

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental study* dengan hewan coba berupa tikus wistar. Menggunakan *Post Test-Only Control Group Design*, hal ini dikarenakan pengukuran variabel terikat yaitu trigliserida hanya memungkinkan dilakukan pada akhir penelitian karena perlu dilakukan pembedahan jantung untuk mengambil serum darah. Pemilihan subyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen (Adji, 2005).

Setelah hewan coba melalui proses adaptasi, dilakukan proses randomisasi, kemudian tikus dibagi 5 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol (kontrol positif dan negatif) dan 3 kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran intervensi yang diberikan pada masing-masing kelompok, kemudian hasil pengukuran dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil yang diteliti adalah perbedaan kadar trigliserida darah pada kelompok-kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.1.1 Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini kelompok perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (K-) : kelompok tikus yang hanya diberi pakan diet normal 40 gram/hari selama 8 minggu.

2. Kelompok kontrol positif (K+) : kelompok tikus yang hanya diberi pakan diet aterogenik 40 gram/hari selama 8 minggu.
3. Kelompok perlakuan (P1) : kelompok tikus yang diberi pakan diet aterogenik 40 gram/hari dan serbuk jamur tiram putih dosis I sebanyak 25 mg/hari selama 8 minggu.
4. Kelompok perlakuan (P2) : kelompok tikus yang diberi pakan diet aterogenik 40 gram/hari dan serbuk jamur tiram putih dosis II sebanyak 50 mg/hari selama 8 minggu.
5. Kelompok perlakuan (P3) : kelompok tikus yang diberi pakan diet aterogenik 40 gram/hari dan serbuk jamur tiram putih dosis III sebanyak 100 mg/hari selama 8 minggu.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Identifikasi Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berjenis kelamin jantan dan berusia 8-12 minggu, dengan kondisi umum sehat yang ditandai dengan gerakan aktif, bulu putih bersih dan mata jernih. Alasan digunakannya tikus putih berjenis kelamin jantan, agar dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus betina. Selain itu tikus jantan mempunyai kondisi biologis yang lebih stabil dibandingkan dengan tikus betina (Noor, 2010).

Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba tersebut dipelihara dalam kandang berupa kotak plastik 30 cm x 40 cm x 20 cm,

dengan setiap kandang berisi masing-masing 1 ekor tikus dan disimpan pada rak-rak yang tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar.
- b. Jenis kelamin jantan.
- c. Usia 8-12 minggu.
- d. Berat badan 100-250 gram.
- e. Dalam kondisi sehat, ditandai dengan gerakan aktif, bulu bersih dan baik, mata jernih (tidak cacat).
- f. Tidak mengalami pengobatan dan paparan sebelumnya.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus cacat (belang, lumpuh, anggota tubuh tidak lengkap).
- b. Sakit pada masa penelitian.
- c. Tikus tidak mau makan selama penelitian.
- d. Tikus mati pada masa penelitian

4.2.3 Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan jumlah sampel menurut Hanifah (2008), yaitu :

$$(t-1)(r-1) \geq 16$$

$$(5-1)(r-1) \geq 16$$

$$4(r-1) \geq 16$$

$$4r - 4 \geq 16$$

$$4r \geq 20$$

$$r \geq 5$$

Keterangan :

r = Jumlah minimal tikus

t = banyak perlakuan

Jadi jumlah tikus untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 5 ekor. Ada 5 kelompok perlakuan yang digunakan, jadi besar sampel keseluruhan adalah 25 ekor tikus. Untuk cara pengelompokan sampel atau teknik randomisasi dapat dilihat pada lampiran 1.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah dosis pemberian serbuk jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*), yang terdiri dari 3 dosis pemberian.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar trigliserida dalam darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

- Pembuatan serbuk jamur tiram putih dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

