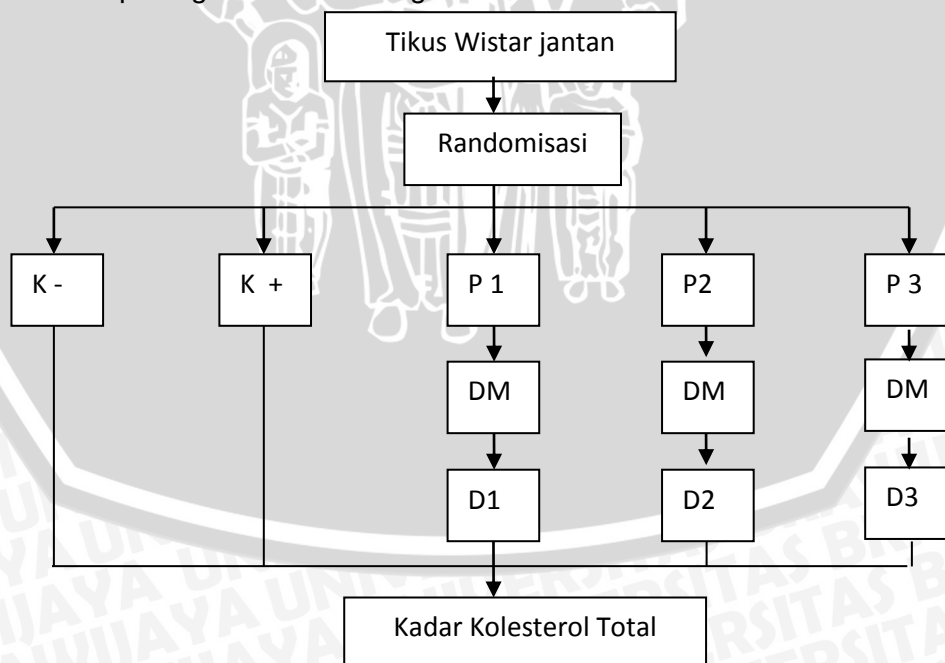


BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium *in vivo* terhadap tikus putih dengan 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Penelitian bersifat preventif sehingga dilaksanakan dengan *Post test Only Controlled Group Design*. Dengan metode ini peneliti dapat membandingkan kelompok eksperimental dengan kelompok kontrol. Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dalam perlakuan menggunakan metode *Simple Random Sampling* karena tikus, bahan pakan tikus, dan tempat penelitian dapat dikatakan homogen. Secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.1.1 Post Test Only Control Group Design

Rancangan penelitian menggunakan *post test* dengan kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Dengan randomisasi, maka kedua kelompok mempunyai sifat yang sama pada awalnya, sehingga perbedaan hasil *post test* pada kedua kelompok tersebut dapat dianggap sebagai pengaruh dari intervensi atau perlakuan yang diberikan. Rancangan ini melibatkan lebih dari 1 variabel bebas. Perlakuan dilakukan pada lebih dari 1 kelompok eksperimen dengan perlakuan yang berbeda (Notoadmodjo, 2005). Objek penelitian yang dipakai adalah tikus jantan *Rattus Novergicus* strain wistar dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus.

4.1.2 Penentuan Perlakuan

Pada rancangan penelitian ini, sampel dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan yaitu :

Kontrol Negatif: Pemberian diet normal (kelompok kontrol negatif), yaitu tikus yang tidak diinduksi STZ dan tidak diberi high fat diet

Kontrol Positif : Pemberian high fat diet kemudian tikus diinduksi STZ (kelompok kontrol positif) namun tidak diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D

Perlakuan I : Pemberian high fat diet kemudian tikus diinduksi STZ dan diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 0.9 gram

Perlakuan II : Pemberian high fat diet kemudian tikus diinduksi STZ dan diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 1.8 gram

Perlakuan III : Pemberian high fat diet kemudian tikus diinduksi STZ dan

diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 2.7 gram

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus putih atau *Rattus Norvegicus strain Wistar*. Pemilihan hewan coba ini dikarenakan sifatnya sebagai hewan coba memiliki ketertarikan dengan manusia. Selain itu tikus putih merupakan hewan mamalia pemakan segala (omnivora) yang mudah berkembang biak dan mudah mendapat perlakuan. Tikus putih juga memiliki struktur esophagus yang langsung bermuara ke lambung, sehingga tidak dapat memuntahkan makanannya dan tidak memiliki kandung empedu.

