

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental *in vivo* dengan *posttest only controlled group design*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan. Pemilihan subjek dikarenakan pemeliharaan yang mudah dan memiliki sistem imun seperti manusia. Tikus jantan dipilih karena tikus jantan tidak memiliki hormon esterogen yang dapat mempengaruhi metabolisme HDL.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan usia 6-8 minggu dengan berat badan ≥ 200 gram. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan penelitian menggunakan *Purposive Sampling Design* untuk kelompok kontrol negatif (KN) dimana tikus putih yang diambil adalah tikus putih dengan berat ≥ 300 gram, sedangkan untuk kelompok perlakuan lainnya digunakan *Simple Random Sampling Design*.

Besar sampel didasarkan pada jumlah dari replikasi setiap kelompok dengan perhitungan yang akan diuji dengan level signifikansi 95% dengan rumus $n = (15+p) / p$ (Indra, 1999) sebagai berikut:

$$n = (15 + 5)/5$$

$$n = 20 / 5$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Dengan pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok kontrol negatif (KN): Kelompok kontrol negatif dengan pemberian pakan normal, tidak diinduksi dengan STZ, dan tidak diberi terapi.
- b. Kelompok kontrol positif (K+): Kelompok kontrol positif dengan pemberian pakan HFD dan diinduksi dengan STZ, namun tidak diberikan terapi.
- c. Kelompok Perlakuan I (KP1): Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian pakan HFD dan diinduksi dengan STZ, serta diberikan ekstrak kulit tomat sebanyak 50 mg/ kgBB.
- d. Kelompok Perlakuan II (KP2): Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian HFD dan diinduksi dengan STZ, serta diberikan ekstrak kulit tomat sebanyak 100 mg/ kgBB.
- e. Kelompok Perlakuan III (KP3): Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian HFD dan diinduksi dengan STZ, serta diberikan ekstrak kulit tomat sebanyak 150mg mg/ kgBB.

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan
- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat \geq 200 gram
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi.

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus putih yang mati selama masa perlakuan.

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus putih dinyatakan *drop out* apabila sesuai dengan kriteria eksklusi dan diganti dengan Tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus yang sesuai dengan ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

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

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar serum *High-Density Lipoprotein* (HDL).

4.3.3 Variabel Luar

4.3.3.1 Variabel Luar Terkendali

Variabel luar terkendali pada penelitian ini adalah makanan, minuman, genetik, jenis kelamin, umur, dan berat badan.

4.3.3.2 Variabel Luar Tak Terkendali

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

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

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

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 11 minggu.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan perawatan tikus adalah air matang, sekam, dan pakan tikus (normal dan tinggi lemak). Bahan pakan normal meliputi tepung Segitiga Biru, *scrumble*, dan air secukupnya. Bahan pakan tinggi lemak antara lain tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *Palm Olein*, air, minyak babi. Bahan pembuatan ekstrak adalah tomat (*Solanum lycopersicum*), aseton, cortina. Bahan pengecekan gula darah puasa meliputi darah tikus yang diambil dari ekor, air hangat. Bahan pembedahan antara lain ketamin, aquades, alkohol. Bahan

pemeriksaan serum HDL adalah darah jantung tikus sebanyak 5cc yang ditaruh dalam vacutainer tanpa antikoagulan, reagen 1x 50 mL, *Phosphotungstate* 0,4 mmol/ L, *Magnesium Chloride* 20 mmol/ L.

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. Alat untuk membuat pakan tinggi lemak tikus antara lain baskom plastik, timbangan pakan *Sartorius Melter*, gelas ukur, pengaduk, loyang adonan. Alat untuk pemeliharaan tikus membutuhkan kandang dari kotak plastik berukuran 45cm x 35,5cm x 14,5cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air minum tikus, rak tempat kandang tikus, timbangan digital *Sartorius Melter*, batu untuk menindih tutup kandang agar tikus tidak lepas. Alat untuk pengecekan GDP adalah jarum, serbet, alat pengukur gula darah digital *Easy Touch*. Alat untuk pemberian kapsul terapi adalah alat pembuka mulut, sonde, serbet. Alat pembuatan ekstrak kulit tomat antara lain kompor, panci, spatula, baskom, blender, *Beker Glass*, aluminium foil, kulkas, alat penyaring, kertas penyaring, *Rotary Evaporator* IKA, spatula, gelas ukur, neraca digital dengan ketelitian 3 angka di belakang koma, kapsul kosong, spatula kecil. Alat untuk pembedahan adalah Spuit Terumo 1cc, jarum 26, Vacutainer *Onemed*, *Centrifugation Tube Onemed*, Telenan, jarum pentul, kapas, alat bedah, toples berisi formalin, spidol *Snowman*. Alat pengukuran HDL meliputi *Spectrophotometer Biosystems*, Sentrifugasi *Hettich Zentrifugen*.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model Diabetes Melitus tipe 2 adalah tikus putih *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar dengan usia 6-8 minggu dan berat ≥ 200 gram yang diinduksi dengan pakan tinggi lemak sebanyak 25 gram/ tikus dan penyuntikan STZ dengan dosis 30 mg/ kgBB yang dapat merusak sel beta pankreas sehingga tikus menderita Diabetes Melitus tipe 2 (Zhang, 2008).

4.6.2 Ekstrak Kulit Tomat

Ekstrak kulit tomat adalah hasil dari pemisahan kulit dan daging tomat yang dihancurkan hingga lembut kemudian dicampurkan dengan aseton untuk mengikat likopen di dalam kulit tomat dan kemudian dievaporasi sehingga terbentuklah ekstrak kulit tomat.

4.6.3 Kadar Serum HDL

Kadar serum *High-Density Lipoprotein* (HDL) adalah serum yang diambil dari darah jantung tikus putih *Rattus norvegicus* yang telah diberi perlakuan selama 4 minggu dan diukur dengan menggunakan *Spectrophotometer* dengan satuan mg/ dL.

4.7 Prosedur Penelitian dan Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian

4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Sebelum memulai penelitian, kami mengadaptasikan tikus selama 1 minggu dan menimbang

beratnya. Pemberian pakan normal tikus masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti sekali setiap hari. Setelah adaptasi, pakan diganti dengan pakan tinggi lemak (HFD) selama 11 minggu. Penggantian sekam dilakukan setiap tiga hari sekali, sementara saat sudah diinduksi STZ dan timbul gejala DM yaitu pengeluaran urin yang banyak, sekam diganti setiap dua hari sekali.

4.7.1.2 Pembuatan dan Pemberian Pakan Normal

Penelitian menggunakan pakan normal yang merupakan scrumble yang terbuat dari tepung jagung, tepung kacang hijau, palm olein yang kemudian dicampur dengan tepung terigu, dan air. Setelah pencampuran bahan, bahan dicetak, dan dikeringkan. Perbandingan scrumble dan tepung terigu adalah 3:1. 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.

4.7.1.3 Pembuatan dan Pemberian Pakan Tinggi Lemak (HFD)

Pakan tinggi lemak pada penelitian ini terbuat dari tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *Palm Olein*, air, 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 (KP1, KP2, KP3) mulai dari minggu ke pertama hingga akhir penelitian.

4.7.1.4 Induksi Larutan STZ

Cara penginduksian larutan STZ adalah sebagai berikut:

- a. Memposisikan tikus dengan *abdomen* menghadap ke arah penyuntik.
- b. Menyemprotkan alkohol 70% pada bagian *abdomen* untuk disinfeksi.

- c. Mencubit kulit tikus hingga ke bagian *intraperitoneal*.
- d. Menusukkan spuit pada bagian *abdomen* dan akan terasa agak keras bila sudah di bagian intraperitoneal.
- e. Menginjeksikan STZ pada daerah *intraperitoneal*.

4.7.1.5 Pengukuran Kadar Gula Darah Puasa Tikus

Cara mengukur kadar glukosa darah tikus adalah sebagai berikut:

- a. Memegang tikus menggunakan kain agar tenang.
- b. Mencilupkan ekor tikus ke air hangat agar vena lebih mudah terlihat.
- c. Memberi alkohol pada ekor untuk desinfeksi kemudian ditusuk menggunakan jarum suntik.
- d. Menempelkan darah yang sudah keluar pada stik alat ukur digital kemudian dilihat hasilnya. Apabila kadar glukosanya ≥ 140 mg/dL berarti tikus tersebut positif Diabetes Melitus tipe 2.

4.7.1.6 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Cara ekstraksi kulit Tomat adalah sebagai berikut:

- a. Menimbang dan mencuci tomat.
- b. Memasukkan tomat yang sudah dicuci ke dalam panci yang sudah berisi air kemudian merebusnya hingga kulit dan dagingnya terpisah.
- c. Mengupas kulit tomat dan menatanya di loyang, kemudian dijemur hingga kering.
- d. Setelah kering, menghaluskan kulit tomat menggunakan blender dan bila belum cukup halus, dilanjutkan dengan penumbukan.

- e. Mencampurkan ekstrak kulit tomat yang sudah menjadi serbuk dengan aseton untuk mengikat likopen kemudian disimpan dalam botol kaca yang dibungkus dengan aluminium foil.
- f. Melakukan filtrasi untuk mengambil cairan kuning (aseton dan likopen) dari ekstrak tomat.
- g. Melakukan evaporasi untuk memisahkan likopen dan aseton menggunakan *rotary evaporator*.
- h. Ekstrak kulit tomat yang sudah jadi dicampur dengan cortina supaya lebih mudah larut dengan lemak dan stabil terhadap suhu lingkungan.

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 selama 4 minggu.

4.7.1.7 Pengukuran Kadar Serum HDL

Prosedur pengukuran kadar serum HDL adalah sebagai berikut:

- a. Menganestesi tikus dengan cara menginjeksi ketamin sebanyak 2 cc melalui *intraperitoneal*, kemudian ditunggu hingga tidak sadar.
- b. Memposisikan tikus dengan posisi terlentang, keempat ekstremitas ditusukkan menggunakan jarum pentul ke *sterofoam*.
- c. Mengambil darah menggunakan spuit 5ml secara *intrakardial* di ventrikel kanan.
- d. Memindahkan darah yang sudah diambil ke tabung *vacutainer*.
- e. Menambahkan reagen ke darah dengan reagen 1 x 50 mL, *Phosphotungstate* 0,4 mmol/L, *Magnesium Chloride* 20 mmol/L ke dalam tabung reaksi kemudian disentrifugasi selama 10 menit dalam

suhu ruangan hingga homogen. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan minimum 4000 r.p.m

- f. Sebagai blanko, air suling sebanyak 5ml ditambah 1 ml reagen.
- g. Menginkubasi serum selama 30 menit pada suhu ruang (16-25°C) atau selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian membaca absorpsinya dengan Spektrofotometri dengan panjang gelombang 500nm.

4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah:

- a. Sisa pakan tikus yang dikumpulkan setiap hari.
- b. Berat badan tikus yang dilakukan 3 kali setiap minggunya.
- c. Kadar glukosa darah yang dilakukan sebelum penginduksian STZ dan satu minggu setelah penginduksian.
- d. Kadar serum HDL yang diukur pada akhir penelitian menggunakan spektrofotometri.

4.8 Pengolahan Data

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

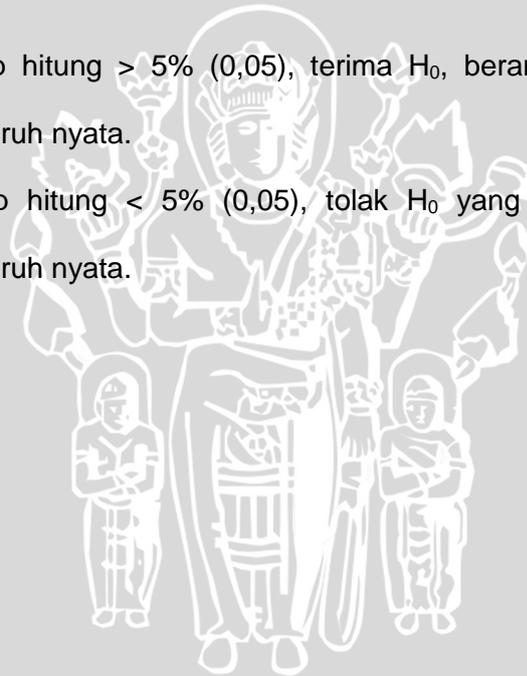
- a. Uji normalitas dengan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data karena jumlah sampel kurang dari 50 ekor. Dengan $p > 0,05$.
- b. Uji Homogenitas dengan uji *Levene test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok dengan taraf kepercayaan $p > 0,05$.

c. Analisis komparasi dengan ANOVA jika data berdistribusi normal dan homogen. Untuk melakukan uji ANOVA ini, diperlukan beberapa syarat yang harus dimiliki oleh sebuah data yang akan diuji, berikut beberapa syarat yang harus dimiliki:

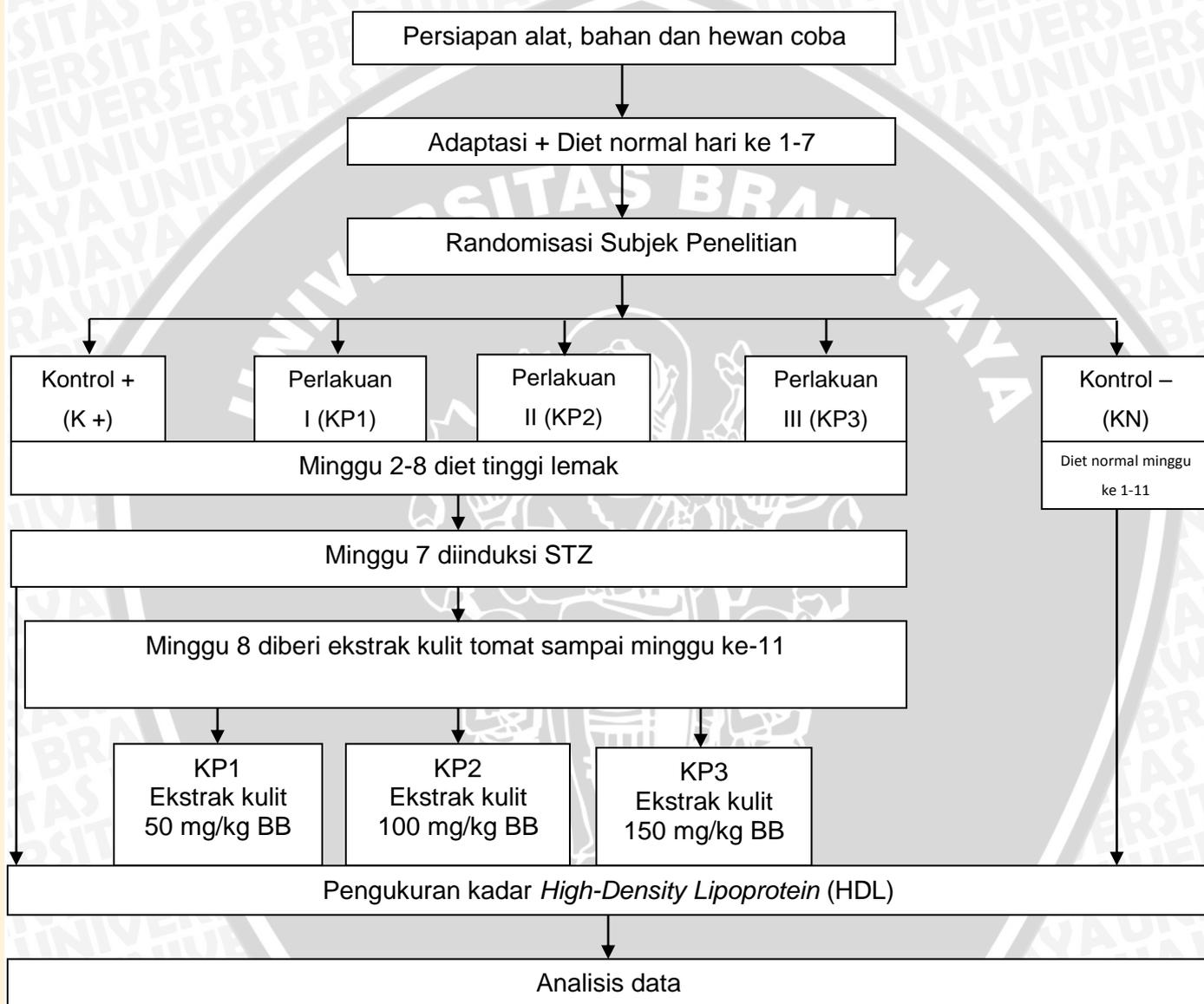
- a. Data berdistribusi normal, uji *Shapiro Wilk* $p > 0,05$.
- b. Varians atau ragamnya homogen.

Kaidah keputusan apakah suatu perlakuan memberi efek yang diinginkan terhadap variabel terikat pada sebuah penelitian (H_0 ditolak) atau tidak (H_0 diterima):

- a. Apabila p hitung $> 5\%$ (0,05), terima H_0 , berarti perlakuan tidak berpengaruh nyata.
- b. Apabila p hitung $< 5\%$ (0,05), tolak H_0 yang berarti perlakuan berpengaruh nyata.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian