

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Controlled Group Design* pada tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar model DM tipe 2 yang dilakukan di laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada penelitian ini dilakukan *Simple Randomized Sampling* sehingga diharapkan sampel memiliki sifat yang homogen sebelum diberi perlakuan. Beberapa kelompok akan diberikan perlakuan dan akan dilakukan pengukuran pada akhir penelitian, kemudian hasilnya akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama tiga bulan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus* galur wistar berusia 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu:

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kontrol Normal	Pemberian pakan normal
Kontrol Positif	Pemberian pakan tinggi lemak, diinjeksi STZ sebagai model DM tipe 2
Perlakuan I	Pemberian pakan tinggi lemak, diinjeksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50 mg/kg BB
Perlakuan II	Pemberian pakan tinggi lemak, diinjeksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100 mg/kg BB
Perlakuan III	Pemberian pakan tinggi lemak, diinjeksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150 mg/kg BB

Penentuan dosis pada penelitian ini diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Nyamthabad dan Umesh 2014 tentang evaluasi anti diabetes dan ekstrak biji tomat dengan dosis pemberian antara 50-200 mg/kgBB. Untuk dosis terendah digunakan 50 mg/kgBB dan dosis selanjutnya dihitung menggunakan rumus hitung deret (1n, 2n, 3n, dan seterusnya) sehingga dosis selanjutnya adalah 100mg/kgBB dan 150 mg/kgBB.

4.3.1 Perhitungan Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus Indra (1999):

$$n = \frac{(15 + p)}{p}$$

Keterangan:

t : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

p : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok

Jumlah kelompok dalam penelitian ini adalah 5 (lima) kelompok, maka jumlah sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok penelitian adalah:

$$n = \frac{(15 + p)}{p}$$

$$n = \frac{(15 + 5)}{5}$$

$$n = \frac{20}{5}$$

$$n = 4$$

Jumlah sampel untuk kelima kelompok perlakuan adalah jumlah kelompok dikalikan dengan jumlah sampel perlakuan yang dibutuhkan dari tiap kelompok yaitu:

$$5 (\text{jumlah kelompok perlakuan}) \times 4 (\text{jumlah perlakuan}) = 20$$

Jumlah minimal sampel yang dibutuhkan adalah 20 (dua puluh) ekor tikus. Peneliti menambahkan 1 (satu) ekor tikus pada tiap kelompok sebagai cadangan apabila ada yang mati.

4.4 Kriteria Sampel

4.4.1 Kriteria Inklusi

- Tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan.
- Warna bulu putih.
- Usia 6-8 minggu.
- Berat badan 150-200 gram.
- Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi.

4.4.2 Kriteria Eksklusi

Tikus mati selama perlakuan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak kulit tomat (*Solanum lycopersicum*).

4.5.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar LDL pada serum tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah jenis kelamin, usia, berat badan, pakan, dan kondisi lingkungan kandang.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model DM tipe 2 yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar dengan berat badan 150-200 gram yang diinjeksi dengan STZ dengan dosis 30 mg/kgBB. Tikus yang diberi pakan tinggi lemak dapat mengalami resistensi insulin tetapi tidak sampai pada tahap hiperglikemia atau DM. Sementara itu streptozotocin (STZ) banyak digunakan untuk menginjeksi DM *insulin-dependent* dan *noninsulin-dependent*. STZ yang disuntikkan dalam dosis rendah akan merusak sedikit sekresi insulin dan menyerupai DM tipe 2. Maka dari itu, tikus yang digunakan diberi pakan tinggi lemak dan disuntikkan STZ dosis rendah agar menyerupai DM tipe 2 secara alami (Zhang, 2008).

4.6.2 Kadar Serum LDL

Kadar serum LDL diambil dari serum darah tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar yang telah diberi perlakuan selama empat minggu, diukur menggunakan alat spektrofotometer dengan hasil berupa skala interval dalam satuan mg/dl.

