



**HUBUNGAN KADAR INSULIN PANKREAS DAN KADAR GLUKOSA
DARAH PADA MODEL TIKUS WISTAR JANTAN SETELAH
DIINDUKSI BISPHENOL-A**

SKRIPSI

oleh:

Mala Hayati

NIM 151610101012

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**HUBUNGAN KADAR INSULIN PANKREAS DAN KADAR GLUKOSA
DARAH PADA MODEL TIKUS WISTAR JANTAN SETELAH
DIINDUKSI BISPHENOL-A**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

oleh:

Mala Hayati

NIM 151610101012

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

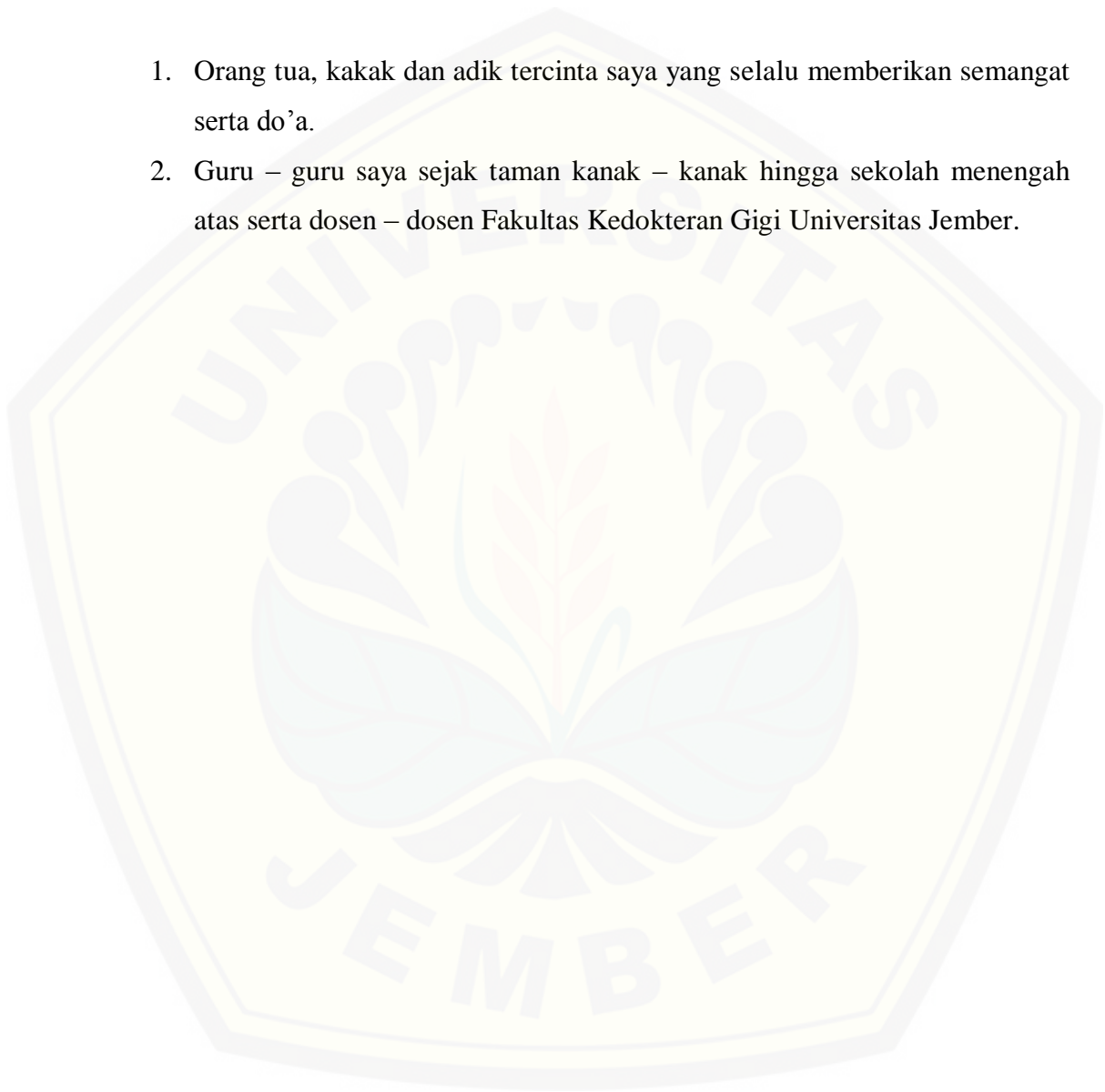
UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tua, kakak dan adik tercinta saya yang selalu memberikan semangat serta do'a.
2. Guru – guru saya sejak taman kanak – kanak hingga sekolah menengah atas serta dosen – dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTO

“ Karena, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya,
sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”

(QS. Al-Insyirah: 5-6)*

“ Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(QS. Al-Baqarah: 286)*

* Departemen Agama RI. 2010. Al-Qur'an dan Terjemah. Bandung : Penerbit Hilal

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Mala Hayati

NIM : 151610101012

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Hubungan Kadar Insulin Pankreas dan Kadar Glukosa Darah pada Model Tikus Wistar Jantan Setelah Diinduksi Bisphenol-A” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 24 Juli 2019

Yang menyatakan,

Mala Hayati

NIM 151610101012

SKRIPSI

**HUBUNGAN KADAR INSULIN PANKREAS DAN KADAR GLUKOSA
DARAH PADA MODEL TIKUS WISTAR JANTAN SETELAH
DIINDUKSI BISPHENOL-A**

oleh:

Mala Hayati

NIM 151610101012

Dosen Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Hubungan Kadar Insulin Pankreas dan Kadar Glukosa Darah pada Model Tikus Wistar Jantan Setelah Diinduksi Bisphenol-A” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Jum’at, 31 Mei 2019

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Anggota

drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc
NIP. 197908142008122003

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP. 197005091999032001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S.
NIP. 196104011985112001

Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes
NIP. 197308182001122001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof
NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Hubungan Kadar Insulin Pankreas dan Kadar Glukosa Darah pada Model Tikus Wistar Jantan Setelah Diinduksi Bisphenol-A Mala Hayati, 151610101012; 2019: 53 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Indonesia menempati urutan ke-dua setelah China sebagai negara penghasil sampah terbesar di dunia. Jumlah penduduk Indonesia sebanyak 259 juta jiwa dan dapat menghasilkan sampah mencapai 187 juta ton pertahun (Jenna *et al.*, 2015). Komposisi sampah di Indonesia menunjukkan kandungan plastik sebanyak 29%. Data tersebut menunjukkan bahwa masyarakat Indonesia masih banyak menggunakan plastik dalam kehidupan sehari-hari.

Salah satu bahan kimia yang digunakan sebagai monomer dalam produksi plastik polikarbonat (PC) dan resin epoksi yakni Bisphenol-A (BPA). BPA dapat berpindah dari kemasan berbahan polikarbonat ke makanan atau minuman dengan dipengaruhi oleh lamanya waktu kontak dengan makanan, temperatur mulai 20°C dan pH makanan atau minuman yang basa atau lebih dari 7.

Bisphenol-A juga merupakan salah satu bentuk *Endocrine Disrupting Chemical* (EDCs) yang memiliki dampak yang berbahaya bagi lingkungan dan kesehatan tubuh karena bersifat sebagai pengganggu fungsi endokrin. BPA memiliki sifat menyerupai hormon estrogen sehingga dapat secara langsung berinteraksi dengan estrogen reseptor. BPA memiliki sifat estrogenik, sehingga diduga dapat mempengaruhi peningkatan kadar insulin pankreas.

Insulin sangat dibutuhkan dalam metabolisme tubuh karena insulin memiliki efek pada hati terutama pada glikogenesis, menghambat ketogenesis dan glukoneogenesis. Insulin juga memiliki efek pada otot dan lemak yakni membantu sintesis protein dan glikogen serta penyimpanan trigliserida. Fungsi utama insulin yakni menurunkan konsentrasi glukosa darah. Glukosa merupakan sumber energi utama dalam tubuh. Glukosa juga memiliki fungsi sebagai bahan bakar utama otak dan sel darah merah. Glukosa juga merupakan prekursor untuk sintesis semua karbohidrat dalam tubuh.

Sampel yang digunakan tiap kelompok sebanyak 6 ekor dan total sampel yang digunakan adalah 12 ekor. Dua kelompok sampel tersebut yakni terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol diberi sondase aquadest sebanyak 3ml selama 28 hari dan didekapitasi pada hari ke-29. Kelompok perlakuan diberi sondase BPA dengan dosis yakni 20 mg/kg/hari, setiap hari selama 28 hari dan dilakukan dekapitasi pada hari ke-29. Sebelum dilakukan dekapitasi tikus terlebih dahulu diukur kadar glukosa darahnya. Selanjutnya, kadar insulin diuji menggunakan ELISA *sandwich*.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan kadar insulin pankreas tikus yang telah diinduksi BPA dengan dosis 20 mg/kg/hari selama 28 hari. Rata-rata kadar insulin pankreas pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol. Peningkatan tersebut disebabkan akibat efek induksi BPA yang telah diberikan selama 28 hari. BPA merupakan salah satu dari EDC (*Endocrine Distrupting Chemicals*) yang menunjukkan sifat estrogenik dan memiliki efek yang sama dengan hormon 17β -estradiol (E_2), sehingga dapat secara spesifik mengikat dan mengaktivasi reseptor estrogen. E_2 memiliki dua isoform yakni ER- α dan ER- β yang terdapat pada sel β pankreas. Aktivasi pada ER- α akan menyebabkan proliferasi sel β pankreas dan aktivasi ER- β akan meningkatkan sekresi insulin.

Rata-rata kadar glukosa darah pada kelompok perlakuan juga lebih tinggi dari kelompok kontrol. Hal tersebut diduga karena adanya aktivasi ER β oleh BPA yang akan mengakibatkan ekspresi GLUT4 mengalami penurunan sehingga insulin akan sulit masuk ke dalam sel dan glukosa juga tidak dapat digunakan dengan maksimal. Glukosa yang tidak dapat digunakan serta diubah menjadi ATP, akan menumpuk di pembuluh darah dan disebut dengan hiperglikemia.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi yang kuat serta hubungan yang positif antara kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah yakni, semakin meningkatnya kadar insulin pankreas maka kadar glukosa darah juga akan meningkat pada tikus yang telah diinduksi BPA dengan dosis 20 mg/kg/hari selama 28 hari.

