

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan rancangan *pre-post test control group design*.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan di Laboratorium Gizi dan Pangan PAU UGM, LPPT UGM dan Laboratorium Farmasi FKIK UMY. Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Mei 2017.

#### **C. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian ini adalah tikus putih strain *Sprague dawley* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Jenis kelamin jantan
2. Berusia sekitar 2 bulan
3. Berat badan > 150 gram
4. Sehat (dilihat dari aktivitas geraknya dan tidak cacat)

Jumlah subyek pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Shofiati, 2013), yaitu:

$$(n-1)(t-1) \geq 15 \text{ (t adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah sampel)}$$

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

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Jadi, sampel yang dibutuhkan untuk setiap kelompok pada penelitian ini adalah 5 ekor, sehingga jumlah keseluruhan sample yang akan digunakan sebanyak 25 ekor tikus jantan putih *Sprague dawley* dan dibagi kedalam 5 kelompok.

Perlakuan yang diberikan kepada subyek antara lain:

1. Kelompok I sebagai kontrol negatif (tanpa diberi intervensi)
2. Kelompok II sebagai kontrol positif (diinduksi STZ 60 mg/kgBB + NA 120 mg/kgBB)
3. Kelompok III (diinduksi STZ+NA dan *glibenclamide* dosis 0,09 mg/200grBB/hari)
4. Kelompok IV (diinduksi STZ+NA dan pemberian kayu manis dosis 300 mg/kgBB/hari)
5. Kelompok V (diinduksi STZ+NA dan pemberian kayu manis dosis 150 mg/kgBB/hari).

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Infusa kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan dosis 300 mg/kgBB/hari dan 150 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

2. Variabel Tergantung

Kadar adiponektin serum dari masing – masing tikus.

3. Variabel Terkendali

- a. Ras : dilakukan pemilihan objek penelitian dari galur yang sama yaitu strain *Sprague dawley*
- b. Usia : subyek penelitian memiliki usia 2 bulan
- c. Jenis kelamin : subyek memiliki jenis kelamin jantan
- d. Berat badan : subyek pada penelitian ini mempunyai berat badan antara >150 gram
- e. Sehat : subyek penelitian ini seluruhnya sehat, berdasarkan aktivitas dan kelincahan gerak serta tidak ada kelainan fisik.
- f. Infusa kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) diberikan pada setiap tikus putih pada kelompok IV dan kelompok V.
- g. Masing – masing sampel diupayakan mendapat perawatan yang sama.

## E. Definisi Operasional

### 1. Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*)

Pada penelitian ini kayu manis didapatkan dari Pasar Tradisional Bringharjo, Yogyakarta.

### 2. Diabetes

Pada penelitian ini, diabetes diakibatkan oleh induksi *streptozotocin* dosis 60 mg/kgBB dan *nicotinamide* dosis 120 mg/kgBB secara intraperitoneal pada tikus *Sprague dawley* dan diperiksa 3 hari setelah induksi. Kriteria penentuan diabetes berdasarkan peningkatan kadar glukosa darah puasa tikus yaitu  $238 \pm 14,4$  mg/dL. Sebelum dilakukan pemeriksaan, tikus dipuasakan minimal 8 jam. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode GOD-PAP (*Glucose Blood Test "Enzymatic Colorimetric Test"*) (Ghasemi, *et al.*, 2014).

### 3. *Glibenclamide*

*Glibenclamide* merupakan antidiabetik oral golongan sulfonilurea generasi II yang bekerja dengan cara merangsang sekresi insulin dan meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin. *Glibenclamide* memiliki efek samping berupa hipoglikemik, insulinemia dan peningkatan berat badan. Dosis *glibenclamide* pada manusia adalah 5 mg/hari maka dosis pada tikus 0,09 mg/200grBB/hari. Larutan *glibenclamide* diperoleh dengan cara melarutkan 0,09 mg zat aktif *glibenclamide* kedalam 1 ml

*aquadest*. Pemberian *glibenclamide* dilakukan secara oral menggunakan sonde, diberikan sebelum makan selama 14 hari.

#### 4. Kadar Adiponektin

Sampel yang digunakan adalah serum darah tikus yang diukur sebanyak 3 kali yaitu sebelum diberi terapi, setelah hari ke-7 terapi dan hari ke-14 terapi sesuai dengan kelompok perlakuan. Pengukuran kadar adiponektin ini menggunakan Rat ADP/Acrp30 (*Adiponectin*) ELISA Kit. Serum diambil dari vena pembuluh darah mata tikus *Sprague dawley* pada semua kelompok, kemudian pemeriksaan kadar adiponektin dilakukan pada keadaan puasa sedikitnya 8 jam (Rahman, 2008). Kadar adiponektin normal diambil dari rata – rata kadar adiponektin pada kelompok kontrol negatif atau dengan membandingkan kadar adiponektin pada kelompok tikus sebelum dan setelah diberi perlakuan.

### **F. Alat dan Bahan**

#### 1. Alat

Alat – alat yang digunakan antara lain kandang tikus ukuran 50 cm x 50 cm x 40 cm, timbangan *electrical scale*, spuit 3 cc, spuit 10 cc, panci, kompor, pisau, blender, sonde, gelas ukur, sarung tangan, kertas saring, tempat minum tikus, tabung ependorf, spektrofotometri.

## 2. Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan diantaranya adalah *streptozotocin* dan *nicotinamide*, kayu manis (*Cinnamomum burmanii*), *glibenclamide*, makanan standar untuk tikus, *aquadest*, air minum, sekam, Rat *Adiponectin* ELISA kit.

## G. Cara Kerja

### 1. Adaptasi Hewan Uji Coba

Tikus uji coba diadaptasikan di animal house selama 3 hari untuk menyamakan kondisi seluruh tikus uji coba sebelum diberikan perlakuan.

### 2. Induksi Tikus dengan *Streptozotocin* dan *Nicotinamide*

Tikus pada kelompok yang diberi perlakuan, diinduksi NA 120 mg/kgBB, kemudian setelah 15 menit diinduksi STZ 60 mg/kgBB secara intraperitoneal dan kadar gula darah diperiksa 3 hari setelah induksi. Sebelum diinduksi, tikus dipuasakan minimal 8 jam (Ghasemi, *et al.*, 2014).

### 3. Pembuatan dan Pemberian Infusa Kayu Manis

Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Kulit kayu manis dijemur hingga kering, setelah itu dihaluskan menggunakan blender. Bubuk kayu manis ditimbang sesuai dosis yang ditentukan. Langkah selanjutnya bubuk kayu manis dicampur dengan air hingga volume mencapai 100 mL, lalu dipanaskan didalam panci tertutup dengan suhu 90°C selama 15 menit. Ditunggu beberapa saat sampai infusa dingin, kemudian saring dan masukkan ke dalam gelas berlabel. Setiap kelompok

perlakuan diberikan infusa menggunakan sonde dengan volume 1 mL sesuai dosis, satu hari sekali sebelum makan selama 14 hari.

#### 4. Pemberian *Glibenclamide*

Dosis *glibenclamide* pada tikus 0,09mg/200grBB/hari. Larutan *glibenclamide* diperoleh dengan cara melarutkan 0,09 mg zat aktif *glibenclamide* kedalam 1 mL *aquadest*. Pemberian *glibenclamide* dilakukan secara oral menggunakan sonde, satu kali sehari dan diberikan sebelum makan selama 14 hari.

##### a. Berat badan tikus

Pengukuran berat badan dilakukan menggunakan timbangan sebelum tikus diberikan perlakuan. Tikus putih strain *Sprague dawley* yang dijadikan sampel yaitu tikus dengan berat badan > 150 gram.

##### b. Kadar gula darah tikus

Pengukuran glukosa darah tikus dilakukan sebelum dan sesudah diinduksi *streptozotocin + nicotinamide*. 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. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode GOD-PAP (*Glucose Blood Test "Enzymatic Colorimetric Test"*).

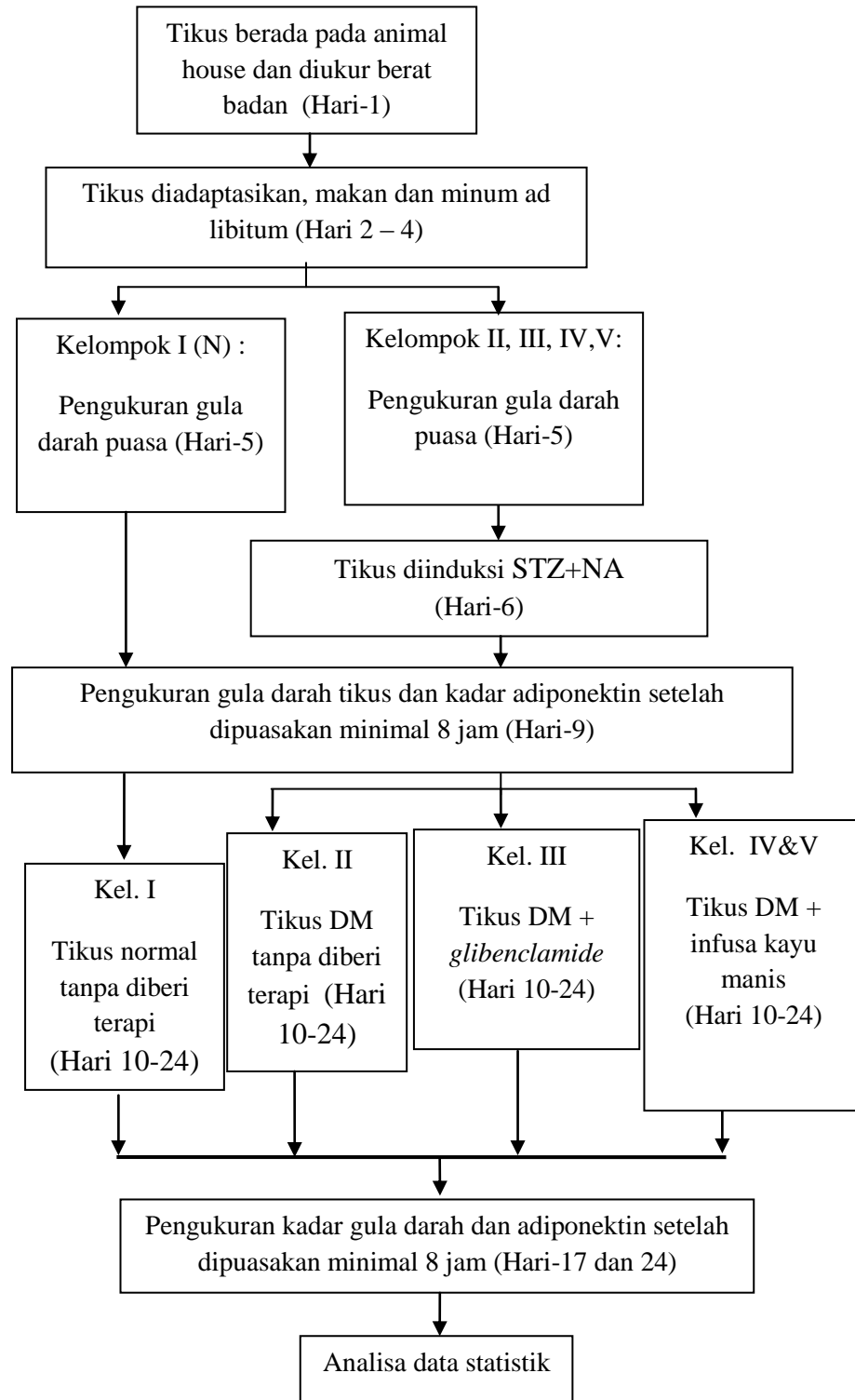
c. Kadar adiponektin tikus

Pengukuran kadar adiponektin menggunakan metode Rat Adiponektin ELISA kit dan sampel diletakkan pada suhu ruang. Pertama, *wells* dicuci menggunakan *wash buffer* sebanyak 2 kali, yaitu sebelum dimasukkan *standard*, sampel dan *control* (kosong) *wells*. Kemudian *standard* dan sampel dimasukkan ke *wells* sebanyak 0,1 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Lalu, masukkan *biotin detection antibody* sebanyak 0,1 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.

Kemudian, *wells* dikeluarkan dan dicuci kembali dengan *wash buffer* 3 kali, tambahkan *SABC working solution* sebanyak 0,1 mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Cuci kembali *wells* menggunakan *wash buffer* sebanyak 5 kali, kemudian tambahkan *TMB substrat* sebanyak 90 µL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 25 menit. Tambahkan *stop solution* sebanyak 50 µL pada tiap *wells*, setelah itu dilakukan pembacaan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.



## H. Alur Penelitian



### **I. Uji Validitas dan Realibilitas**

Kesahihan (validitas) dan keterandalan (realibilitas) pada penelitian ini ditentukan oleh ketepatan alat ukur, ketepatan cara pengukuran dan dosis bahan uji serta terapi yang tepat.

### **J. Analisa Data Penelitian**

Pengambilan data dilakukan dengan eksperimen langsung pada tikus *Spargue dawley* yang sudah diberikan perlakuan berupa induksi *streptozotocin+nicotinamide*, pemberian terapi infusa kayu manis dan *glibenclamide*. Setelah data terkumpul, dilakukan pengolahan data secara statistik menggunakan program SPSS.

Uji yang dilakukan dengan variabel 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.

### **K. Kesulitan Penelitian**

Kesulitan yang dihadapi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Infusa kayu manis pada suhu ruang hanya dapat bertahan selama 24 jam.
2. Keterbatasan jumlah *sample serum* darah yang diambil, dikarenakan frekuensi pengambilan darah dengan jumlah yang relatif banyak dapat mempengaruhi kesehatan tikus.

**L. Etika Penelitian**

Etika penelitian didapatkan dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang terlampir pada Lampiran 1.