

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

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

#### **B. Populasi dan Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) berkelamin jantan, galur (*Sprague Dawley*) usia 8 minggu dengan berat badan 150-200 g, berjumlah 30 ekor yang di acak menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor subyek. Jumlah sampel didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu  $(t-1)(r-1) > 15$ . Subjek di dapatkan dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus diberikan jenis makan AD 2 yang diberikan secara *ad libitum* kecuali menjelang pengambilan sampel glukosa darah puasa. Ukuran kandang yaitu 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 guna mendukung pelaksanaannya.

#### 2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dalam kurun waktu sekitar 3 bulan.

### D. Variabel dan Definisi Operasional

#### 1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Perlakuan dan Dosis seduhan daun kersen  
(*Independent*) (*Muntingia calabura L.*) masing-masing  
250 mg/200g BB, 500 mg/200g BB dan  
750 mg/200g BB.
- b. Variabel tergantung : Kadar HDL dan LDL  
(*dependent*)

- c. Variabel terkendali : a. Subyek penelitian adalah Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* (umur 8-10 minggu dan berat 150-200 gram).
- b. Faktor genetik menggunakan tikus satu galur yaitu dari galur *Sprague Dawley* dan proses pengambilan menggunakan randomisasi.
- c. Kondisi pakan dan kandang sama.

## 2. Definisi Operasional

### a. Tikus Diabetes Melitus

Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* (umur 8-10 minggu dan berat 150-200 g) didapatkan dari tempat laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tikus DM adalah tikus yang diinduksi dengan *streptozotocin* 65 mg/kg BB, dimana 15 menit sebelumnya diinjeksi *nicotinamide* 230 mg/kg BB, dibiarkan selama 5 hari dengan parameter peningkatan kadar glukosa darah puasa yang diambil dari pembuluh darah vena mata. Tikus dinyatakan DM apabila kenaikan gula darah puasanya >136 mg/dl setelah induksi 5 hari dengan nilai 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 berwarna kecoklatan menyerupai teh. Daun kersen yang digunakan didapatkan dari Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan dikeringkan dengan sinar matahari dan dikeringkan dengan sinar matahari. Seduhan daun kersen kemudian diberikan kepada tikus yang telah diinduksi *streptozotocin* melalui sonde dengan dosis masing-masing 250 mg/200g BB, 500 mg/200g BB dan 750 mg/200g BB.

c. Kadar HDL dan LDL

HDL dan LDL merupakan lipoprotein yang kadarnya akan menurun dan meningkat pada kondisi DM. Kadar HDL dan LDL didapatkan dari pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus.

d. Induksi *Streptozotocin-nicotinamide*

Induksi *streptozotocin* ditujukan untuk menghasilkan tikus Diabetes Melitus. Dosis yang digunakan adalah 65 mg/kg BB diinjeksikan secara intraperitoneal, 15 menit sebelumnya dilakukan injeksi *nicotinamide* 230 mg/kg BB yang mempunyai efek protektif dari toksisitas streptozotocin (Szkudelski, 2012).

## E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah

a. Timbangan digital

- b. Sonde
  - c. Gelas kaca
  - d. Sduit
  - e. Sarung tangan
  - f. Masker
  - g. Panci
  - h. Kompor
  - i. Peralatan bedah
2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah

- 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. Automatic chemistry analyzer (KIT GO F400 CH)

## **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 30 ekor tikus ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 5 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/200g BB, 500 mg/200g BB dan 750 mg/200kg BB.

## **3. Cara pengumpulan data**

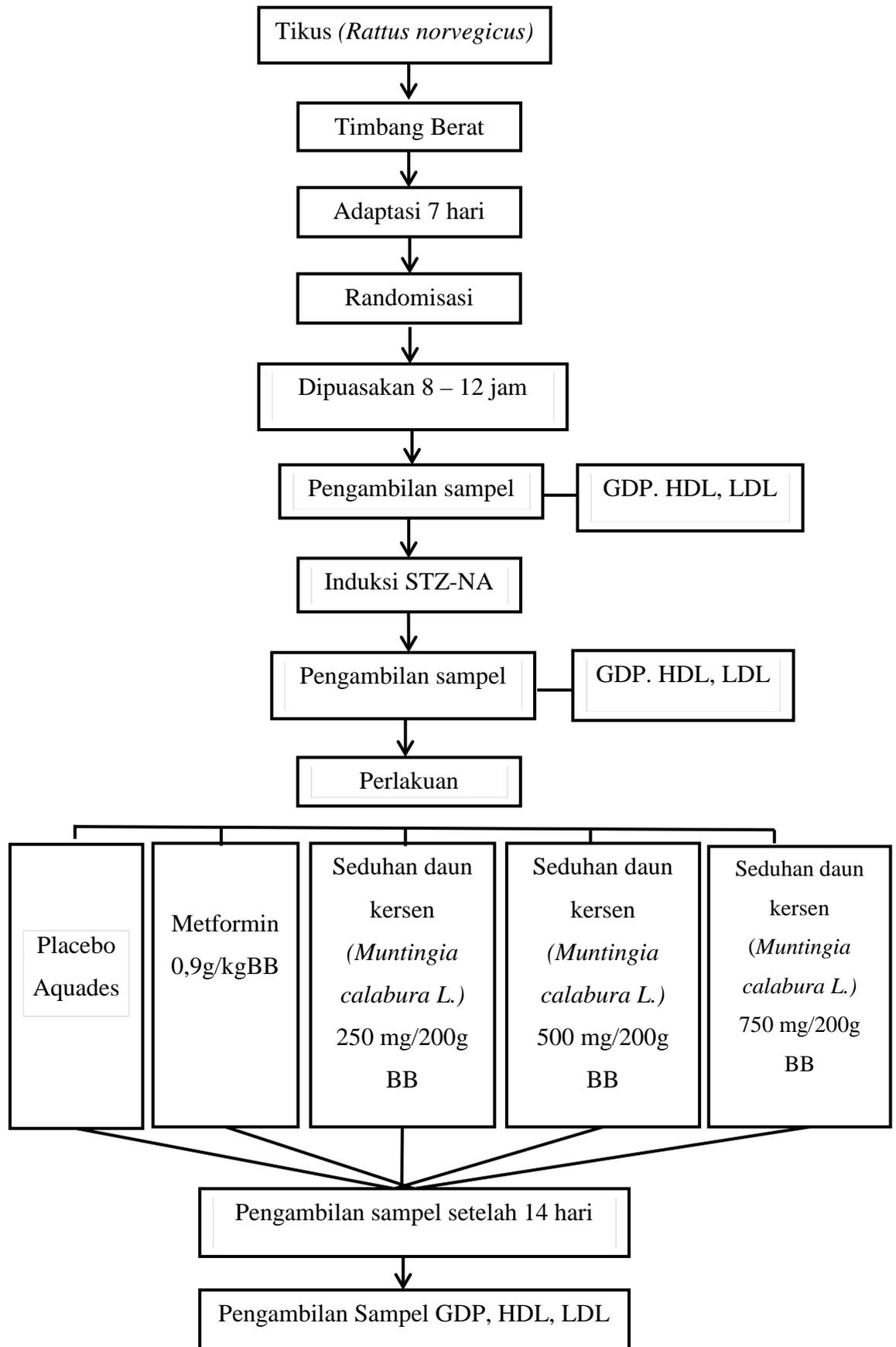
- a. Adaptasi tikus di kandang Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi selama 7 hari.
- b. Dilakukan pengambilan sampel darah pre injeksi melalui pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus, parameter yang diukur adalah kadar gula darah puasa (GDP), kadar HDL, dan kadar LDL. Pengukuran kadar gula darah puasa menggunakan metode GOD-PAP. Sedangkan

untuk kadar HDL & LDL menggunakan HDL & LDL presipitan berdasarkan metode CHOD-PAP dengan bahan KIT GO F400 CH. LDL diendapkan dengan menambah heparin, sehingga setelah disentrifuse HDL dan VLDL berada di permukaan dan di ukur secara enzimatis dengan metode CHOD-PAP. Konsentrasi LDL dihitung berdasarkan perbedaan total kolesterol dan kolesterol pada permukaan. Perhitungan kadar HDL dilakukan dengan menambahkan asam fosfotungstat dan ion magnesium pada kilomikron, VLDL, dan LDL, sehingga hanya meninggalkan HDL pada permukaan.

- c. Injeksi tikus menjadi DM : Tikus dipuasakan selama 12 jam sebelum penginduksian pagi harinya. Induksi DM tipe 2 dilakukan dengan injeksi intraperitoneal *nicotinamide* (NA) 230 mg/kg BB yang dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%). Setelah 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemberian *Streptozotocin* (STZ) 65 mg/kg BB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 secara intraperitoneal untuk merusak sel  $\beta$  pankreas.
- d. Setelah 5 hari post injeksi, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa (dikatakan DM jika GDP >136 mg/dl), kadar HDL, dan kadar LDL.
- e. 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/kg BB/hari/tikus, kelompok III diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 250 mg/200g BB/hari/tikus, kelompok IV diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 500 mg/200g BB/hari/tikus dan kelompok V diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 750 mg/200g BB/hari/tikus. Pemberian semua perlakuan dilakukan selama 14 hari.

- f. Setelah 14 hari post perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa, kadar HDL, dan kadar LDL.



Gambar 9. 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 HDL dan LDL dianalisis menggunakan uji *paired sample t Test* dan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji rata-rata *Tuckey*.