DAFTAR SINGKATAN

BPA	Bisphenol-A
<i>EDCs</i>	<i>Environmental Endocrine Distrupting chemical</i>
ER	Estrogen Reseptor
ER- α	Estrogen Reseptor- α
ER- β	Estrogen Reseptor- β
Bcl-2	B-cell Lymphoma-2
Bax	Bcl-2-associated x protein
<i>GLUT-2</i>	<i>Glucose Transporter Type 2</i>
<i>GLUT-4</i>	<i>Glucose Transporter Type 4</i>
Gck	Glucokinase
ATP	Adenosine Triphosphate
<i>GSIS</i>	<i>Glucose Stimulation Insulin Secretion</i>
Oghd	Oxoglutarate dehydrogenase
Ucp 2	Uncoupling Protein 2

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat, hidayah serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Hubungan Kadar Insulin Pankreas dan Kadar Glukosa Darah pada Model Tikus Wistar Jantan Setelah Diinduksi Bisphenol-A”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Kedua orang tua saya, Ayah Mas’ud dan Ibu Munjidah serta kakak dan adik-adik saya;
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S. dan Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes selaku dosen pembimbing skripsi yang senantiasa meluangkan banyak waktu untuk membimbing, memberi saran, nasihat serta motivasi sehingga skripsi ini dan terselesaikan;
4. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc dan Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik serta saran dalam penulisan skripsi ini;
5. Mas Agus, Bu Nuris dan Bu Nur selaku analis dan teknis lab yang telah membantu dan membimbing dengan sabar selama penelitian;
6. Teman-teman proyek, Fitria Nurhabiba A dan Rizky Purboningtyas yang telah bersama-sama berjuang dan selalu memberikan dukungan serta kerjasama yang luar biasa;
7. Teman-teman yang telah membantu penelitian saya, Raziqa, Nindya, Nimas, Dian, Vera, Alodia, Shinta, Rabella, Riri, Nadya;

8. Ratih, Widia, Sofira, Wulan, Maura, Anesty, Wifqi, Rini yang selalu memberikan dukungan dan semangat;
9. Teman-teman angkatan 2015. Terimakasih atas kebersamaan dan dukungan selama ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak mungkin disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dalam bidang kesehatan serta menjadi upaya peningkatan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 24 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	x
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bisphenol - A	4
2.2 Pankreas.....	7
2.3 Insulin	8
2.3.1 Sintesis Insulin	9

2.3.2 Pengaturan Sekresi Insulin	9
2.4 Glukosa	10
2.5 Hewan Model Tikus.....	11
2.6 Kerangka Konseptual.....	12
2.7 Hipotesis.....	13
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1 Jenis dan Desain Penelitian	14
3.2 Tempat Penelitian.....	14
3.3 Waktu Penelitian	14
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	14
3.4.1 Populasi Penelitian	14
3.4.2 Sampel Penelitian.....	14
3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	15
3.6 Variabel Penelitian	15
3.7 Definisi Operasional	16
3.8 Alat dan Bahan Penelitian.....	16
3.8.1 Alat	16
3.8.2 Bahan.....	17
3.9 Prosedur Penelitian	17
3.9.1 Persiapan Penelitian	17
3.9.2 Pembuatan Sediaan Bisphenol - A.....	18
3.9.3 Prosedur Perlakuan	18
3.9.4 Prosedur Dekapitasi	18
3.9.5 Prosedur Pembuatan Homogenat Pankreas	18
3.9.6 Prosedur Pengukuran Kadar Insulin Menggunakan <i>ELISA Kit</i>	19

3.10 Rancangan Analisis Data.....	20
3.11 Alur Penelitian	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	22
4.2 Pembahasan	23
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur kimia BPA	4
Gambar 2.2 Proses BPA memicu disfungsi sel β	7
Gambar 2.3 Anatomi pankreas	8



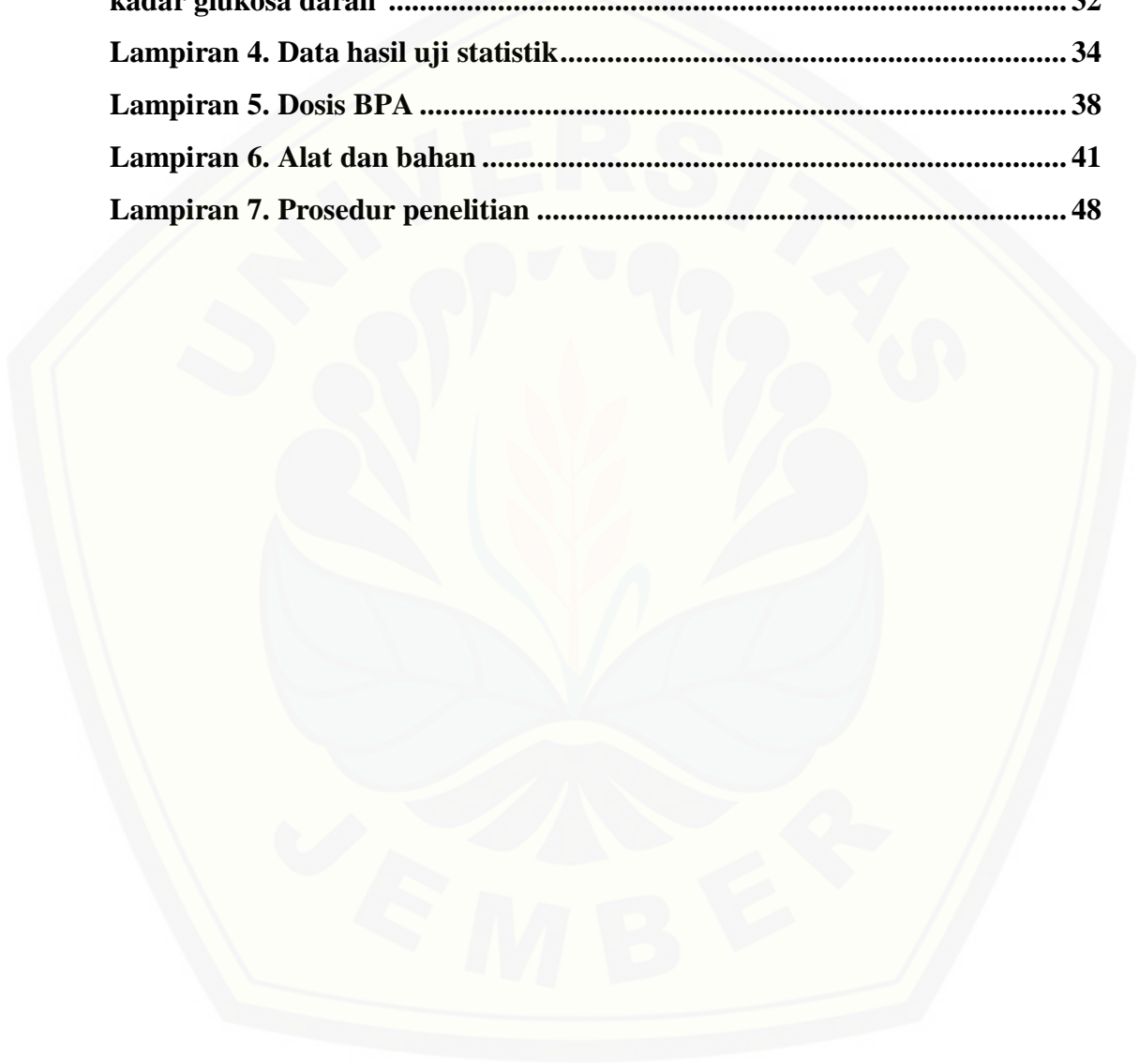
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rata-rata kadar glukosa darah dan kadar insulin pankreas..... 22



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan <i>Etichal Clearance</i>	29
Lampiran 2. Surat ijin penelitian.....	30
Lampiran 3. Data hasil uji ELISA, perhitungan kadar insulin, pengukuran kadar glukosa darah	32
Lampiran 4. Data hasil uji statistik.....	34
Lampiran 5. Dosis BPA	38
Lampiran 6. Alat dan bahan	41
Lampiran 7. Prosedur penelitian	48



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia menempati urutan ke-dua setelah China sebagai negara penghasil sampah terbesar di dunia. Jumlah penduduk Indonesia sebanyak 259 juta jiwa dan dapat menghasilkan sampah mencapai 187 juta ton pertahun (Jenna *et al.*, 2015). Jumlah sampah yang dihasilkan akan terus meningkat tiap tahunnya sesuai dengan bertambahnya penduduk Indonesia. Komposisi sampah di Indonesia menunjukkan kandungan plastik sebanyak 29% (Acharya, 2018). Data tersebut menunjukkan bahwa masyarakat Indonesia masih banyak menggunakan plastik dalam kehidupan sehari-hari.

Salah satu bahan kimia yang digunakan sebagai monomer dalam produksi plastik polikarbonat (PC) dan resin epoksi yakni Bisphenol-A (BPA). BPA banyak ditemukan di kehidupan sehari-hari, seperti pada botol susu bayi, peralatan makan, botol air, pipa air, termasuk pada kedokteran gigi dapat ditemukan pada akrilik, komposit dan lainnya. BPA dapat berpindah dari kemasan berbahan polikarbonat ke makanan atau minuman dengan dipengaruhi oleh lamanya waktu kontak, temperatur mulai 20°C dan pH makanan atau minuman yang basa atau lebih dari 7 (Hoekstra dan Simoneau, 2013).

Bisphenol-A juga merupakan salah satu bentuk *Endocrine Disrupting Chemical* (EDCs) yang memiliki dampak yang berbahaya bagi lingkungan dan kesehatan tubuh karena bersifat sebagai pengganggu fungsi endokrin (Perdana *et al.*, 2016). BPA memiliki sifat menyerupai hormon estrogen sehingga dapat secara langsung berinteraksi dengan estrogen reseptor (Vandenberg *et al.*, 2009). BPA juga dapat menyebabkan kemungkinan lebih tinggi menderita penyakit jantung koroner, diabetes, gangguan kekebalan tubuh dan ketidaknormalan enzim pada hati (Miller dan Spoolman, 2011). BPA memiliki sifat estrogenik, sehingga diduga dapat secara langsung mempengaruhi peningkatan kadar insulin pankreas yang nantinya juga akan berdampak pada kadar glukosa darah.

Insulin sangat dibutuhkan dalam metabolisme tubuh karena insulin memiliki efek pada hati terutama pada glikogenesis, menghambat ketogenesis dan glukoneogenesis. Insulin juga memiliki efek pada otot dan lemak yakni membantu sintesis protein dan glikogen serta penyimpanan trigliserida. Fungsi utama insulin yakni menurunkan konsentrasi glukosa darah (Haviz, 2012).

Glukosa merupakan sumber energi utama dalam tubuh. Glukosa juga memiliki fungsi sebagai bahan bakar utama otak dan sel darah merah. Glukosa juga merupakan prekursor untuk sintesis semua karbohidrat dalam tubuh (Joyce, 2013). Insulin dan glukosa memiliki peran yang sangat penting bagi tubuh. Jumlah kadar insulin dan glukosa juga sangat berpengaruh terhadap metabolisme serta kesehatan tubuh.

