

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan desain penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* yang dilakukan di laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Dengan menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan Diabetes melitus tipe 2. Pada penelitian ini dilakukan *Simple Randomized Sampling* sehingga diharapkan sampel memiliki sifat yang homogen sebelum diberi perlakuan. Beberapa kelompok akan diberikan perlakuan dan dilakukan pengukuran pada akhir penelitian, kemudian hasilnya akan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus *Rattus Norvegicus* galur Wistar berusia 6-8 minggu.

4.2.2 Pemilihan Sampel

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan *Simple Randomized Sampling* sehingga diharapkan sampel yang akan digunakan bersifat homogen. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan coba, yaitu tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan ketentuan:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus* Wistar) jantan.

- b. Usia 6-8 minggu.
- c. Berat badan 150-200 gram.

4.2.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan umur 6-8 minggu, tampak sehat dengan berat rata-rata 150-200 gram. Pada penelitian ini subjek dibagi dalam 5 kelompok yaitu :

- a. Kontrol Negatif (KN)

Pemberian diet normal dan tidak diberi *Streptozotocin* (STZ).

- b. Kontrol Positif (KP)

Pemberian *high fat diet*, diinduksi STZ sebagai model Diabetes Melitus Tipe 2, tetapi tidak diberikan terapi.

- c. Kelompok Perlakuan 1 (KP1) Melitus

Pemberian *high fat diet*, diinduksi STZ sebagai model Diabetes Melitus Tipe 2, lalu diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50 mg/kg BB.

- d. Kelompok Perlakuan 2 (KP2)

Pemberian *high fat diet*, diinduksi STZ sebagai model Diabetes Melitus Tipe 2, lalu diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100 mg/kg BB.

- e. Kelompok Perlakuan 3 (KP3)

Pemberian *high fat diet*, diinduksi STZ sebagai model Diabetes Melitus Tipe 2, lalu diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150 mg/kg BB.

Penentuan jumlah dosis ekstrak kulit tomat yang akan diberikan diadaptasi dari hasil penelitian Nyamthabad dan Umesh (2014) mengenai evaluasi aktivitas antidiabetes dari ekstrak biji tomat dengan dosis pemberian antara 50-200 mg/kg

BB. Untuk dosis terendah menggunakan 50 mg/kg BB dan perbandingan dosis selanjutnya ditentukan menggunakan deret hitung ($1n$, $2n$, $3n$, dan seterusnya). Maka dosis yang digunakan adalah 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, 150 mg/kg BB ekstrak kulit tomat.

4.2.4 Perhitungan Jumlah Sampel

Sampel penelitian adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dengan umur 6-8 minggu, tampak sehat dengan berat rata-rata 150-200 gram. Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus:

$$n = \frac{15+p}{p} \quad (\text{Indra, 1999})$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok.

p : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok.

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

4.2.5 Kriteria sampel

1. Kriteria inklusi
 - a. Tikus putih (*Rattus norvegicus* Wistar) jantan.
 - b. Usia 6-8 minggu.
 - c. Berat badan 150-200 gram.
 - d. Sehat (tikus yang aktif bergerak).
 - e. berbulu putih dan bersih.
2. Kriteria eksklusi
 - a. Tikus yang mati selama penelitian.

4.3 Lokasi dan waktu penelitian

Pemeliharaan dan perawatan tikus dilakukan dilaboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang, untuk pengukuran kadar serum MDA dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan selama 11 minggu, dimulai tanggal 25 juli 2015 sampai dengan 10 oktober 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas (independent)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit tomat (*Solanum lycopersicum*) dengan berbagai dosis :

KP 1 : Ekstrak kulit tomat 50mg/kgBB.

KP 2 :Ekstrak kulit tomat 100mg/kgBB.

KP 3 :Ekstrak kulit tomat 150 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel Terikat (Dependent)

Variabel terkait dalam penelitian ini adalah kadar MDA pada serum tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model Diabetes Melitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan berat badan 150-200 gram, yang sebelumnya diberikan diet HFD kemudian di injeksi Streptozotocin (STZ) dengan dosis rendah 30 mg/kgBB satu kali dalam seminggu, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah selang satu minggu pemberian STZ, untuk mengembangkan tikus model diabetes melitus tipe 2 (Zhang *et al.*, 2008).

4.5.2 Ekstrak kulit tomat

Hasil ekstraksi kulit tomat menggunakan aseton, dibuat dengan cara mengukus tomat hingga terpisah antara daging buah dan kulit. Kemudian

kulit di tempatkan pada loyang setelah itu di keringkan, lalu dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Dosis ekstrak kulit tomat yang digunakan antara lain 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150mg/kgBB.

