

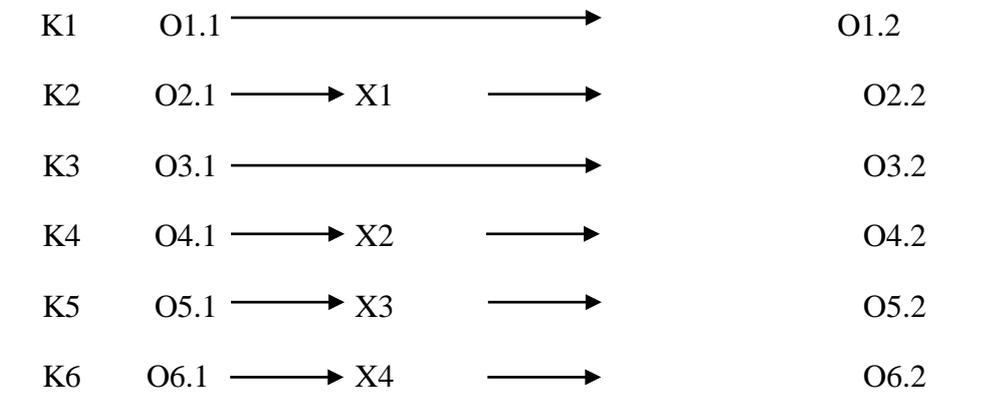
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan menggunakan hewan percobaan *in vivo* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Teh Alga Hijau- Biru (*Nostoc commune*) terhadap Indeks aterogenik yaitu rasio TG/HDL pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes. Desain penelitian menggunakan *Pre - Post Test with Control Group Design* dengan menggunakan lima kelompok yaitu kelompok kontrol positif, negatif, dan kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II, kelompok perlakuan III dan kelompok perlakuan IV.

B. Rancangan percobaan



Gambar 6. Rancangan Percobaan *Pre - Post Test with Control Group Design*

Keterangan :

- K1 = Kelompok kontrol negatif
- K2 = Kelompok kontrol positif dengan perlakuan
- K3 = Kelompok kontrol positif
- K4 = Kelompok Perlakuan 1
- K5 = Kelompok Perlakuan 2
- K6 = Kelompok Perlakuan 3

- XI = Kelompok normal dengan perlakuan (Pemberian ekstrak 180 mg/200 gr BB)
- X2 = Perlakuan 1 (Pemberian ekstrak 90 mg/200 bg BB) (Ku, C. S, 2015)X3 = Perlakuan 2 (Pemberian ekstrak 180 mg/gr BB)
- X4 = Perlakuan 3 (Pemberian ekstrak 360 mg/200 gr BB)O1.1 = Indeks aterogenikawal kelompok kontrol negatif
- O2.1 = Indeks aterogenik awal kelompok positif dengan perlakuan
- O3.1 = Indeks aterogenik awal kelompok kontrol positif.
- O4.1 = Indeks aterogenikawal kelompok perlakuan 1
- O5.1 = Indeks aterogenikawal kelompok perlakuan 2
- O6.1 = Indeks aterogenikawal kelompok perlakuan 3
- O1.2 = Indeks aterogenikakhir kelompok kontrol negatif
- O2.2 = Indeks aterogenik akhir kelompok kontrol positif dengan perlakuan
- O3.2 = Indeks aterogenik akhir kelompok kontrol positif
- O4.2 = Indeks aterogenikakhir kelompok perlakuan 1
- O5.2 = Indeks aterogenikakhir kelompok perlakuan 2
- O6.2 = Indeks aterogenikakhir kelompok perlakuan 3

C. Sampel dan objek penelitian

1. Sampel

Jumlah sampel setiap kelompok perlakuan yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok. Penentuan sampel dilakukan dengan menghitung jumlah sampel menggunakan metode Federer, sebagai berikut:

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

Keterangan :

t = Jumlah kelompok percobaan

n = Jumlah pengulangan atau jumlah sampel yang diberikan

Berdasarkan rumus perhitungan jumlah sampel menurut Federer (1977),

maka jumlah sampel yang dibutuhkan :

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

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

$$4 (n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75$$

Jumlah sampel tikus yang dibutuhkan pada setiap kelompok perlakuan adalah sebanyak 5 sampel ($n \geq 4.75$). Sehingga total sampel tikus putih jantan galur wistar yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus untuk 6 perlakuan.

