

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental murni (*true eksperimental design*) secara *in vivo* serta menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* penelitian yang dilakukan pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) dengan model Diabetes Melitus tipe 2, karena pengambilan sampel yang dilakukan secara intrakardial memiliki resiko jika tikus tidak dapat bertahan sampai akhir penelitian apabila dilakukan sebelum penelitian selesai dilakukan. Pengambilan kelompok dilakukan dengan randomisasi untuk menentukan anggota kelompok kontrol dan anggota kelompok perlakuan yang diharapkan nantinya memiliki sifat dan kriteria yang sama sebelum dilakukan penelitian, selain itu randomisasi dilakukan agar setiap tikus memiliki kesempatan yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Pengambilan data kadar TG dilakukan pada akhir setelah dilakukan perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

#### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Universitas Brawijaya, Malang.

### 4.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Dalam penelitian ini subjek penelitian dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan yaitu :

Kontrol Negatif	Kelompok tikus dengan pemberian diet normal
Kontrol Positif (Model DM Tipe 2)	Kelompok tikus dengan diet tinggi lemak dan injeksi STZ, sebagai model DM Tipe2
Perlakuan I	Kelompok tikus model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50mg/kgBB.
Perlakuan II	Kelompok tikus model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100mg/kgBB.
Perlakuan III	Kelompok tikus model DM tipe 2 dan diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150mg/kgBB.

### 4.4 Perhitungan Sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus:

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

Keterangan

$t$  : 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 kedelapan 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.

#### 4.5 Kriteria Sampel

##### 4.5.1 Kriteria Inklusi

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan
- Usia 6-8 minggu
- Berat badan 150-200 gram
- Kondisi sehat (tikus aktif bergerak)

e. Memiliki bulu putih dan bersih

#### 4.5.2 Kriteria Eksklusi

Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang mati selama masa perlakuan.

### 4.6 Variabel Penelitian

#### 4.6.1 Variabel Bebas (Independen)

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

#### 4.6.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar serum trigliserida (TG) dalam darah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan.

### 4.7 Definisi Operasional

#### 4.7.1 Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus model Diabetes Melitus tipe 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dengan berat badan 150 – 200 gram yang diberi diet tinggi lemak selama 2 minggu dan diinduksi Streptozotocin (STZ) dengan dosis 30 ml/kgBB. STZ digunakan sebagai penginduksi diabetes pada hewan coba. Komposisi diet tinggi lemak mengandung karbohidrat, protein (tepung terigu), lemak (kolesterol, minyak babi), air dan asam cholate. Asam cholate merupakan *ionic detergent* yang digunakan untuk persiapan liposome dan isolasi lipid. Asam cholate ini larut dalam air, digunakan untuk lisis sel oleh *bile-acid* (Zhang et al, 2008).

#### 4.7.2 Kadar Serum Triglicerida

Kadar serum trgliserida diambil dari serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan yang diambil pada minggu kedua belas, diukur dengan menggunakan alat *spectrophotometer*, dengan hasil yang didapat berupa skala interval dalam satuan mg/dL.

#### 4.7.3 Ekstrak Kulit Tomat

Hasil ekstraksi buah tomat dan aseton untuk terapi berbentuk menyerupai serbuk yang tidak halus. Serbuk ini dibuat dengan cara mengukus tomat hingga terpisah antara daging buah dan kulit. Kemudian kulit di tempatkan pada loyang setelah itu dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari hingga kering dan selanjutnya dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Dosis ekstrak kulit buah tomat yang digunakan antara lain 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 150mg/kgBB.

### 4.8 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.8.1 Alat Penelitian

##### 4.8.1.1 Alat Pemeliharaan Tikus

Alat yang digunakan untuk memelihara tikus putih jenis *Rattus novergicus* strain wistar adalah kandang dari bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm berjumlah 50 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*.

#### 4.8.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

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

#### 4.8.1.3 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit

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

#### 4.8.1.4 Alat untuk Injeksi Streptozotocin

Sprit 1 ml dan 3 ml merk Terumo, pipet tetes.

#### 4.8.1.5 Alat untuk Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

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

#### 4.8.1.6 Alat Pengambilan Serum Darah Tikus

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

#### 4.8.1.7 Alat Pemeriksaan Kadar Serum TG Tikus

Alat untuk pemeriksaan kadar serum berupa spektrofotometer. Bahan untuk pemeriksaan kadar serum trigliserida yaitu serum darah tikus, dan TG Kit Test merk BiosystemS.

#### 4.8.1.8 Alat Pembedahan

Alat yang diperlukan untuk pembedahan tikus yaitu:

- Gunting bedah
- Pinset
- Kipas
- Jarum pentul
- Styrofoam
- Papan kayu
- Loyang
- Spuit 1cc merk Terumo

#### 4.8.2 Bahan Penelitian

##### 4.8.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Air minum
- b. Pakan normal tikus (diet standart)
- c. Sekam

##### 4.8.2.2 Bahan Pembuatan Makanan Tikus

- a. Pakan normal
- b. Pakan diet tinggi lemak (*high fat diet*)

Pembuatan HFD (high fat diet) dengan komposisi BR1 221,75 gram, tepung terigu 123,25 gram, asam cholat 0,098 gram, kolesterol 7,105 gram, minyak babi 184,25 mL.

##### 4.8.2.3 Bahan Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

Bahan yang diperlukan untuk membuat ekstrak kulit tomat, yaitu :

- Buah tomat segar
- Aseton

#### 4.8.2.4 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.

#### 4.8.2.5 Bahan Pembedahan

Bahan yang digunakan untuk pembedahan tikus yaitu:

- Alkohol spray
- Kethamin dosis 0,2cc

### 4.9 Prosedur Kerja Penelitian

#### 4.9.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan pada Tikus

1. Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan sehat yang tersertifikat oleh dokter hewan berasal dari Malang Murine Farm.
2. Pada 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 pertama. Pada masa adaptasi ini, berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan dua kali dalam 1minggu, 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. Dan penggantian sekam dilakukan 2 kali dalam seminggu.

5. Pada minggu kedua sampai minggu keenam diberikan diet tinggi lemak. Dan pada minggu ketujuh tikus diinduksi STZ
6. Pada minggu ketujuh, sekam diganti setiap 2 hari sekali. Dan minum diberikan 2 kali sehari tiap pagi dan sore hari.
7. Pada minggu kedelapan dilakukan pengecekan glukosa darah.
8. Terapi dilakukan sampai minggu ke sembilan. Dosis ekstrak kulit tomat adalah 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 150mg/B
9. Pada minggu kedua belas dilakukan pembedahan dan pengambilan darah pada tikus untuk diukur kadar serum trigliserida dalam darah.

#### **4.9.2 Pembuatan dan Pemberian Diet**

##### **4.9.2.1 Cara Pembuatan Pakan Tikus**

Jumlah makanan rata-rata 25mg/hari untuk setiap tikus. Cara membuat pakan yaitu:

- a. 750 gram scramble pakan, 250 gram tepung terigu, 750mL air.
- b. Bahan-bahan diatas diaduk dengan menuangkan air sedikit-demi sedikit sampai adonan teruleni dengan baik.
- c. Cetak adonan menjadi bentuk persegi panjang, dan diletakkan diatas loyang.
- d. Panggang adonan sekitar 20-40 menit dengan suhu 100°C.

Pakan yang sudah jadi diletakkan pada sebuah tempat yang digantungkan pada tepi kandang.

##### **4.9.2.2 Pembuatan dan Induksi Larutan STZ pada Tikus**

Cara pembuatan larutan STZ pada tikus, yaitu:

- a. Streptozotocin (STZ) ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambah aquades, kemudian dilarutkan hingga tercampur dengan baik atau homogen.
- b. pH larutan STZ dicek menggunakan kertas pH, dan apabila pH mencapai 4,5 maka larutan dapat langsung disimpan. Namun jika pH larutan lebih dari 4,5 maka ditambahkan asam sitrat 0,1M pada larutan, yang bertujuan untuk menurunkan pH. Dan dalam proses menurunkan ini, pH tidak boleh lebih rendah dari 4,5.
- c. Larutan STZ disimpan dalam suhu 4°C sebelum diinjeksikan (Gunawan, 2014)

Prosedur injeksi Streptozotocin (STZ) pada tikus, yaitu:

- a. Tikus diposisikan senyaman mungkin dengan bagian abdomen menghadap kearah frontal
- b. Semprotkan alkohol 70% pada abdomen tikus yang akan disuntikkan STZ
- c. Spuit dimasukkan dengan arah jarum menghadap keatas dan masuk pada daerah intraperitoneal
- d. Injeksi STZ secara perlahan dan pastikan larutan terinjeksi semua
- e. Keluarkan spuit, dan usapkan kapas yang telah diberi alkohol pada bekas daerah abdomen tikus yg telah diberi STZ

#### 4.9.2.3 Cara Mengukur Kadar Glukosa Darah Tikus

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

- a. Sebelum dilakukan cek gula darah, tikus dipuasakan selama 8 jam terlebih dahulu.

- b. Tikus dipegang dengan kedua tangan.
- c. Celupkan ekor tikus pada air hangat untuk memudahkan untuk menemukan vena.
- d. Mengusapkan alkohol pada daerah yang akan ditusuk.
- e. Tusuk ekor tikus dengan menggunakan spuit
- f. 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  $\geq 126$ mg/dL.

#### 4.9.2.4 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Pembuatan Ekstrak Kulit tomat didapatkan melalui proses berikut:

- a. Tomat ditimbang sesuai kebutuhan, dan dicuci sampai bersih
- b. Setelah bersih, tomat dikukus dalam dandang
- c. Pisahkan kulit dan daging tomat yang telah dikukus dengan menggunakan pisau
- d. Kulit tomat yang sudah terpisah dari dagingnya diletakkan diatas loyang yang sudah dikeringkan
- e. Kulit buah tomat dijemur dibawah sinar matahari sampai kering
- f. Setelah kulit buah tomat kering, haluskan dengan menggunakan blender
- g. Kulit tomat yang sudah dihaluskan dicampurkan dengan aseton, dan diaduk menggunakan spatula sampai homogen. Dan diletakkan pada beker glass. Setelah itu, beker glass ditutup dengan menggunakan aluminium foil

- h. Setelah itu, ekstrak kulit buah tomat disaring dengan kertas saring dan menghasilkan larutan berwarna jingga
- i. Setelah terpisah, ekstrak diletakkan pada alat rotatory evaporator untuk memisahkan larutan aseton dan ekstrak kulit tomat

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 dosis masing-masing setiap hari.

#### 4.9.2.5 Pengukuran Kadar Serum Trigliserida

Pengukuran kadar serum trigliserida pada tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan dilakukan pada minggu kesepuluh dengan prosedur sebagai berikut:

- a. Tikus dianestesi dengan cara menginjeksikan kethamin dengan dosis 2cc secara intraperitoneal dan ditunggu hingga tikus lemas tidak sadar
- b. Darah diambil dengan spuit 3 ml pada daerah ventrikel kiri jantung
- c. Pindahkan darah yang berada di spuit ke tabung vacutainer tanpa mendorong spuit untuk meminimalisir lisisnya eritrosit
- d. Masukkan 10  $\mu\text{L}$  serum ditambah 1000  $\mu\text{L}$  reagen kedalam tabung reaksi, kemudian disentrifuge hingga homogen
- e. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C, dan dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* pada panjang gelombang 500 nm

- f. Dilakukan pembedahan dengan cara tikus yang telah pingsan ditaruh pada papan yang dialasi dengan styrofoam dalam kondisi telentang dengan kondisi kaki dan tangan dijepit dengan jarum pentul kemudian dibedah pada bagian perut sampai daerah dada

#### 4.9.2.5 Cara Pembiusaan Hewan Coba

- a. Posisikan tikus pada posisi abdomen tikus menghadap ke ventral
- b. Tarik peritoneal tikus untuk memastikan daerah yang akan diinjeksikan kethamin sebanyak 2cc
- c. Injeksikan kethamin secara intraperitoneal pada tikus
- d. Tunggu sampai tikus tidak sadar untuk dilakukan prosedur selanjutnya

#### 4.10 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 setiap minggu.

#### 4.11 Analisa Data

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

- a. Uji normalitas dengan uji *kolmogorov-swirnov* 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 *Post-hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok- kelompok yang mempunyai perbedaan.
- e. Uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan terapi ekstrak kulit tomat terhadap TG.

4.12 Alur Penelitian

