

### **BAB III METODE PENELITIAN**

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

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test only control group design*.

#### **B. Subyek Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) berkelamin jantan, galur *Sprague dawley* usia 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram, berjumlah 36 ekor yang di acak menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 6 ekor subyek. Jumlah sampel didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu  $(t-1)(r-1) > 15$ . Subyek didapat dari laboratorium hewan uji Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Subyek dipelihara dengan pencahayaan yang cukup yaitu dengan perbandingan 50:50, siang hari terang dan malam hari gelap dengan suhu ruangan 20-25 derajat celsius. Jenis makanan AD 2 yang diberikan secara *ad libitum* kecuali menjelang pengambilan sampel glukosa darah puasa. Ukuran kandang panjang 20 cm lebar 12 cm dan tinggi 15 cm dan dalam 1 kandang terdapat 6 subyek.

### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas (PAU) Pasca Sarjana Universitas Gajah Mada guna mendukung pelaksanaannya.

#### 2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan dalam kurun waktu sekitar 3 bulan.

### D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 1. Variabel

- a. Variabel bebas (*independent*) : Perlakuan dan Dosis seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) masing-masing 250mg/kgBB, 500mg/kgBB, 750mg/kgBB.
- b. Variabel tergantung (*dependent*) : Kadar Malondialdehid (MDA).
- c. Variabel terkendali :
  - a. Subyek penelitian adalah Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* (umur 8-10 minggu dan berat 150-200 gram).
  - b. Faktor genetik menggunakan tikus putih satu galur yaitu dari

galur *Sprague dawley* dan proses pengambilan menggunakan randomisasi.

- c. Kondisi pakan dan kandang sama.

## 2. Definisi Operasional

### a. Tikus Diabetes Melitus

Tikus DM adalah tikus yang diinduksi dengan Streptozotocin 65mg/kgBB, dimana 15 menit sebelumnya diinjeksi Nicotinamide 230mg/kgBB, dibiarkan selama 5 hari dengan parameter peningkatan kadar gula darah puasa yang diambil dari pembuluh darah vena mata. Kadar GDP normal tikus SD adalah 55-135 mg/dl (Puspitasari, 2015). Dinyatakan DM apabila kenaikan gula darah puasanya >135mg/dl setelah induksi STZ-NA selama 5 hari. Kadar GDP diukur dengan metode *enzymatic colorimetric test "GOD-PAP"* (Sulistiyorini *et al.*, 2015).

### b. Seduhan Daun Kersen

Seduhan daun kersen didapatkan dengan cara menyeduh daun kersen kering dengan air mendidih hingga berwarna kecoklatan menyerupai teh. Daun kersen yang digunakan didapatkan dari Universitas Muhammadiyah Yogyakarta 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 250mg/200gBB, 500mg/200gBB dan 750mg/200gBB.

c. Kadar Malondialdehid (MDA)

Malondialdehyde (MDA) merupakan produk hasil peroksidasi lipid dalam tubuh dan terdapat dalam bentuk bebas atau terkompleks dengan jaringan di dalam tubuh. Kadar MDA akan meningkat dalam keadaan DM karena adanya peningkatan radikal bebas dan stress oksidatif.

d. Induksi Streptozotocin-Nicotinamide

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

## **E. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a. Timbangan digital
- b. Gloves / sarung tangan
- c. Masker
- d. Saringan
- e. Sonde
- f. Pipet

- g. Sduit
  - h. Panci
  - i. Saringan
  - j. Kompor
  - k. Mortar
  - l. Peralatan bedah
2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a. Metformin
- b. Streptozotocin
- c. Nicotinamide
- d. Plasma darah Puasa
- e. Daun kersen (*Muntingia calabura L.*)
- f. Hepar
- g. Larutan stok kit MDA
- h. NaCl 0,9%
- i. Buffer sitrat 0,1 M
- j. Aquades

## **F. Jalannya Penelitian**

### **1. Pembuatan Seduhan Daun Kersen**

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.

## **2. Pengelompokan Hewan Uji**

Sebanyak 36 ekor tikus putih ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, yaitu : kelompok I sebagai kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok II sebagai kontrol positif (Metformin), kelompok III, IV dan V sebagai kelompok Seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) masing masing 250mg/200gBB, 500mg/200gBB 750mg/200gBB, serta kelompok VI sebagai kelompok kontrol normal (tanpa induksi STZ-NA dan tanpa perlakuan).

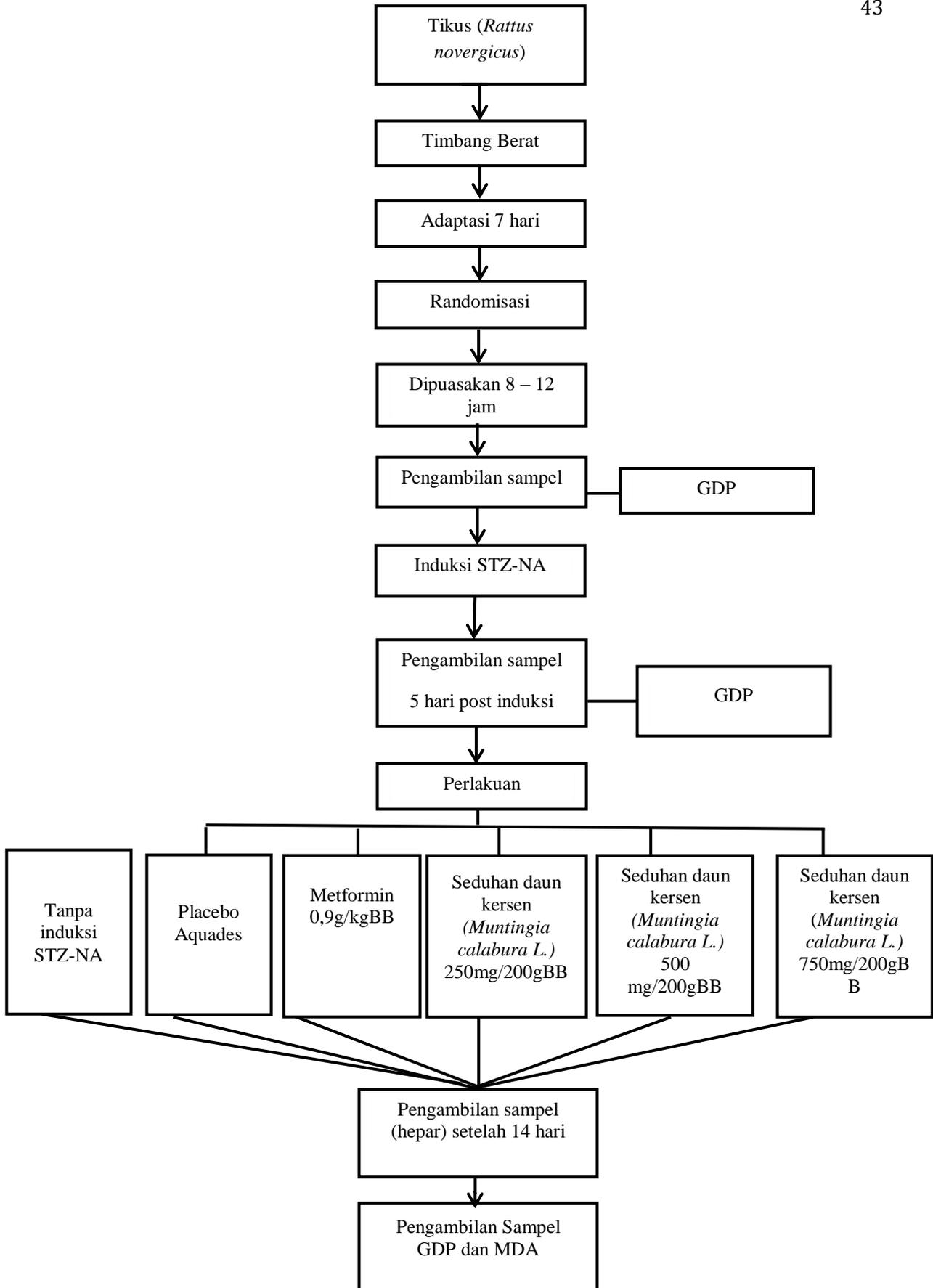
## **3. Cara Pengumpulan Data**

- a. Adaptasi tikus di kandang Laboratorium PAU selama 7 hari.
- b. Dilakukan pengambilan sampel darah pre injeksi melalui pembuluh darah sinus orbita pada mata tikus, parameter yang

diukur adalah kadar gula darah puasa (GDP) menggunakan metode GOD-PAP.

- c. Injeksi tikus menjadi DM. Induksi DM tipe 2 dilakukan dengan injeksi intraperitoneal nicotinamide (NA) 230mg/kgBB yang dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%). Setelah 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemberian Streptozotocin (STZ) 65mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 secara intraperitoneal untuk merusak sel  $\beta$  pankreas.
- d. 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 >135mg/dl)
- e. Jika tikus sudah dinyatakan DM, selanjutnya dilakukan pemberian perlakuan seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) sesuai kelompoknya. Kelompok I dibiarkan tanpa perlakuan, kelompok II diberi metformin 0,9mg/kgBB/hari/tikus, kelompok III diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 250mg/200gBB/hari/tikus, kelompok IV diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 500mg/200gBB/hari/tikus dan kelompok V diberi seduhan daun kersen (*Muntingia calabura L.*) 750 mg/200gBB/hari/tikus. Pemberian semua perlakuan dilakukan selama 14 hari.

- f. Setelah 14 hari post perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah melalui pembuluh darah sinus orbita mata pada tikus, dengan parameter kadar gula darah puasa, selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil hepar tikus yang akan menjadi bahan pemeriksaan MDA. Pengambilan hepar dilakukan dengan melakukan anastesi pada tikus sebelum dilakukan pembedahan kemudian diambil hepar lobus kanan



Gambar 5. Alur Penelitian.

**G. Analisis Data**

Untuk menguji normalitas dan homogenitas digunakan uji normalitas *Shapiro wilk*. Jika data normal dan varians nya sama, data hasil MDA dianalisis menggunakan uji *paired sample t Test* dan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji rata-rata *Tuckey*.