4.6.3 Ekstrak Kulit Tomat

Ekstrak kulit tomat adalah hasil ekstraksi kulit tomat yang didapatkan dari tomat yang dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah, kemudian kulitnya dipisahkan dan diletakkan untuk dijemur hingga kering, setelah kering, kulit tomat diblender hingga halus menjadi serbuk.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat Penelitian

4.7.1.1 Alat Pemeliharaan Tikus

- Kandang plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
- Tutup kandang dari anyaman kawat
- Botol air minum tikus
- Rak tempat kandang tikus
- Timbangan neraca digital merk Sartorius Melter (ketelitian 0,1 kg)

4.7.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

- Timbangan
- Gelas ukur
- Loyang
- Mangkok plastik

- Sarung tangan

4.7.1.3 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

- Timbangan
- Blender
- Kompor
- Loyang
- Baskom
- Kertas saring
- Gelas ukur
- Aluminium foil
- Rotary evaporator merk IKA

4.7.1.4 Alat Injeksi STZ

- Spuit disposable merk Terumo 1 ml
- Spuit disposable merk Terumo 3 ml

4.7.1.5 Alat Pengukuran Glukosa Darah Tikus

- Jarum 26g
- Kain
- Alat pengukur glukosa digital merk Easy Touch

4.7.1.6 Alat Pembedahan Tikus

- Gunting bedah
- Jarum pentul
- Strerofoam
- Alkohol 70%

4.7.1.7 Alat Pengambilan Serum Darah Tikus

- Spuit disposable merk Terumo 5ml

- Tabung vacutainer merk OneMed 3ml
- Tabung ependorf

4.7.1.8 Alat Pemeriksaan Kadar LDL Tikus

- Tabung reaksi
- Cuvet
- Alat sentrifugasi merk Hettich Zentrifugen
- Spektrofotometer merk Biosystems

4.7.2 Bahan Penelitian

4.7.2.1 Bahan Pemeliharaan Tikus

- Air minum
- Pakan (normal dan tinggi lemak)
- Sekam

4.7.2.2 Bahan Pakan Normal

- BR 1

4.7.2.3 Bahan Pakan Tinggi Lemak

- BR1 221.75 gram
- Tepung terigu 123.25 gram
- Asam cholat 0.098 gram
- Kolsterol 7.105 gram
- Minyak babi 184,25 gram

4.7.2.4 Bahan Ekstrak Kulit Tomat

- Tomat merah segar
- Etanol
- Aseton

- Aquades

4.7.2.5 Bahan Larutan STZ

- STZ 100 gram
- Buffer sitrat 3 ml
- Aquades

4.7.2.6 Bahan Pemeriksaan Kadar LDL Tikus

- Reagen R1: MOPS (3-morpholinopropane sulfonic acid) buffer: 20.1 mmol/L, pH 6,5; HSDA: 0.96 mmol/L; ascorbate oxidase (Eupenicillium spec., recombinant); $\geq 50 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (horseradish): $\geq 167 \mu\text{kat/L}$; preservative
- Reagen R2: MOPS buffer 20.1 mmol/L, pH 6,8; MgSo₄7H₂O: 8.11 mmol/L; 4-aminoantipyrine: 24,6 mmol/L; cholesterol esterase (Pseudomonas spec.): $\geq 50 \mu\text{kat/L}$; cholesterol oxidase (Brevibacterium spec., recombinant): $\geq 33.3 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (horseradish): $\geq 334 \mu\text{kat/L}$; detergent; preservative

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Sebelum penelitian dimulai, semua tikus diadaptasikan selama satu minggu dan ditimbang beratnya. Tikus diberi pakan normal masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti sekali setiap hari. Penggantian sekam dilakukan setiap

tiga hari sekali, sementara saat sudah diinjeksi STZ dan timbul gejala DM yaitu pengeluaran urin yang banyak, sekam diganti setiap hari.

4.8.2 Pembuatan dan Pemberian Pakan Normal

Pakan normal yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crumble* yang terbuat dari BR1. Bahan dicetak dan dikeringkan. Setiap tikus diberi pakan sebanyak 25 gram yang diisi ulang setiap harinya. Pakan normal diberikan pada semua kelompok pada masa adaptasi, dan pada kelompok kontrol negatif diberikan hingga akhir penelitian.

4.8.3 Pembuatan dan Pemberian Pakan Tinggi Lemak

Pakan tinggi lemak pada penelitian ini terbuat dari BR1, tepung terigu, asam cholat, kolesterol, dan minyak babi. Semua bahan dicampur, dicetak, dan dikeringkan. Setiap tikus diberi pakan sebanyak 25 gram yang diisi ulang setiap harinya. Pakan tinggi lemak diberikan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan mulai minggu kedua hingga akhir penelitian.

