

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *true experimental design* dengan menggunakan jenis *Post Test Only Control Group Design*. Pemilihan kelompok hewan coba menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dari hewan coba yang memenuhi kriteria eksklusi dan inklusi. 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 3 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada objek 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 Novergicus Strain Wistar*. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Usia 8-12 minggu
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Berat badan 150 - 250 gram
- d. Tikus tidak cacat yang ditandai dengan anggota badan yang lengkap
- e. Tikus sehat
- f. Tidak mendapat pengobatan sebelumnya

4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang tidak mau makan selama penelitian berlangsung
- b. Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

4.3.3 Estimasi Jumlah Subjek Penelitian

Besar sampel berdasarkan ketentuan WHO rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut : (Hanifah, 2008)

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan hasil perhitungan diatas 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

4.4.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas adalah dosis bubuk tempe kacang tanah.

4.4.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

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

4.5 Lokasi Dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dan sampel darah tikus di laboratorium Parasitologi FKUB. Perhitungan kadar kolesterol total tikus dilakukan di laboratorium Kawi 31, Malang.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 2,5 bulan, yaitu dimulai sekitar awal bulan Januari 2013 sampai dengan pertengahan bulan Maret 2013.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Bahan pakan tikus berupa Diet normal (PARS, tepung terigu) dan Diet Aterogenik (PARS, tepung terigu, asam kolat, minyak babi, minyak kelapa, kuning telur bebek, lemak kambing)
- b. Bubuk tempe kacang tanah

4.6.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian adalah seperti berikut:

- a. Alat pemeliharaan binatang coba: kandang dari wadah plastik, penutup dari anyaman kawat, tempat pakan, dan botol air diletakkan ke kandang.
- b. Alat untuk pembuatan ransum tikus: timbangan, neraca analitik, waskom, pengaduk, gelas ukur, nampan, sarung tangan (hand glove).
- c. Alat untuk penimbangan pakan dan sisa pakan: sarung tangan (hand glove), timbangan 100 gram.
- d. Alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah: jarum suntik 10 ml dan spluit disposable, mikro pipet dan sentrifuge.
- e. Pemeriksaan Kolesterol Total: mesin Spektofotometri, cup dan rak reagen, cuvet disposable, yellow tips, cup dan rak reagen, mikropipet 500uL, mikropipet 1000uL, blue tips

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 50% PARS, 25% tepung terigu, 5% kuning telur bebek, 10% lemak kambing, 1% minyak kelapa, 0,13% asam kolat, 8,9% minyak babi.	Rasio
2.	Bubuk Tempe Kacang Tanah	Bubuk yang berasal dari tempe kacang tanah mentah yang diiris tipis. Dimasukkan ke dalam oven 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. Kacang tanah ini	Rasio

		berasal dari toko daerah Batu, yang penanamannya di daerah tersebut. Proses penepungan dilakukan di laboratorium Polinema. Pemberian bubuk secara sonde yang dilarutkan dengan air sebanyak 2 ml.	
3.	Kadar Kolesterol Total	Besarnya kadar kolesterol dalam satuan mg/dl yang diperoleh dari pengujian serum darah yang diambil dari jantung tikus dengan pengujian Cobas Mira.	Rasio

4.8 Prosedur Penelitian Dan Pengumpulan Data

4.8.1 Perhitungan Dosis

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; $\frac{1}{2}n$, n , $1\frac{1}{2}n$

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

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

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

4.8.2 Tahapan Pembuatan Tempe Kacang Tanah

Kacang tanah ini berasal dari toko daerah Batu, yang penanamannya di daerah tersebut. 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.

4.8.3 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 (± 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%

4.8.4 Prosedur Penelitian

4.8.4.1 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 07.00 sampai 16.00) 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 pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) selain pakan aterogenik, sedangkan kelompok kontrol negatif hanya menerima pakan standar dan kelompok kontrol positif menerima pakan aterogenik.

4.8.4.2 Perlakuan Hewan Coba Selama Penelitian

Setelah tikus dirandomisasi pada semua kelompok dilakukan pengukuran berat badan, yaitu: kelompok tikus kontrol negatif (P0), kelompok tikus kontrol positif (P1) dan perlakuan (P2, P3, P4). Kelompok negatif (P0) diberikan diet normal berupa komposisi comfeed PARS, tepung terigu dan air. Kelompok positif (P1) diberikan diet aterogenik dengan komposisi PARS, tepung terigu, kuning telur bebek, minyak babi, minyak kelapa, lemak kambing, asam kolat. Diet normal dan diet aterogenik serta minuman diberikan secara oral. Pada kelompok perlakuan (P2, P3, P4) diberikan diet aterogenik yang disertai pemberian

bubuk tempe kacang melalui sonde yang dilarutkan dengan air sebanyak 2 ml. Untuk kelompok kontrol negatif dan positif dilakukan sonde placebo sebanyak 2ml dengan menggunakan air untuk menyamakan tingkat stress akibat sonde pada semua kelompok perlakuan. Pemberian bubuk tempe kacang tanah sesuai dengan dosis yang telah ditentukan yaitu 50,4, 100,8, 151,2 mg/ hari/ ekor dengan memperhatikan kapasitas lambung tikus.

4.8.4.3 Pengambilan Sampel di Akhir Penelitian

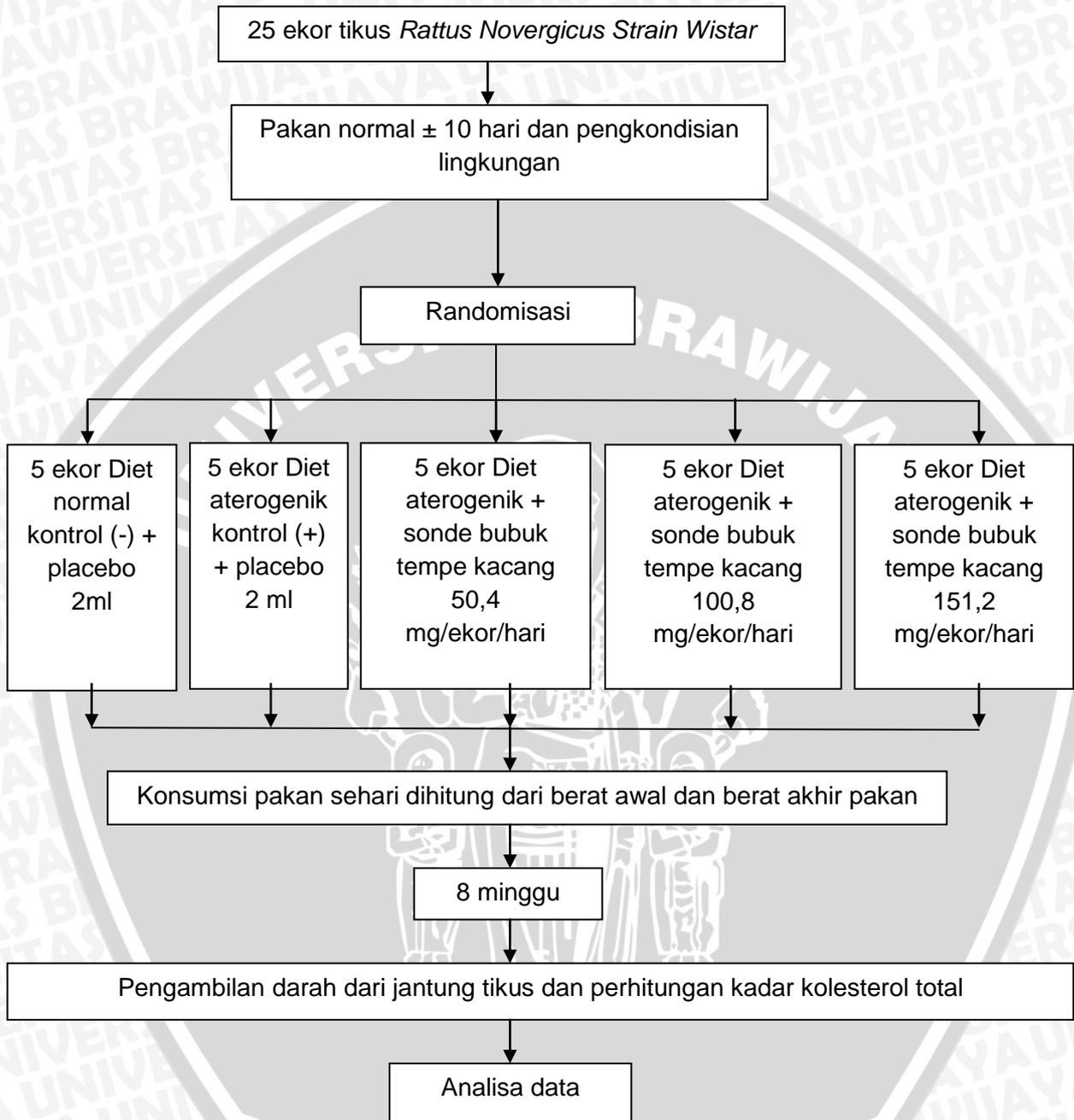
Pada minggu ke 8 tikus *dianestesi* berlebihan dengan menggunakan ether. Setelah hilang kesadaran, kemudian tikus dibedah menggunakan pisau bedah dan diambil darahnya. Pembedahan oleh tenaga profesional/berpengalaman untuk mengambil sampel darah dari jantung tikus. Darah diambil menggunakan *syringe* 5 ml sebanyak 3 ml. Tikus yang telah diambil darahnya tidak digunakan lagi karena telah dikorbankan. Kemudian dilakukan pemeriksaan lebih lanjut yaitu terhadap kadar kolesterol total. Bangkai tikus selanjutnya dipendam dalam tanah.

4.8.5 Prosedur Pemeriksaan dengan alat Cobas Mira

- 1) Menghidupkan alat dengan menghubungkan alat dengan *stop kontak*.
- 2) Menunggu \pm 15 menit hingga suhu di dalam alat mencapai 37°C.
- 3) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 4) Melakukan pencucian alat dengan cara tekan tombol INFO – tombol numerik 6 (*wash*) – tombol numerik 1 (*down*) dan tombol F1 (*start*).

- 5) Menunggu \pm 2 menit hingga dilakukan pencucian oleh alat sebanyak 3x.
- 6) Menekan F1 (*stop*) untuk menghentikan proses pencucian, tekan tombol STATUS untuk kembali ke menu awal.
- 7) Memasukkan reagen yang akan digunakan ke dalam *cup* reagen dan tempatkan di rak reagen yang sudah disediakan.
- 8) Memasukkan sampel (serum) ke dalam *cup* sampel dan letakkan di rak sampel sesuai nomor urut.
- 9) Meletakkan masing-masing rak ke tempat Cobas Mira yang telah tersedia.
- 10) Untuk pemeriksa sampel, tekan tombol ROUTINE – NO SAMPEL – ENTER.
- 11) Memasukkan KODE – ENTER.
- 12) Menekan tombol TEST/PARAMETER yang akan diperiksa (contoh : chol untuk pemeriksaan kolesterol), tekan ENTER – START.
- 13) menunggu hingga alat selesai memproses. Lihat hasil dengan cara menekan tombol INFO, numerik 2 (interm report).

4.8.6 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisa data hasil penelitian menggunakan bantuan software SPSS 16 for windows dengan uji normalitas, apabila datanya normal dilanjutkan metode *One Way ANOVA* yang digunakan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari 2 sampel berbeda secara signifikan.

Penelitian dianggap bermakna atau berbeda signifikan jika nilai p value $< \alpha$, dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Jika terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji Hock Tuckey untuk melihat antar kelompok mana saja yang berbeda makna.

Apabila dalam uji analisis data normalitas, data yang dihasilkan tidak normal walaupun sudah ditransformasi maka pengujian data dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* (metode non parametrik) yaitu pengujian 2 sampel atau lebih.

