

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

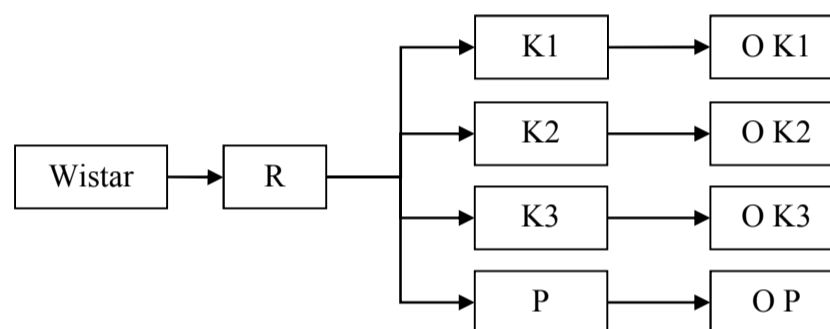
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Biokimia.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pemeliharaan dan Laboratorium CITO, Semarang untuk pemeriksaan kadar TG dan HDL. Penelitian 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*.



Gambar 7. Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K1 : Kontrol negatif (diet standar)

- K2 : Kontrol positif yang diberi minyak goreng dengan pemanasan berulang dan diet standar selama 28 hari
- K3 : Kontrol positif yang diberi ubi ungu *ad libitum* dan diet standar selama 28 hari
- P : Kelompok perlakuan yang diberi minyak goreng dengan pemanasan berulang, ubi ungu *ad libitum* dan diet standar selama 28 hari
- O K1 : Kadar TG dan HDL serum kelompok K1
- O K2 : Kadar TG dan HDL serum kelompok K2
- O K3 : Kadar TG dan HDL serum kelompok K3
- O P : Kadar TG dan HDL serum kelompok P

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 galur wistar jantan terandomisasi yang dikandangkan secara individual dengan siklus pencahayaan 12 jam, suhu ruangan, mendapat makan dan minum *ad libitum*. Galur wistar jantan dipilih karena tidak terdapat hormon estrogen yang dapat mempengaruhi profil lipid. 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 (≤ 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 *WHO* yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok.⁵³ Penelitian ini menggunakan 6 ekor wistar untuk setiap kelompok.

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

4.5 Variable penelitian

4.5.1. Variabel bebas

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

4.5.2. Variabel terikat

Kadar TG dan HDL serum

4.6 Definisi operasional

Tabel 7. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Diet standar	Diet standar yang digunakan adalah pellet jenis P594 <i>ad libitum</i> 20 gram dan air minum yang diberikan setiap hari.	Gram	Nominal
2.	Minyak goreng pemanasan berulang	Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng merk Tropical. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan ± 2000 mL minyak goreng segar ke dalam ketel, dipanaskan hingga suhu 200°C selama 15 menit kemudian didiamkan hingga dingin dan diulang 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 disondase kepada kelompok K2 dan P dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat sondase, dilakukan sondase ulang.	ml	Nominal
3.	Ubi ungu	Ubi ungu dibeli dari Pasar Bandungan, Kabupaten Semarang. Ubi ungu yang telah dicuci bersih kemudian dikukus 75°C selama 20 menit. Ubi ungu dipotong kotak ukuran 1 cm ³	Gram	Rasio

		dan diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran 30 gram/tikus/hari pada pagi hari. Setiap pagi hari yang berikutnya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi tikus.
4.	TG	Pengukuran kadar TG serum menggunakan mmol/L Rasio COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode GPO-PAP.
5.	HDL	Pengukuran kadar HDL serum menggunakan mmol/L Rasio COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode homogenisasi.

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 merek Tropical
- 4) Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.)
- 5) Larutan EDTA
- 6) Reagen pemeriksaan TG
- 7) Reagen pemeriksaan HDL

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) COBAS INTEGRA *analyzer*

4.7.3 Jenis data

Kadar TG dan HDL serum setelah pemberian ubi ungu pada wistar yang diberi minyak goreng pemanasan berulang merupakan data primer.

4.7.4 Cara kerja

- 1) Pembuatan minyak goreng pemanasan berulang

Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng merk Tropical. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan ± 2000 mL minyak goreng segar ke dalam ketel, dipanaskan hingga suhu 200°C selama 15 menit kemudian didiamkan hingga dingin dan diulang sampai pemanasan ke-4. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar). Minyak disondase kepada kelompok K2 dan P dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat proses sondase, maka dilakukan sondase ulang.

2) Pembuatan diet 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 cm³ dan diberikan secara *ad libitum* dengan takaran 30 gram/tikus per hari pada pagi hari. Sore hari wistar diberikan makanan standar. Keesokan paginya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi tikus.

3) Perlakuan terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangkan secara individual di Laboratorium Parasitologi, FK UNDIP. Sebelum perlakuan, wistar diadaptasikan selama 7 hari dengan diberi diet dan minum 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*

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

Setelah 28 hari, dilakukan pengambilan sampel darah. Setelah dilakukan pembiusan dengan eter, dilakukan insisi vertikal pada regio *abdomen* wistar dengan *scalpel*. Darah diambil dari *aorta abdominalis* sebanyak ± 3 mL dengan spuit dan ditampung dalam tabung reaksi. Setelah

didapatkan sampel darah, selanjutnya dilakukan pengukuran kadar TG dan HDL serum sebagai data akhir.

4.7.5 Pengambilan Data

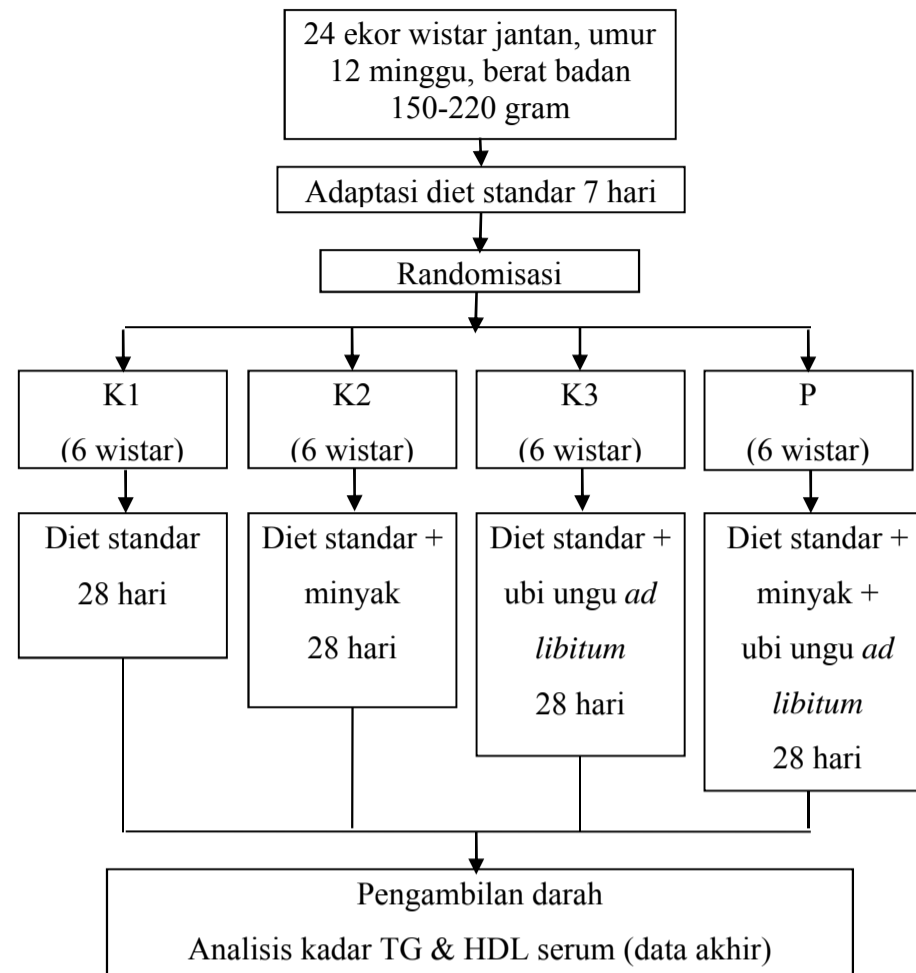
1) Penentuan kadar TG

Kadar TG ditentukan secara enzimatis dengan metode GPO-PAP, yaitu dengan menggunakan COBAS INTEGRA *analyzer*. Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge, kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Sampel yang digunakan dalam supernatan. Setelah itu, reagen sebanyak 120 μ L dan supernatan sebanyak 2 μ L dengan 28 μ L *diluent* H₂O dimasukkan ke dalam cuvet sehingga volume totalnya adalah 150L. Kemudian diukur kadar TG serum menggunakan COBAS INTEGRA *analyzer*.³⁹

2) Penentuan kadar HDL

Kadar HDL ditentukan secara enzimatis dengan metode homogenisasi menggunakan COBAS INTEGRA *analyzer*. Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge, kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Sampel yang digunakan dalam supernatan. Setelah itu, reagen sebanyak 150 μ L dengan SR sebanyak 50 μ L dan supernatan sebanyak 2,5 μ L dengan 7 μ L *diluent* H₂O dimasukkan ke dalam cuvet sehingga volume totalnya adalah 209,5 μ L. Kemudian diukur kadar HDL serum menggunakan COBAS INTEGRA *analyzer*.

4.8 Alur penelitian



Gambar 8. Diagram alur penelitian

4.9 Analisis data

Analisis data menggunakan program SPSS 18. *for Windows*. Data primer yang dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* distribusi data normal dan data homogen (*Levene test*) sehingga dilakukan uji parametrik *One way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok dengan nilai derajat kemaknaan $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%. Hasil uji parametrik kadar TG didapatkan perbedaan yang bermakna sehingga dilanjutkan dengan uji *Post hoc* untuk uji

perbedaan 2 kelompok. Sedangkan hasil uji paramaterik kadar HDL tidak terdapat perbedaan antar kelompok sehingga tidak dilanjutkan uji *Post hoc*.

4.10 Etika penelitian

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

4.11 Jadwal penelitian

Tabel 8. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan ke – (Tahun 2013)																							
	1				2				3				4				5				6			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literature	■	■	■	■																				
Penyusunan proposal	■	■	■	■																				
Seminar proposal								■																
Persiapan peminjaman laboratorium								■	■	■														
Persiapan alat dan bahan								■	■	■	■													
Penelitian								■	■	■	■	■	■	■	■	■								
Analisis data dan evaluasi								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Penulisan laporan								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Seminar hasil								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■