

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental kuasi dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only controlled group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi bengkuang dan *kefir grain* sebagai minuman sinbiotik terhadap kadar MDA dan SOD Hepar tikus hiperlipidemia.

3.2 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan November 2018 – Januari 2019 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran UII dan Pusat Antar Universitas UGM.

3.3 Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti. Dalam penelitian ini penulis menggunakan populasi berupa tikus galur wistar jantan yang didapat dari Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.4 Subjek Penelitian dan Estimasi Besar Sampel

Subjek pada penelitian ini adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jenis kelamin jantan berusia 2-3 bulan dengan Berat Badan 100-300 gram. Jumlah tikus yang dipakai sebagai subjek sesuai dengan kriteria *World Health Organization* (WHO), yaitu minimal lima (5) ekor tikus pada setiap kelompok ²¹ lakukan atau dengan menggunakan rumus *federer* seperti berikut:

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

$$(5-1) (n-1) \geq 15$$

$$5n-5-n+1 \geq 15$$

$$4n-5 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t= jumlah kelompok

n= besar sampel per kelompok

Sehingga, total jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini ialah sebanyak 25 ekor tikus yang terbagi ke dalam 5 kelompok.

3.5 Kriteria Restriksi

3.5.1 Kriteria Inklusi (Cahyaji, 2012):

1. Tikus Hiperlipidemia (kadar kolesterol total >130 mg/dl, LDL >60 mg/dl, dan trigliserida >100 mg/dl)
2. Rendah kadar HDL/ < 50 mg/dl.

3.5.2 Kriteria Eksklusi (Cahyaji, 2012):

1. Tikus mati selama proses penelitian berlangsung
2. Tikus mengalami perubahan fisik maupun fisiologis selama penelitian berlangsung.

3.6 Identifikasi Variabel

3.6.1 Variabel Kontrol : Usia, suhu dan jenis kelamin.

3.6.2 Variabel Terikat: Kadar Malondihaldehid (MDA) dan superoxide dismutase (SOD) yang terdapat pada hepar tikus.

3.6.3 Variabel Bebas : Pemberian minuman Sinbiotik kombinasi bengkuang dan *kefir grains*.

3.7 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Alat dan Bahan Uji Kimia Darah

Instrumen ini bertujuan untuk mengetahui profil lipid dari serum darah tikus sebelum dan sesudah perlakuan.

2. Alat dan Bahan Pengecekan Kadar Malondihaldehid (MDA) dan superoxide dismutase (SOD)

Instrumen ini bertujuan untuk mengetahui kadar MDA dan SOD pada organ tikus model hiperlipidemia yang diintervensi dengan minuman sinbiotik kombinasi bengkuang dan *kefir grain*.

3.8 Definisi Operasional

3.8.1 Bengkuang yang digunakan dalam penelitian ini adalah bengkuang yang sudah siap panen berusia 4-5 bulan yang didapatkan dari pusat perbelanjaan di Jalan Kaliurang km 7 Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

3.8.2 Sari bengkuang yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari murni yang didapatkan dari buah bengkuang yang dihaluskan menggunakan alat *juicer* tanpa menggunakan tambahan air selama proses pembuatan.

- 3.8.3 Jenis *kefir grains* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *kefir grains starter* yang didapatkan dari *the fabians kefir for health and beauty store* yang terletak di Kota Yogyakarta.
- 3.8.4 Susu kefir adalah susu hasil fermentasi antara *kefir grains* dan susu sapi terpasteurisasi yang telah mengalami proses fermentasi sesuai dengan yang tertera dalam prosedur penelitian.
- 3.8.5 Minuman sinbiotik adalah minuman kombinasi probiotik berupa *kefir grains* dan prebiotik berupa sari bengkuang.
- 3.8.6 *Malondialdehyde* (MDA) merupakan biomarker utama untuk menilai tingkat stress oksidatif. Nilai MDA akan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan hiperlipidemia (Hartono, Iriyanti and Suhermiyati, 2016).
- 3.8.7 *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan antioksidan enzimatis yang dapat diukur aktivitasnya. Aktivitas SOD akan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan hiperlipidemia (Astuti *et al.*, 2009).
- 3.8.8 Kuning telur puyuh adalah kuning telur yang didapatkan dari pemisahan putih dan kuning telur dari telur puyuh. Kuning telur puyuh yang telah terpisah dan telah terkumpul dalam wadah kemudian dihomogenisasi dengan cara diaduk hingga merata dengan menggunakan sendok.
- 3.8.9 Keadaan hiperlipidemia tikus dilakukan dengan cara pemberian kuning telur puyuh pada tikus penelitian. Keadaan Hiperlipidemia ketika kadar kolesterol total >130 mg/dl, LDL >60 mg/dl, Trigliserida >100 mg/dl dan HDL <60 mg/dl.

3.9 Prosedur Penelitian

Adapun tahapan-tahapan dalam penelitian ini ialah sebagai berikut.

3.9.1 Pengurusan *Etical Clearance* (EC)

Sebelum melakukan penelitian, penulis mengurus *Etical Clearance* (EC) ke komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk mendapatkan izin penelitian yang akan dilakukan.

3.9.2 Pembuatan minuman sinbiotik kombinasi bengkuang dan *kefir grains* dilakukan dengan beberapa proses dibawah yang mengacu pada nabila, bintoro dan Al-Barri (2017) dengan modifikasi:

1. Pertama pembuatan susu kefir. Setelah *kefir grains* didapatkan, *kefir grains* dicampur dengan susu segar pasteurisasi yang dimasukkan ke dalam botol dengan perbandingan 1:20 (100 gr *kefir grains* : 2 liter susu) dan difermentasi selama 12 jam dengan suhu ruangan (25⁰C-27⁰C) dalam keadaan gelap.