Kriteria Sampel :

- a. Tikus putih jantan *Rattus norvegicus* galur Wistar.
- b. Berat badan 150-200 gram.
- c. Umur 2 bulan

2. Objek Penelitian

Objek penelitian berupa Ekstrak Teh Alga Hijau Biru (*Nostoc commune*). Alga Hijau Biru (*Nostoc commune*) yang diperoleh melalui pembelian di salah satu pasar di Kota Demak, Jawa Tengah

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Maret 2021

2. Tempat penelitian

- a. Proses pembuatan teh alga Hijau-Biru dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan, Jurusan Gizi, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- b. Proses pembuatan ekstrak teh alga Hijau-Biru dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.
- c. Penelitian hewan coba dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.
- d. Uji kadar proksimat, antioksidan, flavonoid, serat pangan dan pati, di

Laboratorium PT Che-mix, Banguntapan, Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variable bebas dalam penelitian ini yaitu pemberian Ekstrak Teh Alga Hijau-Biru (*Nostoc commune*)

2. Variable Terikat

Variable terikat dalam penelitian ini yaitu Indeks Aterogenik

F. Devinisi Operasional

Tabel 6. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Parameter Pengukuran	Skala
Ekstrak Teh Alga Hijau- Biru (<i>Nostoc commune</i>) adalah Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>) yang diolah melalui beberapa proses pelayuan , pengering, penggilingan, penyeduhan, kemudian di lakukan perendaman menggunakan etanol 96%. (Senja, Issusilaningtyas and Nugroho, Akhmad Kharis Setyowati, 2014). Setelah direndam, maserasi yang sudah didapat diekstraksi menggunakan rotary evaporator	<i>Pemberian</i> Ekstrak Teh Alga Hijau-Biru (<i>Nostoc commune</i>) kepada tikus dengan dosis 90 mg/200 grBBgram, 180 mg/200 grBBgra, dan 360 mg/200 grBBgram. Parameter : K2= Normal dengan Pemberian ekstrak teh 180 mg/200grBBgram. K4 = Pemberian ekstrak teh 90 grBBgram. K5= Pemberian ekstrak teh 180 grBBgram. K6=Pemberian ekstrak teh 360 mg/200 grBBgram. Sumber : Chai Siah Ku,2015	Rasio
Indeks Aterogenik adalah rasio yang dihitung dari Logaritma TG/HDL-c (Niroumand <i>et al.</i> , 2015,Akbas <i>et al.</i> , 2014) Trigliserida dikenal sebagai lemaknetral yang dipakai dalam tubuh untuk menyediakan energy bagi berbagai proses metabolik sedangkan <i>HighDensity Lipoprotein</i> (HDL) merupakan salah satu jenis lipoprotein yang mengandung protein	mg/L	Rasio

Variabel	Parameter Pengukuran	Skala
berkonsentrasi tinggi (sekitar 50%) dengan konsentrasi kolesterol dan fosfolipid yang jauh lebih kecil (Guyton, 2007).		

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Berdasarkan sumbernya, data yang diperoleh atau dikumpulkan oleh peneliti adalah data primer yang didapat dari hasil penelitian yang dilakukan. Teknik yang digunakan dalam pengumpulan data adalah dengan melakukan pemeriksaan kadar trigliserida dan HDL pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *Streptozotocin* dan diberi ekstrak teh Alga Hijau-Biru (*Nostoc commune*), kemudian dilakukan perhitungan untuk mendapatkan nilai Indeks aterogenik.

H. Instrument dan bahan penelitian

1. Instrument penelitian

Berikut adalah instrument yang digunakan dalam penelitian.

Tabel 7. Instrumen Penelitian

Kegiatan	Instrumen
Pemeliharaan hewan coba (<i>Rattus norvegicus</i>)	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Kandang 2. Tempat makan 3. Tempat minum 4. Sonde lambung 5. Timbangan digital 6. Sekam 7. Alat tulis
Proses injeksi STZ-NA	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Gelas ukur 2. Sendok takar 3. Sryringe 1 cc sebagai alat penginjeksi 4. Timbangan digital 5. Jam/ Stopwach

