

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

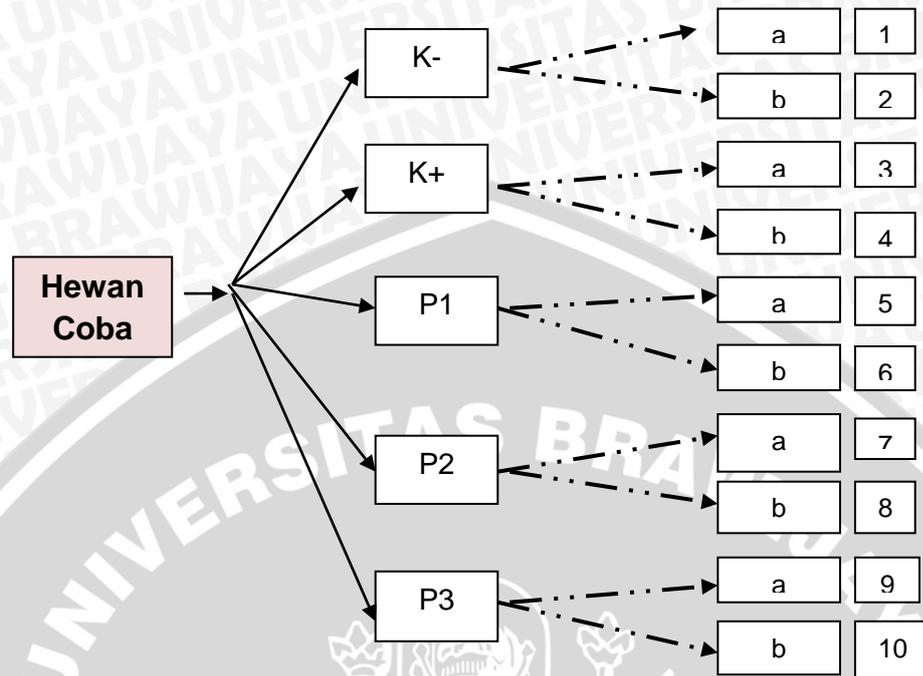
Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experimental: Post Test Only with Control Group Design*. Dengan desain penelitian ini memungkinkan peneliti untuk menguji apakah terdapat suatu hubungan sebab akibat antar variabel. Pemilihan hewan coba untuk pengelompokkan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan tujuan agar karakteristik sampel hampir sama.

Rancangan penelitian ini dibagi menjadi 2 bagian yaitu bagian pertama yang dilakukan pada hewan coba model Diabetes Mellitus yang diberi perlakuan ekstrak *Channa striata* selama 4 hari dan bagian kedua yang dilakukan pada hewan coba model Diabetes Mellitus yang diberi perlakuan ekstrak *Channa striata* selama 8 hari. Perbedaan lama perlakuan dilakukan untuk melihat faktor-faktor yang mempengaruhi kadar Adiponektin dengan lebih jelas. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih dan setiap tahap penelitian subjek yang digunakan berbeda. Pada saat adaptasi yaitu sebelum membuat tikus menjadi model Diabetes Mellitus, tikus diadaptasikan dengan lingkungan kandang dalam ruangan dengan suhu ruang selama 7 hari dengan diet normal.

Tingginya angka kematian (*Mortality rate*) pada tikus yang diberi injeksi STZ yang mencapai 48% dan lama penelitian terhadap tikus model diabetes yang sering kali dilakukan yaitu 4-6 minggu atau 8 minggu atau 24

minggu untuk mempelajari komplikasi kronis pada tikus model diabetes (Wei M *et.al.*, 2003), menjadi landasan dipilihnya rancangan penelitian dengan total observasi pada tikus diabetes selama 4 minggu dengan harapan bahwa tikus diabetes kelompok kontrol positif (K+) dapat bertahan. Pengukuran kadar adiponektin dilakukan pada hari ke-4 dan ke-8 untuk melihat pola kadar adiponektin.

