

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian *in vivo* dengan *postest only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan desain penelitian murni (*true experimental design*) pada tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar dengan diabetes tipe 2 yang dikelompokkan secara *Simple Random Sampling* sehingga diharapkan memiliki sifat homogen sebelum dilakukan perlakuan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian secara oral ekstrak kulit buah tomat (*Solanum lycopersicum*) memberikan efek antioksidan terhadap aktivitas enzim Superoxide dismutase pada serum darah tikus *Rattus norvegicus* galur wistar. Kelompok perlakuan diberikan likopen dan dilakukan pengukuran dari serum darah pada akhir penelitian, yang kemudian hasil data akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

#### 4.2. Populasi dan Sampel

##### 4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar. Pemilihan sampel dikarenakan pemeliharaan mudah dan memiliki metabolisme seperti manusia. Sampel yang dipilih jantan dikarenakan, betina memiliki hormon estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme tubuh tikus.

#### 4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar jantan dengan umur 6-8 minggu dengan berat badan  $\geq 150$  gram dengan *Simple Random Sampling*.

Perhitungan jumlah sampel pada masing – masing perlakuan dapat dihitung dengan menggunakan rumus Indra (1999) :

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

Keterangan:

$n$  : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

$p$  : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok

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

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

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.

Dengan pembagian perlakuan subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok sebagai berikut:

**Tabel 4.1 Pengelompokan Hewan Coba**

KELOMPOK	MACAM DIET DAN PERLAKUAN
<b>Kontrol</b>	Diet : normal
<b>Negatif</b>	Perlakuan : tidak diinjeksi <i>Streptozotocin</i> (STZ)
<b>Kontrol</b>	Diet : tinggi lemak
<b>Positif</b>	Perlakuan : injeksi <i>Streptozotocin</i> (STZ), tanpa terapi
<b>Perlakuan I</b>	Diet : tinggi lemak Perlakuan : injeksi <i>Streptozotocin</i> (STZ) dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis peroral 50 mg/kgBB
<b>Perlakuan II</b>	Diet : tinggi lemak Perlakuan : injeksi <i>Streptozotocin</i> (STZ) dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis peroral 100 mg/kgBB
<b>Perlakuan III</b>	Diet : tinggi lemak Perlakuan : injeksi <i>Streptozotocin</i> (STZ) dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis peroral 150 mg/kgBB

#### 4.2.2.1. Kriteria Sampel

##### 4.2.2.1.1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar jantan

- b. Warna bulu putih
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan  $\geq$  150 gram
- e. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

#### 4.2.2.1.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus dengan perubahan kondisi seperti sakit yang ditunjukkan dengan kurang aktif, perubahan nafsu makan dan minum
- b. Tikus dengan cacat fisik
- c. Tikus mati

#### 4.2.2.1.3. Kriteria Drop Out

Tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar dinyatakan *drop out* apabila sesuai dengan kriteria eksklusi.

### 4.3. Variabel Penelitian

#### 4.3.1. Variabel Bebas (Independen)

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

#### 4.3.2. Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas SOD serum tikus Wistar jantan.

### 4.3.3. Variabel Luar

#### 4.4.3.1. Variabel Luar Terkendali

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

#### 4.4.3.2. Variabel Luar Tak Terkendali

Variabel luar tak terkendali pada penelitian ini adalah keadaan tikus sebelum perlakuan, kondisi psikologis tikus, imunitas, dan reaksi hipersensitivitas tikus.

### 4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

#### 4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama empat bulan dimulai pada bulan Juli hingga Oktober.

### 4.5. Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.5.1. Bahan Penelitian

Bahan pembuatan pakan normal tikus adalah tepung Segitiga Biru, *scrumble*, dan air secukupnya. Pembuatan pakan tinggi lemak meliputi tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *Palm Olein*, air, minyak babi. Perawatan tikus dibutuhkan bahan berupa air matang,

sekam, dan pakan tikus (normal dan tinggi lemak). Bahan pembuatan ekstrak kulit tomat antara lain buah tomat (*Solanum lycopersicum*), aseton, dan cortina. Pemeriksaan gula darah puasa tikus dibutuhkan air hangat untuk membersihkan ekor tikus. Bahan untuk pembedahan tikus antara lain ketamin, aquades, dan alkohol. Pemeriksaan aktivitas serum darah tikus meliputi ether, EDTA, H<sub>2</sub>O (bidest) xantin, xantin oksidase, dan NBT.

#### 4.5.2. Alat Penelitian

Alat yang diperlukan untuk membuat pakan normal tikus antara lain baskom plastik, timbangan pakan Sartorius Melter, gelas ukur, pengaduk, loyang adonan. Pembuatan pakan tinggi lemak tikus antara lain baskom plastik, timbangan pakan Sartorius Melter, gelas ukur, pengaduk, loyang adonan. Perawatan tikus dibutuhkan kandang dari kotak plastik berukuran 45cm x 35,5cm x 14,5cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air minum tikus, rak kandang tikus, dan timbangan digital Sartorius Melter. Pemeriksaan gula darah puasa (GDP) membutuhkan jarum, serbet, alat pengukur gula darah digital Easy Touch. Pembuatan ekstrak kulit tomat dibutuhkan kompor, panci, spatula, baskom, blender, Beker Glass, aluminium foil, kulkas, alat penyaring, kertas penyaring, *Rotary Evaporator* IKA, spatula, mortar dan *pestle*, gelas ukur, neraca digital dengan ketelitian 3 angka di belakang koma, kapsul kosong, dan spatula. Alat untuk pemberian ekstrak kulit tomat adalah alat pembuka mulut, pendorong kapsul, serbet. Alat untuk pembedahan adalah spuit Terumo 1cc, jarum ukuran 26, vacutainer Onemed, centrifugation tube Onemed, telenan, jarum pentul, kapas, alat

bedah, toples berisi formalin, dan spidol Snowman. Pemeriksaan aktivitas SOD membutuhkan antara lain seperangkat tabung reaksi, sentrifuge, trans-pipet 1 ml, pemanas/water bath, dan spektrofotometer.

#### **4.6. Definisi Operasional Variabel**

##### **4.6.1. Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2**

Tikus model Diabetes Melitus tipe 2 yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* jantan galur Wistar dengan usia 6-8 minggu, berat badan  $\geq 150$  gram, dan dalam kondisi sehat atau tanpa kelainan anatomi. Tikus diberikan pakan tinggi lemak sebanyak 25 gram per hari dan disuntikan Streptozotocin (STZ) sebanyak 30mg/kgBB. Tikus memperoleh perlakuan setelah memenuhi kriteria DM yaitu kadar gula darah puasa  $\geq 140$  mg/dL (Zhang *et.al.*, 2008).

##### **4.6.2. Ekstrak Kulit Tomat**

Terapi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit tomat. Ekstrak kulit tomat didapatkan dari hasil pemisahan kulit dan daging tomat yang dihaluskan, kemudian dilakukan ekstraksi dengan aseton dan evaporasi. Dosis tomat yang digunakan adalah 50 mg/KgBB, 100 mg/KgBB, 150 mg/kgBB. Menurut Nyamthabad dan Umesh (2013) pemberian ekstrak biji *Solanum lycopersicum* pada tikus induksi hiperglikemia pada dosis 50 – 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar GDP secara signifikan.

#### 4.6.3. Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase

Superoksida dismutase adalah enzim antioksidan serum yang diambil dari darah jantung tikus *Rattus norvegicus* yang diberi perlakuan selama 4 minggu. Aktivitas antioksidan enzimatis SOD yang diambil dan dihitung melalui metode Beauchamp dan Fridovich (1971). Prinsip perhitungan melalui reaksi antara xantin oksidase dengan *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA). Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometri secara tidak langsung melalui absorbansi formazan. Aktivitas SOD dihitung menggunakan kurva standar SOD dengan satuan unit per milliliter (U/ml).

#### 4.7. Prosedur Penelitian dan Metode Pengumpulan Data

##### 4.7.1. Prosedur Penelitian

##### 4.7.1.1. Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan dipelihara di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada awal penelitian, semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi. Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan diadaptasikan selama satu minggu di dalam masing-masing kandang dengan pemberian diet normal. Pada masa adaptasi ini, berat tikus dan pakan tikus ditimbang setiap harinya dan setiap minggu dilakukan rata - rata, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik. Setiap kandang tikus diberi label sesuai dengan perlakuan yaitu label kelompok kontrol negatif, positif, dan perlakuan I - III. Kandang tikus diberikan sekam yang diganti



setiap 3 hari sekali. Setiap kandang diberikan botol minum dengan air yang diisi kembali setiap hari dan diletakkan di atas kawat penutup kandang.

#### 4.7.1.2. Pembuatan dan Pemberian Pakan Normal

Pakan normal dibuat dari *crumble* yang dicampurkan dengan tepung terigu dengan perbandingan 3 : 1. *Crumble* dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan dengan komposisi 225 gr Confeed PAR-S, 100 gr tepung terigu, dan 100 ml air dengan kandungan lemak 5%, karbohidrat 53%, protein 23%, dan kalori sebesar 25 kkal. Tepung terigu dan *crumble* dicampur merata, diberi air secukupnya, dan dicampur kembali. Setelah jadi adonan dicetak dan dikeringkan di sinar matahari atau oven. Pakan normal diberikan pada semua kelompok tikus saat adaptasi 1 minggu dan setelah itu tikus kelompok kontrol negatif sebanyak 25 gram setiap harinya. Saat diberikan terapi hingga akhir penelitian, pakan tikus perlakuan akan diganti dengan pakan normal kembali.

#### 4.7.1.3. Pembuatan dan Pemberian Pakan Tinggi Lemak

Pakan tinggi lemak dibuat dari campuran 200 gr Confeed PAR-S, 100 gr tepung terigu, 8 gr kolesterol, 0,8 gr asam kolat, 40 ml pig oil, dan 51,2 ml air dengan kandungan lemak 22%, karbohidrat 48%, protein 20%, dan kalori sebesar 44,3 kkal/kg. diberikan pada tikus kelompok kontrol positif dan perlakuan sebanyak 25 gram setelah 1 minggu adaptasi. Pakan setiap harinya diisi ulang dan diganti jika kotor atau terjatuh dari tempat pakan. Pada tikus perlakuan, pakan tinggi lemak diganti kembali ke pakan normal saat tikus mulai diberikan terapi hingga akhir penelitian.

#### 4.7.1.4. Injeksi STZ

Prosedur injeksi larutan STZ pada tikus kelompok kontrol positif dan perlakuan :

- a. Mempersiapkan STZ dengan spuit
- b. Memegang tikus dengan menjepit bagian tekuk menggunakan ibu jari dan jari telunjuk, dan ekornya dijepit diantara jari manis dan kelingking.
- c. Menyemprotkan alkohol 70 % pada abdomen tikus untuk disinfeksi
- d. Mencubit bagian perut tikus sampai terasa otot tikus terangkat
- e. Menusuk bagian belakang dari otot tersebut dengan spuit
- f. Menginjeksi STZ pada daerah intraperitoneal.
- g. Membersihkan bekas injeksi dengan alcohol swab atau menyemprotkan kembali alkohol 70%

#### 4.7.1.5. Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Prosedur mengukur kadar glukosa darah tikus pada semua kelompok tikus :

- a. Memegang tikus dengan kain agar tidak bergerak saat ditusuk
- b. Mencilupkan ekor tikus ke dalam air hangat agar vena lebih terlihat
- c. Meraba ekor tikus untuk melihat adanya penonjolan vena
- d. Melakukan disinfeksi pada ekor tikus dengan alcohol swab
- e. Menusuk ekor tikus dan mengurut agar darah keluar lebih banyak
- f. Menempelkan stik alat ukur digital dan melihat hasilnya. Jika hasil tidak rasional, dilakukan pengecekan ulang kembali.

#### 4.7.1.6. Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Prosedur pembuatan ekstrak kulit tomat :

- a. Memilih tomat yang berwarna merah tanpa cacat atau rusak.
- b. Tomat ditimbang dan dicuci.
- c. Tomat disayat di tiap ujungnya dan direbus hingga kulit terkelupas.
- d. Memisahkan kulit tomat dari daging tomat dan mengeringkannya.
- e. Menghaluskan kulit tomat dengan blender, pestle, dan mortar.
- f. Mencampurkan aseton dengan kulit tomat yang telah dihaluskan dan mengaduknya dengan vortex. Aseton berguna untuk mengikat likopen yang ada dalam kulit tomat.
- g. Menyaring campuran ekstrak kulit tomat dengan kertas saring dan memasukkannya ke dalam botol kaca yang dibungkus dengan alumunium foil. Proses penyaringan diulang hingga 3 kali.
- h. Hasil saringan dimasukkan ke *rotatory evaporator*.
- i. Setelah dipadatkan, kemudian dipekatkan dengan  $N_2$  dan ditimbang.
- j. Ekstrak dicampur dengan cortina dan dimasukkan ke dalam kapsul kosong.

#### 4.7.1.7. Pengambilan Serum Darah Tikus

Prosedur pengambilan serum darah tikus :

- a. Melakukan anastesi pada tikus dengan cara menginjeksi ketamin 2cc secara intraperitoneal.
- b. Memosisikan tikus dalam keadaan supine di atas sterofoam, kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul.
- c. Mempalpasi jantung tikus
- d. Mengambil darah dengan spuit 5ml secara intrakardial
- e. Memindahkan darah dari spuit ke darah vacutainer dengan hati-hati atau tanpa ditekan

#### 4.7.1.8. Pengukuran Aktivitas SOD

Prosedur Pemeriksaan aktivitas enzim SOD pada serum tikus :

1. Darah disimpan pada tabung vacutainer non additive dimasukkan ke dalam tabung 15 cc.
2. Darah disentrifugasi selama 10 menit, 3000 rpm.
3. Supernatant dimasukkan dengan trans-pipet ke dalam tabung I sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , tabung II sebanyak 200  $\mu\text{L}$ .
4. Tabung I (kontrol) diisi dengan :
  - EDTA 100 MM 200  $\mu\text{L}$
  - Xantin 25 U 100  $\mu\text{L}$
  - Xantin oksidase 1 U 100  $\mu\text{L}$
5. Tabung II diisi dengan :
  - EDTA 100 MM 200  $\mu\text{L}$
  - NBT 25 U 100  $\mu\text{L}$
  - Xantin 25 U 100  $\mu\text{L}$
  - Xantin oksidase 1 U 100  $\mu\text{L}$
6. Kedua tabung diinkubasi pada suhu 39°C selama 30 menit.
7. Kedua tabung disentrifugasi 3000 rpm selama 5 menit, lalu disaring bila terdapat koloid.
8. Ditambahkan bidest ke masing-masing tabung hingga volumenya menjadi 3 cc.
9. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  580 nm.
10. Menentukan aktivitas SOD dengan menggunakan kurva standar SOD

#### 4.7.2. Pengumpulan Data

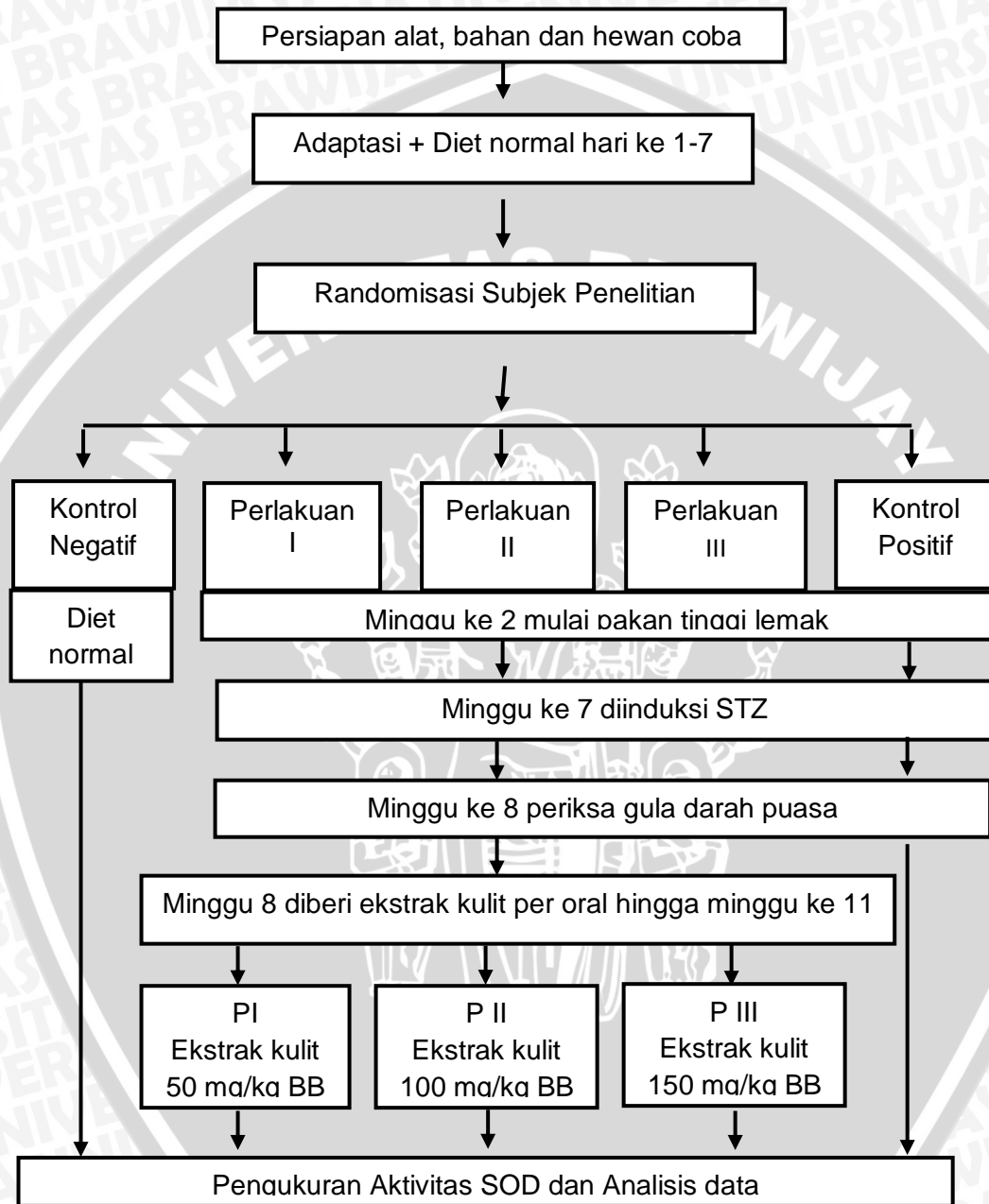
Data yang dikumpulkan dalam penelitian anatara lain :

- a. Sisa pakan setiap hari
- b. Berat badan tikus setiap hari yang dirata – rata setiap minggunya
- c. Kadar glukosa sebelum dilakukan induksi, satu minggu setelah induksi STZ, dan sebelum dilakukan pembedahan.
- d. Aktifitas enzim SOD pada serum tikus yang diukur pada akhir penelitian

#### 4.8. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan menggunakan Program *SPSS For Windows* Versi 21.0 dengan derajat kepercayaan 95% dengan  $p < 0,05$  sebagai toleransi bias. Analisis pertama dilakukan uji normalitas *Saphiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data. Digunakan uji *Saphiro Wilk* untuk sampel yang berjumlah kurang dari 50, sedangkan *Kolmogorov Smirnof* untuk sampel yang berjumlah lebih dari 50. Uji homogenitas *Levene Test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok. Data dikatakan terdistribusi normal dan homogeny apabila didapatkan  $p > 0,05$ . Jika data didapatkan normal dan homogeny maka dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Dilanjutkan uji korelasi regresi untuk mengetahui kuatnya hubungan dan pengaruh pemberian ekstrak kulit tomat terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase pada serum tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar.

4.9. Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1