

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan *pre test post test control group design*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Lab Biokimia FK UMY mulai Maret-Agustus 2009.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus putih strain Wistar diperoleh dari LPPT-UGM. Subyek yang diteliti memiliki kriteria sebagai berikut:

1. Usia sekitar 2 bulan
2. Memiliki berat badan rata-rata 145,5 gram
3. Berjenis kelamin jantan

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Vitamin E
2. Variabel Tergantung
Kadar profil lipid plasma dan AGE'S masing-masing subyek.
3. Variabel Terkendali

- a. Usia : diatasi dengan pemilihan subyek penelitian yang memiliki usia sekitar 2 bulan.
- b. Jenis kelamin : diatasi dengan pemilihan subyek dari jenis kelamin yang sama yaitu jantan.
- c. Berat badan : diatasi dengan pemilihan subyek yang memiliki berat badan antara 145,5 gram.

E. Definisi Operasional

1. Kadar glukosa darah

Kadar glukosa darah yang diperoleh dari subyek penelitian setelah dipuasakan selama 8-12 jam.

2. Aloksan

Aloksan adalah suatu produk asam urat teroksidasi yang jika diberikan pada hewan percobaan cenderung merusak sel beta pulau pankreas dan menimbulkan diabetes aloksan. Obat ini bersifat sitotoksik terhadap sel beta pankreas yang dimediasi oleh reaktivitas oksigen spesies.

3. Vitamin E

Vitamin E adalah salah satu antioksidan yang larut lemak dan dapat berfungsi menghilangkan oksidan-oksidan dari dalam tubuh.

F. Instrumen Penelitian

Untuk mengukur kadar glukosa darah

- a. Larutan reagen KIT Glucose DYASIS yang terdiri dari:
- | | |
|-------------------------|--------------|
| Phosphare Buffer Ph 7,5 | : 250 mmol/L |
| Phenol | : 5 mmol/L |
| 4-aminoantipyrine | : > 15 KU/L |
| Glucose Oxidase | : > 1 KU/L |
- b. Alloxan
- c. Glibenklamide
- d. Darah
- e. Aquades
- f. Undur-undur Darat (*Myrmeleon.sp*)
- g. Larutan KIT HDL, LDL dan Kolesterol

