**BAB IV**

**METODE PENELITIAN**

**4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian**

 Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *Randomized* *Post Test Only Control Group Design.* Menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 macam perlakuan, setiap perlakuan dengan 5 ulangan.

**4.2. Populasi dan Sampel Penelitian**

Hewan coba adalah tikus galur wistar yang diperoleh dari laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Besar sampel penelitian hewan coba untuk jangka pendek menurut WHO minimal 5 ekor tiap kelompok.

**4.3. Variabel Penelitian**

4.3.1 Variabel terikat

 Variabel terikat pada penelitian ini adalah *Malondialdehyde* (MDA) dan kadar ferritin pada tikus putih anemia yang mendapatkan ekstrak kacang hijau pada dosis yang berbeda.

4.3.2 Variabel bebas

 Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak kacang hijau pada tikus putih anemia.

42

**4.4 Definisi Operasional**

4.4.1. Ekstrak Kacang Hijau

 Ekstrak kacang hijau didapatkan dari ekstraksi serbuk kacang hijau dengan metode maserasi menggunakan 400 mL pelarut etanol 70 %. Ampas diremaserasi dan filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50° C. Ekstrak kacang hijau diberikan dengan dosis 0,18 ; 0,36 ; dan 0,72 g /200 g/hari. 29

Skala : Ratio

4.4.2. Kadar Ferritin

 Dalam penelitian ini sampel diambil dari serum 1 cc untuk tiap tikus, kemudian diukur karad ferritin menggunaka kit Immulite ferritin dan dibaca dengan ELISA *reader*. Satuan kadar ferritin adalah microgram/liter (µg/l).

 Skala : Ratio

*4.4.3 Malondialdehyde* (MDA)

 *Malondialdehyde* (MDA) dilakukan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) dengan Spektofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Satuan kadar MDA adalah µl

 Skala : Ratio

**4.5 Bahan Penelitian**

 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hewan coba berupa tikus putih sejumlah 25 ekor, bahan makanan tikus berupa pellet, ekstrak kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) dengan dosis 0,18 ; 0,36 dan 0,72 g /ekor/hari, betadin, natrium siklamat alcohol 70%, aquades dan bahan minuman tikus berupa air ledeng.

**4.6. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang hewan coba, timbangan analitik , sarung tangan plastic, papan, jarum gavage, tabung reaksi, kertas saring halus, beaker glass 100 ml, gelas ukur 10 ml, tabung Erlenmeyer 500 eppendorf untuk menampung darah, Haemositometer, mikropiper ukuran 20 – 1000 µl, kapas, spidol maeker merah, hitam dan biru

**4.7. Cara Penelitian**

4.7.1 Persiapan hewan coba

Sebelum penelitian dimulai, hewan uji diadaptasikan selama satu minggu dalam kandang pada suhu kamar 20 – 25 °C. 40

4.7.2 Persiapan Perlakuan

1. Setiap hewan coba, diberi kode 1,2,3,4,5, dan 6 untuk memudahkan identifikasi
2. Ekstrak kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) disiapkan dalam 3 dosis yang berbeda

4.7.2.1 Penghitungan Dosis Ekstrak Kacang Hijau

 Penentuan dosis ekstrak kacang hijau dalam penelitian ini berdasarkan hasil konversi dosis maksimal yang digunakan oleh manusia ke tikus, mengikuti tabel konversi perhitungan dosis antar jenis hewan 40

 Angka konversi dosis dari manusia 70 kg ke tikus 200 g = 0,018, sehingga diperoleh tiga dosis berdasarkan konversi deret hitung, yaitu 0,18 g /200 g/hari, 0,36 g /200 g/hari dan 0,72 g /200 g/hari. 7

4.7.2.2 Pembuatan Ekstrak Kacang Hijau

 Ekstrak kacang hijau diperoleh dengan cara metode maserasi dengan menggunakan air sebagai bahan pelarutnya. Sebelumnya, kacang hijau kering ditumbuk halus, kemudian masing – masing dosis 0,18 ; 0,36 dan 0,72 g /200 g/hari dilarutkan ke dalam 3 ml aquades. Setelah itu, masing – masing larutan disaring menggunakan kertas saring kasar sebagai langkah awal, kemudian disaring menggunakan kertas saring halus. Hasil saringan tersebut merupakan ekstrak dari kacang hijau.

4.7.2.3 Pembagian Kelompok Sampel

 Setelah 25 ekor tikus putih aklimatisasi selama 1 minggu, tikus putih dibagi dalam lima kelompok secara acak, masing – masing kelompok sebanyak lima ekor

Kelompok I : Pakan standar

Kelompok II : Kontrol, diberi aquades selama 14 hari

Kelompok III : Diberi ekstrak kacang hijau dengan dosis 0,18 g /200 g/hari

 dalam 3 ml aquades selama 14 hari

Kelompok IV : Diberi ekstrak kacang hijau denagn dosis 0,36 g /200 g/hari

 dalam 3 ml aquades selama 14 hari

Kelompok V : Diberi ekstrak kacang hiajau dengan dosis 0,72 g /200 g/hari

 3 ml aquades selama 14 hari

**4.8.3 Teknik Pengumpulan**

3.8.3.1 Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah tikus dengan cara 38:

1. Mengeluarkan tikus dari kandang dengan cara setengah bagian dari ekornya diangkat
2. Memegang tikus dan menjepit di bagian tengkuk dengan jari tangan
3. Mengkondisikan tikus senyaman mungkin, kemudian *mikrohematokrit* digoreskan pada medial canthus mata di bawah bola mata ke arah foramen opticus.
4. *Mikrohematokrit* diputar sampai melukai plexus, jika diputar 5X maka harus dikembalikan 5X.
5. Darah yang keluar pertama kali dibuang, kemudian darah ditampung dalam eppendorf sampai mencukupi
6. Menghisap darah dengan menggunakan mikropipet smpai dengan angka 0,2 µl, kemudian sebelah luar pipet dibersihkan dengan kapas
7. Pipet yang berisi darah tersebut, dimasukkan dalam tabung sampai ujung pipet menempel pada dasar tabung, kemudian tiap ditekan sampai seluruh cairan bercampur

4.8.3.2 Pemeriksaan *Malondialdehyde (MDA)*

1. Semua sampel darah dimasukkan ke dalam sample rack dan dipilah – pilah menurut warna sampel darah
2. Setiap 8 sampel darah dimasukkan ke mesin *Centrifuge* dan *disentrifuse* dengan kecepatan 2500 rpm selama 8 menit sehingga terbentuk serum
3. Serum diambil dengan menggunakan *micropipette* dan dimasukkan jke dalam *eppendorf*
4. Ambil 0,5 cc serum kemudian tambahkan dengan :
5. 1,25 cc TCA 40% 2,5 µl
6. 200 µl HCL 1 N
7. 0,5 cc aquabides
8. NaThio 100 µl
9. Panaskan pada suhu 100 °C selama 25 menit menggunakan mesin pemanas supernatan
10. *Sentrifuse* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan ambil supernatan yang terbentuk
11. Masukkan supernatan ke dalam *vacum tube* dan tambahkan aquabides sampai 3 cc
12. Masukan supernatan ke dalam *cuvette*, kemudian masukkan *cuvette* tersebut pada mesin *UV-Spectrophotometer* dan baca serapan dengan panjang gelombang 532 nm

4.8.3.Penentuan Kadar Ferritin

1. Well plate dilapisi dengan antibodi penangkap.
2. Well plate dicuci dengan menggunakan washing buffer.
3. Antigen  diberikan pada well plate dan well plate kemudian dicuci dengan menggunakan washing buffer.
4. Well plate diberi antibodi detektor dan well plate kembali dicuci menggunakan washing buffer.
5. Anti-antibodi yang dilabeli enzim ditambahkan pada well plate dan well plate kembali dicuci menggunakan washing buffer.
6. Substrat dimasukkan agar enzim dapat berikatan dan memberikan sinyal terhadap keberadaan antigen

4.8.3.4 Perlakuan anemia

 Perlakuan pathologis (anemia), yaitu dengan pemberian pakan rendah zat besi pada semua tikus wistar putih selama 14 hari secara *ad libitum*.

4.8.3.5 Perlakuan Pemberian Ekstrak Kacang Hijau

 Perlakuan diberikan selama 14 hari, yaitu setelah tikus berhasil dibuat anemia. Perlakuan dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit injeksi 3 ml yang ujungnya dilengkapi kanul.

**4.9 Alur Kerja Penelitian**

25 ekor tikus putih

Adaptasi 7 hari

Perlakuan diet rendah Fe 14 hari

Pengukuran Kadar Hb

Randomisasi

Kelompok K5

5 ekor

Kelompok K4

5 ekor

Kelompok K2

5 ekor

Kelompok K3

5 ekor

Kelompok K1

5 ekor

Diet rendah FE dan Aquades 14 hari

Pakan standar

Diet rendah Fe & Ekstrak kacang hijau dosis 0,36 g/200 g / hari

Diet rendah Fe & Ekstrak kacang hijau dosis 0,18 g/200 g / hari

Diet rendah Fe & Ekstrak kacang hijau dosis 0,72 g/200 g / hari

Pengambilan darah di vena orbitalis

Pengukuran *Malondialdehyde* (MDA)

Pemeriksaan kadar Ferritin

Intepretasi hasil

Analisa data

**4.10. Analisa Data**

Data hasil penelitian dilakukan proses cleaning, coding, tabulating, dan entry data dalam computer. Data hasil penelitian dilakukan analisis deskriptif untuk mengetahui ukuran tendensi sentral yang meliputi mean, median, modus, kuartil dan persentil serta mengetahui ukuran penyebaran data meliputi standar deviasi, rentang, rata – rata deviasi dan variasi relative.

 Hasil analisa deskriptif untuk menghitung nilai mean, median, simpang baku terhadap kadar ferritin dan MDA. Selanjutnya disajikan dalam table *box plot* untuk mengetahui gambaran karakteristik satu set data. Uji normalitas kedua data menggunakan *Saphiro Wilks*. Didapatkan data kadar ferritin dan MDA berdistribusi normal. Kemudian data normal diuji dengan menggunakan *Levene’s test* untuk mengetahui homogenitas data. Selanjutnya dilakukan uji beda *One Way Anova* untuk data kadar ferritin dan kadar MDA serta dilanjutkan uji Post hoc dengan *Least Significant Difference test (LSD).*

**4.11. Lokasi dan Waktu**

Lokasi penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini 6 minggu

**4.13. Etika Penelitian**

Tikus merupakan hewan berkelompok, sehingga waktu adaptasi selama 7 hari, yang dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta Tikus diadaptasi dalam kandang berukuran 60cm x 20cm x 30cm dengan penutup yang terbuat dari kawat kasa yang diberi botol minuman. Kandang diletakkan dalam ruangan dengan suhu kamar. Tikus diberi pakan standar selama perlakuan. Sebelum penelitian dilakukan, *ethical clearance* telah dimintakan dari Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan (KBPK) Fakultas kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.