

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen untuk melihat pengaruh pemberian biskuit tempe-kelor terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) pada tikus jantan wistar. Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Desain penelitian disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Rancangan Acak Lengkap

Taraf perlakuan	Replikasi					
	1	2	3	4	5	6
P ₁	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆
P ₂	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆
P ₃	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆

Keterangan :

- P₁ = tikus wistar jantan gizi normal, ransum normal
- P₂ = tikus wistar jantan gizi kurang, ransum normal
- P₃ = tikus wistar jantan gizi kurang, ransum biskuit
- X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₃₆ unit percobaan

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus wistar (*Rattus novergicus wistar*) dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi
 - a. Tikus jantan, berbulu putih, sehat, dan aktif
 - b. Umur 4-5 minggu yaitu pada saat lepas saph (ekstrapolasi disajikan pada Lampiran 4)
 - c. Berat Badan 50-60 gram
2. Kriteria Eksklusi
 - a. Tikus yang selama 2-3 hari berturut-turut tidak mau makan
 - b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
 - c. Tikus yang selama pengkondisian gizi kurang tidak mengalami penurunan berat badan

Dalam penelitian ini menggunakan 3 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dibutuhkan 6 ekor tikus dengan jumlah sampel minimal sebanyak 18 ekor tikus. Namun, pada penelitian ditambahkan 4 ekor tikus sebagai cadangan sehingga total sampel sebanyak 22 ekor tikus.

Jumlah tikus untuk masing-masing taraf perlakuan dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut :

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

$$3(n-1) \geq 15$$

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

$$n \geq 6 \text{ subyek penelitian}$$

$$n = 6 \text{ subyek penelitian}$$

Keterangan :

t = perlakuan (3 perlakuan)

n = jumlah subjek penelitian

15,00 = nilai deviasi

3. Teknik Randomisasi

Teknik randomisasi pada rancangan ini memungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk menjadi sampel dalam kelompok kontrol dan perlakuan. Pengambilan sampel dilakukan pengacakan sebagai berikut;

- Memberikan nomer urut 1 – 22 pada tikus
- Memberikan bilangan acak pada setiap tikus. Bilangan acak terdiri dari 3 digit angka
- Memberikan ranking pada setiap tikus sesuai dengan angka acak yang telah dibuat. Angka ranking dijadikan sebagai dasar penentuan kelompok. Ranking 1 – 7 masuk dalam P₁, ranking 8 – 15 masuk dalam P₂, dan ranking 16-22 masuk dalam P₃. Randomisasi tikus percobaan disajikan pada Lampiran 3.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Mei – Juni 2018.

2. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Pemeliharaan Tikus Poltekkes Malang untuk proses pembuatan ransum dan pemeliharaan tikus.
- b. Laboratorium Universitas Muhammadiyah Malang untuk analisis kadar malondialdehyde (MDA) serum.

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Alat pembuatan ransum tikus : baskom, sendok, dan timbangan elektrik merk Dextra CH-302.
- b. Alat pemeliharaan tikus : kandang metabolik sesuai jumlah tikus, tempat ransum, dan botol air.
- c. Alat penimbangan tikus dan sisa ransum tikus : timbangan elektrik merk Dextra CH-302.
- d. Alat pembedahan tikus : meja bedah, gunting bedah, pinset, jarum suntik, toples anestesi, masker, dan sarung tangan.
- e. Alat pengambilan dan penyimpanan sampel darah : *Spuit disposable*, jarum suntik 3 ml, jarum suntik 1 ml, tabung vacutainer warna merah, tabung *ependof* untuk penyimpanan serum, dan *sentrifuge*.
- f. Alat preparasi dan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) serum : spektrofotometer (PC-control EZRead 400 series ELISA Reader), sentrifuge, tabung reaksi, tabung *eppendorf*, pipet ukur

2. Bahan

- a. Ransum tikus
 - Ransum normal modifikasi
 - Ransum rendah protein
 - Ransum biskuit tempe-kelor
- b. Bahan pemeliharaan tikus
 - Air
- c. Bahan pembedahan tikus
 - Kloroform