- b. Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- c. Pengukuran kadar trigliserida dilakukan di Laboratorium Klinik Kawi Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 3 tahap, yaitu tahap penyusunan proposal, tahap penelitian dan tahap penyusunan laporan. Tahap penyusunan proposal dimulai bulan Januari 2012 sampai dengan bulan September 2012. Tahap penelitian dimulai bulan Desember 2012 sampai bulan Februari 2012. Tahap penyusunan laporan dimulai bulan Februari 2012 sampai bulan Juni 2012.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Makanan Tikus

4.5.1.1 Diet Normal

Diet normal diberikan sebanyak 40 gram/hari dalam bentuk ransum dengan komposisi yang disajikan dalam tabel 4.1

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal

No.	Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
1	PARS	53%	21,2
2	Terigu	23,5%	9,4
3	Air	23,5%	9,4
Total		100	40

4.5.1.2 Diet Aterogenik

Diet aterogenik diberikan sebanyak 40 gram/hari dalam bentuk ransum dengan komposisi yang disajikan dalam tabel 4.2

Tabel 4.2 Komposisi Diet Aterogenik

No.	Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
1	Comfeed PARS	50	20
2	Tepung terigu	25	10
3	Kuning telur bebek	5	2
4	Lemak kambing	10	4
5	Minyak kelapa	1	0.4
6	Minyak babi	8.9	3.55
7	Asam kolat	0.1	0.05
Total		100	40

4.5.1.3 Serbuk Jamur Tiram Putih

Serbuk jamur tiram putih yang digunakan adalah serbuk yang berasal dari jamur tiram putih. Dosis serbuk jamur tiram yang digunakan berdasarkan konversi dari dosis lovastatin yang diberikan pada manusia yakni dengan dosis bertingkat 20 mg, 40 mg dan 80 mg untuk 50 kg berat badan manusia (Tjay dan Rahardja, 2007). Jika dikonversikan ke tikus dengan berat badan rata-rata 250 gram maka didapatkan dosis lovastatin adalah 0,1 mg, 0,2 mg dan 0,4 mg. Maka untuk kebutuhan serbuk jamur tiram putih yang diberikan adalah sebagai berikut :

- Dosis I : 25 mg/hari serbuk jamur tiram putih.
- Dosis II : 50 mg/hari serbuk jamur tiram putih.
- Dosis III :100 mg/hari serbuk jamur tiram putih.

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang yang terbuat dari kotak plastik.
- Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat.
- Tempat pakan.
- Botol air untuk minum.
- Rak untuk tempat menaruh kandang.
- Timbangan analitik.
- Alat untuk memantau keadaan tikus : form pemantauan harian untuk mencatat apabila ada sisa pakan tikus.

4.5.2.2 Alat Pembuatan Pakan Hewan Coba

- Sendok
- Timbangan analitik untuk mengukur kebutuhan serbuk jamur tiram putih dan pakan aterogenik
- Baskom plastik
- Pengaduk.

4.5.2.3 Alat Pembuatan Serbuk Jamur Tiram Putih

- Pisau
- Blender atau grinder
- Oven
- Penggiling
- Desikator

4.5.2.4 Alat Pemberian Serbuk Jamur Tiram Putih

Serbuk jamur tiram putih dicampur dengan air hingga didapatkan cairan campur sebanyak 3 ml, lalu diberikan pada tikus melalui spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde yang bisa melewati mulut, esophagus hingga lambung.

4.5.2.5 Alat Ukur Pengambilan dan Penyimpanan Sampel Darah Hewan

Coba

- a. Spet 10 ml
- b. Plastik
- c. Gunting atau seperangkat alat bedah

4.5.2.6 Alat Pengukuran Kadar Trigliserida

- a. Mesin Cobas Mira
- b. Cuvet disposable
- c. Cup dan rak reagen
- d. Cup dan rak sampel
- e. Mikro pipet 100 μ l
- f. Mikro pipet 500 μ l
- g. Mikro pipet 1000 μ l
- h. Yellow tip
- i. Blue tip



4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Serbuk Jamur Tiram Putih

Serbuk jamur tiram putih merupakan serbuk yang terbuat dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) yang digunakan sebagai pencegah peningkatan kadar trigliserida, dibuat dengan cara dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam lalu digiling sampai halus dengan grinder atau blender. Diberikan kepada tikus dengan cara serbuk jamur tiram putih dicampur dengan air hingga mencapai 3 ml cairan campur (serbuk jamur tiram putih dan air), lalu dimasukkan melalui sonde. Serbuk jamur tiram putih yang diberikan dengan dosis bertingkat yaitu dosis pertama 25 mg/hari, dosis kedua 50 mg/hari dan dosis ketiga 100 mg/hari.

4.6.2 Diet Aterogenik

Diet aterogenik merupakan diet yang diberikan pada tikus kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan, diet mengandung tinggi kolesterol dan lemak jenuh yang dapat meningkatkan asam lemak jenuh sehingga menyebabkan dislipidemia. Komposisi ransum diet aterogenik terdiri dari PARS 20 g (50%), tepung terigu 10 g (25%), kuning telur 2 g (5%), lemak kambing 4 g (10%), minyak kelapa 0,4 g (1%), minyak babi 3,55 g (8,9%) dan asam kolat 0,05 g (0,1%) (Muwarni, dkk. 2005). Alur pembuatan pakan diet aterogenik terdapat pada lampiran 2.

4.6.3 Diet Normal

Diet normal merupakan diet yang diberikan pada tikus kelompok kontrol negatif. Komposisi ransum diet normal terdiri dari PARS 21,2 g

(53%), tepung terigu 13,2 g (33%) dan air 5,4 ml (14%). Alur pembuatan pakan diet normal dapat dilihat pada lampiran 3.

4.6.4 Kadar Trigliserida Darah

Kadar trigliserida darah adalah kadar trigliserida darah tikus yang didapatkan dari hasil pemeriksaan. Trigliserida merupakan kandungan salah satu jenis lemak yang terdapat dalam darah yang berbentuk partikel lipoprotein (kilomokron, VLDL, LDL dan HDL). Trigliserida merupakan unsur yang dominan pada lipoprotein yang berupa kilomikron dan VLDL. Kadar trigliserida yang tinggi merupakan faktor resiko untuk terjadinya penyakit jantung koroner. Kadar trigliserida darah ini dapat diukur dengan menggunakan alat spektrofometer *Cobas mira* dengan menggunakan satuan milligram per desiliter (mg/dl).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Adaptasi Hewan Coba

Hewan coba atau tikus diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Hal ini dilakukan agar tikus menyesuaikan diri dan tidak stres, karena tikus yang stres akan berpengaruh pada asupan makan dan kesehatannya. Selama masa adaptasi, semua tikus diberi diet normal, karena belum dibagi dalam kelompok-kelompok perlakuan.

4.7.2 Prosedur Pengambilan Darah Sampel

Setelah diberi pakan selama 8 minggu, darah hewan coba tikus diambil dari jantung sebanyak ± 2 cc. Sebelumnya harus dilakukan pembedahan terlebih dahulu.

4.7.3 Prosedur Analisis atau Pengukuran Trigliserida

Setelah sampel darah tikus diambil, dianalisis dengan menggunakan spektrofometer *Cobas mira*, seperangkat alat *Cobas mira* sudah disebutkan diatas.

Prosedur penggunaan *Cobas mira* yaitu :

1. Tombol stop kontak ditekan untuk menghidupkan alat
2. Setelah itu ditunggu selama ± 15 menit hingga suhu dalam alat mencapai 37°C
3. Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan
4. Untuk mengoperasikan mesin lakukan langkah seperti berikut :

4.7.3.1 Pencucian alat

- Tombol INFO ditekan – setelah itu tombol numberik 6 (*wash*) – tombol numberik 1 (*down*) – dan tombol F1 (*start*)
- Proses ditunggu selama ± 2 menit hingga pencucian oleh alat sebanyak 3 kali
- Tombol F1 (*stop*) ditekan untuk menghentikan pencucian, atau tombol STATUS ditekan untuk kembali ke menu awal

