

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental*, metode yang digunakan adalah *posttest-only controlled design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK), yakni dengan membagi sampel dalam beberapa kelompok perlakuan secara acak.

4.2 Populasi dan Sampel

- a) Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang mengalami DM tipe 2.
- b) Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan model DM tipe 2 melalui induksi makanan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
- c) Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan model DM tipe 2 yang diinduksi makanan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.1 Besaran Sampel

Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing perlakuan (5 perlakuan) dihitung menggunakan rumus Federer: (Federer, 1991)

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

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n = 4,75 \approx 5$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

Dengan demikian setiap kelompok uji dibutuhkan 5 tikus putih jantan strain Wistar sebagai sampel. Total tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus putih jantan.

4.2.2 Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan berjumlah 5 (lima) yang dibagi secara acak (P_n, P_1, P_2, P_3, P_p), dengan ketentuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (P_n): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan 10% tween 80 tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_1): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_2): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- Kelompok perlakuan (P_3): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kgBB/hari selama 30 hari.

- e) Kelompok kontrol positif (P_p): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari selama 30 hari.

Berdasarkan penelitian Ali Benhaddou-Andalousi tentang aktivitas ekstrak biji jintan hitam terhadap penurunan glukosa darah (2011), didapatkan dosis efektif biji jintan hitam adalah 48 mg/kgBB/hari sehingga dalam penelitian ini digunakan dosis tersebut. Selain itu digunakan dosis ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari dan 96 mg/kgBB/hari bertujuan untuk mengetahui dosis optimum yang dapat memberikan perbedaan kadar MDA jantung tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2.

4.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak agar setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok perlakuan. Metode yang digunakan adalah sistem lotre sebanyak 2 kali. Lotre pertama menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan lotre kedua untuk mengelompokkan tikus.

Terlebih dahulu dilakukan lotre untuk menentukan perlakuan yang akan diambil. Dalam lotre ini terdapat 5 macam kertas, yakni P_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_p . Kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dulu ditentukan anggotanya, lalu kertas yang telah keluar tidak dimasukkan lagi. Untuk menentukan pengelompokan hewan coba, masing-masing hewan coba diberi nomor 1-25. Selanjutnya dilotre untuk masuk ke kelompok tertentu, nomor lotre yang sudah diambil tidak dimasukkan kembali. Teknisnya, disiapkan 5 kertas bertuliskan P_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_p , dan 25 kertas bertuliskan angka 1-25, serta diberi nomor 1-25 pada masing-masing kandang tikus menggunakan kertas label. Lotre yang pertama adalah untuk menentukan kelompok kontrol dan perlakuan.

Dimisalkan setelah pengundian yang keluar adalah kertas bertuliskan P_1 maka yang akan ditentukan terlebih dahulu anggotanya adalah kelompok P_1 , kemudian dilakukan lotre kedua untuk menentukan anggota yang masuk pada kelompok P_1 . Setelah jumlah anggota satu kelompok terpenuhi sesuai estimasi jumlah sampel, dilakukan kembali lotre hingga semua tikus masuk dalam masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.

4.2.4 Kriteria Subjek

Pada penelitian ini digunakan hewan coba sebagai subjek penelitian karena untuk merekomendasikan terapi tambahan pada manusia, dibutuhkan data preklinik serta data tentang peran obat tradisional disamping obat standar. Subjek dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar karena dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2, penanganan mudah dan harga terjangkau. Kriteria tikus yang digunakan sebagai berikut:

4.2.4.1 Kriteria Inklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri berikut:

- a) Tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar.
- b) Jenis kelamin jantan.
- c) Usia 12 bulan karena tikus pada usia tersebut sepadan dengan manusia usia 30 tahun dimana insiden DM tipe 2 mulai meningkat jumlahnya (Bruno *et al.*, 2005; Andreollo *et al.*, 2012).
- d) Berat badan 250-550 gram.
- e) Tikus sehat, aktif dan mau makan.

4.2.4.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang tidak dapat diambil sebagai sampel memiliki karakteristik berikut:

- a) Tikus yang sebelumnya pernah menjadi subjek penelitian.
- b) Tikus dengan DM sebelum dilakukan induksi DM tipe 2.
- c) Tikus yang mengalami infeksi sebelum perlakuan, ditandai dengan pembengkakan pada nodus limfe, adanya luka dan timbul kemerahan di daerah luka.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis 24 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dosis 48 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dosis 96 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dan dosis 75 mg/kgBB/hari metformin.

4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar MDA pada jaringan jantung tikus model DM tipe 2.

4.4 Instrumen Analisis

Perubahan kadar MDA jantung tikus dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimal berdasarkan reaksi warna dengan *thiobarbituric acid* (TBA), kadar MDA jantung tikus diketahui dengan memasukkan nilai absorban ke dalam persamaan kurva baku.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Pengujian kadar MDA jantung dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada Maret 2014 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada pertengahan Juni 2014.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian dikelompokkan berdasarkan metode masing-masing yaitu:

- a) Bahan untuk pemeliharaan tikus: sekam sebagai alas kandang tikus, alkohol 70% untuk membersihkan tikus, campuran *cornfeed* PAR-S, tepung terigu, lemak babi serta sukrosa untuk makanan tinggi kalori. Adapun kandungan zat gizi dan energi per 100 gram bahan makanan normal tikus adalah:

Tabel 4.1 Komposisi Energi dan Zat Gizi Makanan Tikus Normal

| Zat Gizi | <i>Cornfeed</i> PAR-S | Tepung Terigu |
|--------------------|-----------------------|---------------|
| Energi (kkal) | 344 | 340 |
| Protein (gram) | 19 | 11 |
| Lemak (gram) | 4 | 0,9 |
| Karbohidrat (gram) | 58 | 72 |

(Adi, 2008)

Tikus diet normal membutuhkan 102 kkal yang bersumber dari *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu (Anggraeni *et al.*, 2009). Untuk membuat makanan normal dengan perbandingan *cornfeed*:tepung (2:1) dibutuhkan *cornfeed* sebanyak 19,77 gram (68 kkal) dan tepung sebanyak 10 gram (34 kkal). Untuk membuat makanan tinggi kalori maka perlu ditambahkan lemak babi sebanyak 10% dan 20% sukrosa dari total energi yang dibutuhkan pada makanan normal, yaitu 10,2 kkal dan 20,4 kkal (Wang *et al.*, 2007). Sukrosa sebanyak 1 gram setara dengan 3,87 kkal sedangkan 1 gram lemak babi setara dengan 9,02 kkal energi (PERSAGI, 2005). Lemak babi yang dibutuhkan sebanyak 1,13 gram dan sukrosa sebanyak 5,27 gram.

- b) Bahan untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa*) didapatkan dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Provinsi Jawa Timur sejumlah 1 kg. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol 80% sebanyak 900 mL dengan perbandingan simplisia:pelarut (1:3).
- c) Bahan untuk Uji Fitokimia Kualitatif
 - (i) Minyak atsiri: ekstrak biji jintan hitam, Sudan III ((1E)-1-[(4-phenyldiazenylphenyl)hydrazinylidene]naphthalene-2-one), alkohol, gliserin (USP, 2007).
 - (ii) Alkaloid: ekstrak biji jintan hitam, reagen Mayer, reagen Wagner, HCl 2N.
 - (iii) Saponin: ekstrak biji jintan hitam, HCl 2N.
- d) Bahan untuk pembuatan homogenat jaringan jantung: jaringan jantung tikus, 0,1% TCA sebanyak 1 mL .

- e) Bahan untuk pemeriksaan MDA jantung: *trichloroacetic acid* (TCA) 20% sebanyak 4 mL yang mengandung 0,5% *thiobarbituric acid* (TBA).
- f) Bahan untuk pembuatan kurva baku dan pengukuran λ max: MDA standar, TBA, TCA.