4.2.2 Kriteria Inklusi

Tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar*

1. Berjenis kelamin jantan.
2. Usia 2 – 3 bulan
3. Berat badan 180-250 gram
4. Sehat, tingkah laku dan aktifitas normal
5. Bulu putih, halus, dan mengkilat
6. GDA <126 mg/dL

4.2.3 Kriteria Eksklusi

1. Tikus cacat tidak bergerak aktif, dan tampak sakit
2. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
3. Tikus yang mati selama proses penelitian

4.2.4 Perhitungan Sampel

Dalam penelitian ada 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan dengan pemberian 3 dosis susu bubuk yang berbeda. Perhitungan jumlah sampel berdasarkan rumus di bawah ini:

$$[(t - 1)(r - 1)] \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan/banyaknya kelompok (5 kelompok)

r = jumlah pengulangan/besar sampel dalam kelompok

15 = nilai deviasi (Arkermen dan David, 2006 dalam Fadila, 2011)

Maka jumlah sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah :

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Jumlah sampel untuk 5 kelompok adalah $5 \times 5 = 25$ ekor tikus. Jumlah 25 ekor tikus adalah jumlah minimal sampel. Peneliti menambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan untuk tiap kelompok maka total jumlah sampel adalah 30 ekor tikus dengan 6 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

4.2.5 Randomisasi Sampel

Seluruh tikus sampel yang tersedia dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan berdasarkan *Simple Random Sampling* sehingga tiap

tikus memiliki peluang yang sama untuk semua kelompok. Teknik *Simple Random Sampling* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus. Umumnya menggunakan 3 angka acak.
2. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus.
3. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah dosis susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah kadar kolesterol total tikus wistar jantan.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini, yaitu : jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal, pemberian diet tinggi lemak, kondisi lingkungan kandang, dan pemberian susu bubuk sumber vitamin D.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Perawatan tikus dan pengukuran kadar kolesterol total dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih 90 hari mulai Juli 2013-September 2013

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

1. Alat untuk pemeliharaan binatang coba berupa kotak kaca dilengkapi sekam, tempat makan, dan tempat minum.
2. Timbangan analitik untuk mengukur sisa pakan dan berat badan tikus
3. Alat untuk memantau keadaan tikus : form pemantauan sisa pakan, form pemantauan gula darah, dan form pemantauan berat badan tikus.
4. Alat ukur pengambilan dan penyimpanan sampel darah adalah jarum suntik 5 ml, spuit disposable, dan tabung vial 15 ml.
5. Alat untuk pemeriksaan kadar kolesterol total berupa seperangkat tabung reaksi, cuvet, sentrifuge, dan spektrofotometri.
6. Alat untuk injeksi larutan streptozotocin adalah spuit
7. Alat untuk pengukuran glukosa darah tikus adalah jarum, serbet, dan alat pengukur glukosa digital

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

1. Diet normal

Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan protein 11 %, lemak 4 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. High Fat Diet

High fat diet diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi high fat diet adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Komposisi High Fat Diet

Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
Comfeed PARS	50	20 gram
Tepung terigu	25	10 gram
Kuning telur bebek	5	2 gram
Lemak kambing	10	4 gram
Minyak kelapa	1	0.4 gram
Minyak babi	8.9	3.55 gram
Asam kolat	0.1	0.05 gram
TOTAL	100	40 gram

3. Susu sapi bubuk

Susu sapi bubuk yang digunakan merupakan susu bubuk dengan kandungan vitamin D yang tinggi dan memiliki rasio kandungan yang mendekati anjuran optimal untuk menurunkan resiko diabetes mellitus tipe 2. Susu bubuk yang digunakan adalah susu bubuk yang terdapat di pasaran dengan merek "HiLo Soleha" dengan kandungan vitamin D sebesar 400 IU dan kalsium sebesar 500 mg dalam setiap sajian 40 gram susu bubuk. Pemberian susu sapi bubuk akan dicampurkan kedalam pakan tikus.

