

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1.1. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan merupakan eksperimental dengan rancangan *pre-post test control group design*.

3.1.2. Waktu dan Tempat Penelitian

a. Waktu

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari – Mei 2017

b. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di :

1. Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada untuk perawatan tikus.
2. Laboratorium Farmasi FKIK UMY untuk penimbangan obat dan pembuatan infusa kayu manis.
3. Laboratorium LPPT Universitas Gajah Mada untuk pemeriksaan kadar IL-6 (metode ELISA).

3.1.3. Populasi dan sampel

Subyek penelitian yang akan digunakan adalah tikus putih strain *Sprague dawley* yang diambil secara acak dengan karakteristik sebagai berikut :

1. Usia sekitar 2 bulan
2. Berat badan >150 gram
3. Jenis kelamin jantan
4. Sehat dilihat dari aktivitas gerakannya.

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

Untuk menentukan jumlah sampel, menggunakan rumus faderer sebagai berikut (Shofiati, 2013) :

$$(n-1) (t-1) \geq 15 \quad n = \text{jumlah sampel, } t = \text{jumlah kelompok}$$

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

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 3,75$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang di perlukan adalah dua puluh lima ekor tikus jantan *Sprague dawley* yang akan dibagi secara acak kedalam 5 kelompok, dimana masing-masing kelompok terdapat 5 sampel tikus *Sparague dawley*.

3.1.4. Identifikasi Variable dan Definisi Operasional

a. Identifikasi Variable

1. *Variable bebas* :

Infusa kayu manis (*Cinamomum burmanii*) yang diberikan setiap hari selama 14 hari kepada hewan percobaan dengan dosis 300mg/kgBB/hari dan 150 mg/kgBB/hari.

2. *Variable tergantung* :

Kadar IL-6 dalam satuan pg/ml

3. *Variable terkontrol* :

Jenis kelamin pada setiap sample adalah jantan, rata-rata berat badan tikus >150 gram, usia tikus diupayakan sama yaitu 2 bulan, perawatan pada masing-masing sample diupayakan sama, pemberian infusa kayu manis pada masing-masing sample diupayakan sama.

b. Definisi Operasional

1. *Diabetes*

Pada penelitian ini diabetes diakibatkan oleh induksi *streptozotocin* (STZ) dosis 60 mg/kgBB dan *nicotinamide* (NA) dosis 120 mg/kgBB secara intraperitoneal pada tikus strain *Sparague dawley*. Lalu di periksa kadar glukosa darah tikus pada hari ke 3 setelah induksi. Kriteria penentuan diabetes berdasarkan kadar glukosa darah tikus yaitu 238 ± 14.4 mg/dl. Sebelum

dilakukan pemeriksaan, tikus dipuasakan minimal 8 jam. Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan menggunakan metode GOD-PAP (*Glucose Blood Test "Enzymatic Colorimetric Test"*) (Ghasemi, et al., 2014).

2. Kayu manis (*Cinnamomum burmanii*)

Pada penelitian ini kayu manis di dapatkan dari Pasar Beringharjo D.I Yogyakarta.

3. Glibenklamid

Glibenklamid merupakan antidiabetik oral golongan sulfonilurea generasi II kerjanya dengan cara merangsang sekresi insulin dan meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin. *Glibenklamid* memiliki efek samping hipoglikemik, hiperinsulinemia dan peningkatan berat badan. Dosis *glibenclamide* pada manusia adalah 5 mg/hari maka dosis pada tikus 0,09mg/200grBB/hari. Larutan *glibenclamide* diperoleh dengan cara melarutkan 0,09 mg zat aktif *glibenclamide* kedalam 1 ml aquadest. Untuk tikus dengan berat >150 mg dibutuhkan 1 ml larutan *glibenclamide*. Pemberian *glibenclamide* dilakukan secara oral menggunakan sonde, diberikan bersamaan saat makan selama 14 hari.

4. Kadar IL-6

Didapatkan dari darah tikus dan diukur dengan kit sitokin proinflamasi pada pemeriksaan Elisa. Sample yang digunakan adalah sample serum darah tikus sebelum diberi perlakuan atau sample darah tikus normal, sample darah tikus diabetes, sample darah setelah diberi terapi infusa kayu manis, dan setelah diberi terapi glibenklamid. Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar IL-6 tikus dipuasakan terlebih dahulu setidaknya 8 jam. Darah tikus *Sparague dawley* diambil dari pembuluh darah vena mata pada setiap kelompok tikus. Pengukuran kadar IL-6 menggunakan metode *enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)* dan menggunakan alat *ELISA reader* dan kadarnya diukur dalam satuan pg/ml.

3.1.5 Cara kerja penelitian

a. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus ukuran 50cm x 50cm x 40cm , timbangan *electrical scale*, spuit 3 cc, *blood pressure analyzer*, *vortex mixer*, pipet mikro, inkubator, tabung *eppendorf*, seperangkat kit IL-6 dan *ELISA reader*.

b. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah makan standar untuk tikus, minum, *streptozotocin* dan *nicotinamide* (NA), glibenklamid, kayu manis (*Cinammon burmaniii*), seperangkat bahan kimia kit IL-6.

a. Adaptasi hewan coba

Tikus percobaan diadaptasikan di *Animal House* selama 3 hari. Tikus tersebut diadaptasikan dengan lingkungan barunya, makanan, dan minuman. Tujuannya adalah untuk mengkondisikan semua tikus dalam kondisi yang sama sebelum dilakukan perlakuan.

b. Induksi tikus dengan *streptozotocin*

Tikus pada kelompok yang diberi perlakuan diinduksi NA dosis 120 mg/kgBB dan STZ 60 mg/kgBB secara intraperitoneal dan di periksa kadar gula darah pada hari ke 3 setekah induksi. Sebelum diinduksi, tikus dipuaskan selama satu malam (Ghasemi, et al., 2014).

c. Pemberian glibenklamid

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 aquades. Pemberian *glibenclamide* dilakukan secara oral menggunakan sonde, diberikan bersamaan saat makan selama 14 hari.

d. Pembuatan dan pemberian infusa kayu manis

Proses pembuatan infusa kayu manis diawali dengan menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Kulit kayu manis dijemur hingga kering, setelah itu dihaluskan, serbuk kayu manis ditimbang sebanyak 10 gram. Langkah selanjutnya, siapkan 2 panci. Panci pertama adalah panci kecil yang berada diatas panci besar dan berisi air sebanyak 100 ml + serbuk kayu manis 10 gram, sedangkan panci kedua adalah panci besar berisi air sebanyak 2 x berat serbuk kayu manis tersebut. Setelah panci kecil siap untuk diproses, masukkan panci kecil kedalam panci besar yang telah berisi air sebanyak 2 x berat serbuk di dalam panci kecil. Lalu, panci besar dipanaskan diatas api hingga mendidih. Pemanasan dilakukan selama ± 15 menit terhitung dari air dalam panci besar mendidih (suhu panci kecil mencapai 90°C). Setelah mencapai ± 15 menit, maka panci kecil diturunkan dan disaring selagi panas melalui kain flanel dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas, lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infusa sebanyak 100 ml (Sunarsih, et al., 2011).

3.1.6 Pengukuran sampel

1. Berat badan tikus

Pengukuran berat badan dilakukan menggunakan timbangan sebelum tikus diberi perlakuan. Tikus putih *Sparague dawley* yang dijadikan sample yaitu tikus yang memiliki berat badan > 150 gram.

2. Kadar gula darah tikus

Pengukuran glukosa darah dilakukan sebelum dan sesudah tikus diinduksi *streptozotocin*. Pengukuran dilakukan dengan memeriksa kadar gula darah menggunakan metode GOD-PAP (*Glucose Blood Test "Enzymatic Colorimetric Test"*) dan tikus dipuasakan minimal 8 jam. Sampel yang digunakan yaitu serum darah tikus yang diambil dari pembuluh darah vena mata. Kriteria tikus dinyatakan diabetes bila kadar glukosa tikus 236 ± 14.4 mg/dl. (Ghasemi, et al., 2014).

3. Pengambilan Sample Darah Tikus

Darah diambil melalui vena mata menggunakan spuit, kemudian darah ditampung di tabung *ependorf* kurang lebih 1,5 ml, selanjutnya sample disentrifus untuk memisahkan darah dan serum dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit dan diambil serumnya untuk pemeriksaan kadar IL-6.

4. Pemeriksaan Kadar IL-6 (Metode ELISA)

1. Reagen Kit IL-6
 - a. *Micro ELISA* plate
 - b. Standard dilution buffer
 - c. *Biotin-detection antibody*
 - d. *Antibody dilution buffer*
 - e. *HRP-Streptavidin conjugate (SABC)*
 - f. *SABC dilution buffer*
 - g. *TMB substrate*

h. *Stop solution*

i. *Wash buffer*

2. Prosedur Pemeriksaan

a. Pengambilan sampel darah tikus diambil melalui vena orbital.

Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi diendapkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian dipindahkan dalam tabung sentrifuse dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Serum diambil dengan mikropipet sebanyak 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf.

b. Disiapkan reagen, sample dan standar sesuai petunjuk.

c. Disiapkan microplate 96 wells.

d. Larutan standard pada tabung *ependoff* a-g dipindahkan ke tiap sumuran (a-g) microplate dan dibuat duplikasi atau secara duplo .

e. Ditambahkan 0,1 ml sample diluent buffer sebagai kontrol pada (h) microplate.

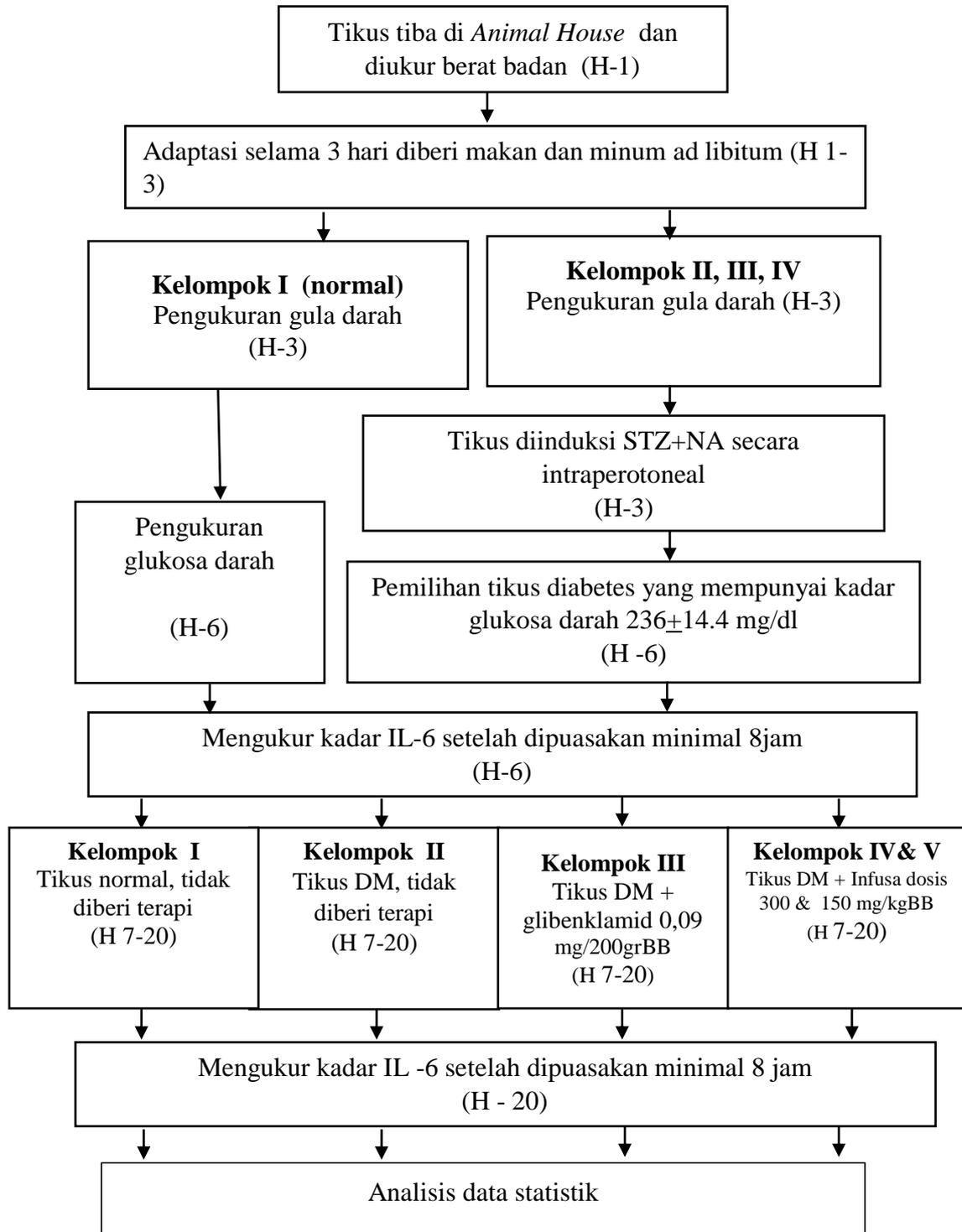
f. Ditambahkan 0,1 ml sample serum darah tikus pada tiap-tiap sumuran yang kosong dan dilakukan duplikasi microplate di tutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.

g. Penutup microplate dibuka, isi sumuran dibuang dan dibalikkan pada kertas tissue agar tidak ada cairan yang tersisa

di sisi microplate. Sumuran tidak boleh dibiarkan sampai benar-benar kering.

- h. Ditambahkan 0,1 ml larutan biotin IL-6 *antibody* pada tiap sumuran, ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- i. Sumuran di cuci 3 kali dengan wash buffer, isi sumuran dibuang dan dibalikkan pada kertas tissue.
- j. Ditambahkan 0,1 ml larutan *SABC* dalam tiap sumur , ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- k. Sumuran dicuci sebanyak 5 kali menggunakan wash buffaer .isi sumuran dibuang dan dibalikkan pada kertas tissue.
- l. Ditambahkan 90 μ l *TMB* ke tiap sumuran, kemudian microplate ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 25-30 menit dan akan berubah warna menjadi biru.
- m. Ditambahkan 0,1 ml *TMB stop solution*, maka setelah 30 menit warna akan berubah menjadi kuning.
- n. Dibaca O.D absorbansi pada 450 nm di microplate reader.

3.1.7. Alur penelitian



3.1.8. Uji Validitas dan Reliabilitas

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

3.1.9. Analisa Data

Pengambilan data dilakukan dengan eksperimen langsung pada tikus *Spargue dowley* yang sebelumnya diberi perlakuan dengan diinduksi *streptozotocin* dan *NA*, pemberian terapi infusa kayu manis dan terapi dengan glibenclamid. Setelah data terkumpul dilakukan pengolahan secara statistik menggunakan program SPSS. Uji yang dilakukan dengan variable 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.

3.2.1. 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 darah yang diambil dan lama treatment, dikarenakan frekuensi pengambilan darah yang terlalu sering dengan jumlah sample darah dalam jumlah relatif banyak dapat berefek pada kesehatan tikus.

3.2.2. Etika Penelitian

Etika penelitian didapatkan dari persetujuan komite etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan terlampir pada lampiran 1.