

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratoric* karena terdapat dua perlakuan pada hewan coba tikus serta menggunakan randomisasi untuk pemilihan kelompok perlakuan. Desain penelitian ini *randomized control group posttest design*. Hewan coba yang digunakan adalah *Rattus novergicus galur Wistar* jantan. Hewan coba dibagi atas 2 kelompok, yaitu:

Perlakuan 1 (P1) : diberi pakan diet normal standar PAR-S

Perlakuan 2 (P2) : diberi pakan diet normal standar AIN-93 M

4.2 Sampel

4.2.1 Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini, maka peneliti menggunakan rumus *Frederer*:

$$(n - 1) (t - 1) > 15$$

$$(n-1) (2-1) > 15$$

$$(n-1) > 15$$

$$n = 16,$$

Keterangan :

n : jumlah sampel

t : banyaknya perlakuan pada sampel

15: nilai deviasi atau konstanta

(Shaw *et al.*, 2002).

Dari perhitungan sampel di atas, jumlah sampel yang dibutuhkan tiap perlakuan adalah 16 sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini sejumlah 32 tikus.

4.2.2 Prosedur Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL), hal ini karena perlakuan yang diberikan kepada sampel sejak fase adaptasi adalah sama. Teknik randomisasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2.3 Kriteria Subjek

a. Kriteria inklusi

- 1) Tikus putih jenis *Rattus novergicus galur wistar* jantan usia 3 bulan.
- 2) Berat badan 177 – 230 gram
- 3) Anggota badan lengkap, gerak aktif, dan mata jernih
- 4) Warna bulu putih bersih
- 5) Tikus dalam kondisi sehat ditandai dengan nafsu makan baik.

b. Kriteria eksklusi

Mengalami kelainan anatomi

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian eksperimental adalah perlakuan, sehingga variabel bebas dalam penelitian ini adalah diet normal standar PAR-S (P1) dan pakan standar normal modifikasi AIN-93 M (P2).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung atau terikat dalam penelitian eksperimental merupakan respons subjek penelitian terhadap perlakuan yang diberikan. Kadar kolesterol total serum pada hewan coba merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

4.3.3 Variabel kendali

Variabel yang dikendalikan oleh peneliti adalah subjek penelitian berupa hewan coba tikus dalam keadaan homogen. Pengendalian yang dilakukan adalah dengan cara inklusi dan eksklusi, yaitu hewan coba yang memenuhi syarat dimasukkan (inklusi) dalam sampel penelitian, sedangkan yang tidak memenuhi syarat dikeluarkan (eksklusi) dari penelitian.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pangan dan Dietetik FK UB, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Pangan FTP UB dan Laboratorium Kawi 31 Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini berlangsung \pm 12 minggu mulai dari tanggal 20 Agustus sampai 01 Desember 2014. Jadwal penelitian dapat dilihat pada lampiran 3.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan tikus adalah: kandang pemeliharaan hewan coba, botol minum. Sedangkan bahan yang digunakan

untuk pemeliharaan tikus adalah: serutan kayu, diet normal standar PAR-S, dan standar AIN-93 M.

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Normal Standar PAR-S

Diet Normal standar PAR-S diberikan pada tikus wistar kelompok P1. Alat yang digunakan untuk membuat diet normal standar PAR-S adalah timbangan dan *mixer*. Untuk bahan yang diperlukan dapat dilihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal Standar PAR-S (per 100 gram)

Bahan	Jumlah	Nilai Gizi*
Comfeed PAR-S	66,67 g	Karbohidrat 75,10 %
Terigu	33,33 g	Protein 15,14 %
Air	90 ml	Lemak 4,78 %
		<i>Energy density</i> 2,33 kkal/gram pakan

*Zat gizi hasil uji proksimat di Laboratorium Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet normal standar AIN-93 M

Alat yang digunakan dalam pembuatan diet normal standar AIN-93M: timbangan, mangkok, baskom, gelas ukur, *mixer*, panci, kompor, sendok, spatula, loyang, plastik, *freezer*. Untuk komposisi diet g/kg yang dibutuhkan tanpa mengubah anjuran persen zat gizi makro per gram pakan seperti yang diuraikan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi Diet Standar Normal Modifikasi AIN-93 M (per 100 gram)

Bahan	Jumlah	Zat Gizi*
Tepung Jagung (g)	66	Karbohidrat 77,66 %
Sukrosa (g)	8	Protein 8,07 %
Minyak kedelai (g)	5	Lemak 11,21 %
Gelatin (g)	8	Serat 3,06 g
Kasein (g)	8	<i>Energy density</i> 3,35 kkal/gram pakan
Vitamin mix- AIN (g)	1,5	
Mineral mix-AIN (g)	3,5	
Terasi	secukupnya	
Air (ml)	25	

