

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah studi eksperimental laboratorium dimana sampel dibagi dalam beberapa kelompok perlakuan. Metode penelitian yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design*. *Post test only control group* adalah salah satu jenis *true experimental design* yang memungkinkan peneliti untuk mengukur pengaruh intervensi yang diberikan kepada kelompok perlakuan dengan membandingkan hasil pengukuran pada kelompok kontrol (Montgomery, 2001).

Pemilihan obyek penelitian dalam pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Hal ini disebabkan jenis hewan coba, tempat percobaan, dan bahan penelitian lainnya yang bersifat homogen, sehingga setiap sampel yang digunakan dalam penelitian memiliki peluang yang sama untuk masuk pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan.

Ada 5 macam perlakuan yang diberikan kepada subjek, yaitu diet normal (P_0), diet normal + induksi streptozotosin (P_1), diet normal + induksi streptozotosin + bubuk kayu manis dengan berbagai dosis (P_2, P_3, P_4).

Tabel 4.1 Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
P ₀	X ₀₁	X ₀₂	X ₀₃	X ₀₄	X ₀₅
P ₁	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅
P ₂	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅
P ₃	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅
P ₄	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅

Keterangan:

P₀ : kontrol negatif

P₁ : kontrol positif (diinduksi streptozotosin)

P₂ : diinduksi streptozotosin + bubuk kayu manis dosis 1 (27 mg)

P₃ : diinduksi streptozotosin + bubuk kayu manis dosis 2 (54 mg)

P₄ : diinduksi streptozotosin + bubuk kayu manis dosis 3 (108 mg)

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah tikus putih jenis *rattus norvegicus strain wistar* jantan. Pemilihan tikus jantan sebagai sampel percobaan dikarenakan pada tikus jantan tidak mengalami adanya perubahan hormon setiap bulannya akibat adanya siklus menstruasi. Adanya fluktuasi hormon pada tikus dikhawatirkan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Sedangkan untuk pemilihan tikus sebagai hewan coba dikarenakan tikus adalah hewan coba yang paling sering digunakan dan memiliki kedekatan dengan manusia, diantaranya merupakan mamalia, pemakan segala (omnivora), mudah berkembang biak, dan mempunyai metabolisme yang sesuai dengan manusia (Ramarao dan Srinivasan, 2007).

4.2.2 Besar Sampel

Dalam penelitian ini terdapat lima perlakuan, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, P₂, P₃, dan P₄. Rumus perhitungan jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan berdasarkan Hanafiah, 2008 adalah sebagai berikut :

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah sampel

15 = Nilai deviasi

Berdasarkan hasil perhitungan di atas diperoleh bahwa untuk lima perlakuan diperlukan pengulangan sebanyak 5 kali untuk masing-masing perlakuan, sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Agar setiap sampel mempunyai peluang yang sama dalam mendapat perlakuan maka dalam pengambilan sampel digunakan randomisasi dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Memberi nomor urut 1 – 25 pada subyek penelitian.
- Mengambil bilangan random sebanyak jumlah sampel dengan menggunakan tabel acak.
- Memberi rangking pada bilangan random yang diperoleh.
- Memasukkan jenis perlakuan dalam sampel pada rancangan penelitian

4.2.4 Kriteria Inklusi

- a. Berumur 2-3 bulan.
- b. Berat badan 120-220 gram.
- c. Warna bulu putih dan bersih.
- d. Aktif dan mau makan.
- e. Sehat, ditandai dengan bulu baik dan mata jernih.
- f. Tidak pernah mengalami perlakuan sebelumnya.

4.2.5 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan selama penelitian berlangsung.
- b. Tikus yang mati selama proses penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)

Variabel terikat yang diukur dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol HDL dalam serum darah tikus putih jenis *rattus norvegicus strain wistar* yang digunakan dalam penelitian.

4.3.2 Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bubuk kayu manis (*Cinnamomum burmanii*).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sedangkan

untuk pemeriksaan serum HDL dilakukan di Laboratorium Kawi Malang. Penelitian dilakukan selama 45 hari. Pembagian hari tersebut dibagi menjadi 7 hari masa adaptasi, 2 hari setelah tikus diinduksi STZ, dan 35 hari pemberian intervensi. Pemilihan waktu selama 35 hari didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Suganthi *et al.* (2005) yang menunjukkan hewan percobaan sudah memperlihatkan adanya dislipidemia.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Alat Pemeliharaan Binatang Coba

Alat yang dibutuhkan untuk memelihara tikus putih jenis *rattus norvegicus strain wistar* adalah :

- a. Kandang dari bak plastik.
- b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat.
- c. Sekam
- d. Botol air untuk minum.

4.5.1.2 Alat Pengambilan Sampel Darah Binatang Coba

Alat yang dibutuhkan untuk mengambil sampel darah tikus putih jenis *rattus norvegicus strain wistar* adalah :

- a. Jarum suntik dan spuit *disposable*
- b. Tabung untuk penyimpanan serum.
- c. Mikropipet.

4.5.1.3 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Alat yang dibutuhkan untuk pembuatan pakan tikus putih jenis *rattus norvegicus strain wistar* adalah :

- a. Sendok.
- b. Timbangan analitik.
- c. Baskom.
- d. Sarung tangan.

4.5.1.4 Alat Pemberian Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis diberikan pada tikus melalui spuit yang ujungnya dipasang sonde yang bisa melewati mulut, esophagus, hingga lambung.

4.5.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan Pakan Tikus

Bahan pakan tikus terdiri dari diet standar dengan komposisi comfeed PAR-S dan tepung terigu yang diberikan dengan perbandingan 2:1 ditambah dengan air secukupnya (Muwarni dkk., 2006).

- b. Streptozotosin
- c. Bubuk Kayu Manis

4.6 Definisi Operasional Variabel

4.6.1 Kadar HDL Darah

Kadar HDL yang diukur dalam penelitian adalah HDL serum hewan coba yang diambil dari jantung yang sebelumnya telah diberi perlakuan selama 35 hari sebanyak 5 mL dengan satuan mg/dL.

4.6.2 Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis adalah bubuk yang dibuat dari kulit kayu manis yang telah mengalami proses pengolahan. Jenis kayu manis yang digunakan adalah *Cinnamomum burmanii* karena merupakan jenis kayu manis yang tumbuh banyak di Indonesia. Bubuk kayu manis tersebut dibeli di Avia dengan merk "Jay's Kitchen" untuk meminimalisasi adanya perbedaan jenis dari kayu manis yang akan diberikan pada tikus, yang nantinya akan menyebabkan perbedaan hasil akhir. Bubuk kayu manis tersebut diberikan kepada tikus melalui sonde berdasarkan 3 dosis yang telah diterapkan.

4.6.3 Streptozotosin

Streptozotosin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranos] diperoleh dari *Streptomyces achromogene* dapat digunakan untuk menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intraperitoneal dengan dosis 55 mg/kg BB. Dalam waktu 36-48 jam, streptozotosin akan merusak sel β pankreas (Kume *et al.*, 2004).

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Pra Penelitian

Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi dengan sistem rancangan acak lengkap agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan menyesuaikan dengan lingkungan. Pada masa adaptasi berat badan tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi agar dapat memantau berat badan tikus agar tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi baik.

4.7.2 Prosedur Perhitungan Dosis Kayu Manis

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khan *et al.* tahun 2003, mengujicobakan pemberian ekstrak kayu manis kepada manusia sebesar 1, 3, dan 6 gram. Dari penelitian tersebut disebutkan bahwa dosis pemberian ekstrak kayu manis sebesar 3 gram paling mampu menurunkan kadar gula darah secara signifikan (Khan *et al.*, 2003).

Walaupun penelitian tentang pengaruh kayu manis telah beberapa kali dilakukan, dalam penelitian tersebut bahan yang digunakan adalah ekstrak dari kayu manis yang sulit untuk didapatkan. Oleh karena itu dalam penelitian ini, peneliti menggunakan bubuk kayu manis yang diujicobakan ke tikus dengan menggunakan dosis konversi dari manusia ke tikus

Tabel 4.2 Konversi Dosis Antar Spesies

Konversi Dosis antar Spesies (berdasarkan luas permukaan tubuh)						
	Mencit (20 g)	Tikus (200 g)	Marmot (400 g)	Kelinci (1,5 kg)	Anjing (12 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	60,0
Marmot (400 g)	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,6
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,10	0,22	1,0	3,1
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,32	1,0