4.5.3 *Malondialdehid (MDA)*

Malondialdehid (MDA) merupakan hasil peroksidasi lipid yang dianggap sebagai marker kerusakan jaringan, sebagai tanda dari stress oksidatif. Didapat dari serum darah tikus pada akhir penelitian, yang dibaca dengan spektrofotometer 500-600 nm.

4.6 Alat dan bahan

4.6.1 Alat Penelitian

4.6.1.1 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

Timbangan, blender, kompor, loyang, baskom, dandang, kertas saring, gelas ukur, aluminium foil, rotary evaporator, batang pengaduk, beaker glass 250 ml.

4.6.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Timbangan, gelas ukur, loyang, bak plastik, handscoon, oven, baskom.

4.6.1.3 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 (ketelitian 0,1 kg), tempat pakan tikus.

4.6.1.4 Alat Injeksi Streptozotocin

Sprit disposable merk terumo 1 ml, spuit disposable merk terumo 3 ml, alkohol swab.

4.6.1.5 Alat Pengukuran MDA serum Tikus

Centrifuge, tabung reaksi, pemanas, spektrofotometer, pipet.

4.6.2 Bahan Penelitian

4.6.2.1 Bahan Pemeliharaan Tikus

Air minum, pakan (normal dan *high fat diet*), sekam.

4.6.2.2 Bahan Ekstrak Kulit Tomat

Tomat merah segar, etanol, aseton, aquades, kortina.

4.6.2.3 Bahan Pakan Normal

Crumble BR-1 250 gram, tepung terigu 750 gram, air.

4.6.2.4 Bahan Pakan Tinggi Lemak

Crumble BR-1 221,75 gram, tepung terigu 123,25 gram, asam cholate 0,098 gram, kolesterol 7,105 gram, minyak babi 184,25 gram.

4.6.2.5 Bahan Larutan Streptozotocin

Streptozotocin 100 gram, buffer sitrat 3 ml, aquades.

4.6.2.6 Bahan Pengukuran MDA serum Tikus

TCA 100%, HCL IN, Na-thiosulfat 1%, akuades.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian

4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan. Dipelihara dalam kandang di laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Sebelum penelitian dimulai, tikus diadaptasi terlebih dulu selama 1 minggu dan ditimbang berat badanya, tikus diberikan pakan normal masing-masing 25 gram. Makan dan minum diberikan satu kali dalam sehari dengan cara meletakkan pakan pada tempat pakan yang sudah disediakan di dalam kandang dan minum diberikan melalui alat minum hewan yang dikaitkan pada tutup kandang (anyaman kawat). Pergantian sekam dilakukan 3 (tiga) hari sekali sedangkan pada saat tikus sudah Diabetes melitus tipe 2, pergantian sekam dilakukan 2 hari sekali, sebab tikus dengan diabetes mellitus banyak mengeluarkan urine.

4.7.1.2 Pembuatan dan Pemberian Diet Normal

Jenis Diet yang digunakan adalah, Diet normal (pakan standart) dengan crumble BR-1, tepung terigu dan air. Perbandingan BR 1 dengan tepung terigu yaitu 1 : 3. Semua bahan dicampur, 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. Diet normal

tersebut diletakkan pada tempat makan hewan yang berada di dalam kandang.

4.7.1.3 Pembuatan dan Pemberian *High Fat Diet*

Diet tinggi lemak dibuat dengan komposisi crumble BR 1, tepung terigu, asam cholate, kolesterol, dan minyak babi. Bahan tersebut dicampurkan pada bak plastik, kemudian dibentuk bulat dan dikeringkan dengan oven. Setelah itu dilakukan penimbangan sebanyak 25 gram untuk satu ekor tikus. Diet tinggi lemak diberikan satu kali sehari pada semua kelompok perlakuan. Diet Tinggi lemak tersebut diletakkan pada tempat makan hewan yang berada di dalam kandang. Diet tinggi lemak diberikan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan pada minggu ke dua hingga akhir penelitian.

4.7.1.4 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

Sedangkan cara menginjeksi larutan STZ adalah sebagai berikut:

- a. Tikus diposisikan terlentang dengan abdomen mengarah ke penyuntik.
- b. Pada bagian atas abdomen tikus diusapkan dengan alkohol swab untuk desinfeksi.
- c. Kulit tikus dicubit hingga terasa bagian ototnya.
- d. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen lalu coba gerakkan spuit apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal (IP).

- e. Injeksikan STZ dengan dosis 30 mg/kgBB pada daerah intraperitoneal secara perlahan.
- f. Usapkan alcohol swab pada daerah abdomen tikus.
- g. Pemberian STZ dilakukan satu kali dalam seminggu. Lakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa selang satu minggu injeksi STZ.

4.7.1.5 Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

Pembuatan dan pemberian ekstrak kulit tomat dilakukan dengan cara :

- a. Tomat dicuci kemudian ditimbang.
- b. Tomat disusun didalam dandang yang sudah berisi air kemudian dikukus hingga tomat terpisah antara bagian kulit dan daging buah.
- c. Kulit tomat dikupas dan ditata diatas loyang yang sudah dikeringkan.
- d. Setelah kering kulit tomat dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk. Untuk 5-6 kg buah tomat akan dihasilkan 60-70 gram serbuk kulit tomat.
- e. Kulit tomat yang sudah dihaluskan dicampurkan dengan acetone sampai homogen dengan perbandingan 1:2 (tomat:aseton). acetone berfungsi untuk mengikat senyawa bioaktif yang terdapat pada kulit tomat yang sudah diserbukkan. Kemudian ekstrak kulit tomat ditimbang sesuai dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan. Simpan dalam botol kaca yang sudah dibungkus aluminium foil.
- f. Lakukan filtrasi untuk mengambil cairan kuning (aseton, likopen dan komponen antioksidan lainnya) dari ekstrak kulit tomat.

- g. Lakukan evaporasi dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kulit tomat dan agar terpisah dengan aseton.
- h. Campurkan ekstrak kulit tomat yang sudah jadi dengan Cortina
- i. Kemudian dimasukkan dalam kapsul dengan berat 0,55 gram. Setiap tikus mendapat dua kapsul yang diberikan secara per oral sesuai dengan dosis masing-masing setiap hari.

4.7.1.6 Pengukuran Kadar Serum MDA

Prosedur pengukuran kadar MDA adalah sebagai berikut:

- a. Tikus dianestesi dengan menginjeksi ketamine dengan dosis 2cc melalui intraperitoneal, lalu ditunggu hingga tidak sadar.
- b. Tikus diposisikan terlentang, keempat ekstremitas ditusukkan menggunakan jarum ke sterofom.
- c. Darah diambil menggunakan spuit 5ml secara intrakardial di ventrikel.
- d. Darah yang sudah diambil dipindahkan dengan hati-hati ke tabung vacutainer.
- e. Darah disentrifugasi 3000 rpm 10 menit.
- f. Diambil serumnya.
- g. Serum disentrifugasi 6000rpm 10 menit.
- h. Ambil supernatan (sampel).
- i. TCA 100% (100 μ L), Na-Thio 1% (100 μ L), HCN 1N (250 μ L), akuades (450 μ L), sampel (100 μ L).
- j. Panaskan 100 $^{\circ}$ C selama 10 menit.

- k. Sentrifuge 3000 rpm selama 5 menit.
- l. Ambil supernatan (endapan jangan sampai terambil).
- m. Supernatan ditambah akuades s.d 3500 μ L (700 μ L supernatan + 2800 μ L akuades).
- n. Perubahan warna dibaca dengan spektrofotometer 500-600 nm.

4.7.2 Pengumpulan data

Data yang dikumpulkan selama penelitian ini diantaranya:

- a. Sisa pakan tikus

Sisa pakan tikus baik sisa yang di dalam tempat makan dan sisa yang disekam ditimbang dan dicatat setiap hari selama penelitian berlangsung secara terpisah.

- b. Berat badan tikus yang dilakukan setiap hari kemudian di rerata setiap kelompok pada tiap minggunya.
- c. Kadar glukosa darah puasa setelah injeksi STZ.
- d. Kadar MDA pada akhir penelitian.

