

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

3.1.1 Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only with control*.

3.1.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Riau bulan Apr - Nov 2009, sebagaimana yang tercantum pada jadwal kerja.

3.1.3 Variabel Penelitian

3.1.3.1 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah konsentrasi MDA plasma.

3.1.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi kolesterol plasma.

3.1.4 Definisi Operasional

Pada penelitian ini yang dimaksud dengan:

- Air perasan umbi bawang merah adalah sari air yang diperoleh sebagai hasil perasan umbi bawang merah dengan konsentrasi 80%. Konsentrasi ini diperoleh dari penelitian pendahuluan.
- MDA adalah produk peroksidasi lipid dalam plasma yang diukur dengan metode Wills.
- Mencit adalah mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa yang diperoleh dari Bagian Farmakologi Universitas Riau, berumur \pm 4 bulan dengan berat badan rata-rata 30-35 g/ekor.
- Kuning telur adalah kuning telur mentah ayam negeri.

- Kolesterol adalah kolesterol total plasma yang diukur dengan metode CHOD PAP.

3.1.5 Sampel

Penentuan jumlah sampel berdasarkan rumus $t(r-1) \geq 15$, t = jumlah perlakuan; r = jumlah ulangan.

Penelitian ini menggunakan sampel 20 ekor mencit, terdiri dari 4 kelompok perlakuan (KP), masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit, yaitu

1. KP I yaitu kelompok mencit yang hanya diberi air layak minum melalui sonde lambung disamping diet standar.
2. KP II yaitu kelompok mencit yang diberi kuning telur melalui sonde lambung disamping diet standar.
3. KP III yaitu kelompok mencit yang diberi kuning telur dan air perasan bawang merah (konsentrasi ditentukan dalam penelitian pendahuluan) disamping diet standar.
4. KP IV yaitu kelompok mencit yang diberi kuning telur dan simvastatin disamping diet standar.

3.2 Bahan dan Cara

3.2.1 Pemeliharaan hewan percobaan

Bahan dan alat :

Mencit, pakan, kandang mencit, serutan kayu, timbangan.

Cara kerja :

Mencit-mencit dipelihara dalam kandang. Alas kandang diberi serutan kayu untuk menyerap kotoran mencit. Alas kandang diganti 2 x seminggu. Kandang tersebut diletakkan pada ruanan berventilasi cukup. Makanan dan minuman diberikan *ad libitum*, diperiksa dan ditambah setiap hari. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap minggu. Setiap bulan kandang-kandang dicuci dan dibersihkan.

3.2.2 Pengolahan bawang merah

Bahan dan alat :

Umbi bawang merah, aquadest, oven, timbangan, blender, kain flanel.

Cara kerja :

Air perasan bawang merah dibuat dengan cara :

- Bawang merah dikupas kulitnya dan dicuci dengan air bersih.
- Umbi bawang diiris sampai ketebalan menjadi ± 2 mm, lalu dikeringkan dengan oven (lemari pengering) pada suhu 40-50 °C selama 30-36 jam.
- Setelah kering bawang merah ditimbang 500 gram. Bawang dilumat dengan 100 ml akuades menggunakan blender.
- Setelah didiamkan 1 jam, lumatan tersebut diperas dengan kain flanel dan sarinya ditampung.
- Air perasan diencerkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 250 ml. Dengan demikian, 2 gram bawang merah setara dengan 1 ml air perasan bawang merah atau sama dengan 200% b/v.
- Pengenceran dilakukan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

3.2.3 Pemberian air perasan bawang merah

Bahan dan Alat :

Air perasan bawang merah, sonde lambung

Cara kerja :

Volume yang diberikan adalah 1 ml, konsentrasi disesuaikan dengan konsentrasi optimal yang didapatkan pada penelitian pendahuluan. Air perasan bawang merah diberikan tiap hari pada pagi hari dengan menggunakan sonde lambung. Pemberian air perasan bawang merah dilakukan selama 2 minggu, saat yang bersamaan juga diberikan kuning telur. Tetapi pemberian keduanya dijarakkan ± 1 jam.

3.2.4 Pemberian kuning telur

Bahan dan alat :

Kuning telur, sonde lambung.

Cara kerja :

Pemberian kuning telur dilakukan tiap hari selama 5 minggu, yaitu 3 minggu dilakukan sebelum pemberian bawang merah dan 2 minggu dilakukan bersamaan dengan pemberian air perasan bawang merah. Kuning telur diberikan sebanyak 1 ml pada pagi hari dengan sonde lambung.

3.2.5 Pemberian simvastatin

Simvastatin diberikan tiap hari pada pagi hari dengan menggunakan sonde lambung. Pemberian simvastatin dilakukan selama 2 minggu, saat yang bersamaan juga diberikan kuning telur. Tetapi pemberian keduanya dijarakkan \pm 1 jam. Perhitungan dosis simvastatin menurut Laurence dan Bacharach (1964) dalam Santoso (2006) yaitu $0,0026 \times 20 \text{ mg} = 0,052 \text{ mg}/20 \text{ g}$ berat badan. Simvastatin ini kemudian dilarutkan dalam akuades.

