

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* laboratorik pada hewan coba tikus jantan strain wistar dengan menggunakan desain penelitian *control group post test design* (Notoatmodjo, 2005). Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen.

4.2 Subjek Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar*.

4.2.2 Sampel

Sampel hewan coba dibagi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yaitu:

a. Kriteria Inklusi

- Umur 2 bulan
- Berat badan 150-200 g
- Jenis kelamin jantan
- Dalam keadaan sehat selama penelitian
- Warna bulu putih

b. Kriteria Eksklusi

- Cacat/memiliki kelainan anatomi

- Tidak aktif

4.2.3 Estimasi Jumlah Sampel

Dalam penelitian ini terdapat lima perlakuan yang dapat dilihat pada tabel

4.1.

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
K (-) (Kontrol Negatif)	Diet Normal
K (+) (Kontrol Positif)	Diet Aterogenik
P1	Diet Aterogenik + bubuk daun katuk dosis I
P2	Diet Aterogenik + bubuk daun katuk dosis II
P3	Diet Aterogenik + bubuk daun katuk dosis III

Jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat menggunakan

rumus Federer (Faustine, 2009), yaitu: $(n-1)(t-1) \geq 15$,

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

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

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5 \text{ ekor}$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel

Dari rumus tersebut diperoleh jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan adalah lebih besar sama dengan 5. Dalam penelitian ini jumlah hewan

coba yang digunakan untuk masing-masing perlakuan adalah 5 sehingga total sampel adalah 25 ekor hewan coba.

4.2.4 Randomisasi Subjek Penelitian

Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol. Untuk itu dalam pengambilan sampel dilakukan pengacakan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Memberikan nomer urut 1 – 25 pada tikus.
- b. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus menggunakan 3 angka acak.
- c. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus.
- d. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Dosis Bubuk Daun Katuk

4.3.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Kadar LDL dalam serum tikus wistar jantan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Eksperimen ini dilaksanakan selama 2 bulan sejak Juli sampai September 2013 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus dan Laboratorium Kawi sebagai tempat pengukuran kadar LDL serum tikus.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

- 1) Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang terbuat dari anyaman kawat, tempat diet, dan botol air diletakkan dalam kandang dari kotak plastik.
- 2) Alat untuk membuat ransum makanan tikus: baskom plastik, timbangan, sarung tangan, dan gelas ukur.
- 3) Alat ukur pengambilan dan penyimpanan sampel darah: jarum suntik 5 ml, spuit disposable, dan tabung vial 15 ml.
- 4) Alat untuk pemeriksaan kadar LDL: mesin cobas mira, cuvet disposable, cup dan rak reagen, cup dan rak sampel, mikro pipet 100 μ l, mikro pipet 500 μ l, dan mikro pipet 1000 μ l.

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor per hari adalah 40 gram. Dalam penelitian ini terdapat dua macam pakan tikus yaitu diet aterogenik dan diet normal. Adapun komposisi pakan normal dan aterogenik akan dijelaskan sebagai berikut:

1. Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS dan tepung terigu perbandingan 2 : 1 dengan ditambahkan air secukupnya. Diet normal diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi diet normal dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi Diet Normal persaji (40 gram)

Komposisi	%	Jumlah
PARS	53%	21,2 gram
Terigu	23.5%	9,4 gram
Air	23,5%	9,4 mL

Kandungan gizi diet normal dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kandungan Zat Gizi Diet Normal persaji (40 gram)

Zat Gizi	Jumlah
Energi	104,9 kkal
Karbohidrat	19,06 gram
Lemak	0,93 gram
Protein	5,06 gram

2. Diet aterogenik diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi diet aterogenik dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Komposisi Diet Aterogenik

Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
PARS	50	20
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 : Hrapkiewicz, *et al.*, 2007 ; Sacher, *et al.*, 2000

Kandungan zat gizi diet aterogenik dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Kandungan Zat Gizi Diet Aterogenik persaji (40 gram)

Zat Gizi	Jumlah
Energi	182,76 kkal
Karbohidrat	18,816 gram
Lemak	9,59 gram
Protein	5,24 gram

4.5.2.2 Bubuk Daun Katuk

Bubuk daun katuk akan diberikan kepada tikus percobaan dengan cara dicampurkan ke pakan selama 60 hari.

Perhitungan dosis:

Rata-rata berat badan manusia dewasa = 70 kg = 70.000 gram

Rata-rata berat badan tikus = 0,2 kg = 200 gram

Kebutuhan fitosterol optimal untuk menurunkan kadar kolesterol darah = 2-3 g/hari (Cantrill *et al.*, 2008).

