

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

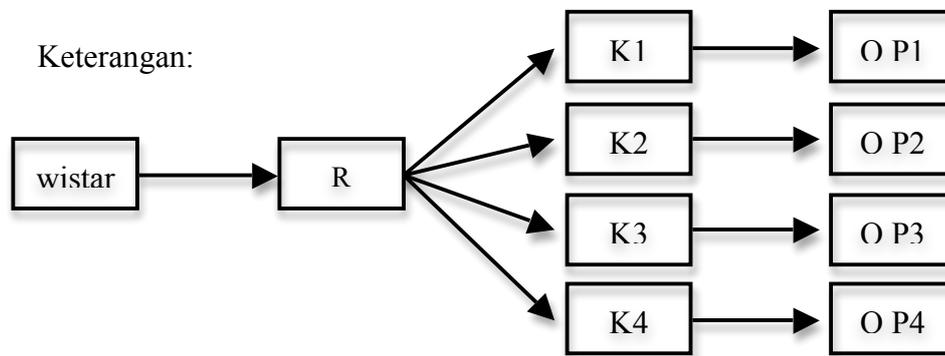
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia, Gizi dan Farmakologi.

4.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pengandangan secara individual hewan coba, pembuatan pakan. Pemeriksaan dan analisis kadar CAT hepar dan otak dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

4.3 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) *ad libitum* dan minyak jelantah, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar CAT hepar dan otak tikus.



Gambar 6. Skema Desain Penelitian

R : Randomisasi

K1 : Kontrol negatif yang diberi pakan standar

K2 : Kontrol positif yang diberi minyak jelantah dan pakan standar selama 28 hari

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

K4 : Kelompok perlakuan yang diberi minyak jelantah, ubi ungu *ad libitum* dan pakan standar selama 28 hari

O P1 : Kadar CAT hepar dan otak kelompok K1

O P2 : Kadar CAT hepar dan otak kelompok K2

O P3 : Kadar CAT hepar dan otak kelompok K3

O P4 : Kadar CAT hepar dan otak kelompok K4

4.4 Populasi Dan Sampel

4.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan.

4.4.2 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar yang dikandangkan dalam kandang individual yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus jantan dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme hampir sama dengan manusia. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi
- Pada pengamatan visual tikus tampak sehat, aktif bergerak, dan tidak terdapat kelainan anatomis

Kriteria Eksklusi

- Tikus mengalami penurunan berat badan $> 10\%$ (berat badan kurang dari 150 gram)
- Mengalami diare selama masa penelitian
- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati saat penelitian.

4.4.3 Cara Sampling

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *random sampling allocation*.

4.4.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO *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 wistar untuk setiap kelompok perlakuan sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat adaptasi dan perlakuan. Terdapat satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 24 sampel.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

- Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) *ad libitum*
- Minyak jelantah

4.5.2 Variabel Tergantung

- Kadar CAT hepar dan otak

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Pakan Standar	Pakan standar yang digunakan adalah pellet jenis P594 <i>ad libitum</i> dengan takaran 20 gram dan air minum yang diberikan setiap hari	Gram	Nominal
2.	Minyak jelantah	Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng merk Tropical. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan minyak goreng segar ke dalam wajan sebanyak ± 2000 ml, kemudian wajan dipanaskan hingga suhu mencapai 200°C selama 15 menit. Setelah 15 menit minyak di dalam wajan 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 disondase kepada wistar kelompok K2 & K4 sebanyak 3 ml/ekor/hari selama 28 hari.	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 dicuci bersih kemudian dipotong berbentuk persegi dengan volume 1 cm ³ . Ubi ungu dikukus dengan suhu 75 ^o c selama 20 menit Ubi ungu diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran 30 gram per penyajian setiap hari per tikus. Sehari kemudian diukur ubi ungu yang dikonsumsi tikus.	Gram	Nominal
4.	Kadar CAT Hepar dan Otak	Tinggi buih/busa hasil reaksi katalase dalam memecah H ₂ O ₂ per satuan waktu. ⁴²	cm	Numerik

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan
- d. Tabung reaksi
- e. Scalpel
- f. Gunting tajam
- g. Bak lilin
- h. Mistar
- i. Gelas beaker

- j. Mikropipet 100 ul
- k. Stop watch/ timer
- l. Rak tabung reaksi

4.7.2 Bahan

- a. Tikus jantan
- b. Ransum pakan standar untuk hewan coba
- c. Minyak jelantah
- d. Ubi ungu
- e. Larutan NaCl fisiologis
- f. Larutan H₂O₂ 10%
- g. Ekstrak hepar dan otak
- h. Aquadest

4.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan kadar CAT hepar dan otak setelah pemberian ubi ungu pada tikus yang diberi minyak jelantah merupakan data primer yang bersifat semikuantitatif.

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 wajan, dipanaskan hingga suhu 200°C selama 15 menit. Setelah 15 menit minyak didiamkan hingga dingin & 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 & K4 dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat proses sondase, maka dilakukan sondase ulang.

