

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan penelitian *post test only 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* (SD) jantan yang diperoleh dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Sampel penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley* yang memenuhi kriteria penelitian sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi:

- a. Berjenis kelamin jantan galur *Sprague dawley*
- b. Berusia \pm 8 minggu
- c. Berat badan \pm 150-200 gram

2. Kriteria eksklusi:

- a. Aktivitas kurang/tidak aktif
- b. Mati selama masa pemberian perlakuan

- c. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak)
- d. Penurunan berat badan >10% selama masa adaptasi di laboratorium

Besar sampel tiap kelompok minimal 5 ekor (Murti, 2010). 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:

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \text{ (Wulandari et al., 2010)}$$

Jumlah sampel yang digunakan minimal 5 ekor tikus putih per kelompok. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 36 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) yang terbagi dalam 6 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. Kontrol 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.
4. Kelompok normal : Tikus putih yang tidak diinduksi STZ-NA dan tidak diberikan perlakuan apapun.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta.

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 enzim SOD.
- c. Variabel terkendal :
 1. Subyek penelitian adalah Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague dawley* (umur 8 minggu dan berat 150-200 gr).
 2. Faktor genetik menggunakan

tikus satu galur yaitu dari 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 (Puspitasari, 2015). Kadar GDP normal tikus *Sprague dawley* adalah 55-135 mg/dl. Tikus dinyatakan DM apabila kenaikan gula darah puasanya >135 mg/dl setelah 5 hari induksi STZ-NA. Kadar GDP diukur dengan metode *glukosa oksidase (GOD-PAP)* (Sulchan *et al.*, 2014).

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 halaman laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah 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 SOD

Enzim SOD merupakan enzim endogen yang kadarnya akan menurun pada kondisi DM. Kadar enzim SOD didapatkan dengan menggunakan Kit BioVision dan pembacaannya menggunakan spektrofotometer.

d. Induksi Streptozotocin-nicotinamide

Induksi *streptozotocin* ditujukan untuk menghasilkan tikus DM. 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. KIT Biovision
- k. Kandang hewan percobaan
- l. Sentrifuge
- m. Spektrofotometer

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. Jaringan hepar tikus DM

F. Jalannya Penelitian

1. Persiapan

- a. Kandang tikus disiapkan, tikus putih (*Rattus novergicus*) sebanyak 36 ekor ditimbang, lalu dilakukan pembagian kelompok secara randomisasi menjadi 6 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 250 mg/200 grBB, 500 mg/200 grBB, dan 750 mg/200 grBB serta kelompok kontrol tanpa perlakuan sama sekali.
- b. Tikus putih (*Rattus novergicus*) Diadaptasi selama 7 hari dan diberi makan pelet (pakan tikus) serta diberikan minum 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*) dipuasakan selama 8-12 jam. Sampel darah diambil dari pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus, parameter yang diukur adalah kadar gula darah puasa (GDP).

3. Induksi Streptozotocin-nicotinamide

Tikus putih (*Rattus novergicus*) dipuasakan selama 12 jam sebelum penginduksian pada pagi harinya. Induksi DM tipe 2

dilakukan dengan injeksi intraperitoneal nicotinamide 230 mg/kgBB yang dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%). Setelah 15 menit, dilanjutkan dengan pemberian *streptozotocin* 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 kadar GDP >135 mg/dl).

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:

- a. Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dijemur dibawah sinar matahari hingga kering (berwarna kecoklatan).
- b. Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang sudah kering diseduh dengan aquades yang telah mendidih dan dibiarkan hingga berwarna kecoklatan menyerupai teh.

- c. 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 pelet dan aquades secara *ad libitum*.
- b. Kelompok II: Kelompok kontrol positif
Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan pelet dan aquades secara *ad libitum* dan metformin 0,09 mg/kgBB/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 pelet 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 pelet 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

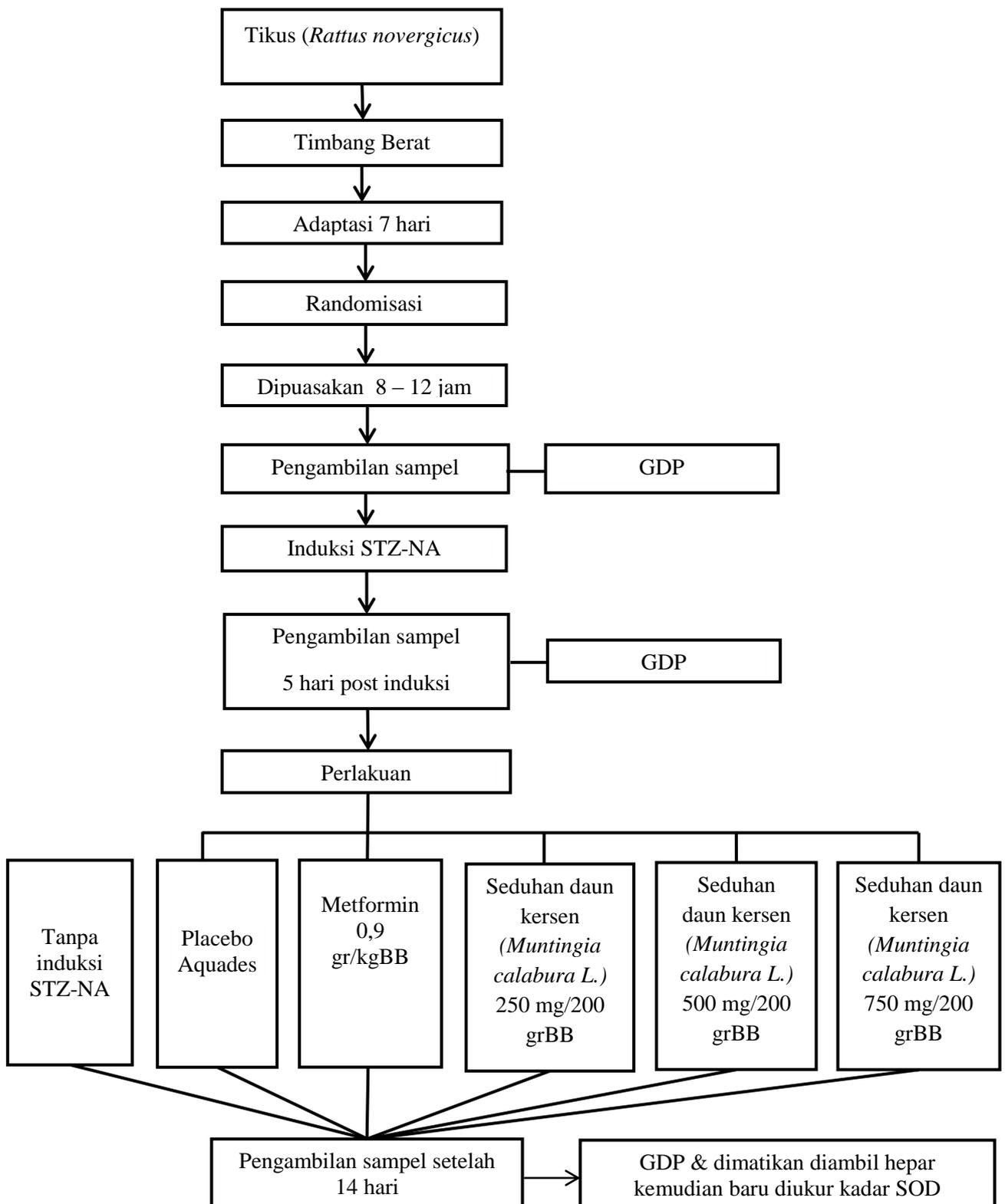
Hari ke-13 hingga hari ke-26 diberi pakan pelet dan aquades secara *ad libitum* dan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis 750 mg/200 grBB/hari/tikus dengan sonde pada pagi hari pukul 08.00.

f. Kelompok VI: Kelompok normal

Kelompok tikus yang dari awal hingga nanti akhir tidak diberikan perlakuan sama sekali hanya sebagai pengontrol saja.

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 gula darah puasa dan juga jaringan hepar tikus untuk dilakukan pengujian. Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test only with control group design*. Penelitian ini menggunakan kit BioVision dan pembacaan akhirnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm.



Gambar 6. Alur Penelitian

G. Analisis Data

Pengolahan statistik dari data hasil penelitian enzim SOD 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 enzim SOD pada kelompok kontrol 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 36 ekor tikus sehingga uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-wilk*. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah varians populasi homogen atau tidak. Jika hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc test* dengan uji rata-rata *tuckey*. Uji *One Way 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, tempat penelitian jauh dari lingkungan kampus, 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.