

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

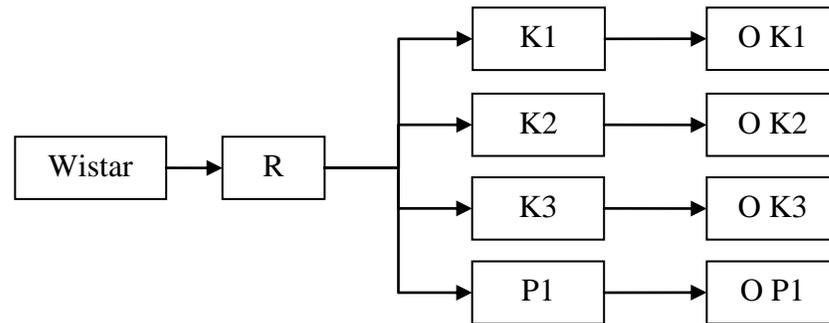
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Biokimia.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pemeliharaan hewan coba dan Laboratorium Klinik CITO untuk analisis kadar kolesterol total serum. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan *post test only control group design*. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ubi ungu *ad libitum* dan minyak goreng pemanasan berulang, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar kolesterol total serum tikus wistar.



Gambar 6. Rancangan penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K1 : Kontrol negatif (diet standar)

K2 : Kontrol positif yang diberi diet standar dan minyak goreng pemanasan berulang selama 28 hari

K3 : Kontrol positif yang diberi diet standar dan ubi ungu *ad libitum* selama 28 hari

P1 : Kelompok perlakuan yang diberi diet standar, minyak goreng pemanasan berulang, dan ubi ungu *ad libitum* selama 28 hari

O K1 : Kadar kolesterol total serum kelompok K1

O K2 : Kadar kolesterol total serum kelompok K2

O K3 : Kadar kolesterol total serum kelompok K3

O P1 : Kadar kolesterol total serum kelompok P1

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar.

4.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar yang dikandangkan individual dalam kandang yang dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Galur wistar jantan dipilih karena memiliki karakteristik mirip manusia dari data dasar fisiologis maupun pemeriksaan kolesterol. Sampel yang digunakan memenuhi kriteria sebagai berikut:

4.4.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 12 minggu sebelum adaptasi
- Kondisi sehat (aktif dan tidak ada kelainan anatomis)

4.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus tidak bergerak secara aktif
- Tikus mengalami penurunan berat badan (kurang dari 100 gram)
- Tikus mengalami perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)

- Tikus mati selama masa penelitian

4.4.2.3 Cara Sampling

Sampel penelitian diperoleh secara *simple random sampling*.

4.4.2.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria *World Health Organization* dalam *Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompok.

Pada penelitian ini terdapat tiga kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut, didapatkan jumlah total sampel sebesar 24 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

- 1) Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.)
- 2) Minyak goreng pemanasan berulang

4.5.2 Variabel Terikat

Kadar kolesterol total serum

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Diet Standar	Diet standar yang digunakan adalah pelet jenis P594 yang diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran penyajian 20 gram dan air minum yang diberikan setiap sore hari.	gram	Nominal
2.	Minyak goreng dengan pemanasan berulang	Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng dengan merek dagang Tropical. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan minyak goreng segar ke dalam ketel sebanyak ± 2000 mL, kemudian ketel dipanaskan hingga suhu mencapai 200°C selama 15 menit. Setelah 15 menit minyak di dalam ketel didiamkan hingga dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-4. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar). Setelah pemanasan ke-4, minyak didinginkan kemudian diberikan dengan cara sonde lambung setiap pagi kepada kelompok K2 dan P1 dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat proses menyonde, maka dilakukan sonde ulang.	ml	Nominal

Tabel 4. Definisi operasional (Lanjutan)

