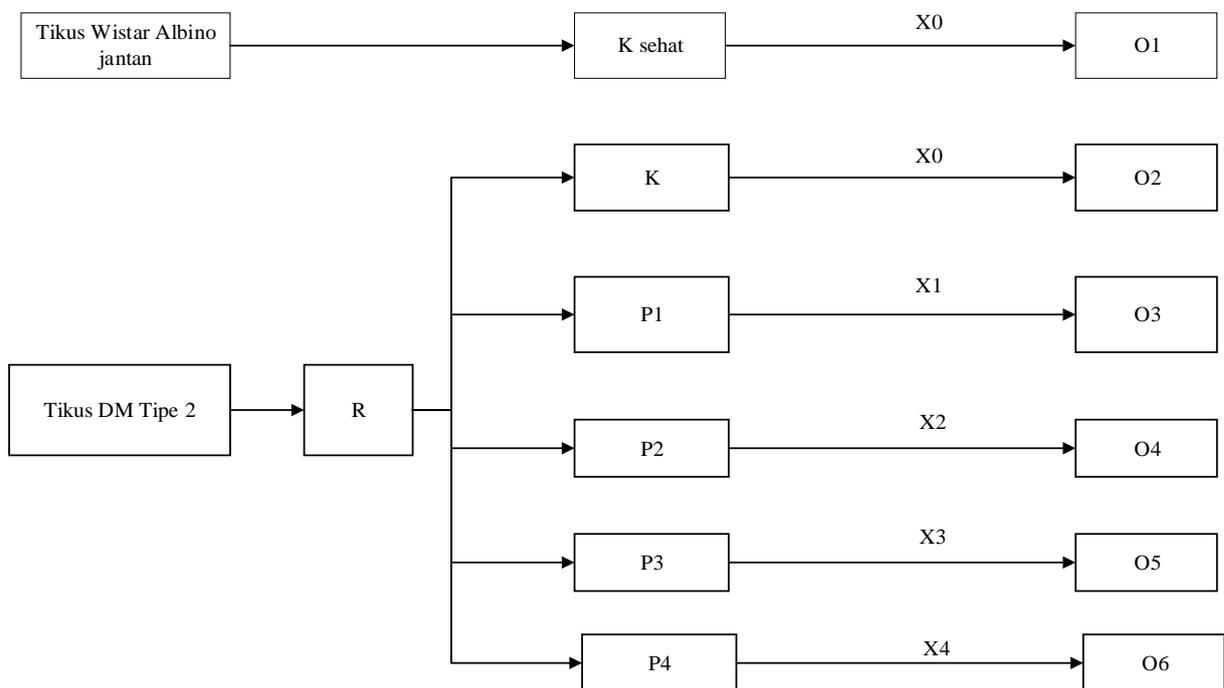


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik (*true experimental designs*) dengan rancangan *randomized post-test only with control group design*, yang dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*completely randomized design*). Tujuan penggunaan desain ini adalah untuk membandingkan dua kelompok atau lebih dengan cara randomisasi dan mengurangi faktor perancu dalam penelitian. Hewan percobaan adalah tikus albino galur Wistar dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok intervensi dan kelompok kontrol. Tikus dibuat menjadi tikus DM tipe 2 dengan cara memberikan makanan tinggi lemak selama 2 minggu diikuti STZ 1x 45 mg/kg dan NA 110 mg/kg [89–91], sampel penelitian memenuhi syarat gula darah puasa > 200 mg/dl, dilanjutkan pemberian ekstrak likopen dan metformin selama 28 hari [43]. Keluaran (*Outcome*) adalah indeks fagositosis makrofag, rerata kadar gula darah (HbA1c), kadar ROS, NO, dan AGEs. Desain penelitian terangkum dalam **Gambar 12**.