2. Setelah 12 jam, saring *kefir grains* dan didapatkan filtrat berupa susu kefir hasil dari fermentasi.
3. Kemudian pembuatan sari bengkuang dengan cara menyiapkan 270-285 gram bengkuang dan kemudian dimasukkan ke dalam *juicer*.
4. Filtrat yang didapatkan sekitar 225 ml (tanpa dilakukannya penyaringan) dan kemudian dipasteurisasi dengan suhu 80°C-90°C selama 15 menit.
5. Susu kefir kemudian dicampur dengan sari buah bengkuang dengan perbandingan:

Tabel 1. Formulasi Minuman Sinbiotik

Formulasi	Jumlah Susu Kefir	Jumlah Sari Bengkuang	Total
P1	85% (255 ml)	15% (45 ml)	300 ml
P2	75% (225 ml)	25% (75 ml)	300 ml
P3	65% (195 ml)	35% (105 ml)	300 ml
Total	675 ml	225 ml (± 270-285 gr bengkuang)	

6. Kemudian susu kefir dan sari bengkuang dari masing-masing formulasi dicampur dan difermentasi kembali selama 12 jam dengan suhu ruangan (25-27°C) dengan keadaan gelap.
7. Setelah 12 jam, hasil fermentasi disimpan dalam kulkas dengan suhu 4°C.
8. Minuman sinbiotik siap untuk diujikan ke hewan coba.

3.9.3 Uji Pada Hewan Coba

Pada uji hewan coba, penulis menggunakan rancangan penelitian "*post test only controlled group design*". Berikut langkah-langkah pengujian pada hewan coba :

1. Menyiapkan 25 ekor tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*).
2. Membagi 25 ekor tikus kedalam 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol (+) 5 ekor, kelompok kontrol (-) 5 ekor dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masingnya 5 ekor tikus.
3. Tiga kelompok perlakuan yakni 85% susu 15% bengkuang (P1), 75% susu 25% bengkuang (P2), 65% susu 35% bengkuang (P3).
4. Membiarkan selama 7 hari 25 ekor tikus untuk mengalami proses aklimatisasi.

5. Menginduksi kelompok tikus kontrol (+) dan kelompok perlakuan dengan kuning telur puyuh sebanyak 5 ml/200 grBB yang diberikan 1 x sehari selama 4 minggu dengan metode sonde (Prabowo and Pramaningtyas, 2018).
6. Memuasakan tikus selama 1 hari sebelum dilakukan pengecekan.
7. Pengambilan sampel darah tikus dari vena mata (*Plexus retroorbitalis*) sebanyak 3-5 ml yang sebelumnya telah dianestesi dengan menggunakan ketamin dan xilazine sebanyak 0,1-0,33 cc per tikus yang disuntikan melalui intramuskular.
8. Melakukan sentrifugasi dari sampel darah tikus yang telah didapat 5000 rpm 5 menit.
9. Memindahkan serum ke tabung yang baru dan melakukan pengecekan kadar profil lipid yang meliputi kolesterol total, trigliserida, LDL dan HDL untuk memastikan tikus sudah mengalami kondisi hiperlipidemia.
10. Memberikan minuman sinbiotik sebanyak 5 ml/200grBB pada kelompok tikus perlakuan 1 x sehari selama 4 minggu dengan metode sonde (Sudiarto, Prabowo and Pramaningtyas, 2018).
11. Memuasakan tikus selama 1 hari sebelum dilakukan terminasi.
12. Tikus diterminasi dengan cara pemberian bus ketamin dengan dosis 0,1-0,3 ml. Setelah pemberian ketamin memberikan reaksi kemudian dilakukan dekapitasi pada tikus.
13. Setelah tikus sudah dipastikan mati, kemudian posisikan tikus pada papan bedah menggunakan *pins*. Pastikan tubuh tikus terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan. Bedah mulai dari bagian perut ataupun uterus menggunakan gunting bengkok. Jika perlu, cukur bulu tikus pada bagian perut dan bersihkan sisa bulu dengan kapas yang dibasahi air.
14. Pembedahan dilakukan untuk mengambil organ hepar. Kemudian hepar dibersihkan dengan menggunakan larutan NaCl.
15. Kemudian organ hepar dibungkus dengan kertas *aluminium foil* dan disimpan ke dalam *freezer* dengan suhu -4°C .
16. Setelah itu bagian-bagian tikus yang tidak digunakan dilakukan proses penjahitan kembali luka insisi kemudian proses kremasi.
17. Organ hepar yang telah dibungkus dengan *aluminium foil* dibawa ke laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada untuk dilakukan pemeriksaan

kadar MDA dan SOD jaringan hepar. Organ hepar harus segera dianalisis di laboratorium (tidak lebih dari 7 hari setelah pengambilan organ).

18. Setelah pemeriksaan MDA dan SOD selesai kemudian data yang didapatkan dianalisis.

3.10 Analisis Data

Data yang didapatkan kemudian dianalisis dengan menggunakan software statistik jenis *one way annova*. Jika data yang didapatkan normal dengan varian sama maka dilakukan uji *one way annova* dengan *post hoc* bonferroni. Jika data yang didapatkan normal dengan varian berbeda maka dilakukan uji *one way annova* dengan *post hoc* tamhane's. Namun jika data tidak normal maka uji yang akan dilakukan adalah kruskal-wallis dengan *post hoc* Mann-Whitney. Data dikatakan normal ketika *p value* > 0,05. Data dikatakan memiliki varian berbeda ketika *p value* < 0,05. Data dikatakan signifikan berbeda ketika *p value* < 0,05 (Dahlan, 2014).

