

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis desain eksperimental murni dengan menggunakan “*post test only control group design*” untuk menilai efek pemberian mentega putih terhadap peningkatan kadar MDA pankreas pada tikus kelompok kontrol maupun perlakuan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai dengan bulan Maret 2017. Penelitian berlangsung di laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada (PAU UGM) Yogyakarta pada bulan Maret 2017.

3.3 Populasi dan Subyek Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bahan biologi tersimpan berupa organ pankreas dari tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang sebelumnya telah mendapat perlakuan dari penelitian Pramanigtyas dan Nurmasitoh (2016), dengan judul Efek Pemberian Mentega Putih Berbagai Dosis Sebagai Induksi Hiperkolesterolemia Terhadap Profil Lipid dan Perlemakan Sel Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*).

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini berjumlah 24 buah bahan biologi tersimpan organ pankreas tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Kriteria tikus yang digunakan pada penelitian ini yaitu, tikus jantan wistar (*Rattus norvegicus*) putih

yang berusia sekitar 2-3 bulan dan memiliki berat 170-250 gram. Tikus yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok percobaan, yaitu kelompok K-, K+, P1, dan P2. Kelompok K-, kontrol negatif merupakan kelompok hewan coba yang hanya diberikan pakan standar *ad-libitum* tanpa induksi hiperkolesterolemia. Kelompok K+, kontrol positif merupakan kelompok hewan coba yang diberikan intervensi pakan tinggi lemak standar sebagai penginduksi hiperkolesterolemia. Kelompok P1 merupakan kelompok yang diberikan intervensi mentega putih cair dosis 1:5 (perbandingan 1 untuk mentega putih dan 5 untuk pakan) sebagai penginduksi hiperkolesterolemia. Kelompok P2 merupakan kelompok hewan coba yang diberikan intervensi mentega putih cair dosis 1:10 (perbandingan 1 untuk mentega putih dan 10 untuk pakan).

Pemberian pakan standar setiap harinya diukur sejumlah 20 gram/tikus. Oleh karena itu, kelompok P1 mendapatkan 20 gram pakan standar dan 4 gram mentega putih sedangkan P2 mendapatkan 20 gram pakan standar dan 2 gram mentega putih. Mentega putih diberikan menggunakan sonde lambung yang sebelumnya di lelehkan.

Jumlah hewan coba yang digunakan dapat diperoleh dengan menggunakan rumus Federer (Ridwan, 2013):

Diketahui $p=4$

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

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

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok

p = jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan penghitungan menggunakan rumus Federer di atas didapatkan jumlah sampel tiap kelompok adalah ≥ 6 sehingga total jumlah hewan coba yang diperlukan dalam penelitian ini sejumlah 24 ekor tikus galur wistar. Selanjutnya, teknik pengambilan sampel dilakukan secara acak (randomisasi). Tikus dimasukkan secara acak menggunakan tabel untuk dibagi menjadi 4 kelompok sehingga masing-masing kelompok berisi 6 ekor hewan coba. Kemudian tikus diberi label sesuai dengan kelompoknya.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar MDA pankreas tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*).

3.4.2. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian mentega putih dengan perbandingan dosis 1:5 dan 1:10 yang diberikan menggunakan sonde ke lambung hewan coba selama 6 minggu.

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Mentega putih

Mentega putih adalah bahan penginduksi hiperkolesterolemia yang digunakan pada hewan coba. Mentega putih diberikan dengan cara sonde ke lambung hewan coba. Sebelumnya mentega putih harus di lelehkan pada suhu sekitar 45°C. Dosis yang diberikan pada kelompok P1 dengan dosis 1:5 dan pada kelompok P2 dengan dosis 1:10.

3.5.2 Kadar MDA Pankreas

Kadar MDA digunakan sebagai parameter stres oksidatif. MDA dihasilkan sebagai akibat peningkatan reaksi stres oksidatif. Pengukuran MDA ini menggunakan metode TBA secara spektrofometri yang dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU UGM.

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

- a. Kandang tikus dengan tempat pakan dan minum
- b. Neraca analitik dengan skala gram merek Adam
- c. Penggaris
- d. Sonde lambung
- e. Set alat pencair mentega putih
- f. *Minor set*
- g. Papan bedah (dilapisi dengan *aluminium foil*)
- h. Set alat penyimpanan organ : *aluminium foil*, plastik, lemari pendingin, *ice box*
- i. Tabung reaksi
- j. *Homogenizer* merek Ultra-Turrax T8
- k. *Mixture* merek Vortex Genie-2
- l. pH meter
- m. *Sentrifuge* merek Heraus
- n. Spektrofotometer merek Shimtazu UV120IV

3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Pankreas tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 2 bulan dengan berat badan antara 200-250 gram yang sudah diberi perlakuan dan berjumlah 24 buah.

- b. Pakan tikus standar
- c. Pakan tikus tinggi lemak
- d. Minum tikus
- e. Sekam
- f. Mentega putih dengan dosis 1:5 dan 1:10.
- g. Bahan-bahan penyimpanan organ pankreas untuk analisis biokimia (es batu dan *dry ice*).
- h. Reagen TBA 0.8% merek Sigma_Aldrich
- i. Larutan KCl 1.15%
- j. Larutan Sodium dodecyl sulfate 8.1%
- k. Larutan Asam asetat 20%
- l. Larutan NaOH
- m. Larutan Aquades
- n. Larutan n-butanol dan piridin
- o. Ketamin 1000 mg/ 10 ml

3.7 Alur Penelitian

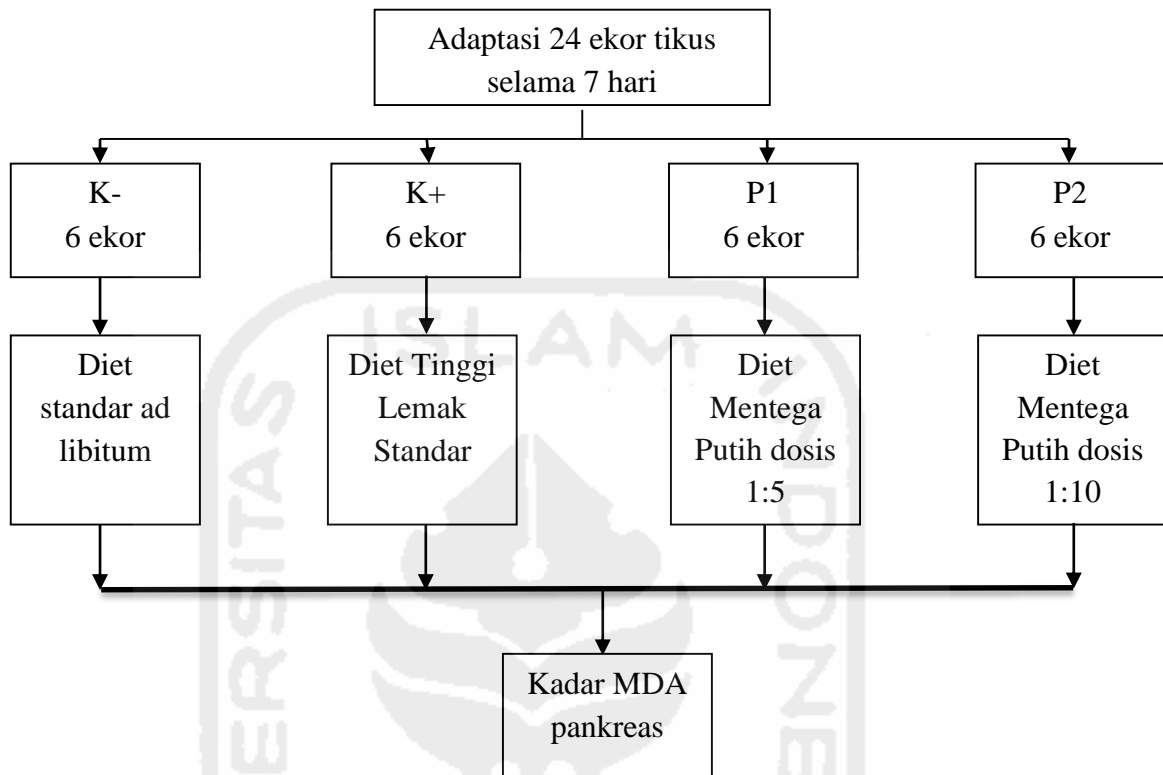
3.7.1 Terminasi

Setelah selama 6 minggu hewan coba diberikan perlakuan, tikus pada penelitian Pramaningtyas dan Nurmasitoh (2016) diterminasi dengan cara dekapitasi yang sebelumnya telah diberikan anestesi menggunakan suntikan intramuskular ketamin dengan dosis 0,2 ml. Kemudian dilakukan pengambilan organ pankreas hewan coba yang selanjutnya dibersihkan dari darah menggunakan larutan NaCl 0,9 %. Setelah itu organ dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan disimpan di dalam wadah yang berisi es batu. Penyimpanan tersebut dilakukan sebelum pengukuran kadar MDA pankreas yang dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada (PAU UGM).

3.7.2 Pengukuran Kadar MDA Pankreas

Menurut Ohkawa (1979) pengukuran MDA dilakukan dengan cara modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri dengan cara sebagai berikut:

- a. Sebanyak 1 g jaringan pankreas dihomogenisasikan dengan 9 ml KCl 1,15% menggunakan alat *homogenizer*
- b. Sebanyak 0,2 ml homogenat pankreas diambil, kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml *sodium dodecyl sulfate* 8,1%, 1,5 ml larutan asam asetat 20% dan NaOH hingga mencapai pH 3,5, serta tambahkan larutan TBA 0,8% sebanyak 1,5 ml.
- c. Sebanyak 4 ml air ditambahkan pada campuran tersebut, kemudian campuran tersebut dipanaskan pada suhu 95⁰C selama 60 menit.
- d. Campuran tersebut didinginkan pada air mengalir, kemudian ditambahkan 1 ml air dan 5 ml larutan yang berasal dari pencampuran antara n-butanol dan piridin dengan perbandingan volume 15:1.
- e. Larutan tersebut kemudian dicampur menggunakan alat vorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
- f. Supernatan yang didapat kemudian diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm menggunakan alat spektrofotometer.
- g. Nilai yang didapat pada pengukuran ini dituliskan dengan satuan nmol MDA/g jaringan pankreas.



Gambar 6. Alur Penelitian

3.8 Rencana Analisis Data

Hasil yang didapat dari pengukuran kadar MDA pankreas yang dilakukan di laboratorium PAU UGM kemudian dianalisis menggunakan *software* statistik. Pertama, data diuji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena sampel merupakan data numerik dan jumlah data < 50 . Distribusi data dikatakan normal jika $p > 0,05$. Selain itu, data diuji dengan uji homogenitas yang dilakukan dengan *Levene's Test*. Data dinyatakan homogen bila $p > 0,05$. Kedua, jika distribusi data normal kemudian diuji dengan uji *one way ANOVA* untuk mengetahui efek pemberian mentega putih pada tiap kelompok. Namun, jika distribusi data tidak normal dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Perbedaan antar kelompok dianggap signifikan jika didapatkan nilai $p < 0,05$. Ketiga, dilakukan analisis *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan rerata antar masing-masing kelompok.

3.9 Etika Penelitian

Pada penelitian ini, peneliti mengusahakan untuk melakukan langkah-langkah penelitian, yaitu:

1. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, maupun kegagalan dan keberhasilan penelitian.
2. Peneliti menggunakan organ pankreas tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang didapat dari penelitian Pramaningtyas dan Nurmasitoh (2016), dengan judul Efek Pemberian Mentega Putih Berbagai Dosis Sebagai Induksi Hiperkolesterolemia Terhadap Profil Lipid dan Perlemakan Sel Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang telah disetujui oleh komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia (FK UII) dengan nomor 03/Ka.Kom.Et/70/KE/II/2016. (terlampir)
3. Protokol perlakuan hewan coba telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan dengan persetujuan etik nomor 03/Ka.Kom.Et/70/KE/III/2017. (terlampir)