3.2.6 Pengambilan darah

Bahan dan alat :

Eter, bejana kaca untuk membius mencit, alat-alat bedah berupa pinset, gunting, skapel, tabung EDTA, alat sentrifugasi, pipet.

Cara kerja :

Pada waktu yang telah ditentukan, dilakukan pengambilan darah dari jantung. Sebelumnya mencit dibius dengan jalan memasukkannya ke dalam bejana yang telah jenuh dengan uap eter. Darah ditampung dalam tabung EDTA. Tambahkan 10 μl 2 Mm BHT dan 10 μl 2Mm desferal per ml darah. Tabung dibolak-balik perlahan agar tidak

menggumpal. Darah kemudian disentrifugasi dengan kecepatan sekitar 3000 rpm untuk memperoleh plasma, kemudian disimpan dalam lemari pendingin – 20 °C sampai waktu pengukuran.

3.2.7 Pembuatan larutan standar MDA

Bahan dan alat :

Tetra etoksiopropan (TEP) 0,125 µM, *Thiobarbituric acid* (TBA) 0,67 % w/v dalam air, es spektrofotometer, kuvet, vortex, penangas air, bejana, alat sentrifus.

Cara kerja :

Pembuatan larutan standar MDA dengan menggunakan larutan tetraetoksiopropan (TEP) sebagai prekursor. TEP akan dihidrolisis oleh air menjadi MDA. Pembuatan kurva standar dengan menggunakan berbagai konsentrasi dari larutan standar TEP (0,4 sampai 5 nmol/ml). Sumbu x menunjukkan kadar standar dan sumbu y menunjukkan absorban.

- Preparat MDA standar (TEP) diencerkan dengan berbagai jumlah dan didapat berbagai konsentrasi MDA.
- Ke dalam 2 ml larutan standar ditambahkan 2 ml reagen TBA.
- Larutan dipanaskan selama 10 menit pada suhu 95 °C dalam penangas air dengan tabung tertutup.
- Tabung didinginkan dengan es kemudian disentrifus pada 2.000 g selama 10 menit.
- Larutan dipindahkan ke dalam kuvet dan dibaca absorbansinya.
- Kontrol yang digunakan membuat *autozero* alat terdiri dari akuades yang diinkubasi dengan reagen TBA.

Perhitungan konsentrasi MDA plasma menggunakan rumus $A1/A2 = C1/C2$ dengan mengambil nilai yang terdekat.

3.2.8 Pemeriksaan MDA plasma

Bahan dan alat :

Plasma, TCA 20%, akuades, *Thiobarbituric acid* (TBA) 0,67 % w/v dalam air, es spektrofotometer, kuvet, vortex, penangas air, bejana, pipet mikro, alat sentrifus, tabung reaksi.

Cara kerja :

Pengukuran MDA dilakukan dengan metode Wills dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan asam tiobarbiturat akan membentuk senyawa berwarna merah muda, yang akan mengabsorpsi sinar tampak pada panjang gelombang 515-553 nm. Jumlah MDA akan menggambarkan tingkat peroksidasi lipid.

- Masukkan 150 μ l plasma yang sudah diencerkan dengan 350 μ l akuades ditambahkan 250 μ l TCA 20%.
- Larutan dicampurkan dan didiamkan dalam suhu ruangan selama 5 menit.
- Tabung disentrifus pada 2.000 g selama 10 menit dalam suhu ruangan.
- Supernatan kemudian diambil 500 μ l
- Ke dalam larutan ditambahkan 500 μ l reagen TBA dan dicampur.
- Larutan dipanaskan dengan tabung yang ditutup selama 10 menit dalam waterbath dengan suhu kurang lebih 95 °C.
- Tabung diangkat dan didinginkan dalam es, kemudian disentrifus pada 2.000 g selama 10 menit.
- Dimasukkan dalam kuvet dan dibaca absorbansinya.

3.3 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data dilakukan secara manual, dengan kalkulator dan komputer, sedangkan analisis data dilakukan menggunakan *program Statistical Package for Social Science* (SPSS). Uji statistik yang digunakan untuk membandingkan konsentrasi MDA dan konsentrasi kolesterol antar kelompok tergantung uji normalitas dan homogenitas. Jika data berdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji parametrik anava 1 arah, sedangkan jika salah satu syarat tersebut tidak terpenuhi maka digunakan uji non parametrik Kruskal Wallis. Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi MDA dan konsentrasi kolesterol digunakan uji statistik korelasi. Uji Pearson digunakan jika data berdistribusi normal dan uji Spearman jika data tidak berdistribusi normal (Dahlan, 2004).