BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 DESAIN PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium dengan *pre- post test control group design.*

3.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

A. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2017 – Mei 2017.

B. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) UGM, Lembaga Pusat Penelitian Terpadu (LPPT) UGM dan Laborotorium Farmasi UMY.

3.3 POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN

Populasi yang diambil dalam penelitian ini adalah tikus putih *strain Sparague dowley*. Subjek penelitian memiliki kriteria sebagai berikut: usia sekitar 2 bulan, memiliki berat >150 gram, jenis kelamin jantan, sehat dinilai dari aktivitas gerak tikus dan tidak memiliki kecacatan.

Terdapat 5 kelompok perlakuan pada penelitian ini. Kelompok I adalah N (Normal) sebagai kontrol, kelompok II adalah D (Diabetes) yaitu tikus yang

diinduksi streptozoticin (STZ) + Nicotinamide (NA), kelompok III adalah D+G yaitu tikus diabetes dengan diberi glibenklamid, kelompok IV adalah D+C yaitu tikus diabetes yang diberi infusa kayu manis dosis 300 mg/kgBB/hari kelompok V yaitu tikus diabetes yang diberi infusa kayu manis dosis 150 mg/kgBB/hari.

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan menggunakan rumus Federer (federerW, 1991) sebagai berikut :

$(n-1)(t-1) \geq 15$ (t = jumlah kelompok, n = jumlah sampel)

$(n-1)(5-1) \geq 15$

$n \geq 4{,}7$ (dibulatkan 5)

dari perhitungan tersebut dapat disimpulkan sampel yang akan dipergunakan pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih strain *sprague dowley* yang akan dibagi secara acak kedalam 5 kelompok dengan masing- masing terdiri dari 5 ekor tikus per kelompok .

3.4 VARIABLE PENELITIAN

A. Variable Bebas : Infusa kayu manis (*Cinnamon burmanii*) dosis 300mg/kgBB/hari dan 150 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

B. Variable Tergantung : Kadar superoksida dismutase pada masing- masing tikus.

C. Variable Kontrol : Tikus putih strain spargue dowley, usia pada setiap sampel 2 bulan, jenis kelamin pada setiap sampel adalah jantan, berat badan sampel yang digunakan >150 gram, sehat dilihat dari aktivitas dan kelincahan gerak, makan dan minum ad libitum.

3.5 DEFINISI OPERASIONAL

A. Kayu manis *(Cinnamon burmani)*

Pada penelitian ini kayu manis didapatkan dari Pasar Beringharjo D.I Yogyakarta.

B. Diabetes

Diabetes pada penelitian ini diakibatkan oleh induksi *Nicotinamide* 120mg/kgBB dan *Streptozotocin* 60mg/kgBB/hari pada tikus putih strain *sparague dowley* . Kriteria penetuan diabetes berdasarkan peningkatan kadar glukosa darah puasa tikus yaitu 238 $\pm$ 14,4 mg/dL. Pengukuran dilakukan menggunakan metode GOD PAP ((Kumar S.S. & J.K, 2013) .

C. Superoksida Dismutase

Kadar superoksida dismutase berasal dari sampel darah tikus yang diukur setelah diinduksi STZ+NA, setelah diberi terapi infusa kayu manis pada hari ke 7 dan 14 , dan setelah diberi terapi glibendklamid pada

hari ke 7 dan 14. Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar superoksida dismutase tikus dipuasakan terlebih dahulu setidaknya 8 jam. Pengukuran kadar superoksida dismutase diperiksa dengan metode ELISA (Winarsi, et al., 2012).

D. Glibenklamid

Glibenklamid merupakan antidiabetik oral golongan sulfonylurea generasi kedua. Kerjanya dengan cara merangsang sekresi insulin dan meningkatkan sensivitas jaringan terhadap insulin. Glibenklamid memiliki efek samping hipoglikemia, hiperinsulinemia dan peningkatan berat badan. Pada penelitian ini glibenklamid diberikan menggunakan sonde dengan dosis 0,09 mg/200gramBB/hari selama 14 hari. (Gisti Rahmawati, 2014)

3.6 CARA KERJA PENELITIAN

A. Alat

Alat – alat yang digunakan adalah kandang tikus, timbangan *electrical scale*, spuit 5 cc, termometer , panci, kompor, pisau, blender, sonde, GOD PAP diagnostic kit, SOD kit, spektofotometer , vortex.

B. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan diantaranya adalah streptozotocin, Nicotinamide, kayu manis (*Cinnamomum burmanii*), glibenklamid, makanan dan minum untuk tikus, eppendorf, kertas saring, aquadest.

C. Adaptasi hewan uji coba

Tikus uji coba diadaptasikan di animal house selama 3 hari. Tikus diadaptasikan dengan lingkungan barunya, makan dan minumnya. Tujuannya adalah untuk menyamakann kondisi seluruh tikus uji coba sebelum diberikan perlakuan.

D. Induksi tikus dengan Streptozoticin dan Nicotinamide

Tikus pada kelompok yang diberi perlakuan, diinduksi NA dosis 120 mg/kgBB dan STZ 60 mg/kgBB secara intraperitoneal dan kadar gula darah diperiksa 3 hari setelah induksi. Sebelum diinduksi, tikus dipuasakan selama satu malam (Ghasemi, et al., 2014).

E. Pembuatan dan pemberian infusa kayu manis

Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Kulit kayu manis dijemur hingga kering, setelah itu dihaluskan. Serbuk kayu manis ditimbang sebanyak 10 gram. Langkah selanjutnya siapkan 2 panci, panci pertama berukuran kecil berisi serbuk kayu manis 300g + 100 ml air yang diletakkan diatas panci kedua yang berukuran lebih besar dan telah berisi air sebanyak 2x berat serbuk kayu manis tersebut. Kemudian panci besar dipanaskan diatas api hingga mendidih. Pemanasan dilakukan selama ±15 menit terhitung dari air didalam panci besar mendidih (suhu panci kecil mencapai 90ºC). Setelah ±15 menit, panci kecil diturunkan dan disaring melalui kain

flannel dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai memperoleh volume infusa yang diinginkan. (Sunarsih, et al., 2014)

F. Pemberian glibenklamid

Dosis glibenklamid pada manusia adalah 5 mg/hari maka dosis pada tikus 0,09 mg/200grBB/hari. Larutan glibenklamid diperoleh dengan cara melarutkan 0,09 mg zat aktif glibenklamid kedalam 1ml aquadest. Pemberian glibenklamid dilakukan secara oral menggunakan sonde, diberikan selama 14 hari .

G. Pengukuran Subyek

a. Berat badan tikus

Pengukuran berat badan dilakukan menggunakan timbagan sebelum tikus diberi perlakuan. Tikus putih strain *sparague dowley* yang dijadikan sample yaitu tikus dengan berat badan antara >150 gram .

b. Kadar Gula Darah tikus

Pengukuran glukosa darah tikus dilakukan sebelum dan sesudah diinduksi streptozotocin. Pengukuran dilakukan dengan memeriksa kadar gula darah puasa dan tikus dipuasakan minimal 8 jam. Sampel yang digunakan yaitu serum darah tikus yang diambil dari pembuluh darah vena mata. Tikus yang dipilih adalah tikus dengan kadar gula darah puasa 238 $\pm$ 14,4 mg/dL (Ghasemi, et al 2014).

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode GOD-PAP

(Kumar S.S. & J.K, 2013).

a. Kadar superoksida dismutase tikus

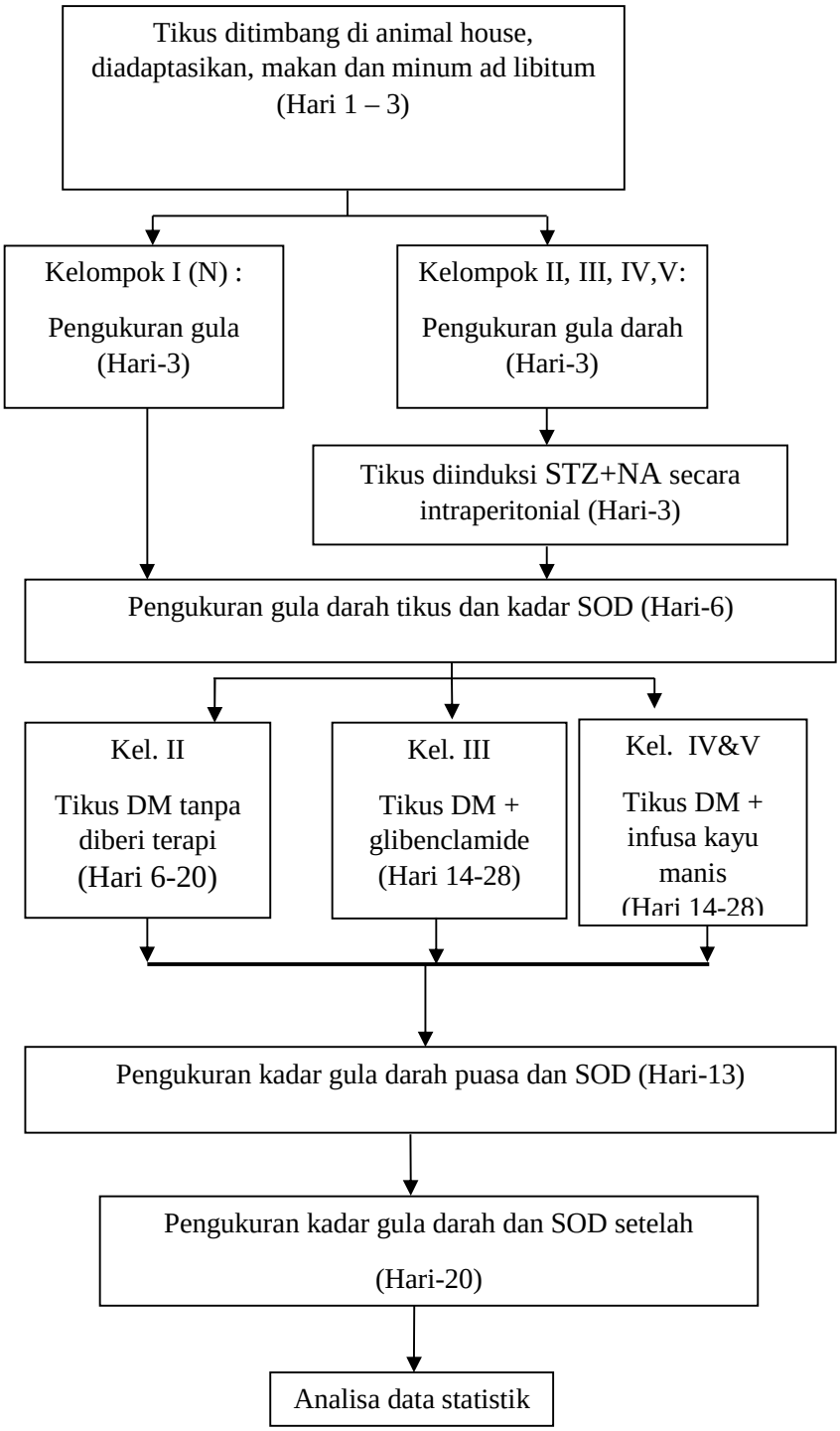
Dilakukan pengukuran kadar SOD sebayak 3 kali yaitu, sebelum terapi, setelah terapi 1 minggu dan setelah terapi 2 minggu. Pengambilan sampel darah tikus diambil melalui vena orbital. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi diendapkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian dipindahkan dalam tabung sentrifuse dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Serum diambil dengan mikropipet sebanyak 100 µl kemudian dimasukkan ke dalam tabung efendorf. Pengukuran SOD dilakukan menggunakan SOD kit dengan metode ELISA, adapun penjelasan prosedur pemeriksaan sebagai berikut :

1. Disiapkan reagen,sample dan standar sesuai petunjuk.
2. Disiapkan microplate 96 wells.
3. Larutan standard pada tabung ependoff a-g dipindahkan ke tiap sumuran (a-g) microplate dan dibuat duplikasi atau secara duplo .
4. Ditambahkan 0,1 ml sample diluent buffer sebagai kontrol pada (h) microplate.
5. Ditambahkan 0,1 ml sample serum darah tikus pada tiap-tiap sumuran yang kosong dan dilakukan duplikasi microplate di tutup dan inkubasi pada suhu 37ºC selama 90 menit.

6. Penutup *microplate* dibuka, isi sumuran dibuang dan dibalikkan pada kertas tissue agar tidak ada cairan yang tersisa di sisi microplate. Sumuran tidak boleh dibiarkan sampai benar-benar kering.
7. Ditambahkan 0,1 ml larutan biotin SOD antibody pada tiap sumuran, ditutup dan dinkubasi pada suhu 37ºC selama 60 menit.
8. Sumuran di cuci 3 kali dengan wash buffer, isi sumuran dibuang dan dibalikan pada kertas tisu.
9. Ditambahkan 0,1 ml larutan SABC dalam tiap sumur , ditutupp dan diinkubasi pada suhu 37ºC selama 30 menit.
10. Sumuran dicuci sebanyak 5 kali menggunakan wash buffaer .isi sumuran dibuang dan dibalikkan pada kertas tissue.
11. Ditambahkan 90 πl TMB ke tiap sumuran , kemudian *microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37ºC selama 25-30 menit dan akan berubah warna menjadi biru.
12. Ditambahkan 0,1 ml TMB stop solution, maka setelah 30 menit warna akan berubah menjadi kuning.
13. Dibaca O.D absorbansi pada 450 nm di *microplate reader*.

(Septiawati, 2013)

3.7 ALUR PENELITIAN



3.8 UJI VALIDITAS DAN RELIABILITAS

Validitas dan realibilitas pada penelitian ini ditentukan oleh ketepatan alat ukur, ketepatan cara pengukuran dan dosis bahan uji serta terapi yang tepat.

3.9 ANALISIS DATA

Pengambilan data dilakukan dengan eksperimen langsung pada tikus *Spargue dowley* yang sebelumnya sudah diberikan perlakuan dengan diinduksi STZ+NA, pemberian terapi infusa kayu manis dan glibendklamid. Setelah data terkumpul dilakukan pengolahan secara statistik menggunakan program SPSS 16.0. Uji yang dilakukan dengan variable numerik dengan sampel lebih dari 2 kelompok adalah uji parametrik *One way* ANOVA dengan syarat distribusi normal dan varians data homogen. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi dapat dilakukan transformasi data menggunakan uji non parametrik.

3.10 ETIKA PENELITIAN

Etika penelitian didapatkan dari persetujuan Komite Etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Univesitas Muhammadiyah Yogyakarta dan tertera di lampiran 1.