Penelitian tentang dampak BPA terhadap kesehatan masih terus dikembangkan sampai saat ini. Seperti penelitian yang dilakukan Mirmira dan Carmella (2014) menunjukkan adanya hubungan positif antara tingkat BPA urin dan penyakit metabolik diabetes. Pada penelitian Jensen *et al.*, (2016) meneliti tentang hubungan BPA terhadap DM2 yang ditinjau dari toleransi glukosa.

Penelitian yang mempelajari hubungan kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah setelah diinduksi BPA masih belum jelas mengenai mekanismenya. Berdasarkan dari penjelasan di atas, peneliti ingin mengaji tentang hubungan kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah setelah diinduksi BPA dengan menggunakan dosis 20 mg/kg/BB (Indumathi *et al.*, 2013).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dirumuskan masalah sebagai berikut :

Apakah terdapat hubungan kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah pada model tikus wistar jantan setelah diinduksi Bisphenol-A?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah pada model tikus wistar jantan setelah diinduksi Bisphenol-A.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan manfaat untuk:

1.4.1 Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberi pengetahuan kepada masyarakat, tentang pentingnya menjaga kesehatan dan pencegahan terhadap penyakit khususnya diabetes melitus yang jumlah penderitanya meningkat tiap tahunnya, menginformasikan bahwa penggunaan BPA memiliki dampak yang buruk bagi kesehatan serta agar mengurangi penggunaan BPA dalam kehidupan sehari - hari.

1.4.2 Pemerintah/Produsen

Penelitian ini, diharapkan dapat memberi masukan kepada pemerintah untuk menetapkan kebijakan penggunaan bahan BPA dalam kehidupan sehari hari serta mengatur dan meregulasi pembuangan BPA, sehingga dapat mengurangi dampak buruk yang ditimbulkan. Pemerintah juga dapat memberikan sosialisasi tentang bahaya dan dampak yang dapat ditimbulkan oleh BPA. Penelitian ini juga diharapkan dapat memotivasi produsen untuk membuat wadah makanan dan minuman yang digunakan sehari – hari dengan bahan yang lebih ramah lingkungan serta tidak memberi efek yang buruk untuk kesehatan.

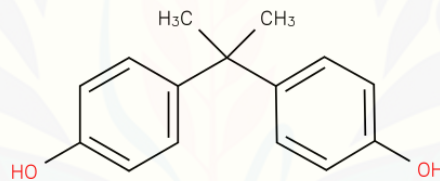
1.4.3 Peneliti lain

Penelitian ini diharapkan dapat memberi ide atau gambaran tentang pengaruh BPA terhadap peningkatan kadar insulin pankreas sehingga peneliti lain dapat melanjutkan untuk melihat pengaruh BPA terhadap berbagai penyakit.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bisphenol - A

Bisphenol – A (BPA) merupakan suatu senyawa sintesis yang digunakan terutama sebagai monomer dalam produksi plastik polikarbonat (PC), dan resin epoksi (Guergana *et al.*, 2014). BPA juga merupakan salah satu bahan kimia yang paling sering menyebabkan gangguan endokrin serta estrogen sintetis pertama tanpa struktur steroid. BPA juga memiliki kegunaan sebagai resin poliester, polisulfon dan poliakrilat, memiliki struktur formula berupa $C_{15}H_{16}O_2$ dan nama IUPAC (2,2- bis (4-hydroxyphenyl) propane (Geens *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Struktur kimia BPA (Geens *et al.*, 2012)

Bisphenol-A dapat ditemukan dalam bahan yang berkontak dengan makanan ataupun minuman seperti botol susu bayi, peralatan makan, microwave ovenware, wadah makanan, botol air, pipa air, termasuk pada kedokteran gigi dapat ditemukan pada akrilik, komposit dan lainnya. Resin epoksi digunakan sebagai lapisan pelindung untuk berbagai kaleng makanan dan minuman serta sebagai pelapisan pada tutup logam untuk botol kaca, termasuk wadah yang digunakan untuk susu formula. Hal ini merupakan hasil dari konsumen yang terkena paparan BPA melalui makanan tiap harinya (Alonso *et al.*, 2010).

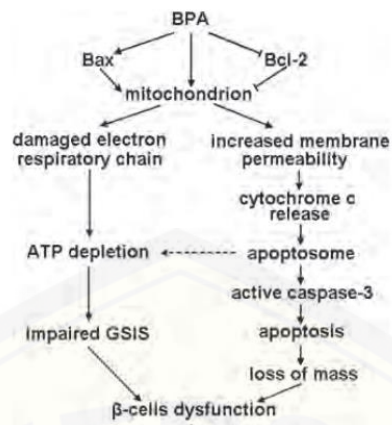
Bisphenol-A dapat terlepas dari rantai polikarbonat dalam bentuk uap air dan secara langsung akan berkontak dengan makanan ataupun minuman melalui dua proses, yakni hidrolisis dan difusi polimer. Hidrolisis BPA terjadi pada makanan basah yang mengandung banyak cairan. Polimer polikarbonat yang berkontak dengan makanan basah yang memiliki banyak cairan akan dikatalisasi oleh senyawa hidroksida, bersama dengan stimulan yang lain maka dapat terjadi proses hidrolisis yang menyebabkan rantai polimer lepas dan BPA menjadi bebas. Sedangkan proses difusi BPA terjadi pada makanan kering yang diproduksi oleh pabrik. Pelepasan BPA tersebut juga dapat dipengaruhi oleh tiga hal, yakni waktu kontak, temperature dan juga tipe makanan atau pH yang basa (Hoekstra dan Simoneau, 2013).

Pada penelitian Jensen *et al.*, (2016) meneliti tentang hubungan BPA terhadap DMT2 yang ditinjau dari toleransi glukosa serta pada penelitian Huang *et al.*, (2017) yang melihat konsentrasi BPA pada urine dan hasilnya, lebih dari 90% orang-orang di Amerika Serikat dan Kanada ditemukan kandungan BPA pada urine. Paparan BPA juga dilaporkan berkaitan dengan DMT2. BPA dapat menyebabkan gangguan pada metabolisme yang berhubungan dengan glukosa sehingga dapat menjadi faktor resiko terjadinya diabetes melitus (Alonso *et al.*, 2010). Hal ini membuktikan manusia sangat mudah terkena paparan BPA dan sangat merugikan kesehatan.

Bisphenol-A merupakan salah satu dari EDC (*Endocrine Disrupting Chemicals*) yang merupakan toksin estrogenik yang berasal dari bahan baku plastik. BPA menunjukkan sifat estrogenik dan memiliki efek yang sama dengan hormon 17β -estradiol (E_2) sehingga dapat secara spesifik mengikat dan mengaktivasi reseptor estrogen. E_2 memiliki dua isoform yakni $ER-\alpha$ dan $ER-\beta$ yang terdapat pada sel β pankreas. Aktivasi pada $ER-\alpha$ akan menyebabkan proliferasi sel β pankreas dan aktivasi $ER-\beta$ akan meningkatkan sekresi insulin. BPA akan berinteraksi dengan kedua isoform tersebut (Nadal *et al.*, 2011). Produksi insulin yang berlebihan dapat menyebabkan gangguan pada sel beta pankreas akibat stress oksidatif pada retikulum endoplasma dan dapat memicu apoptosis pada sel beta pankreas (Makaji *et al.*, 2011).

Hipersekresi insulin dapat memicu apoptosis pada sel β pankreas melalui aktivasi jalur mitokondria oleh Bcl-2 dan caspase. Bcl-2 merupakan gen yang mengatur pro-apoptosis dan anti-apoptosis sebagai pengatur jalur apoptosis mitokondria, caspase merupakan kelompok cysteine protease, setelah diproses menjadi bentuk aktif akan memicu apoptosis melalui transduksi sinyal apoptosis. Peningkatan permeabilitas membran mitokondria dan pemicu sekresi faktor apoptogenik mitokondria diinduksi oleh bax yang merupakan protein pro-apoptosis. Pengeluaran cytochrome-c ke sitosol dan caspase-3 serta caspase-9 juga dapat diaktifkan oleh BPA sehingga dapat meningkatkan kemampuan katabolitik yang mengakibatkan apoptosis. GLUT-2 berfungsi untuk mentranspor glukosa pada sel β , fosforilasi oleh gck (glucokinase) dan diubah menjadi piruvat melalui mekanisme glikolisis. Piruvat memasuki siklus trisiklo asetat dan mengaktifasi pembentukan adenosine triphosphate (ATP) didalam mitokondria, yang dapat memicu penutupan kanal Kalium-ATP dan mendepolarisasi membran plasma yang berakhir pada sekresi insulin (Henquin, 2009). BPA juga dapat menyebabkan gangguan *glucose stimulation insulin secretion* (GSIS).

GSIS terjadi disebabkan oleh paparan BPA terhadap downregulation gck (glucokinase) dan GLUT-2 pada sel β pankreas. Adanya downregulation ogdh (oxoglutarate dehydrogenase) dan gen Ucp2 di mitokondria dapat menurunkan sensitivitas insulin terhadap stimulasi glukosa dan juga menurunkan efisiensi metabolik produksi ATP di mitokondria sel β pankreas (Hock, 2009). Adanya paparan BPA juga dapat mengakibatkan berkurangnya ekspresi Tfam pada sel, sehingga dapat mengalami gangguan fungsi mitokondria sel β pankreas (Lin *et al.*, 2013).



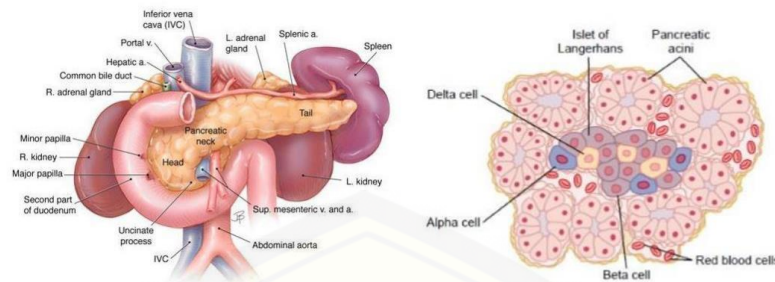
Gambar 2.2 Proses BPA memicu disfungsi sel β (Lin *et al.*, 2013)

2.2 Pankreas

Pankreas memiliki fungsi ganda yakni sebagai kelenjar eksokrin dan endokrin. Pankreas sebagai kelenjar eksokrin membantu dalam sistem pencernaan dengan mensekresikan enzim-enzim pankreas seperti amilase, lipase dan tripsin. Pankreas sebagai kelenjar endokrin mensekresi hormon lain, yakni insulin dan glukagon yang sangat penting untuk pengaturan metabolisme glukosa, lipid, dan protein secara normal. Pankreas juga mensekresi berbagai hormon seperti amylin, somatostatin, dan polipeptida pankreas. Pankreas terdiri atas dua jenis jaringan utama, yaitu

- a. Asini, yang mensekresi getah pencernaan ke dalam duodenum
- b. Pulau Langerhans, yang langsung mensekresi insulin dan glucagon kedalam darah serta hormon yang lain (Guyton, 2015).

