

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental (*true experimental*) pada hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan menggunakan desain penelitian *Randomized Post Test Control Group Design*. Pada desain penelitian ini dilakukan randomisasi untuk menentukan anggota kelompok kontrol dan perlakuan sehingga diharapkan akan memiliki sifat yang sama sebelum dilakukan perlakuan. Kelompok eksperimen diberikan perlakuan dan dilakukan pengukuran kemudian hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak menerima perlakuan.

Metode pemilihan sampel menggunakan *Simple Random Sampling* karena setiap populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dijadikan sebagai sampel. Pengelompokan dan pemberian perlakuan pada sampel dilakukan dengan acak karena hewan coba, tempat percobaan dan bahan yang digunakan bersifat homogen.

4.2 Subyek Penelitian

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diambil secara acak. Pada penelitian ini subyek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu sebagai berikut:

- a. Perlakuan I : Pemberian diet normal (kelompok kontrol negatif), yaitu tikus yang tidak diinduksi STZ dan tidak diberi diet tinggi lemak (*high fat diet*)
- b. Perlakuan II : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ (kelompok kontrol positif) namun tidak diberi ekstrak aseton kulit tomat
- c. Perlakuan III : Pemberian *high fat diet* kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan ekstrak aseton kulit tomat dengan dosis 50 mg/kgBB
- d. Perlakuan IV : Pemberian *high fat diet* kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan ekstrak aseton kulit tomat dengan dosis 100 mg/kgBB
- e. Perlakuan V : Pemberian *high fat diet* kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan ekstrak aseton kulit tomat dengan dosis 150 mg/kgBB

Dosis ekstrak aseton kulit tomat yang di gunakan diadaptasi dari hasil penelitian yang telah dilakukan Nyamthabad dan Umesh (2014) yang meneliti tentang evaluasi aktivitas antidiabetes dari ekstrak biji tomat.

Kriteria inklusi:

- Tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar
- Warna bulu putih
- Umur 6-8 minggu
- Berat badan 120-150 gram

- Badan sehat (aktif dan tidak cacat)

Kriteria eksklusi

- Tikus dengan perubahan kondisi seperti sakit pada saat penelitian berlangsung
- Tikus mati pada saat penelitian berlangsung

Estimasi jumlah sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus indra (1999)

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

Keterangan:

t : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

p : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok

Jumlah kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah 5 (lima), maka jumlah sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

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

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

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

$$n = 4$$

Dengan demikian jumlah hewan coba untuk masing-masing kelompok adalah 4 ekor tikus. Sedangkan 5 (jumlah kelompok perlakuan) x 4 (jumlah perlakuan) = 20

dapat diartikan bahwa jumlah minimal sampel yang di butuhkan adalah 20 (dua puluh).

4.3 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak aseton kulit tomat.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter pulau Langerhans tikus.
- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus, usia tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal, pakan hewan dan kondisi lingkungan kandang.
- d. Variabel tak terkontrol dalam penelitian ini adalah keadaan awal pankreas tikus sebelum dilakukan perlakuan, kondisi psikologis tikus selama perlakuan, imunitas dan reaksi hipersensitivitas atau alergi.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

- a. Pemeliharaan dan perawatan tikus dilakukan di laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- b. Perhitungan diameter pulau Langerhans dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan yaitu dimulai dari bulan Juni sampai dengan Agustus 2017.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Alat Pemeliharaan Tikus

Alat yang digunakan untuk memelihara 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* (ketelitian 0,1 kg).

4.5.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Alat yang digunakan dalam pembuatan pakan tikus adalah timbangan, gelas ukur, nampan, mangkok plastik dan sarung tangan.

4.5.1.3 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

Alat yang digunakan adalah timbangan, blender, kompor, loyang, baskom, dandang, kertas saring, *rotary evaporator*, dan *aluminium foil*.

4.5.1.4 Alat Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Ekstrak kulit tomat dimasukkan ke dalam kapsul yang masing-masing berisi 0,5 gram. Setiap tikus mendapat dua kapsul yang diberikan secara per oral sesuai dengan dosisnya masing-masing setiap hari.

4.5.1.5 Alat untuk Induksi Streptozotocin

Disposable spuit 1 ml, disposable spuit 3 ml, labu ukur 50 ml, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, *beaker glass*, aluminium foil, tabung appendorf, alat inhalasi, pH meter, vial kosong steril.

4.5.1.6 Alat Untuk Pembedahan Tikus

Alat yang digunakan untuk pembedahan tikus adalah gunting bedah, steriofoam, jarum pentul, dan alkohol 70%.

4.5.1.7 Alat Pembuatan *Slide Jaringan Pankreas Tikus*

Mesin *Tissue Tex Procesor*, alat microtome, *auto staining*, inkubator, *hot plate*, kaset *embedding*, *water bath*, *cold plate*.

4.5.1.8 Alat untuk Pengukuran Pulau Langerhans

Alat untuk pengukuran pulau Langerhans tikus yaitu mikroskop, kamera, dan dotslide Olympus.

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Air minum, bahan pakan normal (diet standart), sekam.

4.5.2.2 Makanan Tikus

- a. Pakan normal, terdiri dari tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *palm olein* dan air.
- b. Diet tinggi lemak (*high fat diet*), terdiri dari BR1, asam cholat, tepung terigu, kolesterol, dan minyak babi.

4.5.2.3 Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

Bahan yang diperlukan adalah tomat merah segar, aseton, dan aquadest.

4.5.2.4 Induksi Streptozotocin

Bahan untuk induksi streptozotocin pada tikus adalah larutan streptozotocin 100 gram dan etanol 70%.

4.5.2.5 Pembuatan Jaringan

Bahan untuk membuat jaringan adalah xylol, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut, alkohol asam, cat HE, air dan amonia lithium karbonat.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1. Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model Diabetes Melitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan Berat Badan 120-150 gram yang di injeksi Streptozotocin (STZ) dengan dosis 30 ml/kgBB. Streptozotocin adalah salah satu zat diabetogenik yang

bersifat toksik, terutama terhadap sel beta pankreas, dan jika diberikan kepada hewan coba seperti tikus dapat menyebabkan hewan coba tikus menjadi Diabetes melitus (Nugroho, 2006). Jumlah dosis STZ yang diinjeksi diadaptasi dari penelitian yang dilakukan Pranata (2010) yang menggunakan hewan coba tikus model DM tipe 2 sebagai subjek dalam penelitiannya.

4.6.2. Ekstrak Aseton Kulit Tomat

Hasil ekstraksi kulit tomat yang di dapatkan dari tomat yang dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah, kemudian dilarutkan dengan pelarut aseton dan dosis ekstrak aseton kulit tomat yang digunakan pada penelitian ini adalah 50 mg/kgBB/hari, 100 mg/kgBB/hari, 150 mg/kgBB/hari.

4.6.3 Diameter Pulau Langerhans

Pengamatan yang dilakukan terhadap jaringan pankreas yang telah diwarnai dengan HE adalah diameter pulau Langerhans Menggunakan perbesaran 400x. Diameter yang di gunakan adalah diameter terpanjang dan di ukur dalam satuan μm . Menggunakan 5 (lima) *sample* pulau Langerhans pada setiap pankreas.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Persiapan Hewan Coba

1. Pemilihan hewan coba sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar sebanyak 20 ekor.

2. Sebelum penelitian dilaksanakan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu yaitu melakukan penyesuaian diri dengan lingkungan yang baru dengan cara dimasukkan pada kandang dengan diberi pakan normal dan minum selama 1 minggu. Pemberian makan dan minum sebanyak 1 kali dalam sehari. Pemberian makan diletakkan di atas tutup kandang (anyaman kawat). Sedangkan minum diberikan secara *ad libitum*. Sekam diganti tiga hari sekali pada saat adaptasi sedangkan pada saat minggu ke-7 (tikus sudah DM) penggantian sekam dilakukan 1 hari sekali karena tikus dengan Diabetes melitus banyak mengeluarkan urin sehingga sekam harus sering diganti (Yuliani, 2012).

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Diet

Cara Pembuatan dan Pemberian Pakan Standar Tikus

Pakan standart tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar adalah diet normal berupa konsentrat PARS 58,3%, tepung terigu 26% dan air sebesar 19,8%. Cara membuat pakan yaitu:

1. 750 gram *crumble* pakan, 250 gram tepung teringu, 750mL air.
2. Bahan-bahan diatas diaduk dengan menuangkan air sedikit-demi sedikit sampai adonan teruleni dengan baik.
3. Setiap harinya satu ekor tikus diberikan sekitar 30 gram diet normal dengan berat yang sama. Tikus hanya di beri makan sekali dalam sehari dengan meletakkan pakan di atas tutup kandang tikus
4. Pada masa adaptasi, semua tikus diberikan diet normal. Sedangkan unuk memulai perlakuan, diet normal hanya diberikan pada kontrol negatif.

4.7.3 Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Bahan yang digunakan untuk membuat pakan diet tinggi lemak adalah dengan komposisi BR1 (merek broiler)=221.75 gram, terung terigu=123.25 gram, asam *Cholat*=0.098 gram, kolesterol=7.105 gram, dan minyak babi=184.25 ml.

4.7.4 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:

Cara menginjeksikan larutan STZ adalah sebagai berikut:

- a. Tikus diposisikan dengan abdomen menghadap ke arah penyuntik.
- b. Pada bagian abdomen didesinfeksi dengan menggunakan alkohol 70%.
- c. Kulit tikus dicubit hingga ke bagian otot.
- d. Spuit ditusukkan pada bagian abdomen dan akan terasa agak keras bila sudah di bagian intraperitoneal.
- e. STZ diinjeksikan pada daerah intraperitoneal.

- f. Bila telah selesai, bagian yang disuntik disemprotkan kembali dengan alkohol 70%.
- g. Setelah diinjeksi STZ, satu minggu kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa untuk mengkonfirmasi keadaan Diabetes melitus Tipe 2 (Zhang *et al.*, 2008).

4.7.5 Pemberian Estrak Aseton Kulit Tomat pada Tikus

- a. Tomat di timbang dan di cuci
- b. Buah tomat direbus terlebih dahulu pada suhu sekitar 70°C
- c. Tomat diambil kulitnya saja dan dibersihkan dari buahnya kemudian dijemur hingga kering.
- d. Setelah kering, kulit tomat dihaluskan dengan menggunakan blender hingga berbentuk seperti serbuk
- e. Kulit tomat yang sudah menjadi serbuk dicampurkan dengan aseton kemudian disimpan dalam botol kaca yang dibungkus dengan aluminium foil.
- f. Selanjutnya filtrasi dilakukan untuk mengambil cairan kuning (aseton dan likopen) dari ekstrak tomat.
- g. Lalu evaporasi dilakukan untuk memisahkan likopen dan aseton menggunakan alat *rotary evaporator*.
- h. Ekstrak kulit tomat yang sudah jadi dicampur dengan cortina supaya lebih mudah larut dengan lemak
- i. Ekstrak aseton kulit tomat yang sudah jadi, dimasukkan ke dalam kapsul yang masing-masing berisi 0,5 gram. Dosis ekstrak aseton kulit tomat yang

dipakai pada penelitian ini adalah 50 mg/kgBB/hari, 100 mg/kgBB/hari, 150 mg/kgBB/hari.

4.7.6 Proses Pembuatan Jaringan

4.7.6.1 Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Jaringan atau Spesimen Penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan buffer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
4. Di masukan kekaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Jaringan kemudian diproses dengan alat *Automatic Tissue Tex Procesor* atau dengan cara manual
6. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan *Automatic Tissue Tex Procesor* selama 90 Menit
7. Alarm bunyi tanda selesai.

4.7.6.2 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

1. Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Procesor*
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan di potong dengan alat *microtome* ketebalan 3-5 mikron

4.7.6.3 Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di tempatkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit

4.7.6.4 Proses Pewarnaan HE

- | | | |
|----|--------------------------------------|------------------------------|
| 1. | Cat utama Harris Hematoksilin selama | 10-15 Menit |
| 2. | Cuci dengan air mengalir selama | 15 Menit |
| 3. | Alkohol asam 1 % | 2-5 Celup |
| 4. | Amonia lithium karbonat | 3-5 Celup (bila kurang biru) |
| 5. | Eosin | 10-15 Menit |

4.7.6.5 Alkohol bertingkat

- | | | |
|---|-----------------|---------|
| • | Alkohol 70% | 3 menit |
| • | Alkohol 80% | 3 menit |
| • | Alkohol 96% | 3 menit |
| • | Alkohol Absolut | 3 menit |

4.7.6.6 Penjernihan (*Clearring*)

- Xylol 15 menit
- Xylol 15 menit

4.7.6.7 *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

Slide / *object glass* ditutup dengan entelan kemudian ditutup dengan *cover glass* dan biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering siap untuk diamati (Lee, 1991).

4.7.6.8 Pengukuran Diameter Pulau Langerhans

Pengukuran dilakukan menggunakan dotslide Olympus untuk mengukur diameter pulau Langerhans. *Slide* di *scan* lalu pilih objek yang akan di teliti kemudian klik *arbitrary line* lalu klik pada bagian yang akan di ukur selanjutnya alat akan secara otomatis menunjukkan hasil pengukuran jika pada gambar preparat ditarik garis sesuai dengan bagian yang ingin diteliti.

4.8 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian ini diantaranya:

a. Berat badan tikus

Berat badan tikus ditimbang setiap hari selama 11 (sebelas) minggu masa penelitian berlangsung kemudian di ukur rata-ratanya.

b. Kadar glukosa darah puasa

Kadar glukosa darah puasa di ambil setelah perlakuan pembuatan tikus Diabetes melitus sebelum di lakukan pemberian terapi ekstrak aseton kulit tomat untuk memastikan bahwa tikus percobaan benar-benar sudah menjadi Diabetes melitus.

c. Pengambilan dan pewarnaan sampel (pulau Langerhans)**d. Pengukuran diameter pulau Langerhans****4.9 Analisis Data**

Dalam penelitian ini seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Program *SPSS for windows Versi 23.0*. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Uji normalitas dengan uji *Shapiro-wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data
- b. Uji Homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok
- c. Analisis komparasi dengan *One Way Anova* jika data berdistribusi normal dan homogen dan menggunakan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak berdistribusi normal atau data tidak homogen
- d. Uji LSD dilakukan untuk mengetahui kelompok-kelompok yang mempunyai perbedaan

- e. Uji korelasi Spearman. Uji ini bertujuan untuk menilai apakah terdapat hubungan antara perbedaan dosis dengan efek ekstrak aseton kulit tomat terhadap diameter pulau Langerhans tikus.

4.10 Alur Penelitian

