

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode *True Experimental, Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh air kelapa muda terhadap kadar SGOT-SGPT pada tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar diabetes yang diinduksi aloksan. Penelitian ini menggunakan randomisasi untuk pemilihan sampel. Metode yang digunakan adalah *accidental sampling*. *Accidental sampling* adalah teknik penentuan sampel berdasarkan kebetulan, yakni: siapa saja yang kebetulan bertemu dengan peneliti dan dipandang dapat menjadi sumber data, maka sampel tersebut akan digunakan di dalam penelitian (Sugiyono, 2007). Hewan coba dibagi dalam 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok positif Diabetes diberikan insulin, dan kelompok positif Diabetes dengan pemberian perlakuan air kelapa muda 4mL/hari selama 14 hari. Setiap hari hewan coba diberi makan dan minum normal. Sebelum menginjeksi aloksan, hewan coba diukur terlebih dahulu berat badannya untuk menghitung dosis aloksan. Selain itu, hewan coba akan dipuaskan dengan cara memberikan makan hewan coba 20gram/tikus kemudian diukur kadar gula darahnya dengan menggunakan *glucostick* dan *glucometer* merk *Accu Check*. Hal ini bertujuan untuk membandingkan kadar gula darah hewan coba sebelum dan sesudah diinjeksi aloksan. Setelah hewan coba memenuhi kriteria Diabetes Mellitus tipe 1, hewan coba akan diberikan perlakuan masing-masing kelompok baik dengan

insulin maupun dengan air kelapa muda dalam jangka waktu yang telah ditentukan. Setelah itu, hewan coba akan dibedah untuk mengambil sampel darah yang nantinya akan memeriksa kadar SGOT-SGPT.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur Wistar.

4.2.2 Sampel Penelitian

Perhitungan jumlah sampel pada penelitian ini dihitung dengan mengacu pada rumus dari Kemas (2005). Rumus tersebut adalah sebagai berikut.

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

Dimana:

t = jumlah perlakuan / kelompok (dalam penelitian ini terdapat 4 kelompok)

n = besar sampel dalam 1 kelompok

Dari penjelasan rumus di atas, maka jumlah sampel setiap kelompok perlakuan dapat dihitung sebagai berikut.

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

$$[(4-1) (n-1)] \geq 15$$

$$3 (n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dalam penelitian ini, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus sehingga total jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 tikus. Berikut adalah perincian jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini:

Tabel 4.1 Perincian Perlakuan dan Jumlah Hewan Coba

Kelompok	Macam Diet dan Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol Negatif	Non Diabetes : diet normal	6
Kontrol Positif	Diinduksi Aloksan, diet normal tanpa perlakuan	6
Insulin	Diinduksi Aloksan, diet normal + insulin	6
Air Kelapa Muda 4mL	Diinduksi Aloksan, diet normal + air kelapa muda 4mL selama 14 hari	6

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih *Rattus norvegicus* galur Wistar, dewasa, jantan, mata jernih, dan bulu putih.
2. Berat badan sekitar 170-200 gram.
3. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomik.

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian.
2. Tikus yang mati.

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

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

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejak Mei 2015 sampai Desember 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas (independen) pada penelitian ini adalah air kelapa muda.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung (dependen) dari penelitian ini adalah kadar SGOT dan SGPT tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar diabetes yang diinduksi aloksan.

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar, dewasa jantan, berjumlah 24 ekor, berat badan berkisar antara 170-200 gram dan dibeli dari Pusvetma Surabaya.
2. Tikus diabetes diinduksi dengan aloksan merk Sigma dengan dosis 150mg/kgBB yang diinjeksikan secara intraperitoneal dan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Tikus dianggap diabetes jika kadar gula darah puasa di atas 150mg/dL. Pengukuran gula darah tersebut dilakukan menggunakan alat *glucometer* dan *glucostick* merk *Accu Check* dengan sampel darah diambil dari arteri ekor tikus.
3. Air kelapa muda yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kriteria: dari kelapa muda, berusia 6 bulan, berwarna hijau muda, dipanen dari pohon kelapa di Malang Selatan, masih terdapat endosperma cair yang nantinya akan diberikan pada tikus dengan cara disonde.
4. Diet normal berupa pakan standar di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
5. *Euthanasia* dengan ketamin dilakukan pada tikus yang hendak dibedah setelah 2 minggu pemeliharaan tikus dengan perlakuan seperti dipaparkan di atas. Ketamin tersebut diinjeksikan secara intramuskular dengan dosis 0,2mL/tikus di bagian paha tikus. Pembedahan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Dari hasil pembedahan, setiap hewan akan diambil sampel darah dengan spuit 10cc kemudian dimasukkan ke dalam *vacutainer* dengan

EDTA lalu dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk menghitung kadar SGOT dan kadar SGPT hewan coba. Penghitungan kadar SGOT dan SGPT dilakukan setelah memperoleh serum darah dari proses sentrifugasi sampel darah. Serum tersebut diperiksa dengan metode spektrofotometri dengan panjang gelombang 340nm.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

1. Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang beserta penutup kandang dan botol minum.
2. Alat untuk menimbang berat badan tikus: timbangan.
3. Alat untuk mengukur sisa pakan dan minum tikus: timbangan.
4. Alat untuk memberikan intervensi: spuit sonde, spuit injeksi aloksan (1cc).
5. Alat untuk mengukur gula darah: jarum, *glucometer*, *glucostick*.
6. Alat untuk pembedahan: spuit untuk ketamin, papan bedah, *scalpel*, pinset, gunting bedah, jarum pentul, penjepit organ.
7. Alat untuk mengambil sampel: spuit pengambil darah (10cc), *vacutainer* dengan EDTA.
8. Alat untuk mengukur kadar SGOT dan SGPT: *vacutainer* berisi darah dengan EDTA, *ependorf*.
9. Alat perlindungan diri: masker dan *handscone*.

4.6.2 Bahan

1. Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan tikus: air, pakan, dan sekam.
2. Bahan yang digunakan untuk mengintervensi tikus: insulin dan air kelapa.
3. Bahan yang digunakan untuk mengukur kadar SGOT dan SGPT: sampel serum darah tikus.
4. Bahan yang digunakan untuk *euthanasia* tikus: ketamin.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama 7 hari untuk beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Setelah itu, dilakukan seleksi sesuai kriteria inklusi. Selama aklimatisasi, hewan coba diberikan makan dan minum secara teratur. Setiap hewan coba diberikan makan sebanyak 40 gram/ekor/hari dan minum sebanyak 80mL/ekor/hari. Setiap hari, peneliti akan mengukur sisa pakan serta minum hewan coba dan juga setiap minggu akan dilakukan pengukuran berat badan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui jumlah atau porsi makan dan minum hewan coba serta mengetahui pertambahan berat badan hewan coba sehingga dapat dijadikan patokan maupun pembanding saat diberikan perlakuan.

4.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah aklimatisasi, setiap tikus akan dilakukan seleksi sesuai kriteria inklusi. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi akan dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut.

1. Kelompok 1: Kelompok tikus kontrol negatif, yakni: tikus tidak diinduksi aloksan, tanpa perlakuan insulin ataupun air kelapa muda, diberi makan makanan tikus normal, dan air minum tikus normal.
2. Kelompok 2: Kelompok tikus kontrol positif, yakni: tikus diinduksi aloksan agar menjadi diabetes, tanpa perlakuan insulin ataupun air kelapa muda, diberi makan makanan tikus normal, dan air minum tikus normal.
3. Kelompok 3: Kelompok tikus yang diinduksi aloksan agar menderita Diabetes Mellitus, diberi perlakuan: diet normal, air minum normal, dan diberi insulin.
4. Kelompok 4: Kelompok tikus yang diinduksi aloksan agar menderita Diabetes Mellitus, diberi perlakuan: diet normal, air minum normal, dan diberi air kelapa muda 4mL/hari selama 14 hari.

4.7.2.1 Induksi Diabetes

Hewan coba diinjeksi dengan aloksan yang telah diuji sebelumnya. Dosis aloksan yang diberikan pada hewan coba yaitu: 150mg/kg BB hewan coba, dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing hewan coba dan disuntik secara intraperitoneal. Sebelum diinjeksi aloksan, peneliti menimbang hewan coba untuk menentukan dosis aloksan. Selain itu, hewan coba juga dipuaskan dengan cara memberikan makanan sebanyak 20gram/tikus. Setelah hewan coba dipuaskan, peneliti melakukan pengukuran kadar gula darah dengan menggunakan alat *glucometer* dan

glucostick merk *Accu Check* dengan sampel darah diambil dari arteri ekor tikus. Hal ini dilakukan untuk memperoleh data yang nantinya akan dibandingkan dengan kadar gula darah hewan coba setelah diinjeksi aloksan. Hewan coba dikatakan diabetes jika kadar glukosa darah puasa hewan coba di atas 150mg/dL.

4.7.2.2 Pemberian Air Kelapa Muda

Hewan coba diberikan air kelapa muda dengan dosis 4mL/hari. Pemberian air kelapa muda tersebut dilakukan satu kali per hari dengan cara disonde selama 14 hari.

4.7.2.3 Proses *Euthanasia*

Hewan coba dieuthanasia dengan cara diinjeksikan ketamin secara intramuskular di paha tikus dengan dosis 0,2mL/tikus. Hewan coba yang telah dieuthanasia dibedah untuk mengambil sampel darah dari setiap hewan coba.

