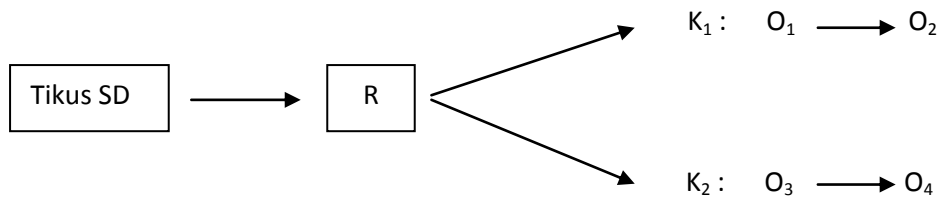


BAB IV

METODE PENELITIAN

IV.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan *Randomized Pre & Post –test control group design*⁵⁸. Randomisasi sederhana dilakukan dengan menggunakan komputer. Tujuan penggunaan desain tersebut adalah untuk membandingkan dua kelompok atau lebih dengan cara randomisasi, dan pengujian dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan untuk masing- masing kelompok. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian asam lemak trans dalam bentuk margarin pada tikus dengan keluaran (*outcame*) adalah perbedaan perubahan kadar NO dan kadar osteokalsin. Desain penelitian tersaji pada Gambar 20.



Gambar 14. Rancangan Penelitian

Keterangan

R = randomisasi (2 kelompok)

K1 = kelompok 1, tikus diberi pakan pelet/ standar dan minum ad libitum, sebagai kontrol

K2 = kelompok 2, tikus diberi pakan standar, dan tinggi asam lemak trans sebagai perlakuan

Pengamatan/observasi:

O_{1,3} = pengukuran data awal penelitian terhadap kadar NO dan osteokalsin.

O_{2,4} = pengukuran data akhir penelitian terhadap kadar NO dan osteokalsin.

Pengendalian validitas:

1. Usia
2. Berat badan
3. Varietas tikus/ genetik
4. Jenis kelamin.

IV.2. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdiri 2 jenis variabel yaitu

Variabel terikat (*dependent variable*) dan variabel bebas (*independent variable*), dan masing- masing adalah sebagai berikut:

- Variabel bebas: pemberian asam lemak trans dosis tinggi

- Variabel terikat adalah :
 - kadar NO
 - kadar osteokalsin

IV.3. Populasi dan besar sampel

IV.3.1. Populasi

Sampel adalah tikus Sprague dawley jantan berusia 8 minggu, berat badan 200-250 gram, diperoleh dari Laboratorium Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Justifikasi penggunaan hewan tikus Sprague dawley. karena tikus merupakan *animal models* untuk studi perubahan fungsi, struktur dan perubahan biokimia sitokin ROS (NO).⁴⁰

IV.3.2. Besar Sampel

Penelitian dilakukan terhadap 2 kelompok, tikus Sprague dawley, terdiri dari kelompok 1 yaitu kelompok kontrol, diberi pakan standar , kelompok 2 yaitu kelompok perlakuan, diberi pakan standard dan asam lemak trans dosis tinggi.

Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus, sehingga didapatkan total sampel adalah 20 ekor tikus Sprague Dawley yang sebelumnya telah dikelompokkan secara acak dalam 2 kelompok. Perhitungan jumlah sampel mengacu pada rumus Federer.⁴³

$$(k-1) (n-1) \geq 15$$

k- jumlah kelompok

n= jumlah sampel pada tiap kelompok

Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok, maka jumlah sampel masing-masing kelompok adalah

$$(2-1)(n-1) \geq 15$$

$$1(n-1) \geq 15$$

$$1n - 1 \geq 15$$

$$2n \geq 16$$

$$n \geq 8$$

Penelitian ini menggunakan 10 ekor tikus dalam 1 kelompok, jumlah sampel keseluruhan adalah 20 ekor tikus.

IV.4. Kriteria sampel.

