

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen semu (quasi eksperimen) dengan rancangan *Pretest Posttest* dengan kelompok kontrol (*Pretest-Posttest with Kontrol Group*).

Dalam rancangan ini, dilakukan pengelompokan anggota-anggota kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan berdasarkan acak atau random.

Rancangan ini dapat digambarkan sebagai berikut (Notoatmodjo, 2010):

Tabel 10
Rancangan Penelitian

	Sebelum Induksi Aloksan	Pretest	Perlakuan	Posttest I	Posttest II
R (Kel. Eksperimen a1)	01	02	X(a1)	03	04
R (kel. Eksperimen a2)	01	02	X(a2)	03	04
R (kel. Eksperimen a3)	01	02	X(a3)	03	04
R (Kel. Kontrol positif)	01	02	X(b)	03	04
R (Kel. Kontrol negative)	01	02		03	04

Keterangan :

- 01 : pengukuran kadar glukosa darah tikus putih sebelum induksi aloksan
 - 02 : pretes (pengukuran kadar glukosa darah tikus putih sebelum diberikan perlakuan).
 - 03 : postes I (pengukuran kadar glukosa darah tikus putih setelah diberikan perlakuan hari ke-4).
 - 04 : postes II (pengukuran kadar glukosa darah tikus putih setelah diberikan perlakuan hari ke-8).
- X(a) : pemberian ekstrak buah alpukat
- X(b) : pemberian *antidiabetik oral (glibenklamid)*.

B. Obyek Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan tikus putih yang berjenis wistar berkelamin jantan sebagai obyek penelitian. Dan penentuan besar sampel obyek penelitian menurut rumus WHO yaitu jumlah sampel minimal lima ekor setiap kelompok yang diambil secara acak (Endah Catharian W, 2010).

Rumus menentukan jumlah sampel menurut *fredrer*:

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

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

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

$$n \geq 5$$

Keterangan:

n : jumlah sampel setiap kelompok

t : jumlah kelompok

Pada penelitian ini, jumlah sampel obyek penelitian yang digunakan sebanyak 25 ekor hewan uji. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor hewan uji (tikus putih). Kelompok pertama terdiri dari kelompok kontrol positif (pemberiang gibenklamid), kelompok kedua terdiri dari kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan tetapi hanya diberikan NaCl 0,9%), kelompok ketiga (E1) terdiri dari kelompok dengan pemberian serbuk biji alpukat dosis 0,63 g/kgBB dan kelompok keempat (E2) terdiri dari kelompok dengan pemberian serbuk biji buah alpukat dosis 1,26 g/kgBB. Kelompok kelima (E3) terdiri dari kelompok dengan pemberian serbuk biji buah alpukat dosis 2,52 g/kgBB. Semua kelompok mempunyai criteria sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi

- a. Tikus putih strain wistar
- b. Tikus putih yang mempunyai jenis kelamin jantan
- c. Tikus putih yang mempunyai berat badan berkisar antara 150 sampai 250 gram.
- d. Tikus putih yang sehat (tidak mengalami kecacatan).
- e. Tikus putih yang berusia kisaran antara 2-3 bulan

2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih yang mati saat penelitian berlangsung

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 2 minggu di laboraotrium biomedis FKIK

UMY. Berikut ini ada beberapa perencanaan waktu penelitian.

Tabel 11
Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Minggu	
		I	II
1	Pemeliharaan tikus dan diadaptasikan dengan lingkungan (aklimatisasi) selama 6 hari		
2	Tikus dipuaskan selama 8 jam		
3	Pengukuran kadar glukosa darah I pada semua tikus (untuk mengetahui kadar normal glukosa darah tikus)		
4	Pembagian kelompok hewan uji		
5	Semua tikus di puasakan selama 18 jam sebelum diinduksi aloksan		
6	Semua tikus diinduksi dengan Aloksan dan dipelihara selama 2x24 jam		
7	Tikus dipuaskan selama 8 jam dan		

8	Pengukuran kadar glukosa darah II pada semua tikus dalam keadaan hiperglikemik.
9	Pemberian serbuk biji alpukat serta antidiabetik oral periode I, II, III, IV, V, VI, VII. Setelah itu, semua tikus dipuasaakan selama 8 jam dan Pengukuran kadar glukosa darah III, IV, pada semua tikus

D. Variabel Penelitian

a. Variabel Dependen (terikat)

Variabel dependen merupakan variable yang nilainya ditentukan oleh variabel lain. Variabel respon akan muncul sebagai akibat dari manipulasi variabel-variabel lain (Nursalam, 2009). Dari penjelasan tersebut maka variabel dependen dari penelitian ini adalah perubahan kadar glukosa darah pada tikus putih yang diinduksi aloksan.

b. Variabel Independen (bebas)

Variabel independen merupakan variabel yang nilainya menentukan variabel lain. Suatu kegiatan stimulus yang dimanipulasi oleh peneliti menciptakan suatu dampak pada variabel dependen (Nursalam, 2009). Dapat kita ketahui bahwa variabel independen pada penelitian ini adalah pengaruh pemberian serbuk biji buah alpukat (*Persea Americana Mill*) bentuk bulat.

c. Variabel Pengganggu

1. Aktifitas: semua hewan uji dipelihara di satu kandang menurut kelompoknya masing-masing dan jenis serta ukuran kandang disamakan.

2. Nutrisi: semua hewan uji diberi jenis makanan dan minuman yang sama baik hewan uji kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.
 3. Autoimun: semua hewan yang diteliti pada penelitian ini merupakan hewan yang sehat dan aktif beraktifitas.
 4. Genetik: hewan yang dipilih sebagai subyek penelitian tidak menderita diabetes mellitus dan obesitas dengan cara pengukuran kadar glukosa darah serta pengukuran berat badan terlebih dahulu.
- d. Variabel terkendali
1. Berat badan: berat badan hewan uji pada penelitian ini berkisar antara 150-250 gram.
 2. Lama perlakuan: lama perlakuan pada penelitian ini sekitar kurang lebih dua minggu.

E. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tikus Diabetes mellitus adalah tikus diabetes yang diakibatkan oleh induksi dari aloksan, yang ditandai dengan adanya kenaikan kadar glukosa darah. Tikus hiperglikemik permanen dapat dihasilkan dengan menginjeksikan 150 mg/kg BB aloksan. Aloksan diberikan secara intraperitoneal pada hewan uji dalam bentuk serbuk dengan konsentrasi 50 mg/ml, setelah dihitung, maka volume pemberian aloksan setiap ekor tikus adalah 0,6 ml.

2. Biji Buah Alpukat

Buah Alpukat merupakan bahan yang digunakan dalam penelitian ini. Jenis buah yang digunakan adalah biji alpukat yang sudah matang. Berat rata-rata buah yang digunakan adalah 500 g dari berat bersih. Biji alpukat didapatkan di pasar swalayan Gamping, Kabupaten Sleman DIY.

3. Obat antidiabetik oral

Obat antidiabetik oral merupakan obat yang mengandung senyawa yang mampu memodifikasi pelepasan insulin. Pada penelitian ini obat yang akan digunakan adalah glibenklamid. Glibenklamid merupakan obat turunan dari sulfonurea. Cara kerja obat ini dengan cara membebaskan insulin yang dapat dimobilisasi dari sel beta pankreas dan pada saat yang sama memperbaiki tanggapan terhadap rangsangan glukosa fisiologik. Dengan kata lain obat ini tidak berkhasiat bila tidak ada produksi insulin.

