

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Pada penelitian ini, data diambil hanya pada akhir penelitian setelah perlakuan, dimana dibandingkan hasilnya pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, serta kelompok perlakuan.

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang dipelihara di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan tersebut dipilih untuk subjek penelitian karena memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia. Selain itu, hewan tersebut mudah didapatkan dan ditangani, serta dengan tubuhnya yang relatif kecil diharapkan pengambilan data lebih akurat. Sampel dipilih dengan cara *random sampling*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang dipilih adalah dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusinya adalah:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar
- b. Jantan, karena tikus betina memiliki hormon estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak maupun kolesterol

- c. Berat badan 150-200 gram
- d. Usia 6-8 minggu
- e. Kondisi sehat (aktif bergerak, tidak ada kelainan anatomis)
- f. Memiliki bulu putih dan bersih

Kriteria eksklusinya adalah:

- a. Tikus putih yang mati selama penelitian berlangsung

Pada penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif : Pemberian diet normal
2. Kelompok kontrol positif : Pemberian diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ, sebagai model DM tipe 2
3. Kelompok perlakuan I : Pemberian diet tinggi lemak dan tikus diinjeksi STZ dan diberi vitamin A dengan dosis 50 mg/kgBB
4. Kelompok perlakuan II : Pemberian diet tinggi lemak dan tikus diinjeksi STZ dan diberi vitamin A dengan dosis 100 mg/kgBB
5. Kelompok perlakuan III : Pemberian diet tinggi lemak dan tikus diinjeksi STZ dan diberi vitamin A dengan dosis 150 mg/kgBB

#### 4.2.1 Jumlah Sampel

Menurut Indra (1999), untuk penelitian eksperimental dapat dirumuskan sebagai berikut:

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

Keterangan:

$n$  = jumlah replikasi/pengulangan tiap kelompok perlakuan

$p$  = jumlah kelompok perlakuan

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

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

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

$$n = 4$$

Jumlah sampel yang digunakan untuk sebelas kelompok perlakuan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{jumlah kelompok perlakuan} \times \text{jumlah replikasi} = \text{jumlah sampel}$$

$$5 \times 4 = 20$$

Dari hasil tersebut, didapatkan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 20 (dua puluh) ekor tikus.

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 3 bulan, yaitu bulan Agustus sampai dengan Oktober 2015.

- a. Pemeliharaan dan perawatan tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- b. Pengukuran kadar serum insulin dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik dan Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

- c. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

#### 4.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas : suplemen vitamin A
- b. Variabel Terikat : indeks sensitivitas insulin
- c. Variabel Kendali : berat badan, usia, jenis kelamin, pakan hewan, dan kondisi lingkungan kandang hewan

#### 4.5 Definisi Operasional

##### 4.5.1 Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Tikus model diabetes melitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dengan berat badan dengan kisaran 150-200 gram yang diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi/diinjeksi streptozotocin (STZ) dengan dosis rendah 30 mg/kgBB. Pada beberapa penelitian melaporkan bahwa STZ bersifat diabetogenik, hingga akhirnya STZ telah menjadi satu agen kimia untuk injeksi diabetes pada hewan percobaan, dimana fungsi STZ itu sendiri adalah sebagai inhibitor pada sintesis DNA di sel bakteri dan mamalia (Eleazu *et al.*, 2013). STZ bersifat sitotoksik dimana dapat menembus sel  $\beta$  Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Kerja STZ intraseluler menghasikan perubahan pada DNA sel  $\beta$  pankreas (Nugroho, 2006). Diagnosa diabetes melitus diukur dengan glukosa darah puasa  $\geq 126$  mg/dl (PERKENI,2015).

##### 4.5.2 Kadar Serum Insulin

Kadar serum insulin adalah kadar insulin yang diambil dari serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang telah diberi perlakuan

selama 10 minggu diukur dengan menggunakan metode *immunoassay*, yaitu ELISA (*Enzim-Linked Immunosorbent Assay*) dengan hasil yang didapat berupa skala interval dalam satuan  $\mu\text{IU}$ .

#### 4.5.3 Indeks Sensitivitas Insulin

Indeks sensitivitas insulin dapat diukur dengan QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check*). Indeks tersebut didasarkan pada rumus matematika serta fungsi logaritmik dari kadar insulin dan kadar gula darah puasa pada individu yang diukur sensitivitas insulinnya (Katz *et al.*, 2000).

