

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Pada penelitian ini, data diambil hanya pada akhir penelitian setelah perlakuan dibandingkan hasilnya pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, serta kelompok perlakuan.

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang dipelihara di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. manusia dan hewan secara teknis menunjukkan proses fisiologis yang berbeda dan level anatomi yang mirip, manusia mempunyai DNA 99% mirip dengan tikus (Alexandru, 2011).

Kriteria inklusinya adalah:

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar
- b. Jantan, karena tikus betina memiliki hormon estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak maupun kolesterol
- c. Berat badan 150-200 gram
- d. Usia 6-8 minggu
- e. Kondisi sehat (aktif bergerak, tidak ada kelainan anatomis)
- f. Memiliki bulu putih dan bersih

Kriteria eksklusinya adalah:

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

Pada penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif : Pemberian diet normal dan tidak diberi *Streptozotocin* (STZ)
2. Kelompok kontrol positif : Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ (model DM tipe 2), tetapi tidak diberikan terapi
3. Kelompok perlakuan I : Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50 mg/kg BB
4. Kelompok perlakuan II : Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100 mg/kg BB
5. Kelompok perlakuan III : Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150 mg/kg BB

#### 4.2.1 Jumlah Sampel

Untuk penelitian eksperimental dapat dirumuskan sebagai berikut:

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

Keterangan:

$p$  = jumlah kelompok perlakuan

$n$  = jumlah replikasi

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 yang digunakan untuk sebelas kelompok perlakuan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Dari hasil tersebut, didapatkan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 20 (dua puluh) ekor tikus, dimana angka tersebut adalah jumlah minimal sampel.

### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **4.3.1 Tempat Penelitian**

Pemeliharaan tikus serta pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran.

#### **4.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada tahun 2016 di mulai di bulan Agustus sampai dengan bulan Desember.

### **4.4 Variabel Penelitian**

#### **4.4.1 Variabel Bebas**

1. Dosis ekstrak kulit buah tomat

#### **4.4.2 Variabel Terikat**

1. Persentase hepatosit yang degenerasi

#### **4.4.3 Variabel Terkendali**

1. Berat badan
2. Usia
3. Jenis kelamin
4. Pakan hewan
5. Kondisi lingkungan tempat tinggal hewan

#### **4.5 Definisi Operasional**

##### **4.5.1 Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2**

Tikus model Diabetes Mellitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dengan berat badan dengan kisaran 150-200 gram yang diinjeksi *Streptozotocin* (STZ) dengan dosis 30 ml/kgBB STZ dan diberi diet tinggi lemak. Didapatkan gula darah puasa > 126 mg/dl setelah injeksi.

##### **4.5.2 Ekstrak Kulit Tomat**

Ekstrak kulit tomat dengan pelarut aceton. Dosis ekstrak kulit tomat yang digunakan pada penelitian ini adalah 50 mg/kgBB/hari, 100 mg/kgBB/hari, 150 mg/kgBB/hari.

### **4.5.3 Persentase Degenerasi Hepatosit**

Hepatosit yang diamati adalah yang mengalami degenerasi. Hepatosit yang degenerasi mempunyai ciri-ciri tampak vakuola pada sel, pembengkakan pada sel, dan atau kekeruhan pada sitoplasma. Hepatosit degenerasi dihitung jumlahnya dibandingkan dengan jumlah sel keseluruhan dan dikalikan 100% untuk mendapatkan persentase degenerasi hepatosit.

## **4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian**

### **4.6.1 Bahan dan Instrumen Pemeliharaan Hewan Coba**

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang digunakan sebanyak 30 ekor. Hewan tersebut dipelihara di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB, di dalam kandang berupa bak plastik 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang yang terbuat dari kawat., dimana dalam satu bak digunakan untuk satu ekor tikus. Alat dan bahan lain yang dibutuhkan adalah botol air untuk minum beserta air minumnya, bahan pakan, timbangan “*Sartorius melter*”, baskom serba guna (untuk alat bantu penimbangan berat badan, dll), *handscoon* dan *masker*, serta sekam untuk kandang tikus.

### **4.6.2 Bahan dan Instrumen Diet Normal**

Bahan untuk membuat diet normal adalah tepung terigu 750 gram, crumble BR1 dan air secukupnya. Rasio antara tepung dan crumble yang digunakan adalah sekitar 1:2. Sedangkan alat yang digunakan adalah baskom, penggiling pakan, dan loyang.

#### **4.6.3 Bahan dan Alat Diet Tinggi Lemak**

Bahan yang digunakan untuk membuat pakan diet tinggi lemak adalah BR1 221,75 gram, tepung terigu 123,25 gram, asam kolat 0,098 gram, kolesterol 7,105 gram, dan minyak babi 184,24 gram. Alat yang digunakan timbangan, mangkok plastik, gelas ukur, loyang, dan sarung tangan.

#### **4.6.4 Bahan dan Instrumen Pembuatan Sediaan Ekstrak Kulit Tomat**

Bahan yang digunakan adalah tomat segar, Aquades, Aseton, *Rotary evaporator*, blender, kompor, timbangan, baskom, loyang, gelas ukur, kertas saring, aluminium foil, dan dandang.

#### **4.6.5 Bahan dan Instrumen Pembuatan larutan dan Injeksi Streptozotocin (STZ)**

Bahan yang digunakan untuk pembuatan STZ adalah streptozotocin (STZ) 100 gram, aquades, dan buffer sitrat 3 ml. Sedangkan untuk alat yang digunakan adalah *disposable spuit* 1ml, *disposable spuit* 3ml, labu ukur 50 ml, vortex, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, beaker glass, aluminium foil, tabung ependorf, alat inhalasi pH meter, vial kosong steril.

#### **4.6.6 Bahan dan Instrumen Pembedahan Tikus**

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

#### **4.6.7 Alat untuk Pemeriksaan Hepatosit dan Penghitungan Sel**

Alat untuk pemeriksaan hepatosit tikus yaitu mikroskop, kamera, dan *dotslide Olympus*. Sedangkan, alat untuk menghitung sel adalah program *Cell Count*.

## **4.7 Metode Pengumpulan Data**

- Sisa pakan tikus yang dihitung setiap hari selama penelitian berlangsung
- Berat badan tikus yang diukur setiap hari
- Menghitung sel hepatosit yang degenerasi dengan melihat persentase sel degenerasi per lima lapang pandang dengan pembesaran 400x (Muhartono, et al, 2015)

### **4.7.1 Prosedur Penelitian**

#### **4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba**

Pada penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Tikus diberi pakan normal masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti satu kali setiap harinya. Penggantian sekam dilakukan setiap dua kali dalam seminggu.

#### **4.7.1.2 Pembuatan dan Pemberian Diet Normal**

Diet normal sebagai pakan standar yang digunakan dalam penelitian adalah *crumble* yang dibuat dengan mencampurkan tepung terigu. Setiap harinya satu ekor diberikan sekitar 25 gram diet normal, 1 kali dalam sehari dengan meletakkan pakan di atas tutup kandang tikus.

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

Pakan tinggi lemak pada penelitian ini terbuat dari campuran BR1, tepung terigu, air, dan minyak babi. Setelah semua bahan dicampur menjadi satu, selanjutnya campuran tersebut dicetak. Pemberian pakan tinggi lemak ini diberikan sebanyak 25 gram pada setiap tikus yang diisi ulang setiap harinya.

Pakan tinggi lemak diberikan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan mulai dari minggu ke dua hingga akhir penelitian.

#### **4.7.2 Injeksi Larutan STZ pada Tikus Putih**

Cara injeksi 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%.

#### **4.7.3 Proses Pembuatan Jaringan**

##### **4.7.3.1 Proses Pematangan Jaringan Berupa Makros**

1. Spesimen penelitian harus telah difiksasi dengan formalin 10% atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam
2. Pada lokasi yang akan diteliti dipilih jaringan yang terbaik
3. Jaringan dipotong dengan ketebalan kurang lebih 2-3mm.
4. Potongan dimasukkan ke kaset lalu diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Jaringan diproses melalui alat *Automatic Tissue Tex Processor* atau dengan cara manual selama 90 menit sesuai dengan standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB

6. Proses selesai ditandai dengan alarm yang berbunyi

#### **4.7.3.2 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan**

1. Dari mesin *Tissue Tex Prosesor* jaringan diangkat
2. Sesuai dengan kode jaringan, jaringan diblok dengan paraffin
3. Jaringan dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron dengan *microtome*

#### **4.7.3.3 Proses Deparafinisasi**

Setelah dipotong dengan *microtome*, jaringan diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80 derajat . Lalu jaringan dimasukkan ke dua tabung larutan *xyol* masing-masing 20 menit. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam empat tabung *alcohol* masing-masing selama 3 menit (hidrasi). Dan terakhir jaringan dimasukkan ke air mengalir selama 15 menit.

#### **4.7.3.4 Proses Pewarnaan HE**

Dilakukan pengecatan utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit. Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Dichelupkan pada alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup. Dichelupkan pada amonia lithium karbonat sebanyak 3-5 kali. Dichelupkan dalam eosin dan dibiarkan selama 10-15 menit.

#### **4.7.3.5Alkohol Bertingkat**

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

#### 4.7.3.6 Penjernihan (*Clearring*)

- Xylol 15 menit
- Xylol 15 menit

#### 4.7.3.7 *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

*Slide/objectglass* ditutup dengan *cover glass* dan biarkan *slide* kering pada suhu ruangan. Setelah *slide* kering siap untuk diamati.

#### 4.7.4 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Cara ekstraksi kulit tomat adalah sebagai berikut:

- Tomat ditimbang dan dicuci
- Tomat yang sudah dicuci, dimasukkan ke dalam dandang yang sudah berisi air kemudian dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah.
- Kulit tomat dikupas dan ditata di loyang, kemudian dijemur hingga kering.
- Setelah kering, kulit tomat dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk seperti serbuk.
- Ekstrak kulit tomat yang sudah menjadi serbuk dicampurkan dengan aseton kemudian disimpan dalam botol kaca yang dibungkus dengan aluminium foil.
- Filtrasi dilakukan untuk mengambil cairan kuning (aseton dan likopen) dari ekstrak tomat.
- Evaporasi dilakukan untuk memisahkan likopen dan aseton menggunakan alat *rotary evaporator*.
- Ekstrak kulit tomat yang sudah jadi, lalu dicampur dengan *cortina* agar lebih mudah larut dengan lemak.

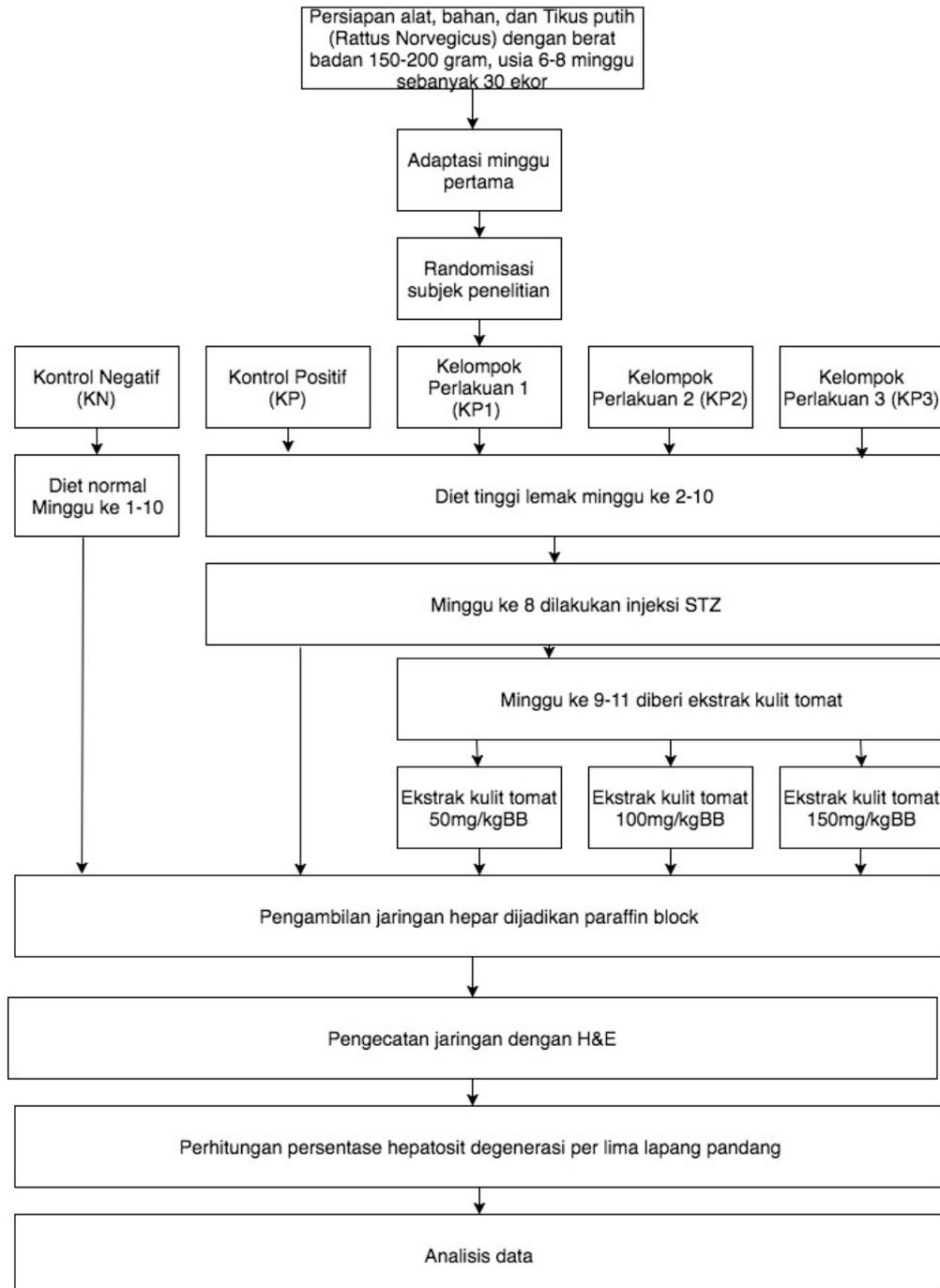
- i. Ekstrak kulit tomat yang sudah dicampurkan dengan *cortina*, dimasukkan ke dalam kapsul yang masing-masing berisi 0,5 gram. Setiap tikus mendapat dua kapsul yang diberikan secara per oral sesuai dengan dosisnya masing-masing setiap hari.

#### **4.8 Analisis Data**

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

1. Uji normalitas dengan uji *saphiro-wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data.
2. Uji Homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
3. 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.
4. Uji *Post-hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok-kelompok yang mempunyai perbedaan.
5. Uji korelasi regresi untuk mengetahui hubungan terapi ekstrak kulit tomat terhadap degenerasi hepatosit.

#### 4.9 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Bagan Alur Peneliti

