

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen untuk melihat pengaruh pemberian biskuit tempe-kelor terhadap trigliserida dan total kolesterol darah tikus wistar. Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Desain penelitian disajikan pada tabel 9.

Tabel 9. Rancangan acak kelompok

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 gizi normal, ransum normal

P₂ = tikus wistar gizi kurang, ransum normal

P₃ = tikus wistar gizi kurang, ransum biskuit

X₁₁, X₁₂, X₁₃, ..., X₃₆: unit percobaan

B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus starin wistar* dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi :

- a. Jenis kelamin jantan, berbulu putih, sehat dan aktif
- b. Umur 4 – 5 minggu
- c. Berat badan 50 – 60 gram

2. Kriteria eksklusi :

- a. Tikus yang selama penelitian 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 sebanyak 25%

Desain penelitian ini menggunakan 3 taraf perlakuan.

Masing-masing taraf perlakuan dilakukan 6 kali replikasi sehingga total tikus yang digunakan sebanyak 18 ekor. 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 subyek penelitian

15 : nilai deviasi

C. Teknik Randomisasi

Teknik randomisasi pada rancangan ini memungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk menjadi sampel dalam tiap taraf perlakuan. Pengambilan sampel dilakukan pengacakan sebagai berikut :

- Memberikan nomor urut 1-18 pada tikus
- Memberikan bilangan acak pada setiap tikus. Bilangan acak terdiri dari 3 digit angka
- Memberikan rangking pada setiap tikus sesuai dengan angka acak yang telah dibuat. Angka rangking dijadikan sebagai dasar penentuan kelompok. Rangking 1-6 masuk dalam P1, rangking 7-12 masuk dalam P2, rangking 12-18 masuk dalam P3.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan mulai bulan April - Mei 2018.

2. Tempat Penelitian

- a. Pembuatan ransum, pemeliharaan, pemberian perlakuan, dan pembedahan tikus dilakukan di Laboratorium Pemeliharaan Tikus Poltekkes Kemenkes Malang.
- b. Pemeriksaan profil lipid tikus dilakukan di laboratorium faal/fisiologi Universitas Muhammadiyah Malang

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Alat pembuatan ransum tikus :

Baskom, pengaduk, sarung tangan plastik, timbangan analitik atau elektrik merk Tanitia tipe Tokyo Japan CAP 2,25 kg Grand 109

- b. Alat pemeliharaan tikus :

Kandang metabolik sesuai dengan jumlah tikus, tempat ransum, dan botol air

- c. Alat penimbangan tikus dan sisa ransum tikus :
Timbangan elektrik (merk Tanitia tipe Tokyo Japan CAP 2,25 kg, Grand 109)
- d. Alat pembedahan tikus :
Meja bedah, gunting bedah, pinset, jarum suntik, toples anestesi, sarung tangan
- e. Alat pengambilan dan penyimpanan sampel darah
Spuit disposable, jarum suntik 10 ml, tabung valcon 15 ml, tabung *ependof* untuk penyimpanan serum, mikropipet, *sentrifuse*
- f. Alat untuk pengukuran Profil lipid:
Spuit, sentrifuge, spektrofotometer, penjepit (block holder), mikropipet, pipet ukur, blue tip, vacutainer tube

2. Bahan

a. Ransum Normal

Ransum normal yang digunakan dalam penelitian adalah ransum modifikasi dengan berbahan dasar susu skim, pati jagung, minyak jagung, mineral mix, vitamin mix, selulosa, dan air. Tabel 10 menunjukkan kandungan gizi ransum normal dalam 20 gram.

Tabel 10. Kandungan Zat Gizi Ransum Normal dalam 20 gram

Kandungan gizi	Jumlah	Persentase (%)
Energi (kalori)	82,9	
Protein (gram)	3,1	15,2
Lemak (gram)	2,7	29,3
Karbohidrat (gram)	11,5	55,5

b. Ransum bebas protein

Ransum bebas protein diberikan selama 14 hari sebanyak 20 gram/hari. Kandungan gizi ransum bebas protein dalam 20 gram disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Kandungan Energi dan Zat Gizi Ransum Rendah Protein dalam 20 gram

Kandungan gizi	Jumlah	Persentase (%)
Energi (kkal)	72,9	
Protein (g)	0,05	0,3
Lemak (g)	1,6	19,9
Karbohidrat (g)	14,56	79,8

c. Ransum biskuit tempe-kelor

Ransum biskuit tempe-kelor diberikan selama 28 hari sebanyak 20 gram/hari. Kandungan gizi ransum biskuit tempe-kelor dalam 20 gram disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Kandungan Gizi Ransum Biskuit Tempe-Kelor dalam 20 gram.