**Gambar 12. Desain Penelitian**

Keterangan :

- R = Randomisasi ( Pembagian tikus DMT2 menjadi 5 kelompok )
- K sehat = Kelompok kontrol sehat tikus normal diberi 1mL minyak kelapa
- K = Kelompok kontrol tikus DM tipe 2 diberi 1mL minyak kelapa
- P1,2,3,4 = Tikus DMT2 yang diberi intervensi metformin dan ekstrak likopen
- X0 = Pemberian 1 mL minyak kelapa
- X1 = Kelompok tikus DMT2 diberi metformin 250 mg/kg bb/hari dalam 1 mL minyak kelapa
- X2 = Kelompok tikus DMT2 diberi metformin 250 mg/kg bb/hari ekstrak likopen 10 mg/kg bb/hari dalam 1 mL minyak kelapa
- X3 = Kelompok tikus DMT2 diberi metformin 250 mg/kg bb/hari ekstrak likopen 20 mg/kg bb/hari dalam 1 mL minyak kelapa
- X4 = Kelompok tikus DMT2 diberi metformin 250 mg/kg bb/hari dan likopen 40 mg/kg bb/hari dalam 1 mL minyak kelapa
- O 1,2,3,4,5,6 = Observasi setelah intervensi yaitu pengukuran indeks fagositosis makrofag, rerata kadar gula darah ( HbA1c ), kadar ROS, NO dan AGEs

## **B. Populasi dan sampel**

### **1. Populasi penelitian**

Populasi (hewan percobaan) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Wistar*) yang berasal dari laboratorium pangan dan gizi Pusat Antar Universitas (PAU), Universitas Gadjah Mada (*UGM*) Yogyakarta.

### **2. Sampel penelitian**

Penentuan besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer, sebagai berikut:  $(n-1)(t-1) \geq 15$  ( $n$  = besar sampel,  $t$  = besar kelompok sampel). Berdasarkan ketentuan tersebut diperoleh besar sampel tiap kelompok perlakuan minimal 4 ekor. Jumlah sampel yang digunakan minimal 24 ekor. Penelitian ini dilakukan pada 6 kelompok perlakuan dengan antisipasi *drop out*, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor,

### **3. Kriteria inklusi**

- a. Tikus albino jantan galur Wistar
- b. Kondisi sehat, aktif bergerak
- c. Usia 6-8 minggu
- d. Berat badan 160-200 gr
- e. Gula darah puasa  $> 200$  mg/dl

### **4. Kriteria eksklusi**

- a. Kelainan anatomis
- b. Perubahan berat badan selama adaptasi  $> 10\%$

### **5. Kriteria *drop out***

Tikus mati pada saat penelitian berlangsung

### C. Variabel Penelitian

Tabel 2. Variabel penelitian

Variabel	Definisi operasional	Cara pengukuran	Satuan	Skala
<b>Variabel Bebas</b>				
Kombinasi likopen dan metformin	Pemberian metformin (kemurnian 99,8% metformin hidroklorida) sebanyak 250 mg/kgbb berasal dari PT Paphros dan likopen (ekstrak likopen dengan kemurnian 98% likopen) berasal dari <i>sigma aldrich</i> sebanyak 10, 20 atau 40 mg/kgbb dilarutkan dalam 1 mL minyak kelapa diberikan melalui sonde selama 28 hari	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Diberi nutrisi standar dan minyak kelapa 1 mL</li> <li>2. Diberi miyak kelapa 1 mL</li> <li>3. Diberi metformin 250 mg/kg</li> <li>4. Diberi metformin dan ekstrak likopen 10 mg/kg</li> <li>5. Diberi metformin dan ekstrak likopen 20 mg/kg</li> <li>6. Diberi metformin dan ekstrak likopen dosis 40 mg/kg</li> </ol>	mg/mL	Nominal dengan 6 kategori
<b>Variabel terikat</b>				
Fungsi fagositosis	Kemampuan makrofag memfagositosis yang dinilai dari Indeks fagositosis marofag	Melihat jumlah partikel lateks yang dapat difagositosis oleh 100 makrofag, diukur hari ke 28 , diamati dan dihitung dengan menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 400x	%	Rasio

Variabel	Definisi operasional	Cara pengukuran	Satuan	Skala
Rerata kadar gula darah	Kondisi gula darah yang diukur dengan kadar HbA1c	Melihat rata-rata glukosa darah yang diukur hari ke 28 menggunakan metode <i>sandwich</i> ELISA	µg/mL	Rasio
Kadar NO	Kondisi oksidasi NO menjadi nitrat dan nitric	Kadar NO dalam serum diukur hari ke 28 dengan metode ELISA	µg/mL	Rasio
Kadar ROS	Kondisi senyawa reaktif dari oksigen	Melihat banyaknya superoksida dalam serum dengan metode TBARS	mmol/mL	Rasio
Kadar AGEs	Jumlah glukosa yang mengalami glikasi dengan protein pada serum	Melihat intensitas warna diukur hari ke 28 menggunakan metode <i>sandwich</i> ELISA	µg/mL	Rasio

#### D. Materi Penelitian

Penelitian menggunakan hewan coba. Spesimen yang digunakan adalah darah untuk pemeriksaan HbA1c, NO, ROS dan AGEs. Cairan peritonium untuk pemeriksaan fungsi fagositosis.

#### E. Tehnik Pengumpulan Data

Penelitian dilaksanakan di laboratorium pangan dan gizi terpadu PAU UGM dan Parasitologi FK UGM, bekerjasama dengan petugas laboratorium.

## 1. Jenis data dan instrumen penelitian

Proses pemeriksaan HbA1c, NO,ROS, AGEs dan fungsi fagositosis mengikuti prosedur dari pabrik reagen [31,92–95].

### Alat dan bahan penelitian

Alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kandang tikus individual beserta perlengkapannya.
- b. Timbangan hewan percobaan OHAUS dan timbangan analitik.
- c. Sonde lambung
- d. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi yang berasal dari laboratorium laboratorium pangan dan gizi PAU UGM Yogyakarta. Ransum pakan untuk hewan coba dengan makanan standar Comfeed PAR AD II yang diproduksi PT. JAPFA Comfeed Indonesia Tbk.
- e. Makanan tinggi lemak untuk induksi DM tipe 2 dengan komposisi Comfeed PAR-s 60%, Terigu 27,8%, kolesterol 2%, asam folat 0,2%, lemak babi 10%.
- f. STZ 45 mg/kg berasal dari sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Amerika Serikat) dilarutkan dalam larutan garam steril dan disuntikkan melalui intraperitoneal.
- g. Ekstrak likopen tomat dengan kemurnian 98% diproduksi sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Amerika Serikat)
- h. Metformin dalam bentuk 99,8% metformin hidroklorida yang diperoleh dari PT Paphros Indonesia.
- i. Reagen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kits HbA1c, NO dan AGEs tikus berasal dari FineTest, Fine Biotech Co., Ltd.Wuhan, China.
- j. Ketamine untuk anastesi

- k. **Pembedahan tikus** terdiri dari: Alkohol, forcep minor, pinset anatomis, gunting bedah minor.
- l. **Pemeriksaan Fagositosis** [93], terdiri dari : Kultur medium, spuit, sentrifugasi, *haemocytometer*, *phosphate buffer salin* (PBS), inkubator dengan suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, mikroskop cahaya, *microtiter plate*, *microtiter plate reader*, *rosewell park memorial institute* (RPMI), *cover slip*, *latex bead*, dan *giemsa*
- m. **Pemeriksaan NO** [94], terdiri dari: *Double distilled water* (ddH<sub>2</sub>O), PBS, *microcentrifuge*, pipet dan pipet tips, *colorimetric microplate reader*, *equipped with filter for OD540 nm*, penahan panas, pengocok.
- n. **Pemeriksaan ROS** [96] terdiri dari : Pipet, *Microplate*, Pemisah, *ddH<sub>2</sub>O*, es, tube pengumpul serum tikus, TBA, asam glacial acetic, *sulfuric acid solution* 42 mM, *phosphotungstic acid solution* (PTA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), MDA standar, vortexer, sentrifugasi, inkubator, dan *microplate reader*.
- o. **Pemeriksaan AGEs** [95] terdiri dari: *microplate reader*, inkubator dengan suhu stabil 37°C±0.5°C, *squirt bottle*, *manifold dispenser*, *microplate washer*, kertas absorbent, *graduated cylinders* 100 ml and 500 ml, deionized atau air suling, pipet, dan tes tubes untuk pengenceran.
- p. **Pemeriksaan HbA1c** [92], terdiri dari: *Microplate reader* (*wavelength:450 nm*), inkubator 37°C, *automated plate washer*, *precision single and multi-channel pipette and disposable tips*, *clean tubes dan eppendorf tubes*, dan deionized atau air suling.