4.6.2 Alat Penelitian

- a) Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan dan timbangan digital untuk mengukur bobot tikus.
- b) Alat untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: timbangan digital untuk menimbang simplisia, toples sebagai wadah dalam proses maserasi, aluminium foil, stirer, kain saring, batang pengaduk dan corong untuk menghasilkan filtrat serta *rotary evaporator* dan oven vakum untuk memekatkan ekstrak.
- c) Alat uji fitokimia kualitatif:
 - (i) Minyak atsiri: plat tetes, pipet tetes.
 - (ii) Alkaloid: timbangan digital, plat tetes, pipet tetes, cawan porselen, corong, penangas air, batang pengaduk dan kertas saring.
 - (iii) Saponin: gelas ukur, pipet tetes.
- d) Alat pemberian ekstrak biji jintan hitam pada tikus: timbangan digital, gelas ukur, batang pengaduk, dan sonde lambung tikus.
- e) Alat pembedahan tikus: pisau bedah, papan bedah, pinset, dan gunting bedah.
- f) Alat pembuatan homogenat jaringan jantung: *microtube*, batang penumbuk, gunting, timbangan digital, pinset, mikro pipet.

- g) Alat untuk pemeriksaan MDA: *sentrifuge*, *vortex*, spektrofotometer UV-VIS yang diatur pada panjang gelombang maksimal, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, oven, *microtube*.

4.7 Definisi Operasional

- a) DM tipe 2 ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah puasa (GDP) hingga ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) setelah diinduksi makanan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal. STZ pada dosis 30 mg/kgBB dapat memberikan efek paling mendekati karakteristik DM tipe 2 dibandingkan dengan dosis 20 dan 60 mg/kgBB (Wang *et al.*, 2013).
- b) Induksi DM tipe 2 merupakan intervensi yang dilakukan oleh peneliti untuk membuat tikus mengalami DM tipe 2 yang sesuai dengan kondisi DM tipe 2 pada manusia, ditandai dengan resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin. Kondisi resistensi insulin pada tikus diperoleh dengan cara memberi makanan tinggi kalori yang berisi *cornfeed* PAR-S, tepung terigu, sukrosa, dan lemak babi selama 2 bulan, kemudian penurunan sekresi insulin diperoleh dengan cara injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
- c) Serbuk biji jintan hitam yang digunakan dalam penelitian ini diimpor dari Timur Tengah oleh UPT Materia Medika, Kota Batu.
- d) Ekstrak biji jintan hitam yang digunakan dibuat melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 80% sebanyak 900 mL, dengan perbandingan simplisia:pelarut (1:3).
- e) Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berusia 12 bulan dengan berat badan antara

250-550 gram, karena hewan coba pada usia ini sepadan dengan usia 30 tahun pada manusia dimana insiden DM tipe 2 mulai meningkat jumlahnya.

- f) Kadar MDA pada jaringan jantung diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-VIS berdasarkan reaksi warna dengan TBA pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan dari pengukuran sebelumnya.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pengkondisian Hewan Coba

Sebelum tikus diberi perlakuan, dilakukan pengkondisian terlebih dahulu yang bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dalam kondisi percobaan dengan cara:

- a) Tikus ditempatkan pada kandang hewan coba yang tertutup dengan anyaman kawat. Setiap kandang berisi 1 ekor tikus.
- b) Suhu ruangan kandang tikus adalah $23 \pm 1^\circ\text{C}$.
- c) Dalam kandang disediakan botol minum sehingga tikus dapat minum *ad libitum*.
- d) Makanan tikus berupa *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- e) Sekam ditempatkan di kandang hewan coba.
- f) Tikus diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.