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
3.	Ubi ungu	Ubi ungu dibeli dari Pasar Bandungan, Kabupaten Semarang. Ubi ungu yang telah dicuci bersih kemudian dikukus dengan suhu 75°C selama 20 menit. Ubi ungu dipotong kotak ukuran 1 cm ³ dan diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran 30 gram/tikus per hari pada pagi hari. Setiap pagi pada hari berikutnya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi wistar.	gram	Rasio
4.	Kolesterol total	Kandungan kolesterol total serum tikus wistar yang diambil dari aorta abdominalis. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode CHOD-PAP.	mg/dL	Rasio

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Ransum diet standar untuk hewan coba
- 3) Minyak goreng kelapa sawit Tropical
- 4) Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.)

- 5) Larutan standar (kolesterol dengan konsentrasi 200 mg/dL atau 5,17 mmol/L)
- 6) Reagen kolesterol (kolesterol LS)

4.7.2 Alat

- 1) Kandang tikus
- 2) Ketel
- 3) Kompor
- 4) Termometer
- 5) Sonde lambung
- 6) Timbangan
- 7) *Disposable syringe*
- 8) Tabung reaksi
- 9) Mikropipet
- 10) Cuvet
- 11) Sentrifuge
- 12) COBAS INTEGRA *analyzer*

4.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan kadar kolesterol total serum setelah pemberian ubi ungu pada tikus wistar yang diberi minyak goreng pemanasan berulang merupakan data primer.

4.7.4 Cara Kerja

1) Pembuatan minyak goreng pemanasan berulang

Minyak goreng segar dimasukkan ke dalam ketel sebanyak ± 2000 mL, kemudian dipanaskan hingga suhu mencapai 200°C selama 15 menit. Pengukuran suhu minyak dengan termometer dimaksudkan untuk menjaga agar suhu minyak konstan, dan waktu mulai dihitung jika suhu sudah mencapai 200°C . Setelah 15 menit minyak di dalam ketel didiamkan hingga dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-4. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar).¹¹

2) Pengolahan ubi ungu

Ubi ungu yang telah dicuci bersih kemudian dikukus dengan suhu 75°C selama 20 menit. Ubi ungu dipotong kotak ukuran 1 cm^3 dan diberikan secara *ad libitum* dengan takaran 30 gram/tikus per hari pada pagi hari. Setiap pagi pada hari berikutnya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi wistar.

3) Perlakuan terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangkan secara individual di Laboratorium Parasitologi. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan diberi diet standar yang sama setiap harinya secara *ad libitum*.

Pada hari ke-8, wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok:

K1 : wistar mendapat diet standar;

K2 : wistar mendapat diet standar dan minyak goreng yang telah dipanaskan berulang;

K3 : wistar mendapat diet standar dan ubi ungu *ad libitum*;

P1 : wistar mendapat diet standar, minyak goreng yang telah dipanaskan berulang, dan ubi ungu *ad libitum*.

