

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

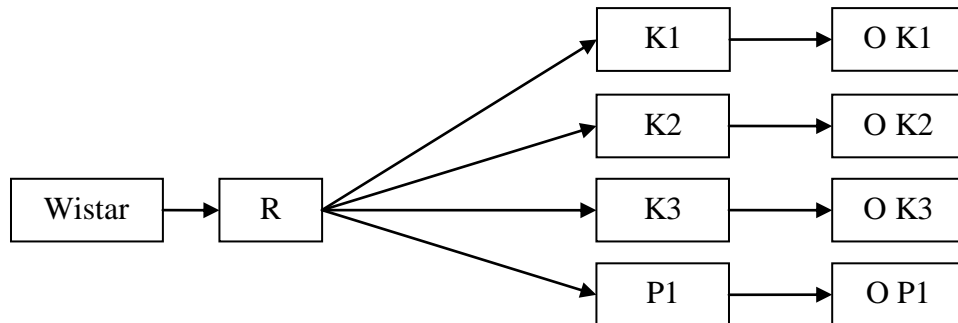
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Biokimia.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pengandangan hewan coba dan pembuatan pakan. Analisis kadar malondialdehida serum dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus wistar. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) *ad libitum* dan minyak goreng pemanasan berulang, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar MDA dalam serum tikus wistar.



Gambar 10. Skema penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K1 : Kontrol negatif (diet standar)

K2 : Kontrol positif yang diberi minyak goreng dengan pemanasan berulang dan diet standar selama 4 minggu

K3 : Kontrol positif yang diberi diet standar dan ubi ungu *ad libitum* selama 4 minggu

P1 : Kelompok perlakuan yang diberi minyak goreng dengan pemanasan berulang, ubi ungu *ad libitum* dan diet standar selama 4 minggu

O K1 : Kadar MDA serum kelompok K1

O K2 : Kadar MDA serum kelompok K2

O K3 : Kadar MDA serum kelompok K3

O P1 : Kadar MDA serum kelompok P1

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar.

4.4.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Galur wistar jantan dipilih karena memiliki karakteristik mirip manusia dari data dasar fisiologis dan metabolisme untuk pemeriksaan MDA. Sampel penelitian adalah tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.4.2.1 Kriteria inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 12 minggu sebelum dilakukan adaptasi
- Kondisi sehat (aktif dan tidak ada kelainan anatomis)

4.4.2.2 Kriteria eksklusi

- Tikus tidak bergerak secara aktif
- Tikus mengalami penurunan berat badan (<100 gram)
- Tikus mengalami perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati selama masa penelitian

4.4.2.3 Cara sampling

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *simple random sampling*.

4.4.2.4 Besar sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria *World Health Organization dalam Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompok. Pada penelitian ini terdapat tiga kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan ketentuan tersebut, didapatkan jumlah total sampel sebesar 24 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

- Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) *ad libitum*
- Minyak goreng pemanasan berulang

4.5.1 Variabel tergantung

- Kadar MDA serum darah

4.6 Definisi operasional

Tabel 5. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
Diet standar	Diet standar yang digunakan adalah pellet jenis P594 <i>ad libitum</i> dengan sediaan 20 gram dan air minum yang diberikan setiap sore hari.	gram	Nominal

Minyak goreng dengan pemanasan berulang	Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng bermerek Tropical. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan minyak goreng segar ke dalam ketel sebanyak ± 2000 mL, kemudian ketel dipanaskan hingga suhu mencapai 200°C selama 15 menit. Setelah 15 menit minyak di dalam ketel didiamkan hingga dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-4. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar). Setelah pemanasan ke-4, minyak didinginkan kemudian disondase kepada kelompok K2 dan P1 dengan dosis 3 ml/ekor/hari selama 28 hari. Jika ada sebagian minyak yang keluar saat proses sondase, maka dilakukan sondase ulang.	ml	Nominal
Ubi ungu	Ubi ungu dibeli dari Pasar Bandungan, Kabupaten Semarang. Ubi ungu dicuci bersih kemudian dikukus dengan suhu 75°C selama 20 menit. Ubi ungu dipotong kotak ukuran 1 cm^3 dan diberikan secara <i>ad libitum</i> dengan takaran 30 gram/tikus per hari pada pagi hari. Pada pagi keesokan harinya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi wistar.	gram	Rasio

MDA	Merupakan hasil sekunder radikal bebas yang diukur pada serum wistar menggunakan spektrofotometer dengan metode TBARS. Tidak dilakukan pemuasaan pada tikus wistar sebelum diukur kadar MDA serum.	nmol /mL	Rasio
-----	--	----------	-------

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

- a. Tikus wistar jantan
- b. Ransum pakan standar untuk hewan coba
- c. Minyak goreng jelantah
- d. Ubi ungu
- e. Larutan EDTA
- f. Larutan TCA 15%
- g. Larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25N
- h. *Aquadest*

4.7.2 Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan
- d. *Disposable syringe*
- e. Tabung reaksi

- f. Spektrofotometer
- g. Mikropipet 100 μ
- h. Cuvet
- i. *Waterbath*
- j. Spektrofotometer Stat Fax 3300
- k. Sentrifuge

4.7.3 Jenis data

Pemeriksaan kadar MDA serum setelah pemberian ubi ungu pada tikus wistar yang diberi minyak goreng pemanasan berulang merupakan data primer.

4.7.4 Cara Kerja

1. Pembuatan minyak goreng pemanasan berulang

Minyak goreng segar dimasukkan ke dalam ketel sebanyak ± 2000 mL, kemudian dipanaskan hingga suhu mencapai 200°C selama 15 menit. Pengukuran suhu minyak dengan termometer dimaksudkan untuk menjaga agar suhu minyak konstan, dan waktu mulai dihitung jika suhu sudah mencapai 200°C . Setelah 15 menit minyak di dalam ketel didiamkan hingga dingin dan dilanjutkan pemanasan berikutnya sampai pemanasan ke-4. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama (tidak diganti dan tidak dilakukan penambahan volume minyak segar).⁵²

2. Pembuatan pakan ubi ungu

Ubi ungu yang telah dicuci bersih kemudian dikukus dengan suhu 75°C selama 20 menit. Ubi ungu dipotong kotak ukuran 1 cm³ dan diberikan secara *ad libitum* dengan takaran 30 gram/tikus per hari pada pagi hari. Pada pagi keesokan harinya dilakukan pengukuran sisa ubi ungu untuk mengetahui banyaknya ubi ungu yang dikonsumsi wistar.

3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel dikandangkan secara individual di Laboratorium Biokimia. Selama penelitian, wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh wistar hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*.

Pada hari ke-8, wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok:

K1 : wistar mendapat diet standar

K2 : wistar mendapat diet standar dan minyak goreng yang telah dipanaskan berulang

K3 : wistar mendapat diet standar dan ubi ungu *ad libitum*

P1 : wistar mendapat diet standar, minyak goreng yang telah dipanaskan berulang, dan ubi ungu *ad libitum*

Perlakuan dilakukan per hari 8 sampai 35. Pada hari ke-35 dilakukan pengambilan sampel darah dari aorta untuk kelompok K1, K2 dan P1. Sebelum pengambilan darah, terlebih dahulu dilakukan pembiusan dengan eter. Kemudian dilakukan insisi vertikal pada regio abdomen wistar menggunakan scalpel. Setelah itu, tulang iga dipatahkan sehingga dapat terlihat jantung wistar. Darah langsung diambil dari aorta sebanyak \pm 3ml dengan spuit dan ditampung dalam tabung reaksi yang telah terisi 2 tetes antikoagulan EDTA. Setelah didapatkan sampel darah, selanjutnya dilakukan pengukuran kadar MDA serum sebagai data akhir.

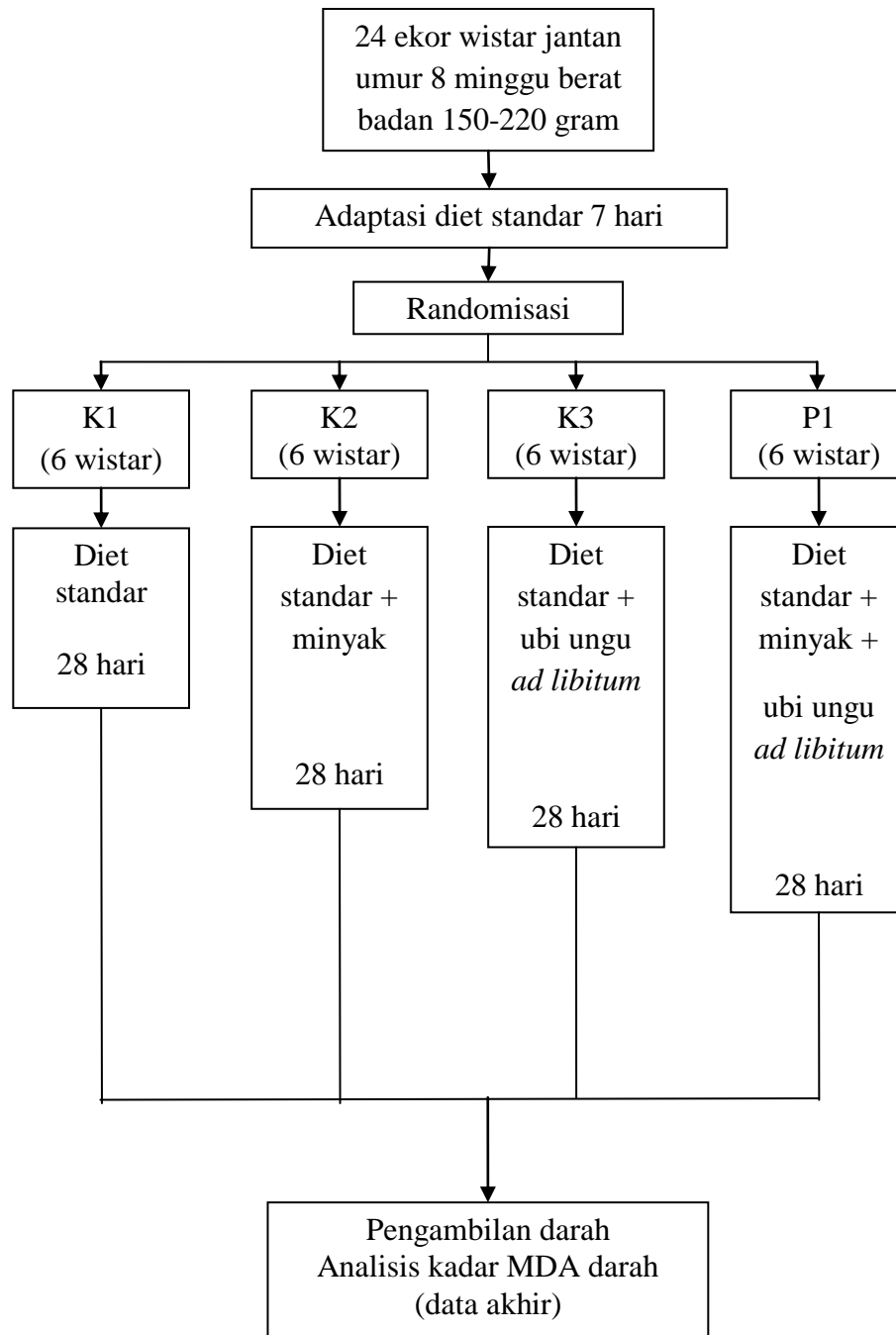
4. Pengukuran kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dapat dilakukan dengan metode TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) dengan cara seperti berikut:

1. Ambil darah wistar sebanyak 3cc, masukan dalam tabung sentrifuge yang telah diberi 2 tetes EDTA.
2. Sampel darah yang telah disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit diambil supernatannya sebanyak 200 μ l masukan ke dalam tabung sentrifuge yang kosong.
3. Tambahkan dengan larutan TCA 15% sebanyak 2000 μ l.
4. Tambahkan dengan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N sebanyak 2000 μ l
5. Panaskan dalam *waterbath* pada suhu 95^oc selama 60 menit.
6. Dinginkan pada suhu ruang diatas ice bath selama 15 menit.

7. Sentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm.
8. Ambil supernatant dan masukan ke dalam cuvet.
9. Baca absorbansi supernatant dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm.⁵³

4.8 Alur penelitian



Gambar 11. Alur penelitian

4.9 Analisis data

Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Package for Social Science*) 17.0 for Windows. Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Karena pada penelitian ini didapatkan distribusi data normal dan data homogen, maka untuk menganalisis perbedaan antar kelompok dilakukan uji parametrik *One-way ANOVA* dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%. Hasil uji *one-way ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,267$ yang berarti tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok, sehingga tidak dilakukan analisis data menggunakan uji *post-hoc*.

4.10 Etika penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang.

