

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group design*, yaitu perlakuan atau intervensi telah diberikan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau *post test*. Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus norvegicus*. (Notoatmodjo, 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. 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 subjek 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 Supranto (2007), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut :

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

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Perhitungan sampel yang digunakan berdasarkan rumus tersebut, 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 kolesterol total darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **1.4.1 Lokasi**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus, pemberian perlakuan, dan pengukuran kadar kolesterol total 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 plastik
  - 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 kolesterol total
    - 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 kolat, 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% (Murwani, 2006)
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%, dan asam kolat 0,1% (Murwani, 2006)
3. Dekok daun suruhan merupakan suatu cairan yang diperoleh dari daun suruhan yang direbus dengan suhu 90° selama 15 menit (Ditjen POM, 2000).
4. Kolesterol total adalah jumlah keseluruhan kolesterol yang beredar dalam plasma tubuh (Murray et al, 2014).

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan karena penelitian mengenai dekok daun suruhan dapat menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih belum pernah dibuktikan. Penelitian pendahuluan dilakukan sebelum dilakukan penelitian sesungguhnya, selama 2 minggu. Penelitian pendahuluan diawali dengan percobaan menggunakan 4 ekor tikus yang diberi berbagai konsentrasi dekok daun suruhan. Konsentrasi yang digunakan adalah 10%, 20%, dan 30%. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan konsentrasi yang dapat menurunkan kolesterol total pada tikus putih adalah 20%, sehingga pada penelitian sebenarnya, digunakan

konsentrasi yang berada diatas dan dibawah konsentrasi tersebut, yakni tetap dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%.

#### 4.7.2 Pembuatan dekok daun suruhan

Sebelum direbus, daun suruhan dibersihkan dengan air mengalir. Kemudian daun dan batangnya dipisahkan lalu dipotong kecil. Potongan daun suruhan dimasukkan pada gelas ukur untuk mengetahui volume dan menentukan konsentrasi. Sebelumnya dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi dengan menggunakan rumus :

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

Daun suruhan direbus hingga mendidih selama kurang lebih 15 menit, kemudian api dimatikan dan dibiarkan sampai cairan dingin (BPOM RI, 2012).

Konsentrasi yang digunakan dalam perebusan adalah 30%, karena merupakan konsentrasi terpekat. Konsentrasi lainnya diperoleh dengan cara pengenceran, menggunakan rumus:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Dekok daun suruhan disimpan dalam lemari es sebagai larutan stok.

#### 4.7.3 Pemberian pakan tikus

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

1. Kelompok kontrol negatif (K-) diberikan diet normal dengan takaran 40 gram perhari.
2. Kelompok kontrol positif (K+) diberikan diet tinggi lemak 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. Perlakuan pada tikus di setiap kelompok dilakukan secara bersamaan selama 2 minggu
5. Pada akhir percobaan dilakukan pembedahan terhadap tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian diukur kadar kolesterol total darahnya

#### 4.7.5 Penghitungan kolesterol total dengan metode spektrofotometri

Prosedur:

Panjang gelombang : Hg 560 nm (470-560)

Spektrofotometer : 500 nm

Kuvet : diameter dalam 1 cm

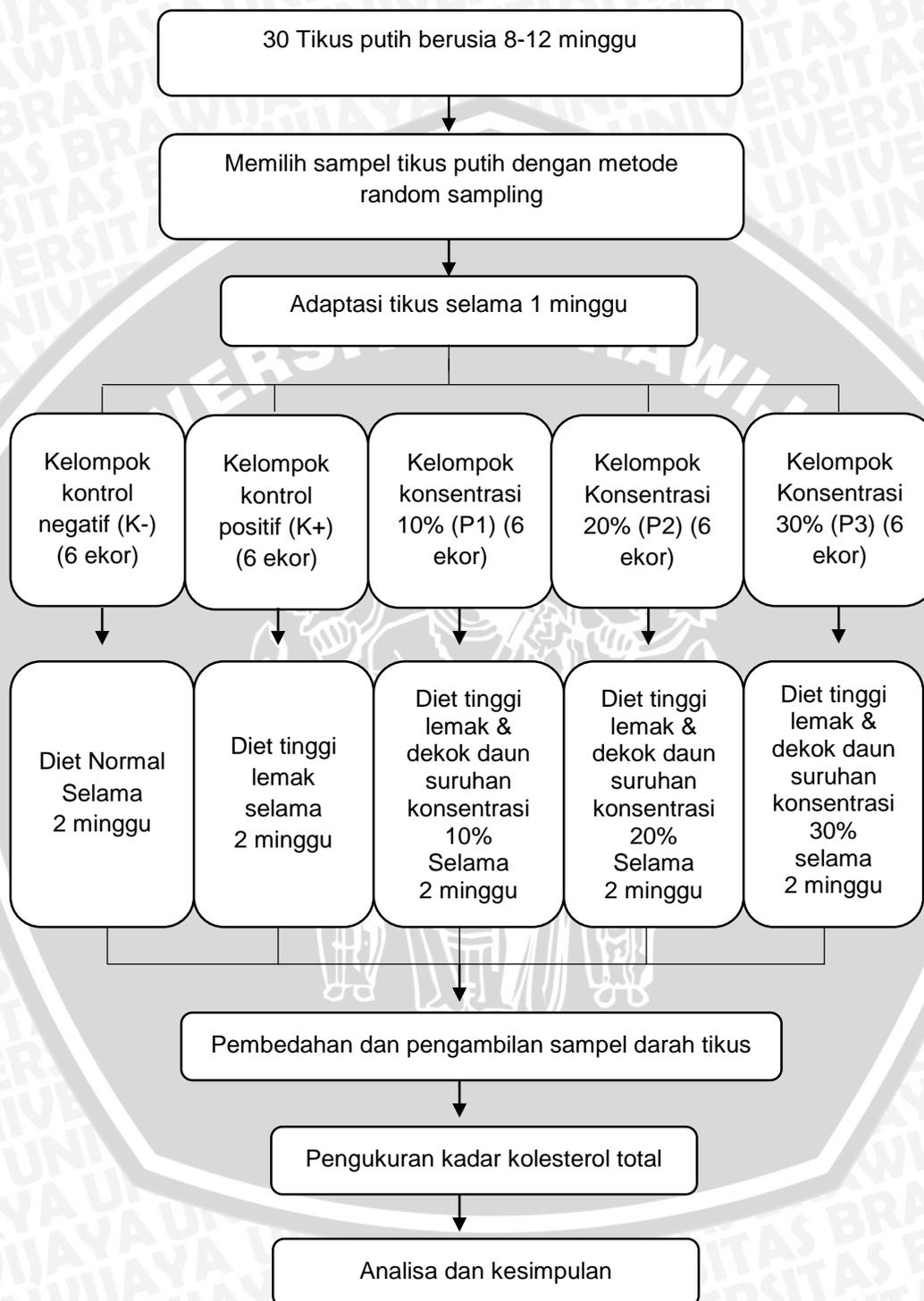
Suhu inkubasi : 20-25°C atau 37°C

	Blanko	Sampel atau standart
Sampel atau standar	-	10 $\mu$ L
Aqua bidestilata	10 $\mu$ L	-
Reagen	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Campur, inkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25° atau selama 10 menit pada suhu 37°C. Absorbansi terhadap blanko dibaca dalam waktu 1 jam.		

Kalkulasi:

$$\text{Kolesterol (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ Sampel}}{\Delta A \text{ Standar}} \times \text{Konsentrasi standar (200 mg/dl)}$$

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 kolesterol total pada tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variences*. Uji statistik *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata kolesterol total antar kelompok kontrol dengan perlakuan. Penelitian ini bermakna bila nilai  $p < 0,05$  dan hipotesis yang menyatakan bahwa daun suruhan (*Peperomia pellucida* [L]. kunth) menurunkan kadar kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus 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 kolesterol total antar kelompok kontrol dan perlakuan,  $H_1$  pada penelitian ini adalah terdapat beda kadar kolesterol total antar kelompok kontrol dan perlakuan.