

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

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

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta yang meliputi pemeliharaan hewan uji, pengukuran kadar kolesterol LDL, pembuatan seduhan kulit buah naga merah dan pembuatan jus buah naga merah. Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan.

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 dan jus daging buah naga merah. Sedangkan luarannya (*outcome*) adalah analisis kadar kolesterol LDL serum pada tikus *Sprague dawley* dislipidemia.

3.4 Sampel

Sampel pada penelitian ini menggunakan tikus *Sprague dawley* jantan. Galur ini dipilih karena terdapat respon yang baik dalam penelitian yang menggunakan kadar kolesterol serum sebagai indikator dan penggunaan tikus jantan dalam penelitian dapat memberikan hasil yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi hormon estrogen.³³

3.4.1 Kriteria inklusi

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

3.4.2 Kriteria eksklusi

1. Tikus tidak menjadi dislipidemia setelah pemberian pakan tinggi kolesterol
2. Tikus cacat dan mati selama masa penelitian

3.4.3 Cara sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

3.4.3 Besar sampel

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan ketentuan WHO yaitu jumlah minimal pengulangan setiap sampel per kelompok adalah 5 kali.³⁴ Pada penelitian ini terdapat dua kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol. Pada penelitian ini dibutuhkan minimal 20 ekor tikus jantan *Sprague dawley*.

Untuk mengantisipasi kemungkinan adanya *drop out* sebesar 10% maka diberikan satu 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 kolesterol LDL serum tikus *Sprague dawley*.

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 1. Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
Seduhan Kulit buah naga merah	Pemberian seduhan kulit buah naga merah yang dibuat dengan cara membuat kulit menjadi irisan tipis-tipis sebesar ± 2 mm. Kemudian dihitung dosis kulit buah naga merah yang didapatkan hasil sebesar 9,08g/200gbb tikus lalu dilakukan pengeringan dengan oven dengan suhu 35°C sampai kering. Langkah selanjutnya sediaan kering diseduh dengan air hangat sebanyak 3,6ml/200gbb tikus.	ml	nominal

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
Jus Daging buah naga merah	Pemberian jus yang dibuat dari bahan dasar daging buah naga merah dengan cara diblender. Jus diberikan sebanyak 1,53g/200gbb tikus	ml	nominal
Kadar kolesterol LDL serum	Kandungan kolesterol LDL 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 (telur puyuh) + asam kolat

Telur puyuh dipakai untuk pakan tinggi kolesterol karena kadar kolesterol yang terdapat pada telur puyuh lebih tinggi dibanding telur lainnya yaitu sebanyak 3.640 mg/100 gram bahan makanan.^{35,36}

2. Kulit buah naga merah
3. Jus buah naga merah
4. Pakan dan minum standar tikus

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.

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 kolesterol LDL serum sebelum dan setelah pemberian seduhan kulit dan jus buah naga merah merupakan data primer.

3.7.4 Cara kerja

1) Pembuatan Jus 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. Dosis flavonoid pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar flavonoid 100mg/kgbb dapat menunjukkan hipolipidemik sebesar 86,45%. Kemudian kadar yang dibutuhkan flavonoid untuk tikus dengan berat badan 200g ialah 20mg/200gbb. Kadar flavonoid pada daging buah naga merah sebesar 1.310,10 mg/100g, sehingga didapatkan hasil dosis untuk jus 1,53g/200gbb 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. Langkah selanjutnya ialah menentukan dosis seduhan kulit dengan memakai kadar flavonoid dari penelitian sebelumnya 100mg/kgbb sedangkan di dalam kulit buah naga merah mengandung kadar flavonoid sebesar 220,28mg/100g buah naga. Kemudian untuk tikus kadar flavonoid yang dipakai ialah 20mg/200gbb tikus dengan hasil yang didapat untuk dosis seduhan kulit sebesar 9,08g/200gbb tikus. Kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 35°C sampai kering.

Sediaan kering kulit buah naga diseduh pada air sebanyak 2,88 ml air yang didapatkan melalui persamaan matematis seperti berikut: 1 cangkir yang digunakan pada manusia untuk minum teh sebesar 200 ml. Kemudian dikonversikan pada tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018, sehingga $200 \text{ ml} \times 0,018 = 3,6 \text{ ml}$ untuk tikus dengan berat badan 200g, sehingga dibutuhkan 3,6ml air untuk penyeduhan kulit buah naga.

3) Intervensi terhadap hewan coba

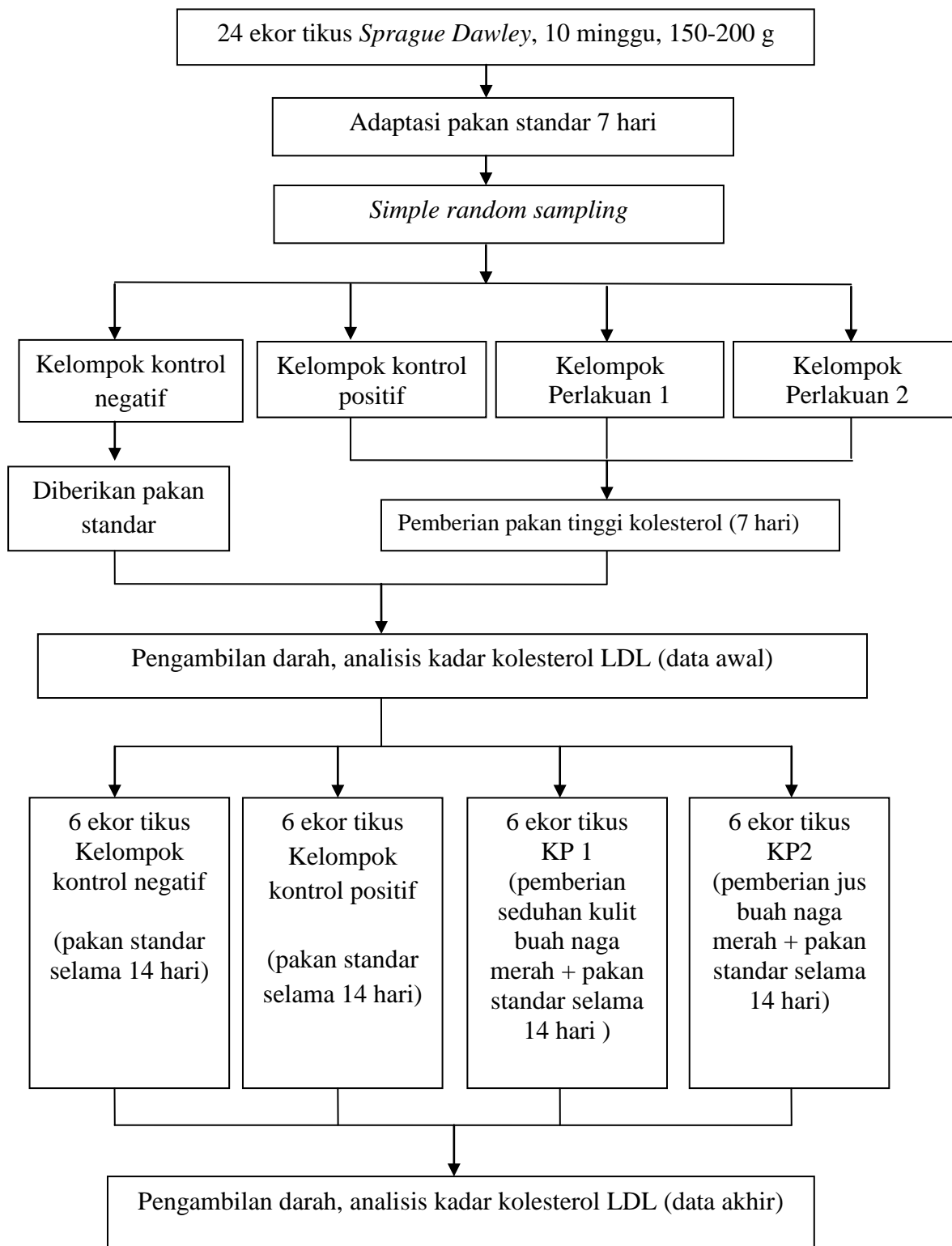
Seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, diberi pakan standar rodentia dan minum air *ad libitum*. Kemudian diberi pakan tinggi kolesterol selama 7 hari. Sebelum dan sesudah pemberian pakan tinggi kolesterol, sampel pada kelompok kontrol diukur kadar kolesterol LDL serum.. Selanjutnya sampel pada kelompok perlakuan 1 diberi perlakuan berupa pemberian seduhan kulit buah naga merah dan kelompok perlakuan 2 diberi perlakuan berupa pemberian jus buah naga merah selama 14 hari. Kemudian diukur kadar kolesterol LDL serum sebagai data akhir. Berat badan tikus juga diukur sebelum dan sesudah perlakuan pada semua kelompok sebagai salah satu data penunjang.

4) Pengambilan data

Sebelum pengambilan darah akan dilakukan anestesi menggunakan ketamin dengan dosis 60mg/kgbb, kemudian darah diambil dari plexus pre-orbitalis tikus *Sprague dawley* sebanyak 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung bersih. Selanjutnya darah diinkubasi 30 menit pada suhu kamar untuk diambil serumnya. Kemudian di sentrifuge sampai serum kelar lalu segera dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol LDL serum.

Kadar kolesterol LDL 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 phenol menjadi quinomine dengan bantuan enzim katalase peroksidase. Hasil akhir ini dapat diukur warna dan intensitasnya secara fotometrik.

3.8 Alur penelitian



Gambar 1. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer. Uji normalitas data menggunakan uji Saphiro Wilks. Uji normalitas menunjukkan sebaran data normal sehingga digunakan uji *ANOVA* untuk mengetahui perbedaan efek dari seduhan kulit dan jus buah naga merah. Namun, jika sebaran data tidak normal dilakukan uji non parametrik Mann-whitney.

3.10 Etika penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RS. Dr. Karyadi setelah usulan penelitian disetujui.

3.11 Jadwal penelitian

Tabel 2 Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literatur	■	■	■	■	■	■	■													
Penyusunan proposal	■	■	■	■	■	■	■													
Seminar proposal								■												
Persiapan peminjaman laboratorium									■	■										
Persiapan alat dan bahan									■	■										
Penelitian											■	■	■	■						
Analisis data dan Evaluasi														■	■					
Penulisan laporan														■	■					
Seminar Hasil																	■			