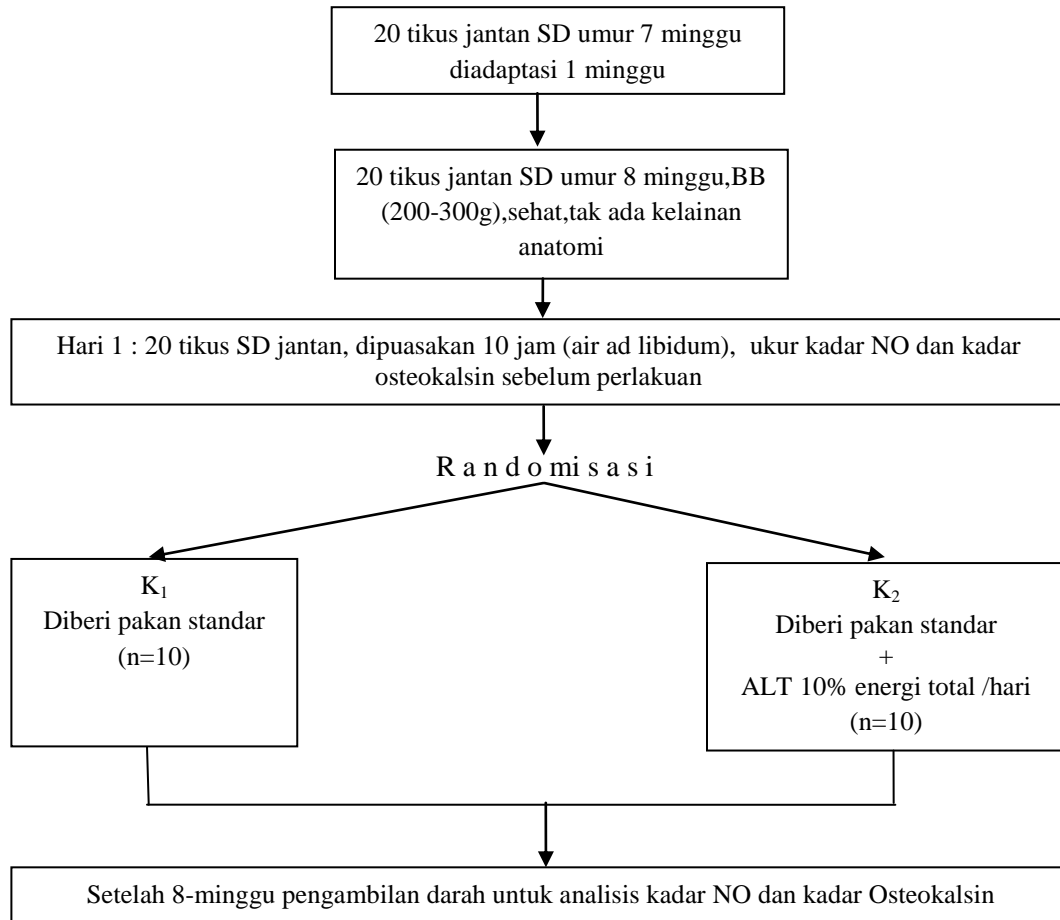
IV.4.1 Kriteria inklusi:

1. berat badan tikus normal : 200- 250 gram pada usia 8 minggu
2. kondisi sehat, aktif bergerak dan tidak ada kelainan anatomi
3. Selama pra perlakuan tidak mengalami penurunan berat badan, sehingga berat badan total tetap.

IV.4.2. Kriteria eksklusi:

1. Tikus mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses tidak berbentuk.
2. Perubahan berat badan selama adaptasi > 10%

IV.5. Alur Penelitian



Gambar 15. Alur Penelitian

IV.6. Alat dan Bahan

IV.6.1. Alat

Alat – alat yang diperlukan dalam penelitian meliputi:

1. Alat/ sarana untuk pemeliharaan hewan coba
2. Alat pengambilan darah mikrohematokrit
3. Seperangkat alat pengukur kadar osteokalsin darah
4. Alat- alat untuk pemeriksaan kadar NO beserta perlengkapannya

IV.6.2. Bahan

1. Ransum pakan untuk hewan coba isokalori.

Pakan untuk kelompok kontrol dipakai pakan tikus 4050 kalori yang telah diukur besar kalori dengan Bom Kalorimetri, dengan komposisi pada tabel 2.

