BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *True Experimental* dengan jenis *post test only control group* (Sudigdo, 2002). Tikus akan diadaptasi selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan (Irma, 2011). Penelitian ini menggunakan 5 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dan pemilihan sampel dilakukan menggunakan metode *Complete Randomized Sampling* atau Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen (Guyton, 1991). Tikus akan diberi perlakuan selama 8 minggu dan hasil akan diteliti adalah perbedaan kadar LDL darah pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Pada penelitian ini digunakan 5 kelompok perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol negative (P0), tikus hanya diberi pakan diet normal 40 g/hari selama 8 minggu
2. Kelompok kontrol positif (P1), tikus diberikan pakan diet aterogenik 40 g/hari selama 8 minggu
3. Kelompok perlakuan 1 (P2), tikus diberikan diet aterogenik 40 g/hari dan tepung jamur tiram dengan dosis 25 mg/hari
4. Kelompok perlakuan 2 (P3), tikus diberikan diet aterogenik 40 g/hari dan tepung jamur tiram dengan dosis 50 mg/hari
5. Kelompok perlakuan 3 (P4), tikus diberikan diet aterogenik 40 g/hari dan tepung jamur tiram dengan dosis 100 mg/hari

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Identifikasi Sampel

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih *(Rattus novergicus)* strain wistar, berjenis kelamin jantan. Penelitian ini menggunakan tikus berjumlah 30 ekor tikus dengan jumlah 6 ekor tikus pada masing-masing perlakuan yang diambil dengan menggunkan metode *Complete Randomized Sampling*. Dengan rancangan ini, setiap hewan coba mendapatkan peluang yang sama untuk menjadi sampel dalam kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

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 Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Kriteria Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus putih jantan jenis *Rattus novergicus* galur wistar. Menurut Ganong (2002), tikus jantan mempunyai sedikit hormon esterogen sehingga tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol dalam darah. Selain itu, penggunaan tikus putih jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus betina (Noor, 2010).
- Umur 2-3 bulan

- Berat badan 150-250 gram. Tikus putih setelah mencapai umur dewasa rata-rata berat badannya 200-250 gram, tetapi bervariasi tergantung pada galur (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)
- Warna bulu putih
- Sehat, ditandai dengan gerakan aktif, bulu bersih dan baik, mata jernih
- Tidak mendapatkan perlakuan sebelumnya

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus tidak bergerak aktif dan sakit
- Tikus tidak mau makan
- Tikus mati
- Ada kecacatan secara anatomi
- Tikus hilang

4.2.2.3 Besaran Sampel

Estimasi besar subyek penelitian menurut Kemas (1995) :

$(t - 1)(r - 1) \geq 15$

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

$4(r - 1) \geq 15$

$r - 1 \geq 3{,}75$

$r \geq \mathbf{4{,}75}$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah pengulangan

Berdasarkan hasil perhitungan dibutuhkan tikus percobaan minimal 5 ekor tikus untuk masing-masing kelompok perlakuan dan ditambahkan 1 tikus sebagai cadangan untuk mengantisipasi tikus mati waktu adaptasi dan saat diberi perlakuan sehingga tikus percobaan untuk masing-masing kelompok perlakuan sebanyak 6 ekor tikus. Untuk 5 kelompok perlakuan dibutuhkan minimal 30 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3. 1 Variabel Bebas

Dosis tepung jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) yang diberikan pada tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* jantan.

4.3. 2 Variabel Terikat

Kadar LDL darah tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* jantan setelah diberi tepung jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang untuk pembuatan tepung jamur tiram putih dan Laboratorium Klinik Kawi Malang untuk mengukur kadar LDL darah pada tikus putih jantan.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai 20 Desember 2012 - 14 Februari 2013.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen 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 :

Tabel 4.1 Komposisi Diet Normal per 1 Ekor Tikus

No.	Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
1	PARS	53%	21,2
2	Terigu	33%	13,2
3	Air	14%	5,4
Total		**100**	**40**

(Murwani *dkk*, 2006)

4.5.1.2 Diet Aterogenik

Diet aterogenik diberikan sebanyak 40 gram/hari dalam bentuk ransum dangan komposisi :

Tabel 4.2 Komposisi Diet Aterogenik per 1 Ekor Tikus

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**

(Murwani *dkk*, 2006)

4.5.1.3 Tepung Jamur Tiram Putih

Jamur tiram putih yang digunakan berasal dari Turen Kabupaten Malang. Jamur dibeli dalam kondisi segar, kemudian diolah menjadi tepung. Pada jamur tiram putih ini yang akan diteliti adalah kandungan lovastatin pada jamur yang merupakan senyawa alami yang berperan sebagai obat penurun kolesterol (Tjokrokusumo, 2008).

4.5.1.4 Cara Pembuatan Tepung Jamur Tiram Putih

Jamur tiram segar sebanyak 4 kg dibersihkan dari kotoran, lalu diambil bagian tudungnya saja kemudian ditimbang karena berdasarkan penelitian kandungan yang mirip dengan lovastatin lebih banyak terdapat pada tudung dibandingkan dalam batangnya dan lebih berkonsentrasi dalam insang-insang yang masak khususnya dalam sporanya (Gunde-Cimerman and Plemenitas, 2002). Hasil penimbangan tudungnya diperoleh ± 2 kg. Setelah itu, dipotong-potong kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam lalu digiling sampai menjadi tepung dengan grinder.

Selanjutnya jamur yang sudah digiling dimasukkan ke desikator sampai dingin, kemudian ditimbang dan dihitung rendemen/sisanya (Widyastuti, 2004). Setelah itu diperoleh tepung jamur tiram putih dengan berat 254 gram dari 2 kg jamur tiram segar yang diambil bagian tudungnya saja. Warna yang dihasilkan dari pengeringan dengan suhu 40°C selama 24 jam relatif lebih putih. Pengeringan tidak dilanjutkan sampai 72 jam karena dengan waktu 24 jam hasilnya sudah cukup baik (Widyastuti, 2004).

4.5.1.5 Penentuan Dosis Tepung Jamur Tiram Putih

Dosis tepung jamur tiram yang digunakan adalah berdasarkan konversi dari dosis lovastatin yang diberikan pada manusia yaitu dengan dosis 20 mg untuk 50 kg berat badan manusia (Kasim *dkk*, 2006). Jika dikonversikan ke tikus dengan berat badan 250 gram maka didapatkan dosis lovastatin adalah 0,1 mg dengan perhitungan :

Lovastatin tikus : $\frac{250 \text{ g}}{50000 \text{ g}} \times 0{,}02 \text{ g lovastatin} = 0{,}0001 \text{ g} = 0{,}1 \text{ mg lovastatin}$

Kandungan lovastatin yang digunakan adalah 0,40% - 2,07% pada media *wheat flour*. Dalam 100 gram serbuk jamur tiram putih, terdapat kandungan lovastatin 0,4 gram. Maka untuk kebutuhan tepung jamur tiram putih yang diberikan adalah sebagai berikut :

Dosis jamur tiram putih : $\frac{0{,}1 \text{ mg}}{400 \text{ mg}} \times 100000 \text{ mg} = 25 \text{ mg}$

sehingga :

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

4.5.2 Alat yang Digunakan

4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang dari kotak plastik
- Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
- Botol air untuk minum

- Timbangan analitik
- Alat untuk memantau keadaan tikus : form pemantauan harian, timbangan untuk mengukur BB tikus

4.5.2.2 Alat Pengambilan Sampel Darah Hewan Coba

- Jarum suntik dan *squit disposable*
- Tabung untuk penyimpanan serum
- Mikropipet
- Sentrifuge

4.5.2.3 Alat Pengukuran Serum LDL

- Mesin Cobras Mira
- Cuvet disposable
- Rak reagen, rak sampel
- Mikro pipet 100 µl, mikro pipet 500 µl, mikro pipet 1000 µl
- *Yellow tip* dan *blue tip*

4.5.2.4 Alat Pembuatan Ransum Makanan Tikus

- Sendok
- Timbangan analitik untuk mengukur kebutuhan serbuk jamur tiram putih dan diet aterogenik
- Baskom
- Pengaduk

4.5.2.5 Alat Pembuatan Tepung Jamur Tiram Putih

- Baskom
- Pisau
- Oven
- Grinder/Penggiling

4.5.2.6 Alat Pemberian Tepung jamur Tiram Putih

Serbuk jamur tiram putih dicampur dengan air, lalu diberikan pada tikus melalui spuit yang ujungnya dipasang sonde yang bisa melalui mulut, esophagus hingga lambung.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.3 Definisi Operasional

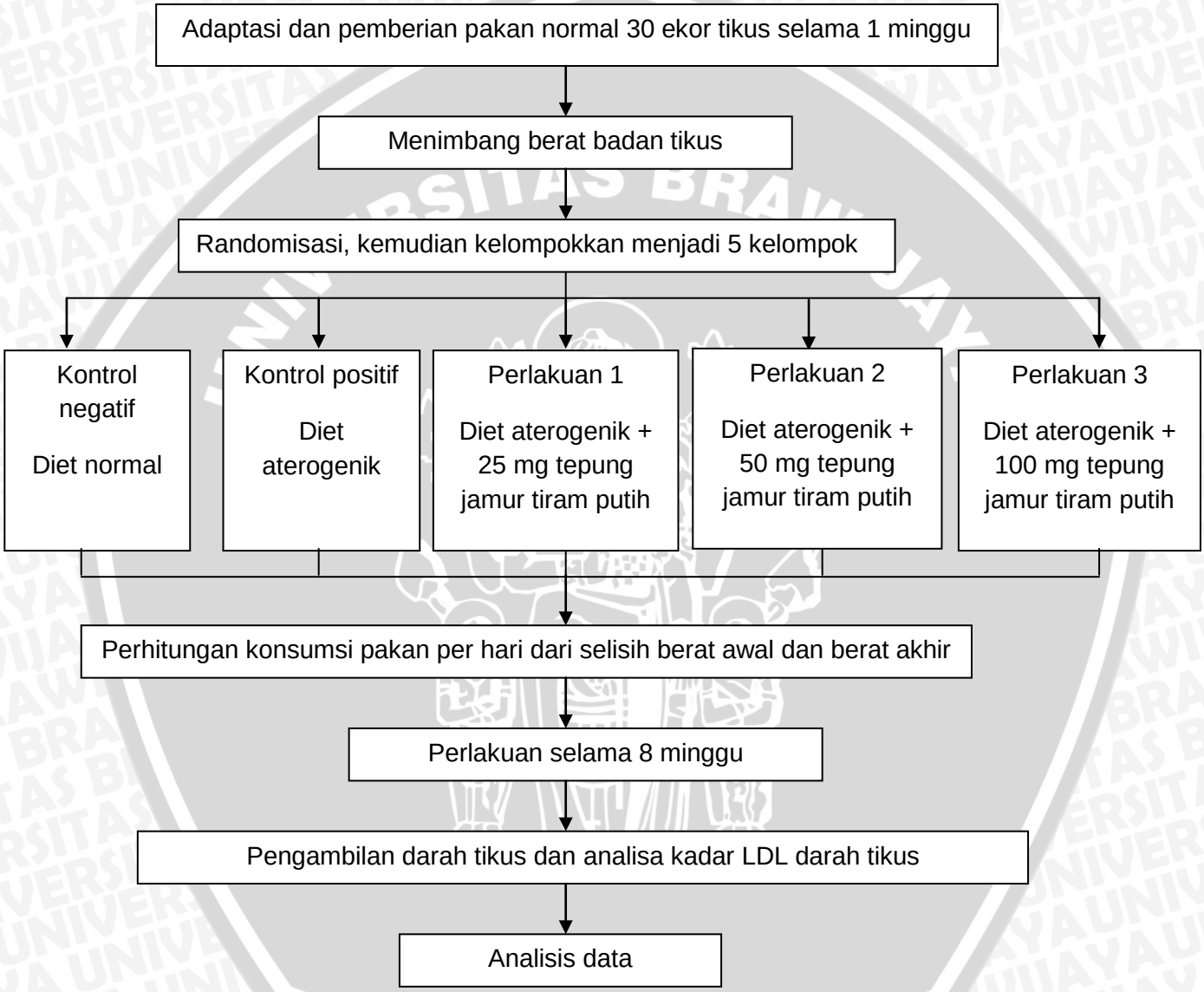
Variabel	Definisi	Indikator	Alat Ukur	Referensi
Diet Aterogenik	Diet yang digunakan untuk meningkatkan kadar kolesterol total dalam tubuh tikus selama 8 minggu			Murwani,*dkk*. (2006)
Tepung Jamur Tiram Putih	Jamur tiram putih diambil dari Kecamatan Turen kemudian diambil tudungnya saja untuk dibuat menjadi tepung karena kandungan yang mirip dengan lovastatin lebih banyak terdapat			Netty dan Sri. (2004) Hasil studi Gunde-Cimerman (1999), Gunse-Cimerman and Cimerman (1995);

	dalam tudung dibandingkan dalam batangnya			Gunde-Cimerman and Plemenitas (2002), dan Bobel et al. (1998)
Kadar LDL darah	Pengambilan sampel darah dilakukan di organ jantung dengan menggunakan spuit kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm dalam suhu 4°C	< 100: optimal 100-129 : mendekati optimal 130-159 : batas normal tertinggi 160-183 : tinggi >190 : sangat tinggi	Metode *analyzer Cobasmira*	The American Heart Association, NIH and NCEP, 2002

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengambilan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.7.2 Pengkondisian Hewan Coba

Tikus jantan dengan berat badan sekitar 200 gram akan ditempatkan pada suhu 25 ± 1° C dengan siklus cahaya selama 12 jam (08.00-12.00). Semua hewan coba akan diberikan diet normal yaitu berupa komposisi comfeed PARS, tepung terigu dan air selama 1 minggu dan diberikan secara *libitum*. Setelah pengkondisian selama 1 minggu hewan coba akan dilakukan penimbangan berat badan untuk dibagi secara acak ke dalam kelompok negatif, kelompok positif dan kelompok perlakuan.

4.7.3 Pemberian Pakan dan Tepung Jamur Tiram Putih

Kelompok negatif akan diberikan diet normal dengan komposisi comfeed PARS, tepung terigu dan air. Kelompok positif akan diberikan diet aterogenik dengan komposisi kuning telur, lemak kambing, minyak, minyak babi, asam kolat PARS dan terigu. Diet normal dan diet aterogenik serta minuman diberikan *ad libitum*. Pada kelompok perlakuan 1 sampai 3 akan diberikan diet aterogenik disertai pemberian tepung jamur tiram putih melalui sonde. Untuk kelompok kontrol negatif dan positif dilakukan sonde plasebo untuk menyamakan tingkat stress akibat sonde pada semua perlakuan. Pemberian tepung jamur tiram putih sesuai dengan dosis yang telah ditentukan yaitu 25 mg/hari, 50 mg/hari dan 100 mg/hari.

4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Kadar LDL Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan di organ jantung dengan menggunakan spuit kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm dalam

suhu 4°C. Kemudian dianalisis dengan *analyzer Cobasmira* dengan prosedur penggunaan alat di bawah ini :

1. Hidupkan alat dengan menekan tombol stop kontak
2. Tunggu ± 15 menit hingga suhu dalam alat mencapai 37°C
3. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
4. Untuk mengoperasikan mesin lakukan langkah berikut ini :
   - Masukkan reagen yang akan digunakan ke dalam *cup reagent* dan tempatkan di rak reagen yang telah disediakan
   - Masukkan sampel (serum) ke dalam *cup* sampel dan letakkan di rak sampel sesuai dengan nomor urut
   - Letakkan masing-masing rak ke tempat *cobas mira* yang telah tersedia
   - Dilakukan pemeriksaan sampel dilakukan dengan langkah-langkah berikut ini :
     a. Tekan tombol ROUTINE – NO. SAMPEL – ENTER
     b. Masukkan KODE/NAMA SAMPEL – ENTER
     c. Tekan tombol TEST/PARAMETER yang akan diperiksa (LDL), kemudian tekan ENTER – START
     d. Tunggu alat hingga memproses
     e. Lihat hasil dengan cara tekan tombol INFO, numberik 2 (*intern report*)

4.7.5 Pengambilan Data

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan pengambilan darah tikus dan penghitungan kadar LDL darah pada tikus. Data yang dikumpulkan meliputi :

1. Berat badan tikus yang diperoleh dari penimbangan tikus setiap hari

2. Data asupan makanan per hari dihitung dari sisa makanan yang diberikan pada hewan coba setiap harinya
3. Kadar LDL darah tikus yang diperoleh dari pengambilan darah tikus

4.8 Analisis Data

Analisa data hasil penelitian menggunakan bantuan sofware SPSS 16 *for windows* dengan metode *One-Way Anova* untuk data berat badan dan intake pakan dan *Kruskall Wallis* untuk kadar LDL karena data tidak homogen. Penelitian dianggap bermakna atau berbeda signifikan jika nilai p *value* < α, dengan tingkat kepercayaan 95% (α = 0,05). Jika terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk kadar LDL dan uji *Post Hoc Test Tukey* untuk data berat badan dan intake pakan untuk melihat antara kelompok mana saja yang berbeda makna.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA