

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol media dengan kontrol negatif dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat badan 200-250 gram, berumur 3 - 4 bulan yang dibagi menjadi 5 kelompok untuk digunakan sebagai penelitian.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) dan Laboratorium Klinik Duta Medika pada bulan November - Desember 2013

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi menurut Notoadmodjo (2012) adalah keseluruhan objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat badan 200-250 gram, berumur 3 - 4 bulan yang diperoleh berasal dari IPB Bogor.

2. Sampel Penelitian

Sampel menurut Notoadmodjo (2012) adalah sebagian yang diambil dari keseluruhan objek yang diteliti dan dianggap memiliki seluruh populasi. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

$$t (n-1) > 15$$

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi :

$$5 (n-1) > 15$$

$$5n-5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ($n > 4$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus dari populasi yang ada.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Sehat.
- b. Memiliki berat badan antara 200-250 gram
- c. Jenis kelamin jantan.
- d. Berusia sekitar 3 – 4 bulan.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus atau genital).
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah :

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus.
- 2) Sonde lambung, untuk mencekoki ekstrak biji jengkol
- 3) Glukometer (*GlucoDrTM*) dan Glukotest strip (*GlucoDrTM strip test*), untuk mengukur kadar gula darah.
- 4) Spectrofotometer, untuk mengukur kadar ureum dan kreatinin serum.
- 5) Gunting minor set, untuk melukai ekor tikus dan membedah tikus.
- 6) Tabung *vacutainer yellow top*, untuk menampung darah tikus.
- 7) Mortar dan Alu, untuk menghaluskan jengkol.
- 8) *Handschoen*, kapas dan alkohol.
- 9) Kandang hewan, tempat pakan hewan dan tempat minum hewan.

2. Bahan penelitian

- a. Hewan coba berupa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Sprague Dawley berasal dari IPB Bogor dan memenuhi kriteria inklusi. Mendapat pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
- b. Ekstrak etanol 96% biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.).
- c. Alokasan monohidrat

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Ekstraksi biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.)

Bahan baku biji jengkol tua yang masih segar dikumpulkan, dibuang bagian yang tidak diperlukan (sortasi basah), dicuci bersih di bawah air mengalir, dan

ditiriskan. Biji jengkol selanjutnya dirajang kecil-kecil dan dikeringkan di bawah matahari hingga kering, dibuang benda-benda asing atau pengotoran-pengotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia kering (sortasi kering), kemudian dihaluskan dengan mortar dan alu lalu disimpan dalam wadah bersih. Dihasilkan 600 gr serbuk biji jengkol (simplisia) dan selanjutnya dilakukan ekstraksi (Candra, 2012). Pembuatan ekstrak etanol biji jengkol dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah penarikan simplisia dengan cara merendam simplisia tersebut dalam cairan penyari (Syamsuni, 2006). Serbuk simplisia direndam dalam 2 liter etanol 96% selama 24 jam, selanjutnya disaring hingga didapatkan filtrat. Filtrat tersebut kemudian dievaporasi menggunakan *Rotary evaporator* hingga dihasilkan ekstrak kental (Depkes, 2000). Ekstrak kental tersebut selanjutnya diencerkan menggunakan aquades sesuai dengan dosis yang dibutuhkan, yaitu 600 mg/kgbb, 900 mg/kgbb, dan 1200mg/kgbb.