Kandungan gizi	Jumlah	Persentase (%)
Energi (kkal)	90,96	
Protein (g)	3,26	14,3
Lemak (g)	2,88	28,5
Karbohidrat (g)	13	57,2
Densitas energi (kal/g)	4,54	

Sumber : Striata, 2017.

- d. Bahan pembedahan tikus
Kloroform, alkohol, kapas, *handgloves*
- e. Bahan analisis kimia darah
reagen albumin kit, reagen kolesterol, reagen trigliserida
- f. Bahan pemeliharaan tikus

F. Variabel Penelitian

1. **Variabel bebas** : Pemberian biskuit tempe-kelor
2. **Variabel terikat** : 1. Kadar Trigliserida
2.Kadar Total Kolesterol

G. Definisi Operasional

Tabel 13. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Metode dan alat ukur	Skala Ukur
Pemberian Biskuit Tempe kelor	Pemberian biskuit tempe-kelor sebagai ransum tikus yang diberikan selama 28 hari setelah tikus dalam kondisi gizi kurang dengan takaran ransum yang sama yaitu 15 gram/hari	Ransum biskuit dihitung dengan takaran 28 gram/hari menggunakan timbangan elektrik	Rasio
Kadar Trigliserida	Kadar trigliserida dalam tikus yang diukur setelah taraf perlakuan selesai dilakukan	Spektrofotometri	Rasio
Kadar Kolesterol	Kadar kolesterol dalam tikus yang diukur setelah taraf perlakuan selesai dilakukan	Spektrofotometri	Rasio
Tikus Wistar Gizi Kurang	Tikus wistar diberi ransum bebas protein selama 14 hari	Berat badan <25%	Rasio

H. 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 bebas protein selama 14 hari. Kemudian perlakuan selanjutnya dengan pemberian ransum biskuit tempe-kelor selama 28 hari dan dilanjutkan dengan pengambilan sampel darah dan menganalisis kimia darah trigliserida dan total kolesterol. Berikut penjelasan penelitian secara rinci :

1. Persiapan Peneliti saat Menangani Hewan Coba

- Mengenakan jas lab
- Mencuci tangan
- Menggunakan masker dan penutup kepala

2. Prosedur Pemegangan Tikus

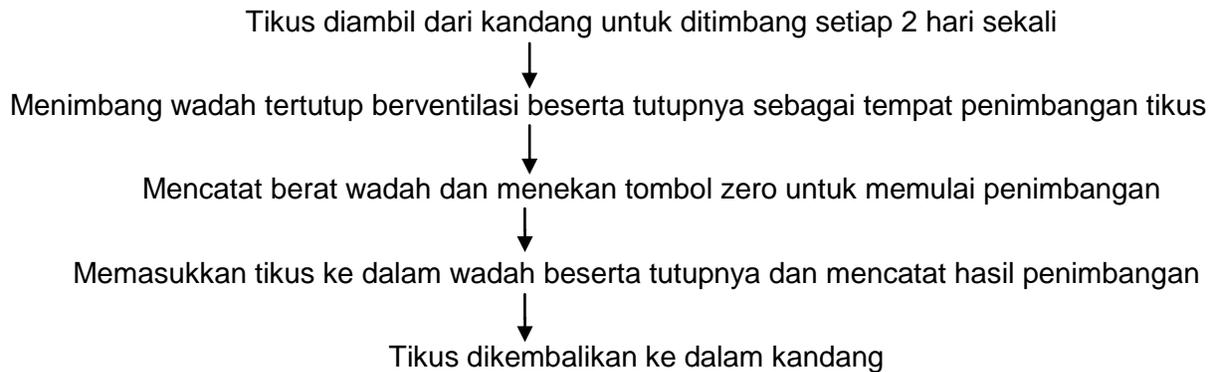
- Memegang pada bagian pangkal ekor (bukan pada bagian ekor)
- Memegang pada bahu, dibelakang kaki bagian depan
- Memosisikan ibu jari dibawah mandibula untuk mencegah tergigit
- Memegang kaki bagian belakang dengan tangan yang lain

Selama penelitian, pemegangan tikus dilakukan saat kandang tikus dibersihkan.

3. Pemeliharaan Hewan Percobaan

- Mempersiapkan kandang tikus, pemberian alas berupa sekam padi setebal 0,5 cm dan meletakkan wadah pakan dan minum.
- Memasukkan dalam kandang yang telah disiapkan (satu kandang untuk satu tikus).
- Mengadaptasikan tikus dengan kondisi laboratorium selama 4 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan perubahan kondisi kandang dan lingkungan.
- Membersihkan kandang 2 kali dalam seminggu untuk mencegah munculnya penyakit.
- Menjaga suhu laboratorium berada pada kisaran suhu kamar 20-25°C
- Menyalakan lampu laboratorium pada pagi hari dan mematikan lampu pada sore hari sebagai fase gelap terang (12 jam : 12 jam), untuk menyesuaikan dengan habitat tikus, dimana tikus merupakan hewan malam. (Muchtadi, 2010)
- Memberikan ransum sebanyak 1 kali dalam sehari secara *ad libitum*, yaitu pukul 07.00 WIB dan mengontrol ransum pukul 16.00 WIB. Kebutuhan makanan bagi seekor tikus putih setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika makanan tersebut merupakan makanan kering.
- Menimbang sisa ransum dilakukan setiap pagi sebelum diberikan ransum pada hari tersebut sehingga selisih berat ransum sebelum dan sesudah dimakan dinyatakan sebagai asupan harian. 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 1. Penimbangan Berat Badan Tikus (Muchtadi, 2010)

5. Pemberian Perlakuan

Pemberian perlakuan berupa pemberian ransum normal pada tikus normal (P_1), pemberian ransum normal pada tikus gizi kurang (P_2), dan pemberian ransum biskuit tempe-kelor pada tikus gizi kurang (P_3). Setiap hari ransum diberikan sebanyak 20 gram untuk setiap tikus (Hartanti, 2010).

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) (P_1)

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. Ransum normal diberikan selama 46 hari. Kandungan gizi ransum normal disajikan pada Tabel 15. Cara pembuatan ransum normal disajikan pada lampiran 3.

Tabel 14. Kandungan Gizi Ransum Normal dalam 20 gram

Kandungan	Jumlah	% Terhadap Energi
Energi (kalori)	82,9	-
Protein (gram)	3,1	15,2
Lemak (gram)	2,7	29,3
Karbohidrat (gram)	11,5	55,5

b. Kelompok Tikus Gizi Kurang Dengan Ransum Normal (P2)

Ransum yang diberikan berupa ransum normal selama 4 hari masa adaptasi dilanjutkan dengan pemberian ransum bebas protein selama 14 hari. Dilanjutkan dengan pemberian ransum normal pada masa perlakuan selama 28 hari.

c. Kelompok Tikus Gizi Kurang dengan Ransum Biskuit Tempe-Kelor (P3)

Ransum yang diberikan berupa ransum normal selama 4 hari masa adaptasi dilanjutkan dengan pemberian ransum bebas protein selama 14 hari. Dilanjutkan dengan pemberian ransum biskuit tempe-kelor selama 28 hari berikutnya. Biskuit dihaluskan terlebih dahulu, sehingga dari segi bentuk dan tekstur menyerupai ransum normal tikus. Perbandingan kandungan energi dan zat gizi ransum normal dan biskuit tempe-kelor disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15. Perbandingan Kandungan Energi dan Zat Gizi Ransum Normal dan Biskuit Tempe Kelor dalam 20 Gram

Kandungan gizi	Ransum Biskuit Tempe-Kelor		Ransum Normal	
	Jumlah	% terhadap energi	Jumlah	% terhadap energi
Energi (kkal)	90,96		82,9	
Protein (g)	3,26	14,3	3,1	15,2
Lemak (g)	2,88	28,5	2,7	29,3
Karbohidrat (g)	13	57,2	11,5	55,5

Kandungan energi dan zat gizi ransum normal dan biskuit tempe-kelor yang disajikan pada Tabel 15 memiliki perbedaan zat gizi berdasarkan persentase terhadap energi adalah kurang dari nilai α (5%) dengan tingkat kepercayaan 95%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan energi dan zat gizi pada kedua pakan relatif sama.

Pemberian ransum dan air sebanyak 1 kali dalam sehari, yaitu pada pukul 07.00 WIB dan dilakukan pengontrolan dan pengecekan pakan pada pukul 16.00 WIB. Ransum diberikan secara *ad libitum*. Pemberian ransum untuk tikus minimal sebesar 10% berat badan tikus (Widiartini, dkk., 2013). Jumlah asupan pakan tikus diperhatikan setiap hari, dengan tujuan tikus tidak akan kekurangan pakan pada hari selanjutnya. Sisa pakan/ransum ditimbang setiap pagi, sebelum pemberian ransum pada hari selanjutnya. Setelah dilakukan perlakuan selama 28 hari, maka dilakukan euthanasia.

6. Euthanasia

Tikus wistar dianestesi menggunakan kloroform sesuai dengan anjuran *Institutional Animal Care and Use Comitte*, dimana lagi 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 \pm 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

Pengambilan sampel darah dalam penelitian ini dilakukan dua kali, yaitu setelah dilakukan pengkondisian tikus gizi kurang (hari ke-18) dan akhir penelitian. Pengambilan sampel darah setelah dilakukan pengkondisian tikus gizi kurang (hari ke-18) bertujuan untuk standarisasi kadar albumin pada tikus gizi kurang sebelum diberikan perlakuan. Pengambilan sampel darah tersebut dilakukan melalui ekor tikus wistar. Prosedur pengambilan sampel darah dari ekor tikus wistar menurut Zulkifli dkk (2014) sebagai berikut :

- a. Tikus wistar diambil sampel darah di ekor bagian vena lateral. Sebelum diambil sampel darah, ekor tikus wistar diberi kompresan air hangat selama 5 menit untuk melebarkan vena.
- b. Ekor tikus wistar bagian vena lateral ditusuk dengan menggunakan spuit 3 ml untuk diambil darahnya.
- c. Darah ditampung pada eppendorf 1,5 ml.

Pengambilan sampel darah pada akhir penelitian dilakukan dengan cara pembedahan untuk mendapatkan darah dari jantung tikus wistar. Sebelum dibedah, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam (Tubagus dkk., 2015). Menurut Pertiwi (2016) proses pengambilan sampel darah pada tikus sebagai berikut :

- a. Tikus diterlentangkan pada baki pembedahan (posisi *supine*). Gunakan 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 *ependorf*. Serum yang telah didapat, disimpan pada lemari pendingin suhu -20°C bila tidak langsung dilakukan pengukuran kadar total kolesterol dan trigliserida.

I. Metode Analisis

a. Pengukuran Kadar Trigliserida

Kadar trigliserida ditetapkan dengan metode pengukuran BTO pack dengan spektrofotometri (Kayamori dkk., 1999). Langkah pertama siapkan 3 tabung reaksi yakni tabung blanko, tabung standart dan tabung standart dan tabung sampel. Tabung blanko diisi reagen trigliserida sebanyak 1000 μl , tabung standart diisi reagen standart sebanyak 10 μl , dan tabung sampel diisi serum yang diambil dengan mikropipet sebanyak 10 μl lalu ditambahkan reagen trigliserida sebanyak 1000 μl . Homogenkan masing-masing larutan dalam tabung lalu inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ukur absorbansi masing-masing larutan dalam tabung pada spektrofotometer, baca padat pada panjang gelombang 546 nm (Arianda, 2015).

Rumus perhitungan trigliserida:

$$\frac{\text{abs.sampel}}{\text{abs.standart}} \times \text{konsentrasi standart}$$

b. Pengukuran Kadar Total Kolesterol

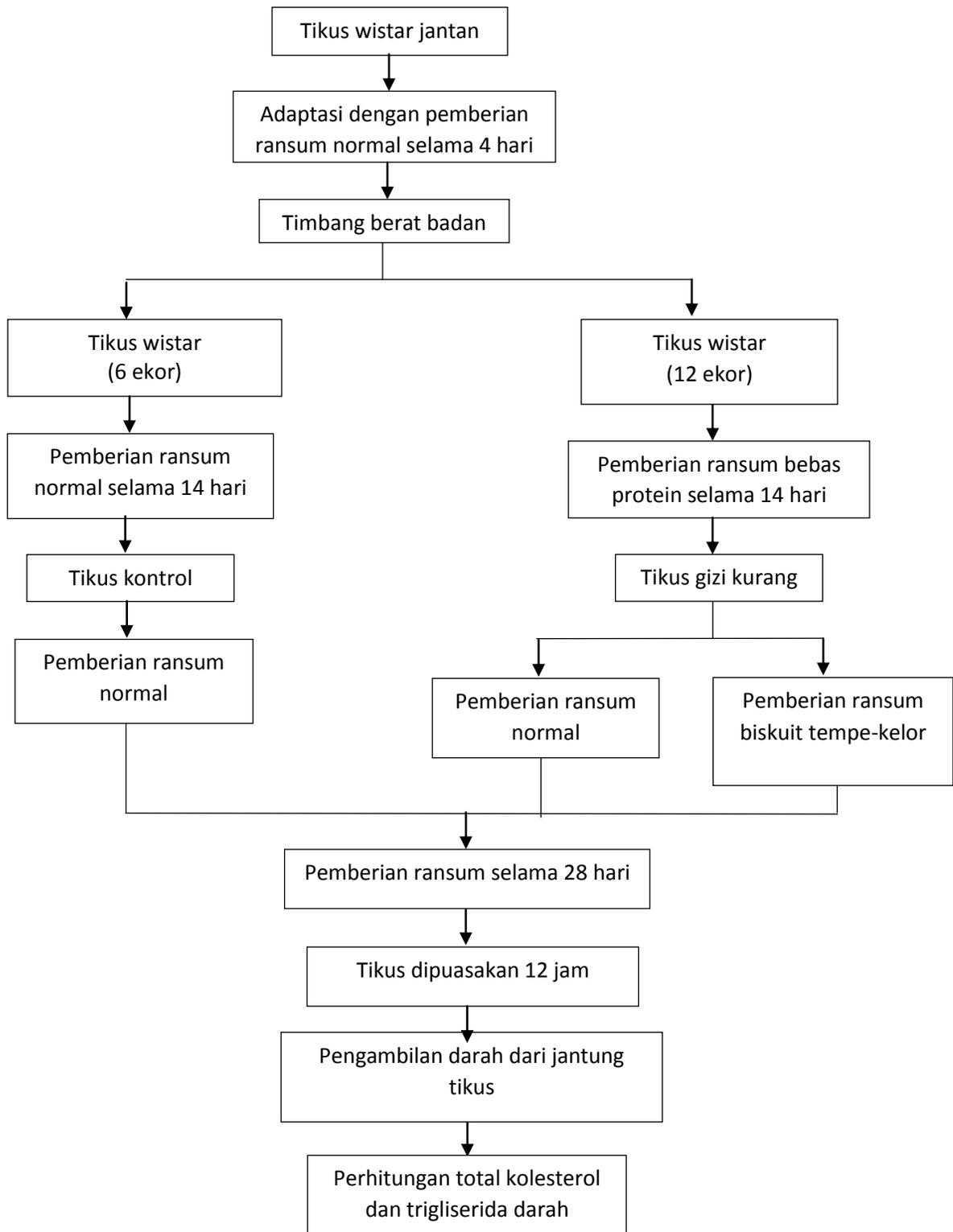
Kadar total kolesterol darah ditetapkan dengan metode pengukuran *Enzimatic Endpoint Method* dengan spektrofotometer (Kayamori dkk, 1999). Lagkah pertama siapkan 3 tbung reaksi yakni tabung blanko, tabung standart dan tabung sampel. Tabung blanko diisi reagen kolesterol sebanyak 1000 μl , tabung standart diisi reagen standart sebanyak 10 μl dan reagen kolesterol 1000 μl , tabung sampel diisi serum yang diambil dengan mikropipet sebanyak 10 μl lalu ditambahkan reagen kolesterol sebanyak 1000 μl . Langkah kedua yakni homogenkan masing-masing larutan dalam tabung lalu inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar atau 5 menit pada suhu 37°C . selanjutnya

ukur absorbansi masing-masing larutan dalam tabung pada spektrofotometer, baca pada panjang gelombang 546 nm (Arianda, 2015).

Rumus perhitungan total kolesterol :

$$\frac{\text{abs.sampel}}{\text{abs.standar}} \times \text{konsentrasi standart}$$

J. Diagram Alir Penelitian



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian

K. Metode Pengumpulan Data

1. Asupan makanan

Asupan makanan perhari dihitung dari selisih berat makanan yang diberikan dengan berat makan yang tersisa.

2. Berat badan tikus

Berat badan tikus diperoleh dengan menimbang tikus menggunakan timbangan elektrik

L. Pengolahan dan 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:

a. 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 $p > 0,05$.

b. Uji Varians

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

c. Uji Hipotesis

Uji hipotesis kadar albumin 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*.

d. Uji *Post Hoc* (Lanjutan)

Uji *post hoc* bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap kadar total kolesterol dan trigliserida. 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*.

M. Instrumen Analisis Data

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