4.8.4 Injeksi Larutan STZ

Cara penginjeksian larutan STZ adalah sebagai berikut:

- Tikus diposisikan dengan abdomen menghadap ke arah penyuntik.
- Pada bagian abdomen disemprotkan alkohol 70% untuk desinfeksi.
- Kulit tikus dicubit hingga ke bagian otot.
- Sprit dimasukkan pada bagian abdomen dan akan terasa agak keras bila sudah di bagian intraperitoneal.
- STZ diinjeksikan pada daerah intraperitoneal.

- f. Semprotkan kembali alkohol 70%.

4.8.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Cara mengukur kadar glukosa darah tikus adalah sebagai berikut:

- Tikus dipegang menggunakan kain agar tidak terlalu bergerak.
- Ekor tikus dicelupkan ke air hangat agar vena lebih mudah terlihat.
- Ekor diberi alkohol untuk desinfeksi kemudian ditusuk menggunakan jarum.
- Ekor diurut hingga darah keluar melalui tempat yang ditusuk.
- Darah yang sudah keluar ditempelkan pada stik alat ukur digital kemudial dilihat hasilnya. Apabila kadar gula darah puasanya ≥ 126 mg/dL berarti tikus tersebut positif diabetes melitus.

4.8.6 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Cara ekstraksi kulit tomat adalah sebagai berikut:

- Tomat ditimbang dan dicuci
- Tomat yang sudah dicuci dimasukkan ke dalam dandang yang sudah berisi air kemudian dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah.
- Kulit tomat dikupas dan ditata di loyang, kemudian dijemur hingga kering.
- Setelah kering, kulit tomat dihaluskan menggunakan blender.
- Ekstrak kulit tomat yang sudah menjadi serbuk dicampurkan dengan aceton kemudian disimpan dalam botol kaca yang dibungkus dengan aluminium foil.

- f. Filtrasi dilakukan untuk mengambil cairan kuning dari ekstrak tomat.
- g. Evaporasi dilakukan untuk memisahkan ekstrak kulit tomat dan acetone menggunakan rotary evaporator.
- h. Ekstrak kulit tomat yang sudah jadi dicampur dengan cortina supaya lebih mudah larut dengan lemak.

Ekstrak kulit tomat yang sudah dicampurkan dengan cortina, dimasukkan ke dalam kapsul yang masing-masing berisi 0,5 gram. Setiap tikus mendapat dua kapsul yang diberikan secara per oral sesuai dengan dosis masing-masing setiap hari.

4.8.7 Pengukuran Kadar Serum LDL

Prosedur pengukuran kadar serum LDL adalah sebagai berikut:

- a. Tikus dianestesi dengan cara menginjeksi ketamin sebanyak 0,2 ml (100 mg/ml) melalui intraperitoneal, kemudian ditunggu hingga tidak sadar.
- b. Tikus diposisikan dengan posisi supinasi, keempat ekstremitas ditusukkan menggunakan jarum pentul ke sterofoam.
- c. Darah diambil menggunakan spuit 5 ml secara intrakardial di ventrikel kanan.
- d. Darah yang sudah diambil dipindahkan dengan hati-hati ke tabung vacutainer.
- e. Darah dipindahkan ke tabung setrifugasi dan disentrifugasi dengan minimal 4000 rpm selama 10 menit.
- f. Setelah disentrifugasi serum yang sudah terpisah dicampur dengan reagen agar homogen.

- g. Serum diinkubasi selama 20 menit pada suhu 16-25°C, kemudian dibaca absorpsinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm.

4.9 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah:

- Sisa pakan tikus yang dikumpulkan setiap hari.
- Berat badan tikus yang dilakukan setiap hari kemudian dirata-ratakan setiap kelompok pada setiap minggu.
- Kadar glukosa darah yang dilakukan sebelum penginjeksian STZ dan satu minggu setelah penginjeksian.
- Kadar serum LDL yang diukur pada akhir penelitian menggunakan spektrofotometer.

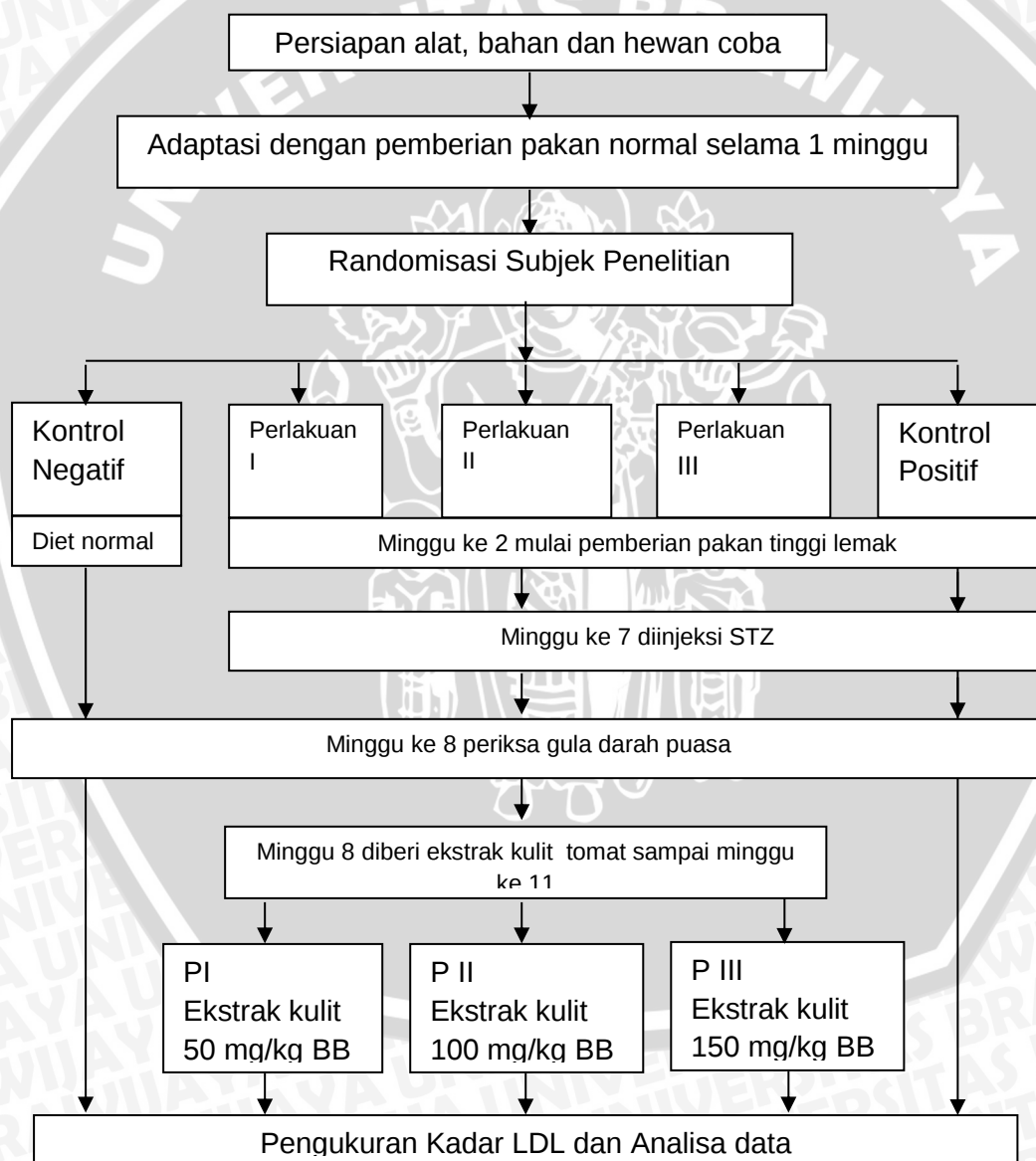
4.10 Analisa Data

Data dari hasil penelitian ini dianalisa dengan menggunakan Program *SPSS for windows Versi 16.0.*, diantaranya:

- Uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas distribusi data.
- Uji Homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
- Analisa komparasi dengan *One Way Anova* jika data berdistribusi normal dan homogen dan menggunakan uji *Kruskal Wallil* jika data tidak berdistribusi normal atau data tidak homogen.

- Uji *Post-hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok- kelompok yang mempunyai perbedaan.
- Uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan terapi ekstrak kulit tomat terhadap kadar LDL.

4.11 Bagian Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian