

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan penelitian *pre and post test with control group design* yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian.

B. Populasi dan sampel penelitian

Obyek penelitian penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley* jantan yang diperoleh dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang memenuhi kriteria penelitian sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

1. Berjenis kelamin jantan galur *Sprague dawley*
2. Berusia \pm 8 minggu
3. Berat badan \pm 150-200 gram

Kriteria eksklusi :

1. Aktivitas kurang/tidak aktif
2. Mati selama masa pemberian perlakuan
3. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak)

4. Penurunan berat badan >10% selama masa adaptasi di laboratorium

Menurut *World Health Organization* (WHO) Besar sampel tiap kelompok minimal 5 ekor (Wulandari & Ismail cit. Chin, 2008). Besar sampel dihitung dengan rumus frederer, dimana (t) merupakan jumlah kelompok uji , dan (n) adalah besar sampel per kelompok. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$(t-1) (n-1) \geq 15 \text{ (Frederer, 1995 cit. Murti, 2006)}$$

Sehingga dalam percobaan ini jumlah sampel minimal yang dibutuhkan per kelompok adalah sebagai berikut :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Jumlah sampel yang digunakan minimal 5 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) per kelompok.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) yang terbagi dalam 5 kelompok, yaitu :

1. Kontrol negatif : Tikus putih yang diinduksi STZ-NA tanpa diberikan intervensi apapun, hanya diberikan aquades.

2. Kontrol positif : Tikus putih yang diinduksi STZ-NA dan diberikan obat hipoglikemik oral (metformin).
3. Kelompok perlakuan : Tikus putih yang diberikan seduhan daun kersen, terbagi menjadi 3 kelompok, dengan variasi dosis pada tiap kelompok perlakuan, kelompok 1 diberi seduhan daun kersen dosis 250 mg /200 grBB, kelompok 2 diberi seduhan daun kersen dosis 500 mg/200 grBB, dan kelompok 3 diberi seduhan daun kersen dosis 750 mg/200 grBB.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada (UGM) guna mendukung pelaksanaannya.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dalam kurun waktu \pm 1 bulan.

D. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel

- a. Variabel bebas (*Independent*) :

Perlakuan dan dosis seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) masing-masing 250 mg/200 grBB, 500 mg/200 grBB, dan 750 mg/200 grBB.

b. Variabel tergantung (*dependent*) :

Kadar SGOT dan kadar SGPT.

c. Variabel terkontrol :

- 1) Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* (umur \pm 8 minggu dengan berat badan 150-200 gram).
- 2) Faktor genetik menggunakan tikus satu galur *Sprague dawley* dan proses pengambilan menggunakan randomisasi.
- 3) Kondisi pakan dan kandang sama.

2. Definisi Operasional

a. Tikus Diabetes Melitus

Tikus Diabetes Melitus adalah tikus yang diinduksi dengan *streptozotocin* 65 mg/KgBB, dimana 15 menit sebelumnya diinjeksi *nicotinamide* 230 mg/KgBB, dibiarkan selama 5 hari dengan parameter peningkatan kadar gula darah puasa (GDP) yang diambil dari pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus. Kadar GDP normal tikus SD adalah 55-135 mg/dl (Puspitasari, 2015). Tikus dinyatakan DM apabila kenaikan gula darah puasanya >135 mg/dl setelah 5 hari induksi STZ-NA. Kadar GDP diukur dengan metode *enzimatic colorimetric test "GOD-PAP"* (Sulistyorini, 2015).

b. Seduhan Daun Kersen

Seduhan daun kersen didapatkan dengan cara menyeduh daun kersen kering dengan air mendidih hingga bewarna kecoklatan menyerupai teh. Daun kersen yang digunakan didapatkan dari Universitas Gajah Mada dan dikeringkan dengan sinar matahari hingga berwarna kecoklatan. Seduhan daun kersen kemudian diberikan kepada tikus yang telah diinduksi STZ-NA melalui sonde dengan dosis masing – masing 250 mg/200 grBB, 500 mg/200 grBB dan 750 mg/200 grBB.

c. Kadar SGOT dan SGPT

SGOT dan SGPT adalah enzim yang mengindikasikan adanya gangguan pada hepar jika jumlahnya meningkat. kadar SGPT normal tikus putih adalah 17,5-30,2 IU/l, sedangkan kadar SGOT normal adalah 30,2-45,7 IU/l (Kusumawati, 2004).

d. Induksi *streptozotocin-nicotinamide*

Induksi *streptozotocin* ditujukan untuk menghasilkan tikus Diabetes Melitus. Dosis yang digunakan adalah 65 mg/KgBB diinjeksikan secara intraperitoneal, 15 menit sebelumnya dilakukan injeksi intraperitoneal *nicotinamide* 230 mg/KgBB yang mempunyai efek protektif dari toksisitas *streptozotocin*.

E. Instrument Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Timbangan digital.
- b. Sonde.
- c. Gelas kaca.
- d. Sduit.
- e. Gloves sarung tangan.
- f. Masker
- g. Panci.
- h. Saringan.
- i. Kompor.
- j. Kandang hewan percobaan.
- k. Sentrifuge.
- l. Spektrofotometer UV-Vis.
- m. Tabung mikrokapiler.
- n. Vortex.

2. Bahan Penelitian

- a. Streptozotocin.
- b. Metformin.
- c. Daun kersen.
- d. Nicotinamide.
- e. NaCl 0,9%.
- f. Buffer sitrat 0,1 M.
- g. Aquades.

- h. Plasma darah puasa.
- i. ALT/SGPT reagen kit.
- j. AST/SGOT reagen kit.

F. Jalannya Penelitian

1. Persiapan

- a. Kandang tikus disiapkan, tikus putih (*Rattus novergicus*) sebanyak 30 ekor ditimbang, lalu dilakukan pembagian kelompok secara randomisasi menjadi 5 kelompok. Kelompok penelitian terdiri dari kelompok kontrol negatif diberi aquades, kelompok kontrol positif diberi metformin, kelompok perlakuan yang diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis I, II, dan III.
- b. Tikus putih (*Rattus novergicus*) Diadaptasi selama 7 hari dan diberi makan AD 2 serta aquades yang diberikan secara *ad libitum*.

2. Pengambilan sampel pre induksi

Pada hari ke-7 dilakukan pengambilan sampel darah pre injeksi setelah sehari sebelumnya tikus putih (*Rattus novergicus*) dipuaskan selama 8-12 jam. Sampel darah diambil dari pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus, parameter yang diukur adalah kadar gula darah puasa (GDP), kadar SGOT, dan kadar SGPT. Pengukuran kadar gula darah puasa menggunakan metode *GOD-PAP*. Sedangkan untuk kadar SGOT dan SGPT digunakan alat Spektrofotometer UV. Pada analisis ini 100 μ L plasma darah dimasukkan dalam kuvet, kemudian ditambah 1000 μ L larutan monoreagen. Blangko yang digunakan adalah campuran antara

100 μ L aquadest dengan 1000 μ L monoreagen. Kemudian antara serum dan monoreagen dihomogenkan dengan vortex dan absorbansi dibaca terhadap blangko pada menit 1, 2 dan 3 pada panjang gelombang 340 nm, suhu 37°C. Aktivitas SGPT dan SGOT dinyatakan dalam satuan IU/L.

3. Induksi Streptozotocin-Nicotinamide

Tikus putih (*Rattus novergicus*) dipuasakan selama 12 jam sebelum penginduksian pagi harinya. Induksi DM tipe 2 dilakukan dengan injeksi intraperitoneal *nicotinamide* (NA) 230 mg/KgBB yang dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%). Setelah 15 menit, dilanjutkan dengan pemberian *Streptozotocin* (STZ) 65 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 secara intraperitoneal untuk merusak sel β pankreas.

4. Pengambilan sampel post-induksi

Setelah 5 hari post injeksi, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa (dikatakan DM jika GDP >135 mg/dl), kadar SGOT, dan kadar SGPT.

5. Pembuatan Seduhan Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*)

Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang digunakan adalah daun kersen yang berkualitas, yaitu daun yang hijau tua, tidak menggulung, serta tidak ada bekas gigitan serangga.

Pembuatan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dilakukan dengan cara berikut :

- 1) Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dijemur dibawah sinar matahari hingga kering (berwarna kecoklatan).
- 2) Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang sudah kering diseduh dengan aquades yang telah mendidih dan dibiarkan hingga berwarna kecoklatan menyerupai teh.
- 3) Seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) disaring sehingga air seduhan terpisah dengan daun.

6. Pemberian perlakuan

Jika tikus sudah dinyatakan DM, selanjutnya dilakukan Pemberian perlakuan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) sesuai kelompoknya.

a. Kelompok I : kelompok kontrol negatif

Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan dan aquades secara *ad libitum*.

b. Kelompok II : Kelompok kontrol positif

Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan dan aquades secara *ad libitum* dan metformin 0,9 mg/200 grBB/hari/tikus sebanyak 1 ml dengan sonde pada pagi hari pukul 08.00.

c. Kelompok III : Kelompok dosis I

Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan dan aquades secara *ad libitum* dan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis 250 mg/200 grBB/hari/tikus dengan sonde pada pagi hari pukul 08.00.

d. Kelompok IV : kelompok dosis II

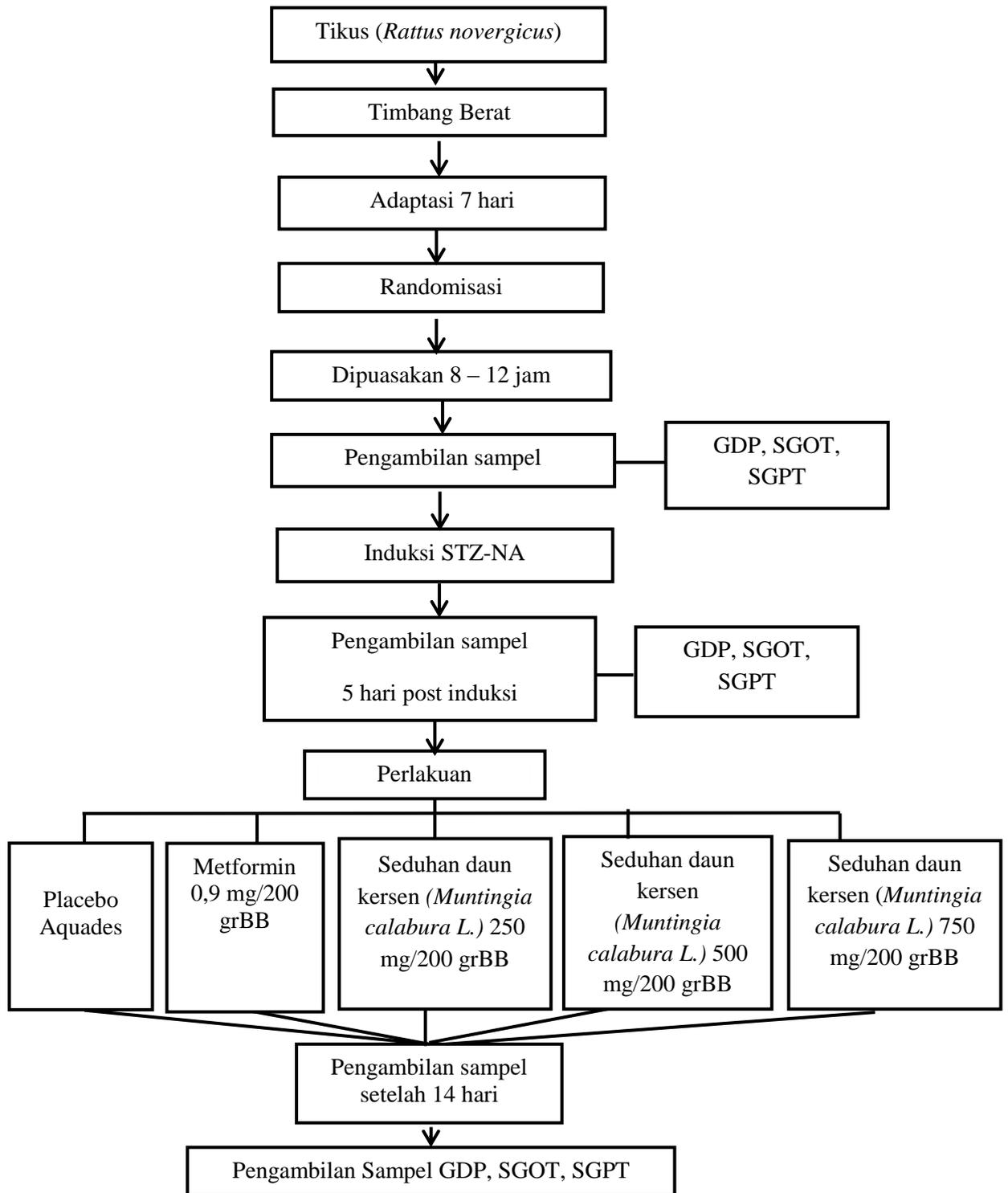
Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan dan aquades secara *ad libitum* dan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis 500 mg/200 grBB/hari/tikus dengan sonde pada pagi hari pukul 08.00.

e. Kelompok V : kelompok dosis III

Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan dan aquades secara *ad libitum* dan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis 750 mg/200 grBB/hari/tikus dengan sonde pada pagi hari pukul 08.00.

7. Pengambilan sampel post perlakuan

Setelah 14 hari post perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar GDP, kadar SGOT, dan kadar SGPT.



Gambar 5. Alur Penelitian

G. ANALISIS DATA

Pengolahan statistik dari data hasil penelitian SGOT & SGPT dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas data. Kemudian dilakukan uji statistik dengan *paired t test* (untuk data yang berdistribusi normal) atau dengan uji *wilcoxon test* (jika ada data tidak berdistribusi normal), untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar SGOT & SGPT pada kelompok sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus Diabetes Melitus. Setelah itu dilakukan uji *One Way Anova* (jika data berdistribusi normal) atau *kruskal-wallis* (jika data tidak berdistribusi normal). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 30 sehingga uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-wilk*. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah varians populasi homogen atau tidak. Jika hasil uji ANOVA menunjukkan nilai yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc test* dengan uji rata-rata *tuckey*. Uji ANOVA adalah uji untuk membandingkan perbedaan rerata lebih dari dua kelompok sedangkan *Post Hoc test* membandingkan antar kelompok.

H. KESULITAN PENELITIAN

Kesulitan dalam penelitian ini adalah sulit mendapatkan sampel tikus, mahalnya harga streptozotocin, sulit perijinan tempat penelitian, dan referensi yang minimal.

I. ETIKA PENELITIAN

Hewan uji pada penelitian ini diperlakukan dengan memperhatikan etika pada penelitian dengan subyek hewan. Selama dilakukan penelitian hewan uji diamati status kesehatannya. Pada saat memberikan perlakuan, tindakan-tindakan yang bersifat melukai didampingi tenaga terlatih untuk meminimalisir efek samping perlakuan pada waktu perlakuan.