

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Subjek, Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian dalam penelitian ini adalah mencit galur Swiss Webster yang diperoleh dari Bio Farma dan dijadikan model diabetes dengan cara diinduksi aloksan.

Kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

1. Mencit jantan galur Swiss Webster
2. sehat
3. Umur 2-3 bulan
4. Berat badan 20-25 gram

Kriteria Eksklusi:

1. Penurunan berat badan mencit selama adaptasi >10%
2. Mencit sakit atau mati selama masa adaptasi

3.1.2 Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel mencit jantan galur Swiss Webster usia 2-3 bulan, dengan berat badan 20-25 gram dan dalam keadaan sehat. Sampel dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling*. Besar sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer yaitu:

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

Dimana t = jumlah perlakuan

n = besar ulangan

Perhitungan rumus Federer:

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

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dari rumus tersebut didapatkan sampel sebanyak ≥ 6 . Jadi jumlah sampel minimal sesuai rumus Federer adalah 6 dan untuk menjaga agar tingkat representatifnya tinggi apabila terjadi *drop out*, maka sampel diperlebar 10%

menjadi 7 ekor tiap kelompok. Jadi jumlah keseluruhan sampel adalah 7×4 kelompok = 28 ekor mencit.

3.1.3 Bahan Penelitian

1. Infusa belimbing wuluh

Bagian belimbing wuluh yang digunakan sebagai bahan uji adalah buah belimbing wuluh matang yang diperoleh dari perkebunan Desa Cicadas, Kecamatan Jatiwangi, Kabupaten Majalengka. Buah belimbing wuluh kemudian diolah menjadi infusa.

2. Aloksan Monohidrat

Dosis pemberian aloksan digunakan pada hewan percobaan adalah 125 mg/kg BB. Aloksan disuntikkan secara subkutan dengan dosis tunggal dan efek hiperglikemik akan muncul setelah 72 jam.

3. Akarbosa

Akarbosa digunakan sebagai monoterapi atau kombinasi dengan sulfonilurea yang bekerja sebagai penghambat enzim α -glukosidase. Dosis akarbosa pada manusia sebesar 25-100 mg, terapi harus dimulai dengan dosis terendah dan ditingkatkan secara perlahan.

3.1.4 Alat Penelitian

1. Kandang, tempat makan dan minuman mencit
2. Timbangan untuk menimbang belimbing wuluh
3. Timbangan untuk menimbang mencit

4. Instrument dalam pembuatan infusa belimbing wuluh antara lain panci, pisau, spatula, dan saringan (kain planel).
5. Alat pemanas air/kompor
6. Sonde oral
7. Jarum dan alat suntik
8. Glukotest (*glucometer easy touch*)
9. Sarung tangan
10. Botol infusa
11. Alat tulis

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental dimana kelompok perlakuan diberi infusa belimbing wuluh. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), *pre and post test controlled group design*.

3.2.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent*) dalam penelitian ini adalah infusa belimbing wuluh
2. Variabel terikat (*Dependent*) dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah puasa dan 2 jam *post prandial*.
3. Variabel ter kendalinya adalah :

- a. Jenis mencit
- b. Umur mencit
- c. Berat mencit
- d. Makanan mencit

3.2.3 Definisi Operasional

| No. | Variabel | Definisi Operasional | Alat ukur | satuan | Skala |
|-----|--|---|------------|--------|---------|
| 1. | Infusa belimbing wuluh | Dosis belimbing wuluh yang dilarutkan dalam pelarut air yang dipanaskan pada suhu 90° C selama 15 menit. ²⁴ | Gelas ukur | mL | Ordinal |
| 2. | Glukosa darah puasa | Glukosa darah adalah hasil metabolisme karbohidrat di dalam darah. Kadar glukosa darah puasa adalah kadar gula darah setelah mencit dipuasakan selama 18 jam dan diukur dengan metode enzimatik. Glukosa darah mencit normalnya 62-175 mg/dL. Mencit hiperglikemik apabila glukosa darahnya ≥ 176 mg/dL. ²⁵ | Glukotes | mg/dL | Rasio |
| | Glukosa darah 2 jam <i>post prandial</i> | Kadar glukosa darah 2 jam <i>post prandial</i> kadar gula darah setelah mencit dipuasakan selama 2 jam setelah makan. | Glukotes | mg/dL | Rasio |

3.2.4 Prosedur Penelitian

3.2.4.1 Perhitungan Dosis Infusa Belimbing Wuluh

Penentuan dosis infusa belimbing wuluh pada penelitian ini menggunakan dosis pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Masruhen yaitu 1,8 g/200 g BB, 3,6 g/200 g BB dan 5,4 g/200 g BB pada tikus.²⁶ Dosis tersebut kemudian di konversi ke dosis mencit dengan menggunakan tabel konversi perhitungan dosis Laurence-Bacharach sehingga didapatkan 3 dosis yaitu:

1. $1,8 \text{ g/200 g BB} \times 0,14 = 0,252 \text{ g/20 g BB}$
2. $3,6 \text{ g/200 g BB} \times 0,14 = 0,504 \text{ g/20 g BB}$
3. $5,4 \text{ g/200 g BB} \times 0,14 = 0,756 \text{ g/20 g BB}$

3.2.4.2 Infusa

Infusa merupakan proses pelarutan air pada temperature penanga air (bejana infusa tercelup dalam penangas air mendidih, temperature terukur 96-98 derajat celcius) selama 15-20 menit.²⁴

Proses persiapan infusa:

1. Campur belimbing wuluh dengan derajat halus yang sesuai dalam panci dengan air secukupnya
2. Panaskan di atas tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90° C sambil sekali-sekali diaduk-aduk.
3. Saring selagi panas melalui kain flannel
4. Tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus yang dikehendaki.
5. Masukkan kedalam gelas ukur.

3.2.4.3 Pengukuran Glukosa Darah

Glukosa darah diukur dengan metode enzimatik yang menggunakan kerja enzim glukosa oksidase atau heksokinase yang bereaksi pada glukosa. Cara enzimatik dilakukan dengan cara otomatis yaitu dengan penggunaan strip pada glukotes. Prinsip pemeriksaan pada metode ini, strip diletakkan pada alat, ketika darah diteteskan pada zona reaksi, katalisator glukosa akan mereduksi glukosa dalam darah. Intensitas dari elektron yang terbentuk dalam strip setara dengan konsentrasi glukosa dalam darah. Pengukuran glukosa darah diambil dari darah kapiler mencit.²⁷

3.2.4.4 Dosis Akarbosa

Dosis yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada dosis yang diberikan pada manusia yaitu 50 mg yang selanjutnya di konversi ke dosis mencit dengan menggunakan tabel konversi perhitungan dosis Laurence-Bacharach sehingga didapat dosis untuk mencit 0,13 mg/20 gr BB.

3.2.4.5 Alur Penelitian

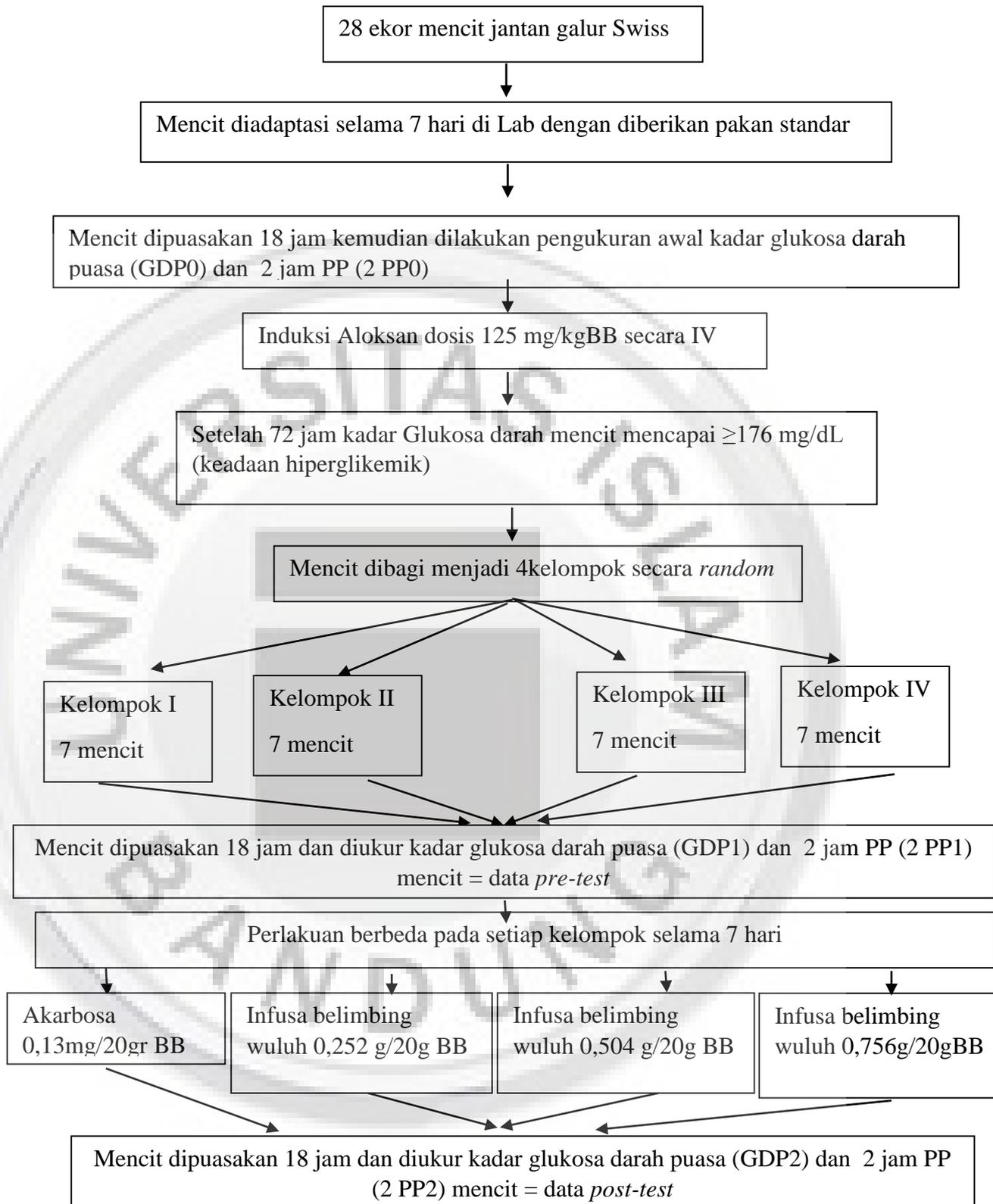
Subjek penelitian sebanyak 28 ekor mencit jantan galur Swiss ditempatkan dalam kandang masing-masing 7 ekor. Mencit diberikan obat penginduksi yaitu Aloksan. Perlakuan diberikan pada masing-masing kelompok sebagai berikut:

- Kelompok I : 7 ekor mencit diberikan akarbosa dengan dosis 0,13 mg sebagai kelompok kontrol ditambah pakan standar
- Kelompok II : 7 ekor mencit diberikan infusa belimbing wuluh dengan dosis 0,252 g/ 20 g BB ditambah pakan standar

- Kelompok III : 7 ekor mencit diberikan infusa belimbing wuluh dengan dosis 0,504 g/ 20 g BB ditambah pakan standar
- Kelompok IV : 7 ekor mencit diberikan infusa belimbing wuluh dengan dosis 0,756 g/ 20 g BB ditambah pakan standar

Sampel penelitian sebanyak 28 ekor mencit jantan galur Swiss di adaptasi selama 7 hari di laboratorium. Seluruh hewan coba dipuasakan 18 jam kemudian dilakukan pengukuran awal kadar glukosa darah puasa (GDP0) dan 2 jam *post prandial* (2 PP0). Setelah dilakukan pengukuran kadar gula darah awal, mencit diinduksi Aloksan dengan dosis 125 mg/kgBB secara intraperitoneal dan ditunggu sampai 72 jam (3hari) untuk menimbulkan efek hiperglikemik. Mencit yang sudah hiperglikemik dibagi menjadi 4 kelompok yang dipilih secara *random*. Setiap kelompok mencit dipuasakan 18 jam kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa (GDP1) dan 2 jam *post prandial* (2 PP1). Pengukuran ini merupakan pengukuran untuk mendapatkan data *pre-test*.

Masing-masing kelompok mencit kemudian diberikan perlakuan berbeda selama 7 hari. Setelah diberikan perlakuan selama 7 hari, setiap kelompok mencit dipuasakan 18 jam kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa (GDP2) dan 2 jam *post prandial* (2 PP2). Pengukuran tersebut untuk mendapatkan data *post-test*. Data yang sudah didapatkan kemudian ditabulasi dan dianalisis.



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung pada bulan April sampai Juni 2015.

3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian dan hewan percobaan yang digunakan pada penelitian akan mengalami penderitaan yaitu ketidaknyamanan, dan rasa nyeri. Etika penelitian kesehatan secara umum tercantum dalam *World Medical Association* yaitu : *respect* (menghormati hak dan martabat makhluk hidup, kebebasan memilih dan berkeinginan, serta bertanggung jawab terhadap dirinya, termasuk didalamnya hewan coba), *beneficiency* (bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain, manfaat yang didapatkan harus lebih besar dibandingkan dengan risiko yang diterima), dan *justice* (bersikap adil dalam memanfaatkan hewan percobaan).^{28, 29}

Dalam penelitian yang memanfaatkan hewan coba, juga diterapkan prinsip 3 R dalam protocol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.³⁰ *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian yaitu relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program computer). *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap

mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum bisa dihitung dengan menggunakan rumus Federer. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik dan tidak menyakiti.³⁰ Pada akhir penelitian dilakukan *euthanasia* atau membunuh pada hewan coba. *Euthanasia* merupakan tindakan dengan maksud mengurangi penderitaan hewan coba. *Euthanasia* pada mencit dilakukan dengan pemberian eter atau pentobarbital-Na pada dosis yang mematikan.³¹

Berdasarkan prinsip-prinsip tersebut, hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini mendapat perlakuan manusiawi, dipelihara dengan baik dan diusahakan agar disesuaikan pola kehidupannya seperti di alam.

3.2.7 Analisis Data

Semua data yang diperoleh dinilai terlebih dahulu normalitasnya dengan menggunakan Kolmogorov-smirnov dan pengujian homogenitas untuk mengetahui varians eror data bersifat homogen atau heterogen dengan menggunakan uji Levene. Selanjutnya uji Anava untuk mengetahui perbedaan kadar glukosa darah mencit antar kelompok. Uji lanjut Anava yaitu dengan Duncan untuk mengetahui dosis yang paling efektif. Data statistik diolah dengan menggunakan SPSS *for windows release 21.0*