

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Farmasi dan Farmakologi, Biokimia, serta Kesehatan Lingkungan.

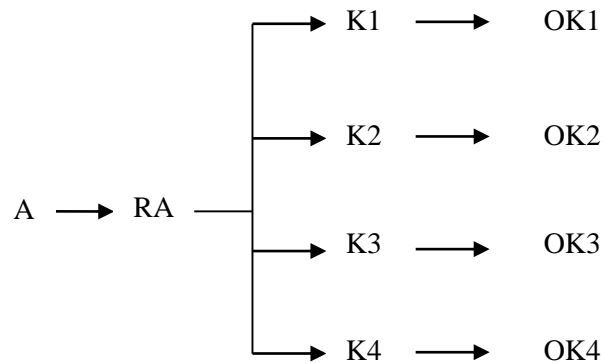
3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk pengandangan, pemeliharaan, dan pemberian intervensi, serta pemeriksaan kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan kolesterol HDL. Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 22 Maret – 27 April 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental (*true experimental designs*) dengan *randomized post-test only with control group design*, menggunakan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan air rebusan jamur kuping hitam dan minyak *jelantah*, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar kolesterol total, kolesterol LDL, dan kolesterol HDL serum tikus Wistar jantan.

Rancangan penelitiannya sebagai berikut:



Gambar 5. Rancangan Penelitian

Keterangan:

A : Adaptasi 7 hari

RA : Alokasi random

K1 : Kelompok kontrol negatif, tikus diberi diet standar selama 28 hari

K2 : Kelompok tikus yang diberi diet standar dan minyak *jelantah* selama 28 hari

K3 : Kelompok tikus yang diberi diet standar dan air rebusan jamur kuping hitam selama 28 hari

K4 : Kelompok tikus yang diberi diet standar, minyak *jelantah* dan air rebusan jamur kuping hitam selama 28 hari

OK1 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum tikus kelompok K1

OK2 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum tikus kelompok K2

OK3 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum tikus kelompok K3

OK4 : Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum tikus kelompok K4

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi hewan coba yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus Wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, yang meliputi :

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Jenis kelamin jantan
- 2) Usia 12 minggu sebelum adaptasi
- 3) Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- 4) Kondisi sehat
- 5) Tidak tampak kelainan anatomis

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Tikus mati selama aklimatisasi 7 hari

3.4.2.3 Kriteria *drop out*

- 1) Tikus mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses tidak berbentuk
- 2) Berat badan tikus turun >10 % (berat badan <100gram)
- 3) Tikus mati selama masa penelitian

3.4.3 Cara sampling

Alokasi sampel dengan randomisasi sederhana (*simple random sampling*)

3.4.4 Besar sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan adalah menurut Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) dan World Health Organization (WHO), yaitu 5 ekor tiap kelompok dan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out* maka pada tiap kelompok ditambahkan satu ekor tikus. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus, yang mana tiap kelompok masing-masing berisi 6 ekor tikus.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

- 1) Air rebusan jamur kuping hitam (*Auricularia polytricha*)
- 2) Minyak *jelantah*

3.5.2 Variabel terikat

Kadar kolesterol total, kadar kolesterol LDL, kadar kolesterol HDL

3.6 Definisi Operasional

Tabel 6. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1.	Diet standar	Diet standar yang digunakan adalah pelet jenis P594 yang diberikan secara <i>ad libitum</i> dengantakaran penyajian 20 gram	Gram	Nominal
2.	Aquades	Aquades diberikan pada kelompok K1 dan K2 dengan cara disonde dengan dosis 2ml/200gramBB	mL	Nominal
3.	Minyak <i>jelantah</i>	Minyak goreng digunakan adalah minyak curah. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan minyak goreng ke dalam ketel/panci sebanyak \pm 2500mL, kemudian ketel dipanaskan hingga mencapai suhu 180°C, sebanyak 1kg ubi yang dibeli di pasar Kopeng digoreng dalam minyak tersebut selama 10 menit. Kemudian minyak didiamkan tunggu hingga dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-5. Minyak yang digunakan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar). Setelah pemanasan ke-5, minyak didinginkan kemudian diberikan dengan cara sonde lambung setiap pagi kepada kelompok K2 dan K4 dengan dosis 3ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat proses menyonde, maka dilakukan sonde ulang.	mL	Rasio

No.	Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
4.	Air rebusan jamur kuping hitam	Jamur kuping hitam dibeli dari Pasar Kopeng, Kabupaten Semarang. Sebanyak 85 gram jamur kuping hitam yang telah dicuci bersih, dipotong-potong kemudian direbus dalam 1800ml air sampai volume tinggal 600 ml. Kemudian disaring dengan kain flanel dan diuapkan pada suhu 90° hingga volume 50 ml. Air rebusan jamur diberikan sebanyak 2 ml setiap hari dengan cara disonde.	gram	Rasio
5.	Kadar kolesterol total, kolesterol LDL, dan kolesterol HDL	Kandungan kolesterol total, LDL, dan HDL serum tikus Wistar yang diambil melalui pleksus retroorbitalis tikus. Pengukuran menggunakan COBAS INTEGRA <i>analyzer</i> dengan metode CHOD-PAP	mg/dL	Rasio

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

- 1) Pakan dan minum standar
- 2) Jamur kuping hitam
- 3) Air
- 4) Minyak *jelantah*
- 5) Ubi
- 6) Larutan EDTA

- 7) Reagen pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL dan HDL

3.7.2 Alat

- 1) Kandang tikus
- 2) Kompor
- 3) Ketel
- 4) Termometer
- 5) Timbangan
- 6) Sonde lambung
- 7) *Disposable syringe*
- 8) Tabung reaksi
- 9) COBAS INTEGRA *analyzer*

3.7.3 Jenis data

Kadar kolesterol total, kolesterol LDL, dan kolesterol HDL serum setelah pemberian jamur kuping hitam pada tikus Wistar yang diberi minyak *jelantah* merupakan data primer.

3.7.4 Cara Kerja

- 1) Pembuatan minyak *jelantah*

Minyak goreng segar dimasukkan ke dalam panci sebanyak ± 2500 mL, kemudian dipanaskan hingga mencapai suhu 180°C . Selanjutnya sebanyak 1kg ubi segar yang dibeli dari pasar Kopeng

digoreng dalam minyak tersebut selama 10 menit. Kemudian minyak didiamkan tunggu sampai dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-5. Minyak yang digunakan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar). Minyak disodase kepada kelompok K2 dan K4 dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28hari.⁴¹

2) Pembuatan pakan jamur kuping hitam

Jamur kuping hitam kering dibeli dari Pasar Kopeng, Kabupaten Semarang. Sebanyak 85 gram jamur kuping hitam kering yang telah dicuci bersih, dipotong-potong kemudian direbus dalam 1800ml air sampai volume tinggal 600 ml. Kemudian disaring dengan kain flanel dan diuapkan pada suhu 90° hingga volume 50 ml.

3) Intervensi terhadap hewan coba

Seluruh sampel dikandangan secara individual di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada. Selama penelitian, tikus Wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh sampel hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*.

Pada hari ke-8, tikus Wistar dibagi secara acak kedalam 4 kelompok yaitu:

K1 :tikus Wistar mendapat pakan standar dan aquades.

K2 :tikus Wistar mendapat pakan standar dan minyak *jelantah*.

K3 : tikus Wistar mendapat pakan standar dan air rebusan jamur kuping hitam.

