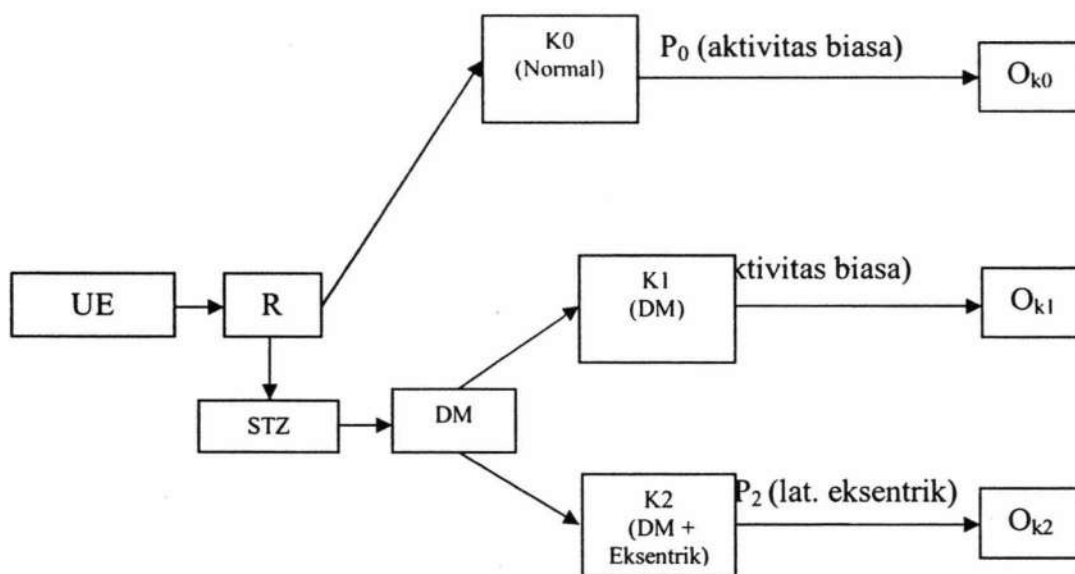


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *Experimental Laboratoris* dengan menggunakan rancangan *The Randomize Post Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000), karena populasinya homogen. Rancangan eksperimen ini tanpa ada pengukuran awal (*pre test*), tetapi hanya *post test* saja. Skema rancangan penelitian yang dipakai adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Desain penelitian

Keterangan :

- UE = Unit Eksperimen
 R = Random
 K0 = Kelompok kontrol mencit normal yang tidak diberi perlakuan
 K1 = Kelompok kontrol mencit DM (diinduksi *streptozotocin* dosis 150 mg/kg bb ip) yang tidak diberi perlakuan

- K2 = Kelompok mencit DM+Eksentrik (diinduksi *streptozotocin* dosis 150 mg/kg bb ip) yang diberi perlakuan (latihan eksentrik)
 P₂ = Perlakuan dengan pemberian latihan eksentrik (*running downhill*)
 O_{k1} = Pemeriksaan GDPP dan ekspresi *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit K1 (*post test*)
 O_{k2} = Pemeriksaan GDPP dan ekspresi *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit K2 setelah perlakuan latihan eksentrik (*post test*)

4.2 Unit Eksperimen, Besar Replikasi, dan Randomisasi

4.2.1 Unit eksperimen dan besar replikasi

Unit eksperimen dalam penelitian ini adalah mencit yang berada di ruang pemeliharaan hewan Lab. Hewan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Karakteristik mencit yaitu, menggunakan mencit dewasa dengan jenis kelamin jantan usia 8-12 minggu, sehat dan aktif, berat badan antara 25±2 gram (berat badan awal sebelum induksi *streptozotocin*). Jumlah replikasi dalam setiap kelompok ditentukan berdasarkan rumus *Lemeshow*:

$$n = \frac{2 \sigma^2 (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan :

- σ : rerata simpang baku penelitian terdahulu
 $SD_1 = 148,830$ dan $SD_2 = 18,539$ maka $\sigma = 83$
 $Z_{1-\alpha}$: nilai standar deviasi untuk $\alpha = 0,05$ satu ekor = 1,645
 $Z_{1-\beta}$: nilai standar deviasi untuk $\beta = 0,20 = 0,84$
 $\mu_1 - \mu_2$: beda antara rerata penelitian terdahulu
 $\mu_1 = 240$ dan $\mu_2 = 130$ maka $\mu_1 - \mu_2 = 110$

$$n = \frac{2 (83)^2 (1,645 + 0,84)^2}{(110)^2} = 7,03 = 8$$

Bila estimasi kegagalan 10%, maka faktor pengali ditentukan dengan rumus $1/1-f$, yaitu sebesar $1/1-0,1 = 1,11 \times 8 = 8,88$, sehingga dibulatkan menjadi 9

ekor tiap kelompok. Total subjek penelitian 3 kelompok x 9 ekor = 27 ekor mencit, yaitu 2 kelompok mencit diabetes berjumlah 18 ekor yang ditambah 1 kelompok mencit normal 9 ekor. Kelompok mencit normal berguna sebagai pembanding kadar glukosa darah setelah induksi *streptozotocin* pada kelompok diabetes.

4.2.2 Randomisasi

Teknik randomisasi yang digunakan adalah *Simple Random* dimana pengambilan anggota replikasi dari unit eksperimen dilakukan secara acak tanpa memperhatikan strata yang ada dalam unit eksperimen itu (Zainuddin, 2000). Randomisasi dalam penelitian ini menggunakan tabel bilangan acak.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 1 minggu di Laboratorium Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya untuk perlakuan sampai dengan pengambilan otot gastrocnemius mencit (*Mus musculus*). Penelitian selanjutnya dilakukan selama 1 minggu di Unit Mikroskop Elektron dan Lab. Medis Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah latihan eksentrik

4.4.2 Variabel tergantung (*dependent variable*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah:

1. Glukosa darah puasa (GDP)
2. Glukosa darah *post prandial* (GDPP)
3. Ekspresi *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit (*Mus musculus*).

4.4.3 Variabel kendali (*control variable*)

Variabel kendali (kontrol) pada penelitian ini adalah:

1. Jangka waktu pemberian latihan eksentrik yaitu 16 menit 30 detik
2. Kecepatan treadmill yaitu 21 cm/detik
3. Sudut kemiringan treadmill yaitu -10 derajat (*down hill*)
4. Waktu observasi (pengukuran)
5. Dosis glukosa oral yang diberikan sebelum latihan (2mg/g bb mencit per pemberian).

4.5 Definisi Operasional

Di bawah ini merupakan definisi variabel yang digunakan dalam penelitian:

Tabel 4.1 Definisi operasional pengaruh latihan eksentrik terhadap ekspresi *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit diabetes mellitus yang diinduksi *streptozotocin*

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat	Nilai
Bebas				
Latihan eksentrik	Lari menggunakan treadmill dengan sudut kemiringan -10 derajat (<i>running down hill</i>). Lama pemberian latihan yaitu 16 menit 30 detik dengan kecepatan treadmill 21 cm/detik. 16 menit 30 detik di dapat dari kapasitas kerja maksimal mencit setelah dibiarkan berlari. Intensitas maksimal yang telah diperoleh dikalikan 75% VO_2 max.	-	Treadmill (merk: <i>modified colombus treadmill</i>)	-
Tergantung				
Glukosa darah puasa (GDP)	Kadar glukosa darah diambil pasca induksi <i>streptozotocin</i> 2x24 jam	Kadar glukosa darah yang ditunjukkan	Glukometer (merk: <i>Easy Touch</i>)	mg/dl

	dan setelah dipuaskan selama 6 jam.	glukometer		
Glukosa darah <i>post prandial</i> (GDPP)	Kadar glukosa darah diambil pasca pemberian glukosa oral dan <i>post</i> perlakuan menit ke 60	Kadar glukosa darah yang ditunjukkan glukometer	Glukometer (merk: <i>Easy Touch</i>)	mg/dl
Ekspresi <i>GLUT-1</i>	Persen jumlah sel positif yang mengekspresikan <i>GLUT-1</i> pada membran. Sampel otot dipotong menggunakan mikrotom dan dimounting dengan antibodi spesifik <i>GLUT-1</i> untuk pemeriksaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya	Nilai atau banyaknya jumlah transporter glukosa (<i>GLUT-1</i>) yang ditunjukkan pada mikroskop cahaya 10 area luas pandang. Mengandung positif <i>GLUT-1</i> jika menunjukkan warna coklat tegas karena kromagen/zat warna menggunakan warna coklat DAB	Mikroskop Cahaya	μm^2

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

1. Alat treadmill (merk: *modified colombus treadmill*) mencit di Laboratorium Departemen Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
2. Mikroskop cahaya
3. Timbangan digital analitik (merk: *Shimadzu*)
4. Glukometer (merk: *Easy Touch*)
5. Stopwatch (merk: *Diamond*)

4.6.2 Bahan penelitian

1. *Streptozotocin* dengan dosis 150 mg/kg bb mencit

2. Dapar sitrat 0,05 M sebagai pelarut *streptozotocin* hingga mencapai pH 4,5
3. Mencit dengan jenis kelamin jantan, sehat dan mempunyai aktivitas normal, usia 8-12 minggu, berat badan antara 25 ± 2 gram (berat badan awal sebelum induksi *streptozotocin*).
4. Antibodi spesifik *GLUT-1*
5. Kromagen warna coklat DAB
6. Buffer formalin 10%
7. *Object glass*
8. Pisau bedah
9. Glukosa oral 2 mg/g bb mencit (*Dextrose-10%*)
10. *Spuut* 1 ml
11. Alumunium foil
12. Stick glukometer
13. Pakan, air untuk minum, sekam, dan kandang

4.7 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada variabel tergantung adalah mikroskop cahaya di Unit Mikroskop Elektron dan Lab. Medis Terpadu untuk mengetahui jumlah *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit diabetes mellitus dan alat glukometer untuk mengukur kadar glukosa dalam darah.

Instrumen yang digunakan pada variabel bebas dalam penelitian ini adalah alat treadmill (merk: *modified colombus treadmill*) dengan sudut kemiringan -10 derajat (*downhill*), kecepatan 21 cm/detik, dan lama waktu pemberian latihan 16 menit 30 detik (diukur menggunakan stopwatch).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pra pelaksanaan penelitian

Peneliti menggunakan empat mencit untuk menetapkan sudut dan kecepatan maksimal yang dapat ditempuh mencit pada latihan eksentrik ini (*running down hill*). Sudut kemiringan treadmill yang dicoba pada mencit adalah -5° , -10° , dan -15° . Sudut kemiringan -5 derajat dan -10 derajat, mencit dapat berlari dengan baik. -15 derajat mencit dapat berlari dengan baik, yaitu berada di *back grade treadmill*. Peneliti menggunakan sudut kemiringan -10 agar tidak terjadi kerusakan otot karena peregangan akibat kontraksi eksentrik yang berlebihan akan merusak jaringan otot. Pengaturan kecepatan treadmill yang dicobakan pada mencit terdiri dari kecepatan 7 cm/detik, 14 cm/detik, 21 cm/detik, dan 30 cm/detik (ketiga pilihan kecepatan tersebut telah tersedia pada treadmill). Uji coba kecepatan terbaik yang dapat ditempuh mencit untuk berlari adalah kecepatan 21 cm/detik. Dosis pemberian latihan yang didapat adalah 21.14.50 menit setelah mencit dibiarkan berlari sampai mencapai kapasitas kerja maksimal. Intensitas maksimal yang telah diperoleh dikalikan $75\% \text{VO}_{2 \text{max}}$, ($50\% - 75\%$) (Ehrman *et al.*, 2009). Peneliti mendapatkan hasil kecepatan 16.30 menit (pembulatan dari stopwatch 16.29.50 menit). Peneliti menetapkan latihan eksentrik (menggunakan treadmill) yang diberikan pada mencit adalah berlari (*running down hill*) dengan sudut kemiringan -10 derajat dan kecepatan 21 cm/detik selama 16 menit 30 detik.

4.8.2 Pelaksanaan penelitian

Peneliti melakukan alokasi random pada mencit DM menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol DM (9 mencit) dan kelompok DM latihan eksentrik (9

mencit). Kelompok kontrol normal sebanyak 9 mencit. Pengandangan hewan coba dipisahkan satu sama lain dengan cara kandang disekat, diberi sekam, serta diberi pakan dan minum. Pakan yang diberikan adalah pakan komplit butiran atau biasa disebut pelet. Analisa pakan komplit butiran ini antara lain; kadar air 13%, protein 13%-15%, lemak 3%, serat 8%, abu 6%, calcium 0,8%, phosphor 0,6%. Minuman yang diberikan adalah air mineral kemasan. Pengandangan dilakukan pada semua kelompok dan badan mencit ditandai pada semua kelompok dengan cat rambut supaya saat penelitian dilakukan tidak tertukar dengan mencit yang lain. Pemberian sekat pada kandang bertujuan agar tidak terjadi perkelahian antar mencit dan berebut makanan atau minuman. Pencatatan berat badan setiap kelompok dilakukan sebelum induksi.

Peneliti menggunakan protokol AMDCC (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*) sebagai acuan untuk menginduksi mencit dengan *streptozotocin*. Mencit ditimbang berat badannya dan dipuaskan selama 4 jam sebelum diinjeksi *streptozotocin*. Kelompok DM diinduksi *streptozotocin* 150 mg/kg bb ip yang dilarutkan dalam sitrat hingga *streptozotocin* memiliki pH 4,5 dengan konsentrasi 22,5 mg/ml. Penginduksian melalui intraperitoneal mencit sesuai dengan kebutuhan dosis per ekor dan penginduksian hanya dilakukan 1 kali saja (KKAMR, 2013). Sepanjang malam pertama setelah induksi diberi dekstrosa 10% untuk menghindari hipoglikemia. 2 x 24 jam pasca induksi *streptozotocin*, kelompok yang diinduksi dibagi menjadi 2 kelompok lagi sehingga didapat masing-masing kelompok 9 mencit. Pasca induksi *streptozotocin*, berat badan mencit akan berkurang 10%-12% dari berat badan awal (Purwanto, 2012). Kelompok pertama (K1) sebagai kelompok kontrol DM tanpa perlakuan.

Kelompok kedua (K2) sebagai kelompok DM yang diberi perlakuan, yaitu diberi latihan eksentrik (*running down hill*) dengan menggunakan treadmill.

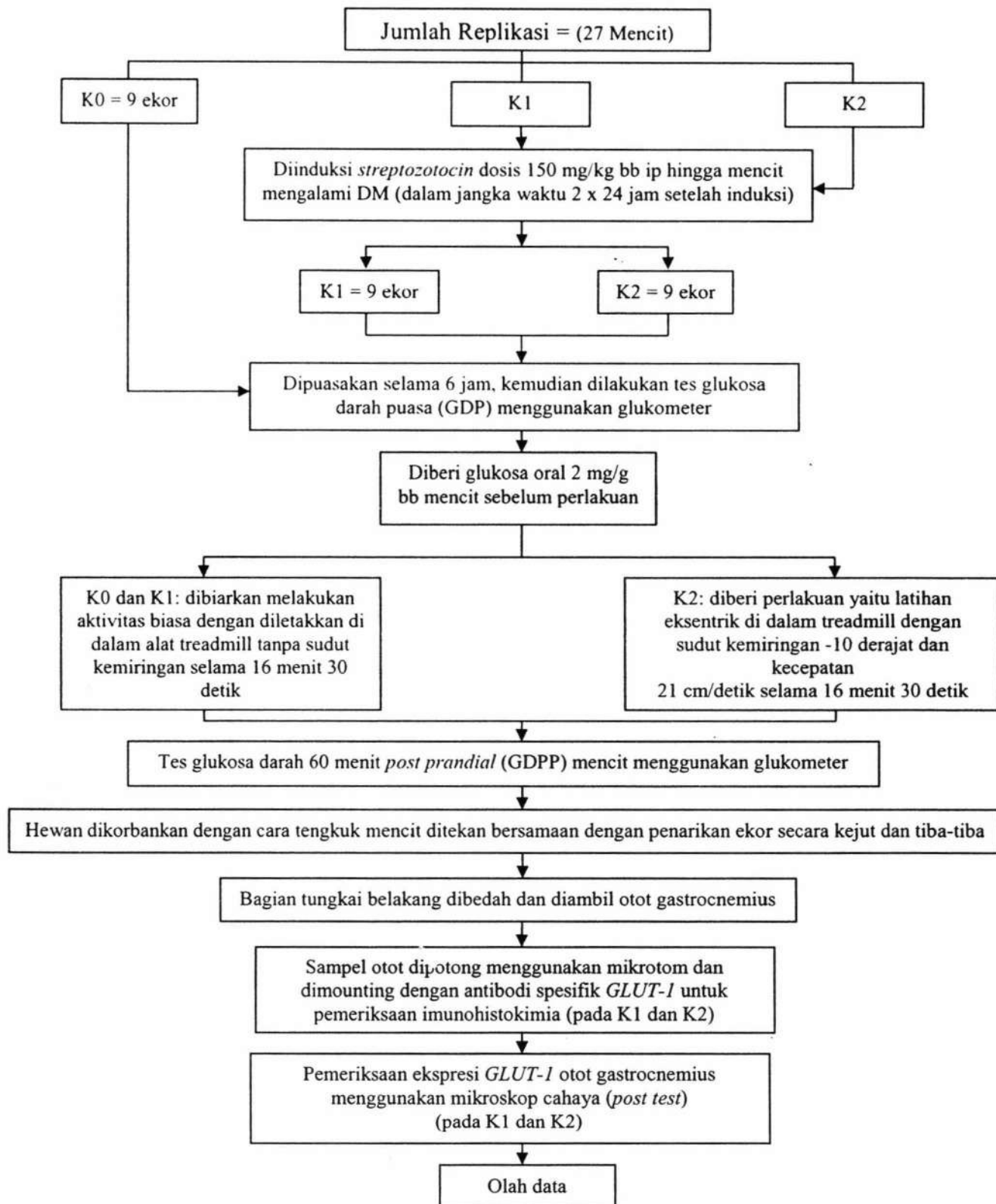
Tahap berikutnya adalah semua kelompok mencit dipuasakan selama 6 jam termasuk kelompok kontrol normal. Peneliti mengambil kadar glukosa darah puasa (GDP) dengan glukometer untuk memastikan kadar glukosa dalam darah mencit tinggi (hiperglikemia) atau sudah diabetes pada K1 dan K2. Pengambilan darah melalui ujung ekor mencit dengan cara dipotong 1 mm pada bagian ujung ekornya. Menurut Zhang (dalam Huzaimah, 2012), pasca mencit dipuasakan selama 6 jam, mencit diberi glukosa oral dengan dosis 2 mg/g bb mencit. Kadar glukosa darah *post prandial* yaitu kadar glukosa darah (menit ke 60) setelah pemberian glukosa oral pada mencit. Kadar glukosa darah dapat diambil pada menit ke-30 dan 60 setelah pemberian glukosa oral (Yan, 2013). Mencit kelompok kontrol normal (K0) dan kelompok pertama (K1) melakukan aktifitas biasa di treadmill, sedangkan mencit kelompok kedua (K2) diberi latihan eksentrik (*running down hill*) dengan menggunakan treadmill yang ada di Laboratorium Departemen Faal FK Unair. Latihan yang diberikan bersifat akut, yaitu hanya dilakukan satu kali untuk melihat efek jangka pendek latihan. Langkah selanjutnya, peneliti menimbang ulang berat badan dan mengambil kadar glukosa darah setelah perlakuan.