2. Pembuatan pakan 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. Setiap sore pada hari yang sama 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. Selama penelitian, wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh wistar hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*. Pada hari ke-8, wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yaitu, K1 (wistar mendapat pakan standar), K2 (wistar mendapat pakan standar dan minyak jelantah), K3 (wistar mendapat pakan standar dan ubi ungu *ad libitum*), K4 (wistar

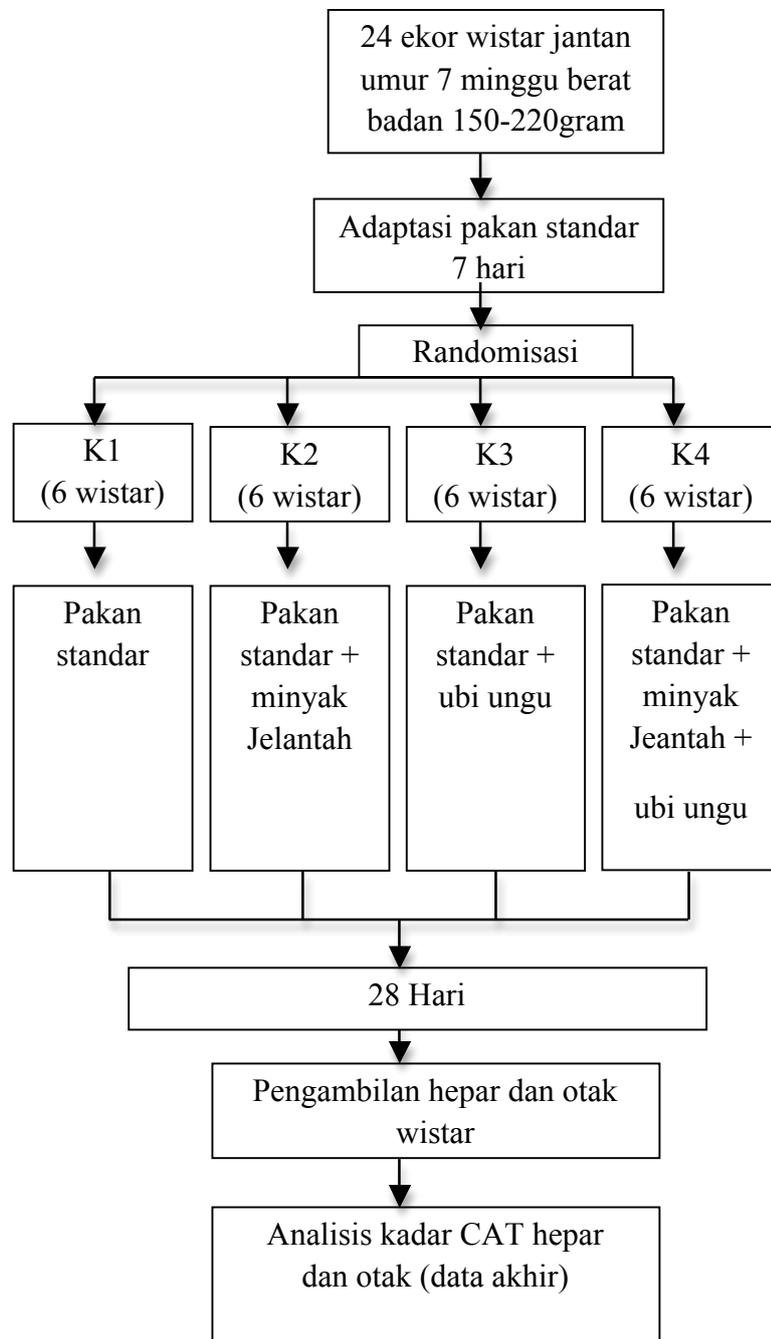
mendapat pakan standar, minyak jelantah, dan ubi ungu *ad libitum*). Perlakuan dilakukan per hari mulai hari ke-8 sampai ke-35. Pada hari ke-35 dilakukan pengambilan sampel hepar dan otak untuk kelompok K1, K2, K3 dan K4. Masukkan tikus dalam toples berisi eter, diamkan sampai lemas bukan mati. Lalu lakukan dislokasi leher pada tikus. Kemudian posisikan tikus berbaring di bak lilin. Fiksasi leher tikus. Dilakukan pembedahan. Organ hati dan otak diambil dan dicuci dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Timbang hepar/otak pada timbangan. Letakkan dalam tabung dan tambahkan 20 ml saline setiap 1 gram hepar/otak. Blender hingga menjadi jus hepar/otak.

4.7.5. Pengambilan Data

Pengukuran kadar enzim katalase hepar dan otak dapat dilakukan dengan cara seperti berikut:

- a. Siapkan tabung reaksi bersih pada rak
- b. Pada satu tabung reaksi diisikan 2 ml ekstrak hepar dan ekstrak otak pada tabung reaksi lainnya
- c. Tambahkan 100 ul larutan H_2O_2 10% ke dalam tabung reaksi yang telah berisi ekstrak hepar/otak. Tunggu selama 5 menit.
- d. Perhatikan pada tabung reaksi. Ukur tinggi gelembung pada dinding tabung dari permukaan ekstrak. Catat hasilnya.
- e. Lakukan sebanyak dua kali lalu rata-ratakan hasilnya.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis data akan menggunakan program SPSS 18. *for Windows*. Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data dan uji *Levene's test* untuk melihat homogenitas data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan yang bermakna akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%. Untuk menilai korelasi antara variabel dilakukan uji Pearson jika distribusi data normal, jika tidak normal maka dilakukan uji Spearman.

4.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, akan dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang.