

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test-Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan pada saat sebelum diberikan perlakuan dan pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley dengan berat badan 200-300 gram, berumur 3-4 bulan yang dibagi menjadi 5 grup untuk digunakan sebagai penelitian.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober – November 2013.

##### **2. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

## C. Populasi dan Sampel

### 1. Populasi Penelitian

Populasi menurut Notoadmodjo (2012) adalah keseluruhan objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley dengan berat badan 200-300 gram, berumur 3-4 bulan yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

### 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 (Supranto, 2007) 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 – 300 gram.
- c. Jenis kelamin jantan.
- d. Berusia  $\pm$  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. Timbangan Ohaus dengan tingkat ketelitian 0,1 g, untuk menimbang berat tikus.
2. Sduit oral 10 cc, untuk mencekoki ekstrak biji jengkol
3. Glukometer (*GlucoDr<sup>TM</sup>*) dan Glukotest strip (*GlucoDr<sup>TM</sup> strip test*)
4. Kapas dan alkohol.

## 2. Bahan penelitian

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

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth)

- a. Cara pembuatan ekstrak etanol biji jengkol :

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 kotoran-kotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia kering (sortasi kering), kemudian dihaluskan dengan blender dan disimpan dalam wadah bersih. Serbuk biji jengkol (simplisia) ditimbang dengan seksama dan selanjutnya dilakukan ekstraksi (Chandra, 2012).

Pembuatan ekstrak etanol biji jengkol dilakukan dengan metode perkolasi. Perkolasi adalah suatu cara penarikan memakai alat yang disebut perkolator dimana simplisia terendam dalam cairan penyari, zat-zat akan terlarut dan larutan tersebut akan menetes secara beraturan (Syamsuni, 2006). Serbuk simplisia direndam dengan etanol 96%, selanjutnya

dipindahkan massa tersebut sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, tambahkan etanol 96% secukupnya hingga simplisia terendam dan terdapat cairan penyari di atasnya, perkolator ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian kran perkolator dibuka dan dibiarkan cairan ekstrak menetes dengan kecepatan 1 ml per menit dan ditambahkan etanol 96% berulang-ulang secukupnya dengan meletakkan corong pisah di atas perkolator dan diatur kecepatan penetesannya cairan penyari sama dengan kecepatan tetesan perkolat, sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Perkolasi dihentikan jika perkolat yang keluar terakhir diuapkan, tidak meninggalkan sisa. Perkolat kemudian disuling dan diuapkan dengan tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari 50°C menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dipekatkan dengan bantuan alat *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 2000a).

## **2. Prosedur Penelitian**

- a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 grup. Grup pertama sebagai kontrol negatif (-), dimana tidak akan diberikan aloksan. Grup kedua adalah kontrol positif (+) dimana grup ini hanya akan diberi aloksan secara subkutan. Grup ketiga adalah grup 1 grup dengan pemberian dosis I ekstrak etanol biji jengkol dengan pemberian aloksan subkutan. Grup keempat adalah grup dengan pemberian dosis II ekstrak etanol biji jengkol, dan diberikan pula aloksan subkutan. Grup kelima adalah grup dengan pemberian dosis III ekstrak etanol biji jengkol dan diberikan pula aloksan

subkutan. Kemudian tikus akan ditaruh di laboratorium selama satu minggu sebagai adaptasi.

- b. Mengukur kadar glukosa darah puasa tikus sebelum perlakuan.
- c. Pemberian aloksan monohidrat 120 mg/kgBB secara subkutan. Setelah diinduksi tikus tetap diberikan makanan dan minuman *ad libitum*, tunggu dalam 10 hari, dan ukur kadar glukosa darahnya. Tikus dianggap diabetes apabila kadar glukosa darah  $\geq 200$  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 dengan ekstrak etanol biji jengkol selama 14 hari, satu kali setiap hari. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.
- f. Mengukur kadar trigliserida tikus setelah 14 hari.
- g. Pengambilan Sampel Darah Tikus. 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 IP 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  $\pm 2$  cc, kemudian langsung dimasukkan ke dalam *vacutainer SST (Yellow Top)* yang sudah berisi *Clot activator* dan *Inner separator*.

### 3. Pengukuran Kadar Trigliserida

#### 1. Penyiapan serum

Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, dimasukkan darah kedalam tabung sentrifuge, disentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 6000 rpm, Diambil serum darah, lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi.

#### 2. Pengukuran absorban blanko

Disiapkan alat dan bahan, dipipet 10  $\mu\text{L}$  *aquadest* kedalam kuvet, ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  reagen trigliserida, diinkubasi pada suhu 25°C selama 20 menit, lalu diukur absorban pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

#### 3. Pengukuran absorban standar

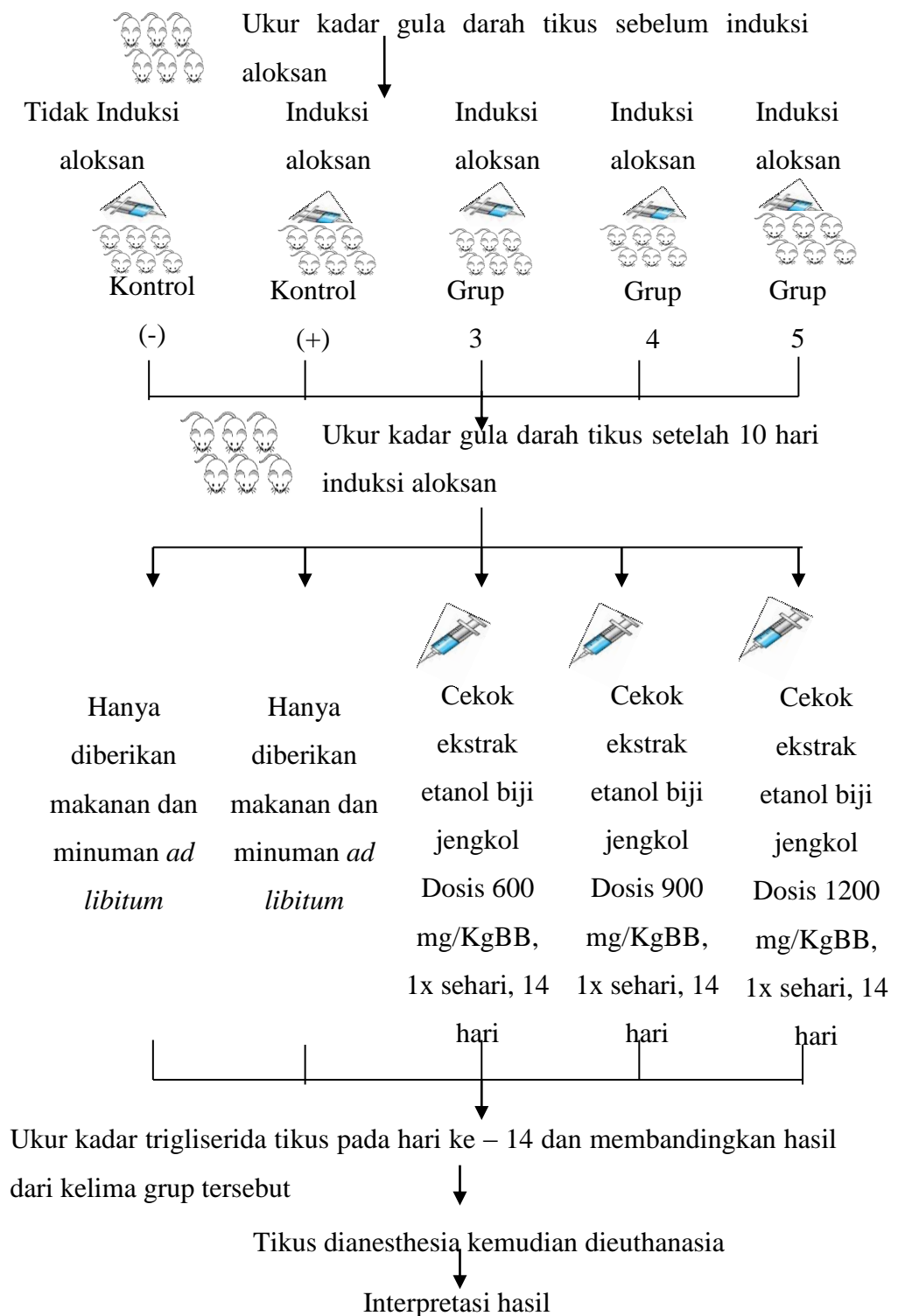
Disiapkan alat dan bahan, dipipet 10  $\mu\text{L}$  larutan standar kedalam kuvet, ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  reagen trigliserida, diinkubasi pada suhu 25°C selama 20 menit, diukur absorban pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

#### 4. Pengukuran absorban sampel

Disiapkan alat dan bahan, dipipet 10  $\mu\text{L}$  *aquadest* kedalam kuvet, ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  reagen trigliserida, diinkubasi pada suhu 25°C selama 20 menit, Diukur absorban pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.



#### 4. Alur Penelitian



**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 pemberian ekstrak etanol biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.).

#### b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar trigliserida dalam darah tikus.

### 2. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 5.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala	Jenis Variabel
<b>Ekstrak etanol biji jengkol</b>	Ekstrak etanol biji jengkol diberikan pada tikus berupa suspensi dengan dosis 600 mg/KgBB (dosis I), 900 mg/KgBB (dosis II), dan 1200 mg/KgBB (dosis III).	Mg/KgBB	Numerik
<b>Kadar Trigliserida</b>	Kadar trigliserida darah tikus putih jantan ( <i>Rattus novergicus</i> ) galur <i>Sprague Dawley</i> secara intraorbita	mg/dl	Numerik

## H. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan meliputi :

### a. 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).

### b. Analisis Bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk mencari hubungan dan membuktikan hipotesis dua variabel. Uji statistik yang digunakan adalah *oneway* ANOVA, dengan derajat kemaknaan (taraf signifikansi) yang dipakai adalah ( $\alpha = 0,05$ ), sehingga bila  $p < \alpha$  maka hasil perhitungan statistik bermakna dan bila  $p > \alpha$  maka hasil perhitungan statistik tidak bermakna.

## J. Ethical Clearance

Penelitian ini telah disetujui oleh 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  $(n-1) (t-1) \geq 15$ ,

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 3-4 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).