

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Gizi, Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang meliputi pemeliharaan dan perlakuan hewan uji, pengukuran kadar trigliserida, pembuatan seduhan kulit buah naga merah dan pembuatan jus buah naga merah. Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan (28 hari).

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan *pre and post test with control group design* dengan perlakuan pemberian seduhan kulit buah naga merah dan jus daging buah naga merah. Sedangkan luarannya (*outcome*) adalah analisis kadar trigliserida serum pada tikus dislipidemia.

3.4 Sampel Penelitian

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague dawley*. Galur ini dipilih karena memiliki respon yang baik dalam penelitian yang menggunakan kolesterol sebagai indikator dan penggunaan tikus jantan karena dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi hormon estrogen.⁵⁸

3.4.1 Kriteria inklusi

- 1) Tikus jantan *Sprague dawley*
- 2) umur 2,5 bulan (10 minggu)
- 3) Berat badan 150-200 gram
- 4) Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat)

3.4.2 Kriteria eksklusi

- 1) Tikus dengan kadar kolesterol dan trigliserida tidak meningkat setelah diberikan pakan tinggi kolesterol
- 2) Tikus cacat dan mati selama masa penelitian

3.4.3 Cara Sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

3.4.4 Besar Sampel

Jumlah sampel minimal menurut kriteria WHO adalah 5 tikus per kelompok.⁵⁹ Pada penelitian ini terdapat 1 kelompok kontrol negatif (kelompok tikus yang sehat), 1 kelompok kontrol positif dan 2 kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus jantan *Sprague dawley*. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out* sebesar 10% maka diberikan satu ekor tikus tambahan setiap kelompok. Jadi, pada penelitian ini digunakan 24 ekor tikus jantan *Sprague dawley*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas (independen)

Pemberian seduhan kulit buah naga merah dan jus daging buah naga merah.

3.5.2 Variabel terikat (dependen)

Kadar trigliserida serum.

3.5.3 Variabel terkontrol

Galur tikus hewan coba, umur hewan coba, jenis kelamin hewan coba, pakan hewan coba dan kandang hewan coba.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	Pemberian seduhan kulit buah naga merah	Seduhan kulit buah naga merah yang dibuat dengan cara membuat kulit menjadi irisan tipis-tipis sebesar ± 2 mm. Ditentukan dosis sediaan basah kulit buah naga merah sebesar 9,08 g/200 gbb tikus. Kemudian dilakukan pengeringan dengan oven yang diatur suhunya 35°C. Sediaan kering kulit buah naga merah yang sudah jadi lalu diseduh dengan air hangat sebanyak 3,6 ml/200 grbb tikus. Seduhan diberikan dengan cara disonde.	ml	Nominal
2.	Pemberian jus daging buah naga merah	Jus yang dibuat dari bahan dasar daging buah naga merah dengan cara diblender. Jus diberikan dengan dosis buah sebanyak 1,53 g/200 gbb tikus. Jus diberikan dengan cara disonde.	ml	Nominal
3.	Kadar trigliserida serum	Kandungan trigliserida serum yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan metode CHOD-PAP dan GPO-PAP.	mg/dl	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- 1) Pakan tinggi kolesterol berupa telur puyuh dan asam kolat. Alasan dipakainya telur puyuh dikarenakan kadar kolesterol yang terdapat pada telur puyuh lebih tinggi dibanding telur lainnya yaitu sebanyak 3.640 mg/100 gram bahan makanan.⁶⁰ Srivastava *et al.*, mengungkapkan bahwa untuk menginduksi aterosklerosis pada mencit (*high-fat/high-cholesterol*) diperlukan diet yang ditambah dengan asam kolat (*cholic acid*). Dengan diet tersebut dapat merubah gambaran lipoprotein menjadi lebih aterogenik, yaitu menurunkan kadar HDL dan meningkatkan LDL plasma. Asam kolat diduga berfungsi untuk menurunkan kadar HDL.⁶¹
- 2) Kulit buah naga merah
- 3) Daging buah naga merah
- 4) Pakan standar dengan kandungan di dalamnya sebagai berikut : air (maks. 12%), protein kasar (min. 15%), lemak kasar (3-7%), serat kasar (maks. 6%), abu (maks. 7%), kalsium (0,9-1,1%), phosphor (0,6-0,9%), serta terdapat coccidiostat dan antibiotika. Pakan standar diberikan secara *ad libitum*.