4. Larutan STZ

Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan kemudian ditambahkan 3 ml buffer sitrat hingga pH mencapai pH 4,5

4.5.2.2 Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total

Pemeriksaan kadar kolesterol total pada serum darah tikus menggunakan spektrofotometer. Pengambilan darah dilakukan dari jantung tikus pada akhir hari ke-65 dengan prosedur sebagai berikut :

- 1) Darah diambil dari jantung tikus dengan menggunakan spuit, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- 2) Dilakukan sentrifugasi 200rpm diambil serum darah sebanyak 10 mikro
- 3) Serum darah yang sudah ada kemudian diberi reagen uji dan dicampur kemudian dimasukkan inkubator 20° - 25° C (suhu kamar) selama 10 menit
- 4) Setelah itu diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500nm dengan larutan blangko sebagai titik nolnya, kemudian dilakukan pembacaan

Perhitungan kadar kolesterol total :

$$C = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times St$$

Keterangan:

A sampel = absorbansi di spektrofotometri

A standar = absorbansi standart

St = kadar standart pereaksi kolesterol (200 mg/dl)

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetes Melitus

Pada tikus percobaan dilakukan prosedur pemberian MLD-STZ dosis 40mg/kgBB. Indikasi keberhasilan induksi diabetes pada tikus galur wistar

dengan penyuntikan STZ adalah kadar glukosa darah yang mencapai \geq 200 mg/dL selama dua hari berturut-turut (Amirshahrokhi, 2008).

4.6.2 Kolesterol Total

Kadar serum kolesterol total adalah hasil pengukuran serum kolesterol total dengan satuan mg/dl yang diambil dari darah jantung tikus wistar jantan menggunakan spuit sebanyak 3 ml. Kadar kolesterol total diukur dengan menggunakan spektrofotometer.

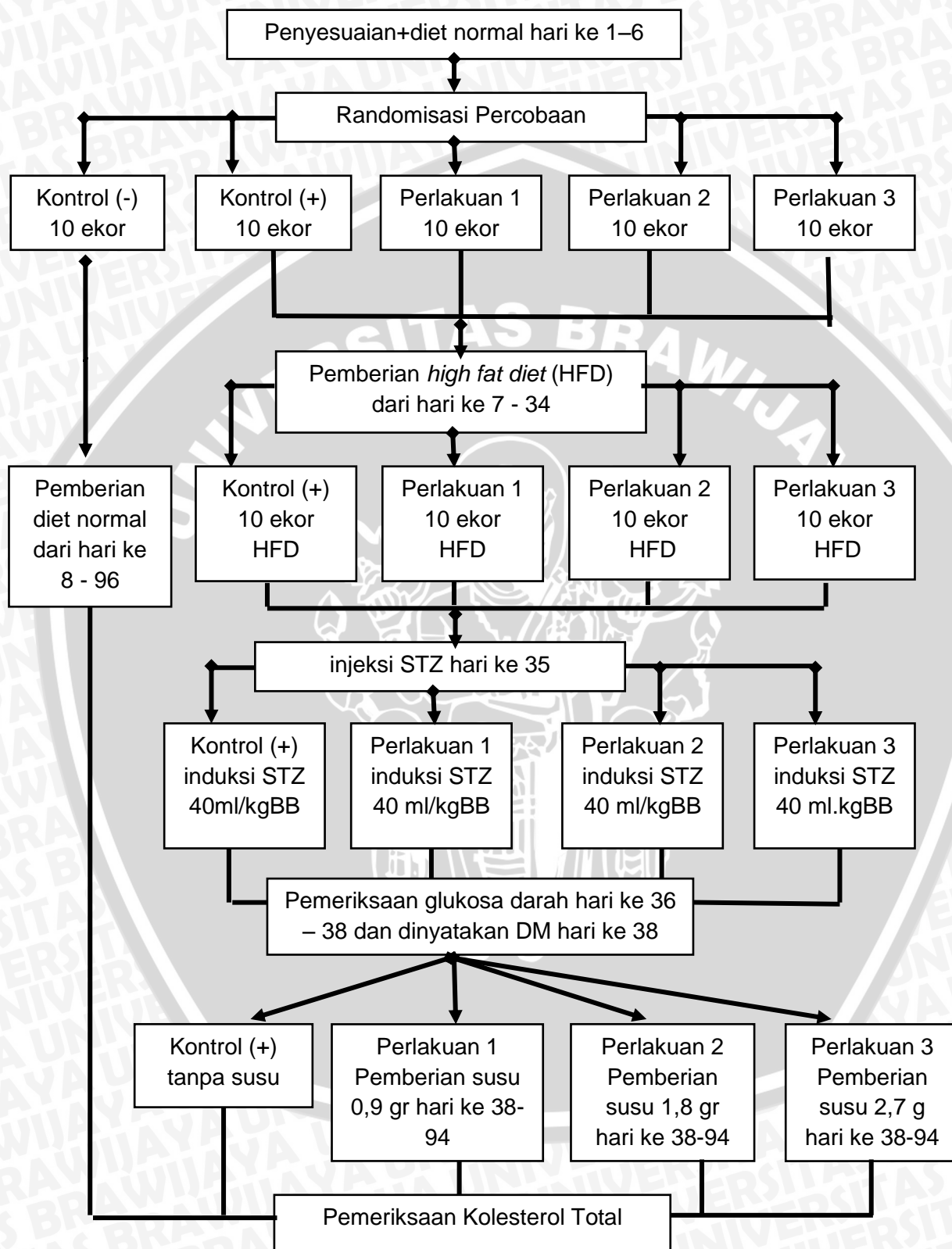
4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Perlakuan pada Tikus Percobaan

1. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi dengan rancangan acak lengkap agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus dilakukan masa adaptasi selama 7 hari sebelum perlakuan. Pada masa adaptasi tikus diberi pakan normal dan minuman secara *ad libitum* dan ditimbang berat badannya sebelum dan setelah adaptasi untuk memastikan berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi baik
3. Tikus putih dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan teknik randomisasi *Simple Random Sampling* yaitu:
 1. Kontrol negatif yaitu kelompok tikus normal tanpa perlakuan dan hanya diberikan pakan normal
 2. Kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan diabetes melitus tipe 2 (induksi STZ) + high fat diet namun tidak diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D

3. Kelompok perlakuan 1 dengan diabetes melitus tipe 2 (induksi STZ) + high fat diet dan diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 0.9 gram
4. Kelompok perlakuan 2 dengan diabetes melitus tipe 2 (induksi STZ) + high fat diet dan diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 1.8 gram
5. Kelompok perlakuan 3 dengan diabetes melitus tipe 2 (induksi STZ) + high fat diet dan diberi susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D dengan dosis 2.7 gram
6. Tikus selama 8 minggu diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan. Semua diet dan minuman diberikan secara *ad libitum*.
7. Dilakukan penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari dan penimbangan berat badan tikus setiap minggu. Sedangkan pergantian sekam 2 kali setiap 1 minggu.
8. Pada akhir percobaan dilakukan pengukuran kadar kolesterol total pada seluruh tikus percobaan.

Untuk lebih jelas dapat dilihat pada diagram alur penelitian sebagai berikut :



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Pakan Standar

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. Membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.

