

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian true experimental laboratorik pada tikus wistar dengan menggunakan desain *randomize post test only control group*.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus galur wistar*. Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang sehat. Tikus diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sampel yang diambil adalah tikus putih (*Rattus norvegicus galur wistar*) yang memenuhi kriteria Inklusi dan Eksklusi.

4.2.1 Kriteria Inklusi:

Kriteria inklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut:

- a. Tikus (*Rattus norvegicus strain wistar*) jantan.
- b. Tikus dengan bulu rata berwarna putih, sehat, mata jernih, bergerak aktif dan tingkah laku normal.
- c. Usia tikus 6-8 minggu.
- d. Berat badan tikus rata-rata 140-200 gram.

4.2.2 Kriteria Eksklusi:

Kriteria eksklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut:

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan.
- b. Tikus yang kondisi fisiknya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

4.2.3 Jumlah Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan sampel menggunakan rumus Hulley (Notoadmojo, 2010) adalah sebagai berikut:

$$p(n-1) = 15$$

p : Jumlah perlakuan, n : Jumlah pengulangan

Pada penelitian ini p = 5 sehingga pengulangan adalah:

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n = 4$$

untuk setiap perlakuan diberikan penambahan satu kali pengulangan sebagai cadangan sehingga total sampel yang dibutuhkan sejumlah 25 ekor tikus dengan rincian 5 ekor atau 5 pengulangan. Sebelum pengelompokan dilakukan aklimatisasi 7 hari.

Penelitian ini membagi sampel dalam 5 kelompok perlakuan yaitu:

- a. Kelompok kontrol negatif (K(-)): kelompok normal tanpa diberi susu kedelai.
- b. Kelompok kontrol positif (K(+)): kelompok dengan diet tinggi lemak tanpa diberi susu kedelai.
- c. Kelompok kontrol Dosis 1 (P2): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 0,81 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.

- d. Kelompok kontrol Dosis 2 (P3): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 1,62 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.
- e. Kelompok kontrol Dosis 3 (P4): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 3,24 gram/ml/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.

4.3 Variabel penelitian

4.3.1 Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus galur wistar*).

4.3.2 Variabel Bebas (*independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian susu kedelai (*Gycine max*). Dosis yang diberikan 0,81 Kg/BB dalam 3 ml aquadest, 1,62 Kg/BB dalam 3 ml aquadest & 3,24 Kg/BB dalam 3 ml aquadest.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Jenis tikus
- b. Usia tikus
- c. Jenis kelamin tikus
- d. Berat badan tikus
- e. Pemberian diet tinggi lemak
- f. Kondisi lingkungan kandang

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pemeliharaan hewan coba adalah Laboratorium Fisiologi Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeriksaan dan perhitungan kadar kolesterol total dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan dalam jangka waktu 90 hari yaitu pada bulan September-November 2014.

4.5 Alat dan Bahan

a. Perawatan tikus

Alat : Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat, botol air, sekam, timbangan berat badan, dan rak tempat meletakkan kandang.

Bahan : -

b. Alat pembuatan pakan tikus

Alat : Timbangan, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggilingan pakan, dan nampan.

Bahan : Diet normal = PARS, tepung terigu, air. Diet tinggi lemak = PARS, tepung terigu, kuning telur bebek, minyak kelapa, lemak kambing, minyak babi, asam cholat dan air.

c. Alat pembuatan susu kedelai

Alat : Gelas ukur, timbangan, corong gelas, kertas saring, labu penampung, dan sonde ukuran 5 ml yang diberi selang kecil.

Bahan : Kedelai bubuk dan air.

d. Alat pengambilan sampel darah

Alat : Lanset

Bahan : *alcohol swab*

e. Alat pemeriksaan kadar kolesterol total

Alat : Easy Touch Glucose Cholesterol Uric Acid (ET-GCU)

Bahan : Sampel darah



4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Skala ukur	Skor
Diet normal	Pemberian pakan diet normal tikus dengan total energi 105 kalori terdiri dari PARS, terigu dan air	Timbangan	Rasio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pars: 21,2 gram 2. Terigu: 9,4 gram 3. Air: 9,4 ml
Diet Tinggi Lemak	Pemberian pakan diet dengan kadar lemak tinggi yang diberikan dengan total energi 105 kalori, komposisi diet tinggi lemak terdiri dari pakan standart (pakan ayam/PARS) dan tepung terigu) ditambah kolesterol, asam kolat, dan minyak babi (Mawarti, 2011). Pada kolesterol dimodifikasi dengan pemberian kuning telur bebek, lemak kambing, dan minyak kelapa yang terbukti dapat meningkatkan kadar lemak	Timbangan	Rasio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Confeed Pars: 20 gr 2. Tepung terigu: 10 gr 3. Kuning telur bebek 2 gr 4. Lemak kambing: 4 gr 5. Minyak kelapa 0,4 gr 6. Minyak babi : 3,55 gr 7. Asam kolat: 0,05 gr
Susu Kedelai	Hasil pengenceran bubuk kedelai dengan air (aquadest) sesuai dengan dosis yang ditentukan.	Timbangan	Rasio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dosis 1: 0,81 gram 2. Dosis 2: 1,62 gr 3. Dosis 3: 3,24 gr

Kadar kolesterol total	Pengukuran kadar kolesterol total dilakukan setelah hari ke 60, 75, 90 baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Pemeriksaan dengan cara: Darah tikus diperoleh dari ujung ekor, pengambilan darah memakai lanset, setelah darah keluar kemudian dimasukkan dalam strip kolesterol yang telah dipasang pada alat Easy Touch Glucose Cholesterol Uric Acid kemudian tunggu selama 150 detik, selanjutnya hasil kadar kolesterol akan keluar pada layar Easy Touch Glucose Cholesterol Uric Acid (mg/dl).	Rasio	Normal: <200 mg/dl	
Hewan Coba	Hewan coba adalah tikus putih (<i>Rattus novergicus galur wistar</i>) jantan, bulu rata, berwarna putih, mata jernih, sehat, bergerak aktif, tingkah laku normal, usia 6-8 minggu dengan berat rata-rata 150 gram.	Timbangan	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok 1: diet normal 2. Kelompok 2: diet tinggi lemak tanpa susu kedelai 3. Kelompok 3: diet tinggi lemak dengan susu kedelai dosis 1 4. Kelompok 4: diet tinggi lemak dengan susu kedelai dosis 2 5. Kelompok 5: diet tinggi lemak dengan susu kedelai dosis 3



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Diet Normal

Komposisi diet normal yang terdiri dari PARS dan tepung terigu, komposisi diet dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Komposisi diet normal (40 gram/hari/ekor)

Komposisi	(%)	Jumlah
PARS	53%	21,2 gram
Terigu	23,5%	9,4 gram
Air	23,%	9,4 gram

Sumber: Amijaya (2013)

Tabel 4.2 Kandungan Zat Gizi Diet Normal (40 gram/hari/ekor)

Zat Gizi	PARS (21,2 gram)	Tepung terigu "Segitiga Biru" (9,4 gram)	Jumlah Zat Gizi
Energi	$(21,2 : 100) \times 344 = 72,93$ kkal	$(9,4 : 100) \times 340 = 31,96$ kkal	104,9 kalori
Protein	$(21,2 : 100) \times 19 = 0,85$ gram	$(9,4 : 100) \times 11 = 1,03$ gram	5,06 gram
Lemak	$(21,2 : 100) \times 4 = 0,85$ gram	$(9,4 : 100) \times 0,9 = 0,08$ gram	0,93 gram
Karbohidrat	$(21,2 : 100) \times 58 = 12,29$ gram	$(9,4 : 100) \times 72 = 6,77$ gram	72,68 gram

4.7.2 Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Komposisi diet tinggi lemak yang terdiri dari PARS, tepung terigu, kuning telur bebek, lemak kambing, minyak kelapa, minyak babi dan asam kolat komposisi diet dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Komposisi Pakan Tikus Diet Tinggi Lemak

Bahan	(%)	Berat (gram)
PARS	50	20
Tepung terigu	25	10
Kuning telur bebek	5	2
Lemak Kambing	10	4
Minyak Kelapa	1	0,4
Minyak babi	8,9	3,55
Asam kolat	0,1	0,05
Total	100	40

Sumber: Amijaya (2013)

Tabel 4.4 Bahan dan Kandungan Gizi Pakan Diet Tinggi Lemak

Pars (20 gram)	$\text{Energi} = (20 : 100) \times 3,44 = 68,8 \text{ kkal}$ $\text{Protein} = (20 : 100) \times 19 = 3,8 \text{ gram}$ $\text{Lemak} = (20 : 100) \times 4 = 0,8 \text{ gram}$ $\text{Karbohidrat} = (20 : 100) \times 58 = 11,6 \text{ gram}$
Tepung terigu "Segitiga Biru" (10gram)	$\text{Energi} = (10 : 100) \times 340 = 34 \text{ kkal}$ $\text{Protein} = (10 : 100) \times 11 = 1,1 \text{ gram}$ $\text{Lemak} = (10 : 100) \times 0,9 = 0,09 \text{ gram}$ $\text{Karbohidrat} = (10 : 100) \times 72 = 7,2 \text{ gram}$
Kuning telur bebek (2 gram)	$\text{Energi} = (2 : 100) \times 398 = 7,96 \text{ kkal}$ $\text{Protein} = (2 : 100) \times 17 = 0,34 \text{ gram}$ $\text{Lemak} = (2 : 100) \times 35 = 0,7 \text{ gram}$ $\text{Karbohidrat} = (2 : 100) \times 0,8 = 0,016 \text{ gram}$
Lemak kambing (4 gram)	$\text{Energi: } 4 \times 9 = 36 \text{ kkal}$
Minyak Kelapa (0,4 gram)	$\text{Energi: } 0,4 \times 9 = 3,6$
Minyak Babi (3,55 gram)	$\text{Energi: } 3,55 \times 9 = 31,95$
Asam Kolat (0,05 gram)	$\text{Energi} = 0,05 \times 9 = 0,45$

