

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) model Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Pemilihan obyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan randomisasi, hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Penelitian ini, hewan coba dibagi dalam 5 kelompok, yakni satu kelompok Kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diambil secara random. Pada penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu sebagai berikut:

- a. Kontrol Negatif : Pemberian diet normal
- b. Kontrol Positif : Pemberian diet tinggi lemak, kemudian tikus diinjeksi STZ sebagai model DM tipe 2
- c. Perlakuan 1 : Pemberian diet tinggi lemak kemudian tikus diinjeksi STZ sebagai model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50 mg/kg BB
- d. Perlakuan 2 : Pemberian diet tinggi lemak kemudian tikus diinjeksi

- STZ sebagai model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100 mg/kg BB
- e. Perlakuan 3 : Pemberian diet tinggi lemak kemudian tikus diinjeksi STZ sebagai model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150 mg/kg BB

4.2.1 Kriteria Sampel

4.2.1.1 Kriteria Inklusi

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan
- Usia 6-8 minggu
- Berat badan 150-200 gram
- Tikus yang sehat, berbulu putih dan tampak aktif

4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang mati selama masa perlakuan.

4.2.2 Perhitungan Sampel

Estimasi jumlah sampel menggunakan rumus:

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

Keterangan

p : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

n : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok

Dalam penelitian ini jumlah kelompok perlakuan ada 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 perlakuan dikalikan jumlah perlakuan 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 sebagai cadangan untuk setiap kelompok perlakuan apabila ada yang mati.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

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

P1 : 50 mg/kgBB

P2 : 100 mg/kgBB

P3 : 150 mg/kgBB

4.3.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar total kolesterol dalam darah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar.

4.3.3 Variabel Perancu

Variabel perancu yang terkendali dalam penelitian ini adalah makanan dan minuman, genetik, jenis kelamin, umur, dan berat badan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan selama 3 bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Alat Pemeliharaan Tikus

Alat untuk pemeliharaan tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain wistar adalah kandang dari bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm berjumlah 20 buah karena 1 kandang hanya ditempati 1 ekor tikus, tutup kandang dari anyaman kawat ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air untuk minum, baskom, sarung tangan, timbangan merk *Sartorius melter*.

4.5.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Alat yang digunakan dalam pembuatan pakan tikus adalah timbangan merk *Sartorius melter*, gelas ukur, nampan, mangkuk plastik, sarung tangan, dan loyang.

4.5.1.3 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit

Alat yang digunakan adalah timbangan merk *Sartorius melter*, blender, kompor, loyang, baskom, pisau dan dandang, rotatory evaporator, kertas saring, aluminium foil, beker glass, spatula.

4.5.1.4 Alat untuk Induksi Streptozotocin

- Spuit 1 ml dan 3 ml merk Terumo
- Pipet tetes.

4.5.1.5 Alat untuk Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Alat untuk pengukuran glukosa darah tikus yaitu jarum 26g, dan alat *glucose check test* digital merk Easy Touch.

4.5.1.6 Alat Pengambilan Serum Darah Tikus

Alat ukur pengambilan dan penyimpanan sampel darah yaitu spuit 3 cc merk Terumo, tabung vacutainer non-koagulan 3cc merk OneMed dan tabung sentrifugasi merk Hettich Zentrifugen untuk menyimpan serum.

4.5.1.7 Alat Pemeriksaan Kadar Serum Kolesterol Total Tikus

Alat untuk pemeriksaan kadar serum kolesterol total berupa spektrofotometer, tabung reaksi, sentrifuge. Bahan untuk pemeriksaan kadar serum kolesterol total yaitu serum darah tikus, reagent, pipes 35 mmol/L, sodium cholate 0.5 mmol/L, phenol 28 mmol/L, kolesterol esterase > 0.2 U/mL, kolesterol oxidase > 0.1 U/mL, peroxidase > 0.8 U/mL, 4-aminoantipyrine 0.5 mmol/L.

4.5.1.8 Alat Pembedahan

Alat yang diperlukan untuk pembedahan tikus yaitu:

- Gunting bedah
- Pinset
- Kapas
- Jarum pentul
- Styrofoam
- Papan kayu
- Loyang
- S spuit 1cc merk Terumo

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

- Air minum
- Pakan normal tikus (diet standart) dan pakan diet tinggi lemak (HFD)
- Sekam

4.5.2.2 Bahan Pakan Tikus

- Pakan normal
- Pakan diet tinggi lemak

4.5.2.3 Bahan Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

- Buah tomat segar
- Aseton PA

4.5.2.4 Bahan Induksi Streptozocin

Bahan dan alat yang digunakan adalah streptozotocin (STZ) 100 gram, aquadest, buffer sitrat 3 ml, spuit 1ml dan 3ml merk Terumo, labu ukur 50 ml, vortex, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, beaker glass, aluminium foil, tabung ependorf, alat pH meter, vial kosong steril. STZ dengan pH 4,5.

4.5.2.5 Bahan Pembedahan

Bahan yang digunakan untuk pembedahan tikus yaitu:

- Alkohol spray
- Kethamin dosis 0,2cc

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Tikus model Diabetes Mellitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan berat badan 150 – 200 gram yang diberi diet tinggi lemak selama 7 minggu dan diinduksi Streptozotocin (STZ) dengan dosis 30 ml/kgBB (Zhang *et al*, 2008).

4.6.2 Kadar Serum Kolesterol Total

Kadar serum kolesterol total diambil dari serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang telah diambil melalui jantung (intra kardial) dengan jarum spuit 2 ml pada minggu ke-11 diukur menggunakan alat *spectrophotometer*, dengan menggunakan metode enzimatik fotometrik test CHOD-PAP (Cholesterol Oxidase Phenol

Aminoantipyrin) hasil yang didapat berupa skala interval dalam satuan mg/dL.

4.6.3 Ekstrak Kulit Tomat

Hasil ekstraksi kulit buah tomat yang didapatkan dari tomat yang dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah, kemudian dilarutkan dengan pelarut aseton dan dosis ekstrak kulit buah tomat yang digunakan antara lain 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150mg/kgBB.

4.7 Prosedur Kerja Penelitian

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan pada Tikus

1. Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan sehat yang tersertifikat oleh dokter hewan berasal dari Malang Murine Farm.
2. Awal penelitian, semua tikus ditimbang berat badannya, dan dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
3. Memberikan label pada kandang di tiap kelompok perlakuan.
4. Mengadaptasi tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan pada minggu ke -1 Pada masa adaptasi ini, berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan dua kali dalam satu minggu, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik. Makan dan

minum diganti secara rutin setiap hari sebanyak 1 kali dalam sehari. Penggantian sekam dilakukan 1 kali dalam seminggu.

5. Minggu ke-2 sampai minggu ke-6 diberikan diet tinggi lemak. Kemudian pada minggu ke- 7 tikus diinduksi STZ
6. Minggu ke-7, sekam diganti setiap 2 hari sekali. Kemudian minum diberikan 2 kali sehari tiap pagi dan sore hari.
7. Minggu ke-8 dilakukan pengecekan glukosa darah.
8. Terapi dilakukan sampai minggu ke-11. Pemberian dosis ekstrak kulit tomat adalah 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 150mg/B
9. Pada minggu ke-11 dilakukan pembedahan dan pengambilan darah pada tikus untuk diukur kadar serum kolesterol total dalam darah.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Diet

4.7.2.1 Cara Pembuatan Pakan Standar Tikus

Pakan standart tikus wistar adalah diet normal berupa konsentrat PARS 58,3%, tepung terigu 26% dan air sebesar 19,8%. Jumlah makanan rata-rata 25 g/hari untuk setiap tikus. Cara membuat pakan yaitu:

1. 250 gram tepung terigu merk bogasari segitiga biru , 750 gram scramble pakan, dan air secukupnya.
2. Bahan-bahan diatas diaduk dengan menuangkan air sedikit-demi sedikit sampai adonan teruleni dengan baik.

3. Cetak adonan menjadi bentuk kotak persegi panjang kecil (2-3 cm), kemudian diletakkan diatas loyang.
4. Panggang adonan dengan suhu 100°C selama 20-40 menit hingga pakan kering.
5. Pakan yang sudah kering dan siap diberikan pada tikus diletakkan pada sebuah tempat yang digantungkan pada tepi kandang.

Pakan tinggi lemak yang diberikan berupa PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air sebesar 21,4%. Jumlah makanan rata-rata 25 g/hari untuk setiap tikus.

Cara membuat pakan yaitu:

1. 250 gram tepung terigu merk bogasari segitiga biru, 750 gram scramble pakan, dan air secukupnya.
2. Bahan-bahan diatas diaduk dengan menuangkan air sedikit-demi sedikit sampai adonan teruleni dengan baik.
3. Cetak adonan menjadi bentuk kotak persegi panjang kecil (2-3 cm), kemudian diletakkan diatas loyang.
4. Panggang adonan dengan suhu 100°C selama 20-40 menit hingga pakan kering.
5. Pakan yang sudah kering dan siap diberikan pada tikus diletakkan pada sebuah tempat yang digantungkan pada tepi kandang.

4.7.3 Pembuatan dan Induksi Larutan STZ pada Tikus

Cara pembuatan larutan STZ pada tikus, yaitu:

1. Streptozotocin (STZ) ditimbang sebanyak 100 gram dan dilarutkan dalam 3 ml aquades hingga tercampur dengan rata (Hashimoto dkk., 1990;McAnuff dkk., 2003)
2. pH larutan STZ dicek menggunakan kertas pH, dan apabila pH mencapai 4,5 maka larutan dapat langsung disimpan. Namun jika pH larutan > 4,5 maka ditambahkan asam sitrat 0,1M pada larutan, yang bertujuan untuk menurunkan pH. Dan dalam proses menurunkan ini, pH tidak boleh < dari 4,5.
3. Larutan STZ disimpan dalam suhu 4°C sebelum diinjeksikan (Gunawan, 2014)

Prosedur injeksi Streptozotocin (STZ) pada tikus, yaitu:

1. Tikus diposisikan senyaman mungkin dengan bagian abdomen menghadap kearah frontal
2. Semprotkan alkohol 70% pada abdomen tikus yang akan disuntikkan Larutan STZ 30 mg/kgBB
3. S spuit dimasukkan dengan arah jarum menghadap ke atas dan diinjeksikan pada daerah intraperitoneal

4. Injeksi STZ dilakukan hanya 1 kali secara perlahan dan pastikan larutan terinjeksi semua,
5. Keluarkan spuit, dan usapkan kapas yang telah diberi alkohol pada bekas daerah abdomen tikus yg telah diberi STZ.

4.7.4 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Untuk mengukur kadar glukosa darah tikus, dilakukan beberapa langkah sebagai berikut:

1. Sebelum dilakukan cek gula darah, tikus dipuaskan selama 8 jam terlebih dahulu.
2. Tikus dipegang dengan kedua tangan.
3. Celupkan ekor tikus pada air hangat untuk memudahkan untuk menemukan vena.
4. Mengusapkan alkohol pada daerah yang akan ditusuk.
5. Tusuk ekor tikus dengan menggunakan spuit
6. Ukur darah pada alat untuk mengukur glukosa darah dengan meneteskan darah yang menempelkan ujung spuit atau menempelkan stik pada bagian ekor tikus yang telah ditusuk. Tikus dinyatakan positif DM bila kadar glukosa darah $\geq 126\text{mg/dL}$.

4.7.5 Cara Pembedaan Hewan Coba

1. Posisikan tikus pada posisi abdomen tikus menghadap ke ventral.
2. Tarik peritoneal tikus untuk memastikan daerah yang akan diinjeksikan kethamin sebanyak 2cc.

3. Injeksikan kethamin secara intraperitoneal pada tikus.
4. Tunggu sampai tikus tidak sadar untuk dilakukan prosedur selanjutnya.

4.7.6 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Ekstrak Kulit tomat didapatkan dengan cara berikut:

1. Tomat ditimbang sesuai kebutuhan, dan dicuci sampai bersih
2. Setelah bersih, tomat dimasukkan kedalam air mendidih selama 45 detik
3. Pisahkan kulit dan daging tomat yang telah dikukus dengan menggunakan pisau
4. Kulit tomat yang sudah terpisah dari dagingnya diletakkan diatas loyang yang sudah dikeringkan
5. Kulit tomat dihaluskan dengan menggunakan mortar.
6. Kulit tomat yang sudah dihaluskan dicampurkan dengan aseton, dan diaduk menggunakan spatula sampai homogen. Dan diletakkan didalam beker glass. Kemudian, beker glass ditutup dengan menggunakan aluminium foil.
7. Setelah itu, kulit buah tomat yang diberi aseton disaring dengan kertas saring dan menghasilkan larutan berwarna jingga
8. Setelah tersaring ditambahkan lagi aseton sebagai pelarut setelah itu dipadatkan dengan alat *rotary evaporator vacuum* yang dipanaskan pada suhu medium sampai mendidih

9. Setelah dipadatkan dengan *rotary evaporator* kemudian dipekatkan dengan N_2 dan ditimbang.
10. Ekstrak kulit yang sudah ditimbang kemudian dicampur dengan cortina dan dimasukkan ke dalam kapsul.

Rumus kebutuhan ekstrak dalam 1 kelompok untuk 30 hari

$$X = a/1000 \times t \times \Sigma \text{tikus 1 kelompok} \times P$$

Keterangan:

- X = kebutuhan ekstrak 1 kelompok untuk 30 hari
a = rata-rata berat badan tikus 1 kelompok
t = 30 hari
P(1,2,3) = dosis (mg) ekstrak yang dibutuhkan per kgBB

4.7.7 Pengukuran Kadar Serum Kolesterol total

Pengukuran kadar serum kolesterol total pada tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dilakukan pada minggu ke-10 dengan menggunakan metode enzimatis fotometrik test CHOD-PAP (Cholesterol Oxidase Phenol Aminoantipyrin) dengan prosedur sebagai berikut:

1. Tikus dianastesi dengan cara menginjeksikan kethamin dengan dosis 2cc secara intraperitoneal dan ditunggu hingga tikus lemas tidak sadar
2. Darah diambil dengan spuit 3 ml pada daerah ventrikel kiri jantung
3. Pindahkan darah yang berada di spuit ke tabung vacutainer tanpa mendorong spuit untuk meminimalisir lisisnya eritrosit

4. Masukkan 10 μL serum ditambah 1000 μL reagen kedalam tabung reaksi, kemudian disentrifuge hingga homogen
5. Selanjutnya dimasukkan inkubator selama 20 menit pada suhu 20-25°C, dan dibaca absorbsinya dengan *spektrophotometer* pada panjang gelombang 500 nm dengan larutan blanko sebagai titik nolnya. Hasilnya adalah kadar total kolesterol.
6. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas serum dengan Cobas Mira pada panjang gelombang 546 nm, kemudian lakukan pembacaan hasil.

4.8 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian ini diantaranya:

a. Sisa pakan tikus

Sisa pakan tikus ditimbang dan dicatat setiap hari selama penelitian berlangsung.

b. Berat badan tikus

Berat badan tikus ditimbang kemudian dicatat setiap minggu.

c. Kadar serum kolesterol total tikus

Kadar serum kolesterol total tikus diukur pada saat akhir penelitian dengan menggunakan metode CHOD-PAP

4.9 Analisis Data

Dalam penelitian ini seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Program *SPSS for windows Versi 16.0*. yaitu membandingkan

perbedaan kadar kolesterol total antar kelompok pada penelitian. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Uji normalitas dengan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data karena $n < 50$
- b. Uji homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
- c. Untuk mengetahui perbedaan kadar serum kolesterol total dalam 5 perlakuan dilakukan analisis komparasi dengan *One Way Anova* jika data berdistribusi normal dan homogen menggunakan uji *Kruskal Wallil* jika data tidak berdistribusi normal atau data tidak homogen. Analisis dilanjutkan dengan *Post-hoc test* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

4.10 Diagram Alur Penelitian

