

BAB IV

METODE PENELITIAN

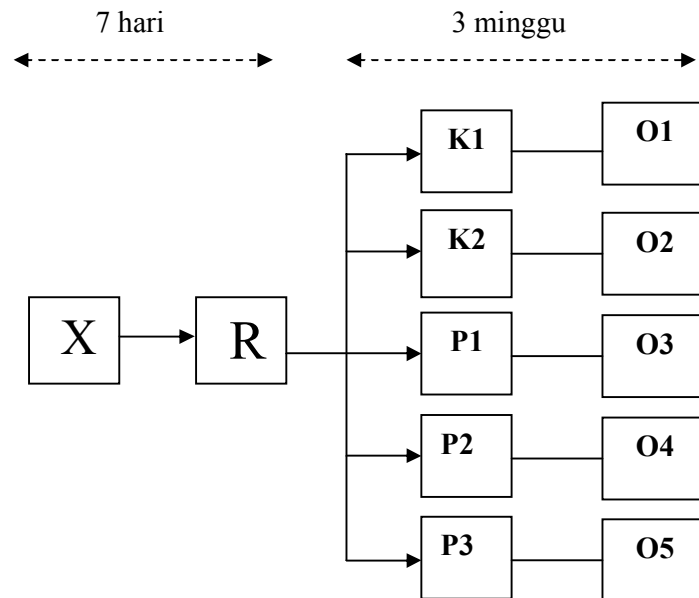
4.1. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah dalam bidang ilmu Gizi Biomedik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, sedangkan pemeriksaan trigliserida dilakukan di laboratorium Biokimia Universitas Gajah Mada.

4.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen dengan rancangan penelitian menggunakan *post test only control group*. Rancangan penelitian ini, memungkinkan dilakukan pengukuran pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol positif. Tetapi rancangan ini tidak memungkinkan untuk menentukan sejauh mana atau seberapa besar perubahan itu terjadi, sebab penelitian ini hanya menggunakan *post test only control group* yang dilakukan pada akhir perlakuan (tidak untuk menentukan data awal).

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) : dengan 2 kontrol yaitu kontrol positif (K1) dan kontrol negatif (K2) serta 3 perlakuan (P1, P2 dan P3) .



Gambar 6. Skema rancangan penelitian

Keterangan :

- X → R = Proses adaptasi tikus selama 4 hari.
- K1 = Kelompok kontrol yang diberi pakan komersial dan air minum tanpa fruktosa.
- K2 = Kelompok kontrol yang diberi pakan komersial dan air minum mengandung tinggi fruktosa selama 3 minggu.
- P1 = Kelompok perlakuan yang diberi pakan komersial dan air minum mengandung tinggi fruktosa (10%/ volume) secara *ad libitum* selama 3 minggu, dan pemberian air seduh teh hitam 0,45 ml.

- P2 = Kelompok perlakuan yang diberi pakan komersial dan air minum mengandung tinggi fruktosa (10%/ volume) secara *ad libitum* selama 3 minggu, dan pemberian air seduh teh hitam 0,9 ml.
- P3 = Kelompok perlakuan yang diberi pakan komersial dan air minum mengandung tinggi fruktosa (10%/ volume) secara *ad libitum* selama 3 minggu, dan pemberian air seduh teh hitam 1,35 ml.

4.3. Jenis dan Besar Sampel

Populasi hewan percobaan adalah tikus *ratus novergicus strain wistar* yang berasal laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Besar sampel penelitian hewan coba untuk perlakuan jangka pendek dari WHO adalah minimal 5 ekor tiap kelompok. Penambahan boleh dilakukan dengan syarat 20% (1 ekor) dari jumlah minimal hewan coba yang digunakan. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Jadi, total sampel dalam penelitian ini 30 ekor *ratus novergicus strain wistar*.

Kriteria inklusi sampel adalah:

- a. Tikus jantan
- b. Tampak aktif dan menghabiskan makanan yang diberikan
- c. Umur rata-rata 8 – 10 minggu
- d. Berat badan rata-rata \pm 150 - 200 gram

Kriteria eksklusi sampel penelitian adalah:

- a. Tikus sakit saat penelitian berlangsung.
- b. Tikus mati saat penelitian berlangsung.
- c. Kadar trigliserida lebih dari 400 mg/dl.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Dosis air seduh teh hitam

4.4.2. Variabel antara

Kadar trigliserida serum

4.4.3. Variabel tergantung

Kadar kolesterol VLDL Kadar trigliserida serum

4.5. Definisi Operasional

4.5.1. Pemberian air seduh teh hitam

Air seduh teh hitam yang diberikan melalui oral (sonde) dengan dosis 0,45 ml, 0,9 ml, dan 1,35 ml. Satuannya adalah rasio.