4.8 Analisis Data

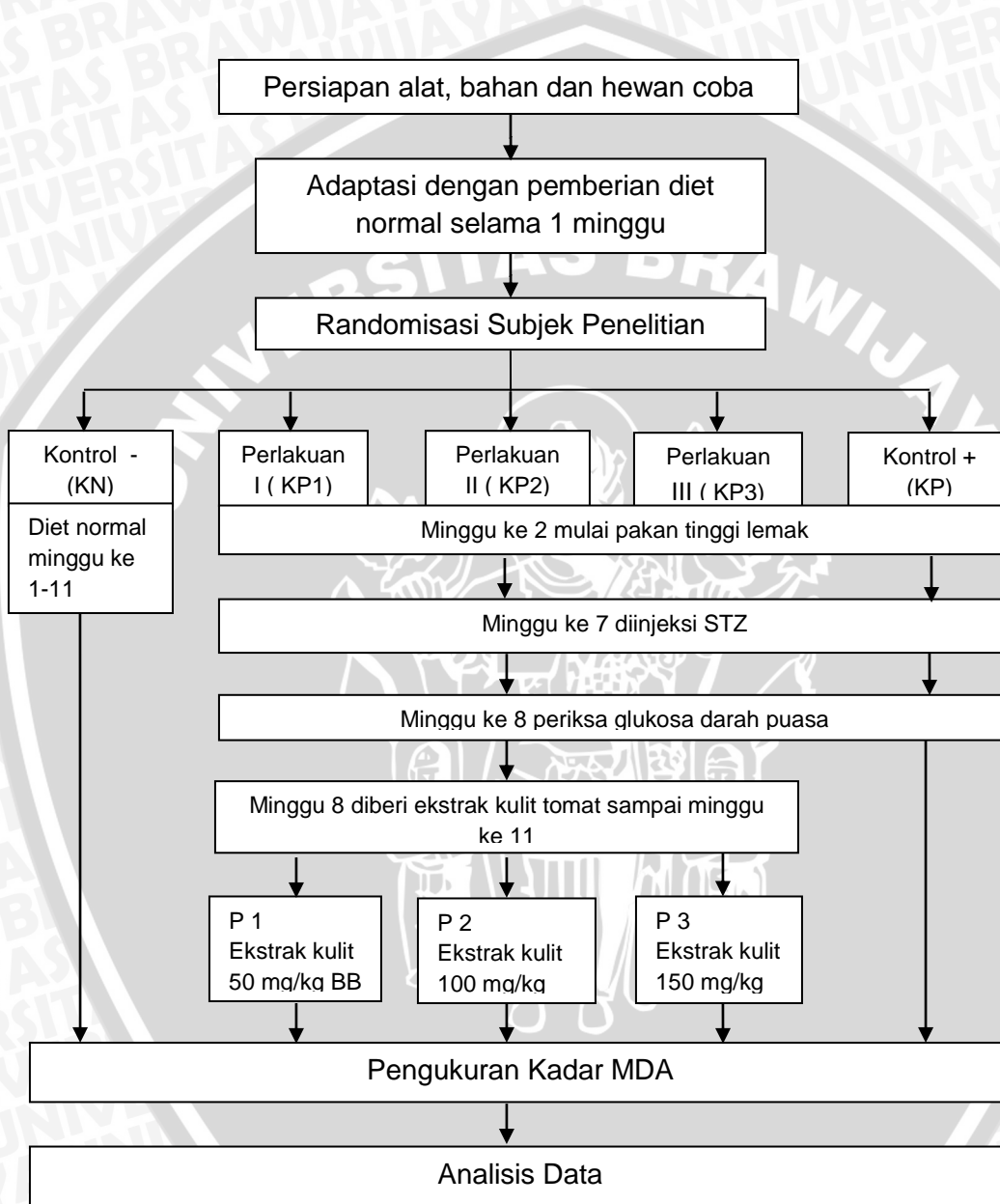
Hasil Pengukuran kadar MDA serum, pada penelitian ini dianalisa secara statistic menggunakan Program *SPSS for windows Versi 16.0.* dengan tingkat signifikansi 0.05 ($p = 0.05$) dan taraf kepercayaan 95%. Analisa data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Uji normalitas bertujuan untuk menginterpretasikan apakah data memiliki sebaran normal atau tidak karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis berdasarkan normal tidaknya distribusi data. Uji normalitas

yang digunakan adalah uji Saphiro Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 ($n \leq 50$), dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran data normal jika $p > 0.05$.

- b. Uji Homogenitas Levene, bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika varian data homogen maka dilanjutkan dengan uji ANOVA jika tidak maka dilanjutkan ke uji Non Parametrik. Pada uji homogenitas levene dikatakan memiliki varian data homogen jika nilai signifikansi $p > 0,05$. Pada penelitian ini data tidak memiliki varian data homogen.
- c. Uji non parametrik dengan Uji Kruskal walis merupakan uji nonparametrik berbasis peringkat yang tujuannya untuk menentukan adakah perbedaan signifikan secara statistik antara dua atau lebih kelompok variabel independen pada variabel dependen
- d. Uji Mann Whitney bertujuan untuk membandingkan antara dua perlakuan, mengetahui perlakuan mana saja yang hasilnya beda secara signifikan dengan nilai signifikansi $p < 0.05$
- e. Uji Korelasi Spearman bertujuan untuk mengetahui tingkat keeratan hubungan yang dimiliki antar variable dalam penelitian.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian