

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian experimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group design*.

#### 4.2 Sampel

Sampel 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 yang kemudian dipelihara di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus galur Wistar* yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

- a. Tikus *Rattus norvegicus galur 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 150 gram

##### 4.2.1 Jumlah Sampel

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

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

p : Jumlah perlakuan, n : Jumlah pengulangan

Pada penelitian ini p = 5 sehingga pengulangan adalah:

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n = 4$$

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 2 minggu.

Penelitian ini membagi sampel dalam 5 kelompok perlakuan yaitu:

- Kelompok kontrol negatif K (-): kelompok normal tanpa diberi susu kedelai.
- Kelompok kontrol positif K (+): kelompok dengan diet tinggi lemak tanpa diberi susu kedelai.
- Kelompok Dosis 1 (P1): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 0,81 gram/ml/tikus/hari.
- Kelompok Dosis 2 (P2): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 1,62 gram/ml/tikus/hari.
- Kelompok Dosis 3 (P3): kelompok dengan diet tinggi lemak yang diberi susu kedelai 3,24 gram/ml/tikus/hari.

### 4.3 Variabel penelitian

#### 4.3.1 Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah agregasi trombosit dan jumlah trombosit pada tikus putih (*Rattus norvegicus galur Wistar*).

#### 4.3.2 Variabel Bebas (*independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian susu kedelai (*Glycine max*). Dosis yang diberikan 0,81 gram/ml/tikus/hari, 1,62 gram/ml/tikus/hari & 3,24 gram/ml/tikus/hari.

#### 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. Pengukuran jumlah trombosit dilakukan di Rumah Sakit Syaiful Anwar serta perhitungan agregasi trombosit 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. 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. 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. Pengambilan sample darah

Alat : Skalpel dan jarum 21G (agregasi trombosit) dan *Spuut disposable* dan vacotainer EDTA.

Bahan : -

e. Pembuatan dan pewarnaan hapusan darah tepi

Alat : *Glass slide*, pengering/*dryer*.

Bahan : Larutan wright dan larutan penyangga/*buffer*.

f. Hitung agregasi trombosit

Alat: Mikroskop, *glass slide*, *glass cover*

g. Hitung jumlah trombosit

Alat: XN 1000

#### 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala	Satuan
Susu kedelai	Hasil pengenceran bubuk kedelai dengan air (aquadest) sesuai dengan dosis (Prihandini, 2006).	Rasio	Gram/ml
Jumlah Trombosit	Suatu vesikel yang mengandung sebagian dari sitoplasma megakariosit yang terbungkus oleh membran plasma. Berupa fragmen-fragmen sel granular (berdiameter sekitar 2-4 $\mu\text{m}$ ), berbentuk cakram, tidak berinti, namun dilengkapi oleh organel dan sistem enzim sitosol (Catherine MB, 2005).	Rasio	$\mu\text{l}$
Agregasi Trombosit	Karakteristik dari trombosit untuk bergabung satu sama lain untuk membentuk sekumpulan trombosit (Furie, 2008).	Rasio	%

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Pembuatan Diet Normal

Pembuatan diet normal dilakukan setiap hari dengan ketentuan total energy 105 kalori. Komposisinya adalah sebagai berikut (Murwani, 2006):

**Tabel 4.2 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

**Tabel 4.3 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	
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

Jumlah energi dalam 1 gram pakan :  $104,9 \text{ kkal} : 40 \text{ gram} = 2,62 \text{ kkal}$

Kebutuhan energi tikus perhari : 105 kkal / hari

Jumlah pakan tikus perhari :  $105 \text{ kkal} : 2,62 \text{ kal} = 40 \text{ gram}$

#### 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 (Muwarni, 2006) komposisi diet dapat dilihat pada Tabel 4.4.

**Tabel 4.4 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
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>40</b>

**Tabel 4.5 Bahan dan Kandungan Gizi Pakan Diet Tinggi Lemak**

<b>Pars (20 gram)</b>	Energi = $(20 : 100) \times 3,44 = 68,8$ kkal Protein = $(20 : 100) \times 19 = 3,8$ gram Lemak = $(20 : 100) \times 4 = 0,8$ gram Karbohidrat = $(20 : 100) \times 58 = 11,6$ gram
<b>Tepung terigu "Segitiga Biru" (10gram)</b>	Energi = $(10 : 100) \times 340 = 34$ kkal Protein = $(10 : 100) \times 11 = 1,1$ gram Lemak = $(10 : 100) \times 0,9 = 0,09$ gram Karbohidrat = $(10 : 100) \times 72 = 7,2$ gram
<b>Kuning telur bebek (2 gram)</b>	Energi = $(2 : 100) \times 398 = 7,96$ kkal Protein = $(2 : 100) \times 17 = 0,34$ gram Lemak = $(2 : 100) \times 35 = 0,7$ gram Karbohidrat = $(2 : 100) \times 0,8 = 0,016$ gram
<b>Lemak kambing (4 gram)</b>	Energi: $4 \times 9 = 36$ kkal
<b>Minyak Kelapa (0,4 gram)</b>	Energi: $0,4 \times 9 = 3,6$

<b>Minyak Babi (3,55 gram)</b>	Energi: $3,55 \times 9 = 31,95$
<b>Asam Kolat (0,05 gram)</b>	Energi = $0,05 \times 9 = 0,45$

**Tabel 4.6 Kandungan Zat Gizi Diet Tinggi Lemak (40 gram/hari/ekor)**

Zat Gizi	Perhitungan	Kalori	%
<b>Energi</b>	$68,8 + 34 + 7,96 + 36 + 31,95 + 0,45 = 182,76$ kkal	<b>182,76 kkal</b>	-
Protein	$3,8 + 1,1 + 0,34 = 5,24$	20,96 kkal	11,5 %
Lemak	$0,8 + 0,09 + 0,07 = 1,59$	86,31 kkal	47,2 %
Lemak Murni	$14,31 \text{ kkal} + 36 + 3,6 + 31,95 + 0,45 = 86,31$ kkal		
Karbohidrat	$11,6 + 7,2 + 0,016 = 18,816$ gram	75,26 kkal	41,2 %

Jumlah Energi dalam 1 gram pakan =  $182,76 \text{ kkal} : 40 \text{ gram} = 4,57 \text{ kkal}$

Jumlah pakan tikus per ekor =  $30 \text{ gram} / \text{hari}$

Dengan total kalori =  $4,57 \times 30 = 137 \text{ kkal} / \text{hari}$

#### 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

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

b. Dosis 2

Dosis pada manusia 90 gram/hari

$$90 \times 0,0118 = 1,62 \text{ gram/ml/tikus}$$

c. Dosis 3

Dosis pada manusia 180 gram/hari

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

#### 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 14 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 K (-) 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 1,62 gram/ml/tikus/hari, 1,62 1,62 gram/ml/tikus/hari & 3,24 1,62 gram/ml/tikus/hari. 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. Jumlah trombosit didapatkan dari hasil pemeriksaan Darah Lengkap (DL) menggunakan metode *flow cytometri* menggunakan alat XN 1000.
- m. Pembuatan hapusan darah tepi dengan cara:
  - Mengambil darah vena ekor tikus menggunakan *scalpel* dan jarum 21G sebanyak 0,5 cc atau satu tetes.
  - Darah ditetaskan ke *glass slide* dengan diameter tidak melebihi 2 mm.
  - *Glass slide* lainnya (penggeser) ditempatkan di sebelah kiri tetes darah dan kemudian digerakkan ke kanan sampai mengenai tetesan darah.
  - Tunggu sampai darah menyebar kira-kira 0,5 cm dari sudut penggeser. Segera gerakkan penggeser ke kiri dengan sudut kira-kira 30-45°.
  - *Glass slide* diberi nomor dan dilanjutkan dengan pengecatan wright.
- n. Pengecatan wright:
  - Hapusan darah tepi ditetesi larutan wright 13 – 14 kali.
  - Diamkan selama 2 menit.
  - Tetesi dengan larutan penyangga / *buffer* 13 – 14 kali
  - Diamkan selama 20 menit
  - Bilas lalu keringkan dengan pengering / *dryer*.

Slide yang telah diwarnai, dilihat dibawah mikroskop menggunakan minyak emersi (pembesaran 100x) untuk menghitung jumlah agregasi platelet dalam 10 lapang pandang dibandingkan dengan perlakuan normal (Maherda, 2013)

Persentase trombosit yang beragregasi dihitung berdasarkan jumlah trombosit yang berkelompok dibandingkan jumlah (trombosit berkelompok dan tidak berkelompok). Kelemahan pembacaan sediaan apus darah tepi terletak pada ketrampilan dan keahlian masing-masing orang dalam membaca agregasi trombosit. Pengecatan apus darah tepi kurang bagus juga akan mempengaruhi dalam pembacaan agregasi trombosit (catatan: menghitung agregasi trombosit tidak menggunakan patokan, jumlah lapang pandang yang diperiksa. Namun menggunakan total jumlah trombosit yang ditemukan kurang lebih 200) (Gumilang, 2014)

#### 4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Untuk mengetahui perbedaan rata-rata agregasi trombosit 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 agregasi trombosit 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 jumlah dan trombosit yang mengalami agregasi antar kelompok kontrol dan perlakuan,  $H_1$  pada penelitian ini adalah terdapat beda jumlah dan trombosit yang mengalami agregasi antar kelompok kontrol dan perlakuan. Teknik pengolahan dan analisis data

dilakukan dengan menggunakan program *Software product and service solution 17 PS* (SPSS 17 PS), dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