* Zat gizi hasil uji proksimat di Laboratorium Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Profil Lipid

- a. Alat yang digunakan untuk pengambilan darah dan pemisahan serum pada daerah ventrikel jantung kanan tikus wistar: *spluit* 5 ml, tabung *ependorf*, *tube*, *sentrifuge*, spektrofotometer, penjepit (*block holder*), *scapel*, gunting, pinset, sarung tangan, mikropipet, *blue tip* (Rufaida dkk., 2012). Bahan yang digunakan untuk *euthanasia* adalah campuran *ketamine* dan *xylazine* dengan dosis 5 mg/kg berat badan tikus (Reilly, 2005).
- b. Alat dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan kadar kolesterol total dengan metode CHOD-PAP adalah alat ukur DiaSys (*Diagnostic System*), dengan reagen larutan *buffer* pH 6,7 50 mmol/L, *Phenol* 5 mmol/L, *4-aminoantipyrin* 0,3 mmol/L, *Cholesterolesterase* (CHE) \geq 200 U/L, *Cholesteroloxidase* (CHO) \geq 50 U/L, *Peroxidase* (POD) \geq 3 KU/L (DiaSys, 2009).

4.5.5 Alat untuk Sanitasi dan Higienisasi

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

4.6 Definisi Operasional

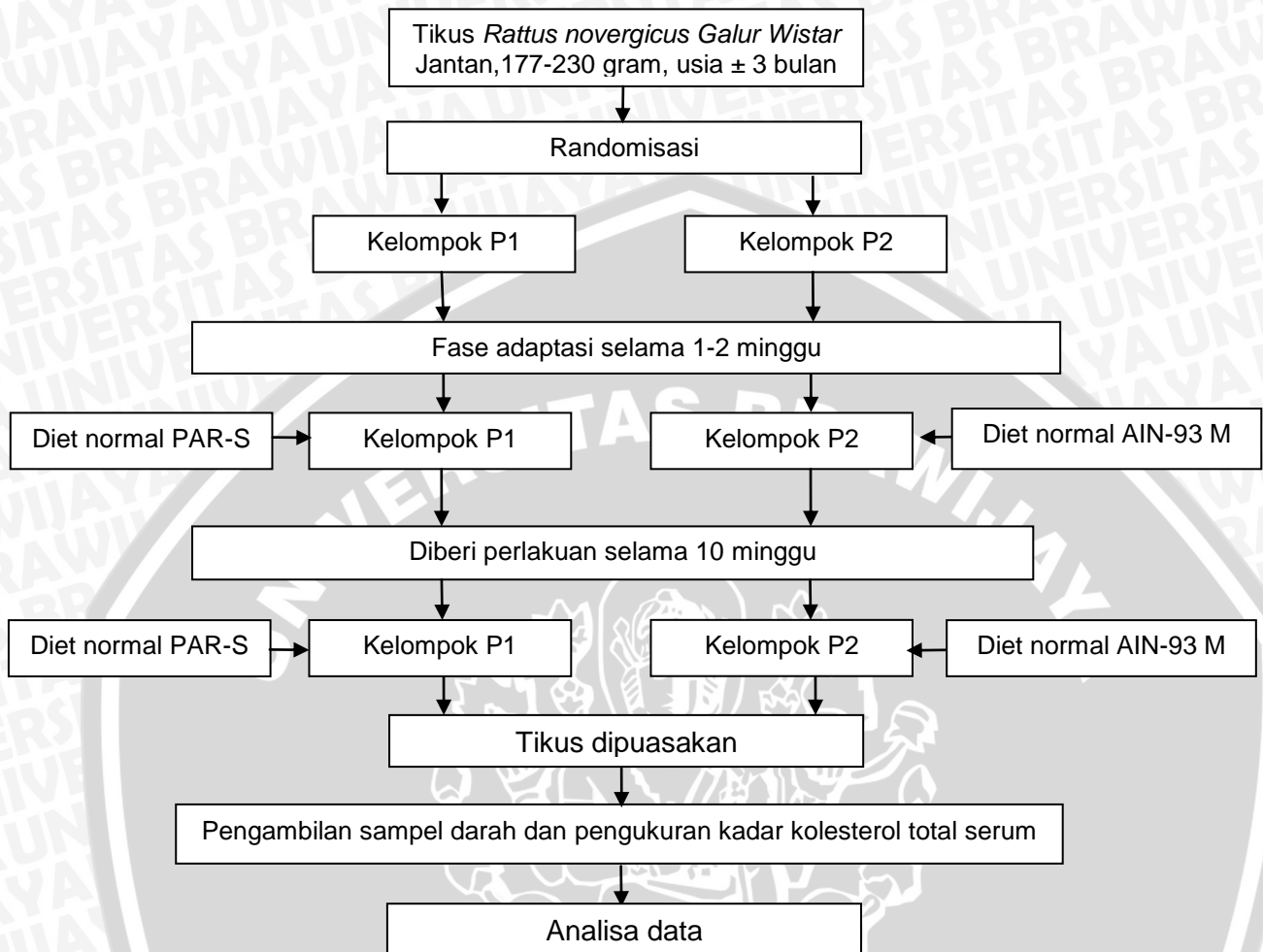
- 1) Diet normal standar PAR-S: diet yang diberikan kepada tikus percobaan dengan komposisi *comfeed* PAR-S (33,33%), tepung terigu (66,67%) dan air secukupnya. Diet diberikan per hari secara oral untuk kedua kelompok perlakuan P1 dan P2 selama 3 hari pertama tikus datang kemudian untuk kelompok P1 dilanjutkan adaptasi selama 1-2 minggu dan saat masa perlakuan selama 10 minggu

- 2) Diet normal standar AIN-93 M: diet yang diberikan kepada tikus kelompok P2 dengan komposisi tepung jagung, *sukrosa*, minyak kedelai, gelatin, kasein, maltodekstrin, *mineral mix-AIN*, *vitamin mix-AIN*, dan terasi. Diberikan pada saat adaptasi tanpa vitamin dan mineral selama 1-2 minggu dan dengan tambahan vitamin dan mineral saat masa perlakuan selama 10 minggu.
- 3) Asupan makanan: merupakan banyaknya asupan makanan tikus yang dihitung dari berat diet yang diberikan dikurangi berat sisa diet setelah 24 jam pemberian. Asupan makanan diukur dengan satuan ukur gram yang akan dikonversikan ke dalam kkal dan merupakan skala rasio.
- 4) Kolesterol total: kadar kolesterol total tikus diukur dari serum darah dengan menggunakan metode CHOD-PAP yang diterapkan di Laboratorium Kawi 31 Malang. Pengambilan darah tikus dari ventrikel kanan jantung sebanyak kurang lebih 3 ml. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan ukur mg/dL dan merupakan skala interval.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Langkah-langkah dalam Pelaksanaan Penelitian

Langkah-langkah proses pelaksanaan penelitian diuraikan seperti pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Alur penelitian

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, serpihan kayu, botol minum, diet normal standar PAR-S atau standar AIN-93 M, hewan uji tikus *Rattus norvegicus* jantan yang berumur \pm 3 bulan, Berat 177-230 gram, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin).

4.7.3 Proses Pembuatan Diet Normal Standar PAR-S

Pakan yang diberikan pada kelompok P1 yaitu dalam terdiri dari *comfeed* PAR-S 66,67 gram, tepung terigu 33,33 gram, air 90 ml. Kandungan zat gizi dari diet normal standar PAR-S yaitu: karbohidrat 75,10%, protein 15,14%, lemak

4,78% dan energi sebesar 2,33 kkal/gram pakan. Prosedur pembuatan diet normal standar PAR-S adalah: (1) semua bahan ditimbang meliputi *comfeed* PAR-S, tepung terigu dan air, (2) semua bahan dicampur dan diaduk rata, (4) bahan yang sudah tercampur dibentuk menjadi bulatan, (5) keseluruhan pakan ditimbang, (6) pakan untuk tiap ekor tikus ditimbang, (6) pakan siap diberikan pada tikus.

4.7.4 Proses Pembuatan Diet Normal Standar AIN-93 M

Komposisi yang ada dalam 100 gram pakan diet normal standar AIN-93 M memiliki kandungan zat gizi sebesar 77,66% karbohidrat, 8,07% lemak, 11,21% protein, dan total energi density 3,35 kkal/g serta air 25 ml. Prosedur pembuatan diet standar AIN-93 M adalah: (1) tepung jagung, kasein, sukrosa (gula bubuk) dan vitamin mineral serta sedikit terasi bubuk dimasukkan ke dalam baskom dan dicampur hingga rata, (2) 10 tetes pewarna dan air panas 50 ml dicampur hingga rata kemudian dimasukkan ke campuran bahan, (3) minyak soybean ditambahkan ke campuran bahan (tahap 2 dan 3 dilakukan bersama), (4) campuran bahan diaduk rata, (5) gelatin dan air 130 ml dicampur kemudian ditambahkan 70 ml air panas dan dimasak hingga warna gelatin bening, (6) cairan gelatin dimasukkan ke dalam campuran bahan dalam mangkok kemudian dimixer hingga rata, (7) adonan diuleni hingga kalis kemudian dipotong dan diberikan kepada tikus.

4.7.5 Pengumpulan Data

- a. Data asupan (*intake*) makanan diperoleh dengan mengurangi hasil penimbangan berat diet yang diberikan secara *ad libitum* dengan hasil penimbangan berat sisa diet setelah 24 jam pemberian. Data dalam satuan gram dan dikonversikan ke dalam satuan kkal.

- b. Data kolesterol total diperoleh melalui pengambilan darah sebanyak 3 ml yang diambil melalui ventrikel kanan jantung kemudian di-sentrifuse untuk diambil serumnya.

4.7.6 Pengambilan Sampel Darah dan Pembuatan Serum

Tikus dipuasakan dahulu sebelum pengambilan sampel darah. Proses pengambilan sampel darah tikus diawali dengan melakukan *euthanasia* dengan menggunakan campuran *ketamine* dan *xylazine* dengan dosis 5 mg/kg berat badan tikus (Reilly, 2005). Berdasarkan rekomendasi dari dokter hewan, penggunaan ketamin secara tunggal tidak terlalu efektif. Selain itu, berdasarkan Reilly (2005), metode *euthanasia* campuran ketamin dan xylazine efektif digunakan pada hewan coba tikus melalui injeksi subkutan atau intramuskular. Setelah lemas, tikus dibedah kemudian darah diambil kurang lebih 3 ml kemudian darah ditampung dalam tabung *ependorf*. Kemudian tabung dibiarkan selama kurang lebih tiga jam dalam posisi miring agar banyak serum yang terbentuk. Setelah itu darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm dengan waktu 15 menit. Serum diambil dan disimpan dalam pendingin (Riesanti *et al.*, 2012).

4.7.7 Uji Kadar Kolesterol Total dengan Menggunakan CHOD-PAP

Pengujian kadar kolesterol total menggunakan prinsip CHOD-PAP. Prinsip tersebut merupakan penentuan kadar kolesterol total menggunakan enzimatis hidrolisis dan oksidasi. Sebagai indikatornya adalah dengan terbentuknya *quinoneimine* dari reaksi hidrogenperoksida + 4 aminoantipirin dan fenol yang dikatalisis oleh peroksida.

Untuk menentukan kadar kolesterol total :

Panjang gelombang 500 nm, Hg 546 nm

Optical path 1 cm
 Temperatur 20-25 °C atau 37 °C

Tabel 4.3 Larutan Standar/Blanko

	Standar	Sampel
Supernatan	-	10 µL
Standar	10 µL	-
Pereaksi	1000 µL	1000 µL

(Sumber: DiaSys, 2009)

Campur reagen dan serum kemudian diamkan atau inkubasi pada suhu 20 – 25 °C selama 20 menit, atau pada suhu 37 °C selama 10 menit. Absorbsinya diukur pada spektrofotometer dengan λ 500 nm atau Hg 546 nm dengan larutan blanko sebagai titik nol nya.

Perhitungan :

$$Cholesterol \left(\frac{mg}{dL} \right) = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Standard}} \times Conc. \text{ Standard} \left(\frac{mg}{dL} \right)$$

Keterangan:

A Sampel = Absorpsi sampel

A Standard = Absorpsi standar

Conc. Standard = konsentrasi dari total kolesterol didalam larutan standar kolesterol

Faktor konversi:

$$Cholesterol [mg / dL] \times 0,02586 = Cholesterol [mmol / L] \text{ (DiaSys, 2009).}$$

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran kadar kolesterol total dari kedua kelompok perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 (p=0,05) dan derajat kepercayaan 95% (α=0,05). Data berat badan tikus dianalisis menggunakan uji homogenitas varian untuk

mengetahui data berat badan homogen dan menentukan tikus masuk dalam kriteria inklusi. Data yang diperoleh mengenai kadar kolesterol total antara 2 kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji normalitas data (*saphiro wilks*), dan selanjutnya bila berupa data parametrik maka dilakukan uji *independent T-test*. Sedangkan bila data, berupa data non parametrik maka dilakukan uji *Mann Whitney*.

