

### BAB III

## METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *pre and post test control design* untuk mengetahui manfaat air ekstraksi rendaman tempe terhadap angka eritrosit dan kadar hemoglobin pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan.

#### B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (UGM).

Penentuan jumlah sampel yang digunakan menggunakan rumus federer:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

t = kelompok perlakuan

n = sampel

Berdasarkan rumus diatas dengan t = 6, didapatkan jumlah sampel pada percobaan ini :

$(6-1)(n-1) \geq 15$	Besar sampel : t x n
$(n-1) \geq 3$	: 6 x 4
$n \geq 4$	: 24 ekor

Sampel yang digunakan yaitu *Rattus Norvegicus* berkelamin jantan strain wistar berumur 2- 3 bulan dengan berat 150-250 gram sebanyak 30 ekor..

Sebanyak 30 ekor tikus ditimbang dan dibagi secara acak (randomisasi) menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor, yaitu :

1. Kelompok K0 sebagai kontrol normal (tanpa perlakuan). Kelompok ini hanya diberi makan dan minum selama penelitian berlangsung.
2. Kelompok K1 sebagai kontrol positif. Kelompok ini diinduksi aloksan 80 mg/kgBB sehingga menjadi diabetes dan diberikan perlakuan glibenklamide 0,09 mg / 200 grBB dalam interval waktu pemberian 1 kali per hari selama 14 hari.
3. Kelompok K2 sebagai kontrol negatif. Kelompok ini hanya diinduksi aloksan 80 mg/kgBB sehingga hanya menjadi diabetes dan tidak diberi perlakuan terapi.
4. Kelompok K3 sebagai kelompok perlakuan. Kelompok ini diinduksi aloksan 80 mg/kgBB sehingga menjadi diabetes dan diberi perlakuan air rendaman tempe sebanyak 40 gr/l per oral melalui sonde yang dilakukan 1 kali per hari selama 14 hari.
5. Kelompok K4 sebagai kelompok perlakuan. Kelompok ini diinduksi aloksan 80 mg/kgBB sehingga menjadi diabetes dan diberi perlakuan air rendaman tempe sebanyak 80 mg/l per oral melalui sonde yang dilakukan 1 kali per hari selama 14 hari.
6. Kelompok K4 sebagai kelompok perlakuan. Kelompok ini diinduksi aloksan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan di beri perlakuan air rendaman tempe sebanyak 160 gr/l per oral melalui sonde yang dilakukan 1 kali per hari selama 14 hari.

Setelah perlakuan tersebut dilakukan selama 14 hari, tiap kelompok dipuasakan selama  $\pm 10$  jam, kemudian langkah selanjutnya dengan mengambil spesimen darah tikus jantan yang dilakukan dengan cara menusukkan mikrohematokrit ke bagian medial dari mata (*sinus orbitalis*) dekat nasal. Kemudian spesimen tersebut dibawa ke PAU UGM untuk dilakukan pemeriksaan angka eritrosit dan kadar hemoglobin.

### C. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada (UGM). Penelitian ini dilakukan dalam rentang waktu 30 hari yaitu pada Desember 2014 hingga Januari 2015.

### D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Air rendaman tempe berbagai konsentrasi
2. Variabel terikat : Angka eritrosit dan kadar hemoglobin tikus diabetes mellitus
3. Variabel terkontrol:
  - a. Usia : Tikus jantan yang memiliki usia 2-3 bulan.
  - b. Jenis kelamin : Tikus berjenis kelamin jantan.
  - c. Berat badan : Pemilihan subjek penelitian yang mempunyai berat badan berkisar antar 150-250 gram.
  - d. Pola makan : Pemberian pakan dengan jumlah yang tersedia satu kali sehari.

- e. Tempat penelitian : Pemilihan tempat (kandang tikus laboratorium PAU) subjek penelitian sama
- f. Waktu pemeriksaan : Pemeriksaan subjek penelitian dilakukan pada waktu yang sama. Pemeriksaan angka eritrosit dan kadar hemoglobin, sebelum dan sesudah pemberian air ekstraksi rendaman tempe .
- g. Lama perlakuan : Waktu pemberian perlakuan sama tiap kelompok subjek penelitian .

#### **E. Definisi Operasional**

1. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) adalah tikus percobaan dengan diinduksi aloksan sehingga menjadi diabetes. Tikus yang digunakan adalah galur wistar berjenis kelamin jantan, berjenis kelamin jantan, dan berat badan 150-250 gram, dan sebanyak 30 ekor.
2. Aloksan adalah zat toksin yang beraksi dengan merusak sel beta pulau Langerhans pada pancreas sehingga menurunkan produksi insulin. Dosis tunggal aloksan intraperitoneal yang dapat berefek diabetogenik sebesar 80-85 mg/kgBB pada mencit atau tikus dengan dosis maksimal sebesar 140-180 mg/kgBB.
3. Angka eritrosit adalah perhitungan eritrosit yang dilakukan dengan metode manual dengan memakai bilik hitung. Eritrosit yang telah diperoleh akan dilarutkan dengan larutan pengencer eritrosit (larutan hayem) kemudian diisikan pada *objek glass* yang ditaruh dibawah mikroskop. Angka eritrosit

diperoleh dari perhitungan, jumlah sel eritrosit per milimeter kubik dibagi volume darah yang dihitung dikali 200 kali pengenceran.

$$\text{Hitung jumlah eritrosit} = \frac{\text{jumlah eritrosit dlm } 1 \text{ mm}^2 \times \text{pengenceran}}{\text{mm}^3 \times 10^6}$$

Volume yang dihitung

4. Kadar Hemoglobin adalah perhitungan dengan metode kolorimetrik sianmethemoglobin. Darah tikus yang akan dimasukkan ke dalam tabung pereaksi diambil dengan memakai pipet hemoglobin dan ditambahkan zat pereaksi (larutan drapkin). Kadar hemoglobin ditentukan dengan mengukur intensitas warna yang terbentuk secara spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm.
5. Obat glibenklamide adalah obat hipoglikemik oral yang biasa digunakan dalam pengobatan Diabetes Mellitus. Dosis glibenklamide yang digunakan adalah 5 mg yang diberikan akan dihitung dosisnya memakai konversi dosis dari manusia 70 kg ke tikus 200 gr yakni 0,018. Dosisnya adalah 0,09mg/200gramBB tikus diberikan satu kali sehari pagi hari.
6. Air rendaman tempe adalah tempe yang dibuat dengan cara tempe dibungkus daun pisang telah ditimbang (20 gram) kemudian dipotong-potong kecil lalu dicampur dengan 250ml air mendidih dalam wadah dan dibiarkan selama 12 jam. Kemudian airnya ditiriskan lalu diminumkan ke tikus diabetes. Diberikan 1 ml satu kali per hari sesuai dosis pada kelompok K3 dengan dosis 40 gr/l, K4 dengan dosis 80 gr/l, dan K5 dengan dosis 160 gr/l.

## F. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

- a. Timbangan (gram)
- b. Kandang
- c. Pipet dan botol minum
- d. Pikrat
- e. Sduit injeksi
- f. Mikropipet
- g. Bilik hitung improved-neubaur
- h. Mikroskop
- i. Handscoen

### 2. Bahan

- a. Aloksan 80-85 mg/kgBB
- b. Aquades
- c. Glibenklamid 0,09mg/200gramBB tikus
- d. Tempe berumur 12 jam
- e. Emersi
- f. Larutan drapkin
- g. Larutan hayem

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Perlakuan pada hewan uji

Sampel penelitian 30 ekor tikus putih jantan yang telah dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing 5 ekor yaitu: kelompok Kontrol Normal (K0) hanya diberi pakan biasa, kelompok Kontrol Positif (K1) disuntik aloksan intraperitoneal 80 mg/KgBB dan diberi obat glibenklamid 0,09 mg/200grBB, kelompok Kontrol Negatif (K2) hanya disuntik aloksan intraperitoneal 80 mg/KgBB, kelompok perlakuan (K3) disuntik aloksan 80 mg/KgBB dan diberi air rendaman tempe 40 gr/l, kelompok perlakuan (K4) disuntik aloksan 80 mg/KgBB dan diberi air rendaman tempe 80 gr/l, kelompok perlakuan (K5) disuntik aloksan 80 mg/KgBB dan diberi air rendaman tempe 160 gr/l.

Pada hari ke-8, semua kelompok tikus dipuasakan selama 12 jam lalu dilakukan pretest berupa pengambilan darah dari vena orbitalis tikus. kemudian dilakukan penghitungan angka eritrosit dan kadar hemoglobin.

Pada hari ke-9, kelompok tikus diinduksi aloksan dengan dosis 80mg/kgBB tikus secara intraperitoneal yaitu: K1, K2, K3, K4, dan K5. Hanya kelompok K0 yang tidak diinduksi aloksan karena hanya sebagai kontrol normal.

Pada hari ke-12, semua kelompok tikus yang diinduksi aloksan telah menderita Diabetes Mellitus. Kemudian dilakukan pretes kedua berupa penghitungan angka eritrosit dan pengukuran kadar hemoglobin kemudian dimulai pemberian terapi sesuai kelompok perlakuan.

Pada hari ke-28, semua kelompok tikus yang telah diterapi kemudian dilakukan postes berupa penghitungan angka eritrosit dan pengukuran kadar hemoglobin. Setelah itu segera dilakukan terminasi segera pada semua kelompok tikus dengan mematahkan *Os scapula*.

## 2. Pembuatan air rendaman tempe

Tempe dibungkus daun pisang seberat 20 gram yang dipotong-potong kecil lalu dicampur dengan 250 ml air mendidih di sebuah baskom dan dibiarkan selama 12 jam. Kemudian airnya ditiriskan lalu diminumkan sebanyak 0,1ml memakai sonde ke tikus diabetes dalam waktu satu kali per hari.

## 3. Pengukuran angka eritrosit

Pengukuran angka eritrosit dilakukan pada hari ke-12 pasca induksi aloksan dan hari ke-28 pasca terapi air rendaman tempe.

Dengan pipet eritrosit, ambillah darah sampai tanda 101 (pengenceran 200x). Lalu, kocok selama 3 menit supaya homogen. Atau bisa dengan cara 20  $\mu$ l darah diencerkan dalam tabung pereaksi ukuran 75 x 12 mm yang diisi 4 ml larutan pengencer, tutup dengan karet, dan campur dengan cara goyangkan sambil memutar membentuk sudut 12°, minimal 2 menit.

Darah pada bilik hitung yang dibersihkan, buanglah 4 tetes pertama dan setelah tetesan ke-5 taruh ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup. Biarkan 3 menit agar mengendap dan mudah dihitung. Hitung dengan perbesaran 10x (objektif). Perhatikan penyebaran sel



eritrosit pada seluruh medan penglihatan, dalam kotak besar di tengah. Kotak akan terbagi menjadi 25 kotak kecil dan setiap kotak akan terbagi menjadi 16 kotak kecil. Hitung sel-sel eritrosit yang ada dalam lima kotak lebih kecil.

Kemudian ganti dengan perbesaran 40x (objektif), geserlah pada kotak yang akan dihitung. Hitunglah dengan cara seperti hitung leukosit. Perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{Hitung jumlah eritrosit} &= \frac{\text{jumlah sel dlm } 1 \text{ mm}^2}{\text{Volume yang dihitung}} \times \text{pengenceran} / \text{mm}^3 \\ &= \frac{\text{jumlah sel dlm } 1 \text{ mm}^2}{5 \times (0,2 \times 0,2 \times 0,1)} \times \text{pengenceran} / \text{mm}^3 \\ &= N \times 10.000 / \text{mm}^3 \end{aligned}$$

#### 4. Pengukuran kadar haemoglobin

Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan pada hari ke-12 pasca induksi aloksan dan hari ke-28 pasca terapi air rendaman tempe. Ke dalam tabung reaksi ukuran 75 x 10 mm, ambil 5 ml pereaksi larutan drapkin dengan mikropet tambahkan 20 $\mu$ l/mm<sup>3</sup> darah ke dalam pereaksi larutan drapkin.

Campur dengan memutar-mutar tabung dengan alat inkubator dan Inkubasikan selama 3-5 menit. Bacalah darah sampel dengan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

#### H. Analisa Data

Hasil pengambilan data akan dianalisa dengan menggunakan *SPSS 16.0 for windows*. Langkah pertama akan disajikan dengan membuat tabel hasil penelitian. Analisis data dengan melakukan uji normalitas

distribusi data dengan uji *Saphiro-wilk*. Bila, Hasil uji normalitas didapatkan data tidak terdistribusi normal, maka uji yang digunakan adalah uji non parametric *Kruskal Wallis*. Tingkat kepercayaan (CI) adalah 95%, sehingga jika didapatkan  $p < 0,05$  maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna. Analisis post hoc test menggunakan uji *Mann Whitney test* (Dahlan, 2003).