#### 4.5.4 Dosis Suplemen Vitamin A

Suplemen vitamin A merupakan vitamin A dalam bentuk tablet dengan merk dagang IPI yang kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk lalu dimasukkan dalam kertas obat dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150 mg/kgBB.

Penentuan dosis vitamin A diadaptasi dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Nyamthabad dan Umesh (2014) tentang evaluasi ekstrak biji tomat sebagai antidiabetes dengan menggunakan dosis 50-200 mg/kgBB, dimana di dalam tomat juga mengandung vitamin A. Hasil yang signifikan ditunjukkan pada dosis minimal 50 mg/kgBB, sedangkan untuk dosis lainnya didasarkan pada deret bilangan  $1n$ ,  $2n$ ,  $3n$ , sehingga pada penelitian ini menggunakan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150 mg/kgBB, dengan pengukuran rata-rata berat badan tikus 300 gram (0,3 kg), didapatkan dosis masing-masing kelompok 15 mg, 30 mg, dan 45 mg. Peneliti lain menyatakan bahwa dengan pemberian vitamin A 100.000 IU (30 mg) dan 250.000 IU (75 mg) pada hari alternatif selama lima hari pada tikus menghasilkan penurunan pada *in vitro* peroksidasi lipid pada jaringan (Kantha dan Krishnamurthy, 1977; Pokrovsky *et al.*, 1974). Vitamin A

dengan dosis tinggi dapat meningkatkan potensi antioksidan dari jaringan, namun konsumsi vitamin A secara berlebihan dapat menyebabkan efek toksik.

#### **4.6 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.6.1 Bahan dan Alat Pemeliharaan Hewan Coba**

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang digunakan sebanyak 48 ekor. Hewan tersebut dipelihara di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB, di dalam kandang berupa bak plastik 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang yang terbuat dari kawat., dimana dalam satu bak digunakan untuk satu ekor tikus. Alat dan bahan lain yang dibutuhkan adalah botol air untuk minum beserta air minumnya, bahan pakan, timbangan “Sartorius melter”, baskom serba guna (untuk alat bantu penimbangan berat badan, dll), *handscoon* dan masker, serta sekam untuk kandang tikus.

##### **4.6.2 Bahan dan Alat Diet Normal**

Bahan untuk membuat diet normal adalah BR1. Alat yang digunakan adalah timbangan, mangkok plastik, gelas ukur, loyang, dan sarung tangan.

##### **4.6.3 Bahan dan Alat Diet Tinggi Lemak**

Bahan yang digunakan untuk membuat pakan diet tinggi lemak adalah BR1 221,75 gram, tepung terigu 123,25 gram, asam kolat 0,098 gram, kolesterol 7,105 gram, dan minyak babi 184,25 gram (Handayani dkk., 2009). Alat yang digunakan timbangan, mangkok plastik, gelas ukur, loyang, dan sarung tangan.

##### **4.6.4 Bahan dan Alat Pembuatan Sediaan Vitamin A**

Bahan yang digunakan adalah tablet vitamin A merk IPI 6000 IU (1,8 mg). Dan alat yang digunakan adalah blender kering, kertas obat, dan cawan petri.

#### 4.6.5 Bahan dan Alat Pembuatan Larutan dan Injeksi Streptozotocin (STZ)

Bahan yang digunakan untuk pembuatan STZ adalah Streptozotocin (STZ) 100 gram, aquades, dan buffer sitrat 3 ml. Alat yang digunakan adalah *disposable spuit* merk Terumo 1 ml dan 3 ml.

#### 4.6.6 Bahan dan Alat Pengukuran Glukosa Darah Tikus

Alat dan bahan yang digunakan untuk mengukur glukosa darah tikus adalah jarum 26 g, alat *Glucose Blood Analyzer* merk *Easy Touch*, *alcohol swab*, serbet, dan darah kapiler dari ekor tikus.

#### 4.6.7 Bahan dan Alat Pengambilan Serum Darah Tikus

Alat yang digunakan untuk pengambilan serum darah tikus adalah *disposable spuit* merk Terumo 5 ml, tabung *vacutainer* merk OneMed 3 ml, dan tabung *ependrof* untuk penyimpanan serum.

#### 4.6.8 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus

Alat yang digunakan untuk pembedahan tikus adalah gunting bedah, pinset, cawan petri, papan bedah, pins/jarum pentul, alkohol 70% (spray), *beaker glass*, dan kapas. Bahan yang digunakan adalah NaCl 0,9%, formalin 10%. Pembiusan dilakukan dengan *disposable spuit* 1 ml dan ketamine dosis 0,2 cc.