4. Hewan Uji yang digunakan (Tikus putih)

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Chordata*

Subfilum : *Vertebrata*

Klas : *Mamalia*

Ordo : *Rodentia*

Subordo : *Myomorpha*

Family : *Muridae*

Subfamily : *Murinae*

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* yang berusia sekitar antara 2-3 bulan dengan berat badan 150 - 250 gram. Kadar glukosa darah puasa normal pada tikus putih dalam rentang antara 50-109 mg/dl (Endah, 2010). Penggunaan tikus putih mempunyai beberapa keuntungan dibanding hewan laboratorium lainnya, yaitu mudah berkembangbiak, mempunyai kemampuan beradaptasi yang baik dan cenderung tahan terhadap berbagai macam perlakuan dalam penelitian. Selain itu, tikus putih mempunyai banyak kesamaan secara fisiologis dengan manusia dan mempunyai jaringan yang spesifik yang dapat digunakan untuk penelitian *in vitro*, endokrinologi, biokimia, toksikologi, farmakologi, fisiologi, neurologi, onkologi, nutrisi dan transplantasi (Wiehe, 1987 *cit.* Febriyanti, 2007).

Tikus memiliki dua sifat yang dapat dibedakan dari hewan percobaan lain yaitu tikus tidak dapat muntah karena struktur anatominya yang tidak lazim di tempat oesophagus bermuara ke dalam lambung, dan tikus tidak mempunyai kantung empedu (Smith & Widjojo, 1988 *cit.* Febriyanti, 2007), sehingga penggunaan tikus putih sangat cocok dalam penelitian ini.

F. Instrument Penelitian

1. Cara membuat ekstrak

Bahan dan alat yang digunakan

- a. Biji Buah alpukat bentuk bulat sebanyak 500 g
- b. NaCl 100 ml
- c. Blender atau alat parut
- d. Saringan atau kain saring
- e. Spuit 2,5 ml
- f. Pisau
- g. Tabung reaksi

Cara kerja

- a. Buah alpukat dikupas dan diambil biji buah alpukat lalu dibersihkan menggunakan air aquades lalu selama.
- b. Daging biji buah ditimbang dan dialuskan menggunakan blender sampai menjadi halus.
- c. Hasil dari penghalusan biji buah alpukat (serbuk) ditampung di gelas kimia atau tabung reaksi.
- d. Dosis yang diberikan berdasarkan dosis biji buah alpukat sebagai obat tradisional indonesia yang telah dikonversikan dari dosis manusia ke dosis tikus dengan berat 200 g yaitu
$$70\text{kg}/50\text{kg} \times 5\text{g} \times 0,18 = 0,126 \text{ g/kgBB}$$
Jika berat BB tikus rata-rata 200 g maka dosis yang digunakan adalah

$$1. \text{ Dosis I : } \frac{0,126 \text{ g/kgBB}}{200 \text{ g}}$$

$$: \frac{0,126 \text{ g/kgBB}}{0,2 \text{ kg}} = 0,63 \text{ g/kgBB}$$

$$2. \text{ Dosis II : } 2 \times 0,63 \text{ g/kgBB} = 1,26 \text{ g/kgBB}$$

$$3. \text{ Dosis III: } 4 \times 0,63 \text{ g/kgBB} = 2,52 \text{ g/kgBB}$$

2. Cara pengukuran kadar glukosa darah pada hewan uji

Bahan dan alat yang digunakan

- a. Larutan *Reagen* KIT *glucose* DYASIS yang diperoleh dari laboratorium Biokimia UMY untuk mengukur kadar glukosa darah plasma
- b. Darah hewan uji (tikus) yang diambil dari pembuluh darah vena bagian ekor sebanyak 1,5 ml
- c. Sarung tangan
- d. Pipet tetes
- e. Tabung reaksi
- f. Centrifuge kecil Hattich EBA III
- g. Spektrofotometer (UV-1202 Shimadzu)
- h. Sduit 2,5 ml.