Proses pembuatan diet normal dan susu dengan cara sebagai berikut :

1. Menimbang bahan (PARS dan terigu).
2. Mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata.
3. Membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.
4. Susu ditimbang untuk satu per satu pakan
5. Kurangkan pakan normal agar isokalorik (Perlakuan 1 dikurangi 1,37 gram, perlakuan 2 dikurangi 2,74 gram, perlakuan 3 dikurangi 4,12 gram)
6. Campurkan susu dalam bulatan pakan yang telah dihancurkan
7. Bentuk bulatan kembali

4.7.3 Pemberian Pakan Tinggi Lemak (*High Fat Diet*)

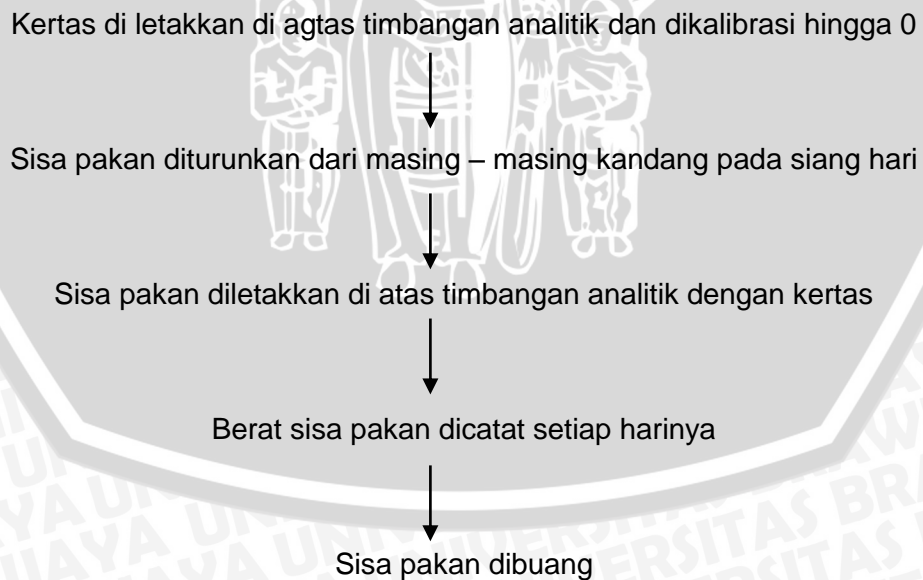
Proses pembuatan pakan HFD tikus dengan cara sebagai berikut :

1. Menimbang bahan (PARS, terigu, kuning telur bebek, lemak kambing, minyak kelapa, minyak babi, asam kolat).
2. Mencampur bahan, diaduk rata dan ditimbang 40 gram untuk pertikus perhari.
3. Pakan ditambahkan air hingga dapat dibentuk bulatan.

4.7.4 Prosedur Penimbangan Berat Badan Tikus



4.7.5 Prosedur Penimbangan Sisa Pakan Tikus



4.7.6 Proses Pembuatan Larutan STZ

1. Streptozotocin (STZ) dilarutkan dalam aquades dan diteteskan buffer sitrat hingga mencapai pH 4,5
2. Larutan divortex hingga homogen
3. Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C
4. Perhitungan kebutuhan STZ dan larutan STZ per tikus terdapat di lampiran

4.7.7 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang
2. Larutan STZ 40 mg/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal (IP) sampai tikus memiliki kadar gula darah >200 mg/dL selama 2 hari berturut-turut
3. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan alkohol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya
5. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.
6. Segera STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan etanol 70 % kembali
7. Setelah injeksi STZ, diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif DM jika kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL

4.7.8 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang dengan serbet
2. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum
3. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka
4. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya

4.8 Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Pemeriksaan kadar kolesterol total dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengambilan darah dilakukan dari jantung tikus pada akhir hari ke-94. Berikut ini merupakan langkah pengukuran kadar kolesterol total :

1. Tikus dianestesi dengan cangan eter per inhalasi hingga lemas
2. Dibaringkan pada permukaan papan bedah yang dialasi sterofoam
3. Kaki dan tangan tikus difiksasikan dengan jarum pentul di atas sterofoam
4. Dinding abdomen dipotong untuk pembedahan
5. Serum darah diambil dari jantung tikus menggunakan spuit
6. Serum dimasukkan ke tabung reaksi
7. Dilakukan sentrifugasi 200 rpm dan diambil serum darah sebanyak 10 mikro
8. Diberi reagen uji dan dicampur
9. Dimasukkan inkubator 20° - 25° C selama 10 menit
10. Diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500nm
11. Dilakukan pembacaan

4.9 Perhitungan Dosis Susu Sapi

Perhitungan dosis:

Rata-rata berat badan manusia dewasa = 70 kg = 70.000 gram

Rata-rata berat badan tikus = 0,2 kg = 200 gram

Kebutuhan vitamin D yang esensial untuk DM menurut Nikooyeh (2011) adalah sebesar 1000 IU, dimana diketahui 1 IU = 0,025 mcg dan 1 mcg = 40 IU (Mahan, 2008). Sedangkan, Kebutuhan kalsium yang esensial untuk DM menurut Pittas (2006) adalah sebesar >1200 mg.

Berdasarkan tabel konversi dosis, diketahui indeks konversi dosis dari manusia (dengan berat badan 70 kg) ke tikus (dengan berat badan 200 gram) adalah sebesar 0,018 kali dosis pada manusia (Harmita, dkk, 2008), maka diperoleh dosis untuk tikus:

Kebutuhan vitamin D optimal tikus = 1000IU/hari x 0,018 = 18IU/hari

Kebutuhan kalsium optimal tikus = 1200 mg/hari x 0,018 = 21,6 mg/hari

Perbandingan kandungan vitamin D dan kalsium dengan menggunakan deret hitung seperti pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Perbandingan Kandungan vitamin D dan Kalsium untuk Manusia

	P1	P2	P3
Vitamin D (IU)	500	1000	1500
Kalsium (mg)	600	1200	1800

Dari tabel di atas, kemudian dikonversikan ke dalam kebutuhan tikus seperti pada tabel 4.3 berikut

Tabel 4.3 Perbandingan Kandungan vitamin D dan Kalsium untuk Tikus

	P1	P2	P3
Vitamin D (IU)	9	18	27
Kalsium (mg)	10,8	21,6	32,4

Dalam 40 gram (satu sajian) susu bubuk HiLo Soleha mengandung 400 IU vitamin D dan 500 mg Ca, sehingga perhitungan susu bubuk yang akan diberikan adalah:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{kebutuhan VTD tikus}}{\text{kandungan VTD dalam susu bubuk}} \times 40\text{g} \\
 &= \frac{18}{400} \times 40\text{g} \\
 &= 1,8 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Pemberian susu bubuk yang optimal (dengan kandungan vitamin D dan kalsium yang optimal) adalah sebesar 1,8 gram. Dengan begitu maka pemberian susu bubuk berturut-turut dari perlakuan (P)1 hingga perlakuan (P)3 adalah 0,9 gram; 1,8 gram; dan 2,7 gram. Pada manusia Upper Level (UL) vitamin D adalah 2000 IU dan kalsium 2500 mg. Sehingga bila dikonversi ke tikus UL vitamin D 36 IU dan kalsium 45 gram.

4.10 Analisa Data

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS 16. Data yang didapatkan pertama kali dilakukan uji normalitas, untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak, karena pemilihan penyajian dan uji hipotesis tergantung dari hasil uji normalitas. Kemudian seluruh data diuji dengan *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui

bahwa semua data homogen. Kemudian dilanjutkan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan kadar kolesterol total antar kelompok. Uji Anova mensyaratkan data harus berdistribusi normal dan varian homogen. Jika terdapat perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Uji statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dikatakan bermakna jika $p < 0,05$.

Jika data tidak homogen dan atau tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan median dengan $\alpha = 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan tersebut ($p < 0,05$).