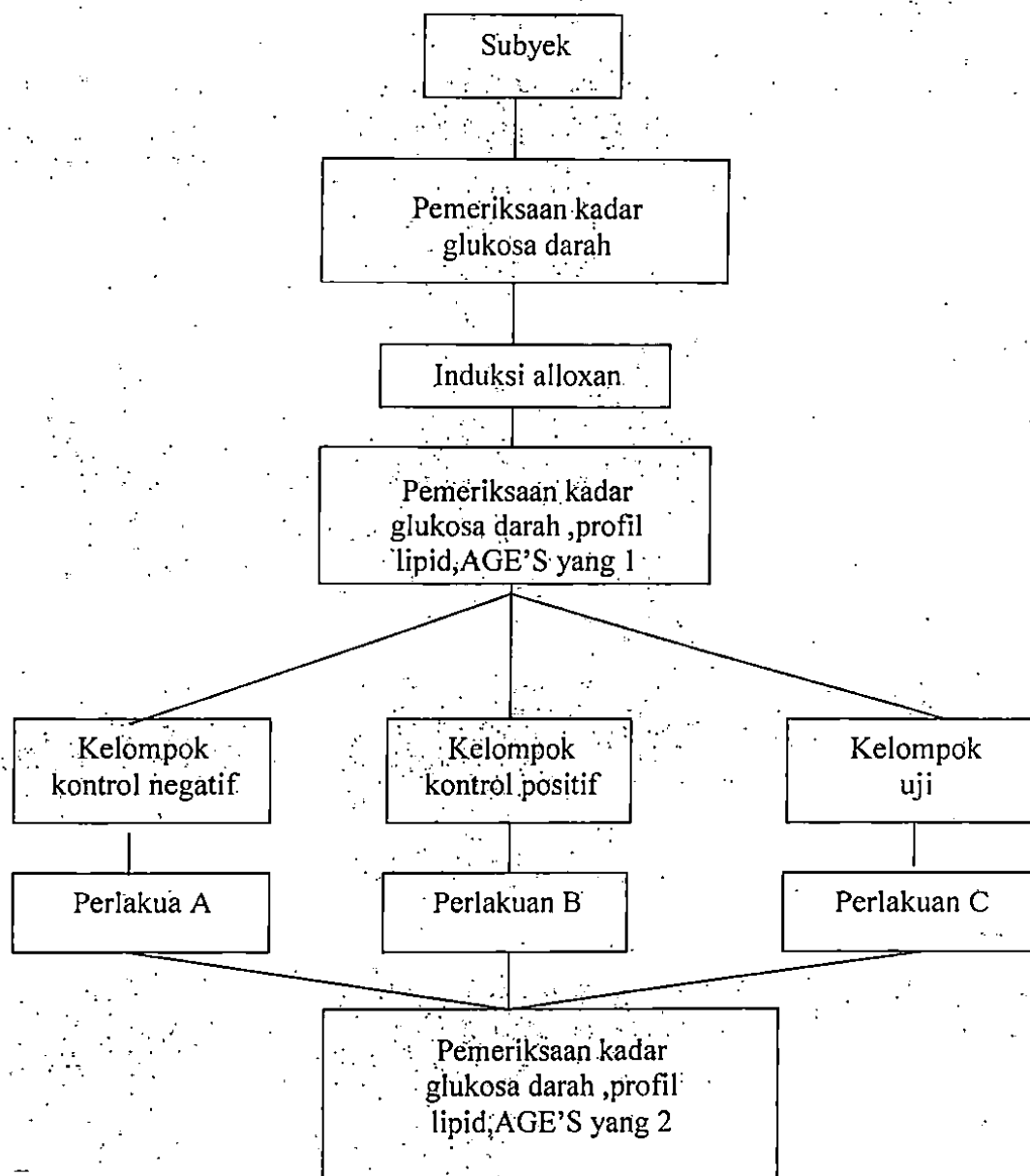
2. Alat

- a. Neraca analitik
- b. Alat homogenisasi
- c. Tabung
- d. Sonde
- e. Pipetman/micropipet
- f. Spektrofotometri microlab 300
- g. Vortex
- h. Sentrifuge kecil Hattich EBA III
- i. Eppendorf
- j. Micro-hematocrite tube
- k. Spektrofotometer (UV-1201 Shimadzu)

1. Gelas kaca

G. Cara Kerja

1. Sampel penelitian 15 ekor tikus putih jantan dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 5 ekor.
2. Sebelum pengambilan darah, hewan uji dipuasakan selama 8-12 jam.
3. Diambil darah awal sebanyak 1,5 ml kemudian diperiksa kadar glukosa darah.
4. Hewan uji diinduksi alloxan (bahan kimia untuk menaikkan kadar glukosa darah).
5. Untuk melihat reaksi yang telah ditimbulkan, dibiarkan selama 48 jam dan dipuasakan selama 8-12 jam, kemudian diambil darah tikus sebanyak 1,5 ml. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah dan profil lipid serta AGE'S yang pertama.
6. Subyek pada kelompok uji diberi vitamin E masing-masing 1 mg setiap hari selama 6 hari. Subyek pada kelompok positif diberi obat glibenklamid, masing-masing 0,1 mg. Pada kelompok kontrol negatif hanya diberi aquades.
7. Pemeriksaan kadar glukosa darah dan profil lipid serta AGE'S yang kedua.
8. Analisis Statistik



Gambar 12. Bagan Rancangan Penelitian

H. Cara Pengumpulan Data

Pemeriksaan kadar glukosa darah menggunakan reagen KIT Glucose

DYASIS metode GOD-POD. Prinsipnya adalah glukosa diubah menjadi asam

glukonik dan H_2O_2 oleh enzim oksidase. H_2O_2 yang terbentuk bereaksi dengan 4-aminoantipyrine dan phenol dengan bantuan enzim hydrogen peroksidase membentuk *chinonimine* yang berwarna dan intensitasnya diukur secara fotometrik (Barham et al, 1972).

Tabel 2. Komposisi Campuran dalam Penetapan Kadar Glukosa Darah

	Blanko	Sampel	Standart
Sampel	-	10 μ l	-
Standart	-	-	10 μ l
Aquades	10 μ l	-	-
Reagen	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l

Campur baik-baik, inkubasikan selama 20 menit pada suhu 20-25°C atau 10 menit pada suhu 37°C. Baca absorbansinya pada panjang gelombang 500nm.

Kadar glukosa darah (mg/dl)

$$= \frac{A \text{ sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ s tan dar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi s tan dar}$$

Pemeriksaan profil lipid menggunakan KIT HDL, LDL dan kolesterol

I. Uji Validitas dan Realibilitas

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

J. Analisis Data

Data hasil pengukuran kadar glukosa darah, profil lipid dan AGE'S dianalisis dengan uji Oneway ANOVA untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan antar kelompok. Dilanjutkan dengan uji post hoc antar kelompok untuk menjawab pada antar kelompok manakah terdapat perbedaan kebermaknaan penurunan kadar tersebut. Untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan kadar sebelum dan sesudah perlakuan inter kelompok, data hasil pengukuran dianalisis dengan *paired t test*.