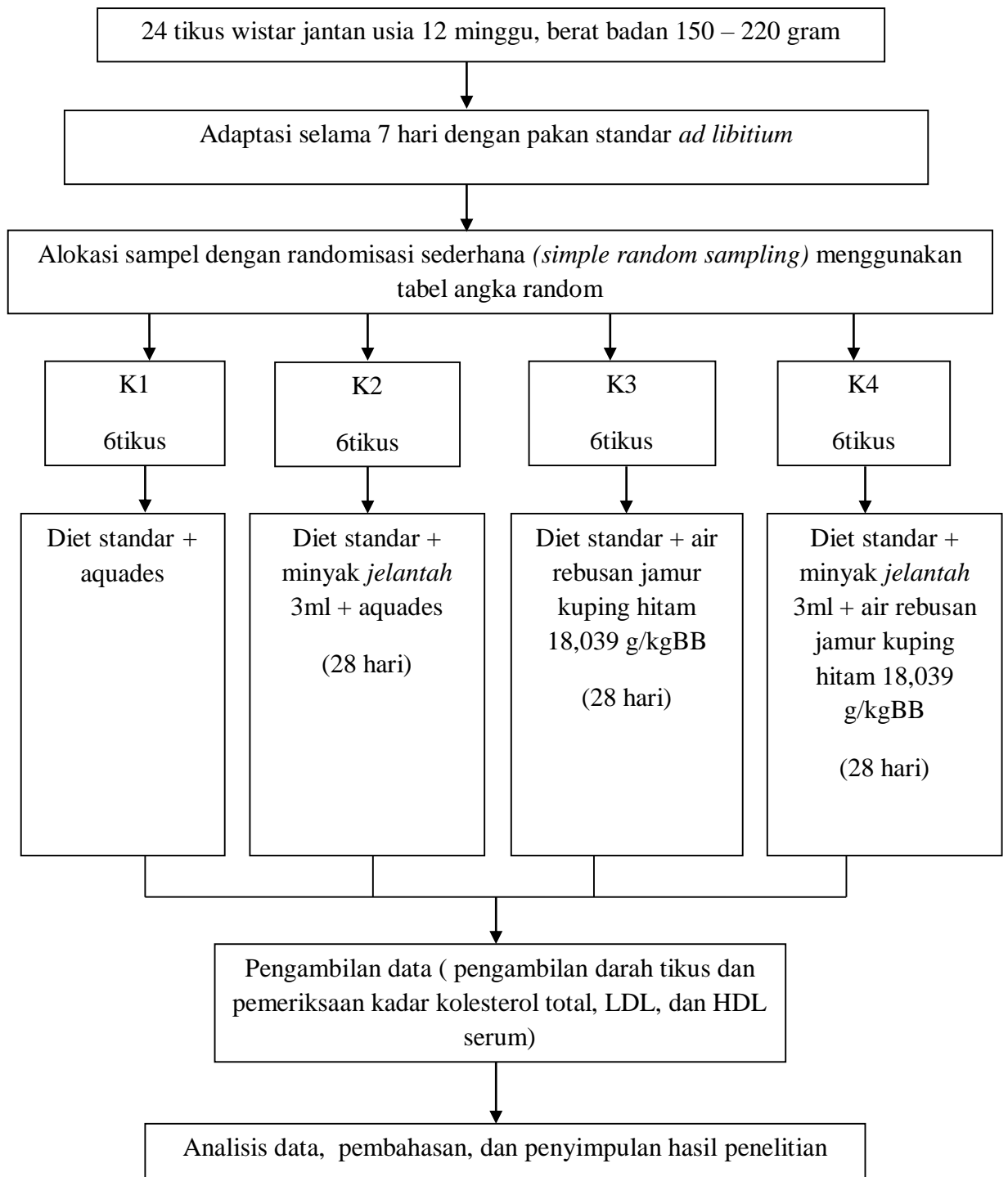
K4 : tikus Wistar mendapat pakan standar, minyak *jelantah*, dan air rebusan jamur kuping hitam.

Setelah perlakuan selama 28 hari, diukur kadar kolesterol total, kolesterol LDL, dan kolesterol HDL serum sehingga didapatkan data akhir.

- 4) Pengambilan darah dan pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum

Darah diambil dari *plexus retroorbitalis* tikus Wistar jantan sebanyak ± 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya darah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifuge sampai serum keluar lalu dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL serum. Kadar kolesterol total, LDL, dan HDL diukur dengan metode CHOD-PAP.

3.8 Alur penelitian



Gambar 6. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Analisis data diolah dengan program komputer. Normalitas distribusi data diuji dengan uji Saphiro-Wilk. Kesamaan varians data diuji dengan uji varians (Levene's test). Oleh karena syarat uji parametrik terpenuhi, uji perbedaan pengaruh dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan uji *Post hoc Bonferroni* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ dan interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika penelitian

Ethical clearance telah diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan sertifikat *ethical clearance* No. 401/EC/FK-RSDK/2016.