4.7.3.2 Penggunaan alat

- Reagen yang digunakan dimasukkan kedalam *cup reagent* dan ditempatkan di rak reagen yang sudah disediakan sebelumnya
- Sampel (serum) dimasukkan kedalam *cup sampel* dan diletakkan di rak sampel sesuai dengan nomor urut
- Masing – masing rak diletakkan ketempat *cobas mira* yang telah tersedia
- Penggunaan alat dilakukan

4.7.3.3 Pemeriksaan sampel

- Tombol ROUTINE ditekan – setelah itu NO. SAMPEL – ENTER
- KODE/NAMA SAMPEL dimasukkan – setelah itu tombol ENTER ditekan
- Tombol TEST/PARAMETER ditekan sesuai bahan yang diperiksa (trigliserida), kemudian menekan ENTER – START
- Alat ditunggu hingga selesai memproses
- Hasil dilihat dengan cara menekan tombol INFO, numberik 2 (*intern report*)

Setelah selesai melakukan pemeriksaan, dilakukan pencucian alat seperti langkah pencucian alat

Catatan :

- Sebelum dilakukan pemeriksaan pasien, reagen harus di kontrol terlebih dahulu menggunakan serum kontrol yang telah diketahui nilai kontrolnya.
- Dilakukan kontrol reagen dengan perlakuan yang sama seperti melakukan pemeriksaan pasien.

Perawatan :

Untuk meminimalkan kesalahan pemeriksaan, hal yang harus dilakukan adalah:

1. Dilakukan kalibrasi alat secara rutin dan berkala 1 bulan sekali
2. Masa *expired* reagen yang digunakan harus dicatat dan dilihat sebelumnya, sebaiknya reagen habis terpakai tidak lebih dari 6 bulan setelah dibuka.

Pemeriksaan kadar trigliserida darah :

Pemeriksaan kadar trigliserida darah tikus yang sudah dilakukan pembedahan terlebih dahulu menggunakan Cobas mira. Pada pemeriksaan trigliserida dengan menggunakan spektrofometer dapat diketahui nilai kadar trigliserida serum dengan cara

$$\frac{A_x}{A_s} \times 200 = \text{mg/dl trigliserida}$$

Keterangan :

A_x = absorbansi sampel

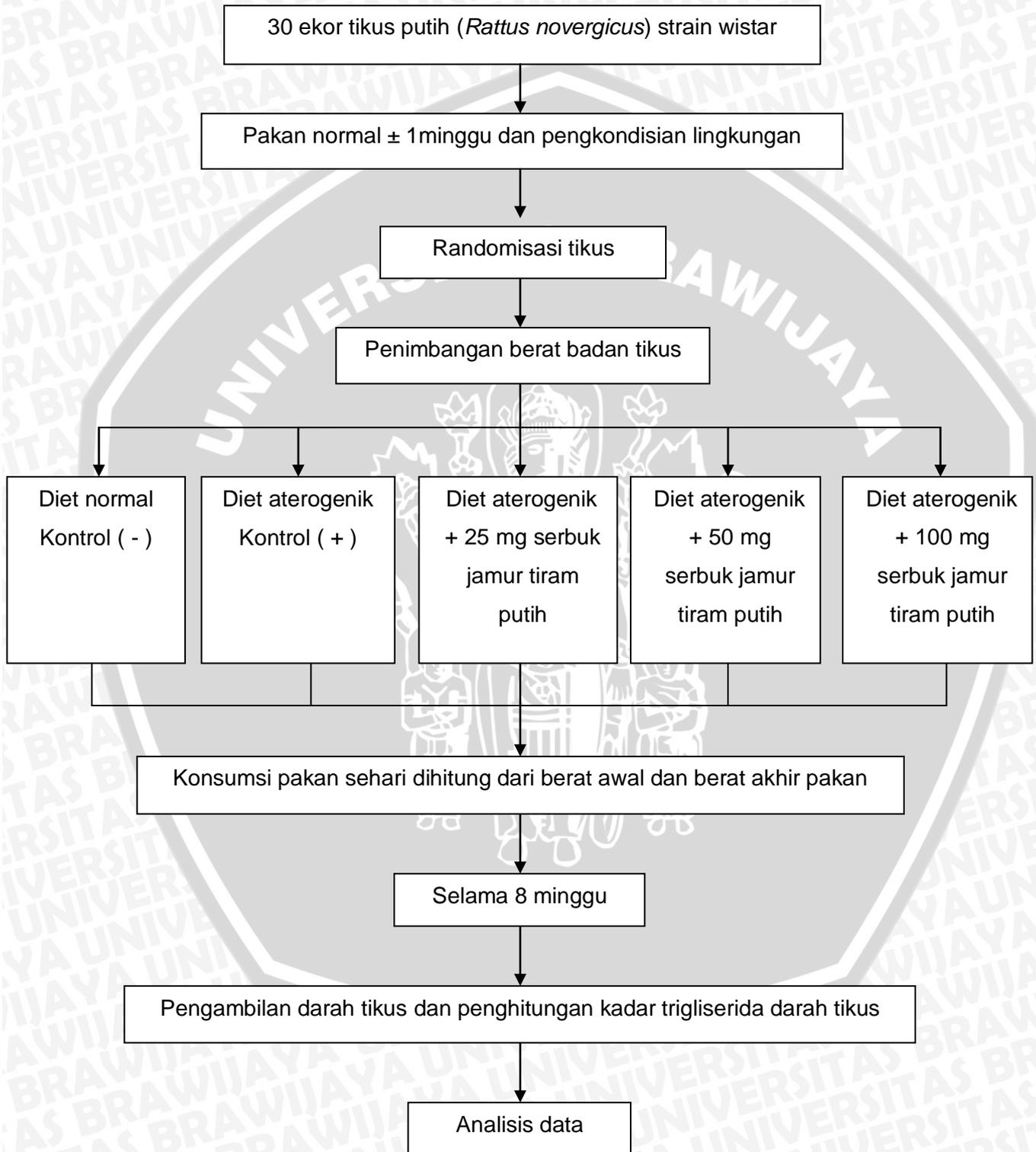
A_s = absorbansi standar

200 = faktor pengali (Saktiani, 2011)

UNIVERSITAS



4.7.4 Alur Kerja Penelitian



4.8 Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan pengambilan darah tikus dan penghitungan kadar trigliserida darah pada tikus. Data yang dikumpulkan adalah sebagai berikut :

1. Berat badan tikus yang diperoleh dengan penimbangan tikus setiap hari
2. Data asupan makanan perhari dihitung dari sisa makanan yang diberikan pada hewan coba setiap harinya
3. Kadar trigliserida darah tikus yang diperoleh dari pengambilan darah pada tikus pada akhir penelitian.

4.9 Analisis Data

Pada penelitian ini diperoleh data kuantitatif yang berupa hasil pengukuran kadar trigliserida, selanjutnya di analisis pada beberapa tahap yaitu :

1. Uji Homogenitas Varian

Bertujuan untuk mengetahui apakah uji berlaku atau tidaknya asumsi Anova yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika varian homogen maka analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA.

2. Uji *One Way ANOVA*

Digunakan untuk menguji apakah rata-rata kadar trigliserida kelompok-kelompok perlakuan berbeda secara signifikan atau tidak, yaitu dari kontrol negatif, kontrol positif, diet aterogenik + serbuk jamur tiram putih 25 mg/hari, diet aterogenik + serbuk jamur tiram putih 50 mg/hari dan diet aterogenik + serbuk jamur tiram putih 100 mg/hari. Dalam penggunaannya dibantu dengan SPSS 16 *for windows*. Penelitian

dianggap bermakna atau berbeda signifikan jika nilai p value $< \alpha$, dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

3. Analisis *Post Hoc* Test

Jika terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey* untuk melihat antar kelompok mana saja yang berbeda makna.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