Tabel 2. Komposisi pakan tikus kelompok kontrol

| Produk | Gram | K. Cal |
|--------------------|---------------|---------------|
| Casein | 200 | 800 |
| L-Cytine | 3 | 12 |
| Minyak jagung | 72,8 | 291,2 |
| Dextrin | 100 | 400 |
| Sukrosa | 172,8 | 691,2 |
| Selulosa | 50 | 0 |
| Minyak kedelai | 25 | 225 |
| Lemak babi | 177,5 | 1597,5 |
| Mineral mix | 10 | 0 |
| Calcium phosphat | 13 | 0 |
| Calcium carbonat | 5,5 | 0 |
| Potasium citrat | 16,5 | 0 |
| Vitamin mix | 10 | 40 |
| Choline bitartrate | 2 | 0 |
| Pewarna | 0,05 | 0 |
| Total | 858,15 | 4057 |
| Produk | gram% | k.cal% |
| Protein | 24 | 20 |
| Karbohidrat | 41 | 35 |
| Lemak | 24 | 45 |
| Total | | 100 |
| k.cal/gr | 4.7 | 100 |

2. Asam lemak trans 10% dari energi total dalam pelet tikus dari produk research diet NJ Amerika pada tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Pakan Hewan Coba

**D11102102
High Trans Fat Rodent Diets (45 kcal% Fat)
10kcal% Trans Fat**

| Product | D11102102 | |
|---------------------------------------|---------------|-------------|
| | gm% | kcal% |
| Protein | 24 | 20 |
| Carbohydrate | 41 | 35 |
| Fat | 24 | 45 |
| Total | | 100 |
| Kcal/gm | 4.7 | |
| Ingredient | gm | kcal |
| Casein, 80 Mesh | 200 | 800 |
| L-Cystine | 3 | 12 |
| Corn Starch | 72.8 | 291.2 |
| Maltodextrin 10 | 100 | 400 |
| Sucrose | 172.8 | 691.2 |
| Cellulose, BW200 | 50 | 0 |
| Soybean Oil | 25 | 225 |
| Lard | 8.65 | 77.85 |
| Primex | 168.85 | 1519.65 |
| Mineral Mix, S10026 | 10 | 0 |
| DiCalcium Phosphate | 13 | 0 |
| Calcium Carbonate | 5.5 | 0 |
| Potassium Citrate, 1 H ₂ O | 16.5 | 0 |
| Vitamin Mix, V10001 | 10 | 40 |
| Choline Bitartrate | 2 | 0 |
| FD&C Yellow Dye #5 | 0 | 0 |
| FD&C Red Dye #40 | 0.025 | 0 |
| FD&C Blue Dye #1 | 0.025 | 0 |
| Total | 858.15 | 4057 |

Research Diets Inc. 10/21/2011 D11102102.for.xls

3. Spesimen untuk pemeriksaan kadar osteokalsin adalah serum hewan coba
4. Reagen untuk pemeriksaan kadar Osteokalsin dengan Elecsys N-Mid Osteocalcin
5. Spesimen untuk pemeriksaan kadar NO adalah serum
6. Reagen buffer, reagen Nitrit standar, reagen Griess I dan II

IV.6. 3. Pemeliharaan Hewan Coba

Untuk menjaga kesehatan hewan coba, maka tikus dipelihara sebagai berikut :

1. Tikus ditempatkan di dalam kandang individual dalam ruangan dengan ventilasi baik , mendapat kan penerangan yang memadai, (12jam siklus gelap/terang), dan dilakukan aklimisasi untuk menyesuaikan terhadap iklim dan lingkungan
2. Suhu ruangan berkisar antara 28- 32⁰C
3. Kandang dibersihkan tiap hari
4. Makanan diberikan berupa pelet beserta minum ad libitum setiap hari.

IV.7. Analisis serum hewan coba

IV.7.1. Pengujian kadar NO

Pengukuran disfungsi endotel bisa dilakukan secara langsung ataupun tidak langsung. Metode pengukuran *nitric oxide* secara langsung misalnya dengan *Electron Spin Resonance* (ESR) sedangkan metode secara tidak langsung seperti pengukuran kadar nitrit dan nitrat dengan metode reaksi Griess. (Reaksi Griess merupakan

pemeriksaan NO dengan cara tidak langsung secara konversi enzimatik dari nitrat menjadi nitrit, oleh enzim nitrat reduktase, dilanjutkan dengan deteksi kolorimetri dari nitrit sebagai suatu produk *azo dye* berwarna dari raksi Griess yang mengabsorpsi cahaya tampak 540 nm.

