

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *pre-test, post-test control group design*. Studi penelitian ini adalah salah satu rancangan penelitian yang menggunakan hubungan sebab akibat.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus putih strain wistar sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari LP3HP-Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM. Tikus putih strain wistar yang diteliti memiliki kriteria inklusi dan eksklusi adalah sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

- Usia 2 bulan.
- Memiliki berat badan \pm 200 gram.
- Berjenis kelamin jantan.

2. Kriteria Eksklusi

- Tikus putih sakit
- Aktivitas rendah
- Cacat bawaan

Tikus putih strain wistar dipilih secara acak (random) dengan jumlah sebanyak 25 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok (kelompok A, B, C, D dan E), serta masing – masing kelompok terdiri dari 5 ekor

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Adapun lokasi dan tempat penelitian yang dilakukan oleh peneliti adalah di Laboratorium FKIK-UMY dan PAU-UGM. Waktu penelitian dilaksanakan pada 27 Februari 2010 sampai dengan 14 Maret 2010.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

a. Variabel Bebas

Pemberian patikan kebo (*Euphorbia hirta* Linn) dengan dosis oral 2,5g/200gBB, 5g/200gBB dan 7,5g/200gBB. Pemberian setiap hari secara oral (sonde) pada masing-masing tikus putih strain wistar.

b. Variabel Tergantung

Kadar glukosa dalam darah pada masing-masing tikus putih strain wistar melalui 3 (tiga) kali pengukuran; sebelum di induksi alloxan, sesudah di induksi alloxan dan setelah diberi perlakuan.

c. Variabel Terkendali

- Usia : diatasi dengan pemilihan tikus usia \pm 2 bulan.
- Jumlah : diatasi dengan pemilihan tikus berjumlah 25 ekor.
- Jenis kelamin : diatasi dengan pemilihan tikus berjenis kelamin jantan.
- Berat badan : diatasi dengan pemilihan tikus berat badan \pm 200 gram.

2. Definisi Operasional

- a. Kadar glukosa darah disini adalah kadar glukosa yang diambil dari serum darah tikus putih strain wistar setelah puasa selama puasa 8-12 jam

- b. Patikan kebo yang digunakan adalah tumbuhan liar dengan spesies *Euphorbia hirta* Linn. Dosis patikan kebo sebesar 2,5g/200gBB, 5g/200gBB dan 7,5g/200gBB.
- c. Alloxan monosakarida merupakan zat kimia yang tidak stabil, hidrofilik dan dapat bereaksi dengan thiol tertentu serta dapat menyebabkan nekrosis spesifik pada sel β pankreas.
- d. Glibenklamida 0,1mg merupakan derivat kloromektosi dari antidiabetika oral generasi kedua dengan khasiat hipoglikemisnya yang 100 kali lebih kuat daripada tolbutamida.
- e. DM tipe II merupakan penyakit metabolik yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin ataupun kedua-duanya dalam keadaan dimana kadar glukosa darah puasa lebih dari 140mg/dL pada manusia.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

- a. Larutan Reagen KIT Glucose DIASYS yang diperoleh dari Laboratorium PAU-UGM untuk mengukur kadar gula darah.
- b. Alloxan diperoleh dari Laboratorium PAU-UGM, dengan rincian dosis :
 - Dosis $125\text{mg/kgBB} = \frac{200}{1000} \times 125 = 25 \text{ mg per ekor tikus.}$
 - $25\text{mg} \times 25\text{ekor} = 625\text{mg}$ yang dibutuhkan dari total jumlah dosis alloxan.
- c. Glibenklamida sebagai zat pembanding, dengan dosis 0,1mg per ekor tikus, berikut adalah rincian dosisnya :

- $0.1 \text{ mg} \times 5 \text{ ekor} = 0.5 \text{ mg} \times 10 \text{ hari pemberian} = 5 \text{ mg}$ yang dibutuhkan

d. Sediaan uji berupa herba patikan kebo (*Euphorbia hirta* Linn). Berikut adalah rincian mempersiapkan bahan menjadi serbuk hingga dosisnya :

- Herba patikan kebo dalam bentuk utuh dicuci dan ditiriskan, gunanya adalah meminimalisir mikroorganisme liar yang masih menempel ; akar, batang, daun dan pada bunganya.
- Herba patikan kebo kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu tidak lebih dari 50°C selama 1 jam pemanasan.
- Setelah kering herba patikan kebo dibuat serbuk dan diayak dengan menggunakan ayakan *mesh* 48.
- Kemudian, dosis dibagi menjadi tiga kelompok sediaan bahan, yakni :

○ Dosis 2,5g/kgBB = $\frac{200}{1000} \times 2,5 = 0,5$ gram per ekor untuk sediaan bahan kelompok pertama;

- 0,5gram × 5ekor = 2,5gram × 10hari = 25gram yang dibutuhkan dari total sediaan bahan kelompok pertama.

○ Dosis 5g/kgBB = $\frac{200}{1000} \times 5 = 1$ gram per ekor untuk sediaan bahan kelompok kedua ;

- 1gram × 5ekor = 5gram × 10hari = 50gram yang dibutuhkan dari total sediaan bahan kelompok kedua.

○ Dosis 7,5 g/kg BB = $\frac{200}{1000} \times 7,5 = 1,5$ gram per ekor tikus putih strain wistar untuk sediaan bahan kelompok ketiga;

1. 5gram × 5ekor = 7.5gram × 10hari = 75gram yang dibutuhkan dari total sediaan

2. Alat

- a. Alat pembuat serbuk herba patikan kebo, meliputi : tampan penjemuran, pemanas khusus (open pengering), penggiling herba dan penadah serbuk.
- b. Alat pembuat larutan serbuk, meliputi : benzene, tabung glass, tabung reaksi, glass pengaduk dan tabung penadah larutan.
- c. Alat pemeriksaan kadar glukosa darah, meliputi : sarung tangan, jarum suntik, tabung reaksi, neraca analitik, sentrifuse kecil Hettich EBA III dan spektrofotometer (UV-1202 Shimadzu).
- d. Alat perlakuan pada tikus putih strain winstar, meliputi : alat pembuka mulut, kertas label, sonde oral, pipet tetes, sarung tangan dan jarum suntik.
- e. Alat pengolahan data, meliputi : pena, kertas dan seperangkat computer.

F. Cara Pengumpulan Data dan Cara Kerja

1. Mempersiapkan alat dan dicek kembali kelengkapannya.
2. Mempersiapkan masing-masing bahan dibuat infusa.
3. Mempersiapkan sampel pada hari pertama. Dilanjutkan dengan melakukan :
 - a. Pemilihan tikus putih strain winstar sebanyak 25 ekor.
 - b. Setiap tikus putih strain winstar ditimbang berat badannya ± 200 gram.
 - c. Tikus putih strain winstar dipuasakan selama 12 jam.
4. Kemudian setiap tikus putih strain winstar diambil darah sebanyak 1,5ml dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pertama cara pengukuran kadar

- a. Darah di Centrifuge dalam tabung reaksi dengan 4000 rpm selama 15 menit → ambil 10 µl plasma ditambah 1000 µl reagen → MiX → inkubasi → 20 menit (20°C - 25°C) → baca λ 500 nm.
 - b. Setelah baca hasil, kemudian melakukan penghitungan dengan rumus ketetapan sebagai $Cal = \frac{\Delta SPL}{\Delta STD} \times Considerat(100mg / dl)$
 - c. serta dicatat kadar gula darahnya. Dan dilanjutkan sebagai berikut :
 - 1) Semua tikus putih strain winstar kemudian diberi alloxan 125 mg/kg BB sehingga menjadi diabetik alloxan.
 - 2) Untuk melihat reaksi yang telah ditimbulkan, tikus putih strain winstar dibiarkan selama 48 jam atau 2 hari.
5. Setelah 48 jam atau 2 hari, kemudian dipuasakan sebelum diambil darah kedua dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah kedua, serta dicatat kadar gula darahnya. Dan selanjutnya diberi perlakuan sebagai berikut :
- a. Pada kelompok A (kelompok kontrol negatif) hanya diberi air putih sebanyak 1 kali sehari selama 10 hari.
 - b. Pada kelompok B (kelompok kontrol positif) diberi glibenklamida 0,1mg sebanyak 1 kali sehari selama 10 hari.
 - c. Pada kelompok C (kelompok uji pertama) diberi patikan kebo dosis 2,5g/200gBB sebanyak 1 kali sehari selama 10 hari.
 - d. Pada kelompok D (kelompok uji kedua) diberi patikan kebo dosis 5g/200gBB sebanyak 1 kali sehari selama 10 hari.
 - e. Pada kelompok E (kelompok uji ketiga) diberi patikan kebo dosis 7,5g/200gBB sebanyak 1 kali sehari selama 10 hari.

6. Setelah 10 hari diberi perlakuan, hari berikutnya atau hari ke-11 dipuasakan sebelum pengukuran kadar gula darah ketiga sebanyak 1,5 ml serta dicatat kadar gula darahnya.

G. Uji Validitas dan Reliabilitas

Prinsip validitas (kesahihan) adalah pengukuran dan pengamatan yang berarti prinsip keandalan instrumen dalam mengumpulkan data. Sedangkan reliabilitas (keandalan) adalah kesamaan hasil pengukuran atau pengamatan bila fakta atau kenyataan hidup tadi diukur atau diamati berkali-kali dalam waktu yang berlainan.

Metode yang digunakan adalah colometric test dengan menggunakan spektrofotometer. Pemeriksaan kadar gula darah menggunakan reagen KIT Glucose DYASIS metode GOD-PAP. Prinsipnya adalah glukosa diubah menjadi asam glukonik dan H_2O_2 oleh enzim oksidase H_2O_2 yang terbentuk bereaksi dengan 4-Aminoantipyrin dan phenol dengan bantuan enzim hydrogen peroxidase membentuk chinonimine yang berwarna dan intensitasnya diukur secara fotometrik.

Berikut adalah bagan rencana penelitian sebagai uji prinsip kesahihan dan

uji prinsip keandalan dalam pengamatan serta proses yang diamati .



Gambar 3. Bagan Rancana Penelitian

Keterangan gambar diatas :

- Pemeriksaan kadar glukosa kadar I : Pemeriksaan kadar glukosa darah sebelum diinduksi alloxan.
- Pemeriksaan kadar glukosa darah II : Pemeriksaan kadar glukosa darah sebelum perlakuan (setelah diinduksi alloxan).
 - Perlakuan A : Pemberian aquades pada kelompok kontrol negatif.
 - Perlakuan B : Pemberian obat glibenklamide 0,1g.
 - Perlakuan C : Pemberian patikan kebo 2,5g/200gBB.
 - Perlakuan D : Pemberian patikan kebo 5,0g/200gBB.
 - Perlakuan E : Pemberian patikan kebo 7,5g/200gBB.

- Pemeriksaan kadar glukosa darah III : Pemeriksaan kadar glukosa darah setelah tikus putih strain winstar diberi perlakuan.

H. Pengolahan dan Metode Analisis Data

Data diperoleh dari hasil pengukuran kadar gula darah pada masing-masing kelompok, pengolahan analisis data dilakukan melalui seperangkat komputer dan melalui metode analisis data One Way ANOVA. Kemudian dilanjutkan dengan Post Hoc Test. Untuk mengetahui kebermaknaan interkelompok digunakan uji Paired Sample T-Test.

I. Kesulitan Penelitian

Adapun kesulitan dalam penelitian ini yang dirasa peneliti cukup serius menanggapinya adalah :

1. Mengumpulkan referensi yang terkait penelitian tentang DM tipe II dan artikel yang terkait tumbuhan patikan kebo (*Euphorbia hirta* Linn).
2. Memperoleh sampel membutuhkan ketelitian serius, seperti umur 2 bulan, kelamin jantan, jumlah 25ekor dan berat badan ± 200 gram.
3. Kesulitan pelaksanaan penelitian di laboratorium diantaranya adalah ; dilakukan 2 hari untuk mengeringkan dan membuat serbuk patikan kebo, 1 hari melakukan infusa pada serbuk patikan kebo, alloxan dan glibenklamide, 2 hari untuk mempersiapkan hewan uji untuk diinduksi alloxan, ditambah 10 hari untuk memberikan perlakuan dan mengumpulkan dan mengolah data pada hari berikutnya.