4.5.2. Kadar trigliserida

Kadar trigliserida adalah kadar trigliserida dalam serum yang diukur dengan metode spektrofotometer. Satuannya miligram/desiliter. Skala rasio.

4.5.3. Kadar Kolesterol VLDL

Kadar kolesterol VLDL adalah kadar kolesterol VLDL yang diperoleh melalui penghitungan jumlah total trigliserida dibagi 5, dengan syarat jumlah trigliserida kurang dari 400 miligram/ desiliter. Satuannya miligram/ desiliter. Skala rasio.

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Pemilihan tikus

- a. Hewan percobaan tikus Wistar jantan yang sehat, tampak aktif, umur 8 - 10 minggu , berat badan 150 – 200 gram sebanyak 30 ekor, dibagi dalam 2 kelompok kontrol (positif dan negatif) dan 3 kelompok perlakuan pemberian air seduh teh hitam dan lama perlakuan selama 3 minggu.
- b. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasi pada kondisi laboratorium selama 4 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan dan selama adaptasi diberi diet standar (diet normal). Pada saat observasi berlangsung, minimum diberikan secara *ad libitum*.
- c. Tikus wistar ditempatkan dalam kandang terpisah (satu ekor/kandang).

4.6.2. Pemberian diet

- a. Tikus kelompok K1 hanya diberikan pakan komersial dan air minum tanpa fruktosa, sedangkan semua tikus kelompok K2, P1, P2 dan P3 diberi pakan komersial dan air minum dengan tinggi fruktosa (10% berat/volume) selama 3 minggu.
- b. Setiap hari asupan makanan dan minuman tikus diukur.

4.6.3. Penentuan dosis dan perlakuan pemberian air seduh teh hitam

- a. Pemberian dosis teh hitam dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan coba dimana dosis tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018 kali dosis manusia. Minuman 1 gram teh hitam instan atau setara 1,5 cangkir atau 250 ml air seduh teh hitam per hari dapat mengurangi respon glukosa plasma fase lambat pada manusia sehat dengan peningkatan insulin yang sesuai.
- b. Pada manusia, di dalam 250 ml air seduh teh hitam (1,5 cangkir) mengandung 1 gram teh hitam instan (konsentrasi 1 kali). Dosis konversi banyaknya volume larutan untuk tikus yang setara dengan 250 ml air $\sim 0,018 \times 250$ ml adalah 4,5 ml (1,5 cangkir), untuk 3 cangkir teh setara dengan 9 ml; sedang untuk 4,5 cangkir teh setara dengan 13,5 ml.
- c. Pada penelitian ini dibuat larutan 10 gram teh hitam (konsentrasi 10 kali) yang diseduh dalam 250 ml air. Pada 1 gram teh hitam (konsentrasi 1 kali) yang diseduh pada 250 ml air, konversi volume

air seduh teh hitam yang diberi pada tikus adalah 4,5 ml, sehingga pada 10 gram teh hitam (konsentrasi 10 kali) yang diseduh pada 250 ml air, konversi volume air seduh teh hitamnya adalah 0,45 ml. Dosis 4,5 ml setara dengan 0,45 ml air seduh teh hitam konsentrasi 10 kali. Penelitian ini akan menggunakan dosis 0,45 ml, 0,9 ml, dan 1,35 ml. Pada dasarnya dosis bertingkat tersebut dapat langsung diberikan pada tikus, tetapi kemungkinan akan mengalami kesulitan karena kecilnya dosis. Oleh karena itu, dosis bertingkat tersebut akan dilarutkan dalam aqua. Banyaknya volume air yang boleh diberikan pada tikus maksimal adalah 5 ml, sehingga dalam penelitian ini volume air seduhan teh hitam yang digunakan sebagai berikut :