Nilai rujukan :

Kadar NO orang normal berkisar $32 \pm 4,9$ umol/L (rata- rata \pm simpang baku. (Assay Design Nitric Oxide Assay Kit.)

IV.7.2. Pengujian kadar Osteokalsin

Osteokalsin seperti (Otc) diketahui adalah suatu protein Gla *g-carboxyglutamic acid* , adalah petanda (marker) dari formasi tulang, adalah suatu vitamin K dan vitamin D-dependent-protein yang diproduksi oleh osteoblas (Allison, 2000). Tes osteokalsin serum menggunakan metode *Elecsys N-MID Osteocalcin Assay* dengan prinsip *sandwich* [dua antibodi monoclonal yang spesifik terhadap kelompok penanda antigen (epitop)] di *N-MIDfragment* dan *N-terminal fragment* } memberikan hasil dalam satuan ng/mL.^{14,15,58}

Stabilitas serum dan plasma heparin adalah 8 jam pada 15-25 derajat celcius, 3 hari pada 2-8 derajat celcius dan 3 bulan pada -20 derajat celcius serta tidak beku ulang. Sedangkan stabilitas plasma EDTA adalah dua hari pada 15-25 derajat celcius, 3 hari pada 2-8 derajat celcius dan 3 bulan pada -20 derajat celcius serta tidak beku ulang.¹⁵

Alat : *Elecsys-Roche*,

Bahan : Serum 20 μ L dan reagen N-MID, Osteocalcin No. Lot. 169091

IV.8. Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi operasional

| No | variabel | Definisi operasional | satuan | skala |
|----|---|---|---------|--|
| 1 | Asam lemak trans (variabel bebas) | adalah asam lemak trans yang berasal dari margarine MDL SR buatan Australia dengan kandungan asam lemak trans 0,5 gram/ 100 gram, untuk dosis tinggi yang diberikan adalah 0,015 gram /hari | mg/hari | Nominal Diberi=1 Tidak Diberi =2 |
| 2 | Kadar NO (variabel tergantung) | Adalah kadar NO total dalam serum yang diperoleh dari pengukuran kadar nitrit dan nitrat sebagai produk stabil dari NO dengan menggunakan metode kolorimetrik non enzimatik. | μM | rasio |
| 3 | Kadar osteokalsin darah (variabel tergantung) | adalah suatu protein Gla g- <i>carboxyglutamic acid</i> , adalah petanda (marker) dari formasi tulang, adalah suatu vitamin K dan vitamin D-dependent-protein yang diproduksi oleh osteoblas. | ng/mL | rasio |

IV.9. Pengolahan dan Analisis data

Data primer yang diperoleh dikumpulkan dan ditabulasi untuk analisis lebih lanjut. Pada analisis berikutnya dilakukan uji normalitas data untuk melihat sebaran distribusi data, jika data berdistribusi normal maka akan dilakukan uji parametrik. Sedangkan bila data tidak berdistribusi normal akan dilakukan transformasi data dengan menggunakan uji delta, namun bila data masih belum normal, maka dilakukan uji non parametrik.

Analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) 15 for Windows. Analisis data untuk uji beda dilakukan dengan t'test (N) atau Man Whitney bila tidak normal. Hubungan antara kadar NO dengan kadar osteokalsin dilakukan dengan uji korelasi Pearson (bila distribusi N) atau Spearman bila distribusi tidak normal.

IV. 10. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Unit Penelitian Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada (UGM) untuk pemeliharaan hewan coba. Pelet pakan hewan coba dibuat di PAU UGM. Pemeriksaan serum darah dikerjakan oleh Laboratorium Prodia. Penelitian ini in vivo yang dilaksanakan selama kurang lebih 9 minggu.

IV.11. Ethical Clearance

Pelaksanaan penelitian ini membutuhkan *ethical clearance* yang diperoleh dari komisi Etik Penelitian Kesehatan dan Kedokteran Universitas Diponegoro.