

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental (*Eksperimental Research*). Menurut Narbuko dan Achmadi, (2004), penelitian eksperimental dilakukan dengan tujuan untuk mencari pengaruh antara variabel yang satu dengan variabel yang lainnya. Hal itu dilakukan agar dapat mengetahui hubungan sebab akibat dari bahan-bahan yang digunakan dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan. Dengan rancangan penelitian *Post Test Only Randomized Control Group Design*, peneliti hanya akan melakukan tes setelah sampel diberi intervensi.

#### **3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang pada bulan September-Januari tahun 2023.

#### **3.3 Subyek Penelitian**

##### 3.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar*.

##### 3.3.2. Sampel

30 ekor tikus galur *Wistar*.

##### 3.3.3. Teknik Sampling dan Besaran Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik sampling dengan simple random sampling. Pengambilan sampel dengan simple random sampling adalah dengan melakukan randomisasi sampel yang memenuhi kriteria inklusi lalu dimasukkan ke beberapa kelompok. Pada eksperimen ini, peneliti membagi

menjadi 6 kelompok yaitu :

- Kelompok *baseline*
- Kontrol negatif
- Kontrol positif
- Perlakuan 1 (Umbi bit 100mg/kgBB/hari)
- Perlakuan 2 (Umbi bit 200mg/kgBB/hari)
- Perlakuan 3 (Umbi bit 300mg/kgBB/hari)

Pada penelitian ini pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan rumus *Federer*, yaitu:

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

Dengan;

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah replikasi

Sampel yang dibutuhkan di penelitian ini :

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

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak empat ekor. Apabila ada kemungkinan terjadi *drop out* yang besarnya 10% maka besar sampel dengan koreksi *drop out* adalah:

$$n_{do} = \frac{n}{1 - do} = \frac{4}{1 - 0,1} = 4,44 \approx 5$$

Dengan:

$n$  : Jumlah sampel tiap kelompok

$do$  : Perkiraan proporsi drop out (10%)

Berdasarkan perhitungan di atas besar sampel yang dibutuhkan untuk sampel penelitian ini adalah lima ekor tikus untuk setiap kelompok. Sehingga besar sampel total untuk enam kelompok adalah 30 ekor tikus.<sup>60</sup>

#### 3.3.4. Karakteristik sampel penelitian

##### a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus dalam keadaan sehat
- 2) Tikus tidak memiliki kelainan anatomis
- 3) Berat badan tikus 200-250 gram
- 4) Tikus berumur 2-4 bulan

##### b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus tampak sakit sebelum diberikan perlakuan dengan tanda lemas, tidak mau makan, rambut rontok
- 2) Tikus berperilaku tidak normal atau stress sebelum penelitian
- 3) Serum lisis
- 4) Kadar gula darah tikus setelah di induksi aloksan  $> 200$  mg/dl

##### c. Kriteria drop out

Tikus mati saat proses penelitian atau pemberian perlakuan, drop out sampel tidak boleh lebih dari 10% dari keseluruhan.

#### 3.3.5. Variabel Penelitian

##### a. Variabel Bebas

Ekstrak umbi bit dalam berbagai dosis

##### b. Variabel Terikat

Kadar SGPT dan SGOT

### 3.3.6. Definisi Operasional

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak Umbi Bit	Dalam penelitian ini ekstrak umbi bit dibuat dengan metode remaserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak diberikan selama 14 hari secara sonde peroral pada kelompok : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Perlakuan 1 = 100mg/kgBB</li> <li>- Perlakuan 2 = 200mg/kg BB</li> <li>- Perlakuan 3 = 300mg/kgBB</li> </ul>	Timbangan tikus, mikropipet	Dosis umbi bit sesuai dengan perlakuan 1, 2, 3 dan dosis sesuai dengan berat badan tikus.	Nominal
2	Kadar SGPT/ALT	Kadar enzim SGPT yang diambil dari darah vena mata tikus atau sinus orbitalis sebanyak 3 ml dengan pipa kapiler. Spesimen darah disentrifuse untuk mendapatkan serum, lalu spesimen diperiksa dengan spektrofotometri.	Spektrofotometri	Kadar normal = 10-40 U/L. <sup>61</sup>	Rasio
3	Kadar SGOT/AST	Kadar enzim SGOT yang diambil dari darah vena mata tikus atau sinus orbitalis sebanyak 3 ml dengan pipa kapiler. Spesimen darah disentrifuse untuk mendapatkan serum, lalu spesimen diperiksa dengan spektrofotometri.	Spektrofotometri	Kadar normal =50-150 U/L. <sup>61</sup>	Rasio

## 3.4 Instrumen Penelitian

### 3.4.1. Alat Penelitian

- a. Pemeliharaan tikus
  - Timbangan untuk mengukur berat badan tikus
  - Enam kandang tikus dengan tiap kandang berisi empat ekor tikus

- Penutup kandang
- Tempat makan dan minum tikus
- b. Pembuatan ekstrak umbi bit
  - Umbi bit
  - Timbangan
  - Alat maserasi
  - Oven
  - Pelarut etanol 96%
  - Rotatory evaporator
  - Corong
  - Kertas saring
  - Water bath
- c. Pengukuran SGOT dan SGPT
  - Sarung tangan
  - Pipa kapiler (Untuk mengambil darah tikus)
  - Ependroff yang berisi heparin
  - Pipet ukur
  - Mikro pipet
  - Tabung reaksi
  - Rak tabung
  - Mesin sentrifugasi
  - Inkubator
  - Spektrofotometri
  - Stopwatch
- d. Pemberian perlakuan
  - Sarung tangan
  - Sonde
  - Sput