Cara kerja

Cara pengukuran kadar glukosa darah pada tikus dengan menggunakan metode *Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminoantipirin* (GOD-PAP). Prinsip metode ini adalah: glukosa ditentukan setelah oksidasi enzimatik dengan adanya glukosa oksidase, *hydrogen peroksida* yang

terbentuk akan bereaksi dengan adanya peroksidase dengan phenol serta 4-aminophenazone menjadi warna *quinoneimine* yang berwarna merah violet. Kemudian diukur absorbansi standar dan absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer. Adapun perhitungan kadar glukosa darah dengan metoda GOD-PAP (Yuriska, 2009):

$$C(\text{mg/dl}) = 100 \times \frac{d \text{ Asp} - d \text{ Abl}}{d \text{ Astd} - d \text{ Abl}}$$

atau

$$C(\text{mmol/L}) = 100 \times \frac{d \text{ Asp} - d \text{ Abl}}{d \text{ Astd} - d \text{ Abl}}$$

Keterangan:

C = kadar glukosa darah dalam mg/dl atau mmol/L

d Asp = absorbs sampel

d Astd = absorbs standar

d Abl = absorbs blanko

- a. Sebelum pengambilan darah, terlebih dahulu tikus dipuasakan selama 8 jam
- b. Pengambilan darah pada tikus diambil secara IV melalui ekor sebanyak 1,5 ml
- c. Darah sebanyak 1,5 ml ditambahkan dengan zat antikoogulan EDTA plasma (asam etilendiamin tetraasetat)
- d. Darah dicentrifuge dalam tabung reaksi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit → diambil 10 μ l plasma ditambah 1000 μ l reagen → MiX → inkubasi → 20 menit (20° C – 25° C) → baca absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm
- e. Kadar glukosa darah di hitung menggunakan rumus

$$C(\text{mg/dl}) = 100 \times \frac{d \text{ Asp} - d \text{ Abl}}{d \text{ Astd} - d \text{ Abl}}$$

3. Pemberian aloksan

Bahan dan alat yang digunakan

- a. Serbuk aloksan monohidrat dosis
- b. Aquades 100 ml
- c. Timbangan atau alat timbang
- d. Tabung reaksi
- e. Spuit 2,5 ml

Cara kerja

- a. Timbang serbuk aloksan monohidrat sebanyak 0,5 g
- b. Dilarutkan dalam aquades sampai larut dan ditambahkan aquades hingga mencapai volume 10 ml
- c. Maka diperoleh kadar aloksan sebanyak 5%b/v atau konsentrasi aloksan adalah 50 mg/ml sebanyak 10 ml yang dilarutkan oleh air dengan dosis 150 mg/kg BB.
- d. Volume pemberian larutan aloksan dihitung dengan berat badan tikus rata-rata 200 gram, menggunakan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian} &= \frac{\text{dosis} \times \text{BB}}{\text{konsentrasi aloksan}} \\ &= \frac{150 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram} \\ &= \frac{30000 \text{ mg}}{50 \text{ mg/ml}} \\ &= 0,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

4. Pemberian glibenklamid

Pemberian dosis glibenklamid berdasarkan penetapan dosis pada manusia dewasa (katzung, 1998) sebanyak 0,00125 g-0,02 g selama 1x24 jam. Pada penelitian ini dosis yang akan digunakan adalah 0,01 g atau 10 mg yang dikonversikan pada tikus sebanyak 0,018x10 mg adalah 0,18 mg dan pada tikus dengan berat badan 200 mg, maka dosis yang diberikan sebanyak $0,18/200 = 0,9 \text{ mg/kgBB}$. Pemberian obat dilakukan melalui oral dan diencerkan dengan aquades sebanyak 10 ml. volume pemberian obat dihitung dengan rumus.

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian} &= \frac{\text{dosis} \times \text{BB}}{\text{konsentrasi aloksan}} \\ &= \frac{\frac{0,9 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} \times 200 \text{ gram}}{0,1 \text{ mg/ml}} \\ &= 1,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

G. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara:

- a. Memilih tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang berjenis wistar, sehat, matur serta dengan jenis kelamin jantan secara acak (*random*)
- b. Tiap tikus yang dipilih untuk dijadikan sampel ditimbang berat badannya
- c. Tikus putih diadaptasikan (aklimatisasi) selama enam hari di laboratorium biomedis FKIK UMY. Selama adaptasi, tikus putih akan diamati serta dipantau aktivitasnya

- d. Sebelum pengambilan darah yang pertama dilakukan, tikus dipuasakan selama 8 jam
- e. Setelah 10 jam, darah tikus diambil sebanyak 1,5 ml melalui pembuluh vena ekor dan diperiksa kadar glukosa darah pertama untuk melihat kadar glukosa darah normal pada hewan uji dengan metode Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminoantipirin (GOD-PAP).
- f. Setelah pemeriksaan glukosa darah pertama hewan uji diberi alloxan, dengan dosis 150 mg/kgBB sebanyak 0,6 ml setiap hewan ujia (0,6 ml setiap satu ekor tikus putih)
- g. Untuk melihat reaksi alloxan yang telah diberikan, tikus dibiarkan selama 2x24 jam, setelah itu, tikus dipuasakan selama 18 jam, kemudian diambil darahnya sebanyak 1,5 ml. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah puasa yang kedua, sebelum hewan uji diberi perlakuan.
- h. Subjek pada hewan uji 1 (kelompok eksperimen I) diberi sebanyak 0,63 g/kgBB setiap satu ekor tikus. Pemberian glibenklamid dilakukan setiap 1x24 jam
- i. Subjek pada hewan uji 2 (kelompok eksperimen II) diberi serbuk biji buah alpukat sebanyak 1,26 g/kgBB untuk setiap satu ekor tikus. Pemberian serbuk biji buah alpukat dilakukan setiap 1x24 jam
- j. Subjek pada hewan uji 3 (kelompok eksperimen III) diberi serbuk biji buah alpukat sebanyak 2,52 g/kgBB untuk setiap satu ekor tikus. Pemberian serbuk biji buah alpukat dilakukan setiap 1x24 jam

- k. Subjek pada kontrol positif merupakan kelompok perlakuan yang diberi antidiabetik oral (glibenklamid) dengan dosis 0,9 mg/kgBB sebanyak 2 ml setiap satu ekor tikus. Pemberian glibenklamid dilakukan setiap 1x24 jam melalui oral sebanyak 2 ml
- l. Subjek pada kelompok kontrol negatif merupakan kelompok dengan tikus putih yang tidak diberi ekstrak buah alpukat dan obat glibenklamid, hanya NaCl 0,9% sebanyak 2 ml
- m. Setiap 2 hari, dilakukan pengambilan darah sebanyak 1,5 ml tiap subjek. Sebelum pengambilan darah, subjek dipuasakan selama 8 jam.
- n. Pemeriksaan kadar glukosa darah setiap 2 hari dilakukan setelah tiap subjek diberikan perlakuan

H. Uji Validitas dan Reliabilitas.

Metode pengukuran yang digunakan adalah *colorimetric test* menggunakan spektrofotometer. Pemeriksaan kadar glukosa darah menggunakan reagen KIT glucose DYASIS metode GOD-PAP. Dengan prinsip glukosa diubah menjadi asam glukonik dan H_2O_2 oleh enzim oksidase. H_2O_2 yang terbentuk bereaksi dengan 4-aminoantipyrin dan phenol dengan bantuan enzim hydrogen peroxidase membentuk chinonimine yang berwarna dan intensitasnya diukur secara fotometrik.

I. Pengolahan dan Metode Analisa Data

Data yang diperoleh dapat diolah dan dianalisa dengan

1. Pengolahan Data.

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan computer dengan program *SPSS for Window Release 15.0*.

2. Metode Analisis Data

Setelah didapatkan data kadar glukosa darah pada masing-masing kelompok sampel, kemudian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Jika didapatkan distribusi data normal, data dianalisis menggunakan *one way ANOVA* digunakan untuk menguji lebih dari dua sampel uji statistik dan dilanjutkan dengan *sample paired t-test* untuk mengetahui perbedaan kadar glukosa darah sebelum diberikan perlakuan dan sesudah diberikan perlakuan. Pada penelitian ini akan dilakukan pengukuran atau perlakuan yang berbeda pada subjek yang sama. Jika data tidak normal, maka data dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis*.

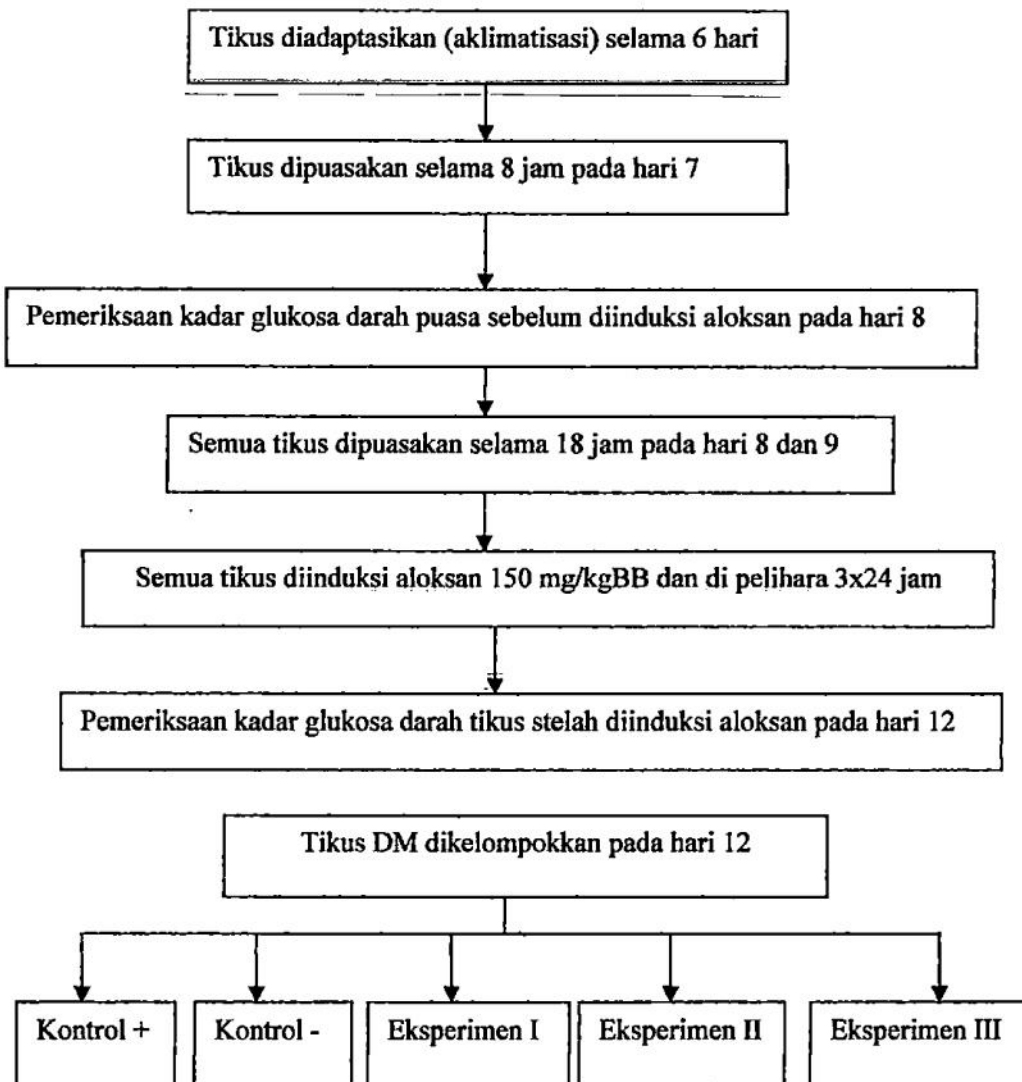
J. Etika Penelitian

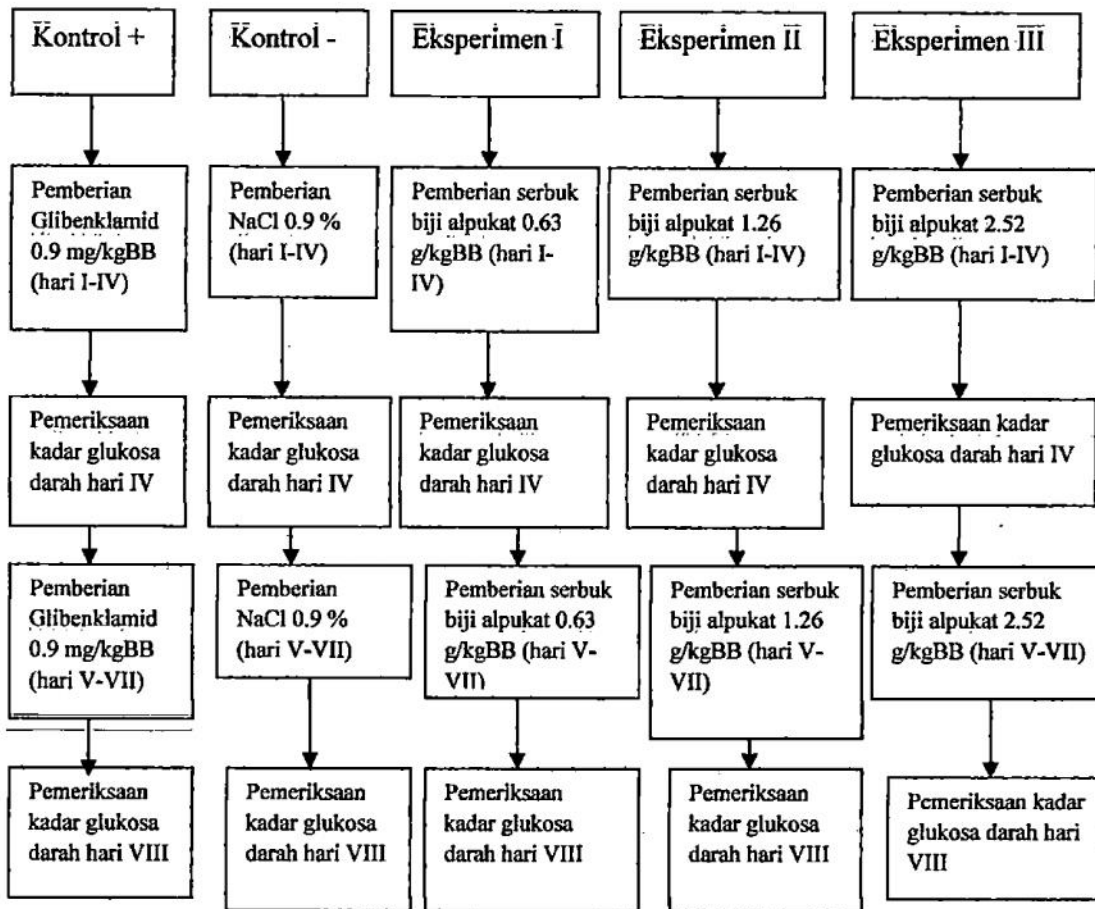
Pada penelitian ini, peneliti menggunakan sampel tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan uji, dimana hewan uji yang sehat akan dijadikan hiperglikemia. Setiap hewan uji akan diperlakukan secara adil (*right in fair treatment*) baik makanannya maupun penempatannya. Yang berbeda hanya terapi

yang diberikan pada tiap kelompok hewan uji untuk melihat perbedaan kadar glukosa darahnya.

K. Bagan Alur Penelitian

Berikut ini adalah gambar 2 bagan alur penelitian sebelum penginduksian aloksan sampai tahap intervensi terakhir.





Gambar 2. Bagan alur penelitian sebelum diinduksi aloksan samapi intervensi terakhir