- d Bahan preparasi dan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) serum:
- Serum 200 μ l
 - TCA 20% 0,5 ml
 - TBA 0,67% 0,6 μ l
 - Supernatant 1 ml

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Pemberian biskuit tempe-kelor
2. Variabel Terikat : Kadar *malondialdehyde* (MDA)

F. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur
Pemberian biskuit tempe-kelor	Pemberian biskuit tempe-kelor sebagai ransum tikus wistar jantan yang diberikan selama 28 hari setelah tikus menderita gizi kurang	Menimbang ransum biskuit tempe-kelor 15 gram/hari dengan timbangan elektrik (merk Dextra CH-302).	Rasio
Kadar MDA	Senyawa aldehida yang merupakan hasil akhir peroksida lipid yang dapat digunakan sebagai biomarker tingkat stress oksidatif.	Jumlah <i>malondialdeyde</i> (MDA) di dalam serum (nmol/ml) yang diuji dengan menggunakan spektrofotometer	Rasio

G. Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan melakukan adaptasi tikus wistar selama 4 hari dengan pemberian ransum normal. Dilanjutkan dengan mengkondisikan tikus wistar menjadi gizi kurang dengan diberikan ransum rendah protein selama 14 hari. Tahap selanjutnya, pemberian perlakuan yaitu ransum biskuit tempe-kelor selama 28 hari pada tikus gizi kurang. Kemudian, pada akhir penelitian dilakukan pengambilan sampel darah dari jantung tikus untuk menganalisis kadar *malondialdeyde* (MDA). Berikut penjelasan prosedur penelitian secara rinci :

1. Persiapan Peneliti Saat Menangani Hewan Coba

- a. Memakai jas lab
- b. Mencuci tangan
- c. Memakai masker dan penutup kepala

2. Prosedur Pemegangan Tikus

- a. Memegang pada bagian pangkal (bukan pada bagian ekor)
- b. Memegang pada bahu, dibelakang kaki bagian depan
- c. Memosisikan ibu jari dibawah mandibula untuk mencegah tergigit
- d. Memegang kaki bagian belakang dengan tangan yang lain

Pemegangan tikus hewan coba dengan benar bertujuan untuk membuat tikus merasa aman sesuai dengan etika penggunaan hewan coba, dimana tikus harus terhindar dari rasa stres. Selama penelitian, pemegangan tikus dilakukan pada sahan penimbangan berat badan dan saat kandang tikus dibersihkan.

