

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian ekperimental murni. Rancangan yang digunakan adalah *pre and post test control design* untuk mengetahui manfaat ekstrak akar Simpur terhadap glukosa darah pada tikus putih yang diinduksi streptozocin (STZ).

B. Subyek dan Sampel Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Sampel yang digunakan memiliki kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Memiliki berat 150-250gram
2. Berjenis kelamin jantan, sehat dan belum pernah mendapat perlakuan
3. Usia 3-4 bulan

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 30 ekor yang diacak dan dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor sampel.

1. Kelompok pertama sebagai kontrol tanpa perlakuan.
2. Kelompok kedua sebagai kontrol positif, hewan uji yang sudah diinduksi streptozocin 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik

dan diberikan perlakuan glibenklamid satu kali sehari selama 30 hari masing-masing 0,09mg/200grBB/hari/tikus.

3. Kelompok ke-3 sebagai kontrol negatif, kelompok yang diinduksi streptozocin 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan tidak diberi perlakuan.
4. Kelompok ke-4 sebagai kelompok uji yang diinduksi streptozocin 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis pertama selama 30 hari.
5. Kelompok ke-5 sebagai kelompok uji yang diinduksi reagen sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis kedua selama 30 hari.
6. Kelompok ke-6 sebagai kelompok uji yang diinduksi reagen sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis ketiga selama 30 hari.

Besar sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu:

Keterangan :

n : jumlah objek tiap kelompok penelitian

t : jumlah kelompok dalam penelitian

Sehingga perhitungan banyaknya subjek penelitian:

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel tiap kelompok pada penelitian ini sebanyak 5 ekor tikus ($n \geq 4$) dan ada 6 kelompok perlakuan. Sehingga dalam penelitian ini membutuhkan 30 ekor tikus putih.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dan Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan di LPPT UGM sedangkan waktu penelitian selama 3 bulan dari bulan Maret sampai Mei 2016.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel *independent* (variabel bebas)

Variabel *independent* adalah variabel yang mempengaruhi. Pada penelitian ini variabel *independent* yaitu ekstrak akar Simpur berbagai dosis.

2. Variabel *dependent* (variabel tergantung)

Variabel *dependent* adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel *independent*. Variable *dependent* pada penelitian ini adalah kadar gula darah.

3. Variabel terkontrol

- a. Usia: pemilihan subjek penelitian yang berusia 3-4 bulan

- b. Jenis kelamin: pemilihan subjek penelitian yang berjenis jantan
- c. Berat badan : pemilihan subjek penelitian yang mempunyai berat badan berkisar antara 150-250gram
- d. Suhu dan kelembapan udara yang diusahakan normal menggunakan *air conditioner* dan *exhaust fan*
- e. Kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok
- f. Waktu pemeriksaan : pemeriksaan subjek penelitian dilakukan pada waktu yang sama
- g. Lama perlakuan: waktu pemberian perlakuan sama pada tiap kelompok subjek penelitian.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak akar Simpur (*Dillenia suffruticosa*)

Ekstrak *Dillenia suffruticosa* adalah ekstrak etanol akar Simpur dengan variasi dosis (Dosis pertama :0.5mg/200grBB/hari; Dosis ke-2: 1mg/200gr/hari BB; Dosis ke-3 : 2mg/200grBB/hari) yang diberikan selama 30 hari kepada tikus diabetik yang diinduksi *Streptozotocin* secara peroral menggunakan sonde.

2. Gula darah

Pengukuran gula darah tikus dilakukan sebanyak tiga kali pada penelitian kali ini. Pemeriksaan gula darah pertama dilakukan kepada semua tikus untuk melihat kadar gula darah masih dalam kadar gula darah tikus sehat. Pemeriksaan gula darah kedua dilakukan setelah

dilakukan induksi STZ pada tikus untuk menilai keberhasilan penginduksian STZ terhadap tikus. Pemeriksaan gula darah ketiga dilakukan 30 hari setelah pemberian intervensi terhadap tikus. Gula darah diambil setelah puasa 8 jam, menggunakan metode *Glucose Oksidase – Peroxidase Aminoantypirin* (GOD-PAP).

3. Tikus diabetik

Tikus diabetik merupakan tikus *wistar* jantan yang memiliki berat rerata antara 150-250 gram yang diinduksi dengan *Streptozotocin*. Injeksi STZ sebesar 40mg/kgBB intravena pada tikus dapat menyebabkan degenarasi sel *beta Langherhans* dan secara klinik menunjukkan tanda diabetes pada hari ke 4-6 sesuai dengan yang dilakukan Szkuldelski, (2001). Tikus diabetik akan dijadikan beberapa kelompok dengan masing-masing kelompok akan diberikan perlakuan yang berbeda untuk melihat keefektifan dari perlakuan dimasing-masing kelompok.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Bahan
 - a. STZ
 - b. Akar Simpur
 - c. Aquades
 - d. Glibenklamid
 - e. Etanol
 - f. Aluminium foil

g. Kertas saring

2. Alat

a. Timbangan

b. Spuit

c. Alat pengukuran gula darah

d. Erlemenyer

e. Evaporator

f. Corong buncher

g. Sonde

h. Sentrifuge

i. Oven

j. Tabung mikro hematokrit

k. Blender

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak akar Simpur

a) Akar Simpur (*Dillenia suffruticosa*) dikeringkan.

b) Diblender dan disaring.

c) Serbuk kemudian dimaserasi dengan menggunakan etanol.

d) Serbuk tanaman dimasukkan ke dalam erlemenyer dan ditambahkan etanol sampai terendam sempurna.

e) Erlemenyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil.

f) Maserasi dilakukan selama 48 jam sambil sesekali diaduk.

- g) Setelah 48 jam sampel disaring menggunakan corong buncher yang telah dilapisi kertas saring, kemudian filtrat dipisahkan.
 - h) Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.
 - i) Ekstrak kemudian dikeringkan di oven hingga diperoleh ekstrak kering.
2. Timbang berat badan tikus
 3. Pengelompokan hewan uji, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan dimasukkan ke dalam kandang
 - a) Kelompok 1 sebagai kontrol tanpa perlakuan
 - b) Kelompok 2 sebagai kontrol positif
 - c) Kelompok 3 sebagai kontrol negatif
 - d) Kelompok 4 sebagai kelompok uji diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis pertama
 - e) Kelompok 5 sebagai kelompok uji diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis kedua
 - f) Kelompok 6 sebagai kelompok uji diberikan perlakuan ekstrak akar Simpur dosis ketiga
 4. Tikus ditempatkan agar tetap pada suhu kamar (25°C) menggunakan *air conditioner* dan *exhaust fan*. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Pencahayaan terang 12 jam gelap 12 jam.
 5. Tikus diadaptasi selama 6 hari

6. Tes gula darah puasa pada semua tikus untuk pemeriksaan gula darah sebelum penginduksian dengan STZ. Darah tikus diambil dari vena sinus orbita menggunakan tabung mikrohematkrit.
7. Tikus putih diinduksi pada kelompok uji dengan STZ 40 mg/kgBB.
8. Tes gula darah puasa pada semua tikus untuk pemeriksaan gula darah setelah induksi STZ
9. Pemberian ekstrak akar Simpur selama 30 hari (dosis ini diambil dari dosis pada kultur, yaitu 12,5 μ gr/ml (Armania, *et al.*, 2013). Jika diasumsikan pada tikus 200gr, memiliki volume cairan ekstrak sebesar 40ml. Sehingga setiap tikus membutuhkan dosis 40ml x 12,5 μ gr = 500 μ gr/200grBB)
Sehingga dosisnya adalah:
 - a. Dosis 1 : 0.5mg/200gr BB
 - b. Dosis 2 : 1mg/200gr BB
 - c. Dosis 3 : 2mg/200gr BB
10. Tes gula darah puasa pada semua tikus untuk pemeriksaan gula darah setelah pemberian perlakuan

H. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM) dan menggunakan alat yang telah terstandarisasi

I. Analisis Data

Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS (Statistical Product and Service Solutions) PC versi 16.0. Analisa data dilakukan untuk menjawab hipotesis penelitian, oleh karena itu diperlukan uji statistik yang sesuai dengan variabel (Widyastuti, 2013).

Data yang telah terkumpul dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *shapiro-wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel, hasil dari uji normalitas didapatkan data terdistribusi tidak normal dengan nilai probabilitas $< 0,05$. Setelah diketahui uji normalitas tidak terdistribusi normal selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan *Wilcoxon Test*. Hasil analisis data dapat dilihat pada Lampiran 5.