Berdasarkan tabel konversi dosis, diketahui indeks konversi dosis dari manusia (dengan berat badan 70 kg) ke tikus (dengan berat badan 200 gram) adalah sebesar 0,018 kali dosis pada manusia (Harmita, dkk, 2008), maka diperoleh dosis untuk tikus:

$$3 \text{ g/hari} \times 0,018 = 0,054 \text{ g/hari}$$

Dalam 100 g bubuk daun katuk mengandung 2,43 gram fitosterol sehingga perhitungan dosis yang diberikan untuk tikus dengan BB 200 gram :

$$= \frac{\text{Kebutuhan Fitosterol Tikus}}{\text{Kandungan Fitosterol dalam Bubuk Daun Katuk}} \times 100 \text{ g}$$

$$= \frac{0,054}{2,43} \times 100 \text{ g}$$

$$= 2,2 \text{ g/hari}$$

Jika diprosentase ke pakan tikus 40 g, maka dosis 2,22 g adalah 5,56 % dari pakan sehingga dibulatkan menjadi 6%.

Jika 6 % dianggap sebagai dosis standar (dosis n), maka dalam penelitian ini menggunakan deret ukur n, 1½n dan 2n. Sehingga, dosis bubuk daun katuk yang digunakan:

$$\text{dosis 1 Standar (n)} = 6\% = 2,4 \text{ g/hari}$$

$$\text{dosis 2 } 1\frac{1}{2}n = 9\% = 3,6 \text{ g/hari}$$

$$\text{dosis 3 } 2n = 12\% = 4,8 \text{ g/hari}$$

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Tabel 4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Diet Aterogenik	Diet yang digunakan untuk meningkatkan kadar LDL dalam tubuh tikus dengan kandungan berupa pakan ayam/PARS 20 gram (50%), tepung terigu 10 gram (10%), kuning telur bebek 2 gram (5%), lemak kambing 4 gram (10%), minyak kelapa 0,4 gram (1%), minyak babi 3,55 gram (8,9%), asam kolat 0,05 gram (0,1%).	Rasio
Bubuk Daun Katuk	Bubuk daun katuk yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk daun katuk yang dibeli di Materia Medika, Balai Penelitian Obat dan Tanaman Malang.	Rasio
Kadar LDL Serum	Besarnya kadar LDL dalam satuan mg/dl yang diperoleh dari pengujian serum darah yang diambil dari jantung bagian ventrikel tikus yang diukur dengan menggunakan Cobas Mira.	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan data

4.7.1 Pembelian Bubuk Daun Katuk

Bubuk daun katuk didapatkan dari Balai Penelitian Kesehatan Materia Medika di daerah Batu Malang dengan pembelian sebanyak 4 kg. Bubuk daun katuk yang digunakan sampai penelitian selesai yaitu sebanyak 3.5 kg.

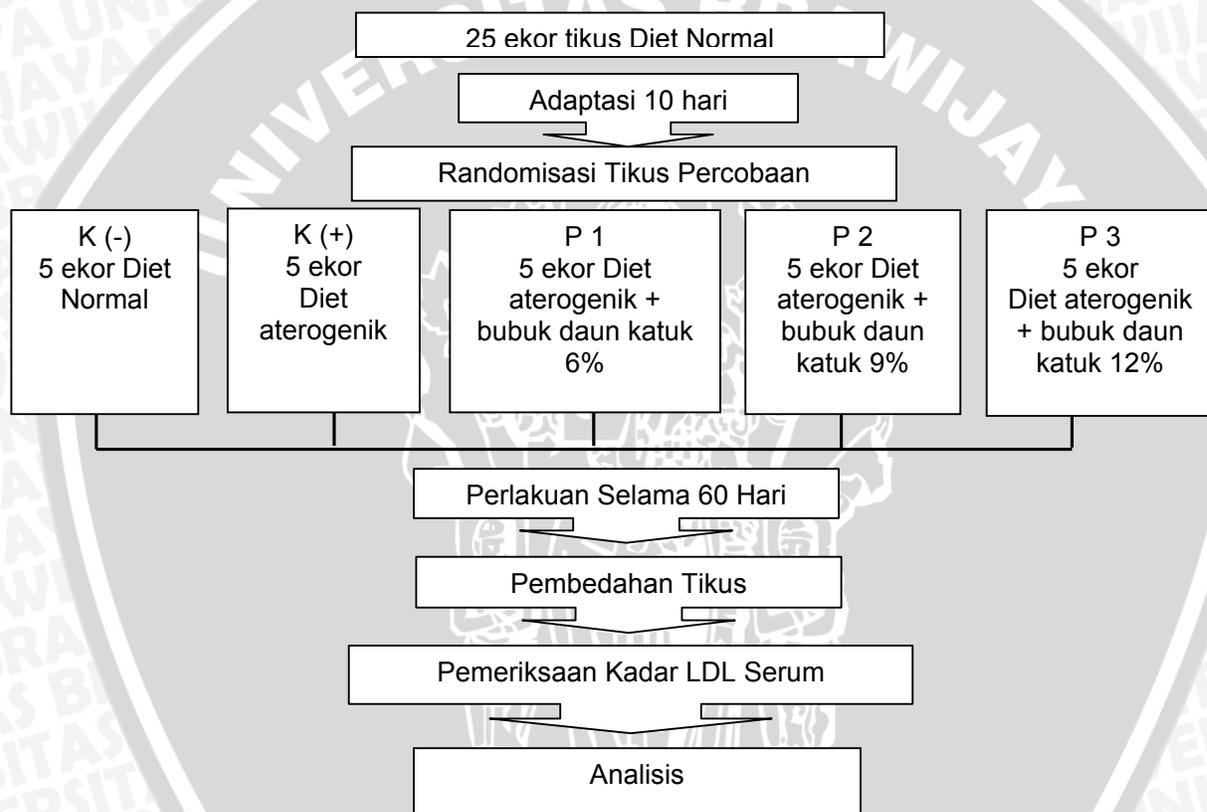
4.7.2 Perlakuan pada Hewan Percobaan

- a. Di awal penelitian 25 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan, dan pakan tikus berupa diet normal selama 10 hari untuk mengetahui apakah pakan tikus tersebut dapat diterima tikus. Pemberian pakan tikus dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

- b. Berat badan tikus ditimbang yaitu pada awal dan akhir masa adaptasi sehingga dapat dipantau berat badan tikus agar tidak mengalami penurunan sehingga tidak keluar dari kriteria inklusi.
- c. Setelah 10 hari masa adaptasi tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan dilakukan randomisasi dengan RAL yaitu :
 - 1) Kelompok kontrol negatif yang hanya mendapatkan diet normal tanpa bubuk daun katuk.
 - 2) Kelompok kontrol positif yang mendapatkan diet aterogenik tanpa diberi bubuk daun katuk.
 - 3) Kelompok perlakuan 1 yang mendapatkan diet aterogenik dan diberi bubuk daun katuk dengan dosis 6%.
 - 4) Kelompok perlakuan 2 yang mendapatkan diet aterogenik dan diberi bubuk daun katuk dengan dosis 9%.
 - 5) Kelompok perlakuan 3 yang mendapatkan diet aterogenik dan diberi bubuk daun katuk dengan dosis 12%.
- d. Tikus selama 60 hari diperlakukan sesuai dengan kelompok perlakuan. Diet normal dan diet aterogenik serta minuman diberikan secara *ad libitum*. Pemberian bubuk daun katuk diberikan dengan mencampurkan bubuk daun katuk ke pakan tikus.
- e. Dilakukan penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari untuk mengetahui intake makanan tikus dan penimbangan berat badan tikus setiap minggu untuk mengetahui perkembangan berat badan tikus. Sedangkan pergantian sekam 2 kali setiap 1 minggu.
- f. Pada akhir percobaan dilakukan pengukuran kadar LDL serum yang diambil

pada seluruh tikus percobaan, di mana tikus percobaan dibius dengan eter hingga pingsan, kemudian dibedah dan diambil darahnya dari jantung bagian ventrikel.

- g. Setelah pembedahan yang dilakukan terhadap tikus dan diambil sampel darah yang dibutuhkan untuk penelitian, tikus dirapikan kembali kemudian dikuburkan.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.3 Analisis Konsumsi Bubuk Daun Katuk

Analisis jumlah bubuk daun katuk yang dikonsumsi tikus menggunakan prosentase dosis bubuk daun katuk yang dicampurkan dalam diet aterogenik yang kemudian dikalikan dengan jumlah pakan yang dimakan tikus. Di mana jumlah pakan yang dimakan tikus diperoleh berdasarkan selisih berat awal pakan

dengan berat sisa pakan.

4.7.4 Pemeriksaan Kadar LDL Serum

Kadar LDL dalam serum sampel diukur setelah 60 hari perlakuan, serum darah sampel diperiksa menggunakan spektrofotometri *colorimetric* menggunakan alat Cobas mira. Dimana hewan coba dibius dengan eter hingga mati/pingsan, kemudian dibedah dan diambil darahnya dari jantung bagian ventrikel. Pelaksanaannya pada panjang gelombang 510 nm, (interval 490-550). Menggunakan cuvet 1 cm pada temperatur 37⁰C. Pengukuran dilakukan dengan dibandingkan reagen blanko.

4.8 Analisis Data

Uji yang dilakukan pertama kali adalah uji distribusi normalitas dan homogenitas data. Setelah didapatkan data yang homogen dilanjutkan dengan *Oneway ANOVA*. *Oneway ANOVA* digunakan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan atau tidak yaitu diet normal, diet atherogenik dengan pemberian bubuk daun katuk dosis I, II, dan III. Jika ada perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan *Post-Hoc test* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan. Uji statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dikatakan bermakna jika $p < 0,05$. Jika data tidak homogen dan atau tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan median dengan $\alpha = 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan tersebut ($p < 0,05$).