

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental in vivo pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan menggunakan *post test only control group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Pada penelitian ini dilakukan persiapan untuk menghasilkan tikus model DM dengan cara menginjeksikan aloksan 150 mg/kg berat badan secara intraperitoneal.

Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama 7 hari. Hewan coba diambil 24 ekor sebagai sampel dan dibagi dalam 4 kelompok. Kelompok 1 normal (kontrol negatif) tanpa diabet, tanpa perlakuan, diberi minum dan pakan tikus normal; kelompok 2 diabet (kontrol positif), tanpa perlakuan, diberi minum dan pakan tikus normal dan injeksi aloksan; kelompok 3 diabet, diberi minum dan pakan tikus normal serta diberi insulin 3 unit; dan kelompok 4 diabet dengan perlakuan, diberi minum dan pakan tikus normal serta diberi air kelapa muda sebanyak 4 ml/hari selama 14 hari.

Perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok hewan coba adalah sebagai berikut:

K (-) : Tanpa Aloksan

K (+) : Aloksan

P1 : Aloksan + insulin

P2 : Aloksan + air kelapa muda dosis 4 ml/hari selama 14 hari

4.2 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan yang dibeli dari Pusvetma Surabaya.

4.3 Sampel Penelitian

4.3.1 Cara Pengambilan

Subjek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan yang diambil secara acak dari populasi dengan:

Kriteria inklusi:

1. Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur Wistar
2. Didapatkan dari tempat pembiakan yang sama dan pakan yang sama.
3. Berat badan 170-200 gram

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang mati selama pemberian perlakuan
2. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan

4.3.2 Jumlah

Jumlah pengulangan pengukuran ditentukan menggunakan rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \text{ (Supranto, 2000)}$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah repetisi

jika t adalah 4, maka didapatkan r adalah lebih besar dari sama dengan 6.

Jadi, jumlah sampel yang digunakan dalam tiap-tiap kelompok adalah 6 ekor tikus.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis air kelapa muda (*Cocos nucifera*) yakni dosis 4 ml.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar trigliserida tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan.

4.4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

1. Air kelapa muda (*Cocos nucifera*) yang digunakan adalah usia 6 bulan dipanen dari pohon kelapa yang tumbuh di daerah Kabupaten Malang Selatan. Kelapa tersebut dibuka dengan hati-hati dan endosperma cair diambil dan digunakan untuk percobaan. Untuk menyesuaikan kapasitas maksimal lambung tikus (5 ml), maka dosis air kelapa muda yang digunakan pada penelitian ini yakni 4 ml per hari selama 14 hari.

2. Trigliserida adalah salah satu senyawa kimia dalam makanan yang diklasifikasikan sebagai lipid. Kadar trigliserida diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm . Nilai rujukan: 26-145 mg/dL
3. Tikus diabetes diinduksi dengan menggunakan aloksan. Aloksan merupakan derivat pirimidin sederhana yang merusak sel beta pankreas sehingga menurunkan produksi insulin. Aloksan yang diberikan dalam bentuk serbuk yang kemudian dilarutkan dengan NaCl (larutan infuse). Dalam percobaan ini tikus disuntikan aloksan sebanyak 150 mg /kgBB secara intraperitoneal. Tikus dinyatakan diabetes bila kadar gula darah mencapai 200 mg/dL. Pemeriksaan kadar gula darah dilakukan menggunakan alat Accu-Check Glukometer.

4.5 Instrumen Penelitian dan Metode Pengambilan Data

4.5.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengukuran kadar trigliserida serum hewan coba dilakukan di laboratorium Patologi Klinik (PK) Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan kurang lebih selama 6 bulan.

