

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratory* karena terdapat perlakuan pada hewan coba tikus serta menggunakan randomisasi untuk pemilihan kelompok perlakuan. Di samping itu tujuan dari *true experimental laboratory* yaitu untuk meneliti hubungan sebab-akibat antara kelompok perlakuan. Desain penelitian ini menggunakan *Randomize only post test control design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus novergicus galur wistar jantan*. Hewan coba dibagi atas dua kelompok, yaitu :

Perlakuan 1 : diberi diet normal modifikasi standar PAR-S

Perlakuan 2 : diberi diet normal standar AIN-93 M

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Jumlah Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tikus putih jenis *Rattus Novergicus galur wistar jantan*. Pemilihan jenis tikus putih jenis *Rattus Novergicus galur wistar jantan*, dikarenakan sistem kerja tubuh yang dimiliki tikus jenis *Rattus Novergicus galur wistar jantan* mirip dengan manusia sehingga sering digunakan dalam penelitian hewan coba. Untuk menentukan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini, maka peneliti menggunakan rumus Frederer (Shaw *et al.*, 2002 dalam Ridwan, 2013)

$$(n-1)(t-1) \geq 15 + do 10\%$$

$$(n-1) (2-1) \geq 15$$

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

$$n = 16$$

$$n = 16 + \text{do } 10\%$$

$$n = 16 + 1,6$$

$$n = 17,6 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 18 \text{ ekor}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = banyaknya perlakuan pada sampel

15 = konstanta

Dari hasil perhitungan di atas didapatkan jumlah sampel adalah 16 dan 2 cadangan yang digunakan apabila sampel yang digunakan tiba-tiba mati atau *drop out* dari penelitian. Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 18 ekor tikus sehingga total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini sejumlah 36 ekor tikus.

4.2.2. Prosedur Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap), hal ini karena perlakuan yang diberikan kepada sampel sejak fase adaptasi adalah sama atau homogen.

4.2.3. Kriteria Subjek

a. Kriteria inklusi

- 1) Berjenis kelamin jantan
- 2) Berusia \pm 3 bulan.
- 3) Berat badan 190 - 230 g.
- 4) Anggota badan lengkap, dan gerakan aktif, mata jernih.
- 5) Warna bulu putih bersih.

6) Tikus dalam kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik.

b. Kriteria eksklusi

1) Mengalami kelainan anatomi yang tidak sesuai dengan kriteria inklusi.

c. Drop out

1) Tikus mati selama masa perlakuan

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas Penelitian :

Variabel bebas dalam penelitian eksperimental adalah perlakuan, sehingga variabel bebas dalam penelitian ini adalah diet normal standar PARS dan diet normal standar AIN-93 M modifikasi Reeves dan Handayani.

4.3.2. Variabel Terikat/ tergantung penelitian :

Variabel terikat dalam penelitian eksperimental merupakan respons subjek penelitian terhadap perlakuan yang diberikan. Dalam penelitian ini yang termasuk variabel terikat adalah jumlah BAT (*Brown Adipose Tissue*) pada hewan coba.

4.3.3 Variabel kendali :

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan oleh peneliti agar subjek penelitian berupa hewan coba tikus dalam keadaan homogen. Pengendalian yang dilakukan adalah dengan cara inklusi dan eksklusi, yaitu hewan coba yang memenuhi syarat dimasukkan (inklusi) dalam sampel penelitian, sedangkan yang tidak memenuhi syarat dikeluarkan (eksklusi) dari penelitian.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemeliharaan hewan coba dan pembedahan. Penimbangan jumlah BAT (*Brown Adipose Tissue*) pada tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sedangkan pembuatan diet normal standar PAR-S dan diet normal standar AIN – 93 M serta penyimpanan pakan dilakukan di Laboratorium Diet Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama \pm 12 minggu atau 3 bulan ditambah 2 minggu adaptasi mulai dari tanggal 21 Agustus 2014 sampai tanggal 3 Desember 2014.

4.5. Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan

Kandang pemeliharaan hewan coba, sekam, botol minum untuk tempat minum hewan coba, tempat makan, pakan *Comfeed*, pakan standart normal AIN 93-M, timbangan analitik untuk menimbang berat badan tikus setiap satu minggu sekali.