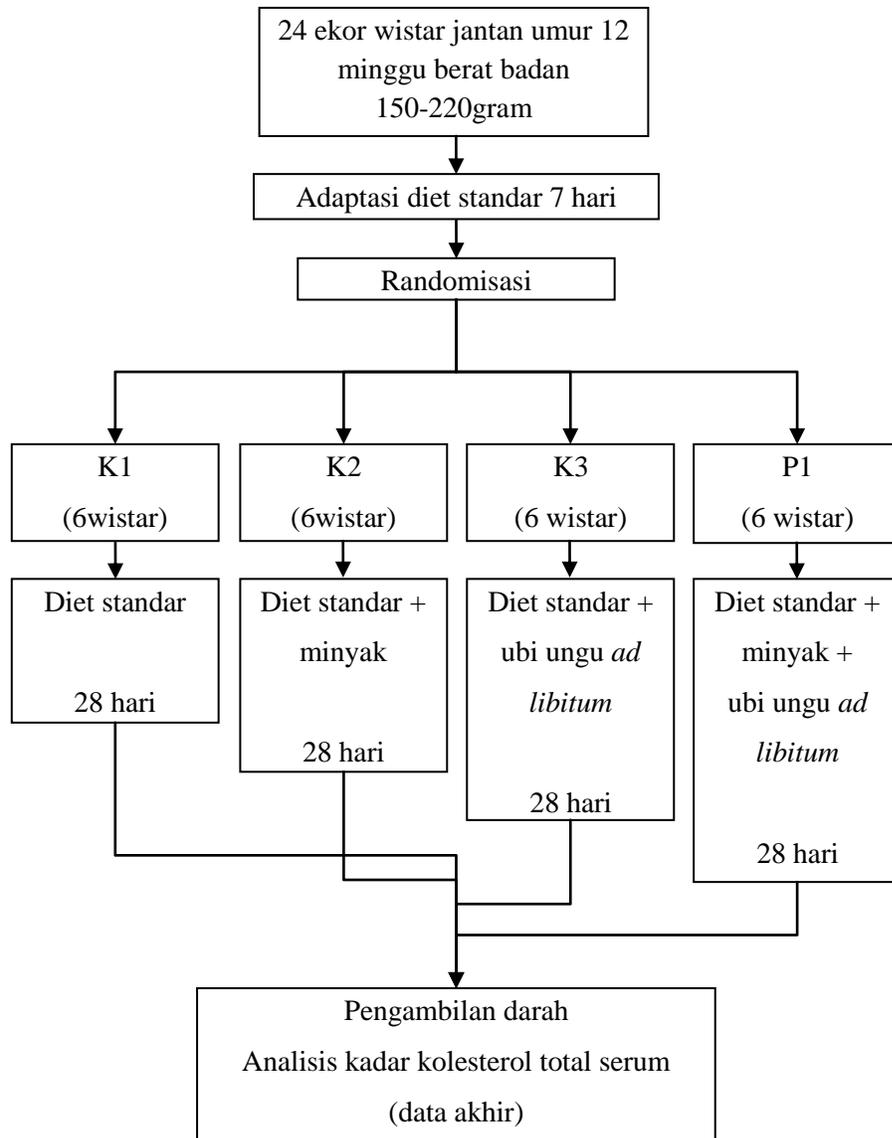
Setelah perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-36 dilakukan pengambilan sampel darah dari aorta abdominalis. Sebelum pengambilan darah, terlebih dahulu dilakukan pembiusan dengan eter. Kemudian dilakukan insisi vertikal pada regio abdomen wistar menggunakan *scalpel*. Setelah itu, tulang iga dipatahkan sehingga dapat terlihat jantung wistar. Darah langsung diambil dari aorta abdominalis sebanyak ± 3 mL dengan spuit dan ditampung dalam tabung reaksi. Setelah didapatkan sampel darah,

selanjutnya dilakukan pengukuran kolesterol total serum sebagai data akhir.

4.7.5 Pengambilan Data

Penetapan kadar kolesterol total dalam serum dengan metode CHOD-PAP menggunakan COBAS INTEGRA 400 *analyzer*. Setelah pengambilan sampel darah dari aorta abdominalis sebanyak 3 mL, darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge, kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Sampel yang digunakan adalah supernatan. Setelah itu, reagen sebanyak 47 μL dengan 70 μL *diluent* H_2O , dan supernatan sebanyak 2 μL dengan 23 μL *diluent* H_2O dimasukkan ke dalam cuvet sehingga volume total nya adalah 142 μL . Kemudian, diukur kadar kolesterol total serum tiap sampel menggunakan COBAS INTEGRA *analyzer*.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Package for Social Science*) 17.0 for Windows. Data primer yang didapatkan dilakukan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Karena pada penelitian ini didapatkan distribusi data normal dan data homogen, maka untuk menganalisis perbedaan antar kelompok dilakukan uji parametrik *One Way Anova*, dengan nilai derajat kemaknaan $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

4.10 Etika Penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

