BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *pretest-postest control group design*

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

1. Tempat

   Penelitian ini dilakukan di laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FK UMY).

2. Waktu

   Waktu penelitian dilaksanakan antara bulan Juli-Agustus 2008.

C. POPULASI SAMPEL

1. Populasi

   Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Spargue dowley dengan kriteria inklusi dan eksklusi, diperoleh dari bagian Hewan Uji Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Sampel

   Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan secara random dengan kriteria sebagai berikut:

   a. Kriteria inklusi

1) Usia sekitar 2 bulan

2) Memiliki berat badan antara 175-225 gram

3) Berjenis kelamin jantan

b. Kriteria eksklusi

1) Mati

2) Terjangkit penyakit yang mengganggu pemeriksaan

Jumlah sampel dalam penelitian adalah 20 ekor, dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor subyek. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut:

a. Sebelum mendapat perlakuan masing-masing subyek diberikan diet tinggi kolesterol untuk menaikkan kadar kolesterol darah.
b. Kelompok kontrol negatif, hanya diberi air putih dan makanan biasa tanpa pemberian tempe biji karet maupun obat simvastatin selama 10 hari.
c. Kelompok kontrol positif, diberi obat simvastatin 1 kali sehari selama 10 hari, masing-masing dengan dosis 0,1 mg.
d. Kelompok sampel 1, masing-masing diberi 1,25 gram tempe biji karet (*Havea brazilienzis*) 1 kali sehari selama 10 hari selama 10 hari yang dipotong kecil dengan ukuran 0,5 x 0,5 x 0,5 cm^3 dan dihaluskan.
e. Kelompok sampel 2, masing-masing diberi 2,5 gram tempe biji karet (*Havea brazilienzis*) 1 kali sehari selama 10 hari yang dipotong kecil dengan ukuran 0,5 x 0,5 x 0,5 cm^3 dan dihaluskan.

f. Kelompok sampel 3, masing-masing diberi 5 gram tempe biji karet (*Havea brazilienzis*) 1 kali sehari selama 10 hari yang dipotong kecil dengan ukuran 0,5 x 0,5 x 0,5 cm^3 dan dihaluskan.

D. IDENTIFIKASI VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas

   Tempe biji karet (*Havea brazilienzis*) yang diolah sendiri. Tempe biji karet sebanyak 1,25 gram diberikan pada kelompok sampel 1, 2,5 gram diberikan pada kelompok sampel 2, 5 gram diberikan pada kelompok sampel 3.

2. Variabel Tergantung

   Kadar kolesterol total dalam darah masing-masing subyek

3. Variabel Kendali

a. Usia : diatasi dengan pemilihan subyek penelitian yang memiliki usia sekitar 2 bulan.

b. Jenis kelamin : diatasi dengan pemilihan subyek dari jenis kelamin yang sama yaitu jantan.

c. Berat badan : diatasi dengan pemilihan subyek yang memiliki berat badan antara 175-225 gram.

d. Lama perlakuan dan takaran sampel yang diuji : diatasi dengan lama penelitian yang sama tiap kelompok yaitu 14 hari dan takaran sampel yang sama untuk tiap kelompoknya yaitu, kelompok kontrol negatif tidak mendapat perlakuan apa-apa, kelompok kontrol positif mendapat 0,1 mg obat simvastatin, kelompok uji 1 mendapat 1,25 gram tempe biji karet, kelompok

uji 2 mendapat 2,5 gram tempe biji karet, dan kelompok uji 3 mendapat 5 gram tempe biji karet.

4. Definisi operasional

a. Tempe biji karet yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari biji karet yang diolah sendiri. Tempe biji karet dengan berat 1,25 gram, 2,5 gram, dan 5 gram dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 x 0,5 cm^3 dan diberikan pada masing-masing subyek sesuai dengan kelompok sampel yang telah ditentukan. Tempe biji karet dengan berat 1,25 gram mengandung asam nikotinat sebesar 0,0306 µg, 4 gram mengandung asam nikotinat sebesar 0,00612 µg, dan 8 gram mengandung asam nikotinat sebesar 0,125 µg.

b. Kadar kolesterol total darah adalah kadar kolesterol yang diperoleh dari darah subyek penelitian setelah dipuasakan selama 8-12 jam.

