

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode *True Experimental* dengan *Design Posttest Only Control*. Pemilihan desain ini karena peneliti ingin mengetahui perbedaan kadar MDA hewan coba pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Terdapat 5 perlakuan pada kelinci dengan masing-masing kelompok terdapat 6 ekor kelinci yang dilakukan selama 5 minggu, kemudian diukur kadar MDA dalam darah kelinci.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium *Center of Excellence* (COE) Politeknik Kesehatan Malang.
- b. Pengambilan sampel darah tiap kelinci dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Politeknik Kesehatan Malang.
- c. Analisis pemeriksaan MDA dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Malang yang dibantu oleh Laboran yang telah lulus pendidikan jurusan teknologi laboratorium (analisis kesehatan).

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada Bulan Juli 2023 - Agustus 2023.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah kelinci jenis lokal, angora dan rex yang diberi diet *atherogenic* dengan jenis kelamin jantan.

2. Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik non-probability sampling dengan metode purposive sampling. Besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer (1963), sebagai berikut:

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \approx 5$$

Keterangan :

t = banyak perlakuan

r = banyak ulangan (Dewi et al, 2013).

Berdasarkan rumus diatas, menunjukkan bahwa besar sampel sebaiknya lebih dari 4,75. Oleh karena itu peneliti menggunakan 6 kelinci dalam setiap kelompok perlakuan dikarenakan sampel keseluruhan yang dibutuhkan sebanyak 30 kelinci.

3. Kriteria Sampel

Sampel memiliki kriteria, diantaranya kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria tersebut bertujuan untuk menentukan dapat atau tidaknya sampel digunakan. Kriteria eksklusi adalah kriteria yang apabila dijumpai menyebabkan objek tidak dapat digunakan dalam penelitian, sedangkan kriteria inklusi ialah apabila terpenuhi dapat mengakibatkan calon objek penelitian (Hajjah, 2012).

a. Kriteria inklusi dalam penelitian ini antara lain :

- 1) Kelinci jenis lokal, angora dan rex
- 2) Sehat dan aktif
- 3) Jenis kelamin jantan
- 4) Umur kelinci kisaran 2 bulan
- 5) Berat badan minimal 500 gram

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Kelinci yang selama 2-3 hari berturut-turut tidak mau makan.
- 2) Kelinci yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah sesuatu yang digunakan sebagai ciri, sifat, atau ukuran yang dimiliki atau didapatkan oleh satuan penelitian

tentang sesuatu konsep-konsep penelitian tertentu (Notoatmodjo, 2012:103).

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas (*independent variable*) dari penelitian ini adalah serbuk ekstrak takokak (*Solanum torvum Swartz*).

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat (*dependent variable*) dari penelitian ini adalah kadar MDA.

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
Pemberian Serbuk Ekstrak Takokak	Pemberian pakan yang terdiri dari serbuk ekstrak takokak, atherogenic dan pelet sebanyak 50 gram setiap kelinci dalam satu hari.	Pemberian serbuk ekstrak takokak dalam satuan gram dengan timbangan digital	Rasio
Berat Badan	Menimbang berat badan setiap seminggu sekali.	Menimbang dengan timbangan digital	Rasio
Kadar MDA	Kadar MDA kelinci yang dilihat dari hasil nilai laboratorium dan 2x pengambilan darah sesudah diberi perlakuan.	Spektrofotometri	Rasio
Kadar Kolesterol	Kadar kolesterol kelinci yang dilihat dari hasil nilai laboratorium dan dilakukan 2x pengambilan darah sesudah diberi perlakuan.	Spektrofotometri	Rasio

E. Tahapan Penelitian

1. Persiapan

a. Pembuatan Ekstrak Takokak

Prosedur pembuatan ekstrak takokak dilakukan berdasarkan hasil penelitian Kurniawan (2016). Ekstrak takokak merupakan minuman campuran alami yang berbahan dasar biji takokak dengan

campuran bahan lain seperti gula dan maltodextrin. Formula ini tidak mengandung bahan pengawet, bahan pewarna buatan dan bahan perasa buatan. Kandungan produk (dalam takaran saji 40 gram) terdiri dari 8% biji takokak.

1) Alat

- a) Sendok
- b) Timbangan digital
- c) Teflon
- d) Mangkok
- e) Kompor
- f) Oven
- g) Sepatula
- h) Blender

2) Bahan

- a) Tepung takokak
- b) Maltosa
- c) Gula halus

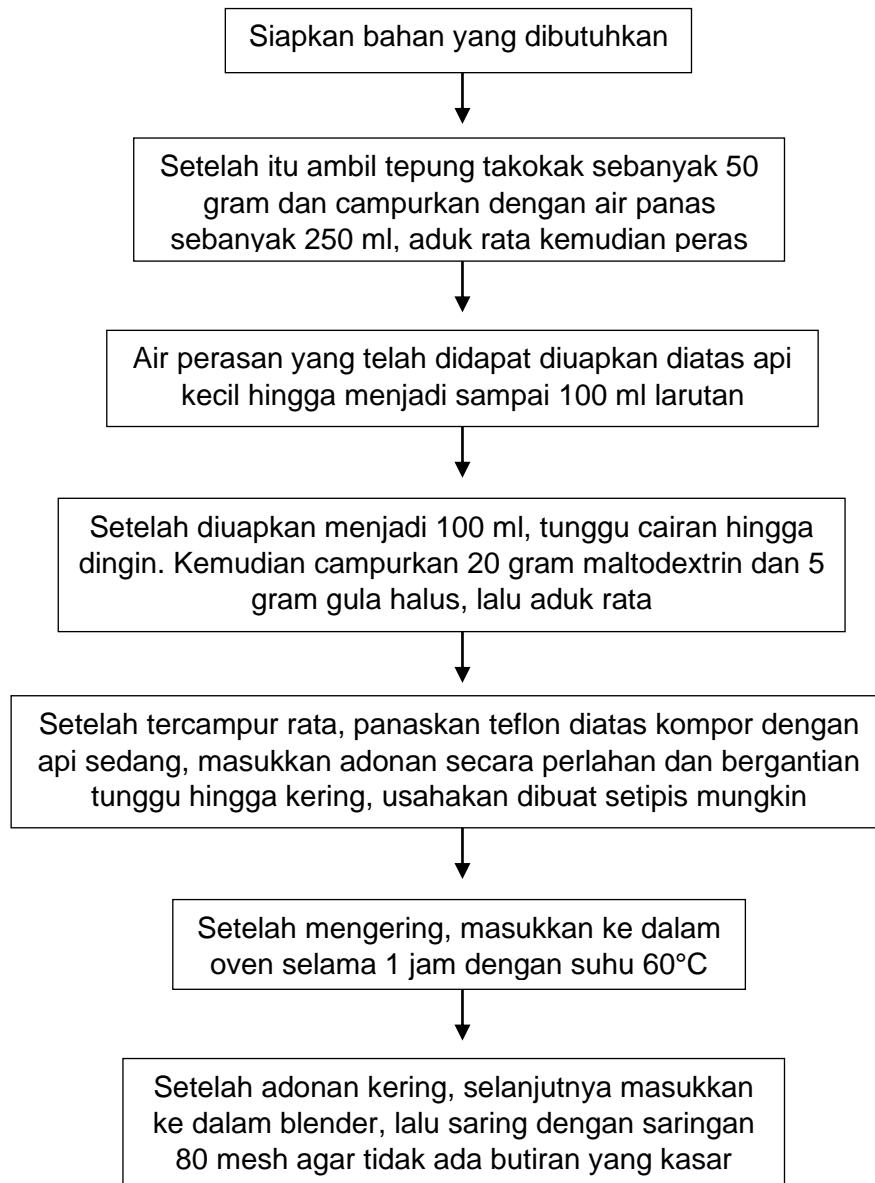
3) Pembuatan Serbuk Buah Takokak

a) Persiapan :

Mencuci tangan dengan sabun kemudian memakai APD (Alat Pelindung Diri).

- b) Buah takokak segar dilakukan pencucian, kemudian dilakukan *steam blanching* selama 5 menit.
- c) Setelah itu dilakukan penimbangan sebanyak 25 gram. Kemudian dilakukan penghancuran dengan blender.
- d) Maka didapat buah takokak bubuk.

4) Prosedur Pembuatan Ekstrak Takokak



Gambar 3. Prosedur Pembuatan Ekstrak Takokak

b. Pembuatan Formula *Atherogenic*

Prosedur pembuatan diet atherogenic dilakukan berdasarkan hasil penelitian Kasiyati (2020). Berikut prosedur yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Alat
 - a) Sendok
 - b) Timbangan digital

- c) Baskom
 - d) Kompor
 - e) Panci
 - f) Sepatula
 - g) Blender
- 2) Bahan
- a) Pelet 500 gram
 - b) Kuning telur bebek 200 gram
 - c) Minyak jagung 100 gram
 - d) Gajih sapi 50 gram
- 3) Pembuatan *Fat Blend*
- a) Siapkan telur bebek, gosok cangkang telur bebek hingga kotoran hilang
 - b) Rebus telur bebek pada air mendidih selama 15 menit
 - c) Kupas telur bebek, pisahkan antara putih telur dan kuning telur
 - d) Remah kuning telur menggunakan tangan hingga benar benar hancur
 - e) Siapkan gajih sapi dan minyak jagung, timbang sesuai kebutuhan
 - f) Chopper gajih dan minyak jagung hingga halus
 - g) Masukkan hasil chopper ke dalam kuning telur yang sudah diremah
 - h) Aduk hingga benar benar tercampur rata
 - i) Bagi fat blend sesuai perlakuan dan kebutuhan
- 4) Mencampur Formula Atero Tiap Taraf Perlakuan
- a) Timbang fat blend untuk 10 hari pemberian karena kadar yang diberikan sangat kecil, sehingga dibuat untuk 10 hari untuk memudahkan penimbangan
 - b) Packing fat blend untuk 1 hari pemberian (sehingga ada 10 pack), dan beri label sesuai taraf perlakuan
 - c) Packing pellet untuk 1 hari pemberian (sehingga ada 10 pack), dan beri label sesuai taraf perlakuan
 - d) Fat blend simpan di showcase

2. Pemeliharaan Kelinci

Pemilihan kelinci sebagai hewan coba mempunyai banyak kelebihan diantaranya adalah sangat jinak dan non-agresif sehingga mudah untuk menangani dan mengamati, mudah dikembangbiakkan dan sangat ekonomis dibandingkan dengan memakai hewan yang lebih besar (Kasiyati, 2020).

Penelitian ini diawali dengan melakukan adaptasi kelinci selama 7 hari. Kelinci ditempatkan di kandang yang berupa kandang individu atau kandang baterai berukuran 45 cm x 30 cm x 40 cm. Setiap kandang berisi satu ekor kelinci yang dilengkapi dengan tempat pakan plastik dan botol air minum. Pemberian minum pada kelinci yaitu secara *ad libitum* yang artinya tidak ada pembatasan minum pada kelinci. Peralatan yang akan digunakan adalah alat kebersihan, timbangan duduk, dan label. Peralatan kebersihan pada umumnya untuk kebersihan kandang dan alat tulis sebagai pencatatan tiap penimbangan yang dilakukan setiap hari.

3. Pemberian Pakan dan Perlakuan pada Kelinci

a. Pemberian Perlakuan pada Kelinci

- 1) Siapkan pellet dan formula atherogenic yang sudah dicampur dengan serbuk ekstrak takokak.
- 2) Timbang pakan sebanyak 50 gram (formula atherogenic sebanyak 22,5 gram dan pellet sebanyak 33,6 gram).
- 3) Lalu berikan pakan ke tempat makanan kelinci yang diletakkan di dalam kandang sebanyak dosis yang diperlukan yaitu 50 gram untuk masing-masing kelinci dalam sehari. Kelinci makan secara alami tanpa bantuan alat.

b. Pengelompokan Pemberian Pakan Setiap Kelompok

Pemberian pakan sesuai dengan perlakuan yang direncanakan yaitu :

K- : kelompok kontrol negatif (pemberian pakan standar)

K+ : kelompok perlakuan dengan pemberian diet *atherogenic*

P1 : kelompok perlakuan dengan pemberian diet *atherogenic* dan ekstrak takokak sebanyak 10 mg/kgBB

P2 : kelompok perlakuan dengan pemberian diet *atherogenic* dan ekstrak takokak sebanyak 60 mg/kgBB

P3 : kelompok perlakuan dengan pemberian pakan standar dan ekstrak takokak sebanyak 60 mg/kgBB

4. Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan 2x yaitu pengambilan darah pertama pada minggu ke-4 dan pengambilan darah kedua pada minggu ke-5. Berikut persiapan pengambilan darah pada kelinci:

a. Persiapan Peneliti Saat Menangani Hewan Coba

- 1) Memakai jas lab
- 2) Mencuci tangan
- 3) Memakai masker, penutup kepala dan sarung tangan

b. Prosedur Pemegangan Kelinci

Menurut Dr. Siska (2019), pemegangan kelinci harus dilakukan dengan hati-hati. Berikut prosedur pemegangan kelinci :

- 1) Langkah pertama, mengeluarkan kelinci dari kandang dengan genggam kedua telinga kelinci dan bagian yang longgar pada tengkuknya, sementara tangan yang lain menahan badan dari bawah perut dan membiarkan kaki belakang bebas. Setelah kelinci berada diluar kandang, dekap kelinci kearah tubuh.
- 2) Pegang kulit di leher kelinci. Tahan bagian bawah kelinci dengan tangan yang lain. Saat memindahkan hewan, tetap pegang leher dan kulit kelinci.
- 3) Pemegang kelinci duduk di kursi dengan satu tangan memegang tengkuk dan yang lainnya memegang kedua kaki belakangnya di paha.
- 4) Taruh bagian bawah badan kelinci di antara paha petugas dan gunakan tangan untuk memegang kedua kaki depan. Pegang tengkuk dan telinga dengan tangan yang lain sehingga kepala tidak bisa bergerak.

Kelinci sangat rentan terhadap efek stres dan harus selalu didekati secara tenang dan percaya diri. Teknik penanganan hewan dapat mengurangi tingkat stres pada kelinci. Kelinci jauh lebih mudah

ditangani jika dilatih oleh petugas kandang yang terbiasa menanganinya. Kebanyakan hewan pengerat mencoba untuk menggigit ketika ditangani.

c. Prosedur Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan berdasarkan hasil penelitian Malole (1989). Berikut langkah-langkah pengambilan darah pada kelinci :

- 1) Pengambilan darah dilakukan oleh 2 orang, orang pertama bertugas memegang kelinci dan orang kedua adalah petugas laboratorium yang bertugas mengambil darah kelinci.
- 2) Pengambilan darah diambil dari arteri telinga kelinci karena banyak jaringan pembuluh darah di telinga kelinci (Anisa Rizki, 2022).
- 3) Bagian yang akan dilakukan pengambilan darah, dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Koleksi darah dengan volume yang lebih kecil dapat dilakukan dari vena (pembuluh lateral), namun jika volume darah yang dibutuhkan lebih banyak sebaiknya dikoleksi dari arteri (pembuluh sentral).
- 4) Ukuran jarum yang dipakai 21G atau yang lebih kecil (baik jarum suntik, atau jarum kupu-kupu).
- 5) Darah ditarik secara perlahan untuk menjaga telinga atau paha tetap kencang.
- 6) Posisi jarum yang dimasukkan ke dalam pembuluh darah pada sudut 200 atau kurang. Setelah jarum sudah didalam pembuluh, dengan hati-hati turunkan sudut jarum sehingga hampir sejajar dengan pembuluh darah dan dapat darah disedot dengan perlahan.
- 7) Ketika sampel darah telah dikumpulkan, perlahan-lahan tarik jarum pada sudut yang sama seperti sewaktu memasukkan jarum.
- 8) Tekan bagian atas arteri selama 3 menit untuk memberikan hemostasis.
- 9) Darah dimasukkan ke dalam tabung vacutainer.

5. Pengukuran Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan berdasarkan hasil penelitian Malole (1989). Berikut langkah-langkah pengukuran kadar MDA :

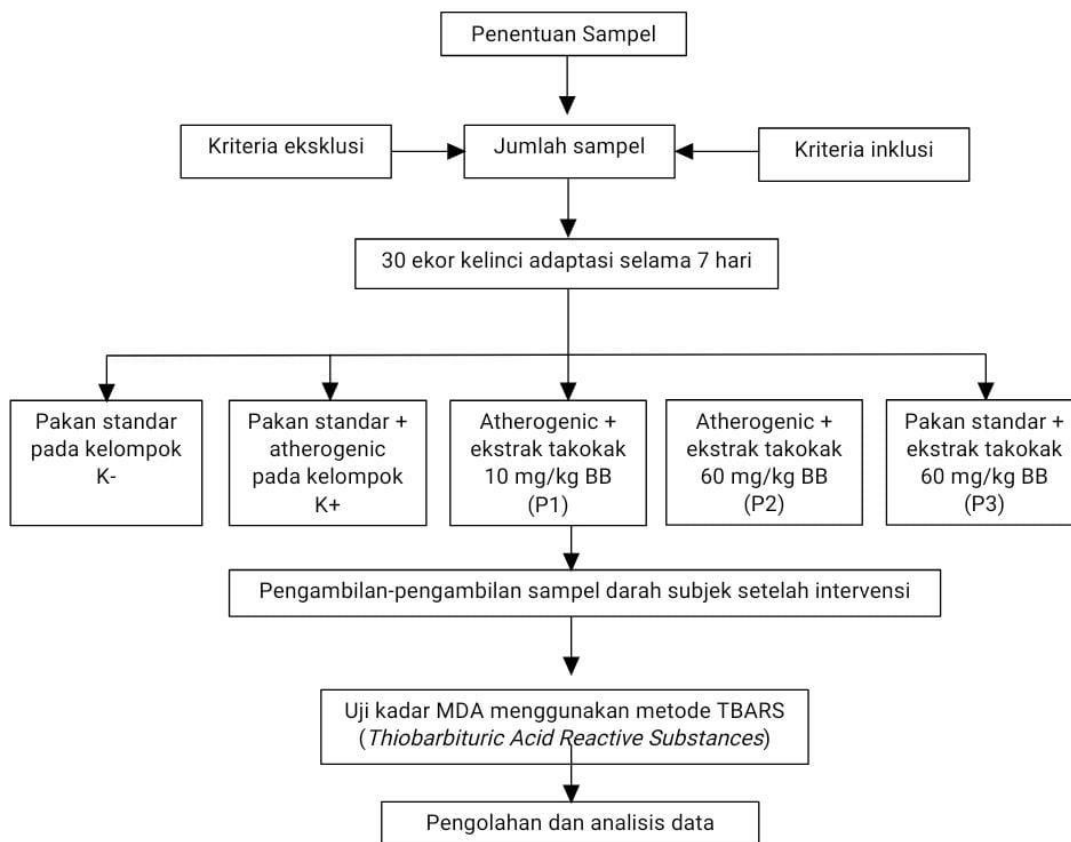
- 1) Mengambil darah dengan spuit pada bagian arteri telinga sebanyak 3 ml.
- 2) Kemudian ditambahkan 300 μ L NaCl-fisiologis ke dalam mortar.
- 3) Homogenat dimasukkan ke dalam tabung polipropilen dan ditambah 550 μ L akuades.
- 4) Kemudian ditambah 100 μ L TCA dan dihomogenkan.
- 5) Selanjutnya ditambah 250 μ L HCl 1N dan dihomogenkan.
- 6) Lalu campuran ditambah 100 μ L Na-Thio 1% dan disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit.
- 7) Supernatan diambil dan disaring menggunakan glass wool.
- 8) Supernatan yang diperoleh dipanaskan dalam waterbath 100°C selama 20 menit.
- 9) Supernatan yang telah dipanaskan selanjutnya didinginkan pada temperatur ruang.
- 10) Setelah itu ditentukan nilai absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

6. Pengukuran Kadar Kolesterol

Menurut Suwandi et al., (2011) pengukuran kadar kolesterol dengan metode spektrofotometri yaitu:

- 1) Sampel darah yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan EDTA.
- 2) Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 15 menit.
- 3) Kemudian sampel akan dimasukkan ke dalam alat Modular P 800 untuk determinasi kadar kolesterol HDL menggunakan cahaya dengan panjang gelombang 700/500 nm.

F. Diagram Alir Penelitian



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian

G. Metode Pengumpulan Data

1. Asupan Makan

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

2. Berat Badan Kelinci

Berat badan kelinci diperoleh dengan menimbang kelinci 1 kali seminggu menggunakan timbangan elektrik.

3. Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Kolesterol

Data diperoleh dari pemeriksaan laboratorium pada sampel serum kelinci dengan pengambilan darah dilakukan 2 kali yaitu pada minggu ke-4 dan minggu ke-5 (akhir penelitian) yang dilakukan.

H. 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 computer SPSS 16, kemudian dilakukan beberapa uji, antara lain:

1. Uji Normalitas Data

Data 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 $p > 0,05$. Apabila homogenitas tidak sama, didapatkan $p < 0,05$.

3. Uji Hipotesis

Uji kadar MDA dan kolesterol pada kelompok perlakuan yang terdistribusi normal dan varians data homogeny menggunakan uji parametric *Paired Sample T-Test* dengan hasil $p < 0,05$ atau sidik ragam untuk mengetahui pengaruh setelah diberikan perlakuan. Namun, distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogeny, digunakan uji *Mann-Whitney*.

4. Uji Post Hoc (Lanjutan)

Uji post hoc bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, sehingga dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh terhadap variabel. Kelompok diketahui terdapat perbedaan nyata dari uji *One Way ANOVA* dengan hasil $p < 0,05$. Namun, untuk distribusi data tidak normal menggunakan uji *Kruskal Wallis*.

I. Instrumen Analisis Data Penelitian

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

J. Uji Etik Lulus Poltekkes Malang

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Politeknik Kesehatan Malang dengan kode etik Reg.No.:815 / KEPK-POLKESMA/ 2024.