4.8.2 Perlakuan pada Hewan Coba

Selama proses penelitian, perlakuan yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

- a) Sebanyak 25 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- b) Tikus diberi makanan tinggi kalori selama 2 bulan untuk mendapatkan kondisi resistensi insulin. Masing-masing tikus menggunakan satu kandang karena perlu dilakukan kontrol makanan. GDP dicek setiap 2 minggu (pada hari ke-15, hari ke-30, hari ke-45 dan hari ke-60). Selanjutnya diinjeksi STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal pada akhir bulan kedua untuk mendapatkan kondisi disfungsi sel beta pankreas sehingga terjadi penurunan sekresi insulin lalu diberikan terapi sesuai masing-masing kelompok perlakuan selama 1 bulan dan diberikan makanan tinggi kalori.
- c) Tikus dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan melalui metode lotre, dengan pembagian kelompok:
 - (i) Kelompok kontrol negatif (P_n): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan 10% tween 80 tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
 - (ii) Kelompok perlakuan (P_1): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
 - (iii) Kelompok perlakuan (P_2): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
 - (iv) Kelompok perlakuan (P_3): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kgBB/hari selama 30 hari.

- (v) Kelompok kontrol positif (P_p): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- d) Makanan yang diberikan selama perlakuan adalah makanan tinggi kalori, yang terdiri dari *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1, dibutuhkan *cornfeed* PAR-S sebanyak 19,77 gram dan tepung sebanyak 10 gram, 20% sukrosa dan 10% lemak babi. Maka dibutuhkan lemak babi sebanyak 1,13 gram dan sukrosa sebanyak 5,27 gram.
- e) Kelompok P_1, P_2, P_3 selain diberi makanan tinggi kalori juga mendapatkan ekstrak biji jintan hitam melalui sonde selama 30 hari.
- f) Pada hari ke-95 tikus dibedah untuk diambil jaringan jantungnya dan dilakukan pemeriksaan MDA jantung.

4.8.3 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Tahap ekstraksi biji jintan hitam (*Nigella sativa*) berdasarkan penelitian Ali Benhaddou-Andaloussi tahun 2011 tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah pada tikus DM adalah sebagai berikut:

- a) Serbuk biji jintan hitam sebanyak 300 gram dimasukkan ke dalam toples kaca bertutup.
- b) Etanol 80% sebanyak 900 mL ditambahkan ke dalam toples dengan perbandingan simplisia:pelarut (1:3).
- c) Campuran serbuk biji jintan hitam dan pelarut diaduk dengan stirer selama 30 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Kemudian ditutup dengan aluminium foil dan penutup toples.
- d) Diamkan selama 24 jam.

- e) Hasil maserasi disaring menggunakan corong dan kain saring, residu penyaringan diremaserasi dengan etanol 80% sebanyak 900 mL, kemudian didiamkan selama 24 jam, lakukan remaserasi kembali 2 hari berikutnya.
- f) Hasil maserasi dan remaserasi disatukan. Lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan oven vakum pada suhu kurang dari 40° C hingga pelarut menguap.

4.8.4 Uji Fitokimia Kualitatif

- a) Minyak atsiri
 - (i) Ekstrak biji jintan hitam ditempatkan dalam plat tetes.
 - (ii) Sudan III ditambahkan, hasil positif jika terbentuk warna merah.
- b) Alkaloid
 - (i) Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditimbang dengan cawan porselen.
 - (ii) Ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 5mL.
 - (iii) Campuran tersebut dipanaskan menggunakan penangas air selama 3 menit sambil diaduk menggunakan batang pengaduk.
 - (iv) Ditunggu hingga dingin.
 - (v) Sebanyak 0,5 gram NaCl ditambahkan dan diaduk menggunakan batang pengaduk.
 - (vi) Filtrat disaring menggunakan kertas saring, dan dipindahkan ke cawan porselen baru.
 - (vii) Ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 5mL dan diaduk dengan batang pengaduk.
 - (viii) Dibagi menjadi 3 bagian pada plat tetes, pada masing-masing plat ditambahkan reagen yang berbeda (reagen Mayer dan Wagner).

(ix) Hasil dikatakan positif bila pada penambahan reagen Mayer terbentuk endapan berwarna putih dan pada penambahan reagen Wagner terbentuk endapan kecoklatan.

c) Saponin

- (i) Ekstrak sebanyak 1 mL dilarutkan dengan 10 mL akuades dan masukkan dalam gelas ukur.
- (ii) Dikocok selama 10 menit.
- (iii) Hasil dikatakan positif bila terbentuk busa yang stabil dan tidak hilang dengan penambahan HCl.