Fungsi endokrin pankreas dilaksanakan oleh pulau Langerhans. Pankreas manusia mengandung 1-2 juta pulau Langerhans. Pulau langerhans ini merupakan kumpulan sel berbentuk ovoid berukuran 76 x 175 mm tersebar di seluruh pankreas, walaupun lebih banyak ditemukan di kauda (ekor) daripada kaput (kepala) dan korpus (badan) pankreas. Pulau – pulau ini menyusun 1- 2 % berat pankreas (Sembulingam dan Sembulingam, 2013).



Gambar 2.3 Anatomi pankreas (Longnecker, 2014)

Sel pada pulau Langerhans terdiri dari empat tipe: Sel A atau sel α yang mensekresi glucagon, kira – kira mencakup 25 % dari seluruh sel. Sel B atau sel β yang mensekresi insulin, kira – kira mencakup 60% dari semua sel pada pulau langerhans, terutama dibagian tengah dari setiap pulau. Sel D atau sel δ yang mensekresi somatostatin, kira – kira mencakup 10% dari seluruh sel. Serta sel F atau sel PP yang mensekresi polipeptida pankreas, hanya terdapat dalam jumlah yang kecil pada pulau Langerhans (Sembulingam dan Sembulingam, 2013; Guyton *et al.*, 2015).

2.3 Insulin

Insulin adalah suatu polipeptida dengan 51 asam amino, hormon ini yang mengandung dua rantai asam amino, yang dihubungkan oleh ikatan sulfida. Dua rantai asam amino tersebut dinamakan rantai α yang mengandung 21 asam amino dan rantai β yang mengandung 30 asam amino (Sembulingam dan Sembulingam, 2013).

Insulin sangat berpengaruh terhadap metabolisme karbohidrat sehingga banyak dihubungkan dengan gula darah. Hal ini dikarenakan insulin merupakan hormon yang berhubungan dengan limpahan energi. Bila terdapat sejumlah besar makanan yang memiliki energi tinggi dalam diet, terutama kelebihan jumlah karbohidrat, maka insulin akan disekresikan dalam jumlah besar. Selanjutnya, insulin akan memainkan peranan penting dalam penyimpanan kelebihan energi. Jika terdapat kelebihan karbohidrat makan insulin tersebut dapat menyebabkan karbohidrat tersimpan sebagai glikogen terutama di hati dan juga otot. Apabila

masih terdapat kelebihan karbohidrat yang tidak dapat disimpan sebagai glikogen maka insulin akan mengubahnya menjadi lemak dan disimpan di jaringan adipose (Guyton *et al.*, 2015).

2.3.1 Sintesis Insulin

Insulin merupakan hormon yang terdiri dari rangkaian asam amino, dihasilkan oleh sel beta kelenjar pankreas. Pada saat keadaan normal, bila ada rangsangan pada sel beta pankreas, insulin disintesis dan kemudian disekresikan ke dalam darah sesuai kebutuhan tubuh untuk keperluan regulasi glukosa darah. Secara fisiologis, regulasi glukosa darah yang baik diatur bersama dengan hormon glukagon yang disekresikan oleh sel alfa kelenjar pankreas.

Insulin disintesis oleh sel beta pankreas dengan cara yang mirip dengan sintesis protein, yakni diawali dengan translasi RNA insulin oleh ribosom yang melekat pada retikulum endoplasma untuk membentuk *praprotein insulin*. Selanjutnya *praprotein insulin* akan dipecah menjadi proinsulin (*precursor* hormon insulin) pada retikulum endoplasma sel beta pankreas dengan bantuan enzim peptidase, kemudian dihipunkan dalam gelembung-gelembung (*secretory vesicles*) dalam sel tersebut. Proinsulin selanjutnya diurai menjadi insulin dan peptida-C (*C-peptide*) dengan bantuan enzim peptidase, yang keduanya sudah siap untuk disekresikan secara bersamaan melalui membran sel (Guyton *et al.*, 2015).

2.3.2 Pengaturan Sekresi Insulin

Kadar asam amino dalam darah serta glukosa sangat berperan penting dalam pengaturan sekresi insulin. Pada kadar normal glukosa darah waktu puasa sebesar 80-90 mg/100 ml, kecepatan sekresi insulin akan minimum yakni 25 mg/menit/kg berat badan, suatu kadar glukosa darah yang hanya mempunyai aktivitas fisiologis yang kecil. Namun apabila konsentrasi glukosa dalam darah meningkat secara tiba-tiba dua sampai tiga kali kadar normal, dan dipertahankan pada nilai ini, maka sekresi insulin akan meningkat dan berlangsung dalam dua tahap, yakni :

- a. Selama 3-5 menit sesudah terjadi peningkatan segera kadar glukosa darah, kadar insulin plasma meningkat hingga 10 kali lipat. Hal ini disebabkan oleh

pengeluaran insulin yang sudah terbentuk lebih dulu oleh sel-sel β pulau langerhans. Kecepatan sekresi awal yang tinggi tidak dapat dipertahankan, sebaliknya dalam waktu 5-10 menit kemudian kecepatan sekresi insulin akan berkurang sampai kira – kira setengah dari kadar normalnya.

- b. 15 menit kemudian, sekresi kembali meningkat untuk kedua kalinya. Biasanya pada saat ini kecepatan sekresi akan lebih besar daripada kecepatan pada tahap awal.

Sekresi insulin akibat stimulus glukosa dapat menyebabkan kecepatan dan nilai sekresinya meningkat secara cepat. Penghentian sekresi insulin hampir sama cepatnya, terjadi dalam waktu 3-5 menit setelah pengurangan konsentrasi glukosa kembali ke kadar puasa. Peningkatan glukosa darah yang cepat ini juga akan meningkatkan sekresi insulin, dan insulin selanjutnya meningkatkan transport glukosa dalam hati, otot, dan sel lain sehingga mengurangi konsentrasi glukosa darah hingga ke nilai normal. Ketika terjadi suatu kelainan pada respon jaringan terhadap insulin atau kerusakan sel β pankreas penghasil insulin, kadar glukosa akan terus menumpuk dalam darah tanpa bisa ditransport menuju jaringan yang lain. Pada DM2, kerusakan terjadi pada sensitivitas jaringan terhadap insulin, akibat tingginya glukosa dalam darah, sel β pankreas juga akan meningkatkan sekresi insulin yang menyebabkan menumpuknya insulin dalam darah (Guyton *et al.*, 2015).

2.4 Glukosa

Glukosa, suatu gula monosakarida, merupakan salah satu karbohidrat yang dapat langsung diserap oleh tubuh dan dikonversi menjadi sumber energy bagi tubuh (Wang dan Copeland, 2015). Hormon yang dapat mempengaruhi kadar glukosa yakni hormon insulin dan glukagon. Hormon tersebut dihasilkan oleh pankreas. Hormon insulin dibutuhkan sebagai transportasi glukosa ke dalam sel dan untuk permeabilitas membran sel terhadap glukosa (Joyce, 2013).

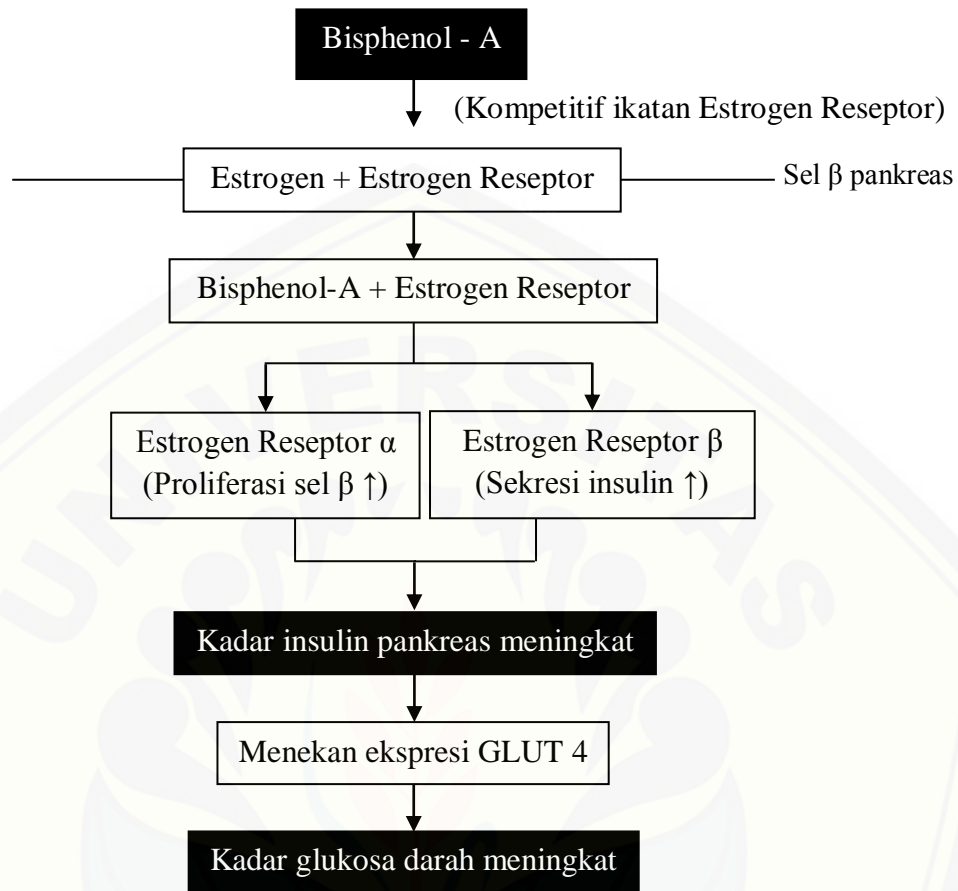
Kadar glukosa darah atau tingkat glukosa di dalam darah ditentukan oleh keseimbangan antara jumlah glukosa yang masuk ke dalam pembuluh darah dan yang meninggalkan pembuluh darah. 30-40% glukosa yang dikonsumsi oleh

tubuh akan dimetabolisme di dalam otot dan jaringan lain dan 5% dari glukosa yang dikonsumsi tubuh akan diubah menjadi glikogen didalam hati (Wulandari, 2016).

2.5 Hewan Model Tikus

Tikus digunakan sebagai hewan model untuk analisis biomedis contohnya penyakit kardiovaskular, metabolik, neurologik, perilaku, kanker, dan ginjal. Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang paling sering digunakan sebagai hewan model karena memiliki sistem faal yang mirip dengan manusia (Sengupta, 2013). Selain itu, kemampuan metabolik relatif cepat sehingga lebih sensitif apabila digunakan dalam penelitian yang berhubungan dengan metabolik tubuh (Johnson, 2012). Tikus wistar memiliki ciri yakni kepala yang lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang kurang dari panjang tubuhnya. Tikus wistar lebih aktif (agresif) jika dibandingkan dengan jenis yang lain seperti tikus Sprague-Dawley.