4.7.2.4 Pengambilan Sampel

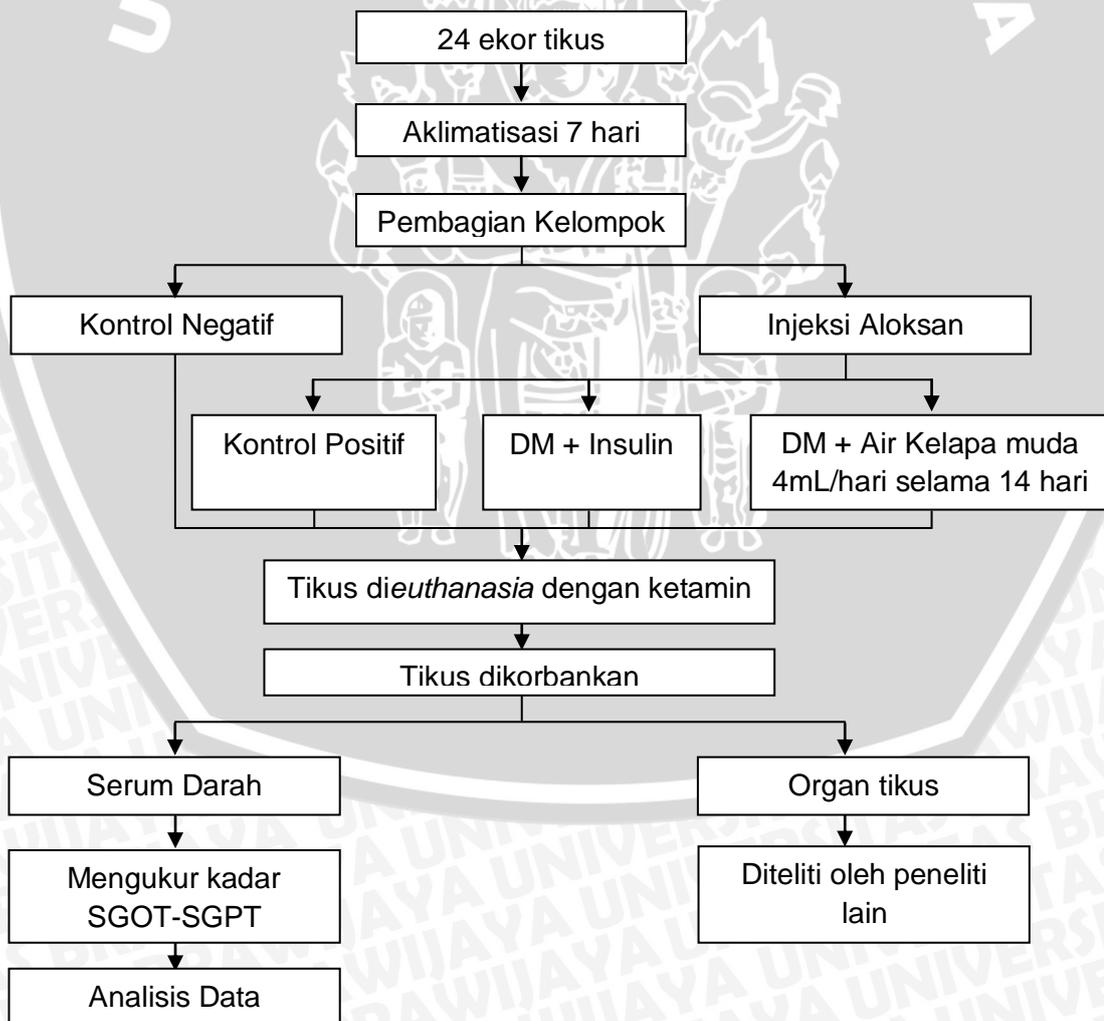
Pengambilan sampel dilakukan setelah dilakukan pembedahan pada hari ke-15. Sampel darah diambil melalui jantung dengan menggunakan spuit 10cc dan juga dilakukan pengambilan organ hewan coba yang nantinya akan diteliti oleh penelitian yang lain. Sampel darah yang berada di spuit 10cc tersebut dimasukkan ke dalam *vacutainer* berwarna ungu dengan EDTA dan diberi label. Sampel tersebut dikirim ke

Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk menghitung kadar SGOT dan kadar SGPT hewan coba.

4.7.2.5 Metode Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT

Sampel darah hasil pembedahan tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000rpm, kemudian mengambil serum darah hewan coba yang nantinya akan dilakukan pengukuran kadar SGOT dan SGPT dengan metode spektrofotometri, panjang gelombang 340nm.

4.7.3 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian



4.8 Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 17. Data penelitian yang telah diperoleh akan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitasnya. Jika data berdistribusi normal dan variasi homogen, maka akan digunakan uji parametrik *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc Test* dengan metode LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika data berdistribusi abnormal dan variasi tidak homogen, maka selanjutnya akan dilakukan uji nonparametrik Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney jika didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Nilai p dikatakan signifikan jika nilai $p < 0,05$ memiliki arti tingkat kepercayaan yang digunakan penguji adalah 95%. Tingkat kepercayaan 95% berarti tingkat kesalahan yang mungkin terjadi adalah 5% (Dahlan, 2011).