## **2. Waktu pengumpulan data**

Pengumpulan data dilaksanakan pada saat observasi akhir setelah diberi intervensi selama 28 hari

## **3. Deskripsi perlakuan**

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah ekstrak likopen dan metformin. Ekstrak likopen dan metformin diberikan dalam larutan minyak kelapa sebanyak 1 mL, dan untuk kelompok kontrol tetap diberikan 1 mL minyak kelapa. Likopen larut dalam lemak, sehingga aktivitas biologi likopen dipengaruhi oleh sistem penghantaran. Emulsi merupakan media yang paling bagus untuk penghantaran likopen karena dapat menjaga stabilitas dan meningkatkan aktivitas biologi likopen. Minyak jagung dan kelapa merupakan penghantar likopen yang paling baik karena stabil [42]. Pemilihan pelarut ini disebabkan minyak kelapa memiliki aktivitas antioksidan yang rendah hingga sedang [97,98], sehingga tidak akan membuat intervensi yang bias terhadap antioksidan metformin dan likopen.

Persiapan dan proses perlakuan secara lengkap sebagai berikut:

- a. Pembuatan model tikus DM tipe 2 dengan cara pemberian diit tinggi lemak selama 2 minggu diikuti pemberian STZ 40 mg/kg dosis tunggal dan NA 110 mg/kg [89,91]. Pemilihan metode ini adalah menggambarkan DM tipe 2 pada manusia yang ditandai dengan resistensi insulin perifer dan penurunan sekresi insulin. Fungsi sel  $\beta$  pankreas sudah sangat berkurang saat terdiagnosis DMT2 [20]. Pemberian STZ melalui intraperitoneal menyebabkan kerusakan

sebagian sel  $\beta$  pankreas dan NA melindungi sel pankreas, sehingga produksi insulin berkurang dan dapat menyebabkan penurunan sensitifitas insulin [90]. Pemberian diit tinggi lemak memodulasi terjadinya resistensi insulin, tindakan ini semakin mendukung resistensi insulin pada pasien DM tipe 2. Tikus dinyatakan DM tipe 2 dengan indikator gula darah puasa  $> 200$  mg/dL.

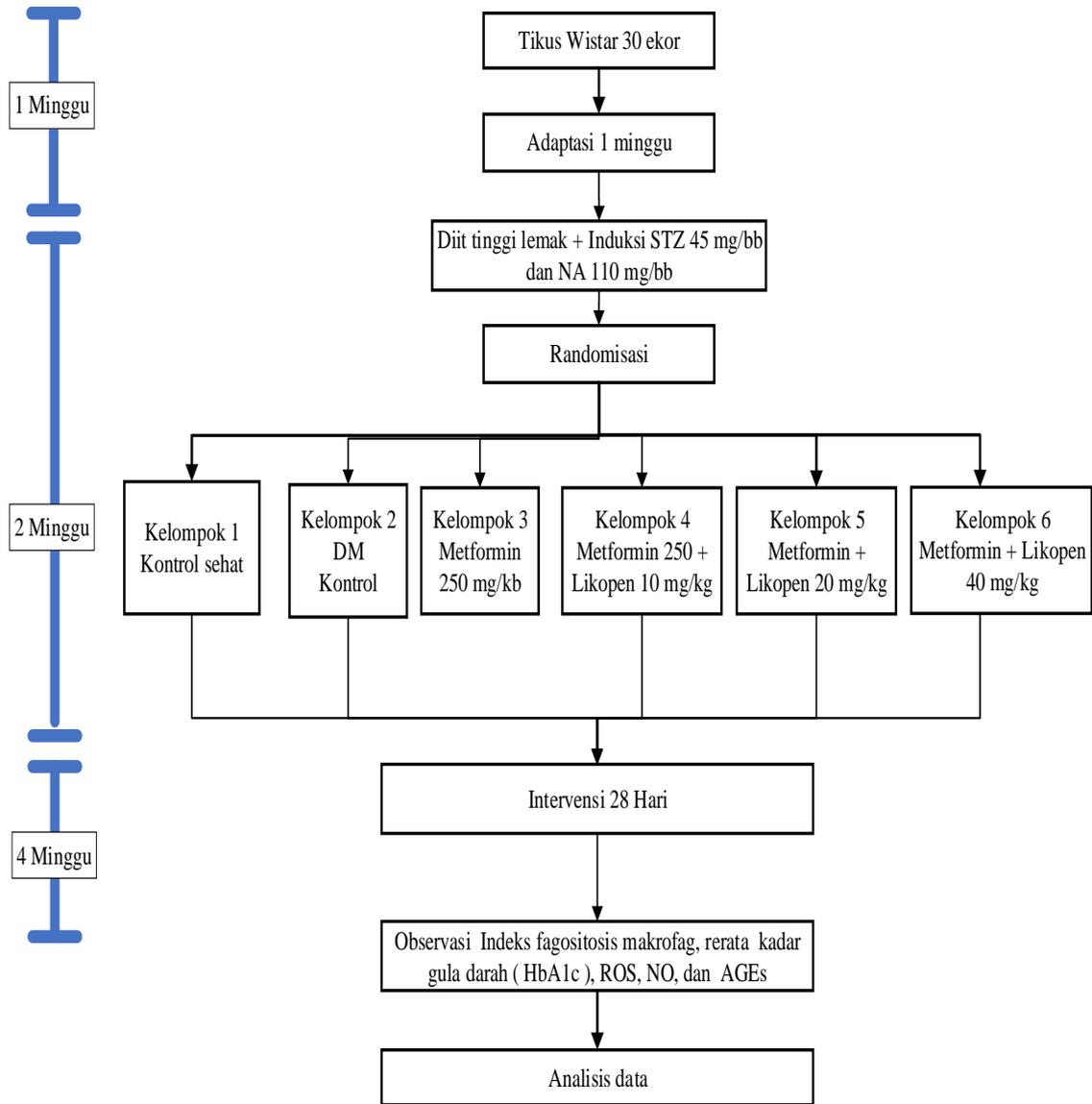
- b. Kelompok kontrol sehat diberi perlakuan layaknya tikus normal dengan pakan dan pemeliharaan standar dan ditambahkan minyak kelapa 1 mL/hari, diberikan selama 28 hari melalui sonde
- c. Kelompok kontrol negatif, tikus DM tipe 2 dipelihara dengan pakan dan pemeliharaan standar serta minyak kelapa 1 mL/ hari selama 28 hari melalui sonde.
- d. Kelompok perlakuan 1, tikus DM tipe 2 diberi pakan dan pemeliharaan standar ditambah dengan pemberian metformin dengan dosis 250 mg/kg bb yang telah dilarutkan dalam minyak kelapa 1 mL/ hari dan diberi selama 28 hari melalui sonde.
- e. Kelompok perlakuan 2, tikus DM tipe 2 diberi pakan dan pemeliharaan standar ditambah dengan pemberian metformin dengan dosis 250 mg/kg bb ditambah likopen dosis 10 mg/kg bb yang telah dilarutkan dalam minyak kelapa 1 mL/ hari dan diberi selama 28 hari melalui sonde.
- f. Kelompok perlakuan 3, tikus DM tipe 2 diberi pakan dan pemeliharaan standar ditambah dengan pemberian metformin dengan dosis 250 mg/kg bb ditambah likopen dosis 20 mg/kg bb yang telah dilarutkan dalam minyak kelapa 1 mL/ hari dan diberi selama 28 hari melalui sonde.