Dalam setiap tahap penelitian dilakukan adaptasi dan kemudian beberapa tikus diambil sebagai sampel kelompok kontrol negative atau kelompok normal. Sedangkan yang lain diberi injeksi STZ dosis tunggal 60 mg yang kemudian dipantau selama 3 minggu untuk Kadar Glukosa Darahnya. Bagi tikus yang Kadar Glukosa Darahnya $>300\text{mg/dl}$ dan tetap stabil selama 3 minggu dikelompokkan menjadi satu dan dilakukan randomisasi untuk kemudian dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Sehingga terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok K-(tikus normal), K+ (Tikus model DM tanpa perlakuan), P1 (Tikus model DM dengan perlakuan 1), P2 (Tikus model DM dengan perlakuan 2) dan P3 (Tikus model DM dengan perlakuan 3).



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

K-: Kelompok hewan model sehat (Normal) tanpa perlakuan

K+: Kelompok hewan model diabetes tanpa perlakuan

P1: Kelompok hewan model diabetes dengan perlakuan pemberian
ECS dosis 3 ml/kg berat badan

P2: Kelompok hewan model diabetes dengan perlakuan pemberian
ECS dosis 6 ml/kg berat badan

P3: Kelompok hewan model diabetes dengan perlakuan pemberian
ECS dosis 9 ml/kg berat badan

a : Kelompok hewan model yang diambil darahnya setelah 4 hari Perlakuan
(Penelitian Bagian Pertama)

- b : Kelompok hewan model yang diambil darahnya setelah 8 hari Perlakuan
(Penelitian Bagian Kedua)

4.2. Populasi dan Sampel

Subyek awal penelitian ini adalah tikus putih *Rattus novergicus strain wistar* yang diambil secara random, dengan kriteria sebagai berikut :

1. Jenis kelamin jantan, aktif dan mau makan.
2. Usia 8 - 12 minggu
3. Berat badan 150-200 gram
4. Berbulu putih mengkilat dan lebat (tidak rontok)
5. Ditempatkan pada lingkungan laboratorium

Setelah adaptasi dilakukan pengambilan sampel darah dari bagian ekor untuk dilakukan pengukuran kadar gula darah, lalu dilakukan pembagian kelompok perlakuan yaitu:

1. Tikus normal yang kadar glukosa darah puasa 150-200 mg/dl digunakan sebagai kontrol negatif (K-). Pemilihan sampel dilakukan secara acak.
2. Tikus putih yang kadar glukosa darah puasa 150-200 mg/dl dan tidak termasuk kontrol negatif, dilakukan injeksi STZ dosis tunggal. Setiap 3 hari selama 3 minggu, dilakukan pengukuran kadar gula darah untuk memantau stabilitas kadar gula darahnya. Tikus putih dengan kadar glukosa darah >300 mg/dL dan kadar gula darah tetap stabil (>300 mg/dL) selama 3 minggu digunakan sebagai kelompok kontrol positif

(K+) dan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3). Pemilihan sampel dilakukan secara random atau acak.

Sedangkan kriteria eksklusi dari sampel yaitu apabila tikus mati selama penelitian dan tikus yang kadar gula darahnya tidak menunjukkan gejala *diabetes mellitus* (glukosa darah >300 mg/dL) untuk kelompok K+, P1, P2, P3.

4.2.1. Estimasi Besar Subyek Penelitian

Dalam setiap bagian penelitian ini, tikus dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dalam setiap tahapnya. Dan karena penelitian ini dilakukan secara 2 bagian terpisah sehingga terdapat 10 perlakuan. Dan untuk menentukan besaran sampel maka digunakanlah rumusan sebagai berikut:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15 \quad r: \text{jumlah minimal tikus}$$

$$(10 - 1)(r - 1) \geq 15 \quad t: \text{banyak perlakuan}$$

$$9(r - 1) \geq 15$$

$$r \geq 2,67$$

$$r = 3$$

Jadi, jumlah minimal tikus untuk masing-masing perlakuan adalah 3 ekor. Jumlah subyek penelitian minimal adalah 10×3 ekor tikus = 30 ekor tikus. Untuk penelitian ditambah satu kali pengulangan, menjadi 4 kali, jadi jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini 4×10 kelompok = 40 ekor.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Pemberian ekstrak *Channa striata* dosis 3 ml, 6 ml, dan 9 ml/kgBB pada hewan model Diabetes Mellitus diberikan secara enteral dan waktu pemberian selama 4 hari dan 8 hari.

4.3.2. Variabel Terikat

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

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di 3 tempat, yaitu Laboratorium Farmakologi FKUB untuk perawatan tikus dan pemberian perlakuan, sedangkan untuk analisis serum Adiponektin akan dilaksanakan di Laboratorium Fa'al FKUB. Dan juga menggunakan Laboratorium Poliklinik Universitas Brawijaya untuk pengukuran kadar Gula Darah serum. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2013 s/d Juli 2013.

4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1. Bahan Makanan Tikus

Makanan yang diberikan pada hewan model kelompok kontrol negatif dan kontrol positif, yang dimodifikasi dari *Confeed PAR-S*, tepung terigu dan air. *Comfeed PAR-S* yaitu air 12 %, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1%, Phospor 0,9%, antibiotika 5,94% sebanyak 16.14 gram Tepung terigu (23,53%) sebanyak 7,17 gram Air (23,53%) sebanyak 7,17 gram.

4.5.2. Alat yang Digunakan

Kandang tikus, timbangan digital, pengukur kadar glukosa darah, *stomach cannula*, spuit injeksi, pita/penggaris, kamera digital *Casio Exilim 12.1 pixel*, pisau bedah, gunting ujung runcing, microtom, pin, refrigerator, *Chromatography multicheck* (Nesco), *microplate reader* (ELISA reader), dan *Autoanalyzer Biosystem A15*.

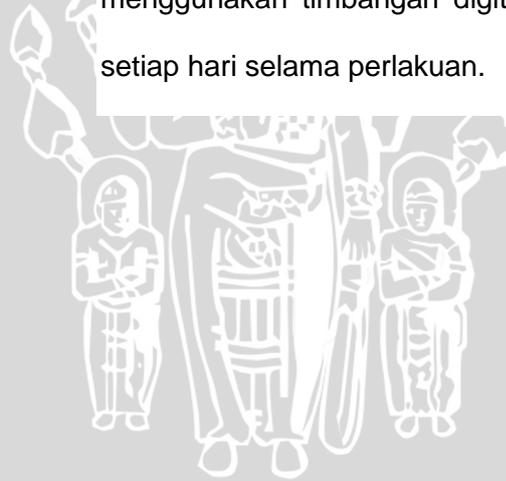
4.5.3. Bahan yang Digunakan

tikus *Rattus norvegicus* jantan strain *Wistar*, pakan standard, aquades, ekstrak ikan gabus (*Channa striata*), bahan anestesi, serum darah tikus, Reagen Griess, STZ, ELISA-Kit.

4.6. Definisi Operasional Variabel

Hewan model DM	:	<i>Rattus norvegicus</i> jenis Wistar jantan yang memiliki kadar glukosa darah sewaktu >300 mg/dL bertahan selama 4 minggu, sebagai kompensasi induksi STZ 60 mg/kg berat badan.
Ekstrak ikan gabus (<i>Channa striata</i>)	:	Cairan yang didapat dari hasil ekstraksi daging <i>Channa striata</i> dalam satuan ml, dengan prinsip dasarnya adalah pengeluaran protein plasma (sarkoplasma) dari jaringan ikan.

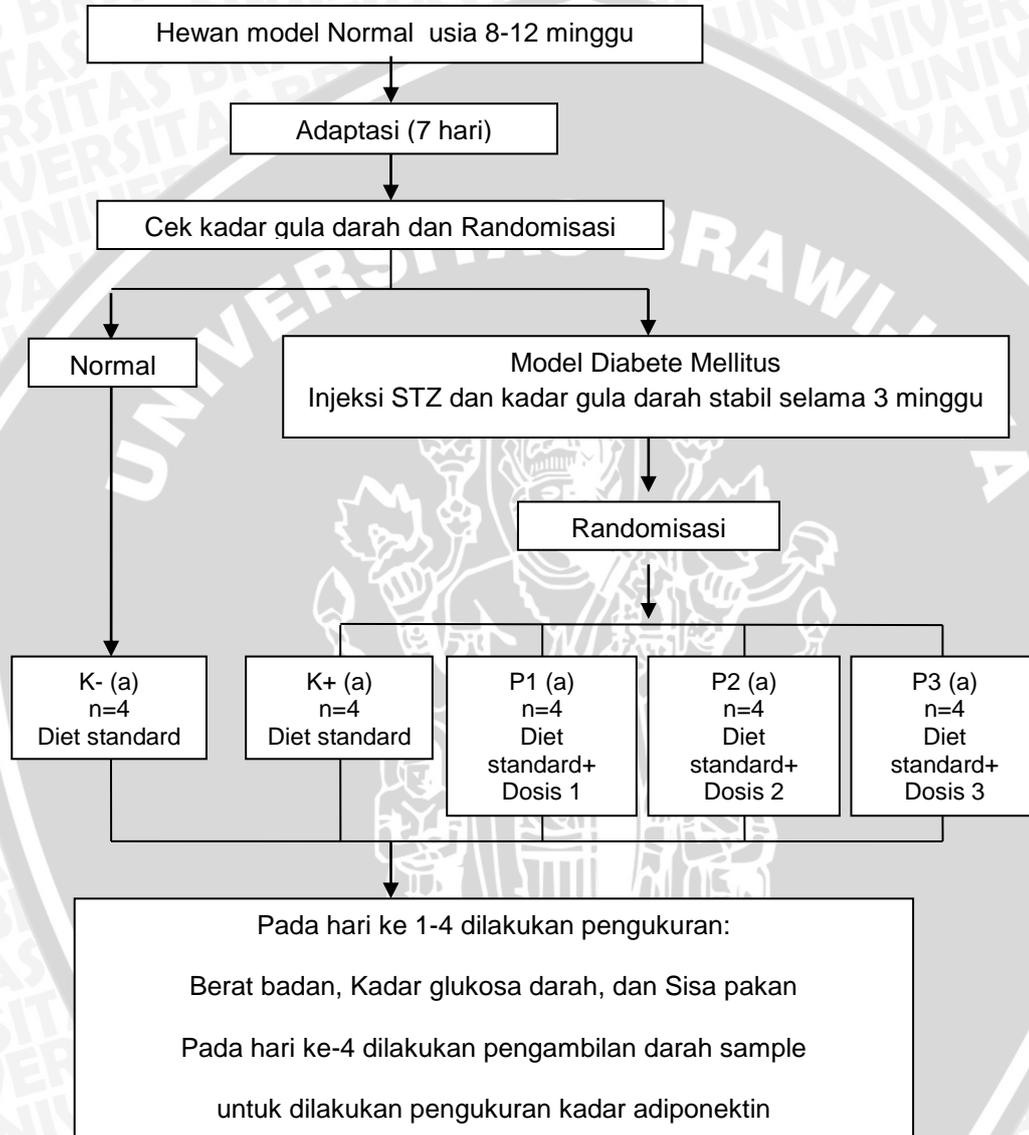
- Adiponektin : Sebuah turunan plasma protein *adipocyte* yang telah terbukti memiliki peran penting dalam pengaturan asam lemak dan metabolisme glukosa.
- Kadar glukosa darah : Hasil pengukuran kadar glukosa dalam darah vena diambil dari ekor tikus diukur menggunakan *chromatography multicheck* (Nesco), dan dalam serum yang diambil dari jantung tikus diukur menggunakan metode *autoanalyzer Biosystem A15* dalam satuan mg/dl.
- Berat Badan : Hasil penimbangan berat badan tikus menggunakan timbangan digital, yang dilakukan setiap hari selama perlakuan.