Sumber : Sjabana, 2006

- Dalam penelitian ini diambil dosis 3 gram sebagai patokan pemberian bubuk kayu manis kepada tikus. Besar dosis yang diberikan kepada tikus adalah :

$$3 \text{ gram} \times 0,018 = 0,054 \text{ gram} = 54 \text{ mg}$$

- Penentuan dosis yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan deret $\frac{1}{2}$ n, n dan 2n, sehingga didapatkan :

$$\text{Dosis 1} = \frac{1}{2} \times \text{dosis} = 27 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 2} = 1 \times \text{dosis} = 54 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 3} = 2 \times \text{dosis} = 108 \text{ mg}$$

4.7.3 Prosedur Pemberian Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis yang telah diukur sesuai perlakuan dilarutkan ke dalam 2 ml air, kemudian diberikan kepada tikus dengan menggunakan sonde yang diberikan sekali sehari. Penambahan air sebanyak 2 ml didasarkan pada kemampuan maksimal lambung tikus yaitu 4 ml (Wilanti, 2008). Bubuk kayu manis diberikan kepada kelompok tikus P₂, P₃, dan P₄ setiap hari selama 35 hari.

4.7.4 Prosedur Penimbangan Berat Badan Tikus

Kalibrasi wadah untuk tempat tikus ketika akan ditimbang

Tikus diambil dari kandang

Tikus diletakkan dalam wadah plastik

Ditimbang

Berat badan tikus dicatat

Tikus dikembalikan ke kandang

Penimbangan pertama kali dilakukan saat sebelum menginduksi tikus dengan streptozotosin. Sedangkan penimbangan terakhir dilaksanakan sebelum tikus dibedah. Selain itu tiap minggunya berat badan tikus ditimbang secara berkala. Untuk menghitung selisih berat badan tikus dilakukan dengan cara mengurangi berat badan akhir dengan berat badan awal kemudian dicari rata-ratanya.

4.7.5 Prosedur Permodelan Tikus Diabetik

Pertama-tama tikus yang telah dipersiapkan diukur berat badannya dan diukur kadar glukosa darahnya. Kemudian tikus diinjeksi dengan streptozotosin secara intraperitoneal dengan dosis 55 mg/kg BB. Selain diberi suntikan, tikus juga diberi perawatan dan pemberian makan seperti biasa. Setelah 48 jam diinjeksi streptozotosin, tikus diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif diabetes melitus jika kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl (Firdaus dkk, 2010).

4.7.6 Prosedur Pembuatan Pakan

Penimbangan bahan (PARS dan terigu) sesuai berat komposisi

↓
Pencampuran bahan

↓
Penambahan air matang secukupnya

↓
Aduk adonan hingga rata dan mudah dibentuk

↓
Penimbangan pakan untuk setiap ekor tikus

↓
Bentuk bulatan dari pakan sesuai jumlah tikus menggunakan tangan

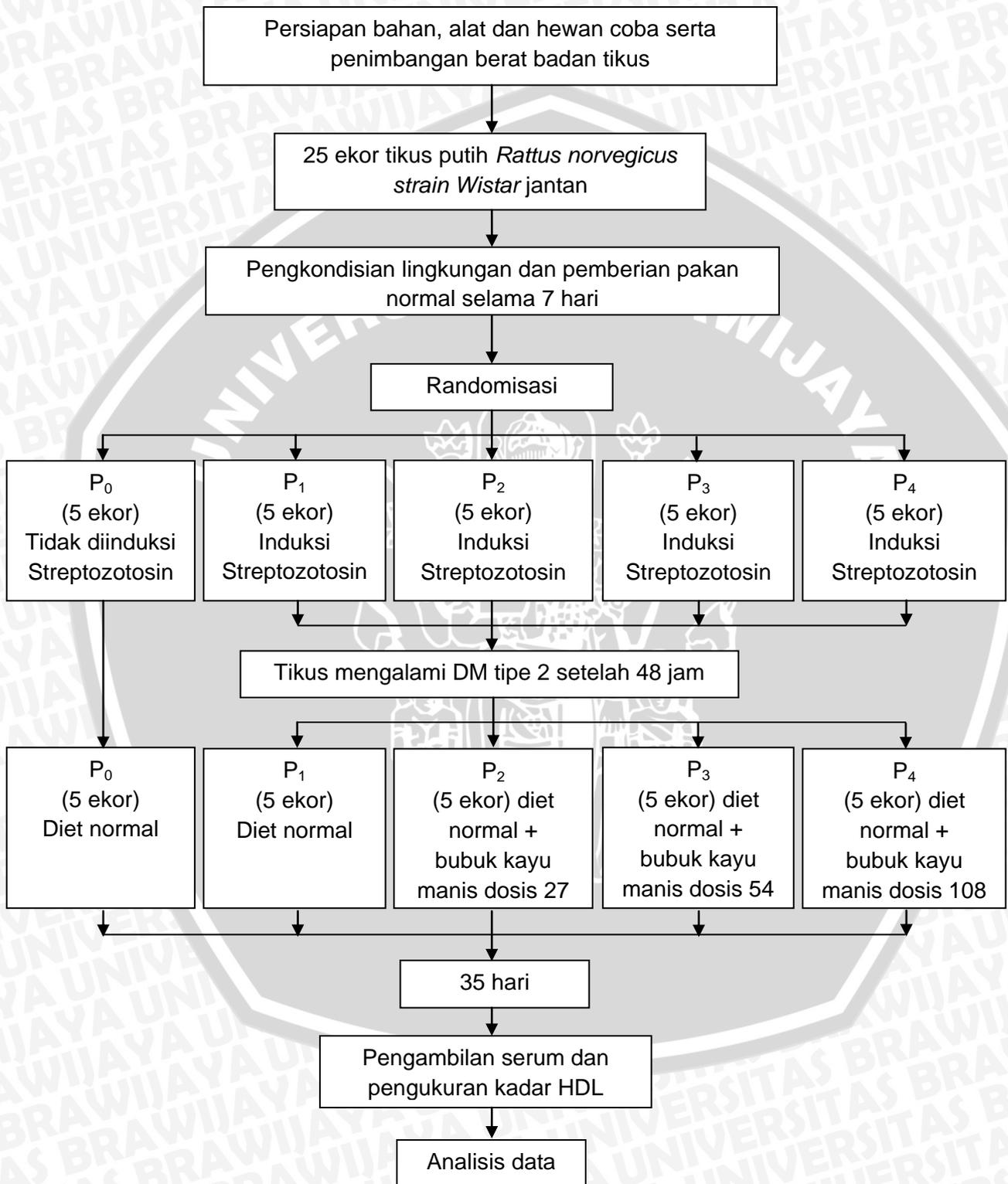
↓
Pembagian pakan untuk tiap ekor tikus

Berat pakan yang diberikan dalam sehari adalah 40 g dan dibagi kedalam dua kali waktu makan. Tiap sekali waktu makan, jumlah pakan yang diberikan adalah 20g.

4.7.7 Prosedur Perlakuan Hewan Coba Pasca Penelitian

Tikus dianestesi dengan menggunakan Ketamin 50 mg/ml dengan dosis 0,4 ml secara intraperitoneal. Kemudian dibiarkan lemas dan setelah itu dilakukan pembedahan guna mengambil serum darah tikus melalui jantung. Tikus yang telah selesai mengalami proses pembedahan kemudian dikuburkan.

4.7.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alir

4.8 Analisis Data

Dalam melakukan analisis dengan menggunakan SPSS, terlebih dahulu harus diketahui apakah data tersebut memiliki distribusi normal atau tidak. Dalam penelitian ini, uji normalitas yang dilakukan menggunakan metode Shapiro-Wilk karena lebih cocok digunakan untuk sampel dengan jumlah kecil yaitu ≤ 50 (Dahlan, 2008).

Syarat dalam melakukan uji *One Way ANOVA* adalah data yang digunakan harus memiliki distribusi normal dan varians data harus sama. Karena data kolesterol HDL memiliki distribusi data normal, maka langkah selanjutnya yang harus dilakukan adalah melihat kesamaan varians data. Bila nilai $p > 0.05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan varians antara kelompok data yang dibandingkan (Dahlan, 2008).

Setelah diketahui bahwa data normal dan memiliki kesamaan varians data, maka analisis hasil penelitian dapat dilanjutkan dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* dengan menggunakan software SPSS 17 for windows dengan tingkat kepercayaan 95%. *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan rata-rata kadar serum kolesterol total antara kelompok kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan. Penelitian dianggap signifikan jika $P \leq 0,05$. Jika terdapat perbedaan terhadap kelompok bermakna, dilanjutkan dengan melakukan uji Tukey HSD (Post-Hock Test). Post Hock adalah uji hipotesis yang dilakukan pada lebih dari dua kelompok. Uji Post Hock dilakukan apabila nilai $P < 0,05$. Uji Tukey HSD akan memperlihatkan kelompok mana saja yang berbeda hasilnya, sehingga dapat digunakan sebagai pembanding (Dahlan, 2008).