

BAB III METODE PENELITIAN

A. Design Penelitian

Model penelitian ini adalah eksperimental murni pada hewan uji yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan *pre test, post test dan controlled group design*.

B. Populasi dan Sampel

Subyek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spargue Dawley*. Subyek yang diteliti memiliki kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Usia sekitar 2-4 bulan
2. Memiliki berat badan 150-250 gram
3. Berjenis kelamin jantan

Subyek didapat dari laboratorium PAU Pasca Sarjana dan laboratorium Farmakologi Universitas Gadjadara. Jumlah Subyek dalam penelitian ini adalah 25 ekor yang diacak dan dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor subyek.

Besarnya sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer.

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

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

$$r-1 \geq 15/4$$

$$r-1 \geq 3,75$$

$$r \geq 5$$

Keterangan :

t = Banyaknya kelompok

perlakuan

r = Jumlah replikasi

Masing masing kelompok akan di beri perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif (Na CMC 0,5%), hewan uji yang sudah diinduksi alloxan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik di beri suspensi Na CMC 0,5% dengan dosis 2 ml/200grBB selama 14 hari.
2. Kelompok 2 sebagai kontrol positif, hewan uji yang sudah diinduksi alloxan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan glibenklamid 1 kali sehari selama 14 hari masing masing 0,09 mg/200grBB/hari/tikus
3. Kelompok 3 sebagai kelompok uji yang diinduksi alloxan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan di berikan perlakuan ekstrak kulit *Garcinia mangostan* 1 kali sehari selama 14 hari masing masing 50 mg/kgBB/hari/tikus
4. Kelompok 4 sebagai kelompok uji yang diinduksi alloxan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan di berikan perlakuan ekstrak kulit *Garcinia mangostan* 1 kali sehari selama 14 hari masing masing 100 mg/kgBB/hari/tikus
5. Kelompok 5 sebagai kelompok uji yang diinduksi alloxan 80mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan di berikan perlakuan ekstrak kulit *Garcinia mangostan* 1 kali sehari selama 14 hari masing masing 200

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : pemberian ekstrak kulit *Garcinia mangostana* 1 kali sehari selama 14 hari dengan dosis masing masing 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, pemberian glibenklamid 1 kali sehari selama 14 hari dengan dosis 0,09 mg/200grBB/hari/tikus dan pemberian placebo (Suspensi Na CMC 0,5% 2 ml/200grBB).
2. Variabel terikat : kadar glukosa darah puasa.
3. Variabel terkontrol :
 - a. Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Spargue Dawley* (umur 2-4 bulan dan berat 150-250 gram).
 - b. Faktor genetik menggunakan tikus satu galur yaitu dari galur *Spargue Dawley* dan dalam proses pengambilannya menggunakan sistem randomisasi.
 - c. Faktor hormonal menggunakan tikus jantan agar tidak terpengaruh oleh siklus hormonal seperti menstruasi dan kehamilan yang akan mengganggu hasil penelitian (Sugiyanto, 1995).
 - d. Kondisi pakan dan kandang sama.
 - e. Sampel yang akan digunakan adalah sampel plasma glukosa darah puasa.
 - f. Waktu pengambilan sampel adalah sebelum diinduksi alloxan, 48 jam setelah diinduksi alloxan dan sesudah 14 hari perlakuan.
 - g. Lama penelitian dan takaran sampel yang di uji adalah 14 hari

yaitu 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB ekstrak kulit *Garcinia mangostana*.

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Adalah kulit buah manggis yang segar dan masak yang ditandai dengan warna merah merata dan konsistensi lebih lunak. Kulit buah manggis tersebut kemudian dianalisa lebih lanjut di Laboratorium Farmasetika Prodi Farmasi FKIK UMY. Pemberian ekstrak *Garcinia mangostana L* dilakukan setiap pagi 1 kali sehari dengan dosis masing masing 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB selama 14 hari. Cara pemberiannya dengan cara di sonde atau per-oral.

2. Glukosa Darah Plasma Puasa

Adalah glukosa darah yang terdapat dalam plasma darah. Glukosa darah puasa ini di ambil setelah hewan uji di puasakan terlebih dahulu selama 8-12 jam. Pengambilan sampel di lakukan 3 kali yaitu sebelum induksi alloxan, 48 jam setelah induksi alloxan dan setelah 14 hari pemberian perlakuan. Sampel glukosa darah puasa akan di ambil melalui vena oftalmika yang ada di sinus orbitalis karena jumlahnya lebih banyak bila di bandingkan dengan vena

3. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) diabetik alloxan

Adalah tikus putih jantan galur *Spargue Dawley* yang diinduksi alloxan. Dikatakan diabetik bila glukosa darah plasma sewaktu tikus putih (*Rattus norvegicus*) $\geq 200\text{mg/dl}$ atau kadar glukosa darah plasma puasanya $>126\text{ md/dl}$.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

Alloxan, Aquades, Glibenklamid, Plasma darah Puasa, Buah manggis (ekstrak *Garcinia mangostana L*), Etanol 70%, Larutan Na-CMC 0,5%.

2. Alat

Neraca analitik, Blender, Kain saring, Tabung, Saringan, Sonde, Pipet, Gelas kaca, Spuit.

F. Cara Pengumpulan Data

1. Pembuatan ekstrak kulit *Garcinia mangostana*

Pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostan L*) dilakukan di laboratorium Farmasetika Prodi Farmasi FKIK UMY. Kulit *Garcinia mangostana* yang telah dikupas bersih, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Selanjutnya, potongan kulit *Garcinia mangostana* digiling dan dijadikan serbuk simplisia. Serbuk kulit *Garcinia mangostana* disari dengan penyari

serbuk simplisia dalam etanol 70% hingga 2 cm dari permukaan serbuk simplisia selama 5 x 24 jam. Selama maserasi, sesekali serbuk diaduk agar penyarian sempurna. Selanjutnya, serbuk disaring dan diambil sarinya. Serbuk di *remaserasi* menggunakan penyari yang sama selama 3 hari. Filtrate diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental hingga beratnya konstan.

2. Pengelompokan hewan uji

Sebanyak 25 ekor tikus ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor, yaitu : kelompok I sebagai kontrol negatif (Na CMC 0,5%), kelompok II sebagai kontrol positif di beri Glibenklamid 0,09 mg/200grBB, kelompok III diberi ekstrak kulit *Garcinia mangostana* 50 mg/kgBB, kelompok IV diberi ekstrak kulit *Garcinia mangostana* 100 mg/kgBB, kelompok V diberi ekstrak kulit *Garcinia mangostana* 200 mg/kgBB. Setelah di bagi menjadi 5 kelompok hewan uji di adaptasi terlebih dahulu selama 3 hari.

3. Pengambilan sampel glukosa darah awal

Pengambilan sampel glukosa darah pertama di lakukan setelah 3 hari hewan uji di adaptasikan. Sebelum pengambilan sampel hewan uji dipuaskan selama 8-12 jam. Lokasi pengambilan sampel adalah vena oftalmika di sinus orbitalis. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 1,5 ml. Pengambilan sampel glukosa darah awal ini digunakan untuk melihat

4. Induksi Alloxan

Setelah pengambilan sampel glukosa darah awal hewan uji di induksi Alloxan. Alloxan di suntikan dengan dosis 80mg/kgBB agar menjadi diabetes mellitus. Alloxan dalam bentuk powder dilarutkan dalam aquades. Tiap 80mg Alloxan dilarutkan dalam 3ml/200grBB. Alloxan di suntikan secara intraperitoneal pada tikus, dihitung dengan rumus :

$$\text{Dosis aloxan/hewan} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{1000g} \times 80mg$$

$$\text{Pelarut (aquades) /ml} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{200g} \times 3ml$$

Untuk melihat reaksi yang telah ditimbulkan maka pengambilan sampel glukosa darah berikutnya di lakukan setelah 48 jam pasca induksi alloxan. Selanjutnya di lakukan pemeriksaan kadar glukosa darah sebagai sampel ke-2 sebelum perlakuan.

5. Pembuatan suspensi CMC 0,5%

Suspensi CMC dibuat dengan melarutkan CMC 0,5 gr ke dalam aquades hangat 100 ml. Penggunaan suspensi Na CMC digunakan setelah dingin.

6. Pemberian placebo (Na CMC 0,5%)

Kelompok I dari hewan uji yang telah diinduksi alloxan di berikan suspensi Na CMC 0,5% sebanyak 2 ml/200grBB. Pemberian placebo ini di lakukan 1 kali sehari selama 14 hari sebagai kontrol negatif.

7. Pemberian glibenklamid

Kelompok II dari hewan uji yang diinduksi alloxan diberi glibenklamid dengan dosis 0,09mg/200grBB, dan di larutkan dengan suspensi Na-

selama 14 hari. Dosis 0,09mg/200grBB di dapatkan dari hasil konversi dosis manusia yaitu 5mg/kgBB.

Hasil konversi dosis gilbenklamid manusia pada hewan uji (mg/200grBB) = $5mg \times 0,018 = 0,09mg/200grBB$

$$\text{Dosis Gilbenklamid per ekor} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{200g} \times 0,09 mg$$

8. Pemberian perlakuan ekstrak kulit *Garcinia mangostana*

Kelompok III, IV, dan V dari hewan uji yang di induksi alloxan di beri ekstrak kulit *Garcinia mangostana* masing masing dengan dosis 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB 1 kali sehari selama 14 hari. Sebelum di berikan kepada hewan uji ekstrak kulit *Garcinia mangostana* di larutkan dengan suspensi Na-CMC 0,5% 2 ml/200grBB agar dosis mencapai 3 ml.

$$\text{Dosis ekstrak kelompok III (mg)} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{1000 g} \times 50 mg$$

$$\text{Dosis ekstrak kelompok IV (mg)} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{1000 g} \times 100 mg$$

$$\text{Dosis ekstrak kelompok V (mg)} = \frac{\text{berat hewan (g)}}{1000 g} \times 200 mg$$

Pengenceran = vol pemberian – dosis ekstrak

$$= 3ml - \text{dosis ekstrak}$$

9. Pengambilan data

Pengambilan data dilakukan 3 kali. Sampel glukosa darah yang akan di periksa adalah plasma glukosa darah puasa, sehingga hewan uji harus di

pengambilan sampel adalah sebelum hewan uji diinduksi aloxan, 48 jam setelah diinduksi aloxan, dan setelah 14 hari pemberian perlakuan.

G. Uji Validitas dan Realibilitas

Kesahlisan (validitas) dan keterandalan (realibilitas) pada penelitian ini di tentukan oleh ketepatan alat ukur, ketepatan cara pengukuran dan dosis bahan coba serta obat yang tepat.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dimasukan ke dalam rumus untuk menentukan kadar glukosa darah.

Metode : GOD-PAP

$$\text{Gula darah} = \frac{\Delta A \text{ sample}}{\Delta A \text{ standar}} \times \text{conc standar (mg/dl)}$$

Standard : 100mg/dl

Data tersebut kemudian di analisis menggunakan uji beda setelah sebelumnya dilakukan uji homogenitas dan uji normalitas. Data yang diperoleh di analisis menggunakan program SPSS 15.0 version. Data *pre aloxan* dan *post aloxan* di analisis menggunakan uji statistika *Paired T Test* dan data masing masing kelompok perlakuan di analisis menggunakan uji

statistika *Independent T Test* dan di analisis dengan uji statistika *Independent T*

Bagan Cara Kerja