4.7. Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1. Prosedur Penelitian

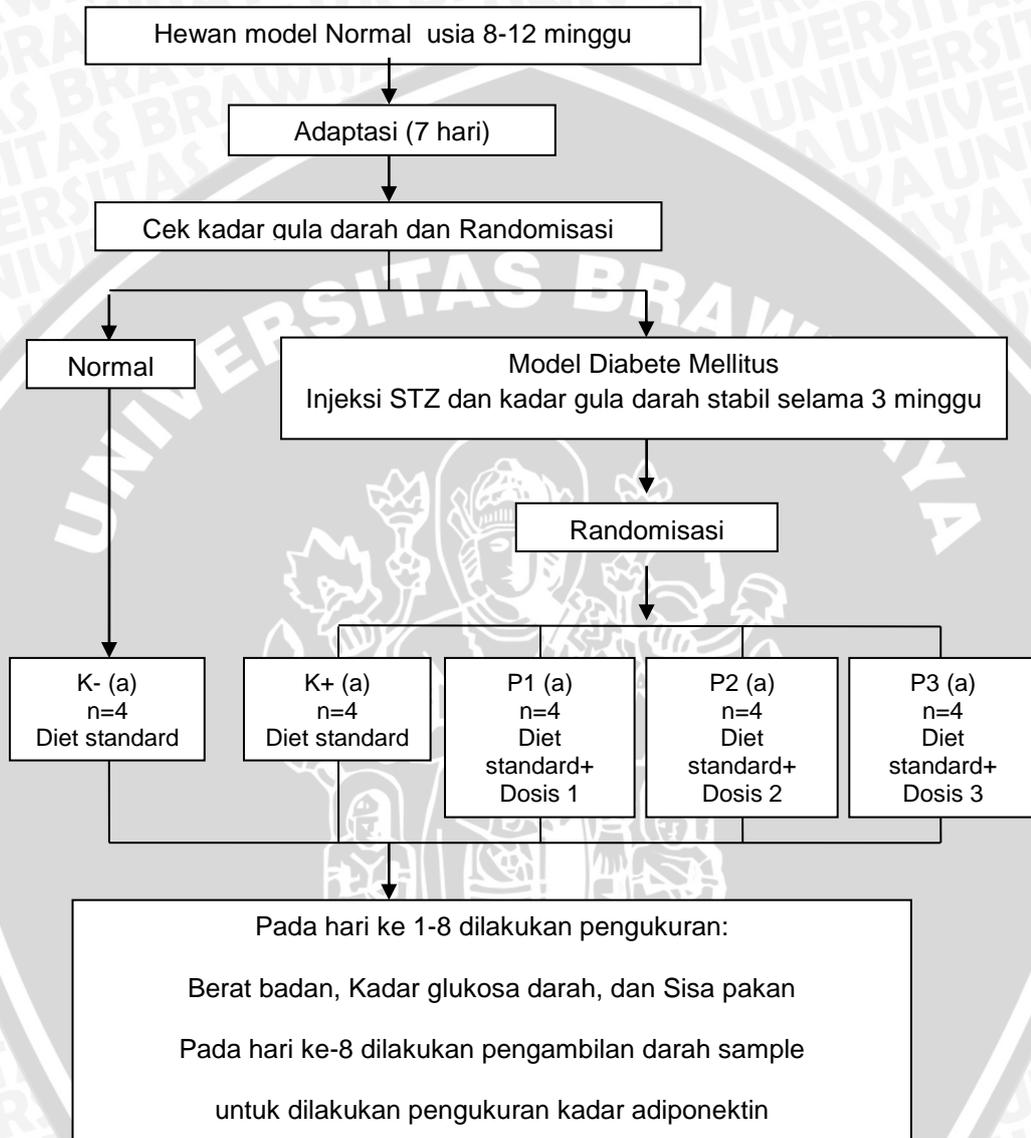
4.7.1.1. Prosedur Penelitian Bagian Pertama



Gambar 4.2 Alur Penelitian Bagian Pertama

1. Tikus ditimbang berat badannya dan dipilih 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 standart untuk pengontrolan kondisi tikus.
3. Randomisasi hewan model. Dilakukan randomisasi untuk menentukan kelompok kontrol negatif atau normal dan kelompok hewan model yang akan diinjeksi STZ dosis tunggal 60 mg.
4. Setelah 3 hari/72 jam pemberian STZ lalu dilakukan pengukuran kadar glukosa darah melalui ekor dan terus dilakukan pemantauan setiap 3 hari selama 3 minggu, dan apabila kadar gula darah tetap stabil ($>300\text{mg/dl}$) maka akan dikelompokkan menjadi kelompok hewan model DM.
5. Pada kelompok hewan model DM dilakukan pembagian perlakuan pada kelompok K+ dan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3).
6. Penempatan subjek penelitian dalam kandang terpisah yang dalam 1 kandang hanya berisi 1 tikus, dilakukan pengukuran terhadap sisa konsumsi pakan dan berat badan untuk setiap harinya sedangkan untuk pengukuran kadar glukosa darah untuk tiap 3 hari selama perlakuan.
7. Pada hari ke 4 (untuk penelitian bagian 1) dan pada hari ke 8 (untuk penelitian bagian 2) setelah diberi perlakuan, hewan model akan dikorbankan dan diambil serum darah untuk kepentingan penelitian.

4.7.1.2. Prosedur penelitian Bagian Kedua



Gambar 4.3 Alur Penelitian Bagian Kedua

4.7.1.3. Pemeliharaan Tikus

Pemeliharaan tikus dilakukan pada minggu pertama dengan diet standar untuk mengontrol kondisi tikus. Tikus di pelihara dalam ruangan

khusus dan diberi diet standar dan minum secara langsung dengan selang yang khusus secara terpisah di dalam masing-masing kandang.

4.7.1.4. Pemberian Streptozotosin (STZ)

Tikus dipuasakan selama 20 jam sebelum dibuat menjadi model Diabetes Melitus secara induksi menggunakan STZ dengan dosis tunggal yaitu 60 mg/kg BB diinjeksikan 1 kali dengan cara intraperitoneal. Kemudian diaklimatisasi selama 1 minggu dan diberi diet standard. Sebelum di Injeksi 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).

4.7.1.5. Ekstrak Ikan Gabus (*Channa striata*)

Prosedur cara ekstraksi ikan gabus (*Channa striata*) yaitu :

1. Pilih ikan dengan berat 300-400 gram/ekor dalam keadaan hidup.
2. Matikan dengan cara dipukul di bagian tengkuk (*oblongata*) harus langsung pingsan dan tidak bergerak, potong di dua urat lalu dilepaskan dari kepalanya dengan mengirisnya mulai dari bagian bawah insang ke atas, kiri dan kanan.
3. Bersihkan dari sisik, sirip, isi perut dan saluran cerna. Dicuci sampai bersih.
4. Dipotong melintang dengan ketebalan $\frac{1}{2}$ -1 cm.

5. Masukkan dalam ekstraktor dengan suhu $70^{\circ}\pm 2.5^{\circ}$ C. Waktu $\frac{1}{2}$ jam pertama ekstrak dibuang, setelah itu baru ditampung. Untuk 5 kg ikan maksimal penampungan ekstrak 2 jam (Agus, 2001).

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak ikan gabus yang sudah kemasan dan diperoleh dari hasil ekstraksi yang dilakukan di poltekkes malang.

4.7.1.6. Dosis Ekstrak *Channa striata* yang Digunakan

Penggunaan dosis sesuai data empiris secara klinis di Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang. Sejak tahun 1999 pemberian ekstrak *Channa striata* telah diberikan kepada pasien dengan indikasi hipoalbumin. Dosis 150 cc/hari dapat meningkatkan kadar albumin pasien.

Perhitungan dosis dilakukan dengan membuat homogen beberapa komponen seperti rata-rata berat badan manusia dan tikus.

Perhitungannya adalah:

- Berdasarkan Depkes (2010) rata-rata berat badan manusia dewasa di Indonesia = 50 kg
- Rata-rata berat badan tikus = 200 g = 0,2 kg
- Standar pemberian ekstrak ikan gabus = 150 ml/hari

Dosis pada tikus:

$$\frac{\text{Berat rata – rata tikus}}{\text{Berat rata – rata manusia}} \times \text{standar pemberian ekstrak ikan gabus}$$

$$\text{Dosis pada tikus} = \frac{0,2}{50} \times 150 = 0,6 \text{ ml}/200\text{gBB}$$

Dosis pada tikus = 0,6 ml/200gBB ~ 3 ml/kgBB

Penelitian ini menggunakan tiga *dosis* ekstrak ikan gabus yang berbeda, yaitu dengan menaikkan *dosis* efektif dengan *deret hitung*, maka diperoleh *dosis* sebagai berikut:

Dosis 1 = 3 ml/kgBB

Dosis 2 = 2 x 3 ml/kgBB = 6 ml/kgBB

Dosis 3 = 3 x 3 ml/kgBB = 9 ml/kgBB

4.7.1.7. Pengukuran Konsumsi Pakan perhari, Berat Badan, Kadar Glukosa Darah dan Kadar Albumin Serum

1. Perhitungan terhadap konsumsi pakan perhari dilakukan dengan menimbang berat awal dan berat akhir pakan. Hasil perhitungan tersebut selanjutnya akan dikonversikan dalam nilai gizi.
2. 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*).
3. Kadar glukosa darah diukur menggunakan metode *Autoanalyzer Biosystem A15* pada hari ke 4 dan ke 8. Kadar glukosa darah sebelum tikus dikorbankan diukur dengan metode *chromatography multicheck* (Nesco), diukur pada awal pemeliharaan, selama minggu pasca induksi STZ dan selama pemberian perlakuan.

4.7.1.8. Pengukuran Adiponektin Serum

Metode pengukuran kadar Adiponektin plasma menggunakan metode ELISA (*human adiponektin ELISA kit-cat 376405*) dengan alat *microplate reader 530*.

4.8. Analisa Data

Pada uji perbandingan mean variabel terukur antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif dengan ketiga kelompok perlakuan yang lain, dalam teknik analisis data akan digunakan uji *Anova One Way*. Bila uji ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak, berarti ada perbedaan yang bermakna antara mean variabel terukur pada kelima kelompok sampel tersebut.

Sebelum melakukan uji *Anova One Way*, maka dilakukan uji homogenitas dan uji normalitas dan apabila data homogen dan normal maka dilanjutkan bisa dilanjutkan dengan *Anova One Way*. Akan tetapi apabila data tidak homogen atau tidak normal maka akan dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*.

Dalam penelitian ini uji *Anova One Way* digunakan untuk membandingkan mean variabel respon antara kelompok kontrol negatif (tikus normal), kelompok kontrol positif (tikus DM), kelompok P1 (tikus DM + ECS dosis 1), kelompok P2 (tikus DM + ECS dosis 2), dan kelompok P3 (tikus DM + ECS dosis 3). Setelah itu dilakukan uji post hoc dan dilakukan uji korelasi pearson dan regresi linear.

Hal ini untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel respon dan membuktikan hipotesis penelitian. Pengaruh variable bebas terhadap variable terikat akan dianalisis dengan menggunakan analisis

regresi linier. Penelitian dianggap signifikan jika $p \leq 0,005$, jika terdapat perbedaan terhadap kelompok bermakna.

Semua hasil uji akan dikomputerisasi dengan program SPSS for windows 16.

