

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group desain*, yaitu dalam rancangan ini perlakuan atau intervensi telah dilakukan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau post tes. Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus Norvegicus* (Notoatmojo, 2010)

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar*. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Usia 8-12 minggu
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat
- d. Tidak mengalami pengobatan atau paparan sebelumnya

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit pada masa penelitian
- b. Tikus mati pada masa penelitian

4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subject penelitian, yaitu :

1. Kontrol negatif (K-) : diet normal
2. Kontrol positif (K+) : diet tinggi lemak

3. Perlakuan 1 (P1) : diet tinggi lemak + dekok daun suruhan
Konsentrasi 10%
4. Perlakuan 2 (P2) : diet tinggi lemak + dekok daun suruhan
Konsentrasi 20%
5. Perlakuan 3 (P3) : diet tinggi lemak + dekok daun suruhan
Konsentrasi 30%

4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Menurut Hanifah (2008), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut :

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

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 5 kali. Penambahan hewan coba cadangan adalah 1 ekor menjadi 6 ekor untuk mengantisipasi apabila terdapat tikus dalam kelompok perlakuan yang mati selama masa penelitian. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $6 \times 5 = 30$ hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah dekok daun suruhan (*Peperomia pellucida L. kunth*) dengan berbagai konsentrasi.

4.3.2 Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah kadar Triglicerida darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian dilakukan pada tempat sebagai berikut :

1. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan serta sebagai tempat pengukuran kadar Triglicerida darah tikus.

4.4.2 Waktu

Penelitian ini berlangsung selama 1 bulan, yaitu pada bulan April 2016.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat/Instrumen penelitian

1. Alat Pemeliharaan Hewan coba
 - a. Kandang dari bak plastic
 - b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
 - c. Botol air untuk minum
 - d. Timbangan
 - e. Tempat pakan

- f. Form pemantauan sisa pakan tikus dan form pemantauan berat badan tikus
2. Alat Pembuatan Makanan Tikus
 - a. Baskom plastik
 - b. Timbangan
 - c. Pengaduk
 - d. Handscoon
 - e. Gelas ukur
 - f. Sonde
3. Alat pembuatan Dekok Daun Suruhan
 - a. Kompor
 - b. Panci
 - c. Gelas ukur
 - d. Pengaduk
4. Alat pemeriksaan kadar Trigliserida
 - a. Tabung reaksi
 - b. Spuit disposable
 - c. Spektrofotometer

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Diet Normal (PARS, tepung terigu, air,)
2. Diet aterogenik (PARS, tepung terigu, kuning telur bebek, minyak kelapa, lemak kambing, minyak babi, asam cholat, air)
3. Dekok daun suruhan
4. Air
5. Sampel darah

4.6 Definisi Operasional

1. Diet Normal adalah diet standar dengan kandungan berupa pakan yang komposisinya terdiri dari PARS 53%, Terigu 23,5%, air 23,5%
2. Diet aterogenik adalah diet tinggi lemak dengan komposisi berupa pakan ayam / PARS 50%, tepung terigu 25%, kuning telur bebek 5%, lemak kambing 10%, minyak kelapa 1%, minyak babi 8,9%, asam kolat 0,1%
3. Dekok daun suruhan merupakan suatu cairan yang diperoleh dari daun suruhan yang direbus dengan suhu 90°selama15 menit
4. Trigliserida adalah salah satu jenis lemak yang diangkut oleh lipoprotein plasma yang beredar pada tubuh manusia.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini dilakukan karena belum ada penelitian sebelumnya mengenai dekok daun yang dapat menurunkan kadar Trigliserida. Penelitian pendahuluan ini dilakukan oleh saya dan teman-teman sekelompok untuk menentukan kadar Trigliserida yang akan digunakan di penelitian selanjutnya. Penelitian pendahuluan diawali dengan percobaan menggunakan 4 ekor tikus yang diberi berbagai konsentrasi dekok daun suruhan. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan konsentrasi yang dapat menurunkan kadar Trigliserida pada tikus putih adalah 20%, sehingga pada penelitian sebenarnya digunakan konsentrasi diatas dan dibawah konsentrasi 20%, yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%.

4.7.2 Pembuatan Dekok Daun Suruhan

Daun suruhan dibersihkan dengan air mengalir sebelum direbus, daun dan batangnya dispisah lalu dipotong kecil-kecil. Potongan daun

suruhan dimasukkan pada gelas ukur untuk mengetahui volume dan menentukan konsentrasi. Sebelumnya dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Volume daun suruhan}}{\text{Volume total}} \times 100\%$$

Setelah ditentukan masing-masing konsentrasi 10%, 20%, 30% maka daun suruhan direbus hingga mendidih selama kurang lebih 15 menit, kemudian api dimatikan dan dibiarkan sampai cairan dingin.

4.7.3 Pemberian Pakan Tikus

Kebutuhan pakan tikus perhari adalah 40 gram perhari (muwani, 2006)

1. kelompok control negatif (K-) diberikan diet normal dengan takaran 40 gram perhari.
2. Kelompok control positif (K+) diberikan pakan diet tinggi lemak dengan takaran 40 gram tanpa dekok daun suruhan.
3. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberikan diet tinggi lemak takaran 40 gram ditambah dekok daun suruhan konsentrasi 10%
4. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan diet tinggi lemak dengan takaran 40 gram ditambah dekok daun suruhan konsentrasi 20%
5. Kelompok perlakuan 3 (P3) diberikan diet tinggi lemak dengan takaran 40 gram ditambah dekok daun suruhan konsentrasi 30%