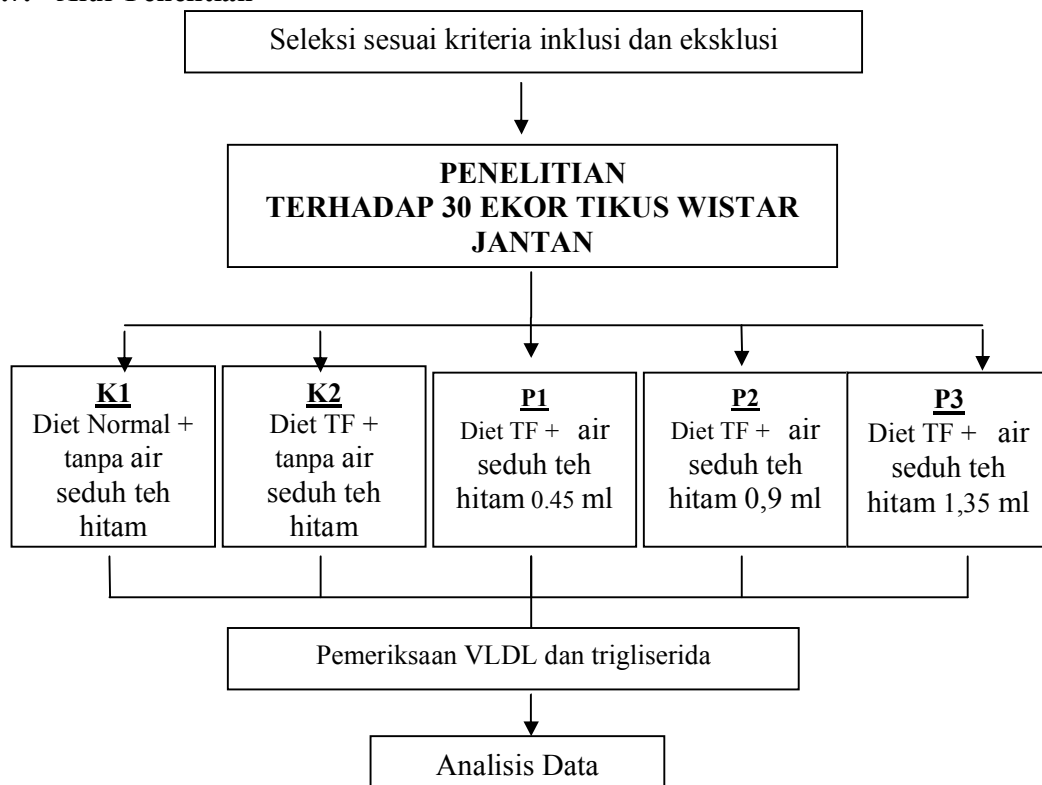
- 1) Kelompok kontrol 1 (K1): aqua 3 ml
 - 2) Kelompok kontrol 2 (K2): aqua 3 ml
 - 3) Kelompok perlakuan 1 (P1): 0,45 ml air seduh teh hitam + aqua, menjadi larutan 3 ml
 - 4) Kelompok perlakuan 2 (P2): 0,9 ml air seduh teh hitam + aqua, menjadi larutan 3 ml
 - 5) Kelompok perlakuan 3 (P3): 1,35 ml air seduh teh hitam + aqua, menjadi larutan 3 ml
- d. Teh yang digunakan dalam penelitian ini memanfaatkan produk yang sudah jadi yaitu, teh hitam komersial yang ada di pasaran.

- e. Teh hitam diseduh dengan air mendidih (90 – 100°C) selama 5 menit . Hal ini berdasarkan pada SNI 01-3753-1995 tentang teh hitam celup.
- f. Air seduhan teh hitam diberikan pada suhu ruangan lewat sonde.

4.6.4. Pengukuran kadar trigliserida

Setelah 3 minggu perlakuan, hewan coba dipuasakan selama 12-14 jam kemudian dilakukan pengambilan darah lewat *plexus retro orbitalis* untuk pemeriksaan trigliserida, kemudian diikuti penghitungan kadar kolesterol VLDL menggunakan rumus yang telah ditentukan.

4.7. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

4.8. Analisis Data

Sebelum dilakukan analisis, pada data yang terkumpul dilakukan pemeriksaan kelengkapan data, koding dan data ditabulasi lalu dimasukkan ke dalam komputer. Analisis data meliputi analisis statistik deskriptif dan analisis statistik inferensial. Pada analisis deskriptif data kadar trigliserida dan kolesterol VLDL dinyatakan sebagai rerata dan simpang baku. Data juga disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

Uji normalitas distribusi data menggunakan uji Saphiro-Wilks oleh karena jumlah sampel kecil. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji *oneway* Anova untuk mengetahui perbedaan trigliserida dan kolesterol VLDL antara kelompok. Uji *post hoc Bonferroni* dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar trigliserida dan kolesterol VLDL terdapat pada kelompok mana saja. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$.

4.9. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus yang diberi diet tinggi fruktosa (10%/ volume) selama 3 minggu. Pengambilan darah lewat *plexus retro orbitalis* kemudian dilakukan untuk pemeriksaan kadar trigliserida dan VLDL. Penelitian yang sudah dilakukan ini telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari komisi etik Fakultas Kedokteran Undip Semarang nomor 23/KEPK/FK.UNDIP-RSDK/2011. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang individu, diberi pakan komersial dan air minum tanpa fruktosa dan mengandung fruktosa. Air seduh teh hitam diberikan melalui

sonde lambung. Pengambilan darah dilakukan melalui vena plexus retro orbitalis. Pemusnahan tikus wistar ditempatkan dalam ruang tertutup kemudian diinhalasi dengan kloroform, setelah tikus dipastikan mati, kemudian dibungkus rapat dengan plastik dan dikubur ditempat yang telah ditentukan.