

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental murni (*true experimental*) dengan model *post-test only with control group design* untuk menilai perbedaan kadar Malondialdehida (MDA) ginjal pada tiap kelompok tikus Wistar jantan. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian diet tinggi kolesterol menggunakan mentega putih dan probiotik dengan dosis bertingkat yang sudah ditentukan tiap kelompoknya.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu

Penelitian utama dalam proposal ini dilakukan selama 7 bulan (bulan Maret 2018-Oktober 2018). Untuk proses penelitian terkait dengan MDA ginjal dimulai dalam periode akhir tahun 2018 sampai dengan Mei 2019 mulai dari penyusunan proposal penelitian hingga penyusunan laporan hasil penelitian.

3.2.2. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dan Laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

3.3. Populasi dan Subyek Penelitian

3.3.1. Populasi

Populasi pada penelitian adalah bahan biologi tersimpan berupa organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan yang berusia sekitar 2 bulan dengan berat badan 150-200 g yang telah mendapatkan perlakuan pada penelitian Lusiantari *et al.* (data belum dipublikasikan) dengan judul Pengaruh Probiotik Terhadap Ekspresi Reseptor Endothelin-B dan Kadar Malondialdehid (MDA) Otak Pada Tikus Model Hiperkolesterolemia Yang diinduksi Mentega Putih di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.3.2. Subyek

Subjek penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini berjumlah 19 buah bahan biologi tesimpan organ ginjal tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah organ ginjal dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jenis kelamin jantan, sehat, dan berat badan rata-rata 200 gram. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah hewan coba yang mati selama penelitian berlangsung. Bahan biologi tersimpan diperoleh dari penelitian Lusiantari, *et al.* (data belum dipublikasikan). Jumlah angka tersebut telah memenuhi sampel yang ideal menurut penelitian Charan & Kantharia (2013). Jumlah sampel hewan coba didapatkan dengan rumus **E = jumlah hewan coba – jumlah total kelompok**, dimana E dianggap optimal apabila terdapat dalam rentang 10-20, sehingga dibutuhkan sampel hewan coba sebanyak 15-20.

Subjek berupa organ ginjal pada penelitian ini berjumlah 19 dan terbagi menjadi 5 kelompok antara lain kelompok C⁻ dengan jumlah 4 hewan coba, C⁺ 4 hewan coba, T1 3 hewan coba, T2 4 hewan coba dan T3 4 hewan coba. Menurut Kim (2017) masing-masing kelompok yang mendapat probiotik mendapat perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok kontrol negatif (C⁻), yaitu kelompok tikus yang diberikan pakan standar dan disondase *aquadest* sebanyak 3 cc/hari selama 10 minggu
- b. Kelompok kontrol positif (C⁺), yaitu kelompok tikus yang diberikan pakan standar dan disondase mentega putih sebanyak 3 gram/hari selama 10 minggu
- c. Kelompok perlakuan 1 (T1), yaitu kelompok tikus yang diberikan pakan standar, disondase mentega putih 3 gram/hari dan probiotik dengan dosis $1,65 \times 10^6$ cfu bakteri/gram (0,04 gram) per hari selama 10 minggu
- d. Kelompok perlakuan 2 (T2), yaitu kelompok tikus yang diberikan pakan standar, disondase mentega putih 3 gram/hari dan probiotik

dengan dosis $5,5 \times 10^6$ cfu bakteri/gram (0,12 gram) per hari selama 10 minggu

- e. Kelompok perlakuan 3 (T3), yaitu kelompok tikus yang diberikan pakan standar, disondase mentega putih 3 gram/hari dan probiotik dengan dosis $1,65 \times 10^7$ cfu bakteri/gram (0,4 gram) per hari selama 10 minggu.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan dosis probiotik yang diberikan pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan selama 10 minggu.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid (MDA) ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.

3.5. Definisi Operasional

- 3.5.1. Mentega putih merupakan bahan yang mengandung lemak yang berperan sebagai induksi hiperkolesterolemia. Pemberian mentega putih pada setiap kelompok hewan coba adalah dengan cara sondase. Sebelum dilakukan sondase, mentega putih dicairkan terlebih dahulu menggunakan alat pemanas. Setelah mencair, mentega dibiarkan hingga tidak terlalu panas atau kurang lebih selama 5 menit. Jumlah mentega putih yang diberikan pada hewan coba adalah 3 gram per hari, hal tersebut mengacu pada penelitian milik Lusiantari *et al.* (2018).

- 3.5.2. Probiotik merupakan diet yang diberikan pada kelompok perlakuan 1 (T1), kelompok perlakuan 2 (T2) dan kelompok perlakuan 3 (T3). Pada penelitian ini, probiotik yang digunakan adalah probiotik bubuk dengan merk Lacto-B. Probiotik ini mengandung $4,7 \times 10^7$ cfu/gram bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Dosis probiotik yang diberikan adalah $1,65 \times 10^6$ cfu bakteri/gram (setara dengan 0,04 gram Lacto-B) pada T1, $5,5 \times 10^6$ cfu bakteri/gram (setara dengan 0,12 gram Lacto-B) pada T2, dan $1,65 \times 10^7$ cfu bakteri/gram (setara dengan 1,2 gram Lacto-B) pada T3. Pemberian probiotik pada hewan coba adalah dengan cara sondase.

Sebelum dilakukan sondase, probiotik ditimbang terlebih dahulu kemudian diencerkan menggunakan *aquadest* sebanyak 0,5 ml.

3.5.3. Kadar Malondialdehida (MDA) ginjal tikus merupakan hasil dari pengukuran kadar MDA pada organ ginjal kiri tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang telah mendapatkan perlakuan selama 10 minggu. Pengukuran kadar MDA ini menggunakan metode uji TBARS dengan satuan nmol MDA/gram. Pengukuran Laboratorium Pangan dan Gizi gedung Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

3.5.4. Tikus Model Hiperkolesterolemia

Tikus model hiperkolesterolemia merupakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diinduksi dengan menggunakan mentega putih yang dicairkan melalui pemanasan, ditunggu hingga tidak terlalu panas kemudian disondasekan kepada hewan coba. Perlakuan ini diberikan selama 10 minggu.

3.6. Instrumen Penelitian

3.6.1. Alat

- a. Mixture merk Vortex Genie-2
- b. Spuit 1 cc
- c. Alat sondase
- d. Alat penyimpanan organ (*aluminium foil*, plastik klip, lemari pendingin - 80 derajat, *ice box*)
- e. Tabung reaksi
- f. *Homogenizer* merk Ultra-Turrax T8
- g. *Sentrifuge* merk Herraus
- h. *Spektrofotometer* merk Shimatzu UV120IV

3.6.2. Bahan

- a. Organ ginjal kiri tikus putih (500) galur Wistar jantan berusia sekitar 2 bulan dengan berat rata-rata 200 gram berjumlah 19, yang sudah diberikan perlakuan selama 10 minggu
- b. Larutan : *aquadest*
- c. Reagen TBA 0,8%
- d. Larutan KCl 1,15%

- e. Larutan asam asetat 20%
- f. Larutan NaOH
- g. Larutan n-butanol dan piridin
- h. Larutan *sodium dodecyl sulfate* 8,1%
- i. Es batu dan *dry ice*

3.7. Tahap Penelitian

3.7.1. Terminasi dan Pengambilan Organ

Terminasi hewan coba dilakukan dengan cara dibius menggunakan ketamin. Setelah dibius, dilakukan reperfusi tikus menggunakan larutan NaCl ke dalam jantung hewan coba selama 15 menit dan dilakukan pembedahan jika telah dipastikan darah pada tikus benar-benar sudah habis. Kemudian dilakukan pengambilan organ ginjal. Organ ginjal yang telah diambil dibebaskan dari lemak-lemak yang menyelimutinya, setelah itu dibersihkan menggunakan larutan PbSO₄. Sebelum dibungkus menggunakan *aluminium foil*, ginjal tersebut ditimbang terlebih dahulu. Setelah dibungkus dengan *aluminium foil*, kemudian disimpan pada *freezer* -80 derajat, kemudian dibawa ke laboratorium PAU UGM dengan termos es untuk mengukur kadar malondialdehid ginjal.

3.7.2. Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA ginjal dilakukan dengan metode yang sama seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Sugiarto, Padaga, dan Wuragil (2012) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Ginjal dengan berat 0,5 gram dimasukkan ke dalam mortar dingin kemudian digerus sampai halus
- b. Ditambahkan 500 µl NaCl 0,9% dan dihomogenkan
- c. Homogenat kemudian diambil dan dipindahkan ke dalam tabung *microtube*
- d. Disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya
- e. Sebanyak 100 µl supernatan dimasukkan ke dalam *microtube*, ditambahkan 550 µl *aquades* dan dihomogenkan

- f. Ditambahkan dengan 100 μ l HCl 1 N dan Na-Thio 1% sebanyak 100 μ l kemudian dihomogenkan
- g. Mulut tabung ditutup dengan *aluminium foil* dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 10 menit
- h. Didinginkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan supernatannya diambil, dipindahkan ke tabung *microtube*
- i. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm dengan nmol MDA/gram jaringan ginjal.

3.8. Analisis Data

Dalam penelitian ini, hasil yang diperoleh dari pengukuran kadar malondialdehid ginjal tikus akan dianalisis menggunakan SPSS. Sebelumnya dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel <50. Distribusi data dikatakan normal jika $p > 0,05$. Apabila didapatkan data terdistribusi normal, maka dilakukan analisis statistik menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *post hoc Benferroni* untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok perlakuan. Apabila data terdistribusi tidak normal maka dilakukan uji alternatif *Kruskal-Wallis* dengan *post hoc Mann-Whitney*. Perbedaan antar kelompok dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$ (Dahlan, 2014).

3.9. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan surat keterangan lolos kaji etik. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, serta kegagalan maupun keberhasilan penelitian.