

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test control group design*.

#### B. Subyek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus Novergicus*) berkelamin jantan, galur *Sprague Dawley* usia 8 minggu dengan berat badan 150-200 gram, berjumlah 36 ekor yang di acak menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 6 ekor subyek. Jumlah sampel didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu  $(t-1)(r-1) > 15$ . Subyek didapat dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus diberikan Jenis makanan AD 2 yang diberikan secara *ad libitum* kecuali menjelang pengambilan sampel glukosa darah puasa. Ukuran kandang panjang 20 cm lebar 12 cm dan tinggi 15 cm dan dalam 1 kandang terdapat 1 subyek.

Kriteria inklusi :

1. Berjenis kelamin jantan
2. Galur Sprague Dawley

3. Berusia sekitar 8-10 minggu
4. Memiliki berat badan sekitar 100-150 gram

Kriteria eksklusi :

1. Aktivitas kurang/tidak aktif
2. Mati selama masa pemberian perlakuan
3. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak)
4. Penurunan berat badan  $>10\%$  selama masa adaptasi di laboratorium

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **1. Lokasi**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada (UGM) guna mendukung pelaksanaannya.

#### **2. Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan dalam kurun waktu sekitar 3 bulan.

### **D. Variabel Penelitian & Definisi Operasional**

#### **1. Variabel**

- a. Variabel bebas : Perlakuan dan dosis seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) masing-masing 250 mg/200 gBB, 500 mg/200 gBB dan 750 mg/200 gBB.
- b. Variabel tergantung : Kadar enzim Glutation Peroksidase (GPx).

- c. Variabel terkontrol :
- 1) Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus Novercigus*) jantan galur *Sprague dawley* (umur 8-10 minggu dan berat 150-200 gram).
  - 2) Faktor genetik menggunakan tikus satu galur yaitu dari galur *Sprague dawley* dan proses pengambilan menggunakan randomisasi.
  - 3) Kondisi pakan dan kandang sama.

## 2. Definisi Operasional

### a. Tikus Diabetes Melitus

Tikus Diabetes Melitus adalah tikus yang diinduksi dengan Streptozotocin 65 mg/kgBB, dibiarkan selama 5 hari dengan parameter peningkatan kadar gula darah puasa yang diambil dari pembuluh darah vena mata. Tikus dinyatakan DM apabila kenaikan gula darah puasanya >135 mg/dl setelah induksi 5 hari dengan kadar normal 55-135 mg/dl (Puspitasari, 2015).

### b. Seduhan daun kersen

Seduhan daun kersen didapatkan dengan cara menyeduh dan kersen kering dengan air mendidih hingga bewarna kecoklatan menyerupai teh. Daun kersen yang digunakan didapatkan dari Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan dikeringkan dengan sinar matahari.

### c. Kadar enzim GPx

Enzim GPx merupakan enzim endogen yang kadarnya akan menurun pada kondisi Diabetes melitus. Kadar enzim GPx didapatkan dengan pemeriksaan hepar tikus menggunakan alat spektrofotometer melalui metode UV.

d. Induksi Streptozotocin-Nicotinamide

Induksi streptozotocin ditujukan untuk menghasilkan tikus diabetes melitus. Dosis yang digunakan adalah 65mg/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal, 15 menit sebelumnya dilakukan injeksi nicotinamide 230 mg/kgBB secara intraperitoneal.

**E. Alat dan Bahan Penelitian**

**a. Alat**

- a. Timbangan digital
- b. Sonde
- c. Gelas kaca
- d. Sduit
- e. Gloves sarung tangan
- f. Masker
- g. Panci
- h. Saringan
- i. Kompor
- j. Peralatan bedah
- k. Spektrofotometer

## 2. Bahan

- a. Streptozotocin
- b. Metformin
- c. Daun kersen
- d. Nicotinamide
- e. NaCl 0,9%
- f. Buffer sitrat 0,1 M
- g. Aquades
- h. Plasma darah puasa
- i. Jaringan Hepar Tikus
- j. Automatic chemistry analyzer (KIT RANSEL)

## F. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan Seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*)

Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang digunakan adalah daun kersen yang berkualitas, yaitu daun yang hijau tua, tidak menggulung, serta tidak ada bekas gigitan serangga. Pembuatan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dilakukan dengan cara berikut :

- a. Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dijemur dibawah sinar matahari hingga kering (berwarna kecoklatan).
- b. Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang sudah kering diseduh dengan aquades yang telah mendidih dan dibiarkan hingga berwarna kecoklatan menyerupai teh.

- c. Seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) disaring sehingga air seduhan terpisah dengan daun.