4.5.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

- Kandang tikus

- Tempat minum tikus (24 buah)
- Timbangan tikus
- Timbangan bahan
- Pengukur gds (glukometer)
- Stik gds (1 botol isi 50 stik, jumlah box stik 8)
- Buku dan Bolpoin
- Botol sampel (200 buah)
- Spuit pengambil darah (10cc)
- Spuit injeksi aloksan (1cc)
- Spuit sonde
- Masker
- Handscone
- Gunting bedah (2 buah)
- Jarum pentul
- Steroform
- Penjepit organ
- Vacutainer



4.5.3 Bahan

Bahan – bahan yang diperlukan untuk melakukan penelitian ini antara lain:

- Bahan pakan standar untuk tikus: 58,3 % PARS, 26 % tepung terigu, 19,8 % air
- Air kelapa muda

- Aloksan
- NaCl (larutan infus) untuk melarutkan aloksan
- Air Minum tikus
- Sekam
- Insulin
- Ketamin
- Bahan pemeriksaan kadar trigliserida serum tikus percobaan

4.5.4 Prosedur Penelitian

4.5.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan diperoleh dari Pusvetma Surabaya
2. Sebelum perlakuan tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan lingkungan. Selama masa adaptasi, tikus diberi diet standar dan minum.
3. Pada masa adaptasi, berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi untuk membuktikan bahwa tikus berada dalam kondisi yang baik dan tidak mengalami penurunan berat badan.

4.5.4.2 Induksi Aloksan pada hewan coba

Dosis aloksan ditimbang disesuaikan dengan perhitungan BB tikus masing-masing. Aloksan diinduksikan ke tikus sebagai model diabetes melalui injeksi intraperitoneal dengan *alloxan monohydrate* 150 mg/kg berat badan. *Fasting blood glucose* (FBG) diperiksa pada hari ke 3, 5, 7 setelah perlakuan dengan

menggunakan glukometer. Tujuh hari kemudian, tikus dengan konsentrasi glukosa darah di atas 200 mg/dL dianggap diabetes dan siap untuk digunakan.

4.5.4.3 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Pemeriksaan glukosa darah digunakan untuk mengetahui kadar glukosa darah. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke 3, 5, 7 setelah injeksi aloksan. Sebelum dilakukan pengukuran kadar glukosa darah, hewan coba dipuasakan terlebih dahulu. Pemeriksaan glukosa darah dilakukan dengan menggunakan glukometer. Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah ekor hewan coba. Tikus dengan konsentrasi glukosa darah di atas 200 mg/dL dianggap diabetes dan siap untuk digunakan.

4.5.4.4 Persiapan Air Kelapa Muda

Kelapa muda (*Cocos nucifera*) usia 6 bulan dipanen dari pohon kelapa yang tumbuh di daerah Kabupaten Malang Selatan. Kelapa tersebut dibuka dengan hati-hati dan endosperma cair diambil dan digunakan untuk percobaan. Air kelapa muda diberikan dengan dosis 4 ml/hari (masing-masing tikus) selama 14 hari melalui sonde.

4.5.4.5 Terminasi dan Pengukuran Kadar Trigliserida Serum Tikus

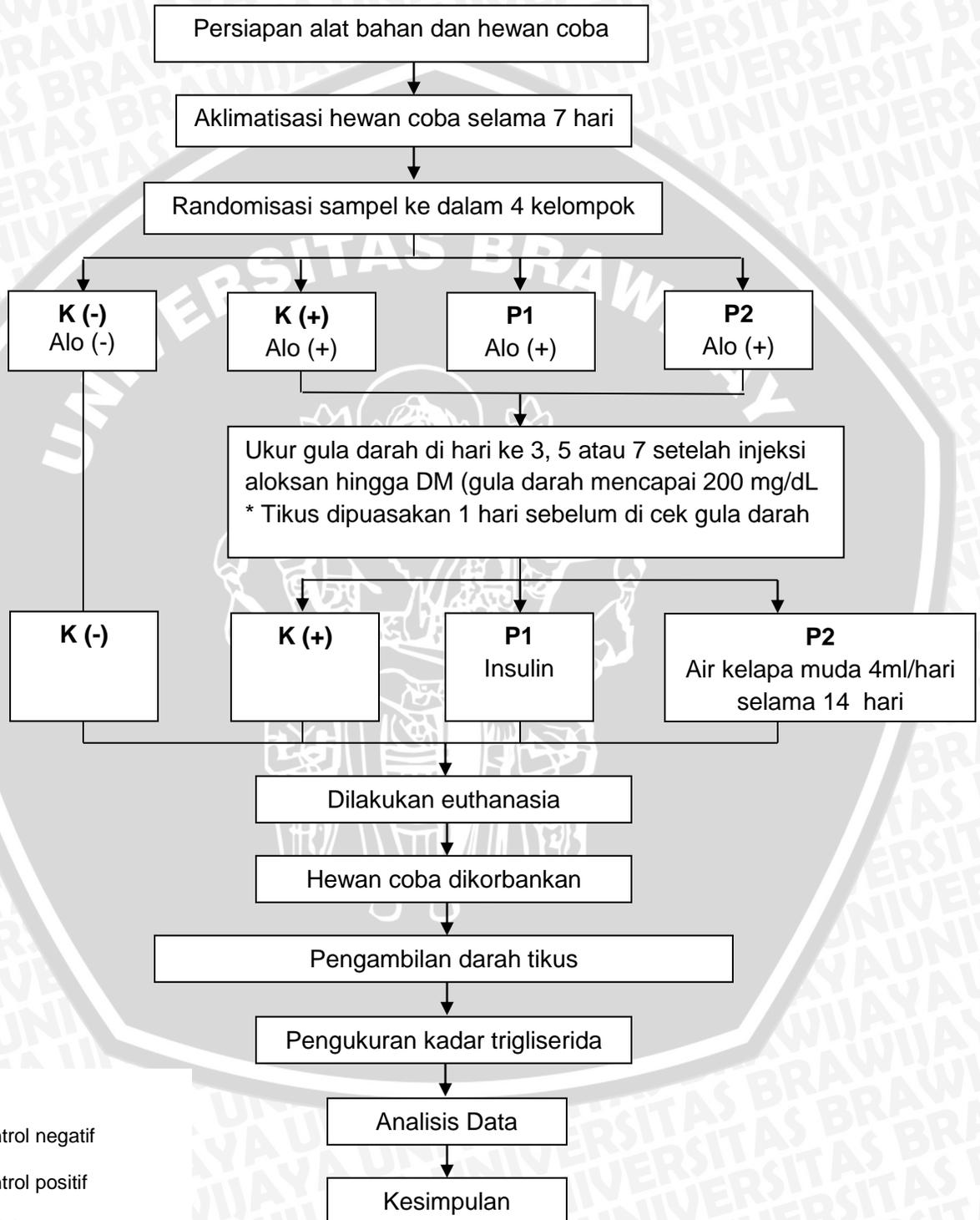
Terminasi tikus dilakukan setelah 2 minggu pemberian air kelapa muda. Pembiusan tikus dilakukan dengan menginjeksikan ketamin sebanyak 40 mg/KgBB. Selanjutnya tikus dibedah dan diambil sampel darahnya sebanyak 5 ml langsung

dari jantung. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung vacutainer kemudian dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi dan serum dipisahkan ke dalam tabung eppendorf. Alat yang digunakan untuk pemeriksaan kadar trigliserida adalah pipet, sentrifuge, autoanalyzer.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.6 Alur Penelitian



Ket:

K(-) : Kontrol negatif

K(+) : Kontrol positif

P1 : Perlakuan 1

P2 : Perlakuan 2

Alo : Aloksan

Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7 Analisis Data

Variabel terikat yang dibandingkan pada penelitian ini adalah kadar trigliserida serum yang berupa data parametrik sehingga pengujiannya harus menggunakan uji komparasi parametrik. Terdapat 4 kelompok yang akan saling dibandingkan pada penelitian ini sehingga analisis datanya dilakukan dengan uji One Way ANOVA. Analisis data dikerjakan dengan menggunakan software SPSS 16 for Windows. Setelah itu dilakukan uji post hoc untuk mengetahui apakah terdapat penurunan trigliserida serum secara bermakna pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan.

