

BAB III

OBJEK, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN

3.1. Objek dan Bahan Penelitian

3.1.1 Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini menggunakan hewan percobaan mencit. Mencit digunakan karena alasan keefektifan biaya serta multiparitas yang tinggi.⁴⁴ Selain itu, mencit dapat digunakan dalam penelitian senyawa antidiabetik karena memiliki karakteristik fisiologi glukosa mirip dengan manusia dan bagian dari hewan mamalia dengan derajat paling rendah.⁴⁴

Spesifikasi mencit yang digunakan berdasarkan pada penelitian sebelumnya, yakni mencit dewasa galur Swiss Webster yang berjenis kelamin jantan dengan berat badan dalam rentang 20–30 gram. Mencit jantan dipilih agar tidak ada pengaruh hormonal yang dimiliki mencit betina.^{24,42,44} Galur Swiss Webster dipilih dengan alasan ketersediaan dan memiliki dasar penggunaan pada penelitian Dewiyeti dan penelitian Gumelar^{47,48} Mencit dewasa adalah mencit yang berusia 2–3 bulan.⁴⁸ Mencit dewasa dipilih karena alasan induksi hiperglikemia pada mencit yang lebih muda akan terjadi *turnover* lebih cepat.^{24,44} Berat badan mencit dipilih sampai 30 gram karena rata-rata mencit dewasa memiliki berat badan tersebut.^{46,48}

Mencit didapatkan dari Laboratorium hewan Sekolah Ilmu Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Mencit melalui masa aklimatisasi selama satu minggu dengan diberi pakan standar (CP 551) dan minum akuades secara *ad libitum*.⁴⁸ Mencit yang mati selama aklimatisasi dikeluarkan dari penelitian.

Selanjutnya mencit diinduksi secara kimiawi untuk kondisi hiperglikemia dengan sebelumnya diukur terlebih dahulu glukosa darah puasa pre-induksi (GDP0). Induksi dilakukan dengan pemberian aloksan secara intraperitoneal dengan dosis disesuaikan dengan hasil pre-penelitian sebesar 200 mg/KgBB.²⁴ Setelah pemberian aloksan, kadar glukosa darah menit diperiksa. Mencit dengan kadar glukosa post-induksi (GDP1) tidak meningkat dari kadar glukosa sebelumnya dikeluarkan dari penelitian.⁴¹

Objek penelitian selanjutnya diberikan perlakuan. Perlakuan hewan coba secara rinci dipaparkan pada bagian prosedur. Seperti halnya pada tahapan sebelumnya, terdapat mencit yang mati selama masa perlakuan, maka mencit dikeluarkan dari penelitian. Disimpulkan bahwa kriteria eksklusi dari objek penelitian ini adalah mati selama masa adaptasi, kadar gula darah setelah induksi dengan aloksan tidak meningkat, dan mencit mati selama proses perlakuan.

3.1.2 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok dengan alokasi random. Jumlah mencit yang diberikan perlakuan menggunakan rumus *Frederer*.⁵³

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

Keterangan:

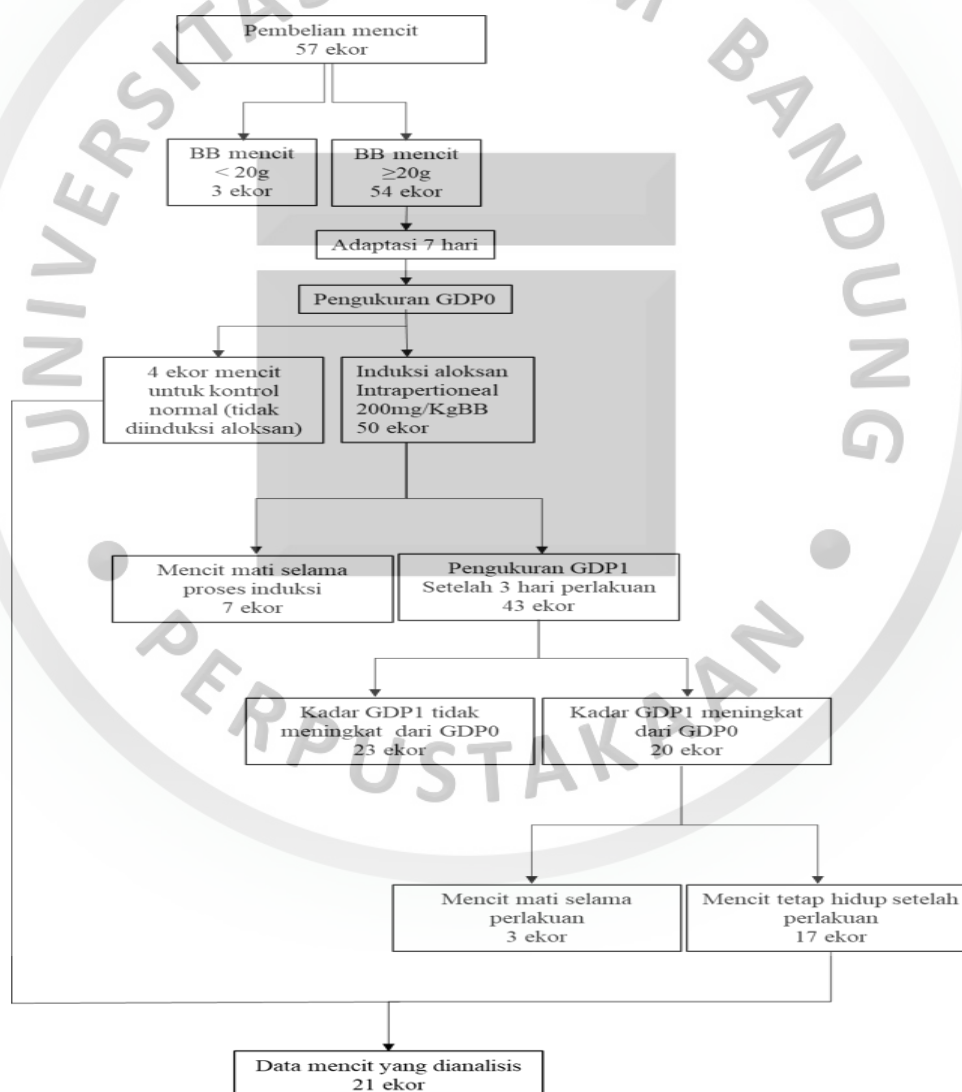
r (*replication*) : jumlah pengulangan

t (*treatment*) : jumlah pengelompokan (perlakuan)

Rumus *Frederer* digunakan pada penelitian ini untuk jumlah perlakuan sebanyak enam. Masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor mencit, sehingga

total mencit yang harus disiapkan sebanyak $r \times t = 3 \times 6 = 18$ ekor mencit. Jumlah ini ditambah 10% setiap kelompoknya untukantisipasi mencit *dropout* atau masuk dalam kriteria eksklusi. Jumlah keseluruhan adalah 24 ekor.

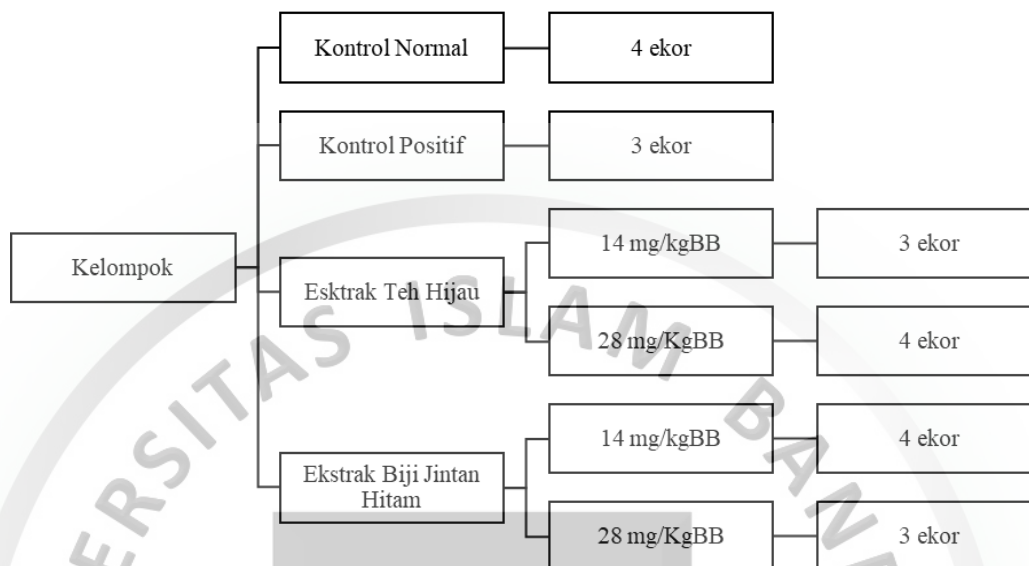
Penelitian dilakukan dengan menggunakan 57 ekor mencit, dilakukan sebagai antisipasi *dropout* berdasarkan hasil pre-penelitian yang menunjukkan ketidakstabilan induksi. Dari total objek penelitian ini, terdapat 21 ekor yang datanya diteruskan untuk dilakukan analisa



Gambar 3.1 Bagan Alur Perlakuan Objek Penelitian

Keterangan: BB = berat badan, GDP0 = kadar glukosa darah puasa pre-induksi aloksan, GDP1= kadar glukosa darah puasa post-induksi aloksan (3 hari)

Penelitian ini menganalisis 21 data glukosa darah puasa yang didapatkan dari enam kelompok perlakuan (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Rincian Jumlah Mencit per Kelompok

Jumlah mencit per kelompok antara tiga sampai empat ekor.

Jumlah ini merupakan jumlah akhir dari mencit yang masih hidup sampai akhir perlakuan. Jumlah ini masih sesuai dengan sampel minimal, yakni 18 ekor mencit tanpa 10% alokasi mencit *dropout*. Pengurangan jumlah mencit signifikan berkurang pada saat induksi. Tujuh ekor mencit mati setelah induksi dari total 50 ekor mencit dan 23 ekor mencit yang hidup namun GDP1 tidak meningkat.

3.1.3 Alat dan Bahan Penelitian

A. Alat Penelitian

1. Kandang berkapasitas 3–5 ekor
2. Alat timbang
3. Tempat makan
4. Botol minum

5. Alat-alat pembuatan ekstrak daun teh hijau
6. Alat-alat pembuatan ekstrak biji jintan hitam
7. Glukometer *On Call Plus*
8. *Gavage oral*
9. *Spuit* 1ml

B. Bahan Penelitian

1. Ekstrak daun teh hijau
2. Ekstrak biji jintan hitam
3. Diet standar (CP 551)
4. Akuades
5. Serbuk kayu
6. Aloksan
7. Strip glukosa *On Call Plus*
8. Botol penyimpanan
9. Jarum *spuit*
10. *Alcohol swab*
11. *Handgloves*
12. *Blood lancet*

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni secara *in vivo* karena memberikan intervensi kepada hewan coba.⁵⁴ Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan eksperimental ulang (*pretest–posttest control group design*), yaitu melakukan observasi sebelum dan sesudah

perlakuan.⁵⁵ Pengelompokan hewan coba melalui rancangan acak kelompok (*complete randomized blocked design*). Pengelompokan ini digunakan karena terdapat sub kelompok pada kelompok perlakuan ekstrak daun teh hijau dan ekstrak biji jintan hitam.

3.2.2 Variabel dan Definisi Operasional

A. Variabel

Variabel yang terdapat pada penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yakni variabel bebas, variabel terikat, dan variabel perancu.

i. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dua macam ekstrak yang diberikan untuk perlakuan. Masing-masing ekstrak akan dibedakan menjadi dua kadar disesuaikan dengan penelitian terdahulu. ekstrak daun teh hijau akan diberikan dalam kadar 14 mg/KgBB/hari dan 28 mg/kgBB/hari. Angka ini berasal dari penelitian Olayinka yang ditambahkan satu dosis kelipatan.⁴⁹ Di sisi lain, ekstrak biji jintan hitam akan diberikan dalam kadar sama, menyesuaikan kadar daun teh hijau. Kedua ekstrak dibuat dengan menggunakan air dengan pertimbangan penarikan senyawa yang dilakukan adalah untuk senyawa polar.^{35,41} Selain itu pemilihan air dilakukan agar pada implementasi ke manusia, ekstrak dapat digunakan secara langsung.

ii. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar gula darah mencit yang diukur menggunakan *Point of Care Testing* (POCT). POCT berupa glukometer yang digunakan terdapat enzim glukosa oksidase

didalamnya sebagai biosensor.⁵⁶ Pengukuran kadar glukosa darah dalam satuan mg/dL. Kadar glukosa diukur dalam keadaan mencit dipuaskan selama 12 jam. Puasa yang dilakukan merupakan puasa pagi hingga sore hari (05.00–17.00). Hal ini dilakukan karena kadar glukosa darah puasa lebih stabil diukur pada hewan coba setelah puasa pagi hingga sore hari dibandingkan puasa malam hari.⁵⁷

iii. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah mencit (jenis kelamin, galur, umur, dan berat badan), kandang mencit (temperatur, ventilasi, dan pencahayaan), serta asupan mencit (pakan standar dan akuades). Jenis kelamin mencit yang digunakan adalah jantan bergalur *Swiss-Webster*. Berat mencit berkisar 20-30 gram yang sudah dewasa. Kandang mencit di atur sesuai dengan pedoman etik berkapasitas 3-5 ekor. Serbuk kayu yang disimpan di dasar kandang. Ventilasi kandang cukup besar agar cahaya dapat masuk. Siklus terang gelap diberikan karena penyesuaian dengan kondisi habitat. Pemberian makan dengan pakan standar dan akuades secara *ad libitum*.

B. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak Daun Teh Hijau	Ekstrak air daun teh hijau yang diberikan pada mencit dengan dua variasi kadar	Alat Timbang	14 mg/KgBB, 28 mg/KgBB.	Numerik Diskrit
Ekstrak Biji Jintan Hitam	Ekstrak air biji jintan hitam yang diberikan pada mencit dengan tiga variasi kadar konsentrasi	Alat Timbang	14 mg/KgBB, 28 mg/KgBB.	Numerik Diskrit
Kadar Glukosa Darah	Glukosa darah puasa (GDP) dengan 12 jam mencit dipuasakan diukur dengan metode POCT	Glukometer <i>On Call Plus</i>	mg/dL	Numerik Kontinu

3.2.3 Prosedur Penelitian

A. Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, Jatingangor. Prosedur pembuatan ekstrak disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan Olayinka dengan modifikasi⁴⁹. Determinasi tanaman dilakukan di Sekolah Ilmu Teknik Hayati Institut Teknologi Bandung dengan nomor surat 2380/11.CO2.2/PL/2019 menerangkan bahwa sampel secara makroskopis sesuai dengan karakteristik *Camellia Sinensis L* (Kuntze). Daun teh hijau didapatkan dari petani rakyat Wanayasa, Purwakarta, salah satu pemasok Kebun Percobaan Manoko Lembang. Pengambilan daun teh dari wilayah tersebut dikarenakan daun teh yang didapatkan tumbuh di dataran tinggi Jawa Barat, daerah penghasil daun teh tertinggi di Indonesia.¹² Daun teh inilah yang di ekspor dan sebagian besar memenuhi kebutuhan nasional.¹² Daun teh hijau didapatkan

dalam bentuk simplisia atau daun kering. Prosedur pembuatan ekstrak daun teh hijau menggunakan air sebagai berikut.

1. *Camellia sinensis* ditimbang (7,5 kg) dan direndam dalam air sulingan.
2. Ekstrak dilakukan dengan cara maserasi pada suhu 28 °C selama 72 jam.
3. Supernatan terkonsentrasi di bawah suhu 40 °C menggunakan *rotary evaporator* sampai bentuk pasta
4. Ekstrak disimpan pada suhu 4 °C dalam bentuk pasta basah sampai sebelum digunakan.

Ekstrak didapatkan sebanyak 1,6 kg, sehingga total rendemen sebesar 21,33%

B. Penetapan Kadar Ekstrak Daun Teh Hijau

Kadar ekstrak daun teh hijau didasarkan pada penelitian Al-Hilfy.³⁵ Kadar yang diberikan pada penelitian Al Hilfy berlaku untuk hewan coba tikus. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyesuaian kadar menggunakan tabel *Paget dan Barne* (Lampiran 1). Kadar ekstrak air daun teh hijau yang diberikan pada mencit sebesar $200 \text{ mg/KgBB} \times 0,14 = 28 \text{ mg/KgBB}$. Peneliti kemudian menentukan konsentrasi lainnya yakni 14 mg/KgBB (1/2n) dan 56 mg/KgBB (2n). Pra penelitian dilakukan untuk ketiga dosis ini, menunjukkan bahwa untuk kadar 2n tidak dilanjutkan karena seluruh mencit uji coba mati setelah perlakuan/

C. Pembuatan Ekstrak Biji Jintan Hitam

Proses pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, Jatinangor. Biji jintan hitam diidentifikasi terlebih dahulu di Institut Pertanian Bogor. Prosedur pembuatan ekstrak disesuaikan dengan penelitian Bensiamer-Touati dengan dimodifikasi.⁴¹ Biji jintan hitam didapatkan dari Solo

melalui toko obat PD Berkat Baru. Pengambilan dari wilayah ini didasari pada penelitian sebelumnya bahwa pertumbuhan biji jintan hitam asli Indonesia terdapat di Yogyakarta dan sekitarnya.⁵⁸ Simplisia dikirimkan biji jintan hitamnya saja untuk proses ekstraksi. Determinasi dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor. Prosedur pembuatan ekstrak air biji jintan hitam sebagai berikut,

1. Tumbuk biji jintan hitam sampai berbentuk bubuk.
2. Timbang bubuk biji jintan hitam sebanyak 3 kg.
3. Campurkan dengan 500 ml air untuk setiap 150 gram biji jintan hitam (3:1) dan biarkan selama 12 jam dalam pengaduk dengan suhu 95°C.
4. Evaporasi dilakukan untuk menguapkan pelarut sampai didapatkan pasta kental.
5. Pindahkan pada tempat penyimpanan dan dibiarkan dalam suhu 4 °C sebelum digunakan.

Hasil ekstraksi didapatkan 422 gram ekstrak biji jintan hitam. Rendemen ekstrak sebesar 14,06%.

D. Penetapan Kadar Ekstrak Biji Jintan Hitam

Kadar ekstrak biji jintan hitam pada penelitian ini disesuaikan dengan kadar ekstrak daun teh hijau.

E. Penetapan Dosis *Metformin*

Obat antihiperqlikemik oral yang menjadi pembanding ekstrak adalah memiliki mekanisme yang akan dilihat adalah *metformin*. *Metformin* bekerja untuk menghambat meningkatkan penggunaan glukosa di enterosit, mencegah

glukoneogenesis dan lipogenesis.. Dosis pada manusia diberikan sebanyak tiga kali dalam sehari dengan dosis harian 500–3000 mg.⁴ Peneliti mengambil dosis harian terendah 500 mg dan dikonversi dengan tabel *Paget* dan *Barne* (Lampiran 1). Hasilnya, didapatkan dosis *metformin* yang diberikan 1,3 mg/KgBB.

F. Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini diawali dengan pemberian adaptasi pada hewan coba selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar dan akuades. Selama proses itu, berat badan mencit dipantau setiap hari agar tidak ada *dropout*. Setelah tujuh hari, mencit dipuaskan selama 12 jam baru kemudian diinjeksikan aloksan sebanyak 200 mg/KgBB (berdasarkan pre-penelitian) dengan dosis tunggal secara intraperitoneal.²⁴ Selanjutnya, dilakukan observasi selama 72 jam kemudian darah diambil untuk pengukuran glukosa darah puasa (mencit dipuaskan 12 jam).⁴⁵ Mencit yang dilanjutkan sebagai objek penelitian apabila glukosa darah meningkat dari perhitungan sebelumnya.

Objek penelitian dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari,

1. Kelompok kontrol normal, diberikan pakan CP 551 dan akuades (**Kontrol Normal**)
2. Kelompok kontrol positif, induksi aloksan dan diberikan pakan CP 551, akuades, dan metformin 500 mg sebanyak 1,3 mg/KgBB (**Kontrol Positif**)
3. Kelompok perlakuan Ia, diberikan CP 551, akuades, dan ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 14 mg/KgBB/hari (**Ekstrak Teh Hijau 14 mg/KgBB**)

4. Kelompok perlakuan IIa, diberikan CP 551, akuades, dan ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 28 mg/KgBB/hari (**Ekstrak Teh Hijau 28 mg/KgBB**)
5. Kelompok perlakuan Ib, induksi aloksan diberikan CP 551, akuades, dan ekstrak biji jintan hitam dengan konsentrasi 14 mg/KgBB/hari (**Ekstrak Jintan Hitam 14 mg/KgBB**)
6. Kelompok perlakuan IIb, diberikan CP 551, akuades, dan ekstrak biji jintan hitam dengan konsentrasi 28 mg/KgBB/hari (**Ekstrak Jintan Hitam 28 mg/KgBB**)

G. Pengambilan Darah Mencit

Pengambilan darah mencit dilakukan untuk mengukur kadar glukosa darah. Pengambilan dilakukan tiga hari setelah pemberian aloksan (GDP0) serta pada hari ke-7 dan 14 setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak biji jintan hitam dan ekstrak daun teh hijau (hari ke-10 dan ke-17 setelah pemberian aloksan), yakni GDP1 dan GDP2.

Pengambilan darah dilakukan oleh peneliti dan tenaga ahli dalam bidang penelitian hewan. Pengambilan dilakukan dengan mengambil sampel darah dari vena lateral ekor mencit dengan menggunting bagian ujung ekor yang telah dibersihkan dengan kapas alkohol terlebih dahulu. Darah kemudian dimasukkan ke strip glukosa sebanyak 1 μ L, dimasukkan ke dalam glukometer dan ditunggu selama 10 detik sampai hasil kadar glukosa darah ditampilkan di layar glukometer.⁵⁹ Data kadar glukosa darah dicatat berdasarkan kelompok mencit dan berdasarkan waktu pengambilan. Pengambilan data dilakukan setelah perlakuan

yang dilaksanakan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung pada bulan September sampai Oktober tahun 2019

H. Pengukuran Kadar Glukosa darah

Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan alat *Poin of Care Testing* (POCT) merek ACON Laboratoris, yaitu *On Call Plus* yang sudah memenuhi kriteria ISO 2003 sebesar 96%.⁶⁰ Alat ini menggunakan enzim glukosa oksidase, merupakan biosensor standar yang digunakan dalam glukometer.⁶⁰⁻⁶²

Alat ini memiliki beberapa tahap dalam memastikan *quality control* pengukuran glukosa. Hal ini adalah kalibrasi strip glukosa ke glukometer dengan kode strip dan pengecekan pengukuran glukometer menggunakan cairan khusus.⁶³ Kalibrasi strip glukosa dilakukan dengan cara mengecek kode strip yang tertera pada bungkus strip dan *chip* kode. Dalam penelitian ini digunakan strip glukosa dengan kode 084. Selain itu, larutan control juga digunakan untuk memastikan pengukuran glukosa dengan glukometer sudah sesuai. Larutan control berisi konsentrasi yang diketahui dari glukosa. Cairan ini digunakan untuk mengonfirmasi bahwa glukometer dan strip secara gabungan berjalan benar serta perlakuan pengukuran benar. Penggunaan cairan control sebagai berikut

1. Masukkan strip glukosa di *strip port* pada glukomete, nyalakan glukometer sampai terdengar bunyi *bip* dan layar menyala
2. Kocok larutan control dalam botol dan buka tutup botol, teteskan larutan ke strip glukosa kurang lebih 1 μ l
3. Jika larutan sudah cukup, layar glukometer menampilkan hitungan mundur dari 10 sampai 1
4. Hasil pengukuran larutan kontrol ditampilkan di layar dan

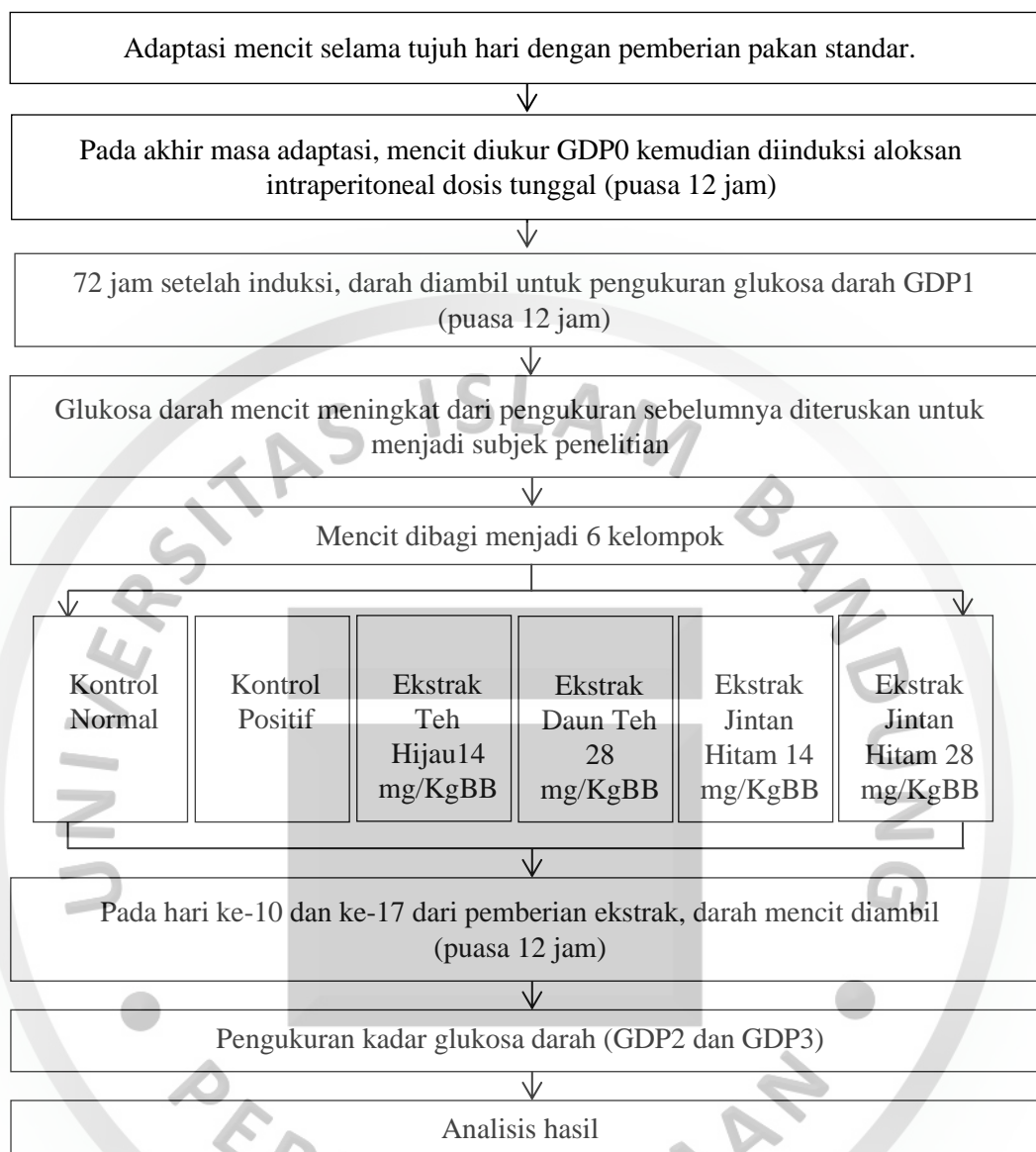
menunjukkan nilai antara *range* control yang tercantum pada bungkus strip

5. *Range* control berada diantara 81–121 mg/dL/ Untuk alat yang didistribusikan di Indonesia, tampilan hasil larutan kontrol sebesar 121 mg/dL.

Pengecekan kontrol dilakukan sebanyak empat kali sebelum pengukuran glukosa, yakni pada GDP0, GDP1, GDP2, dan GDP3.



I. Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema Alur Penelitian

3.2.4 Analisis Data

Analisa data pada penelitian ini digunakan analisa bivariat. Analisa bivariat digunakan untuk membandingkan kadar glukosa darah sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok serta antar kelompok di konsentrasi yang sama. Selain itu, analisa ini digunakan untuk membandingkan kadar glukosa darah antar kelompok perlakuan.

Seluruh data yang didapatkan dilakukan uji normalitas terlebih dahulu. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk* untuk data dengan jumlah kurang dari 50 di setiap kelompok.^{64,65} Jika hasil nilai $p \geq 0,05$, disimpulkan data berdistribusi normal.⁶⁵ Akan tetapi, jika hasil nilai $p < 0,05$, maka kesimpulan data berdistribusi tidak normal.⁶⁵ Data juga dilakukan uji homogenitas dengan Levene's test.⁶⁴

Pengukuran perbandingan kadar glukosa darah sebelum dan sesudah perlakuan dilakukan dengan uji t dependen atau uji *Wilcoxon*.^{64,65} Uji t dependen dipilih apabila distribusi data normal, sedangkan uji *Wilcoxon* dipilih jika data tidak berdistribusi normal.^{64,65} Perbandingan kadar glukosa darah antar kelompok perlakuan dilakukan dengan membandingkan selisih perubahan kadar glukosa. Uji *One-way ANOVA* digunakan jika data berdistribusi normal dan data homogen.^{64,65} Uji *ANOVA Robust* menjadi alternatif apabila data berdistribusi normal namun tidak homogen.^{64,65} Pilihan terakhir adalah uji *Kruskall Wallis* jika data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen.^{64,65} Hasil dari uji antar kelompok apabila bermakna ($p < 0,05$) akan dilanjutkan dengan Uji Post-Hoc *Least Significant Difference* (LSD) untuk distribusi normal atau Uji *Mann-whitney* untuk distribusi tidak normal.^{64,65} Seluruh analisa dilakukan dengan interval kepercayaan sebesar 95%. Analisa menggunakan aplikasi *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 24.

3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilangsungkan di Lab Sentral Universitas Padjadjaran, Jatinangor untuk pembuatan ekstrak daun teh hijau serta ekstrak biji jintan hitam

dan Lab Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung untuk perlakuan hewan coba. Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2019 – Januari 2020.

3.2.6 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini dapat menimbulkan dampak negatif pada objek penelitian, yakni mencit sebagai hewan coba. Oleh sebab itu, prinsip etik pemanfaatan hewan harus terpenuhi agar mengurangi ketidaknyamanan yang akan. Prinsip tersebut terdiri dari 3R yaitu *reduction* (pengurangan), *replacement* (penggantian), dan *refinement* (penghalusan) sesuai dengan pedoman.⁶⁶

Prinsip pengurangan (*reducing*) pada penelitian ini dengan memperhatikan jumlah hewan coba yang digunakan. Jumlah hewan coba yang digunakan harus dihitung sedemikian rupa sehingga hanya menggunakan hewan coba dalam jumlah sedikit. Pada penelitian ini digunakan rumus Frederer untuk menghitung jumlah hewan coba yang digunakan dalam setiap perlakuan hanya sebanyak 3-4 hewan coba. Sehingga, dengan terdapat enam kelompok perlakuan digunakan 18 hewan coba, ditambah enam hewan sebagai 10% dari total keseluruhan hewan yang digunakan untuk antisipasi hewan yang *dropout* ditengah-tengah penelitian.

Prinsip penggantian (*replacement*) dilakukan untuk penggantian penggunaan hewan coba. Penggunaan hewan coba diganti dengan teknik *in vitro* (biakan sel atau jaringan) atau simulasi komputer. Namun apabila tidak dapat dilakukan penggantian tanpa hewan coba dikarenakan hasil yang akan berbeda, maka hewan coba yang digunakan harus hewan dengan derajat paling rendah. Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit. Mencit merupakan

hewan pengerat dengan derajat lebih rendah dibandingkan tikus juga hewan coba lainnya (kera, anjing, babi, dll.)

Prinsip penghalusan (*refinement*) dilakukan terkait dengan perlakuan pada hewan coba. Perlakuan pada hewan coba harus sedemikian rupa agar memenuhi azas kesejahteraan hewan (*animal welfare*). Azas kesejahteraan hewan harus mencakup bebas dari lapar, haus, nyeri, stres, rasa tidak aman, luka, penyakit, serta memiliki kebebasan berperilaku normal.

Mencit akan rutin diberikan makan berupa pakan standar dan minuman akuades pada tempat yang telah disediakan di dalam kandang. Selain itu, makanan diberikan di atas tutup kandang agar mirip dengan kondisi alamiah mencit mencari makanan. Rasa nyeri akan diminimalisir selama perlakuan terhadap objek. Nyeri ini diminimalisir di berbagai tahapan proses penelitian. Tahap pertama adalah pada pemberian injeksi aloksan secara intraperitoneal. Selain itu minimalisir rasa nyeri juga dilakukan ketika pemberian ekstrak dengan cara *handling* yang sesuai dan diberikan dengan *gavage oral*. Tahapan terakhir dalam minimalisir rasa nyeri adalah saat pengambilan darah mencit untuk pemeriksaan glukosa dengan cara rute vena lateral ekor mencit.

Stres yang dialami mencit akan dikurangi dengan cara memberikan ruang yang cukup dalam kandang, yakni hanya terdiri 5 ekor mencit per kandang. Selain itu dilakukan pula aklimatisasi selama 7 hari untuk membiasakan mencit di lingkungan baru. Terakhir, stres dikurangi dengan pemberian dosis aloksan yang sudah dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan dosis yang tepat dengan prinsip dosis terkecil namun tetap efektif.

Objek penelitian memiliki kemungkinan mengalami luka dalam penelitian. Sehingga untuk meminimalisir luka tersebut, *handling* mencit dilakukan oleh tenaga ahli. Selain itu untuk membebaskan objek dari penyakit dengan cara melakukan prosedur septik-aseptik dan menggunakan alat dan bahan yang tidak terkontaminasi antara satu mencit ke mencit lainnya. Hal yang dilakukan adalah 1)membersihkan area injeksi aloksan dengan *alcohol swab*, 2)mengganti jarum suntik yang digunakan untuk injeksi aloksan setiap kali sudah digunakan, 3)membersihkan area ekor mencit untuk pengambilan darah, 4)peneliti menggunakan masker dan *handgloves* sebagai alat pelindung diri dan mencegah adanya penularan, 5)kandang dibersihkan setiap tiga hari sekali, 6)serbuk kayu diganti setiap tiga hari sekali.

Perilaku normal hewan dijaga dengan cara memberikan ruang yang cukup dalam kandang. Kandang hanya berisi 5 mencit dengan ukuran minimal kandang terpenuhi. Selain itu, mencit dikondisikan untuk diberikan cahaya dalam siklus 12 jam agar menyesuaikan siklus harian.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (*ethical approval*) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung pada sidang usulan penelitian pada tanggal 19 Februari 2019 dengan nomor 092/Komite Etik.FK/IV/2019.