E. INSTRUMEN PENELITIAN

Bahan-bahan dan alat yang digunakan untuk pemeriksaan kadar kolesterol total adalah:

1. Bahan

a. Larutan reagen KIT kolesterol

b. Simvastatin 5 mg buatan Kimia Farma

c. Antikoagulan EDTA

d. Darah

e. Tempe biji karet 1,25 gram, 2,5 gram, dan 5 gram untuk masing-masing subyek sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan.

f. Lemak babi untuk semua subyek penelitian

g. Aquades

2. Alat

Alat yang diperlukan yaitu a) neraca analitik, b) alat homogenisasi, c) tabung, d) sonde, e) pipetman / mikropipet, f) sentrifuse, g) spektrofotometri microlab 300, h) vortex, i) eppendorf

F. CARA KERJA

1. Subyek penelitian 20 ekor tikus putih dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 4 ekor.
2. Masing-masing subyek diukur berat badannya.
3. Sebelum pengambilan darah, subyek dipuasakan selama 8-12 jam.
4. Diambil darah awal dan diperiksa kadar kolesterol total darah untuk melihat kadar kolesterol total normal pada hewan uji sebanyak 1,5 ml.
5. Setelah itu, hewan uji diberi lemak babi untuk menaikkan kadar kolesterol darah selama 7 hari.
6. Sebelum pengambilan darah kedua, subyek dipuasakan selama 8-12 jam.
7. Diambil darah dan diperiksa kadar kolesterol total darah untuk melihat kadar kolesterol total setelah pemberian diet tinggi kolesterol pada subyek sebanyak 1,5 ml.
8. Subyek pada kelompok kontrol negatif tidak diberi tempe biji karet maupun obat simvastatin. Subyek pada kelompok kontrol positif diberi obat simvastatin setiap hari, masing-masing dengan dosis 0,1 mg. Subyek pada

kelompok uji 1 masing-masing diberi 1,25 gram tempe biji karet setiap hari selama 10 hari. Subyek pada kelompok uji 2 masing-masing diberi 2,5gram gram tempe biji karet setiap hari selama 10 hari. Subyek pada kelompok uji 3 masing-masing diberi 5 gram tempe biji karet setiap hari selama 10 hari.

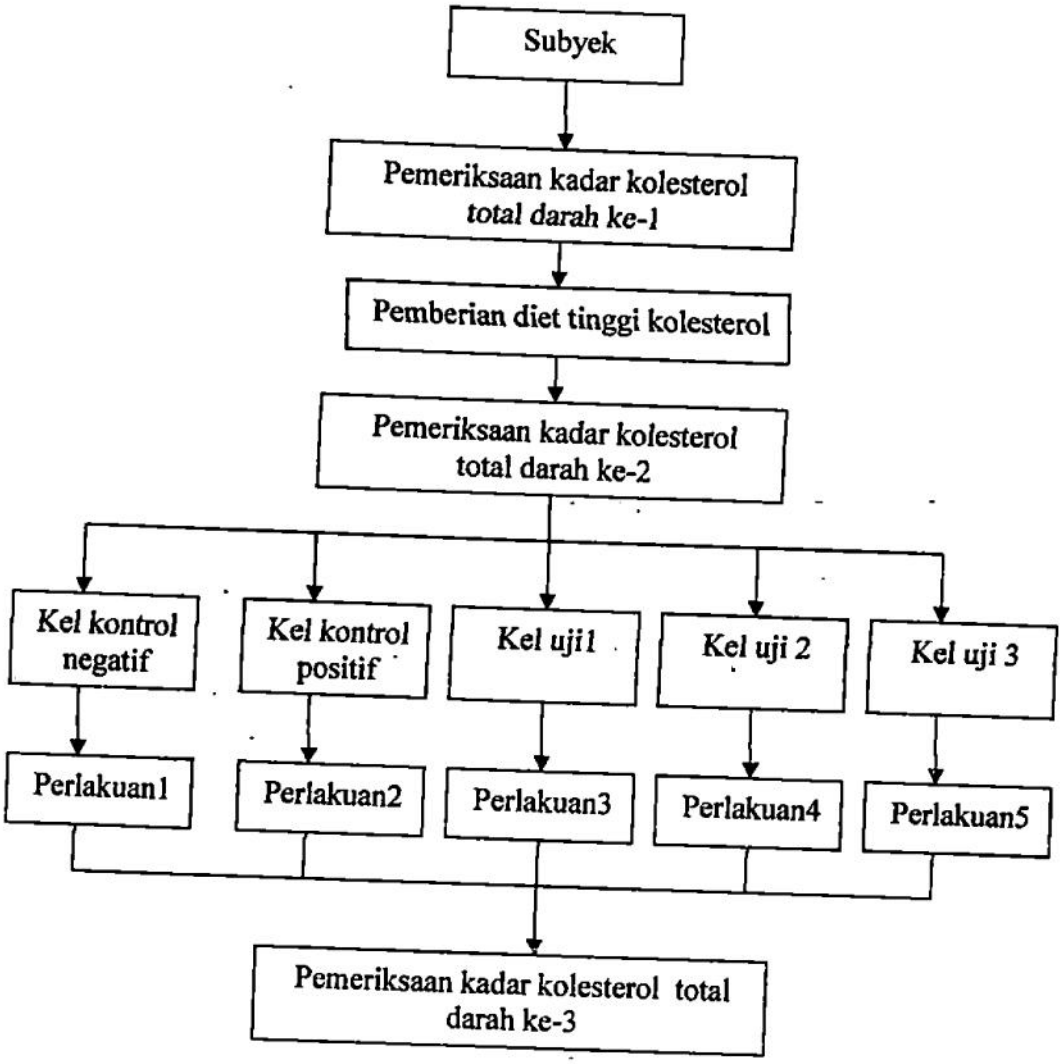
9. Sebelum pengambilan darah ketiga, subyek dipuasakan selama 8-12 jam.
10. Pengambilan darah ketiga sebanyak 1,5 ml tiap subyek.
11. Dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total setelah tiap subyek diberi perlakuan.
12. Analisis statistik

G. TAHAPAN PELAKSANAAN PENELITIAN

1. Rancangan penelitian, pada halaman berikutnya.

Keterangan gambar:

a. Pemberian diet kolesterol : diberikan lemak babi kepada subyek selama 5 hari berturut-turut.
b. Pemeriksaan kadar kolesterol darah 1: pemeriksaan kadar kolesterol darah sebelum pemberian diet tinggi kolesterol (lemak babi).
c. Pemeriksaan kadar kolesterol darah 2: pemeriksaan kadar kolesterol darah setelah pemberian diet tinggi kolesterol (lemak babi) selama 7 hari.
d. Pemeriksaan kadar kolesterol darah 3: pemeriksaan kadar kolesterol darah sesudah diberi perlakuan terapi (simvastatin, tempe biji karet) sesuai dengan kelompok masing-masing.
e. Perlakuan A: pemberian aquades sebagai blanko pada kelompok kontrol negatif.
f. Perlakuan B: pemberian obat simvastatin pada kelompok kontrol positif.
g. Perlakuan C: pemberian tempe biji karet dengan dosis 1 (1,25 gram) pada kelompok uji 1.
h. Perlakuan D: pemberian tempe biji karet dengan dosis 2 (2,5 gram) pada kelompok uji 2.
i. Perlakuan E: pemberian tempe biji karet dengan dosis 3 (5 gram) pada kelompok uji 3.



2. Penetapan Kadar Kolesterol Darah

Kadar kolesterol darah ditentukan dengan reaksi hidrolisis dan oksidasi enzimatik. Quinonimine sebagai indikator kolorimetrik dihasilkan dari reaksi antara 4-aminoantitriptin dan fenol oleh hidrogen peroksida yang dipengaruhi oleh aksi katalitik dari peroksidase.

Cara kerjanya dengan membuat campuran sbb:

Tabel 10. Komposisi campuran dalam penetapan kadar kolesterol darah

	Blanko	Sampel	Standart
Sampel	-	10 µL	-
Standart	-	-	10 µL

Aquades	10 µL	-	-
Reagen	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Campur baik-baik, inkubasikan selama 20 menit pada suhu 20-25'C atau 10 menit pada suhu 37'C. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

H. ANALISIS DATA

Data hasil pengukuran dianalisis dengan seperangkat komputer menggunakan uji Oneway ANOVA dilanjutkan dengan uji Post Hoc antar kelompok dan Paired T Test inter kelompok.