

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor, faktor pertama dengan menggunakan 3 jenis tepung kacang yaitu tepung kacang koro putih, tepung kacang hijau dan tepung kacang merah, faktor kedua dengan menggunakan 3 dosis yaitu 5g, 7g dan 9g. Dengan 11 perlakuan dan 3 ulangan.

Dosis tepung kacang yang diberikan adalah sebagai berikut:

- K — : (Pakan normal),
- K + : (Pakan berlemak tinggi),
- A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> : (Tepung kacang koro 5g /200g BB),
- A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> : (Tepung kacang koro 7g /200g BB),
- A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> : (Tepung kacang koro 9g /200g BB),
- A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> : (Tepung kacang hijau 5g /200g BB),
- A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> : (Tepung kacang hijau 7g /200g BB),
- A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> : (Tepung kacang hijau 9g /200g BB),
- A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> : (Tepung kacang merah 5g /200g BB),
- A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> : (Tepung kacang merah 7g /200g BB),
- A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> : (Tepung kacang merah 9g /200g BB).

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2009 sampai Januari 2010 di Laboratorium Kimia Universitas Islam Muhammadiyah Malang.

### **3.3 Materi Penelitian**

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus,L*) dengan jenis kelamin jantan galur Wistar, umur 3-4 bulan dengan berat badan 150-200 g.

### **3.4 Instrumen Penelitian**

#### **3.4.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat minum tikus, timbangan analitik, kaos tangan, blender, tabung reaksi, plastik ukuran  $\frac{1}{4}$ , betadin, pinset, ovendorf, labu ukur, botol semprot, aquades, pipet mikro, pipet ukur, sentrifuge, spektrofotometer, KIT dan bahan pemeriksaan kadar kolesterol total (Diasys), KIT dan bahan pemeriksaan kadar Trigliserida (Diasys) dan gelas ukur 10 ml.

#### **3.4.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus,L*) jenis kelamin jantan, umur 3,5-4 bulan dengan berat badan antara 180 sampai 250g. Alcohol 70%, NaCL, tepung kacang koro putih (*Phaseolus Lunatus*), tepung kacang merah (*Phaseolus Vulgaris*), tepung kacang hijau (*Phaseolus Radiatus*), aquades, betadin, pakan tikus BR-1, bahan pembuat

diet tinggi lemak (kolesterol 0,49gr, As. Kolat 0,03, lemak sapi 15 ml, dan tepung terigu 8,27 gr) dan minuman tikus berupa air PDAM.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Persiapan Hewan Coba**

Sebelum perlakuan, tikus terlebih dahulu diaklimasi selama 2 minggu, dengan hanya diberi pakan BR-1, dan diberi minum air yang bersumber dari PDAM. Selanjutnya 33 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*,L) di bagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol tikus normal, kelompok tikus berlemak tinggi dan tikus yang diberi pakan dan di tambah tepung kacang-kacangan dengan dosis 5g, 7g, dan 9g selama 42 hari.

#### **3.5.2 Pesiapan Pemberian Diet Tinggi Lemak**

Pembuatan diet tinggi lemak dilakukan setiap hari dengan mencampurkan bahan diet tinggi lemak, kemudian memberikan pakan dist tinggi lemak sehari sekali selama 14 hari. Dengan komposisi sebagai berikut:

1. Kolesterol 0,49 gram
2. Asam Kolat 0,03 gram
3. Lemak Sapi 15 ml
4. Tepung terigu 8,27 gram
5. Pars BR-1 14,88 gram (Wigati, 2007)

### **3.5.3 Persiapan Bahan Uji**

Tepung kacang yang digunakan ada beberapa jenis yaitu tepung kacang koro putih, tepung kacang hijau, dan tepung kacang merah Biji kacang koro putih, kacang hijau, dan kacang merah di keringkan dengan menggunakan sinar matahari, kemudian diblender untuk menghasilkan serbuk.

### **3.5.4 Perlakuan Tikus**

Pada awal setelah masa aklimasi selama 14 hari yaitu masa pra perlakuan, berat badan tikus ditimbang. Kemudian pada masa pra perlakuan, kelompok kontrol diberi pakan BR-1 dan 30 kelompok lain diberi pakan diet tinggi lemak. Pemberian pakan tinggi lemak berupa kolesterol 0,49 gram, asam Kolat 0,03 gram, lemak sapi 15 ml, tepung terigu 8,27 gram, dan Pars BR-1 14,88 gram diberikan dengan cara dicampurkan.

Setelah 14 hari masa pra perlakuan, berat badan tikus ditimbang dan darah diambil dari ekor. Kemudian dilakukan pengukuran kadar kolesterol total, dan HDL, selanjutnya pemberian tepung kacang untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kadar kolestrol.

Setelah masa pra perlakuan, kemudian dilanjutkan dengan masa perlakuan selama 42 hari. Pada masa perlakuan tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok I kontrol tikus normal yang diberi pakan BR-1, kelompok II tikus diberi pakan diet tinggi lemak, dan kelompok III sampai V diberi pakan dan tambahan tepung kacang dengan dosis 5g, 7g, dan 9g.

Pemberian pakan tepung kacang diberikan setiap hari, tepung kacang yang telah diblender, dicampurkan dengan pakan BR-1 dan air secukupnya. Pakan yang telah tercampur kemudian diberikan pada hewan coba selama 42 hari.

### **3.5.5 Pengambilan Sampel**

Sebelum perlakuan tepung kacang, dilakukan pengukuran kadar kolesterol darah untuk memastikan bahwa 27 tikus telah mengalami kolesterol tinggi. Pengukuran kadar kolesterol dilakukan dengan cara mengambil darah dari ekor tikus, dengan menggunakan transferpette. Darah yang telah di hisap transferpette di campurkan dengan larutan NaCL 0,02ml. Larutan darah d sentrifuge selama 20 menit kemudian di letakkan ovendorf. Setelah pemberian tepung kacang selama 42 hari, darah tikus diambil kembali untuk mengetahui kadar kolesterolnya.

### **3.6 Pengukuran Kadar Kolestrol**

#### **3.6.1 Penentuan Kadar Kolestrol Total**

Sampel dan reagen dicampur dan dimasukkan dalam inkubator 20 - 25°C selama 20 menit atau pada 37°C selama 10 menit. Absorbsinya diukur pada spektrofotometer dengan  $\lambda$  500 nm dengan larutan blanko sebagai titik 0 nya.

Kadar kolestrol total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$C = \frac{A_{s\text{ampel}}}{A_{s\text{tan dar}}} \times C_{st}$$

Keterangan:

C = kadar kolesterol (mg/dl)

A = serapan

Cst = kadar kolesterol standar (200mg/dl)

### 3.6.2 Pengukuran Kadar Kolestrol-HDL

Serum sebanyak 200 µl ditambah 500 µl reagen presipitan dimasukkan ke dalam sentrifuge, mencampurnya baik-baik, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 g selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk pemeriksaan kadar kolesterol HDL.

Pengukuran kadar kolesterol HDL yaitu supernatan dan pereaksi kolesterol dancampur, kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian dibaca pada  $\lambda$  500 nm dengan titik 0 blanko.

Kadar kolestrol-HDL dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$C = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \times C_{\text{st}}$$

Keterangan:

C = kadar kolesterol HDL (mg/dl)

A = serapan

Cst = kadar kolesterol standar (200mg/dl)

### 3.7 Teknik Pengambilan Data

Data dalam penelitian ini berupa kadar kolesterol total dan HDL dalam darah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan/ data diperoleh dengan cara mengukur

kadar kolesterol total dan kadar kolesterol HDL tikus sebelum dan sesudah perlakuan, kemudian data yang diperoleh dimasukkan dalam tabel berikut:

Perlakuan	Ulangan					
	I		II		III	
	x	y	x	y	x	y
K -						
K +						
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>						
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>						
A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>						
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>						
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>						
A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>						
A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>						
A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>						
A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>						

Keterangan:

X : Data sebelum perlakuan,

Y : Data setelah perlakuan,

### 3.8 Analisis Data

Data hasil pemeriksaan kadar kolestrol darah yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analisis Kovarian (ANKOVA) 2 faktor, untuk mengetahui perbedaan antara sebelum, sesudah perlakuan, dan pengaruh beberapa jenis tepung kacang terhadap kadar kolesterol darah tikus. Jika terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata (BNT) taraf 0,05 dengan derajat kepercayaan 95 %