Pada penelitian ini, kelompok kontrol normal berguna sebagai pembanding kadar glukosa darah antara kelompok normal dengan kelompok DM setelah induksi *streptozotocin*. Pasca penginduksian *streptozotocin*, diharapkan kadar glukosa darah meningkat >200 mg/dl (hiperglikemia) daripada kelompok kontrol normal yang kadar glukosa <200 mg/dl. Kelompok DM tidak dapat

dibandingkan dengan kelompok kontrol normal karena perbedaan kadar glukosa darah yang signifikan pada kondisi glukosa darah puasa. Penderita DM tidak bisa kembali normal atau kembali semula.

Langkah terakhir adalah hewan coba dikorbankan (dimatikan) dengan metode hewan dikorbankan dengan cara tengkuk mencit ditekan bersamaan dengan penarikan ekor secara kejut dan tiba-tiba. Pengambilan otot gastrocnemius diambil pada tungkai bagian kanan dan jaringan dimasukkan pada object glass yang diisi dengan buffer formalin. Sampel otot dibuat blok parafin dan dipotong menggunakan mikrotom. Slide otot yang telah dipotong, kemudian dimounting dengan antibodi spesifik *GLUT-1* untuk pemeriksaan imunohistokimia. Pemeriksaan jumlah *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit kelompok pertama (K1) dan kelompok kedua (K2) dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan dilakukan oleh seorang ahli patologi anatomi menggunakan mikroskop cahaya.

4.9 Kerangka Operasional



Gambar 4.2 Kerangka operasional pengaruh latihan eksentrik terhadap ekspresi *GLUT-1* pada otot gastrocnemius mencit diabetes mellitus yang diinduksi *streptozotocin*

4.10 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis secara statistik melalui tahapan:

1. melakukan uji normalitas data
2. uji homogenitas variansi dengan menggunakan *Levene Test*
3. uji hipotesis menggunakan metode parametrik

4.11 Etik

Peneliti menggunakan prinsip etika hewan coba yaitu mencit dikorbankan dengan cara dimatikan, yaitu tengkuk mencit ditekan bersamaan dengan penarikan ekor secara kejut dan tiba-tiba (Moore, 2000). Hewan coba tidak boleh dipergunakan sebagai hewan peliharaan setelah dimanfaatkan untuk penelitian. Hewan coba langsung dikuburkan atau dibakar setelah dikorbankan.