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet Normal Standar PAR-S

Alat yang dibutuhkan yaitu timbangan dan mixer. Bahan-bahan yang dibutuhkan dapat dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini

Tabel 4.1 Komposisi diet normal standar PAR-S (per 1Kg)

Bahan	Diet Normal	Nilai Gizi
Comfeed PAR-S	10,5 gr	Karbohidrat : 75,1 % total energy
Terigu	19,5gr	Lemak : 4,77 % total energy
Air	40 ml	Protein : 15,14% total energy
		Energy density : 2,22 kkal/g

Sumber : Widodo *dkk.*, 2006

*Nilai Gizi Berdasarkan Hasil Analisis Proksimat Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Diet normal standar AIN – 93 M

Alat yang dibutuhkan yaitu timbangan, kompor, mixer, oven, gelas beaker, baki, plastik wrap, doughmaker, baskom, sendok, spatula, sarung tangan plastik. Bahan-bahan yang dibutuhkan saat penelitian dapat dilihat pada tabel 4.2 di bawah ini

Tabel 4.2 Komposisi diet normal standar AIN – 93 M berdasarkan penelitian Handayani *et al*, 2011 ; Handayani *et al*, 2012

Nama bahan	g/kg	Nilai Gizi
Tepung jagung	620	Karbohidrat : 77,66 % total energy
Sucrose	100	Lemak : 11,21 % total energy
Soybean oil	40	Protein : 8,06% total energy
Gelatine	65	Energy density : 3,2 kkal/g
Casein	80	
Bran (CMC)	50	
Mineral mix AIN	35	
Vitamin mix AIN	10	

(Sumber: Modifikasi dari Handayani, Chen *et al.*, 2010, Handayani, Meyer *et al.*, 2012, Reeves *et al.*, 1997).

*Nilai Gizi Berdasarkan Hasil Analisis Proksimat Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Hygiene dan Sanitasi

Tempat cuci tangan, sarung tangan (*hand gloves*), jas laboratorium, sabun antiseptik, masker, alkohol, dan *cotton batt*.

4.5.5 Alat dan Bahan Pengambilan Sampel BAT (*Brown Adipose Tissues*)

pada Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan

Alat bedah yaitu pisau atau gunting bedah, papan bedah, pinset, dan bahan berupa ketamine (Sackmann-Sala *et al.*, 2012).

4.5.6 Alat dan Bahan untuk menganalisa jumlah BAT (*Brown Adipose Tissue*) pada Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan

Timbangan analitik untuk menimbang jumlah BAT pada tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan dan cairan PBS untuk memastikan jaringan lemak yang diambil adalah jaringan lemak coklat (BAT).

4.6. Definisi Operasional

4.6.1 Diet normal Standar PAR-S : Diet normal standar PAR-S yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan komposisi diet normal standar PAR-S berdasarkan penelitian Widodo *dkk.*, 2006 dengan komposisi *Comfeed* PAR-S 35%, tepung terigu 65% dan air 1,3%. Diberikan saat adaptasi selama 2 minggu dan saat masa perlakuan selama 10 minggu.

4.6.2 Diet normal standar AIN 93-M : Diet normal standar AIN – 93 M yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan komposisi diet normal standar modifikasi AIN – 93 M pada Handayani *et al*, 2011 serta Handayani *et al*, 2012 terdiri dari tepung jagung 62%, sucrose 10%, soybean oil 4%, gelatin 6,5%, casein 8%, bran (CMC) 5%, mineral mix-AIN 3,5% dan vitamin mix-AIN 1%. Diberikan pada saat setelah masa adaptasi selama 2 minggu tanpa vitamin dan mineral kemudian setelah masuk pada masa perlakuan selama 10 minggu diberikan diet normal standar AIN – 93 M.