Kegiatan	Instrumen
	6. Strip pH
Pembuatan Teh Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>)	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Timbangan 2. Baskom 3. Ember 4. Mesin penggiling 5. Kain hitam 6. Ayakan 80 mesh
Pembuatan ekstrak Teh Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>)	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Benjana tertutup 2. Cawan porselin 3. Kertas saring 4. Neraca digital 5. Rotary evaporator
Pengambilan darah	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Sryringe 1 cc 2. Tabung ependorf
Kadar Trigliserida	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Spektrofotometer UV-Visibel 2. Tabung sentrifuge 3. Vortex 4. Tabung reaksi 5. Lebel 6. Centrifuge 7. Pipet
Kadar HDL	Alat yang diperlukan sebagai berikut : 1. Spektrofotometer UV- Visible 2. Tabung sentrifuge 3. Pipet 4. Centrifuge 5. Vortex 6. Tabung reaksi 7. Label

2. Bahan penelitian

Berikut adalah bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian.

Tabel 8. Bahan Penelitian

Kegiatan	Bahan
Pemeliharaan hewan coba (<i>Rattus norvegicus</i>)	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : Bahan : 1. Pakan AD II 2. Minuman 3. Ekstrak Teh Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>)

Kegiatan	Bahan
Proses injeksi STZ-NA	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Nikotinamid (NA) 110mg/ kgBB 2. STZ 45 mg/ kgBB Sumber (Sita Arifani, Widyastuti and Choirun,2019).
Pembuatan Teh Alga Hijau-Biru (<i>Nostoc commune</i>)	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>) 2. Air bersih
Pembuatan ekstrak Teh Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>)	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Esktrak Teh Alga Hijau-Biru(<i>Nostoc commune</i>) 2. Etanol 96%(Senja, Issusilaningtyas and Nugroho, Akhmad Kharis Setyowati, 2014).
Pengambilan Darah	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Ketamin
Kadar Triglicerida	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Reagen Triglicerida 2. Serum darah
Kadar HDL	Bahan yang diperlukan sebagai berikut : 1. Serum darah 2. Reagen HDL

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jantan, dengan berat masing-masing 200 gram, berusia 2 bulan sebanyak 30 ekor
- b. Adaptasi hewan coba selama 7 hari, diberi pakan standar AD II dan minum secukupnya
- c. Pembuatan kondisi diabetes pada hewan coba tikus putih(*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diinduksi dengan *Streptozotocin* (STZ) dengan dosis 45mg/200gBB dan *nicotinamid* sebanyak 110mg/200g BB. (Sita Arifani, Widyastuti and Choirun, 2019).

- d. Pembuatan teh alga Hijau-Biru (*Nostoc commune*)
- 1) Alga Hijau-Biru(*Nostoc commune*) dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan pasir dan tanah sebanyak 3 kali pengulangan
 - 2) Alga Hijau-Biru lalu dikeringkan dibawah sinar matahari hingga mengering
 - 3) Setelah kering Alga Hijau-Biru(*Nostoc commune*) dikeringkan kembali menggunakan oven dengan suhu 40 C selama 3 jam
 - 4) Setelah kering, alga Hijau-Biru ditimbang.
- e. Proses Ekstraksi
- 1) DaunAlga Hijau-Biru(*Nostoc commune*)yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling tepungr dan ditimbang
 - 2) Bubuk Alga Hijau-Biru(*Nostoc commune*) dimasukkan ke dalam tabung labu yang kemudian direndam menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 3, kemudian ditutup pada ujung tabung labu. (Senja, Issusilaningtyas and Nugroho, Akhmad Kharis Setyowati, 2014).
 - 3) Bubuk Alga Hijau-Biru(*Nostoc commune*)direndam selama 48 jam dengan suhu 25 C
 - 4) Beberapa kali dibuka dan diaduk kemudian ditutup kembali
 - 5) Alga Hijau-Biru(*Nostoc commune*) yang telah didiamkan kemudian disaring menggunakan kertas saring.

- 6) Maserat yang didapat kemudian diuap menggunakan roteri evaporator sampai diperoleh ekstrak kental
- 7) Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang.

2. Tahap pelaksanaan

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar diadaptasi selama 3 hari dan diberikan pakan standar AD II serta minum secukupnya
- b. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok yang tidak diinduksi STZ – NA dengan dosis 45mg/200gBB dan *nicotinamide* 110mg/200g BB sebanyak 10ekor dan kelompok yang diinduksi STZ – NA dengan dosis 45mg/200g BB dan *nicotinamide* 110mg/200g BB secara intraperitoneal sebanyak 20ekor. Diberikan pakan standar AD II dan minum secukupnya selama 3 hari untuk adaptasi
- c. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dipisahkan di tiap kandang untuk mengendalikan faktor stress dan lingkungan. Pakan standar AD II dan minum diberikan dengan jumlah yang sama tiap tikus untuk mengendalikan faktor makanan.
- d. Darah diambil untuk sampel pengukuran kadar trigliserida dan HDL sebelum perlakuan.
- e. Kelompok 3 diberikan ekstrak Teh 90 mg/200 grBBgram, kelompok 4 diberikan 180 mg/200 grBBgram, kelompok 5 diberikan 360 mg/200 grBBgram, dan kelompok 6 normal dengan diberikan 180 mg/200 grBBgram, selama 21 hari. Dan tetap diberikan pakan standar AD II

serta minum secukupnya. (Chai Siah Ku,2015)

f. Penentuan kadar trigliserida menggunakan metode *Colorimetric Enzymatic Test* menggunakan reagen kit GPO-PAP dengan alat *spektrofotometer UV-Visibel*.

- 1) Serum sebanyak 10 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- 2) Tambahkan 1000 μ L reagen, kemudian *divortex* dan diinkubasi pada suhu padasuhu 37⁰C selama 10 menit.
- 3) Baca serapan pada panjang gelombang 546 nm.⁵⁵ Kadar Trigliserida (mg/dL)

$$\frac{\text{Absorbansi Sample}}{\text{Absorbansi Standar}} \times \text{Konsentrasi Standar (mg/dL)}$$

g. Pengukuran kadar kolesterol HDL dilakukan dengan metode *Direct Enzimatic Colorimetri Test* menggunakan spektrofotometer UV-Visibel.

- 1) Sebanyak 10 μ L serum ditambahkan dengan reagen 1
- 2) Vorex dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 5 menit.
- 3) Ditambahkan reagen 2
- 4) Vortex dan diinkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 5 menit.
- 5) Baca serapan pada panjang gelombang 593 nm.

J. Manajemen Data

1. Pengolahan Data

Hasil penelitian yang dihasilkan akan diolah dengan cara manual dan komputerisasi, yaitu disajikan secara tekstual, tabel, dan gambar.

Penelitian ini dilakukan dengan metode obyektif. Pengumpulan data obyektif dilakukan dengan pengujian kadar triglisrerida dan kadar HDL kemudian dihitung untuk mendapatkan nilai Indeks aterogenik.

2. Analisis Data

Kadar trigliseridan dan kadar HDL yang sudah dihitung dan didapat nilai Indeks aterogenik dilakukan analisis data menggunakan uji Shapiro-Wilk. Apabila data terdistribusi normal, data dianalisis menggunakan *one way* ANOVA untuk menguji hipotesis penelitian untuk menilai adakah perbedaan rerata antar keseluruhan kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc Test* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan . Apabiladata tidak terdistribusi normal, maka akan dilakukan uji non parametrik menggunakan Kruskall-Wallis. Taraf kepercayaan untuk uji statistik tersebut adalah 95% ($\alpha = 0,05\%$) dan kemudian dilakukan Uji Wilcoxon, dengan menggunakan aplikasi SPSS.

K. Etika Penelitian

Pada penelitian ini yaitu menguji pengaruh pemberian Ekstrak Teh Alga Hijau- Biru(*Nostoc commune*) terhadap Indeks aterogenik tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes, menggunakan prinsip 3 R, yakni :

1. *Reduction*,
2. *Replacement*, dan
3. *Refinement*.

Reduction artinya memanfaatkan hewan dalam jumlah sekecil mungkin yang dapat memberikan hasil penelitian yang sah. *Replacement* ada 2 yakni relatif dan absolut. Relatif artinya mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah, sedangkan absolut artinya mengganti hewan percobaan dengan memakai kultur sel/jaringan, program komputer. *Refinement* artinya mengurangi rasa nyeri/*distress* dengan memakai obat analgesik, sedatif dan anestesi, mengurangi rasa nyeri/*distress* dengan melakukan prosedur secara benar oleh tenaga ahli/teknisi yang terlatih, menggunakan hewan kurang perasa (*less sentient*/cacung, serangga dan lain-lain)