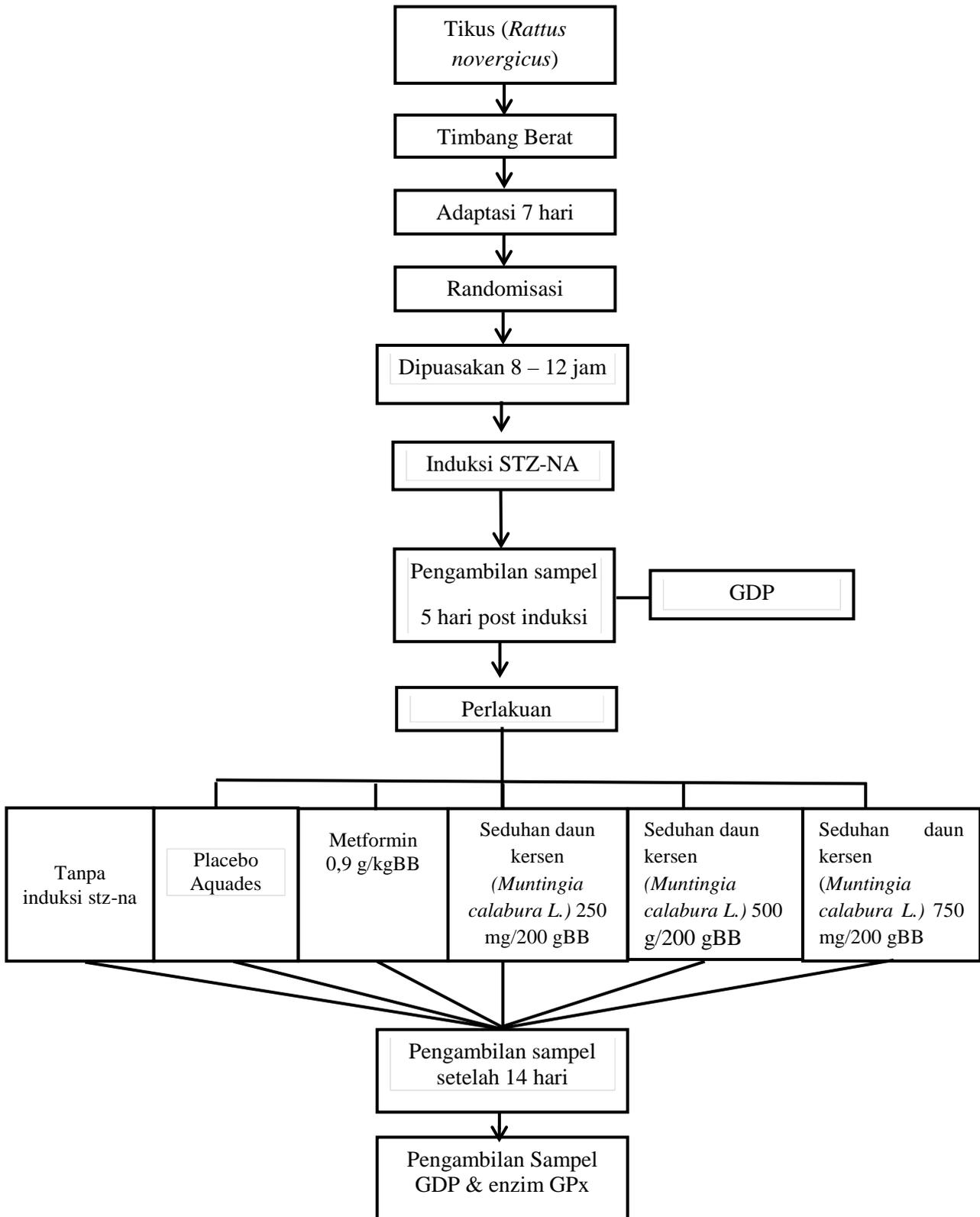
## 2. Pengelompokan Hewan uji

Sebanyak 36 ekor mencit ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, yaitu : kelompok I sebagai kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok II sebagai kontrol positif (Metformin), kelompok III, IV dan V sebagai kelompok Seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) masing masing 250 mg/200 gBB, 500 mg/200 gBB , 750 mg/200 gBB, serta kelompok VI sebagai kelompok kontrol normal (tanpa induksi STZ dan NA).

## 3. Cara pengumpulan data

- a. Adaptasi tikus di kandang Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM selama 7 hari.
- b. Injeksi tikus menjadi DM . Induksi DM tipe 2 dilakukan dengan injeksi intraperitoneal nicotinamide (NA) 230 mg/kgBB yang dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%). Setelah 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemberian Streptozotocin (STZ) 65 mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 secara intraperitoneal untuk merusak sel  $\beta$  pankreas.
- c. Setelah 5 hari post injeksi, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa yang diukur menggunakan metode GOD-PAP (dikatakan DM jika GDP >135 mg/dl) .

- d. Jika tikus sudah dinyatakan DM, selanjutnya dilakukan Pemberian perlakuan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) sesuai kelompoknya. Kelompok I dibiarkan tanpa perlakuan, kelompok II diberi metformin 0,9 mg/kgBB/hari/tikus, kelompok III diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 250 mg/200 gBB/hari/tikus, kelompok IV diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 500 mg/200 gBB/hari/tikus dan kelompok V diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 750 mg/200 gBB/hari/tikus. Pemberian semua perlakuan dilakukan selama 14 hari.
- e. Setelah 14 hari post perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa, selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil hepar tikus yang akan menjadi bahan pemeriksaan enzim GPx.
- f. Bagian hepar tikus yang diambil pada saat pembedahan yaitu seluruh jaringan hepar, setelah itu ditumbuk dan dicentrifuge. Hasil centrifuge tersebut yaitu supernatan yang nantinya akan dicampur dengan KIT Ransel untuk dilakukan pengamatan enzim GPx dengan metode UV. Hasilnya dibaca melalui spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm, kemudian dimasukkan ke dalam rumus pada metode UV.



Gambar 7. Alur Penelitian

## **G. Analisis Data**

Untuk menguji normalitas dan homogenitas digunakan test of normality *Shapiro wilk*. Jika data normal dan varians nya sama, data hasil Glutation peroksidase dianalisis menggunakan uji *paired sample t Test* dan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan post-hoc test dan uji rata-rata *Tuckey*.