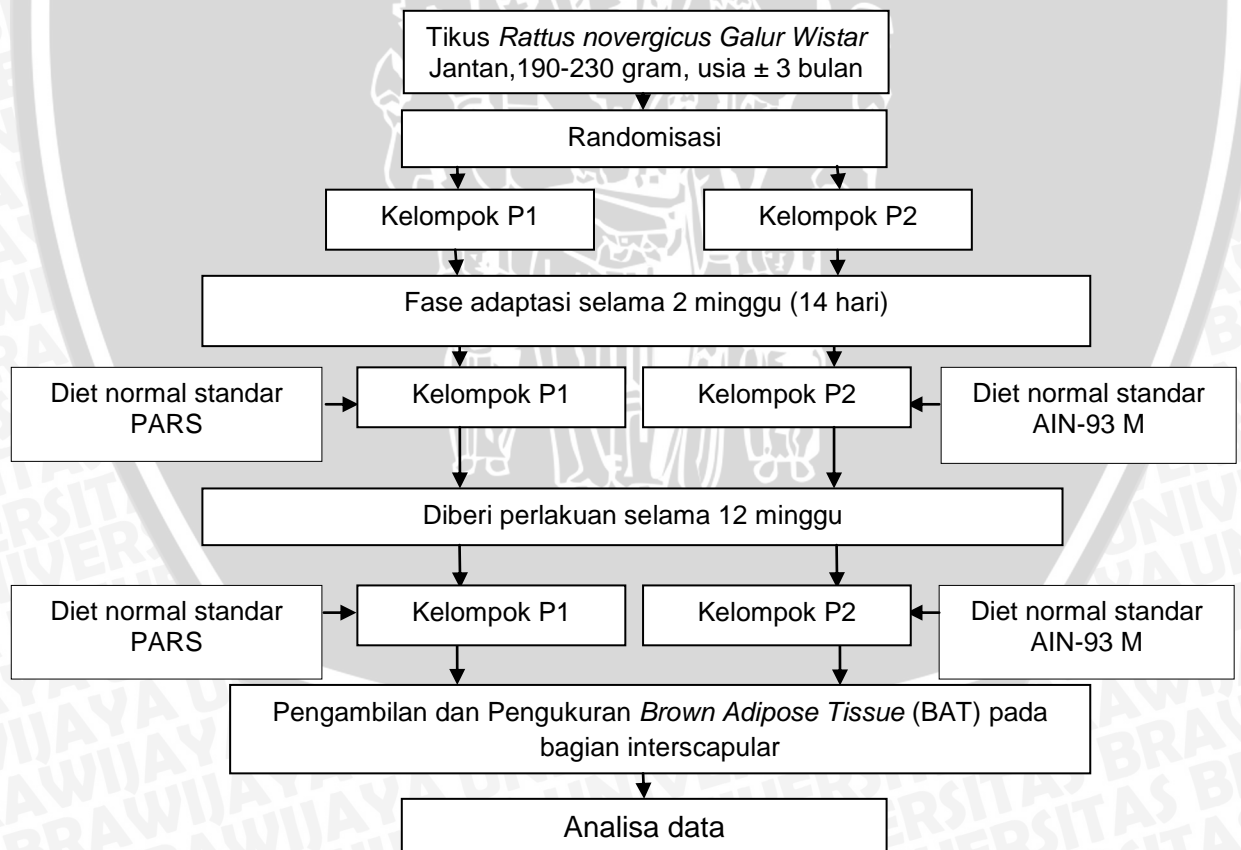
4.6.3 Asupan makan : jumlah rata – rata asupan pakan yang dikonsumsi tikus per hari selama 24 jam. Satuan dari asupan pakan yaitu gram dengan menggunakan skala pengukuran rasio. Asupan pakan per hari yang telah didapatkan kemudian dikonversikan berdasarkan nilai gizinya yaitu dihitung dengan jumlah asupan pakan perhari dibagi dengan jumlah berat pakan pada literatur dikalikan sesuai dengan masing – masing nilai gizi yang terkandung. Satuan konversi dari energi yaitu Kkal, sedangkan

satuan konversi dari protein, lemak, dan karbohidrat yaitu dalam bentuk gram.

4.6.4 Jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) : BAT (*Brown adipose Tissue*) merupakan jaringan lemak berwarna coklat (Lowell dan Flier,1997). Letak Jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) di Interscapular yaitu berada pada bagian punggung tikus. Satuan dari *Brown adipose Tissues* yaitu gram. Skala pengukuran yang digunakan yaitu rasio. Pada penelitian ini jaringan lemak coklat yang hendak dianalisis yaitu berada pada bagian interscapular.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Langkah-langkah dalam pelaksanaan penelitian ini adalah:



Gambar 4.1 Alur penelitian



4.7.2 Proses perlakuan pada tikus Percobaan

- a. Hewan coba (tikus) diperlakukan dengan kandang terpisah, di dalam setiap kandang terdapat tempat makan tikus, tempat minuman, dan sekam. Sekam diganti 3 hari sekali.
- b. Tikus ditimbang berat badannya satu minggu sekali untuk mengetahui perubahan berat badan tikus apakah menurun atau bertambah.
- c. Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus kemudian dikonversi ke dalam nilai gizi.
- d. Sebelum melakukan adaptasi pada kondisi laboratorium. Tikus sudah dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok diet normal standar PARS dan diet normal standar AIN-93M.
- e. Lalu tikus diberikan adaptasi terhadap kondisi laboratorium dan adaptasi pakan selama 14 hari (Pada saat masa adaptasi tikus P1 dan P2 diberikan diet normal standar PAR-S selama 3 hari). Setelah 3 hari tikus diberi diet normal standar AIN – 93 M tanpa vitamin dan mineral mix hingga 4-9 hari pada kelompok P2 dan diet normal standar PAR-S pada kelompok P1.
- f. Pada kelompok P1 diberikan diet normal standar PARS dan kelompok P2 diberikan diet normal standar AIN – 93 M selama total perlakuan 12 minggu.
- g. Setelah 12 minggu, dilakukan pembedahan pada interscapular. Tikus dieuthanasi dengan metode injeksi zat berupa ketamine dan xylazine melalui intravena dengan dosis 0,005 ml per gram berat badan tikus (Cornell Institutional Animal Care and Use Committee, 2011). Kemudian dibedah dan disayat pada bagian *interscapular*, lalu diambil BAT-nya dengan menggunakan pisau bedah kemudian ditimbang untuk menghitung jumlah *Brown Adipose Tissue* (BAT).

4.7.3 Prosedur Pembuatan Diet Normal Standar

4.7.3.1 Diet Normal Standar PAR-S

Berikut ini merupakan langkah – langkah pembuatan pakan diet normal standar PAR-S

- 1) Timbang semua bahan meliputi PAR-S (666,67 gram), tepung terigu (333,33 gram), dan air (900 ml)
- 2) Campur semua bahan dan aduk rata semua bahan
- 3) Bentuk menjadi bulatan, dan timbang pakan
- 4) Timbang pakan untuk tiap ekor tikus
- 5) Pakan siap diberikan pada tikus.

4.7.3.2 Diet Normal Standar AIN-93M

Berikut ini merupakan langkah – langkah pembuatan pakan diet normal standar modifikasi AIN – 93 M

- 1) Timbang semua bahan
- 2) Tempatkan semua bahan (tepung jagung, casein, sukrosa dan vitamin mineral) kecuali gelatin dalam mangkuk mixer
- 3) Tambahkan air sebanyak 50 ml yang sudah ditambahkan 10 tetes pewarna makanan warna hijau ke dalam bahan kering
- 4) Kemudian masukkan minyak kedelai ke dalam bahan kering
- 5) Aduk secara merata
- 6) Sementara adonan merata siapkan larutan gelatin dengan cara campur gelatin dengan air dingin (air kran) sebanyak 130 ml pada panci dan aduk hingga rata kemudian panaskan diatas kompor sambil diaduk dan dituangi air hangat sebanyak 80 ml. Setelah itu, diaduk hingga bewarna jernih
- 7) Campurkan larutan gelatin ke dalam adonan kemudian dimixer hingga merata. Setelah itu diuleni hingga kalis

- 8) Roll adonan kemudian cetak adonan menjadi kotak- kotak kecil
- 9) Diamkan pada suhu ruang selama 10 menit
- 10) Simpan dalam freezer dan siap di berikan pada hewan coba.

4.7.4 Prosedur Pembedahan *Brown Adipose Tissue* (BAT) pada Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar jantan*

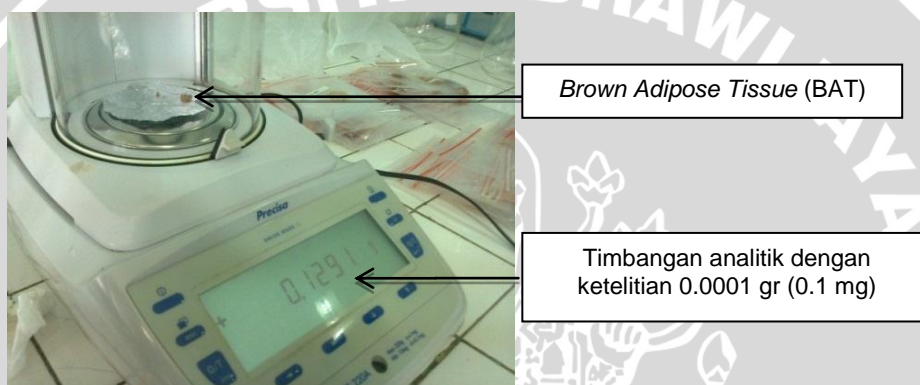
Cara pengambilan *Brown adipose Tissues* yaitu

- 1) Tikus dianestesi dengan menggunakan metode injeksi zat berupa ketamine dan xylazine melalui intravena dengan dosis 0,005 ml per gram berat badan tikus (Cornell Institutional Animal Care and Use Committee, 2011).
- 2) Setelah tikus lemas diletakkan pada penjepit (block holder) (Sirois, 2005 dalam Riesanti *et al.*, 2012)
- 3) Setelah itu diangkat, dan digores bagian bahu/ tengkuk tersebut dengan menggunakan gunting.
- 4) Setengah bagian kulit tersebut digores agak luas hingga bagian dasar terbuka.
- 5) Setelah itu akan terlihat seperti bentuk kupu-kupu. Kupu-kupu tersebut adalah bentuk yang menyatakan *Interscapular Brown Adipose Tissues*.
- 6) *Interscapular Brown Adipose Tissues* tersebut diambil dengan menggunakan alat bedah minor
- 7) Lalu *Interscapular Brown Adipose Tissues* ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

(Casteilla *et al.*, 2012).

4.7.5 Prosedur Perhitungan Jumlah *Brown Adipose Tissue* (BAT) pada Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan

Setelah dilakukan pembedahan *Brown Adipose Tissue* (BAT) pada Tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan, *Brown Adipose Tissue* (BAT) tersebut ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Proses penimbangan jumlah *Brown Adipose Tissue* (BAT) menggunakan timbangan analitik dengan ketelitian 0,0001 gram (0.1 mg) dapat dilihat pada gambar 4.2



Gambar 4.2 Proses penimbangan *Brown Adipose Tissue* (BAT) menggunakan timbangan analitik

4.8. Pengumpulan Data

- 1) Data penimbangan berat badan tikus dilakukan pada awal pertama kali tikus akan dipilih menjadi hewan coba penelitian dan pada setiap satu minggu sekali. Penimbangan berat badan tikus menggunakan timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g
- 2) Data asupan makan setiap hari dihitung dengan menimbang sisa makanan yang diberikan pada hewan coba setiap harinya, menggunakan timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g.

- 3) Data penimbangan jumlah BAT (*Brown Adipose Tissue*) pada tikus yang telah diadaptasi selama 14 hari (dua minggu) dengan diberikan diet normal standar AIN-93 M dan diet normal standar PARS yang kemudian dilanjutkan selama 12 minggu (3 bulan), menggunakan timbangan analitik dengan ketelitian 0.0001 g (0.1 mg).

4.9 Analisa Data

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS (*Statistical Pockage fo Social Science*) for windows versi 16 secara statistik. Apabila data sudah normal maka dianalisis dengan menggunakan uji *independent t-test*, namun apabila data belum normal maka akan dianalisis menggunakan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui adanya perbedaan BAT pada masing-masing kelompok perlakuan (dengan tingkat kepercayaan 95% $\rightarrow \alpha = 0,05$).

