

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan model *true experimental design* jenis *post test only control group*. Rancangan ini dapat mengukur pengaruh manipulasi/perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Budiharto, 2006). Ada 5 kelompok hewan model yaitu diet standard (K-), diet normal + injeksi STZ (K+), perlakuan diet normal + injeksi STZ+ ekstrak ikan gabus dengan berbagai dosis (P1,P2,P3). Penelitian ini ingin mengetahui efek pemberian ekstrak ikan gabus sebagai antioksidan terhadap penurunan kadar F2-isoprostan hewan model diabetes melitus.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus strain Wistar* yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus *Rattus norvegicus* jantan strain *Wistar*
- Tikus umur 10-12 minggu
- Tikus berbulu putih mengkilat dan lebat (tidak rontok)
- Tikus dengan berat badan 150-250 gram

- Tikus aktif dan mau makan

4.2.2 Perhitungan Sampel

Dalam penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut (Hanafiah, 2004):

Rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut:

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

Dengan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus diatas, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 5 kali. Jadi, total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah $5 \times 5 = 25$ ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai dosis ekstrak ikan gabus (*Channa striata*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar F2-isoprostan serum *Rattus norvegicus* jenis Wistar jantan yang digunakan dalam penelitian.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba dan Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk analisis kadar F2-isoprostan serum. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei s/d Juni 2013.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat: kandang tikus, timbangan digital, *stomach cannula*, spuit injeksi, pisau bedah, gunting ujung runcing, pipet, *test tube*, *stirrer*, *plate*, *microplate reader*, *Chromatography multicheck* (Nesco).

Bahan: pakan standard, aquades, ekstrak ikan gabus (*Channa striata*), bahan anestesi *Ketamine hydrochloride*, Streptozotocin, serum darah tikus, F2-isoprostan immunoassay kit.

Hewan coba: tikus *Rattus norvegicus* jantan jenis Wistar.

4.6 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi
1.	Hewan model DM	Tikus <i>Rattus norvegicus</i> jantan jenis <i>Wistar</i> yang memiliki kadar glukosa darah puasa >200 mg/dL hasil induksi STZ dosis 55 mg/kgBB.
2.	Ekstrak ikan gabus (<i>Channa striata</i>)	Ekstrak ikan gabus (<i>Channa striata</i>) yang digunakan merupakan ekstrak murni ikan gabus yang dibeli di kantor Poltekkes Malang. Ekstrak didapat dari hasil ekstraksi daging ikan gabus (<i>Channa striata</i>) dengan metode ekstraksi dengan pengontrolan suhu menggunakan alat ekstraktor dari jaringan ikan. Pengolahan 1 kg ikan gabus dapat menghasilkan \pm 140 ml ekstrak. Dalam suhu ruang, ekstrak berbentuk gel, saat akan disonde perlu dihangatkan terlebih dahulu. Ekstrak diberikan ke tikus dengan cara disonde dengan dosis 3, 6, dan 9 ml/kgBB.
3.	Diet normal	Makanan yang diberikan pada hewan model kelompok kontrol negatif dan kontrol positif, yang dimodifikasi dari <i>Comfeed PAR-S 70%</i> , tepung terigu 30% dan air.
4.	Kadar F2-isoprostan	Adalah produk hasil peroksidasi asam arakidonat yang dimediasi oleh ROS. Hasil

		pengukuran F2-isoprostan dalam serum tikus pada akhir penelitian menggunakan enzym immunoassay kit dengan ELISA <i>Reader</i> , dan dinyatakan dalam bentuk angka kuantitatif.
--	--	--

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Perhitungan Dosis

Penggunaan dosis sesuai data empiris secara klinis di Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang berdasarkan hasil penelitian Lukita dan Gunawan (1997). Sejak tahun 1999 pemberian ekstrak ikan gabus (*Channa striata*) telah diberikan kepada pasien dengan indikasi hipoalbumin. Dosis 150 ml/hari dapat meningkatkan kadar albumin pasien. Dengan menggunakan tabel konversi dosis. Konversi dosis manusia (70 kg) ke dosis untuk hewan coba tikus (200 g) adalah 0,018 (Laurence and Bacharach, 1964 *dalam* Harini, 2009).

$$\begin{aligned}\text{Dosis untuk tikus} &= 150 \text{ ml} \times 0,018 \\ &= 2,7 \text{ ml} \sim 3 \text{ ml/kgBB}\end{aligned}$$

Penelitian ini menggunakan tiga *dosis* ekstrak ikan gabus yang berbeda, yaitu dengan menaikkan *dosis* efektif dengan *deret hitung*, maka diperoleh *dosis* 3 ml/kgBB, 6 ml/kgBB, dan 9 ml/kgBB.