2.6 Kerangka Konseptual



Gambar 2.4 Kerangka konsep

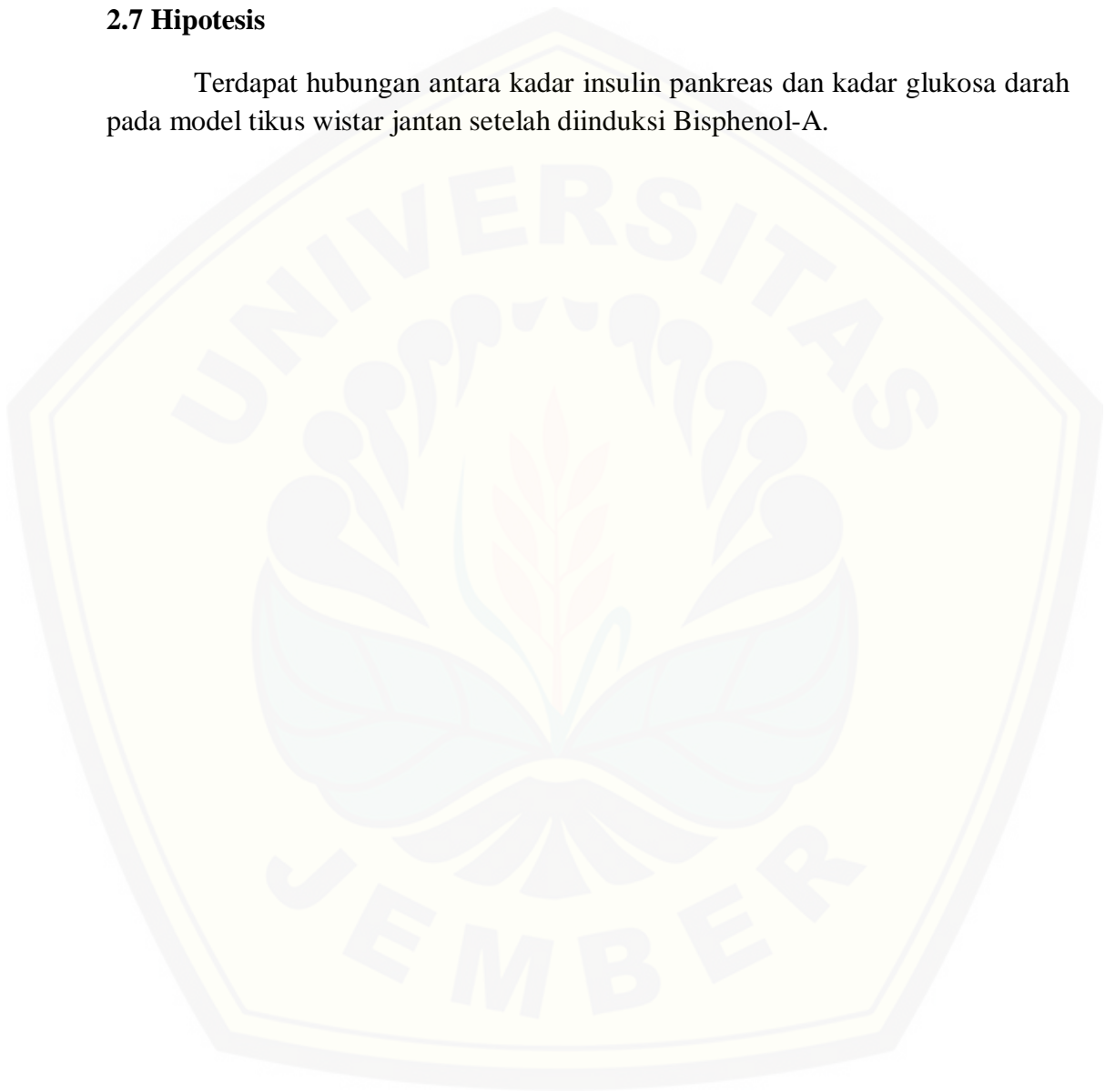
Keterangan kerangka konsep :

Proses BPA dalam meningkatkan produksi insulin pankreas. BPA memiliki sifat estrogenik dan mempunyai efek yang sama dengan hormon 17β -estradiol (E_2), sehingga dapat secara spesifik mengikat dan mengaktivasi reseptor estrogen. E_2 memiliki dua isoform yakni $ER\alpha$ dan $ER\beta$ yang terdapat pada sel β pankreas. Aktivasi pada $ER\alpha$ akan menyebabkan proliferasi sel β pankreas sedangkan aktivasi $ER\beta$ akan meningkatkan sekresi insulin. BPA diketahui akan berikatan 3 kali lebih kuat dengan $ER\beta$ dibandingkan dengan $ER\alpha$. Ikatan BPA dan $ER\beta$ akan menyebabkan ikatan estrogen reseptor lebih banyak. Hal tersebut meningkatkan jumlah produksi insulin dalam pankreas sehingga terjadi hiperinsulin. Ikatan ER dengan BPA juga mengakibatkan ekspresi GLUT4 tertekan, GLUT4 memiliki fungsi sebagai transporter glukosa ke jaringan adiposa.

Ekpresi GLUT4 yang tertekan mengakibatkan glukosa tidak dapat digunakan dengan maksimal dan menyebabkan terjadinya penumpukan glukosa dalam darah (hiperglikemia).

2.7 Hipotesis

Terdapat hubungan antara kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah pada model tikus wistar jantan setelah diinduksi Bisphenol-A.



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized separate posttest control group design* (Hamzah, 2015).

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Maret – April 2019

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Pada penelitian ini akan menggunakan tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, umur 3-4 bulan, dengan berat 200-250 gram. Sengupta (2013) dalam penelitiannya menyebutkan umur hidup tikus 2-3,5 tahun sedangkan manusia \pm 80 tahun. Umur 6 bulan atau 0,5 tahun pada tikus sama dengan usia 18 tahun pada manusia. Sehingga, 1 bulan umur tikus sama dengan 3 tahun usia manusia dan 1 minggu umur tikus sama dengan 0,75 tahun usia manusia.

3.4.2 Sampel Penelitian

Besar sampel penelitian ditentukan menggunakan Rumus Frederer :

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

t = jumlah kelompok percobaan

n = jumlah sampel tiap kelompok

Sampel yang digunakan tiap kelompok sebanyak 6 ekor. Penelitian ini menggunakan 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jadi total sampel yang digunakan adalah 12 ekor.

3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus wistar yang sehat
- 2) Umur 3-4 bulan dengan berat 200-250 gram
- 3) Berjenis kelamin jantan

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Sakit. Misalnya terdapat penampakan seperti bulu kusam, rontok atau botak, menjadi kurang aktif, keluarnya eksudat tidak normal dari mata, mulut, anus, atau genital.
- 2) Penurunan berat lebih dari 10% setelah masa adaptasi
- 3) Mati selama masa adaptasi

3.6 Variabel Penelitian

Variabel terdiri dari dua variabel yaitu :

3.6.1 Variabel Bebas

Bisphenol-A (BPA)

3.6.2 Variabel Terikat

Kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah

3.6.3 Variabel Terkendali

- a. Minuman dan makanan tikus
- b. Teknik pemeriksaan kadar insulin dalam Pankreas tikus
- c. Waktu pemeriksaan kadar insulin
- d. Dosis pemberian BPA
- e. Umur tikus

- f. berat tikus

3.7 Definisi Operasional

- 3.7.1 Bisphenol A merupakan bahan kimia yang digunakan sebagai monomer plastik dalam bentuk bubuk kemudian dilarutkan dengan minyak jagung. BPA diberikan secara sondase dengan dosis 20 mg/kg/hari, selanjutnya dilihat perubahan kadar insulin pankreas.
- 3.7.2 Kadar insulin pankreas merupakan kadar insulin dalam pankreas tikus yang telah diinduksi BPA dan dihitung menggunakan uji ELISA teknik *sandwich* dengan panjang gelombang 450 nm.
- 3.7.3 Kadar glukosa darah merupakan kadar glukosa dalam darah tikus yang telah diinduksi BPA dan dihitung menggunakan glukometer.

3.8 Alat dan Bahan Penelitian

3.8.1 Alat

Alat yang dibutuhkan pada penelitian sebagai berikut :

- a. Kandang tikus
- b. Timbangan digital SF-400
- c. Syringe 5 cc merk one med dan sonde lambung
- d. Gunting bedah, *scalpel* dan wadah untuk membius tikus
- e. Tabung urine untuk wadah organ tikus setelah dibedah
- f. Centrifuge merk hettich
- g. Glukometer merk Easy Touch GCHb
- h. Micropipet merk Nichipet dan pipet
- i. Blue tip, yellow tip, white tip
- j. Tabung eppendorf
- k. Tabung reaksi merk iwaki dan rak tabung reaksi
- l. Vortex merk gemmy, incubator merk memmert, shaker stuart

- m. ELISA reader merk r-bioparm
- n. Mortar dan pestle
- o. pH meter merk ecotestr
- p. Aluminium foil, box container

3.8.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian sebagai berikut :

- a. BPA
- b. Makanan tikus berupa pellet standart
- c. Aquadest
- d. Aquabidest
- e. *Chloroform*
- f. *ELISA Kit merk BT Lab*
- g. PBS
- h. Minyak jagung

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian sebagai berikut :

- a. Perhitungan Berat Badan Tikus

Saat pertama datang tikus ditimbang berat badannya menggunakan timbangan digital untuk dijadikan dasar dalam menentukan tikus tersebut masuk kriteria inklusi atau tidak.

- b. Aklimatisasi Tikus

Tikus diaklimatisasi selama 7 hari, semua tikus diletakkan dalam kandang secara terpisah sesuai kelompoknya, kandang plastik berbentuk kotak dengan tutup kawat yang mudah dibuka tutup. Kandang dialasi dengan sekam dan harus diganti setiap hari agar kondisi kandang tetap kering. Makanan dan minuman standart yang diberikan secara *ad libitum* (tidak terbatas), serta penimbangan berat badan dilakukan setiap hari dan pencucian kandang dilakukan dua hari sekali.

3.9.2 Pembuatan Sediaan Bisphenol - A

Bisphenol-A dilarutkan dengan minyak jagung sesuai hasil perhitungan, kemudian disimpan sampai akan digunakan. Dosis yang digunakan dihitung sesuai dengan berat badan tikus pada hari terakhir aklimatisasi. Menurut hasil penelitian Jay (Indumathi *et al.*, 2013; Shankar *et al.*, 2013) dosis yang digunakan yakni 20 mg/kg/hari. BPA diberikan satu kali sehari pada pukul 09.00 selama 28 hari.

3.9.3 Prosedur Perlakuan

Untuk pemberian perlakuan dilakukan berdasarkan kelompok:

- a. Kelompok Kontrol : diberi sondase aquadest sebanyak 3ml. Tikus diberi makan dan minum standar ad libitum selama 28 hari dan didekapitasi pada hari ke-29 serta dilakukan pengukuran glukosa darah sebelum dilakukan dekapitasi.
- b. Kelompok Perlakuan : diberi sondase BPA dengan dosis yakni 20 mg/kg/hari, setiap hari selama 28 hari, diberi makan dan minum standar ad libitum serta dilakukan dekapitasi pada hari ke-29 serta dilakukan pengukuran glukosa darah sebelum dilakukan dekapitasi.

3.9.4 Prosedur Dekapitasi

Tikus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan didekapitasi pada hari ke-29. Setelah diberi perlakuan selama 28 hari, tikus terlebih dahulu dipuaskan selama 12 jam, selanjutnya dilakukan dekapitasi dengan dibius menggunakan chloroform secara inhalasi dan ditunggu beberapa saat sampai tikus tidak sadar. Kemudian melakukan pembedahan dengan menggunakan *scalpel* dan juga gunting bedah pada daerah *abdomen* tikus.

3.9.5 Prosedur Pembuatan Homogenat Pankreas

Mengambil atau memotong jaringan pankreas lalu dibilas dengan PBS pH 7,4 kemudian ditempatkan pada *tube*. Selanjutnya menggerus organ diatas dry ice dan memberi PBS pH 7,4 sebanyak 10% dari berat pankreas. Sentrifuge

dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Ambil supernatan pindahkan ke eppendorf kosong dan simpan pada suhu -20°C sampai dilakukan uji ELISA.

3.9.6 Prosedur Pengukuran Kadar Insulin Menggunakan *ELISA Kit*

Prosedur pengukuran kadar insulin dilakukan menggunakan *ELISA Kit* sesuai dengan aturan pabrik.

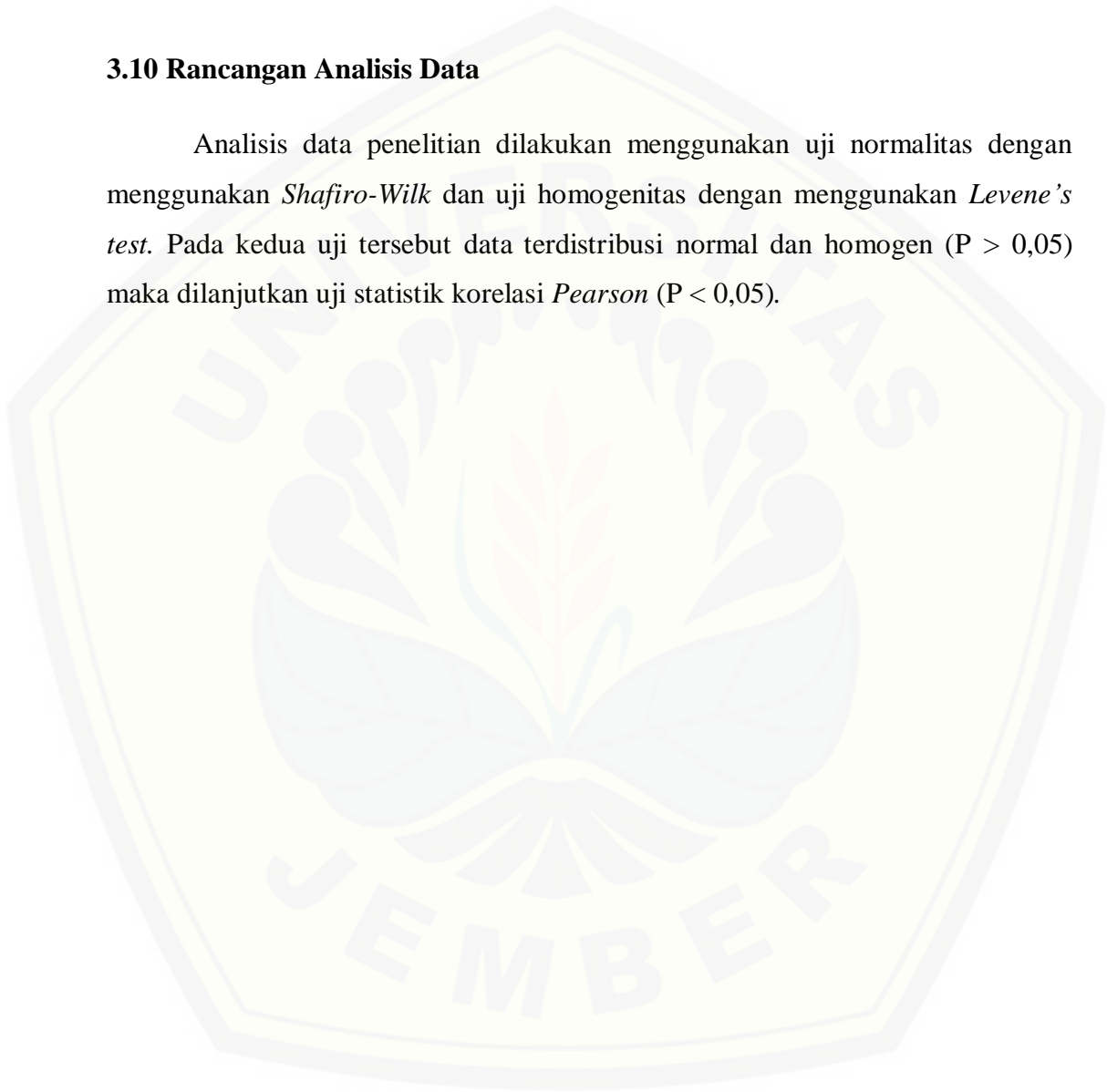
Prosedur pengukuran kadar insulin dilakukan sesuai dengan *User Instruction Rat Insulin ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory (BT Lab)* yaitu sebagai berikut:

- a. Menyiapkan semua reagen, larutan standar dan sampel. Semua reagen harus ada pada suhu ruang sebelum digunakan.
- b. Menentukan jumlah strip yang digunakan untuk uji. Masukkan strip pada kerangka untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.
- c. Masukkan $50\ \mu\text{l}$ standar pada *standard well* tanpa menambahkan antibody
- d. Tambahkan $40\ \mu\text{l}$ sampel pada *sample well* dan kemudian tambahkan $10\ \mu\text{l}$ anti-INS antibody pada *sample well*, kemudian tambahkan $50\ \mu\text{l}$ streptavidin-HRP pada *sample well* dan *standard well* (tidak pada *control well* yang kosong). Campur *well* menggunakan *shaker* kemudian tutup *plate* menggunakan *sealer* yang telah disediakan. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C .
- e. Lepas *sealer* dan cuci *plate* 5 kali dengan *wash buffer*. Rendam *plate* dengan sedikitnya $0,35\ \text{ml}$ *wash buffer* selama 30 detik sampai 1 menit pada setiap kali mencuci.
- f. Tambahkan $50\ \mu\text{l}$ larutan substrat A pada setiap *well* dan kemudian tambahkan $50\ \mu\text{l}$ larutan substrat B pada setiap *well*. Inkubasi *well* yang telah ditutup dengan *sealer* yang baru selama 10 menit pada suhu 37°C dalam ruangan gelap.
- g. Tambahkan $50\ \mu\text{l}$ larutan stop pada setiap *well*, sehingga warna biru berubah menjadi kuning.

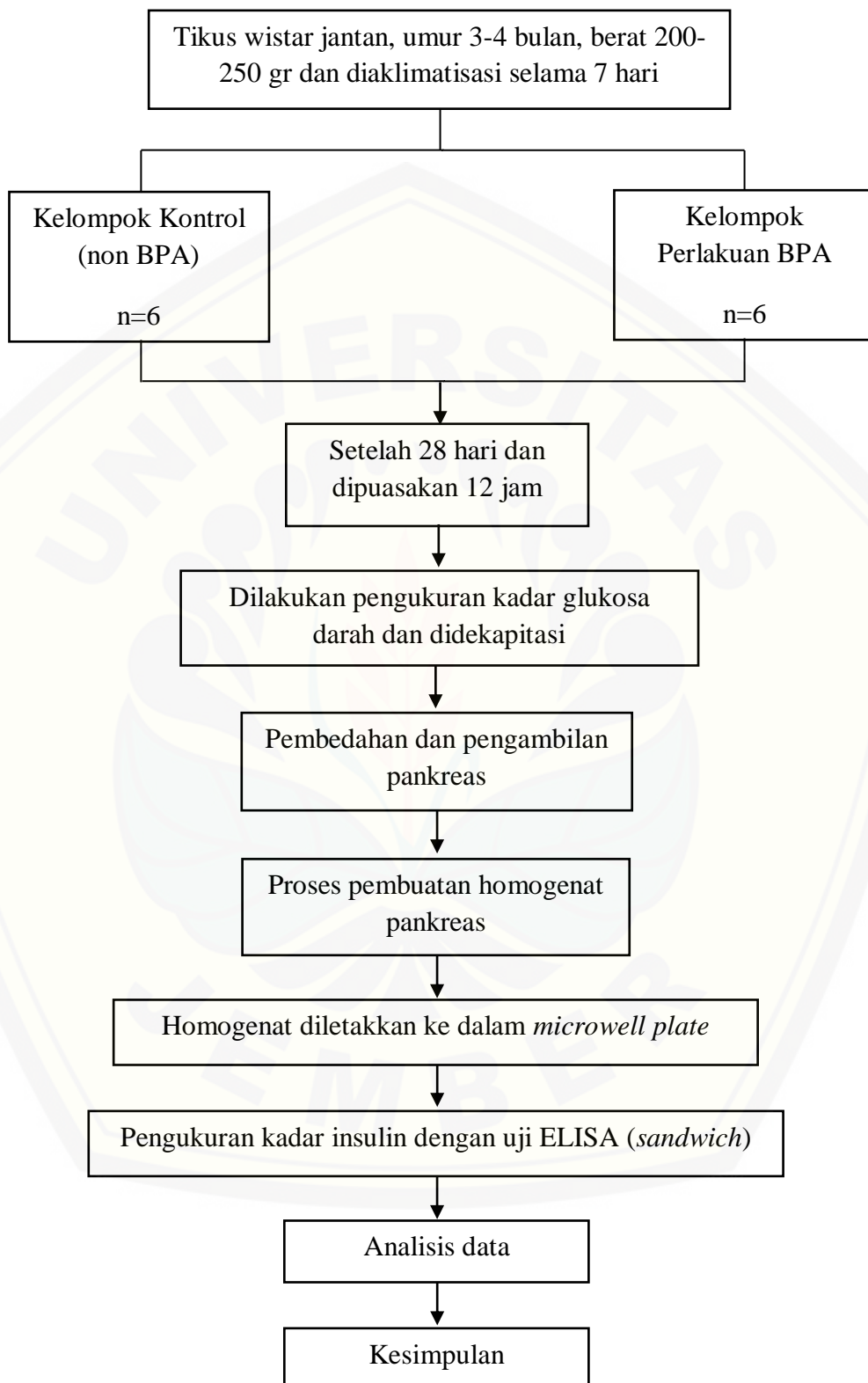
- h. Menentukan *Optical Density (OD value)* pada setiap *well* dengan segera menggunakan *microplate reader*, atur menjadi 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan larutan stop dan baca hasil arpsorbansi yang tertera di layar.

3.10 Rancangan Analisis Data

Analisis data penelitian dilakukan menggunakan uji normalitas dengan menggunakan *Shafiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene's test*. Pada kedua uji tersebut data terdistribusi normal dan homogen ($P > 0,05$) maka dilanjutkan uji statistik korelasi *Pearson* ($P < 0,05$).



3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi yang kuat serta hubungan yang positif antara kadar insulin pankreas dan kadar glukosa darah yakni, semakin meningkatnya kadar insulin pankreas maka kadar glukosa darah juga akan meningkat pada tikus yang telah diinduksi BPA dengan dosis 20 mg/kg/hari selama 28 hari.

5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengukuran akumulasi BPA untuk melihat kadar BPA dalam tubuh.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai perubahan yang terjadi pada organ yang lain atau secara histopatologinya pada tikus yang telah diinduksi oleh BPA.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, A., S. B. Sari, A. Woerasihingtijas, A. Ristanti, I. Najib, dan Wanty. 2018. Laporan Sintesis. Hotspot Sampah Laut Indonesia. *Public Disclosure Authorized*.
- Alonso, M., P. E. Vieira, S. Soriano, L. Menes, D. Burks, I. Quesada, dan A. Nadal. 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring.
- Geens, T., D. Aerts, C. Berthot, J. P. Bourguignon, L. Geoyens, dan P. Lecomte. 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*.50: 3275-40
- Guergana, M., L. S. Baker, A. T. M. Konkle, dan C. Bielajew. 2014. Bisphenol-A: Epigenetic Reprogramming and Effects on Reproduction and Behavior. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11: 7537-7561
- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 2015. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 14. Jakarta : EGC
- Hamzah, Z. 2015. Peningkatan Jumlah Sel Punca Mesenkimal Ligamen Periodontal Penghasil HSP-60 dan TGF- β Berperan Pada Mobilitas Gigi Tikus Sprague Dawley Yang Mengalami Distres Kerja Kronis. Universitas Airlangga. Dissertation Airlangga University 2015.
- Haviz, M. 2012. Insulin Shock dan Hubungannya dengan Metablisme Tubuh. *Jurnal Sainstek*. Vol IV No. 2:185-191
- Henquin, J. C. 2009. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*.
- Hock, M. B., dan A. Kralli. 2009. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol*.
- Hoekstra, E., dan J. Simoneau. 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 53(4):386-402
- Huang, R. P., Z. H. Liu, S. F. Yuan, H. Yin ,Z. Dang, dan P. X. Wu. 2017. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000-2016) and its risk analysis. *Environ Pollut*.

- Indumathi, D., S. Jayashree, J. Selvaraj, S. Sathish, C. Mayilvanan, N. Akilavalli dan K. Balasubramanian. 2013. Effect of bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Human & Experimental Toxicology*. 32(9):960-971.
- Jenna, R., Jambeck, G. Roland, W. Chris, R. Theodore, Siegler, P. Miriam, A. Anthony, N. Ramani, dan L. Kara. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. Vol 347. Issue 6223.
- Jensen, P. D., Provisiero, C. Pivonello, G. Muscogiuri, M. Negri, Cristina, D. Angelis, C. Simeoli, R. Pivonello, dan A. Colao. 2016. Influence of Bisphenol A on Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Health*.
- Johnson, M., 2012. Laboratory Mice and Rats. *Mater Methods*. 2:113. <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>.
- Joyce, L., 2013. *Pedoman Pemeriksaan Laboratorium & Diagnostik*. Edisi Enam. Jakarta: EGC.
- Lemone., Priscilla, M. Karen, Burke, dan G. Bauldoff. 2015. *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah*. Jakarta: EGC.
- Lin, Y., X. Sun, L. Qiu, J. Wei, Q. Huang, dan C. Fang. 2013. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death and Disease*.
- Longnecker, D., 2014. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. Department of Pathology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Lebanon, NH.
- Makaji, E., S. Raha, M. G. Wade, dan A. C. Holloway. 2011. Effect of environmental contaminants on Beta cell function. *Int J Toxicol*. 30(4): 410-8.
- Matsushima, A., X. Liu, H. Okada, M. Shimohigashi, dan Y. Shimohigashi. 2010. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERalpha but a highly specific antagonist for ERbeta. *Environ Health Perspect*. 118(9):1267-1272.
- Miller, G., dan S. Spoolman. 2011. Principles, Connections and Solutions. *Living in the Environment*. 456.
- Mirmira, P., dan C. E. Molina. 2014. Bisphenol A, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus: Genuine Concern or Unnecessary Preoccupation?. *The journal of laboratory and clinical medicine*. 164(1):13-21.

- Nadal, A., A. Magdalena, S. Soriano, C. Ripoll, E. Fuentes, I. Quesada, dan A. B. Ropero. 2011. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cell. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 16:251-60.
- Perdana., W. Yudha, dan D. J. Jacobus. 2016 . Bisphenol A (BPA) adalah Endocrine Disrupture Chemicals (EDC) yang Berperan sebagai Agen Diabetogenik. CDK-244/ vol. 43 no. 9.
- Sengupta, P., 2013. The Laboratory Rat:Relating its Age with Human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6) : 624-630.
- Shankar, J., D. Indumathi, N. Akilavalli, S. Sathish, J. Selvaraj, dan K. Balasubramanian. 2013. Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat. *Environmental toxicology and pharmacology*. 35: 300–310.
- Shanle, E. K., dan W. Xu. 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol*. 24: 6–19.
- Sembulingam, K., dan Sembulingam. 2013. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 5. Jilid 1. Editor Herman R. B. Tangerang: Binarupa Aksara Publisher
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, C. Sonnenschein, B. S. Rubin, dan A. M. Soto. 2009. Bisphenol-A and the great divide: A Review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Review*. 30(1):75-95.
- Wang, S., dan L. Copeland. 2015. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. *J Critical Rev in Food Sci and Nutr*. 55(8):1081–97.
- Wulandari, S., 2016. Gambaran kadar glukosa darah dalam sampel serum dan plasma NaF yang ditunda 1 dan 2 jam di STIKes Muhammadiyah Ciamis. KTI. STIKes Muhammadiyah: Ciamis.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

The image shows a formal ethical clearance certificate from the Faculty of Dentistry at Universitas Jember. The document is framed with a decorative border and contains the following information:

**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)**

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No.309/UN25.8/KEPK/DL/2019

Title of research protocol : "Rate Insulin Changes In Rat Pancreas With Diabetes Mellitus Type 2 State Induction By Bisphenol-A (BPA)"

Document Approved : Research Protocol

Principal Investigator : Mala Hayati

Member of research : 1. Rizli Purboningtyas
2. Fitria Nur Habiba A

Responsible Physician : Mala Hayati

Date of approval : Desember 18th, 2018

Place of research : Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Laboratorium Biokimia Kedokteran Universitas Jember


The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, January 10th, 2019

Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember
(Anggoro Hardjyan P. M. Kes. Sp. Prox)

Chairperson of Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember
Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si

Lampiran 2. 2.1 Surat Ijin Penelitian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember


KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Faks. 331991

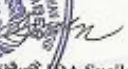
Nomor : 1036/UN.25.8.TL/2019
 Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth
 Kepala Laboratorium Biomedik
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
 Di
 Jember


Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin guna melakukan penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1	Nama	: Mala Hayati
2	NIM	: 151610101012
3	Semester/Tahun	: 2018/2019
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip II No. 78 Sumbarsari Jember
6	Judul Penelitian	: Perubahan Kadar Insulin Pankreas Tikus Pada Kondisi Diabetes Melitus Tipe 2 Yang Diinduksi Bisphenol-A (BPA)
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Sonde lambung, scalpel, gunting bedah, neraca
9	Waktu	: Maret 2019 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk menganalisis spengaruh Bisphenol – A (BPA) terhadap kadar insulin pankreas pada tikus wistar jantan.
11	Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S. 2. Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

Dekan
 Dekan I,

 NIDN. 436109031986022001
 NIDK. 436109031986022001

2.2 Surat Ijin Penelitian Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember


KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(031) 331536, Fsk. 351991

Nomor : 08r/UN25.8.TL/2019
 Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth
 Kepala Laboratorium Biokimia
 Fakultas Kedokteran Universitas Jember
 Di
 Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin guna melakukan penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

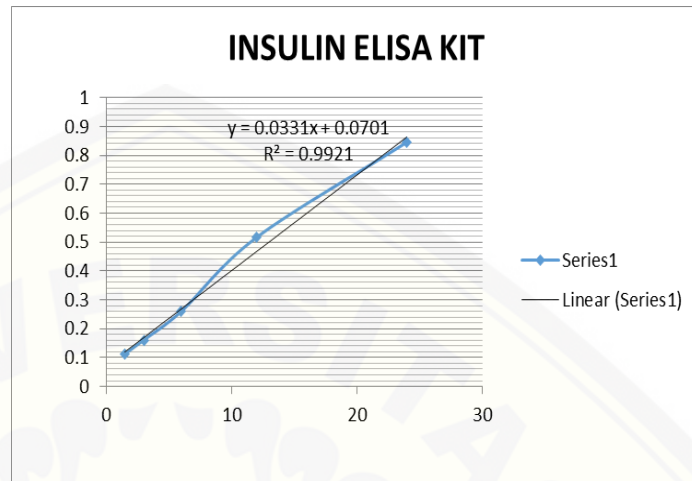
1	Nama	: Mula Hayati
2	NIM	: 151610101012
3	Semester/Tahun	: 2018/2019
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip II No. 78 Sumbersari Jember
6	Judul Penelitian	: Perubahan Kadar Insulin Pankreas Tikus Pada Kondisi Diabetes Melitus Tipe 2 Yang Diinduksi Bisphenol-A (BPA)
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Mortar dan pestle, pipet, sentrifugator, tabung, dry ice
9	Waktu	: Maret 2019 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk menganalisis pengaruh Bisphenol – A (BPA) terhadap kadar insulin pankreas pada tikus wistar jantan.
11	Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S. 2. Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih


 DA Susilawati, M.Kes
 NIP. 196109031986022001

Lampiran 3. Data Hasil Uji ELISA, Perhitungan Kadar Insulin Pankreas, Pengukuran Glukosa Darah