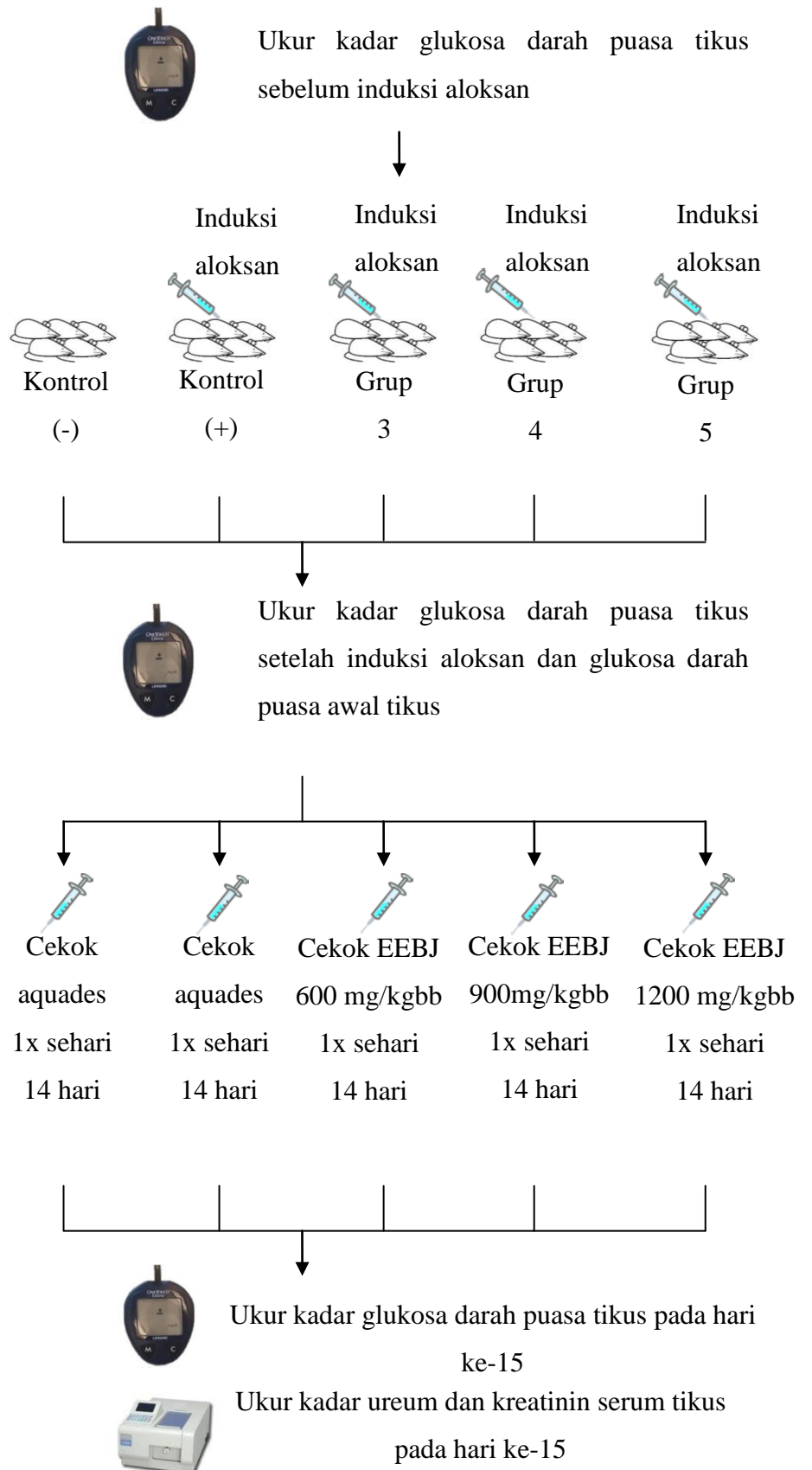
2. Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 grup. Kelompok pertama adalah kontrol media, dimana grup ini hanya diberikan aquadest secara oral tanpa diinduksi aloksan secara intraperitoneal. Kelompok kedua adalah kontrol negatif (-), dimana grup ini akan diberikan aquadest secara oral dan diinduksi pemberian aloksan secara intraperitoneal. Kelompok ketiga adalah grup yang diberi perlakuan berupa induksi aloksan intraperitoneal dan pemberian dosis 600 mg/kgbb ekstrak etanol biji jengkol. Kelompok keempat adalah grup yang diberi perlakuan berupa induksi aloksan intraperitoneal juga dan

pemberian dosis 900 mg/kgbb ekstrak etanol biji jengkol. Kelompok kelima adalah grup yang juga diinduksi induksi aloksan secara intraperitoneal dan pemberian dosis 1200 mg/kgbb ekstrak etanol biji jengkol. Kemudian tikus akan di aklimasi dalam rumah hewan selama satu minggu.

- b. Mengukur kadar glukosa darah puasa tikus sebelum perlakuan.
- c. Pemberian aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kgbb secara intraperitoneal. Setelah diinduksi tikus tetap diberikan makanan dan minuman *ad libitum*, tunggu dalam 4 hari, dan ukur kadar glukosa darahnya. Tikus dianggap diabetes apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl (Triplitt, *et al.*, 2008) dan telah dapat digunakan untuk pengujian. Selanjutnya disebut sebagai tikus diabetes.
- d. Memuaskan tikus selama 8-12 jam, kemudian ukur kadar glukosa darah tikus.
- e. Mencekoki tikus kelompok 3, 4 dan 5 dengan ekstrak etanol biji jengkol sebanyak 3 cc, dengan dosis masing-masing 600, 900, dan 1200 mg/kgbb selama 14 hari, satu kali setiap hari. Tikus tetap diberikan makan dan minum *ad libitum*.
- f. Memuaskan tikus selama 8-12 jam, ukur kadar glukosa darah puasa, ureum dan kreatinin tikus setelah 14 hari.
- g. Pengambilan sampel darah dilakukan pada akhir penelitian. Tikus dikeluarkan dari kandang dan ditempat terpisah dengan tikus lainnya kemudian ditunggu beberapa saat untuk mengurangi penderitaan pada tikus akibat aktivitas antara lain, pemindahan, penanganan, gangguan

antar kelompok, dan penghapusan berbagai tanda yang pernah diberikan. Setelah itu, tikus dianestesi dengan Ketamine-xylazine 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara intraperitoneal kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan mati, darah di ambil melalui jantung dengan menggunakan alat suntik sebanyak ± 2 cc, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer (Red Top)*. Sampel darah tersebut ditampung menggunakan tabung *vacutainer red top*, disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm, kemudian dilakukan pemeriksaan glukosa darah, ureum dan kreatinin serum dengan spektrofotometri.



Gambar 7. Ilustrasi prosedur penelitian

G. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.).

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah (mg/dl), kadar ureum serum (mg/dl), dan kreatinin (mg/dl).

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala	Jenis Variabel
Ekstrak etanol biji jengkol	Ekstrak Etanol Biji Jengkol (EEBJ) diberikan pada tikus berupa suspensi dengan dosis 600 mg/kgbb, 900 mg/kgbb dan 1200 mg/kgbb.	mg/kgbb	Numerik
Kadar glukosa darah	Kadar glukosa darah puasa tikus yang diukur dengan glukometer yang sebelumnya telah dipuasakan 8 – 12 jam, dengan cara tidak diberikan makan namun tetap diberikan minum <i>ad libitum</i> .	mg/dl	Numerik
Kadar ureum dan kreatinin	Kadar ureum dan kreatinin serum yang diukur dengan spektrofotometri.	mg/dl	Numerik

H. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan meliputi :

1. Analisis Univariat

Analisis univariat digunakan presentasi, hasil dari setiap variabel ditampilkan dalam bentuk distribusi frekuensi, sehingga dapat mengetahui karakteristik atau gambaran dari setiap variabel (Notoatmodjo, 2012).

2. Analisis Bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk mencari hubungan dan membuktikan hipotesis dua variable (Notoatmodjo, 2012). Jika memenuhi syarat (distribusi data normal, varians sama), maka digunakan uji statistik *oneway* ANOVA. Jika data tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka uji Kruskal Wallis sebagai alternatif. Untuk menghasilkan nilai $p < 0,05$ di lanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* (Dahlan, 2011).

I. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu:

1. *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $t(n-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi.
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*.
 - b. Bebas dari ketidak-nyamanan, pada penelitian hewan coba ditempatkan di *animal house* dengan suhu terjaga 20-25°C, kemudian hewan coba terbagi menjadi 2-4 ekor tiap kandang. *Animal house* berada jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya sehingga, mengurangi stress pada hewan coba.
 - c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan *nasogastric tube* dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin, dosis

perlakuan diberikan berdasarkan pengalaman terdahulu maupun literatur yang telah ada.

Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan *anesthesia* serta *euthanasia* dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba sesuai dengan IACUC (Ridwan, 2013).