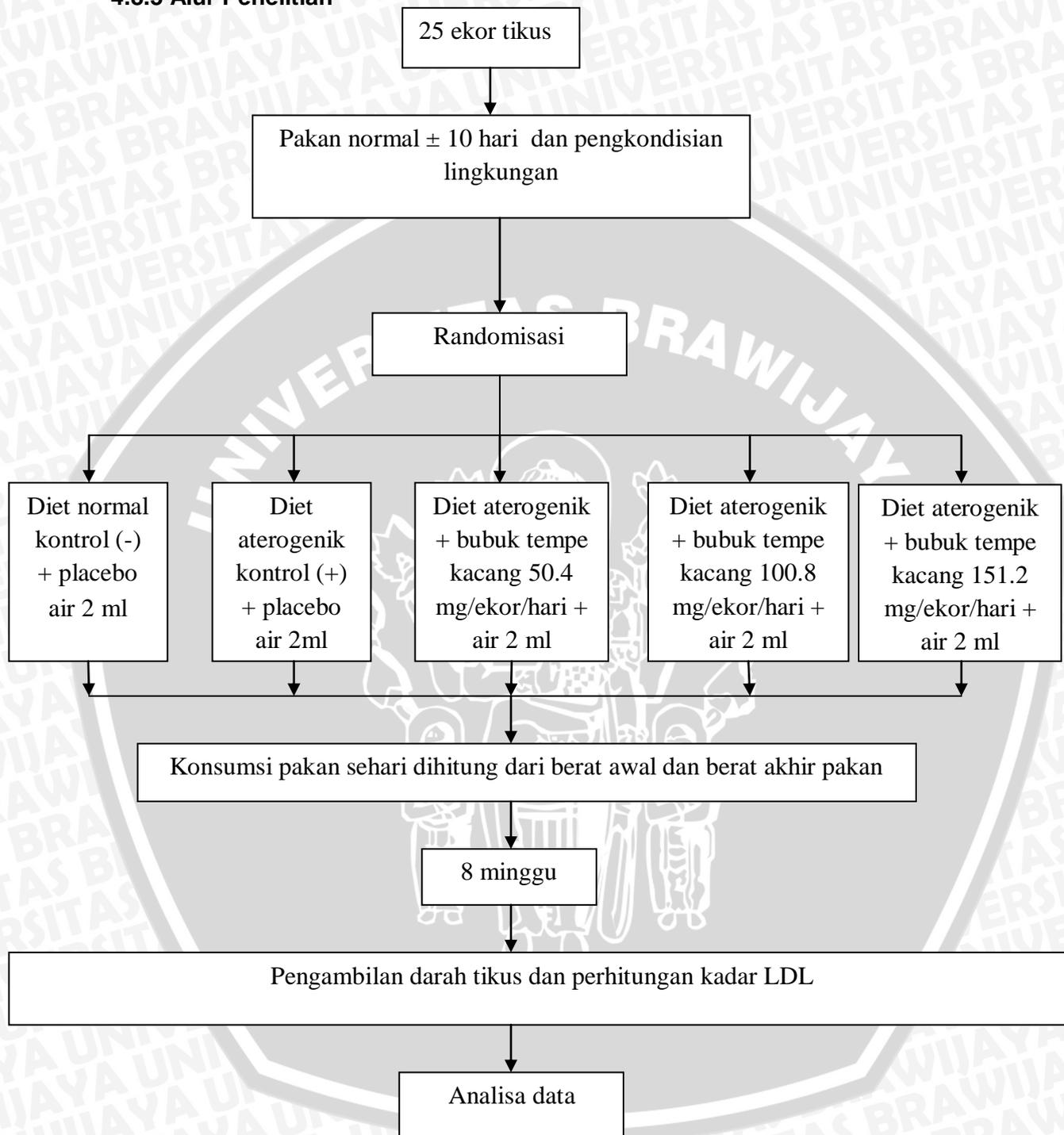
- e. Pada minggu ke 9 dilakukan proses pembedahan dengan tujuan pemeriksaan lebih lanjut yaitu terhadap kadar serum LDL.

#### 4.8.2 Cara Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan meliputi:

- 1) Data berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan berat badan tikus menggunakan timbangan merk Sartorius meter (ketelitian 0.1 kg) setiap minggu sekali.
- 2) Data asupan makanan per hari dihitung dengan menimbang sisa makanan yang diberikan pada hewan coba setiap harinya menggunakan timbangan merk Sartorius meter (ketelitian 0.1 kg)
- 3) Data kadar LDL dalam serum sampel diukur setelah 8 minggu perlakuan serum darah sampel diperiksa menggunakan metode Cobas Mira dengan satuan mg/dl. Dimana hewan coba dibius dengan chloroform hingga mati/pingsan, kemudian dibedah dan diambil darahnya dari jantung.

4.8.3 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



#### 4.8.4 Analisis Data

Analisis data hasil penelitian menggunakan software SPSS 16 for windows dengan melakukan uji normalitas dan dilanjutkan dengan metode *One Way ANOVA*. Hasil yang ada akan menggambarkan ada tidaknya perbedaan yang bermakna. Jika ada perbedaan bermakna maka analisis data dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Turkey* untuk mengetahui perbedaan makna antara tiap kelompok perlakuan. Penelitian dianggap bermakna atau berbeda signifikan jika nilai  $p \text{ value} < \alpha$ , dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Apabila data yang dimasukkan ke dalam uji normalitas tidak normal walaupun data telah ditransformasi maka pengujian data menggunakan uji statistik non parametrik dengan *Kruskal-Wallis*.

