

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan desain eksperimental murni menggunakan *post test only control group design* untuk mengetahui efek mentega putih terhadap peningkatan kadar MDA hepar pada tikus kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Perlakuan yang diberikan berupa sonde lambung mentega putih dosis 1:5 dan 1:10.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan November 2016 sampai dengan bulan Januari 2017. Penelitian berlangsung di laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada (PAU UGM) Yogyakarta.

3.3 Populasi dan Subyek Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah bahan biologi tersimpan berupa organ hepar dari tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang sebelumnya telah mendapat perlakuan dari penelitian Pramunigtyas 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*). Penelitian tersebut bertempat di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini berjumlah 24 buah bahan biologi tersimpan organ hepar lobus kiri tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Kriteria tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus yang berusia sekitar 2 bulan dan

memiliki berat 170-250 gram. Sebelum diberi perlakuan, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari. Tikus yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok percobaan, yaitu kelompok K1, K2, P1, dan P2. Kelompok K1 merupakan kelompok kontrol negatif, artinya hewan coba pada kelompok ini tidak diberikan intervensi induksi hiperkolesterolemia sama sekali, hanya diberi pakan standar *ad-libitum*. Kelompok K2 merupakan kelompok kontrol positif, yaitu kelompok yang diberi intervensi induksi hiperkolesterolemia menggunakan pakan tinggi lemak standar. Kelompok P1 merupakan kelompok hewan coba yang diinduksi mentega putih dengan perbandingan dosis 1:5 (jumlah mentega putih:jumlah pakan standar). Kelompok P2 merupakan kelompok hewan coba yang diinduksi mentega putih dengan perbandingan dosis 1:10.

Jumlah minimal sampel pada penelitian ini didapat dari rumus Federer (Ridwan, 2013) :

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

t = jumlah kelompok perlakuan ; n = jumlah hewan coba yang dibutuhkan

Berdasarkan rumus tersebut didapatkan jumlah minimal sampel setiap kelompoknya adalah 6 ekor tikus. Sehingga, total keseluruhan minimal sampel yang dibutuhkan sejumlah 24 ekor tikus.

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan teknik randomisasi, yaitu pengambilan dilakukan secara acak. Pada awalnya tikus diberi label 1 sampai 20, lalu secara acak sampel dibagi menjadi 4 kelompok menggunakan pengisian pada tabel kosong. Setelah itu, tikus diberi label sesuai dengan kategori kelompok.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Terikat

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

3.4.2. Variabel Bebas

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

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Mentega putih

Mentega putih adalah bahan yang digunakan untuk induksi hiperkolesterolemia pada hewan coba. Pemberian mentega putih dilakukan dengan cara sonde lambung dan sebelumnya dicairkan terlebih dahulu sesuai dosis yang diteliti. Mentega putih dicairkan dengan cara dipanaskan pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ menggunakan kompor listrik. Pada kelompok P1, dosis perbandingan antara mentega putih dengan pakan adalah 1:5 dan P2 sebesar 1:10. Pemberian mentega putih dosis 1:10 diberikan 1 kali setiap pagi, sedangkan dosis 1:5 dibagi menjadi 2 kali pemberian untuk menyesuaikan kapasitas lambung tikus. Pemberian mentega putih dengan perbandingan 1:5 diberikan setiap pagi dan sore. Perlakuan ini dilakukan selama 6 minggu.

3.5.2 Kadar MDA Hepar

Kadar MDA Hepar adalah parameter untuk mengukur tingkat stres oksidatif di dalam hepar akibat peningkatan radikal bebas yang disebabkan oleh kondisi hiperkolesterolemia. Peningkatan radikal bebas meningkatkan proses peroksidase lipid di dalam hepar (Wulandari *et al.*, 2013). Pengukuran kadar MDA Hepar diukur menggunakan metode TBARS secara spektrofotometri dengan panjang

gelombang 532 nm 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 (Gambar 3.1)
- 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 (Gambar 3.2)
- k. *Mixture* merek Vortex Genie-2 (Gambar 3.3)
- l. pH meter
- m. *Sentrifuge* merek Heraus (Gambar 3.4)
- n. Spektrofotometer merek Shimtazu UV120IV

3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Hepar lobus kiri 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

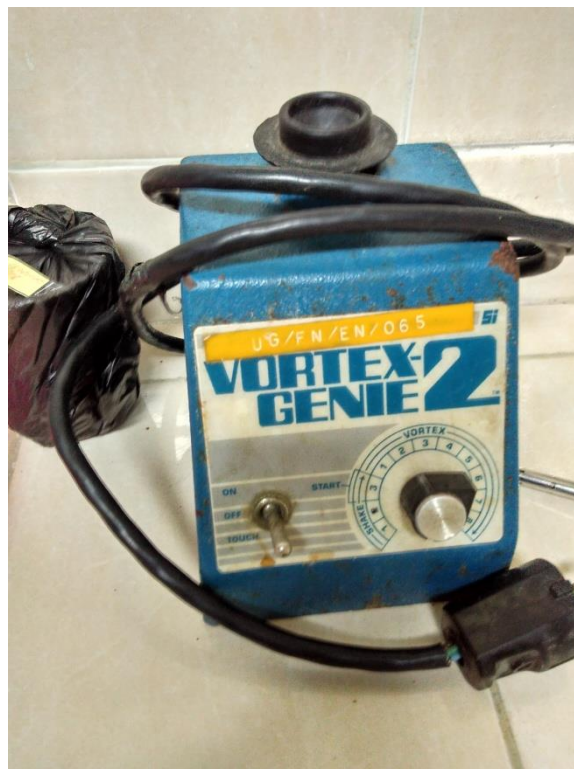
- f. Mentega putih dengan dosis 1:5 dan 1:10.
- g. Bahan-bahan penyimpanan organ hepar untuk analisis biokimia (es batu dan *dry ice*).
- h. Reagen TBA 0.8% merek Sigma_Aldrich
- i. Larutan KCl 1.15%
- j. Larutan Sodium dodecyl sulfate 8.1%
- k. Larutan Asam asetat 20%
- l. Larutan NaOH
- m. Larutan Aquades
- n. Larutan n-butanol dan piridin



Gambar 3.1, Neraca Analitik



Gambar 3.2, *Homogenizer*



Gambar 3.3, *Mixture*



Gambar 3.4, *Sentrifuge*

3.7 Alur Penelitian

3.7.1 Terminasi

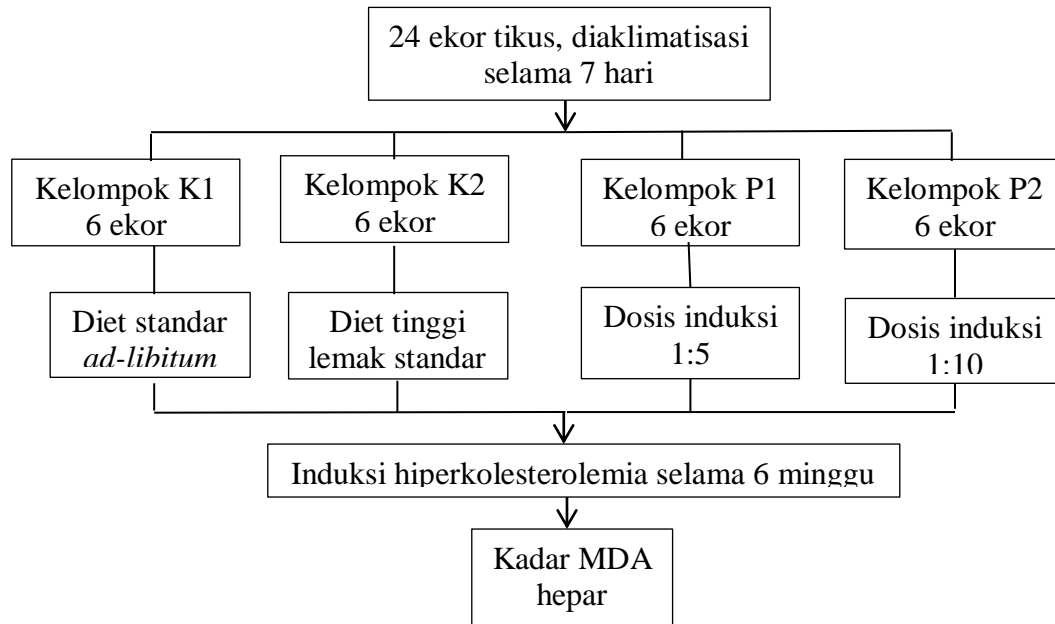
Pada hari terakhir perlakuan penelitian Pramaningtyas dan Nurmasitoh (2016), tikus dikorbankan dengan cara dekapitasi. Sebelumnya, tikus dibius terlebih dahulu dengan suntikan intramuskular ketamin sebanyak 0,2 ml dengan sediaan 1000 mg/10 ml dan bius inhalasi menggunakan eter. Selanjutnya, organ hepar tikus diambil bagian lobus kiri dan dibersihkan menggunakan NaCl 0,9% yang mengalir. Setelah organ bersih dari darah, organ dibungkus menggunakan *aluminium foil* serta plastik bersih. Organ yang telah dibungkus lalu disimpan di dalam wadah yang berisi es batu dan selanjutnya disimpan didalam lemari pendingin selama 5 hari.

3.7.1 Pengukuran kadar MDA hepar

Setelah terminasi, organ segera diangkut menuju lokasi penelitian. Transportasi organ hepar dari laboratorium fisiologi FK UII menuju PAU UGM menggunakan *ice box* yang sebelumnya telah diisi *dry ice* untuk mempertahankan kesegaran organ. Selanjutnya, pengukuran kadar MDA hepar dilakukan di PAU UGM menggunakan

metode TBARS secara spektrofotometri. Menurut Ohkawa *et al.* (1979), metode tersebut dilakukan melalui tahap sebagai berikut :

- a. Sebanyak 1 gram organ hepar dihomogenisasi dengan 9 ml larutan KCl 1,15% menggunakan *homogenizer*.
- b. Sebanyak 0,2 ml hepar yang sudah dihomogenisasi ditambahkan dengan 0,2 ml larutan *sodium dodecyl sulfate* 8,1%, 1,5 ml larutan asam asetat 20%, NaOH sampai dengan pH 3,5, dan larutan tiobarbiturat (TBA) 0,8%.
- c. Sebanyak 4 ml air ditambahkan ke dalam campuran tersebut dan selanjutnya dipanaskan pada suhu 95° celcius selama 60 menit.
- d. Dinginkan larutan terlebih dahulu, selanjutnya tambahkan 1 ml air dan larutan campuran dari n-butanol dan pyridine (15:1) sebanyak 5 ml.
- e. Campuran larutan tersebut selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
- f. Hasil dari sentrifugasi akan menghasilkan lapisan supernatan yang selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.
- g. Standar yang digunakan sebagai referensi pengukuran adalah 1,1,3,3-tetramethoxypropane, selanjutnya hasil pengukuran MDA yang didapat dalam bentuk satuan nmol MDA/g jaringan hepar.



Gambar 3.5 Alur Penelitian

3.8 Rencana Analisis Data

Hasil yang didapat dari hasil pengukuran kadar MDA hepar selanjutnya dianalisis menggunakan *software* statistik. Sebelum dianalisis data diuji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji Saphiro Wilk karena jumlah sampel <50 . Distribusi dikatakan normal jika nilai $p > 0,05$. Jika distribusi data normal maka dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Jika data tidak terdistribusi secara normal maka dilakukan uji Kruskal-wallis. Perbedaan antar kelompok dianggap signifikan jika diperoleh nilai $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan analisis *post hoc* Bonferroni untuk mengetahui perbedaan rerata antar masing-masing kelompok. Semua uji dilakukan dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$).

3.9 Etika Penelitian

Peneliti akan mengusahakan menjalankan penelitian dengan memperhatikan etika penelitian sesuai dengan prinsip 3 R, yaitu *Replacement*, *Reduction*, dan

Refinement (Ridwan, 2013). Penjabaran etika penelitian pada penelitian ini antara lain:

1. Peneliti sudah memperhitungkan secara seksama keperluan memanfaatkan hewan coba dalam penelitian ini.
2. Jumlah sampel pada penelitian ini diusahakan seminimal mungkin namun tetap mendapatkan hasil yang optimal dengan menghitung jumlah minimal sampel menggunakan rumus Federer.
3. Peneliti akan memperlakukan hewan coba secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisir perlakuan yang menyakitkan hewan coba sepanjang penelitian berlangsung.
4. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur.
5. Peneliti menggunakan lobus kiri organ hepar tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang didapat dari penelitian Pramuningtyas 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.
6. Peneliti telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor 10/Ka.Kom.Et/70/KE/XII/2016.