#### 4.6.9 Bahan dan Alat Pemeriksaan Kadar Insulin Tikus

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan kadar insulin adalah Elisa kit Rat Insulin "RayBio" (*microplate* 98 well, mikropipet ukuran 0,5-10  $\mu$ L dan 100-1000  $\mu$ L (Accura), *white tip*, *blue tip*). Alat yang digunakan adalah *Micro plate reader*.

## **4.7 Metode Pengumpulan Data**

### **4.7.1 Prosedur Penelitian**

#### **4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba**

Pada penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Sebelum penelitian dimulai, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu dengan penimbangan berat badan. Pada masa adaptasi, tikus diberi pakan normal masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti satu kali setiap harinya. Penggantian sekam dilakukan setiap tiga kali dalam seminggu, sedangkan saat setelah diinjeksi STZ serta tikus sudah mulai ada tanda klinis DM, yaitu pengeluaran urin yang banyak, maka penggantian sekam dilakukan setiap dua hari sekali.

#### **4.7.1.2 Pembuatan dan Pemberian Diet Normal**

Diet normal sebagai pakan standaryang digunakan dalam penelitian adalah *crumble* yang dibuat dengan mencampurkan tepung terigu, dicetak lalu dikeringkan. Setiap harinya satu ekor diberikan sekitar 25 gram diet normal, 1 kali dalam sehari dengan meletakkan pakan di dalam tempat makan yang diletakkan di dalam kandang tikus. Hanya saat masa adaptasi semua tikus diberikan diet normal ini, sedangkan untuk memulai perlakuan, diet normal hanya diberikan pada kontrol negatif.

#### **4.7.1.3 Pembuatan dan Pemberian Diet Tinggi Lemak**

Pembuatan diet tinggi lemak dengan mencampurkan semua bahan diet tinggi lemak, dicetak, lalu dikeringkan. Setiap harinya satu ekor tikus diberikan sebanyak 25 gram diet tinggi lemak, 1 kali dalam sehari dengan meletakkan pakan di dalam tempat makan yang diletakkan di dalam kandang

tikus. Pemberian diet tinggi lemak pada kelompok perlakuan tikus dilakukan mulai minggu kedua hingga akhir penelitian pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.

#### 4.7.1.4 Pembuatan dan Injeksi Larutan STZ pada Tikus

Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan ke dalam 3 ml buffer sitrat pH 4.5, lalu di *vortex* hingga homogen, sehingga dihasilkan larutan STZ stok. Larutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C (Handayani dkk., 2009).

Prosedur penginjeksian STZ ke tikus adalah dengan cara memposisikan tikus dengan abdomen menghadap ke arah penyuntik. Pada abdomen didesinfeksi dengan alkohol 70%, kulit tikus dicubit hingga bagian otot tercubit. Setelah itu spuit yang sudah diisi dengan STZ disuntikkan dengan cara intraperitoneal. Setelah diinjeksikan, semprotkan kembali dengan alkohol 70%.

Setelah diinjeksi STZ, 1 minggu setelahnya dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk mengkonfirmasi keadaan DM tipe 2 (Zhang *et al.*, 2008).

#### 4.7.1.5 Pengukuran Kadar Gula Darah Tikus

Tikus diukur kadar glukosa darahnya yang diperoleh dari darah ujung ekor (vena lateralis). Tikus yang akan diambil darahnya diletakkan pada tempat yang hanya cukup untuk satu ekor tikus saja dengan posisi ekor ke luar. Kemudian ekor tikus dibasahi dengan air hangat guna untuk memperlihatkan/memperjelas (vasodilatasi) vena lateralis. Setelah itu ekor diberi alkohol dan ditusuk dengan jarum untuk mengambil darahnya. Urut ekor ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka. Pengukuran glukosa darah menggunakan alat (*Easy Touch*) beserta strip untuk pengukuran glukosa darah. Selanjutnya darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan

*glucometer*. Kemudian dibiarkan selama 6 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar, dimana satuan skala pengukuran yang terbaca mg/dl.

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan 2 kali yaitu sebelum diberikan suplemen vitamin A untuk mengetahui adanya kondisi resistensi insulin, dan sesudah diberikan vitamin A untuk mengetahui adanya perbaikan kondisi resistensi insulin. Sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 10 jam, karena kadar glukosa darah yang diukur adalah kadar glukosa darah puasa. Kadar glukosa darah puasa normal pada tikus adalah 100 mg/dl (Handayani dkk., 2009).

#### **4.7.1.6 Pembuatan dan Pemberian Vitamin A pada Tikus**

Vitamin A didapatkan dalam bentuk tablet merk IPI 6000 IU (1,8 mg), kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender. Setelah itu dikemas ke dalam kertas obat dengan dibagi sesuai dosisnya, yaitu 15 mg, 30 mg, dan 45 mg. Cara pemberian ke tikus dengan cara menggunakan sonde langsung menuju lambung tikus sekali sehari, dimana vitamin A tersebut dilarutkan dengan aquades 2 ml kemudian diaduk, dimasukkan ke dalam spuit, baru bisa disondekan ke tikus.

#### **4.7.1.7 Prosedur Pengambilan Darah**

Sebelum dilakukan pengambilan serum untuk uji kadar insulin dilakukan melalui jantung (intrakardial) dengan jarum spuit 5 ml, tikus dibius dengan ketamin dosis 0,2 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam vacutainer yang bersih dan kering, lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Serum yang telah terpisah dimasukkan ke dalam tabung ependrof kemudian ditutup (Rafika, 2005).

#### 4.7.1.8 Pengukuran Kadar Serum Insulin pada Tikus

Prosedur pengukuran kadar serum insulin adalah sebagai berikut :

1. Membawa semua reagen dan sampel ke suhu kamar (18-25°C) sebelum digunakan. Disarankan agar semua standar dan sampel dijalankan setidaknya dalam rangkap.
2. Menambahkan 100 ml masing-masing standar dan sampel ke dalam wadah yang sesuai. Tutup dengan baik dan inkubasi selama 2,5 jam pada suhu kamar atau semalaman di suhu 4°C dengan digoyangkan secara lembut.
3. Membuang larutan dan mencuci 4 kali dengan 1X *Wash Solution*. Mencuci dengan mengisi masing-masing dengan *Wash Buffer* (300 ml) menggunakan multi-channel Pipet atau *autowasher*. Pembersihan sempurna larutan pada setiap langkah sangat penting untuk kinerja yang baik. Setelah pencucian terakhir, menghilangkan sisa *Wash Buffer* dengan cara *aspirating* atau *decanting*. Membalikkan plate dan baut terhadap *paper towels* yang bersih.
4. Meambahkan 100 ml 1X *prepared biotinylated antibody* untuk masing-masing, inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dengan digoyangkan secara lembut.
5. Membuang larutannya. Ulangi mencuci seperti pada langkah 3.
6. Meambahkan 100 ml larutan Streptavidin yang sudah siap untuk masing-masing. Inkubasi selama 45 menit pada suhu kamar dengan digoyangkan secara lembut.

7. Menambahkan 100 ml *TMB One-Step Substrate Reagent* untuk masing-masing. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dengan digoyangkan secara lembut.
8. Meambahkan 50 ml *Stop Solution* untuk masing-masing. Baca segera pada 450 nm.

#### 4.7.2 Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, data yang dikumpulkan adalah sebagai berikut:

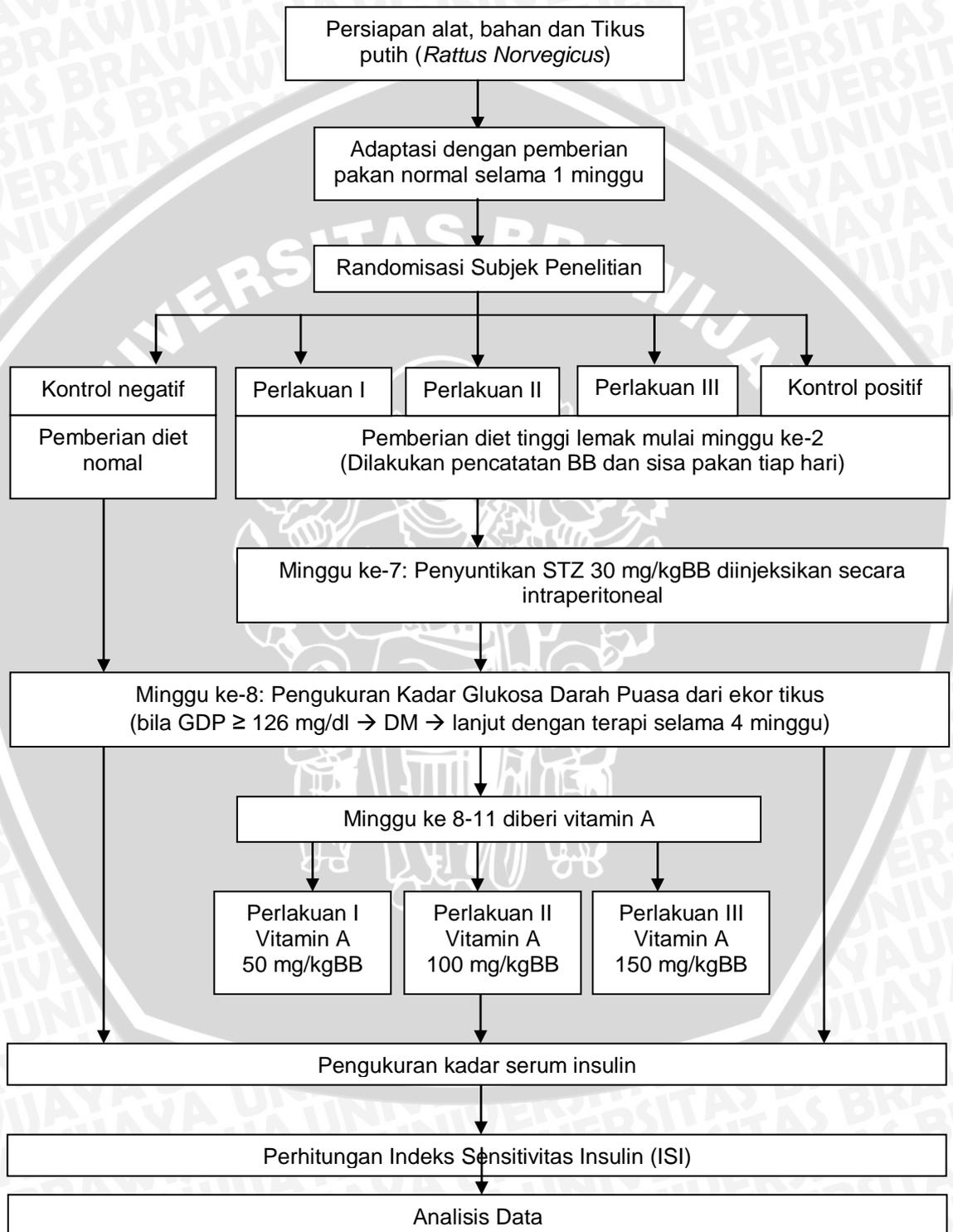
1. Sisa pakan tikus yang dihitung setiap hari selama penelitian berlangsung
2. Berat badan tikus yang diukur setiap minggu, dengan rincian setiap 4 kali selama penelitian berlangsung, yaitu:
  - a) pada awal adaptasi
  - b) minggu ke-2 (setelah adaptasi)
  - c) minggu ke-8 (setelah diberikan diet tinggi lemak serta diinjeksi STZ)
  - d) minggu ke-13 (pada akhir penelitian).
3. Kadar glukosa darah yang diukur sebelum dilakukan injeksi STZ pada tikus dan satu minggu setelah dilakukan injeksi STZ.
4. Kadar serum insulin yang diukur pada akhir penelitian menggunakan *ELISA reader*.
5. Indeks Sensitivitas Insulin (ISI) yang dihitung dengan QUICKI yang menggunakan rumus matematika dan fungsi logaritma yang melibatkan kadar insulin dan kadar glukosa darah puasa tikus.

#### 4.8 Pengolahan/Analisis Data

Dalam penelitian ini seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program *SPSS for windows Versi 16.0*. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

1. Uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data karena  $n < 50$ .
2. Uji Homogenitas dengan *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
3. Analisis komparasi dengan uji *One Way ANOVA* jika data berdistribusi normal dan homogen dan  $> 2$  kelompok. Jika data berdistribusi tidak normal atau tidak homogen menggunakan uji *Kruskal Wallis*.
4. Dilakukan analisis lanjutan *Post-Hoc* jika telah diketahui ada perbedaan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan. Analisis *Post-Hoc* untuk uji *Kruskal Wallis* adalah uji *Mann-Whitney*.
5. Uji korelasi dan regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel satu dengan variabel lainnya.

4.9 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian