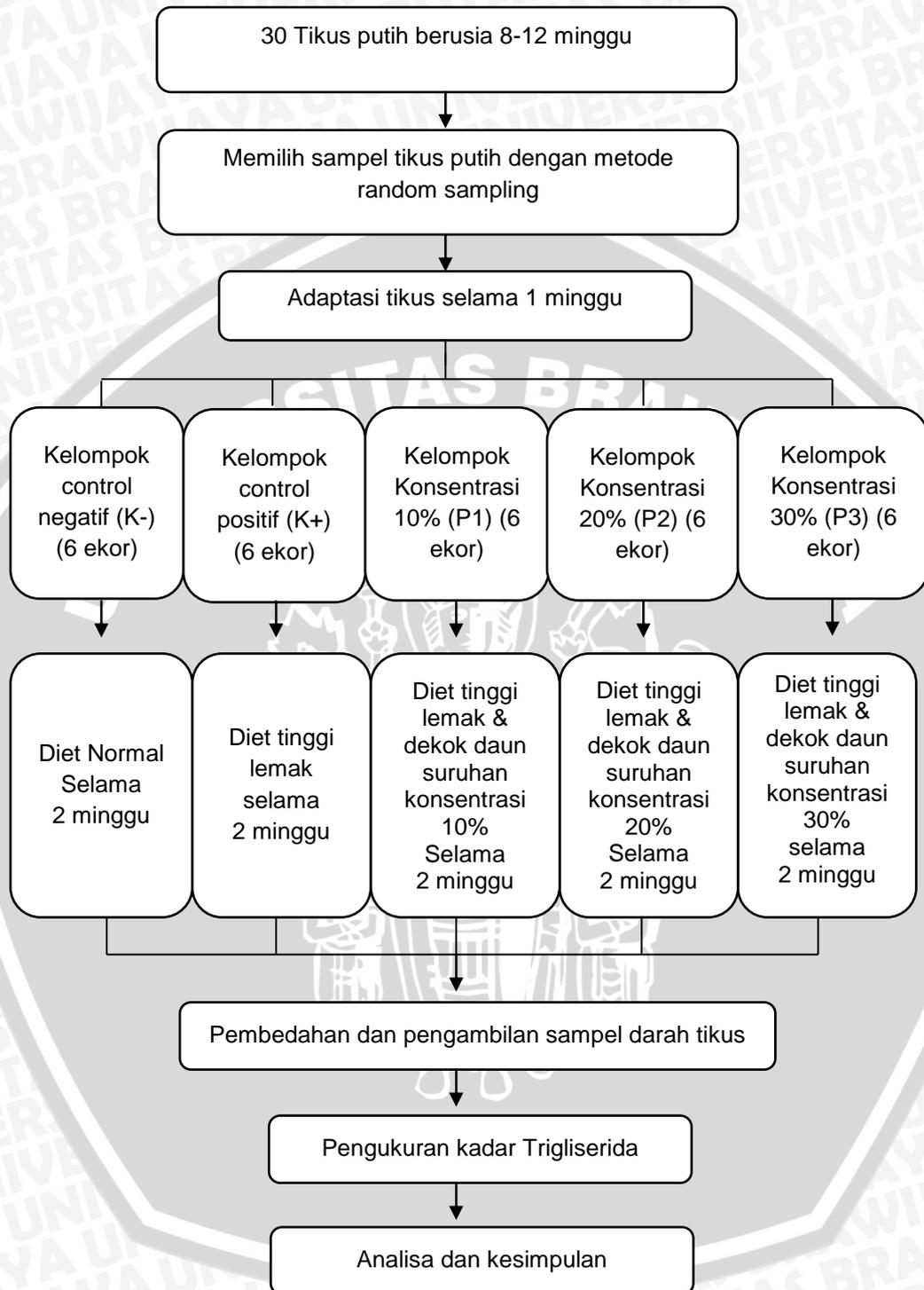
4.7.4 Pemilihan Tikus Galur Wistar

1. 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) dipilih yang memenuhi syarat sampel, kemudian dibagi dalam 5 kelompok kontrol. Cara pemilihan tikus yaitu dengan memberi nomor urut pada tiap tikus, kemudian nomor undian ditulis pada kertas kecil lalu dilipat dan dimasukkan dalam kotak undian. Pemilihan secara acak agar

setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan

2. Hewan coba (tikus) ditempatkan dalam kandang terpisah (1 kandang per ekor)
3. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan, dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari
4. Masing-masing perlakuan pada tikus dilakukan secara bersamaan selama 2 minggu
5. Pada akhir percobaan dilakukan pembedahan terhadap tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian diukur kadarTrigliserida darahnya. Alasan tikus dibedah dan pengambilan darah dari jantung dikarenakan penelitian ini membutuhkan sampel darah yang banyak sehingga untuk mendapatkan sampel darah yang banyak dan cukup darah harus diambil melalui jantung. Jantung merupakan penghasil darah terbanyak dalam tubuh.

4.8 Alur Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian

4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah 2 minggu penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengukuran Triglicerida pada tikus putih jenis *Rattus novergicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variences*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata Triglicerida antar kelompok control dengan perlakuan digunakan uji statistic *One Way Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$ dan hipotesis yang menyatakan bahwa daun suruhan (*peperomia pellucida* L. kunth) meningkatkan kadar Triglicerida pada tikus putih (*Rattus novergicus* strain 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 Triglicerida antar kelompok control dan perlakuan, H_1 pada penelitian ini adalah terdapat beda kadar Triglicerida antar kelompok kontrol dan perlakuan.

4.10 Spektrofotometri

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawaan atau warna terbentuk (Cairns, 2009).

Suatu spektrofotometer standar terdiri atas spektrofotometer untuk menghasilkan cahaya dengan panjang gelombang terseleksi yaitu bersifat monokromatik serta suatu fotometer yaitu suatu piranti untuk mengukur intensitas berkas monokromati, penggabungan bersama dinamakan sespektrofotometer. Penggabungan alat optik ini merupakan elektronika sifat kimia dan fisiknya dan detektor yang digunakan secara langsung mengukur intensitas dari cahaya yang dipancarkan (I_t) dan secara tidak langsung cahaya yang diabsorpsi (I_a).

Kemampuan ini bergantung pada spektrum elektromagnetik yang diabsorb (serap) oleh benda. (Khopkar 2007)

Fungsi alat spektrofotometer dalam laboratorium adalah mengukur transmitans atau absorbans suatu contoh yang dinyatakan dalam fungsi panjang gelombang. Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian di serap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel. Studi spektrofotometri dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual yang lebih mendalam dari absorpsi energi. Hukum Beer menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/medium (Miller J.N 2000)

Rumus menghitung kadar Trigliserida :

$$\text{Kadar Trigliserida kolesterol} = \frac{A_s}{A_{st}} \times \text{kadar standart (200mg/dl)}$$

Keterangan :

A_s = absorbansi sampel rata-rata $[(A_{s1} + A_{s2})/2]$

A_{st} = absorbansi standart