X	Y
0	0,09
1,5	0,111
3	0,16
6	0,259
12	0,515
24	0,845



Persamaan: $Y = 0,0331x + 0,0701$

No	Kelompok	OD	Kadar Insulin Pankreas (mIU/L)	Rata-rata
1	K	0,109	1,18	1,30
2		0,105	1,05	
3		0,114	1,33	
4		0,121	1,54	
5		0,112	1,27	
6		0,117	1,42	
1	P	0,183	3,41	3,19
2		0,172	3,08	
3		0,163	2,81	
4		0,187	3,53	
5		0,18	3,32	
6		0,17	3,02	

No	Kelompok	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)	Rata-Rata
1	Kontrol	91	97,67
2		95	
3		99	
4		103	
5		97	
6		101	
1	Perlakuan	123	122,67
2		112	
3		110	
4		160	
5		120	
6		111	

Lampiran 4. Data Hasil Uji Statistik

Descriptives			Statistic	Std. Error
KELOMPOK				
GLUKOSA KONTROL	Mean		97.67	1.764
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	93.13	
		Upper Bound	102.20	
	5% Trimmed Mean		97.74	
	Median		98.00	
	Variance		18.667	
	Std. Deviation		4.320	
	Minimum		91	
	Maximum		103	
	Range		12	
	Interquartile Range		8	
	Skewness		-.463	.845
	Kurtosis		-.300	1.741
	PERLAKUAN	Mean		122.67
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	102.69	
		Upper Bound	142.64	
5% Trimmed Mean			121.30	
Median			116.00	
Variance			362.267	
Std. Deviation			19.033	
Minimum			110	
Maximum			160	
Range			50	
Interquartile Range			22	
Skewness			2.053	.845

		Kurtosis	4.417	1.741		
INSULIN	KONTROL	Mean	1.2983	.07087		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.1162		
			Upper Bound	1.4805		
		5% Trimmed Mean	1.2987			
		Median	1.3000			
		Variance	.030			
		Std. Deviation	.17360			
		Minimum	1.05			
		Maximum	1.54			
		Range	.49			
		Interquartile Range	.30			
		Skewness	-.060	.845		
		Kurtosis	-.369	1.741		
		PERLAKUAN		Mean	3.1950	.11048
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.9110
Upper Bound	3.4790					
5% Trimmed Mean	3.1978					
Median	3.2000					
Variance	.073					
Std. Deviation	.27061					
Minimum	2.81					
Maximum	3.53					
Range	.72					
Interquartile Range	.47					
Skewness	-.219			.845		
Kurtosis	-1.282			1.741		

Uji Normalitas (*Saphiro wilk*)

Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
GLUKOSA KONTROL	.121	6	.200*	.983	6	.964
PERLAKUAN	.326	6	.045	.724	6	.011
INSULIN KONTROL	.102	6	.200*	.998	6	1.000
PERLAKUAN	.178	6	.200*	.962	6	.838

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas (*Levene Test*)

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GLUKOSA	2.860	1	10	.122
INSULIN	2.396	1	10	.153

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
GLUKOSA Between Groups	1875.000	1	1875.000	9.844	.011
Within Groups	1904.667	10	190.467		
Total	3779.667	11			
INSULIN Between Groups	10.792	1	10.792	208.811	.000
Within Groups	.517	10	.052		
Total	11.309	11			

Uji Korelasi *Pearson*

Correlations

		GLUKOSA	INSULIN
GLUKOSA	Pearson Correlation	1	.802**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	12	12
INSULIN	Pearson Correlation	.802**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 5. Dosis BPA





Minggu ke-	Perhitungan Dosis BPA
1	<p>Rata-rata BB tikus minggu pertama= 242 gr</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kristal BPA yang digunakan: $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 242 = 4,84 \text{ mg}$ <p>Maka jumlah yang dibutuhkan untuk 10 hari adalah: $4,48 \times 10 \times 7 = 338,8 \text{ mg} = 339 \text{ mg} = 0,339 \text{ gr}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>V corn oil</i> yang dibutuhkan untuk melarutkan: $\frac{339 \text{ mg}}{x \text{ ml}} = \frac{1600 \mu\text{g}}{\text{ml}}$ <p>$x \text{ ml} = 211,875 \text{ ml}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Banyak larutan yang disonde ke lambung tikus perhari: $\frac{242 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} = \frac{x \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$ <p>$x \text{ ml} = \frac{242 \times 2,5}{200}$</p> <p>$x \text{ ml} = 3,025 \text{ ml}$</p>
2	<p>Rata-rata BB tikus minggu kedua= 250 gr</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kristal BPA yang digunakan: $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 250 = 5 \text{ mg}$ <p>Maka jumlah yang dibutuhkan untuk 10 hari adalah: 5 $5 \times 10 \times 7 = 350 \text{ mg} = 0,35 \text{ gr}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>V corn oil</i> yang dibutuhkan untuk melarutkan: $\frac{350 \text{ mg}}{x \text{ ml}} = \frac{1600 \mu\text{g}}{\text{ml}}$ <p>$x \text{ ml} = 218,75 \text{ ml}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Banyak larutan yang disonde ke lambung tikus perhari: $\frac{250 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} = \frac{x \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$

	$x \text{ ml} = \frac{250 \times 2,5}{200}$ $x \text{ ml} = 3,125 \text{ ml}$
3	<p>Rata-rata BB tikus minggu ketiga= 255 gr</p> <ul style="list-style-type: none"> Kristal BPA yang digunakan: $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 255 = 5,1 \text{ mg}$ <p>Maka jumlah yang dibutuhkan untuk 10 hari adalah: $5,1 \times 10 \times 7 = 357 \text{ mg} = 0,357 \text{ gr}$ </p> <ul style="list-style-type: none"> <i>V corn oil</i> yang dibutuhkan untuk melarutkan: $\frac{357 \text{ mg}}{x \text{ ml}} = \frac{1600 \mu\text{g}}{\text{ml}}$ $x \text{ ml} = 223 \text{ ml}$ Banyak larutan yang disonde ke lambung tikus perhari: $\frac{255 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} = \frac{x \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$ $x \text{ ml} = \frac{255 \times 2,5}{200}$ $x \text{ ml} = 3,2 \text{ ml}$
4	<p>Rata-rata BB tikus minggu ketiga= 261,2 gr</p> <ul style="list-style-type: none"> Kristal BPA yang digunakan: $\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 261 = 5,22 \text{ mg}$ <p>Maka jumlah yang dibutuhkan untuk 10 hari adalah: $5,22 \times 10 \times 7 = 364 \text{ mg} = 0,364 \text{ gr}$ </p> <ul style="list-style-type: none"> <i>V corn oil</i> yang dibutuhkan untuk melarutkan: $\frac{364 \text{ mg}}{x \text{ ml}} = \frac{1600 \mu\text{g}}{\text{ml}}$ $x \text{ ml} = 227,5 \text{ ml}$ Banyak larutan yang disonde ke lambung tikus per hari: $\frac{261 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} = \frac{x \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$

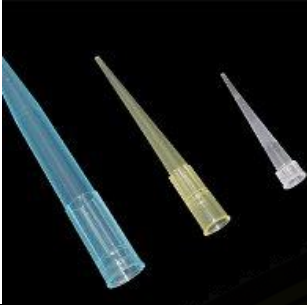




	$x \text{ ml} = \frac{261 \times 2,5}{200}$
	$x \text{ ml} = 3,3 \text{ ml}$







Lampiran 6. Alat dan Bahan






Gambar	Keterangan
	Kandang tikus
	Timbangan digital
	Syringe 5 cc
	Sonde lambung


	Gunting, <i>scalpel</i> dan tabung wadah membius tikus
	Tabung organ tikus
	Sentrifugator
	Glukometer
	Micropipet

		<p><i>Blue tip, yellow tip, white tip</i></p>
		<p><i>Eppendorf</i></p>
		<p>Tabung reaksi dan rak</p>
		<p>Pipet</p>
		<p>Vortex</p>

	Inkubator
	96-well plate
	Shaker
	ELISA reader
	Gelas ukur

	 A white ceramic mortar containing a white pestle, used for grinding substances.	Mortir dan stemper
	 A magnetic stirrer with a glass beaker containing a clear liquid, used for mixing solutions.	<i>Stirer</i>
	 A clear glass beaker containing a clear liquid, used for measuring and holding liquids.	<i>Beaker glass</i>
	 A green and black digital pH meter with a probe, used for measuring the acidity or basicity of a solution.	pH meter

		<p><i>Aluminium foil</i></p>
		<p><i>Chloroform</i></p>
		<p><i>Aquabidest</i></p>
		<p><i>ELISA kit</i></p>
		<p><i>BPA (Bishphenol A)</i></p>


	<i>Corn oil</i>
	Bahan untuk membuat PBS
	PBS dan Box container
	Aquadest

Lampiran 7. Prosedur Penelitian**1. Pembuatan Sediaan BPA**




	Menimbang BPA
	Melarutkan BPA dan <i>corn oil</i> menggunakan <i>stirer</i>
	BPA dan <i>corn oil</i> yang sudah larut

2. Perlakuan Hewan Coba

	Aklimatisasi selama 7 hari
---	----------------------------

	Sondase larutan BPA pada kelompok perlakuan dan sondase aqudest pada kelompok kontrol 2
---	---

3. Pembuatan PBS

	Menimbang NaCl, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄
	Memasukkan semua bahan kedalam beaker glass
	Menuangkan aquadest sebanyak 1 L untuk 1 resep

	<p>Menstirer hingga semua bahan larut dan mengecek pH. Selanjutnya disimpan di lemari es.</p>
---	---

4. Proses Dekapitasi dan Pengambilan Pankreas


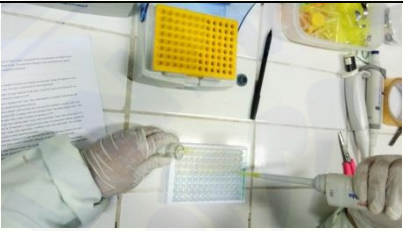

	<p>Anestesi menggunakan chloroform</p>
	<p>Pengambilan pankreas kemudian, menimbang pankreas lalu di bilas menggunakan PBS dan diletakkan dalam tabung berisi PBS kemudian di simpan dalam box container</p>
	<p>Menggerus pankreas diatas dry ice kemudian menambahkan PBS sebanyak 10% berat pankreas</p>

	<p>Menuangkan kedalam tabung reaksi selanjutnya proses sentrifugasi</p>
	<p>Mengambil supernatant dan dimasukkan dalam eppendorf selanjutnya disimpan dalam kulkas suhu -20 C°</p>

5. Proses Uji ELISA

	<p>Penempatan standar ke dalam <i>well</i></p>
	<p>Penempatan sampel dan antibodi</p>

	Pencampuran sampel dan antibodi menggunakan <i>shaker</i>
	Inkubasi selama 60 menit
	Pencucian <i>plate</i> dengan <i>wash buffer</i>
	Penambahan substrat solution A dan B

	Inkubasi selama 10 menit
	Penambahan stop solution
	Pembacaan OD (<i>Optical Density</i>) dengan <i>microplate reader</i> menggunakan gelombang 450 nm