- g. Kelompok perlakuan 4, tikus DM tipe 2 diberi pakan dan pemeliharaan standar ditambah dengan pemberian metformin dengan dosis 250 mg/kg bb ditambah likopen dosis 40 mg/kg bb yang telah dilarutkan dalam minyak kelapa 1 mL/hari dan diberi selama 28 hari melalui sonde.

#### **4. Personalia pengumpul data**

Pengumpulan data dilaksanakan oleh peneliti dan enumerator untuk mencegah subyektifitas atau bias data. Tikus diberi label di ekor, yaitu nomor 1-6 untuk kelompok, dan jumlah garis (1-5 garis) untuk nomor tikus tiap kelompok. Saat pengambilan darah dan pembuatan kultur makrofag, tabung darah dan sumuran diberi kode yang sama menggunakan angka (1.1, 2.1, 3.1 dst). Petugas laboran melakukan pemeriksaan dan menuliskan hasil sesuai dengan label yang diberikan tanpa mengetahui perbedaan intervensi yang diberikan.

## F. Alur Penelitian



Gambar 13. Alur penelitian

## G. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Pengolahan data

Data primer yang diperoleh dikumpulkan, dilakukan proses edit, *coding* dan *entry* ke dalam file computer.

### 2. Analisis data

Analisis data yang digunakan mengikuti protokol yang ditentukan (*analysis by protocol*), dimana data yang dianalisis adalah semua data tikus yang mengikuti protokol hingga akhir penelitian.

#### a. Analisis univariat

Analisis univariat digunakan untuk mendeskripsikan data yang didapat pada semua kelompok dengan menampilkan nilai rerata, standar deviasi dan diagram *box-plot* untuk setiap kelompok.

#### b. Analisis bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk melihat perbedaan variabel di setiap kelompok dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Uji normalitas dilakukan untuk melihat apakah sebaran data normal. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 40. Interpretasi data terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ .
- 2) Uji *One-way ANOVA* digunakan untuk menguji perbedaan kadar indeks fagositosis makrofag, rerata kadar gula darah (HbA1c), ROS, NO dan AGEs. pemilihan uji ini, karena data terdistribusi normal. Hasil bermakna nilai  $p < 0,05$ . Hasil penelitian yang bermakna dilanjutkan dengan uji *post hoc* menggunakan uji *least significant difference* (LSD).

- 3) Uji Pearson digunakan untuk menguji korelasi rerata kadar gula darah (HbA1c), ROS, NO dan AGEs dengan indeks fagositosis. Data bermakna dengan nilai  $p < 0,05$ .
- 4) Analisis jalur digunakan untuk menguji pengaruh langsung dan tidak langsung rerata kadar gula darah (HbA1c), kadar ROS, NO dan AGEs terhadap indeks fagositosis makrofag. Data bermakna dengan nilai  $p < 0,05$ .

## **H. Tempat Dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium pangan dan gizi PAU dan Parasitologi FK UGM Yogyakarta untuk pemeliharaan hewan coba dan pemeriksaan sampel penelitian. Pemeriksaan dan pengambilan data dilaksanakan pada akhir penelitian hari ke 28 oleh laboratoriu FK UGM. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo*.

### ***I. Ethical Clearance***

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan *ethical clearance* yang diperoleh dari komisi etik penelitian kesehatan dan kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor 28/EC/H/FK-UNDIP/IV/2022. Penelitian dilaksanakan berdasarkan pertimbangan dan persetujuan kode etik penelitian hewan coba Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro. Seluruh hewan coba dipelihara dengan baik dengan mendapatkan makanan dan minum *ad libitum* dan terminasi tikus sesuai dengan ketentuan Helsinki.