3.7.2 Alat

- 1) Kandang untuk hewan coba
- 2) Timbangan
- 3) Sduit

- 4) Sonde Lambung
- 5) Gelas ukur
- 6) Blender
- 7) Tempat pengujian tikus
- 8) Alat tulis
- 9) Spektrofotometri
- 10) Inkubator
- 11) Mikrotube serum
- 12) Alat untuk sentrifuge
- 13) Mikrohematokrit
- 14) Oven yang telah diatur suhunya 35° C

3.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan kadar trigliserida serum sebelum dan setelah pemberian seduhan kulit buah naga merah dan jus daging buah naga merah merupakan data primer.

3.7.4 Cara Kerja

1) Pembuatan Jus Daging Buah Naga Merah

Buah naga merah dicuci terlebih dahulu sampai bersih dari kotoran. Setelah buah dibersihkan, daging buah naga merah dipisahkan dari kulitnya dengan pisau. Kemudian daging buah naga merah dipotong kecil agar memudahkan dalam proses pembuatan jus. Potongan kecil buah naga merah kemudian dijus dengan menggunakan blender. Untuk dosis yang digunakan

dalam jus buah naga merah memakai patokan kadar flavonoid yang digunakan dalam percobaan. Dosis flavonoid pada penelitian sebelumnya menerangkan bahwa kadar flavonoid 100 mg/kgbb dapat menunjukkan efek hipolipidemik sebesar 86,45%.⁶² Kemudian kadar flavonoid 100 mg/kgbb yang dibutuhkan untuk tikus dengan berat badan 200 gram ialah 20 mg/200 gbb. Kadar flavonoid pada daging buah naga merah sebesar 1310,10 mg/100gr⁵⁴ dan dikonversikan menjadi 13,10 mg/g daging buah naga merah. Artinya dalam 1 gram buahnya terdapat kadar flavonoid sebesar 13,10 mg. Secara matematis didapatkan dosis buah naga merah yang dibutuhkan untuk tikus dengan berat badan 200 gram yaitu :

$$\begin{aligned} \text{Dosis buah} &= \frac{\text{kadar flavonoid untuk tikus}}{\text{kadar flavonoid daging buah naga merah}} \\ \text{Dosis buah} &= \frac{20\text{mg} / 200\text{gbb}}{13,10 \text{ mg}/1\text{g}} \\ &= 1,53 \end{aligned}$$

Sehingga didapatkan hasil penghitungan dosis untuk buah naga merah yang akan dijus sebesar 1,53 g/200 gbb tikus.

2) Pembuatan Seduhan Kulit Buah Naga Merah

Buah naga merah dicuci terlebih dahulu sampai bersih dari kotoran. Setelah buah dibersihkan, kulit buah naga merah dipisahkan dari daging dengan pisau. Kulit buah naga merah yang telah dipisahkan diiris tipis-tipis sebesar ± 2 mm. Irisan tipis kulit buah naga merah kemudian dikeringkan dengan menggunakan

oven pada suhu 35° C sampai kering. Langkah selanjutnya, penentuan dosis sediaan basah kulit buah naga merah dengan memakai kadar flavonoid dari penelitian sebelumnya sebesar 100 mg/kgbb.⁶² Kadar tersebut dikoversikan ke tikus dengan berat badan 200 gram menjadi 20 mg/200 gbb tikus. Sedangkan di dalam kulit buah naga merah mengandung kadar flavonoid sebesar 220,28 mg/100 gr buah naga dikonversikan menjadi 2,2028 mg/g kulit buah naga merah. Artinya dalam 1 gram kulitnya terdapat kadar flavonoid sebesar 2,2028 mg. Kemudian untuk menentukan dosis sediaan kulit buah naga merah ditentukan dengan rumus seperti berikut :

$$\begin{aligned} \text{Dosis sediaan kulit} &= \frac{\text{kadar flavonoid untuk tikus}}{\text{kadar flavonoid kulit buah naga merah}} \\ &= \frac{20\text{mg} / 200\text{gbb}}{2,2028 \text{ mg}/1\text{g}} \\ &= 9,08 \end{aligned}$$

Didapatkan dosis sediaan kulit buah naga merah sebesar 9,08 g/200 gbb tikus. Dari sediaan tersebut kemudian dibuat sediaan keringnya. Sediaan kering yang sudah jadi, diseduh dengan air hangat sebanyak 3,6 ml air yang didapatkan melalui persamaan matematis seperti berikut : gelas yang digunakan pada manusia untuk minum teh setara 200 ml. Kemudian dikonversikan pada tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018, sehingga 200 ml x 0,018 = 3,6 ml/200 gr tikus. Dalam penelitian ini menggunakan tikus dengan berat badan 200 gr, sehingga

volume air seduhan yang digunakan $200\text{gr}/200\text{gr} \times 3,6 \text{ ml} = 3,6 \text{ ml}/200 \text{ gbb}$ tikus.

3) Intervensi terhadap hewan coba

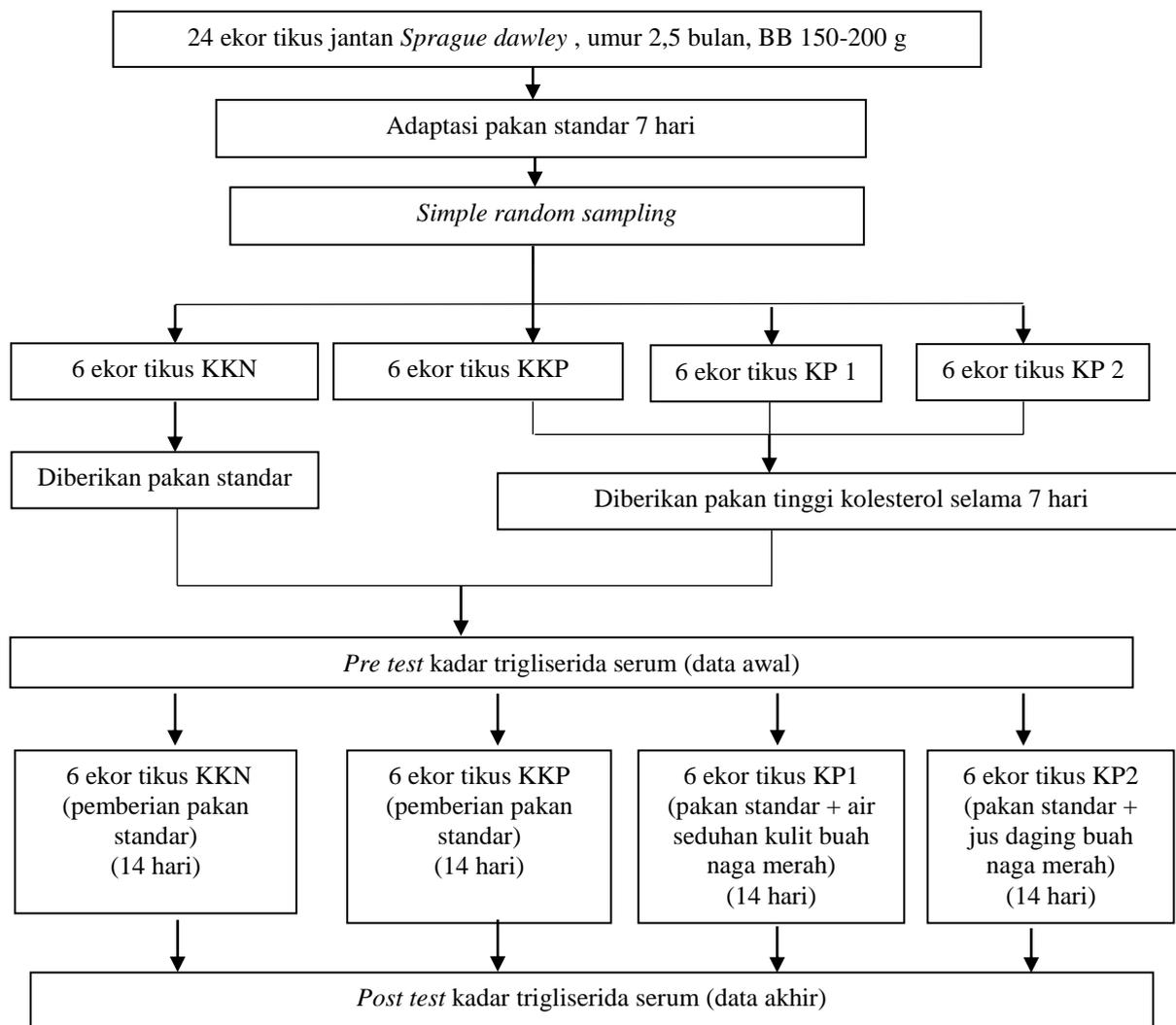
Seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, diberi pakan standar. Kemudian 3 kelompok tikus (KKP, KP1, KP2) diberi pakan tinggi kolesterol selama 7 hari sementara 1 kelompok lainnya (KKN) hanya diberi pakan standar. Sebelum dilakukan intervensi, sampel pada seluruh kelompok diukur kadar trigliserida serum sebagai data awal. Selanjutnya sampel pada kelompok perlakuan 1 diberi perlakuan berupa pemberian seduhan kulit buah naga merah selama 14 hari dan kelompok perlakuan 2 diberi perlakuan berupa pemberian jus daging buah naga merah selama 14 hari. Kelompok KKN dan KKP hanya diberikan pakan standar. Kemudian setelah 14 hari intervensi, seluruh sampel diukur kadar trigliserida serum sebagai data akhir. Berat badan tikus juga diukur sebelum dan sesudah perlakuan pada semua kelompok sebagai salah satu data penunjang.

4) Pengambilan data

Pemeriksaan kadar trigliserida diawali dengan pengambilan darah sebanyak 3 ml dari pleksus retroorbitalis hewan coba dengan terlebih dahulu diberi anestesi ketamin dosis 60 mg/kgbb sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, lalu diinkubasi 30 menit pada suhu kamar untuk diambil serumnya. Kadar trigliserida serum

kemudian ditentukan secara enzimatik dengan metode CHOD-PAP dan GPO-PAP. Metode ini menggunakan prinsip pembebasan kolesterol dan bentuk esternya dari lipoprotein oleh deterjen. Enzim kolesterol esterase akan menghidrolisis kolesterol tersebut, setelah itu kolesterol akan dioksidasi oleh enzim kolesterol oksidase menjadi hidrogen peroksida yang pada tahap selanjutnya akan mengubah 4-aminoantipirin dan fenol menjadi quinomine dengan bantuan enzim katalase peroksidase. Hasil akhir ini dapat diukur warna dan intensitasnya secara fotometrik.³⁹

3.8 Alur Penelitian



Gambar 4. Diagram Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari 4 kelompok sampel diolah menggunakan program komputer. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro wilks* karena jumlah sampel ≤ 50 . Perbedaan berat badan tikus sebelum dan setelah perlakuan dapat diketahui dengan melakukan uji *Paired t-test* (uji t berpasangan) karena distribusi data normal. Perbedaan perubahan (Δ) berat badan sampel antar kelompok diuji dengan uji *Kruskall wallis* karena

distribusi data tidak normal. Perbedaan kadar trigliserida serum sebelum dan setelah intervensi dianalisis dengan uji *Paired t-test* (uji t berpasangan) karena distribusi data normal. Perbedaan antar kelompok sebelum maupun setelah intervensi dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*. Sedangkan perubahan kadar trigliserida serum (Δ) dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* karena data berdistribusi normal.

3.10 Etika Penelitian

Ethical clearance dengan No. 350/EC/FK-RSDK/2016 telah diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RS. Dr. Karyadi pada tanggal 01 April 2016.