4.7.2 Prosedur Penelitian

1. Tikus ditimbang sesuai dengan kriteria inklusi untuk mendapatkan subjek yang diinginkan.

2. Setelah dilakukan pemilihan sampel, hewan model akan diberi masa adaptasi selama 1 minggu dengan diet normal untuk pengontrolan kondisi tikus.
3. Randomisasi hewan model. Dilakukan randomisasi untuk menentukan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif serta kelompok perlakuan.
4. Pembuatan tikus model diabetes dengan pemberian STZ dosis 55 mg/kg BB. Setelah 3 hari/72 jam pemberian STZ lalu dilakukan pengukuran kadar glukosa darah menggunakan *chromatography multicheck* (Nesco) dengan darah yang diambil dari ekor tikus.
5. Pembagian perlakuan pada kelompok normal dan kelompok diabetes.
6. Penempatan subjek penelitian dalam kandang terpisah, dilakukan pengukuran terhadap konsumsi pakan perhari, berat badan dan kadar glukosa darah.
7. Setelah hari 8 perlakuan, hewan model akan dibedah dan diambil serum darah untuk mengukur kadar F2-isoprostan..

4.7.2.1 Pemeliharaan tikus

Pemeliharaan tikus dilakukan pada minggu pertama dengan diet standard untuk mengontrol kondisi tikus. Tikus dipelihara dalam ruangan khusus dan diberi diet normal dan minum secara langsung dengan botol minum khusus secara terpisah di dalam masing-masing kandang.

4.7.2.2 Pemberian Streptozotosin

Tikus dipuasakan selama 20 jam sebelum induksi Diabetes Melitus menggunakan STZ dengan dosis tunggal yaitu 55 mg/kg BB diinjeksikan 1 kali

dengan cara intraperitoneal pada setiap tikus. Kemudian diaklimatisasi selama 1 minggu dan diberi diet standard. STZ dilarutkan dalam buffer sitrat 0,01 M, pH 4,5 dan selalu disiapkan dalam kondisi *fresh* untuk penggunaan dalam waktu 5 menit. Dosis ditentukan berdasarkan berat badan tikus (Braham and Tinder, 1972 *dalam* Arora, 2009).

Pemberian dosis STZ sebesar 60 mg/kgBB secara intraperitoneal dapat menginduksi diabetes pada tikus (Abeeleh *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil optimasi, pembuatan hewan coba DM dengan dosis STZ 55 mg/kgBB dan dosis 60 mg/kgBB menghasilkan perbandingan jumlah tikus DM yang sama, sehingga pada penelitian ini menggunakan dosis STZ sebesar 55 mg/kgBB. Dosis STZ yang akan diinjeksikan ditentukan berdasarkan berat badan tikus. Contoh perhitungan dosis STZ :

- Berat badan tikus X = 250 gram
- Sediaan STZ = 6 mg / 0,5 cc
- Dosis STZ untuk tikus X

$$\text{Berat STZ} = \frac{250}{1000} \times 55 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{BB} = 13,75 \text{ mg}$$

$$\text{Volume STZ} = \frac{13,75}{6} \text{ mg} \times 0,5 \text{ cc} = 1,15 \text{ cc}$$

Jadi, dosis STZ yang disuntikkan pada tikus X sebesar 1,15 cc.

Induksi STZ dilakukan di bagian abdomen hewan model, yang sebelumnya dioleskan alkohol. Tikus dimonitor kadar glukosa darahnya secara *rapid test* menggunakan *chromatography multicheck* (Nesco) sampai memiliki kadar glukosa darah sewaktu >300 mg/dl (Srinivasan *et al.*, 2005). Pada penelitian ini tikus dibiarkan DM selama 21 hari setelah diinduksi STZ dengan tujuan membuat DM kronis pada tikus.

4.7.2.3 Pembuatan Pakan Diet Normal

Proses pembuatan pakan diet normal tikus dengan cara sebagai berikut:

1. Menimbang bahan (PARS dan terigu).
2. Mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata.
3. Menimbang pakan 40 gram untuk per tikus per hari.

4.7.2.4 Pemberian Ekstrak Ikan Gabus (*Channa striata*)

Ekstrak ikan gabus (*Channa striata*) diberikan dengan cara disondekan pada tikus dengan menggunakan syringe yang dilengkapi dengan jarum berujung bundar. Disondekan sebanyak 1 kali per hari sesuai dosis perlakuan, yaitu 3 ml/kg BB, 6 ml/kg BB dan 9 ml/kg BB.

4.7.2.5 Pengukuran Konsumsi Pakan Per hari, Berat Badan, Kadar Glukosa Darah

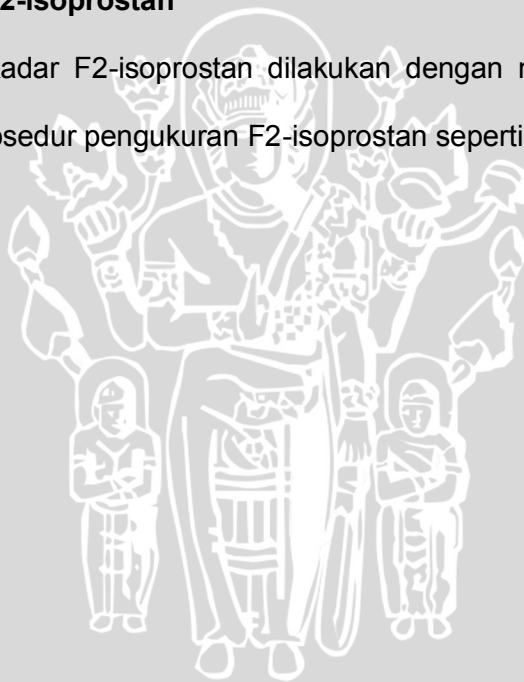
- Perhitungan terhadap konsumsi pakan perhari dilakukan dengan menimbang berat awal dan berat akhir pakan.
- Pengukuran berat badan tikus dengan melakukan penimbangan menggunakan timbangan digital (*electronic balance*) dengan ketelitian 0,1 g. Penimbangan berat badan dilakukan pada awal pemeliharaan di laboratorium sampai hari terakhir sebelum hewan model dikorbankan (*sacrifice*).
- Kadar Kadar glukosa darah selama penelitian diukur menggunakan metode *chromatography multicheck* (Nesco).

4.7.2.6 Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel

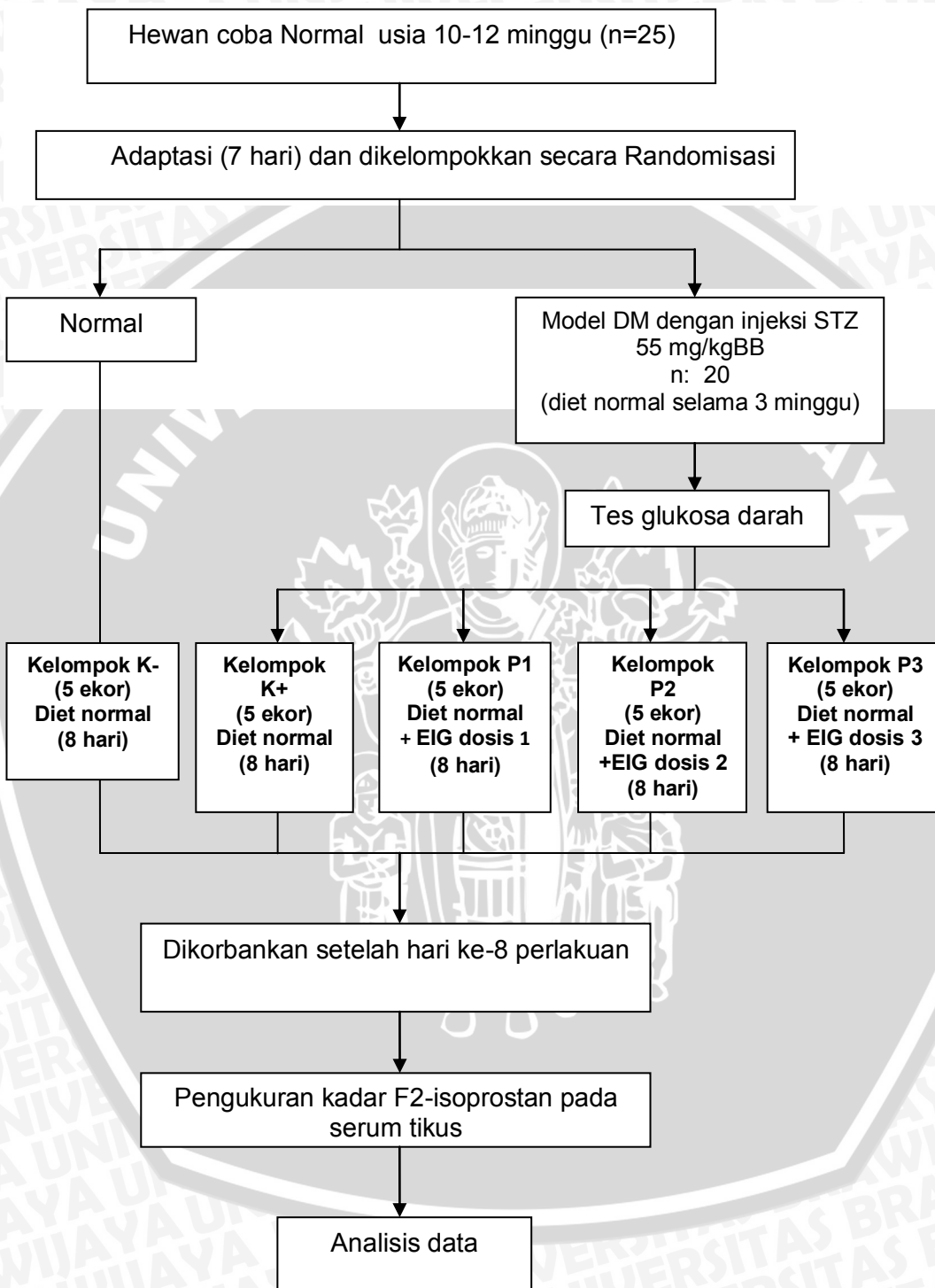
Hewan coba dibius dengan cara diinjeksi secara intraperitoneal menggunakan ketamin dosis 1 ml. Setelah hewan coba kehilangan kesadaran, kemudian diposisikan telentang, kaki dan tangannya ditahan oleh jarum pentul. Bagian perut ditarik kulitnya dan digunting hingga bagian bawah leher. Pengambilan darah dari jantung dilakukan secara bertahap hingga seluruh darah dalam jantung telah habis.

4.7.2.7 Pengukuran F2-isoprostan

Pemeriksaan kadar F2-isoprostan dilakukan dengan menggunakan Rat PGF2 α ELISA Kit. Prosedur pengukuran F2-isoprostan seperti pada lampiran 1.



4.7.3 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Teknik analisis data yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah uji *Anova One Way*. Uji ini digunakan untuk membandingkan mean variabel respon antara kelompok kontrol positif (tikus DM), kelompok P1 (tikus DM + Ekstrak Ikan Gabus dosis 1), kelompok P2 (tikus DM + Ekstrak Ikan Gabus dosis 2), dan kelompok P3 (tikus DM + Ekstrak Ikan Gabus dosis 3). Hal ini untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel respon dan membuktikan hipotesis penelitian. Pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat akan dianalisis dengan menggunakan analisis regresi linier (Wijaya, 2009) serta uji korelasi. Penelitian dianggap signifikan jika $p \leq 0,05$, jika terdapat perbedaan terhadap kelompok bermakna. Semua hasil uji akan dikomputerisasi dengan program SPSS 20.