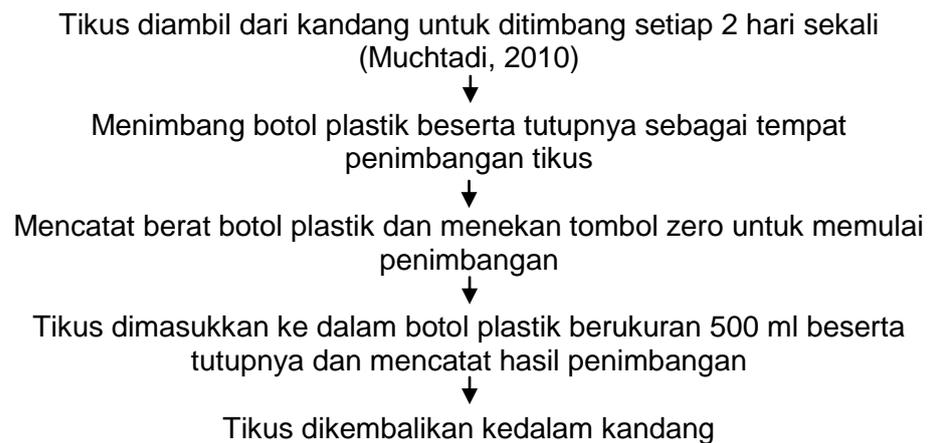
3. Pemeliharaan Hewan Percobaan

- a. Persiapan kandang metabolik yang tidak diberi sekam dengan tujuan untuk memisahkan antara feses dan urin tikus.
- b. Tikus dimasukkan pada kandang metabolik yang telah disiapkan (satu kandang metabolik untuk satu tikus).
- c. Adaptasi tikus selama 4 hari dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan kondisi kandang metabolik dan lingkungan laboratorium.
- d. Kandang metabolik dibersihkan 2 kali dalam seminggu untuk mencegah munculnya penyakit.
- e. Menjaga suhu laboratorium berada pada kisaran suhu kamar 20 - 25°C.
- f. Lampu laboratorium dinyalakan pada pagi hari dan dimatikan pada sore hari sebagai fase gelap terang (12 jam :12 jam), untuk menyesuaikan dengan habitat tikus, dimana tikus merupakan hewan malam (Muchtadi, 2010).
- g. Ransum diberikan sebanyak 1 kali dalam sehari secara *ad libitum*, yaitu pukul 07.00 WIB dan mengontrol ransum pukul 16.00 WIB. Kebutuhan makanan bagi setiap tikus putih setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika makanan tersebut merupakan makanan kering.

- h. Menimbang sisa ransum setiap pagi sebelum diberikan ransum pada hari tersebut. Jumlah ransum dan minuman diberikan secara *ad libitum*, karena tikus harus terbebas dari rasa lapar dan haus.

(Priambodo,1995 dalam Meihardiani, 2013)

4. Penimbangan Berat Badan Tikus



Gambar 2. Diagram Alir Penimbangan Berat Badan Tikus (Widodo dkk, 2006)

5. Pemberian Perlakuan

Pemberian jenis ransum tikus disesuaikan dengan taraf perlakuan. Pemberian perlakuan berupa pemberian ransum normal mulai awal hingga akhir penelitian (P_1), pemberian ransum normal selama adaptasi dilanjutkan ransum rendah protein selama pengkondisian gizi kurang, dan ransum normal selama 28 hari (P_2), pemberian ransum normal selama adaptasi, ransum rendah protein selama pengkondisian gizi kurang, dan ransum biskuit tempe-kelor selama 28 hari (P_3).

Menurut Priambodo (1995) dalam Meihardiani (2013) kebutuhan makanan bagi seekor tikus putih setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika makanan tersebut merupakan makanan kering. Bahan dasar makanan tikus dapat juga sedikit bervariasi dengan kandungan protein 15%, lemak 5%, pati 45-50%, serat kasar 5%, dan abu 4-5% (Kusumawati, 2004). Ransum yang diberikan pada masing-masing kelompok tikus wistar sebagai berikut :

a. Kelompok tikus normal dengan ransum normal (kontrol) (P₁)

Ransum yang diberikan berupa ransum standar tikus berupa ransum normal dengan komposisi susu skim, pati jagung, minyak jagung, mineral mix, vitamin mix, selulosa dan air (dokumentasi bahan ransum disajikan pada Lampiran 14). Ransum normal diberikan selama masa adaptasi 4 hari, kemudian dilanjutkan pemberian selama 14 hari, dan masa perlakuan selama 28 hari. Sehingga pemberian ransum normal pada kelompok kontrol selama 46 hari. Kandungan gizi ransum normal disajikan pada Tabel 8. Cara pembuatan ransum normal disajikan pada lampiran 5.

Tabel 8. Kandungan Gizi Ransum Normal dalam 15 Gram

Kandungan	Jumlah	% Terhadap Energi
Energi (kalori)	62,2	
Protein (gram)	2,35	15,8
Lemak (gram)	2	28,9
Karbohidrat (gram)	8,6	55,3

b. Kelompok tikus gizi kurang dengan ransum normal (P₂)

Ransum yang diberikan berupa ransum rendah protein dan ransum normal. Ransum yang diberikan berupa ransum normal selama 4 hari masa adaptasi dilanjutkan dengan pemberian ransum rendah protein selama 14 hari yang memiliki komposisi terdiri dari pati jagung, minyak jagung, mineral mix, vitamin mix, selulosa dan air (dokumentasi bahan ransum rendah protein disajikan pada Lampiran 14). Dilanjutkan dengan pemberian ransum normal pada masa perlakuan selama 28 hari. Perbandingan kandungan gizi ransum normal dan ransum rendah protein disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Kandungan Gizi Ransum Normal dan Ransum Biskuit Tempe-Kelor dalam 15 Gram

Kandungan	Ransum Normal		Ransum Rendah Protein	
	Jumlah	% terhadap Energi	Jumlah	% terhadap Energi
Energi (kalori)	62,2		54,7	
Protein (gram)	2,35	15,8	0,04	0,3
Lemak (gram)	2	28,9	1,21	19,9
Karbohidrat (gram)	8,6	55,3	10,92	79,8

Kandungan protein pada ransum rendah protein jauh berbeda dengan ransum normal karena ransum tersebut bertujuan untuk menurunkan berat badan tikus menjadi gizi kurang. Permadi (2011) mengatakan bahwa kekurangan asupan protein dalam ransum menyebabkan gangguan pada penyerapan dan transportasi zat-zat gizi, sehingga ransum yang dikonsumsi tidak dapat menambah massa otot, bahkan sebaliknya. Ransum yang dikonsumsi hanya berfungsi untuk mempertahankan hidup sehingga berat badan tikus mengalami penurunan.

c. Kelompok tikus gizi kurang dengan ransum biskuit tempe-kelor (P₃)

Ransum yang diberikan berupa ransum normal, rendah protein dan ransum biskuit tempe-kelor. Ransum yang diberikan berupa ransum normal selama 4 hari masa adaptasi dilanjutkan dengan pemberian ransum rendah protein selama 14 hari. Dilanjutkan dengan pemberian ransum biskuit tempe-kelor selama 28 hari berikutnya (dokumentasi bahan ransum biskuit tempe-kelor disajikan pada Lampiran 14). Biskuit tempe-kelor dihaluskan terlebih dahulu, sehingga dari segi bentuk dan tekstur menyerupai ransum normal. Perbandingan kandungan energi dan zat gizi ransum normal, ransum rendah protein dan ransum biskuit tempe-kelor disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Kandungan Gizi Ransum Normal, Ransum Rendah Protein, dan Ransum Biskuit Tempe-Kelor dalam 15 Gram

Kandungan	Ransum Normal		Ransum Rendah Protein		Ransum Biskuit Tempe-Kelor	
	Jumlah	% terhadap Energi	Jumlah	% terhadap Energi	Jumlah	% terhadap Energi
Energi (kalori)	62,2		54,7		68,2	
Protein (gram)	2,35	15,8	0,04	0,3	2,44	14,40
Lemak (gram)	2	28,9	1,21	19,9	2,16	28,50
Karbohidrat (gram)	8,6	55,3	10,92	79,8	9,75	57,10

Kandungan energi dan zat gizi ransum normal dan ransum biskuit tempe-kelor memiliki perbedaan zat gizi berdasarkan persentase terhadap energi adalah kurang dari 5%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan energi dan zat gizi pada ransum normal dan biskuit tempe-kelor relatif sama atau isokalori.

6. Euthanasia

Tikus wistar dieuthanasia dengan anastesi menggunakan kloroform / ether sesuai dengan anjuran *Institutional Animal Care and Use Comitte*, dimana bagi tenaga yang belum tersertifikasi lebih dianjurkan melakukan pengorbanan hewan coba dengan menggunakan kloroform (IACUC, 2015). Tikus dimasukkan dalam toples dan ditutup dengan rapat, kemudian ether dituang pada kapas sebanyak 10 ml, dan dimasukkan dalam toples. Dilakukan pengamatan terhadap pernapasan dan denyut jantung tikus ± 15 detik, apabila tikus sudah tidak bernapas, maka sudah dapat dilakukan pembedahan dan pengambilan darah, dimana pada prinsipnya tikus harus terhindar dari rasa sakit (Ridwan, 2013).

7. Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah pada akhir penelitian dilakukan dengan cara pembedahan untuk mendapatkan darah dari jantung tikus wistar. Pengambilan darah dari jantung bertujuan untuk mendapatkan volume darah yang lebih banyak dibandingkan dengan pengambilan darah di bagian ekor dan mata tikus. Sebelum dibedah, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam (Tubagus dkk., 2015). Kemudian, tikus dilakukan euthanasia sampai tikus kehilangan kesadaran (pingsan). Selanjutnya, menurut Pertiwi (2016) proses pembedahan dan pengambilan sampel darah pada tikus sebagai berikut :

- a. Tikus diterlentangkan pada baki pembedahan (posisi *supine*) menggunakan jarum untuk menusuk kaki sehingga tikus terlentang lebar.
- b. Melakukan insisi *midline* pada otot dinding perut dari ujung stenum hingga simfisis pubis. Pada potongan *midline* akan terjadi sedikit pendarahan. Potongan pada otot abdomen tidak mengenai diafragma untuk menghindari *pneumothorax*.
- c. Mencari letak jantung yang tepat yaitu dibagian kiri dada di antara costae ke 3 dan 4 di sebelah sinister sternum. Memasukkan jarum suntik ke bagian jantung sedalam 5 mm dari torak menuju dagu. Jarum suntik membentuk sudut 25-30° dari dadat tikus.
- d. Darah langsung diambil sebanyak 5 ml menggunakan *sprit* dan ditampung dalam vacuotainer
- e. Darah disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama ± 5 menit untuk memisahkan serum dan sel darah.

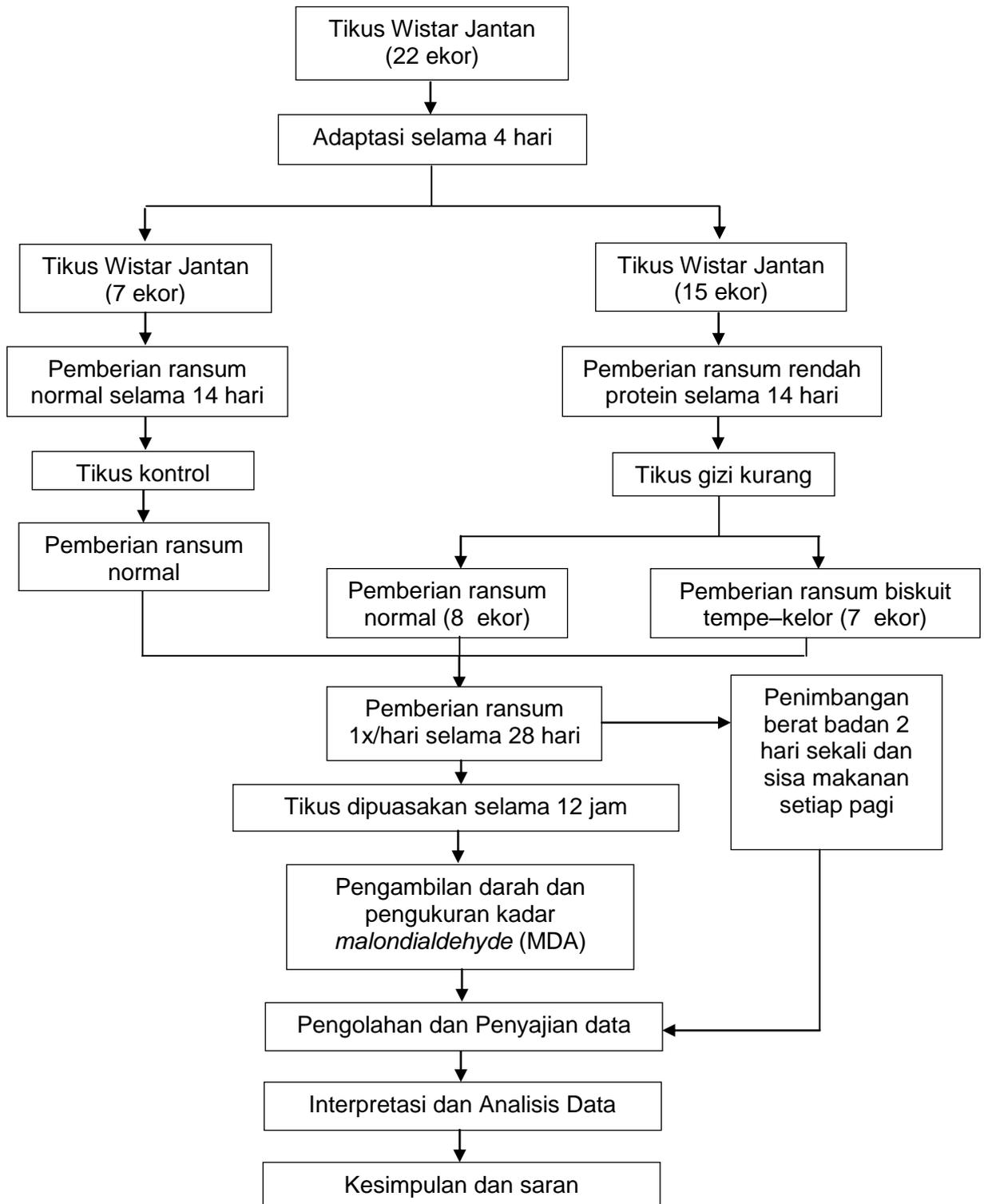
- f. Mengambil sampel serum menggunakan pipet dan dimasukkan pada tabung *eppendorf*. Serum yang telah didapat, disimpan pada lemari pendingin suhu - 20°C bila tidak langsung dilakukan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA).

8. Pengukuran Kadar *Malondialdeyde* (MDA)

Menurut Pertiwi (2016) pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) serum menggunakan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Serum hasil sentrifugasi diambil sebanyak 200 µl lalu dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge* yang kosong
- b. Menambahkan larutan *Trichloroacetic Acid* (TCA) 20% sebanyak 0,5 ml
- c. Menambahkan larutan *Thiobarbituric Acid* (TBA) 0,67% sebanyak 1 ml ke dalam supernatant 1 ml
- d. Serum dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit
- e. Serum didinginkan pada suhu kamar
- f. Hasil akhir serum dibaca dengan alat spektrofotometer (PC-control EZRead 400 series ELISA Reader) dengan panjang gelombang 530 nm

9. Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian

I. Metode Pengumpulan Data

1. Asupan makanan

Asupan makanan tikus diperoleh dari selisih berat ransum yang diberikan dengan berat ransum yang tersisa.

2. Berat badan tikus

Berat badan tikus diperoleh dari hasil penimbangan tikus setiap 2 hari sekali menggunakan timbangan elektrik.

3. Kadar *malondialdehyde* (MDA) serum

Data kadar *malondialdehyde* (MDA) serum diperoleh dari pemeriksaan laboratorium pada sampel serum tikus saat akhir penelitian yang dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS).

J. Metode Analisis Data

Data yang terkumpul dilakukan *editing*, *coding*, dan tabulasi. Semua data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata \pm standar error (*Mean \pm SD*). Data diolah menggunakan program komputer SPSS 16, kemudian dilakukan beberapa uji, antara lain:

1. Uji Normalitas Data

Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk*, karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila distribusi data normal, maka didapatkan hasil $p > 0,05$.

2. Uji Varians

Uji varians (*Levene's test*) digunakan untuk mengetahui homogenitas dari dua atau lebih kelompok. Apabila homogenitas sama, maka didapatkan $p > 0,05$.

3. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar *malondialdehyde* (MDA) pada kelompok perlakuan yang terdistribusi normal dan varians data homogen menggunakan uji parametrik One Way ANOVA atau sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan. Namun, apabila distribusi data tidak

normal dan varians data tidak homogen, maka sebagai alternatif dapat digunakan uji *Kruskal Wallis*.

4. Uji *Post Hoc* (Lanjutan)

Uji *post hoc* bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA). Apabila terdapat perbedaan nyata dari uji *One Way ANOVA* dengan hasil $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji beda *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Namun, untuk uji alternatif digunakan *Mann-Whitney*.

K. Instrumen Analisis Data

Instrumen untuk analisis data antara lain kalkulator *scientific*, computer dengan program *Microsoft word*, *Microsoft excel*, dan SPSS 20,0 serta alat tulis.