Tabel 4.5 Kandungan Zat Gizi Diet Tinggi Lemak (40 gram/hari/ekor)

Zat Gizi	Perhitungan	Jumlah Zat Gizi
Energi	$68,8 + 34 + 7,96 + 36 + 31,95 + 0,45$	182,76 kalori
Protein	$3,8 + 1,1 + 0,34$	5,24 gram
Lemak	$0,8 + 0,09 + 0,07$	1,59 gram
Karbohidrat	$11,6 + 7,2 + 0,016$	18,816 gram

4.7.3 Pembuatan Susu Kedelai

Pembuatan susu kedelai dengan melarutkan kedelai bubuk ke dalam aquadest sesuai dosis yang telah ditentukan, perhitungannya adalah sebagai berikut:

a. Dosis 1

Dosis pada manusia 45 gram/hari

$45 \text{ gram} \times 0,018 = 0,81 \text{ gram.ml/tikus}$ dalam 3 ml aquadest

b. Dosis 2

Dosis pada manusia 90 gram/hari

$90 \times 0,018 = 1,62 \text{ gram/ml/tikus/hari}$ dalam 3 ml aquadest

c. Dosis 3

Dosis pada manusia 180 gram/hari

$180 \times 0,018 = 3,24 \text{ gram/ml/hari}$ dalam 3 ml aquadest

(Prihandini, 2006)

4.7.4 Perlakuan terhadap tikus

- a. Hewan coba tikus jantan sesuai kriteria inklusi sebanyak 25 ekor tikus, dibagi menjadi 5 kelompok dengan metode rancangan acak lengkap, dengan 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok.
- b. Tikus diletakkan dalam kandang terpisah (1 ekor perkandang)
- c. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari, dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan.
- d. Selama aklimatisasi, tikus diberi diet standar (diet normal) dan minuman.
- e. Sebelum pemberian diet tinggi lemak, semua tikus ditimbang berat badannya.
- f. Tikus kelompok kontrol negatif diberi diet normal
- g. Tikus kelompok perlakuan kontrol positif (K+) diberi diet tinggi lemak tanpa susu kedelai.
- h. Semua tikus kelompok perlakuan (P1, P2, P3) diberi diet tinggi lemak dan susu kedelai sesuai dosis masing-masing 0,81 Kg/BB dalam 3 ml aquadest, 1,62 Kg/BB dalam 3 ml aquadest & 3,24 Kg/BB dalam 3 ml aquadest dengan cara peroral dengan menggunakan sonde bersamaan dengan pemberian diet tinggi lemak.
- i. Setiap hari pakan tikus yang diberikan ditimbang. Keesokan harinya sisa pakan yang ada ditimbang kembali untuk mengetahui asupan pakan tikus.

- j. Tikus ditimbang setiap minggu sekali untuk mengetahui perkembangan berat badan tikus.
- k. Perlakuan tikus dilakukan secara bersamaan selama 90 hari.
- l. Pengukuran kadar kolesterol total dilakukan setelah masa perlakuan hari ke-60 karena menurut Murwani (2006) pada hari ke-60 sudah terjadi peningkatan kadar kolesterol, kemudian dilakukan pengukuran pada hari ke-75 dan hari ke-90 untuk mengetahui progresifitas kadar kolesterol baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, pada hari ke 90 tikus dipuasakan agar hasil pemeriksaan kadar kolesterol tidak terpengaruhi oleh asupan makanan yang baru dikonsumsi. Analisis terhadap kadar kolesterol total dilakukan dengan cara sebagai berikut: darah tikus diperoleh dari ekor, pengambilan darah memakai lanset, setelah darah keluar kemudian dimasukkan dalam strip kolesterol yang telah dipasang pada kit kolesterol ET-GCU, kemudian tunggu selama 150 detik, selanjutnya hasil kadar kolesterol akan keluar pada layar ET-GCU.

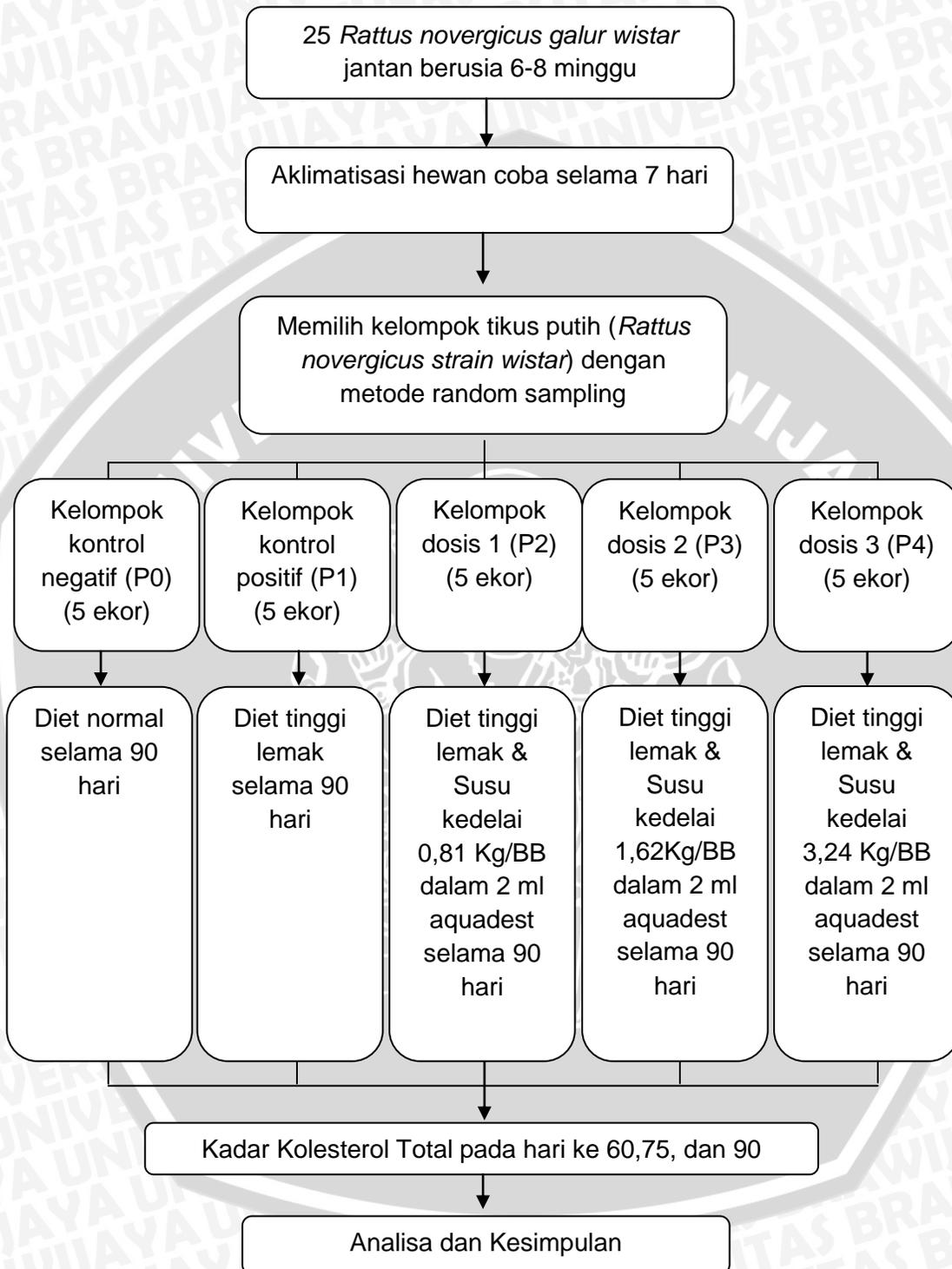
4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah hari ke-60, 75, dan 90 hari penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengukuran kadar kolesterol total pada tikus putih jenis (*Rattus norvegicus strain wistar*). Untuk mengetahui perbedaan rata-rata kolesterol total antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *Oneway Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$

dan hipotesis yang menyatakan bahwa susu kedelai (*Glycine max*) menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus galur wistar*) yang diberi diet tinggi lemak terbukti. Namun, apabila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak. H_0 pada penelitian ini adalah tidak ada beda kadar kolesterol total antar kelompok kontrol dan perlakuan, H_1 pada penelitian ini adalah terdapat beda kolesterol total antar kelompok kontrol dan perlakuan.

Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software product and service solution 20 PS* (SPSS 20 PS), dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).





Gambar 4.1 Alur Penelitian