4.8.5 Induksi DM Tipe 2 pada Tikus

Berdasarkan penelitian Wang tahun 2007, induksi DM tipe 2 pada tikus dilakukan dengan cara:

- a) Tikus putih jantan strain Wistar sejumlah 25 ekor dicek kadar GDP sebelum diberi makanan tinggi kalori.
- b) Makanan tinggi kalori diberikan selama 2 bulan, dicek kadar GDP setiap 2 minggu, kemudian dilakukan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
- c) Dicek kadar GDP yang dilakukan 3 hari setelah injeksi STZ. Tikus dikatakan mengalami DM jika nilai GDP \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) (Wang *et al.*, 2013).

4.8.6 Pembuatan Larutan Ekstrak Biji Jintan Hitam dan Metformin serta Prosedur Pemberian Terapi

- a) Ekstrak pekat biji jintan hitam ditimbang untuk 15 ekor tikus dengan dosis 24, 48, dan 96 mg/kgBB/hari.
- b) Metformin dihaluskan dan ditimbang untuk 5 ekor tikus. Digunakan dosis metformin 75 mg/kgBB/hari.
- c) Ekstrak dan metformin yang telah ditimbang dilarutkan dalam 10% tween 80 sampai diperoleh konsentrasi tertentu.
- d) Larutan ekstrak dan metformin disondekan pada tikus sesuai kelompok perlakuan.

4.8.7 Prosedur Terminasi Hewan Coba

Prosedur pengorbanan hewan coba dilakukan untuk mengambil jaringan jantung tikus, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Dilakukan dislokasi cervical pada hewan coba
- b) Tikus dibedah
- c) Diambil organ jantungnya

4.8.8 Prosedur Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu dengan penguburan.

4.8.9 Pembuatan Larutan Baku Kerja

Larutan baku kerja dibuat dengan cara mengencerkan standar MDA hingga konsentrasi 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 dan 100 ng/mL.

4.8.10 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimal

Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada rentang panjang gelombang 450-550 nm untuk memperoleh panjang gelombang maksimal dengan absorbansi MDA tertinggi.

4.8.11 Pembuatan Kurva Baku

- a) Larutan baku dengan berbagai konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diukur sebelumnya.
- b) Dibuat kurva konsentrasi MDA terhadap absorban, dicari persamaan regresi dan besaran R^2 untuk menilai linearitasnya.

4.8.12 Pembuatan Homogenat dan Pemeriksaan Kadar MDA Jantung

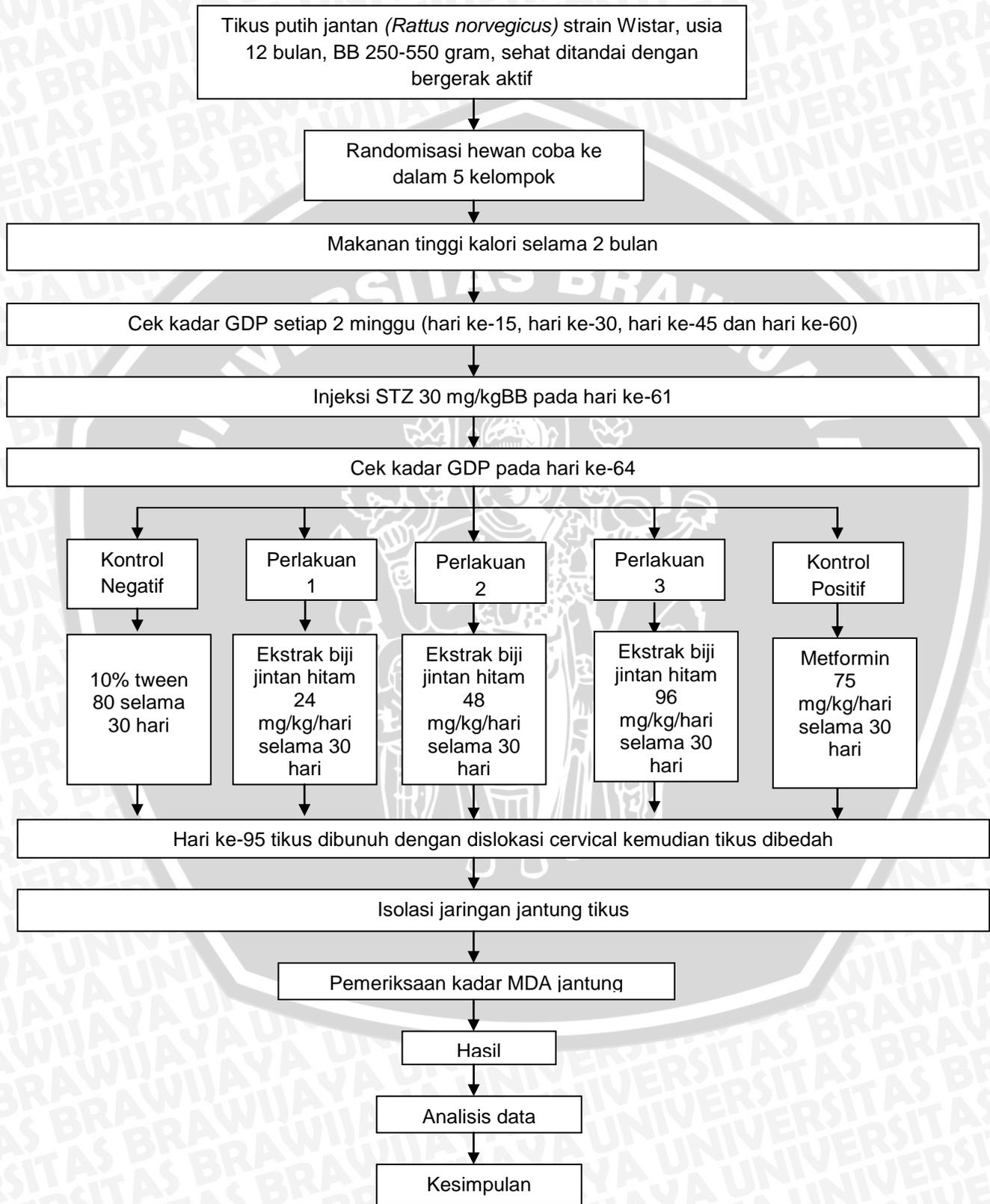
Pengukuran kadar MDA pada homogenat jaringan jantung menggunakan metode berikut ini:

- a) Organ jantung dibersihkan dan dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) berulang-ulang hingga bersih dari darah.
- b) Diambil sebanyak 100 mg.
- c) Dihomogenkan menggunakan *microtube* dan batang penumbuk, kemudian ditambahkan 0,1% TCA sebanyak 1 mL.
- d) Divortex hingga campuran homogen.
- e) Disentrifuge dengan kecepatan 10000 x g selama 10 menit, kemudian ambil supernatan dan pindahkan ke *microtube* baru.
- f) Ditambahkan 20% TCA yang mengandung 0,5% TBA sebanyak 4 mL, kemudian homogenkan menggunakan vortex.
- g) Diinkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit.

- h) Diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimal.



4.9 Alur Penelitian



Skema 4.1 Alur Penelitian



4.10 Pengolahan dan Analisa Data

Hasil pengukuran kadar MDA jantung kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan uji beda dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way* ANOVA, dan *Post Hoc test* (uji *Least Significant Difference*).

Syarat uji ANOVA untuk > 2 kelompok tidak berpasangan: distribusi data harus normal serta varians data harus sama. Jika memenuhi syarat (distribusi data normal, varians sama), maka dipilih uji *One-way* ANOVA. Jika tidak memenuhi syarat, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data agar distribusi menjadi normal dan varians menjadi sama. Jika variabel hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatifnya dipilih uji non parametrik Kruskal Wallis. Jika pada uji ANOVA atau Kruskal Wallis menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc*.