#### 3.4.2. Bahan Penelitian

- a. Perawatan tikus
  - Pakan standar
  - Aquades
- b. Penelitian
  - Serum sampel

- Aloksan
- Ekstrak umbi bit
- Reagen SGPT
- Reagen SGOT

### 3.5 Prosuder Pengambilan data

#### 3.5.1 Pembuatan Ekstrak Umbi Bit <sup>62</sup>

Pembuatan ekstrak umbi bit dilakukan dengan metode maserasi. Umbi bit dikeringkan menggunakan oven atau bisa juga menggunakan matahari, kemudian umbi bit yang kering diblender dan menjadi ekstrak kering berupa serbuk yang disebut simplisia. Serbuk dimasukkan kedalam alat maserasi lalu diberi pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Diamkan selama 3-7 hari dalam keadaan gelap bisa dengan ditutupi alumunium foil, suhu ruang, aduk ekstrak setiap 6 jam sekali. Setelah didiamkan selama 3-7 hari, saring ekstrak menggunakan corong dan kertas saring. Filtrat di uapkan menggunakan alat rotatory evaporator dengan suhu 40 °C. Setelah itu letakkan pada lumpang dan diuapkan di waterbath jadilah ekstrak kental umbi bit.

Ekstrak kental ditimbang untuk menghitung rendemen. Rendemen yang bagus > 10%. Misal dengan 100 gram serbuk simplisia akan didapatkan minimal 10 gram ekstrak kental.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Ekstrak kental (gram)}}{\text{Serbuk simplisia (gram)}} \times 100\%$$

#### 3.5.2 Induksi Aloksan <sup>63</sup>

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai model diabetes mellitus dengan cara melakukan induksi aloksan monohidrat dengan diinjeksi intraperitoneal yang menyebabkan kondisi hiperglikemi pada tikus. Aloksan akan mendestruksi sel beta pankreas

dengan radikal bebas. Dosis aloksan yang diperlukan untuk menginduksi diabetes tergantung pada hewan percobaan dan spesiesnya, rute pemberian dan status gizi. Dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 90 mg/kgBB secara intraperitoneal. Hewan coba dibiarkan selama 3 hari setelah diinjeksi aloksan. Lakukan pemeriksaan gula darah pada hewan coba dengan metode *Point of Care Testing* (POCT) setelah 3 hari untuk melihat apakah induksi DM pada hewan coba berhasil dengan hasil gula darah lebih dari 200mg/dl.

### 3.5.3 Perlakuan Pada Tikus

Tikus diaklimatisasi selama 7 hari dan diberi pakan standard. Kemudian pada hari ke 8, tikus dipuasakan selama 60 menit sebelum penelitian dan dibagi dalam 6 kelompok yaitu :

- a. Kelompok I (Baseline) : Diberi pakan diet normal dan aquadest
- b. Kelompok II (Kontrol Negatif) : Induksi aloksan
- c. Kelompok III (Kontrol Positif) : Induksi aloksan + glibenklamid 0,18 mg/KBB/hari
- d. Kelompok IV (Perlakuan I) : Induksi aloksan + ekstrak umbi bit 100 mg/KgBB/hari
- e. Kelompok V (Perlakuan II) : Induksi aloksan + ekstrak umbi bit 200 mg/kgBB/hari
- f. Kelompok VI (Perlakuan III) : Induksi aloksan + ekstrak umbi bit 300 mg/kgBB/hari

Perlakuan diberikan selama 14 hari, pada hari ke-15 seluruh kelompok diambil darahnya untuk pemeriksaan SGPT dan SGOT.

### 3.5.4 Tahap Pengukuran SGPT dan SGOT dengan metode spektrofotometri<sub>64,65</sub>

Darah diambil melalui mata tikus tepatnya di sinus orbitalis dengan menggunakan pipa kapiler. Darah yang keluar dari pipa kapiler ditampung dengan tabung *ependroff* yang berisi heparin kurang lebih 3 ml. Untuk mendapatkan serum darah, dilakukan sentrifuge 5-15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Lalu plasma sampel dipisahkan dengan pipet.

Penetapan kadar SGPT/SGOT dilakukan dengan Langkah berikut :

- a. 200  $\mu$ l plasma sampel + 1000  $\mu$ l monoreagen
- b. Inkubasi pada suhu 25<sup>0</sup> C selama 1 menit lalu dibaca dengan spektrofotometer pada gelombang 344 nm sebagai absorbansi ke-1 (A1), lakukan dua kali lagi untuk mengetahui A2 dan A3
- c. Jangan lupa menggunakan aquadest sebagai blanko atau titik nol sebelum pembacaan absorbansi
- d. Absorbansinya yang dapat digunakan untuk mengukur kadar aktivitas enzim SGPT dan SGOT

$$(U/I) = \Delta A/\text{min} \times F (25^{\circ}\text{C})$$

Ket :

$$\Delta A/\text{min} = \text{Perubahan kadar absorbansi rata-rata/menit}$$

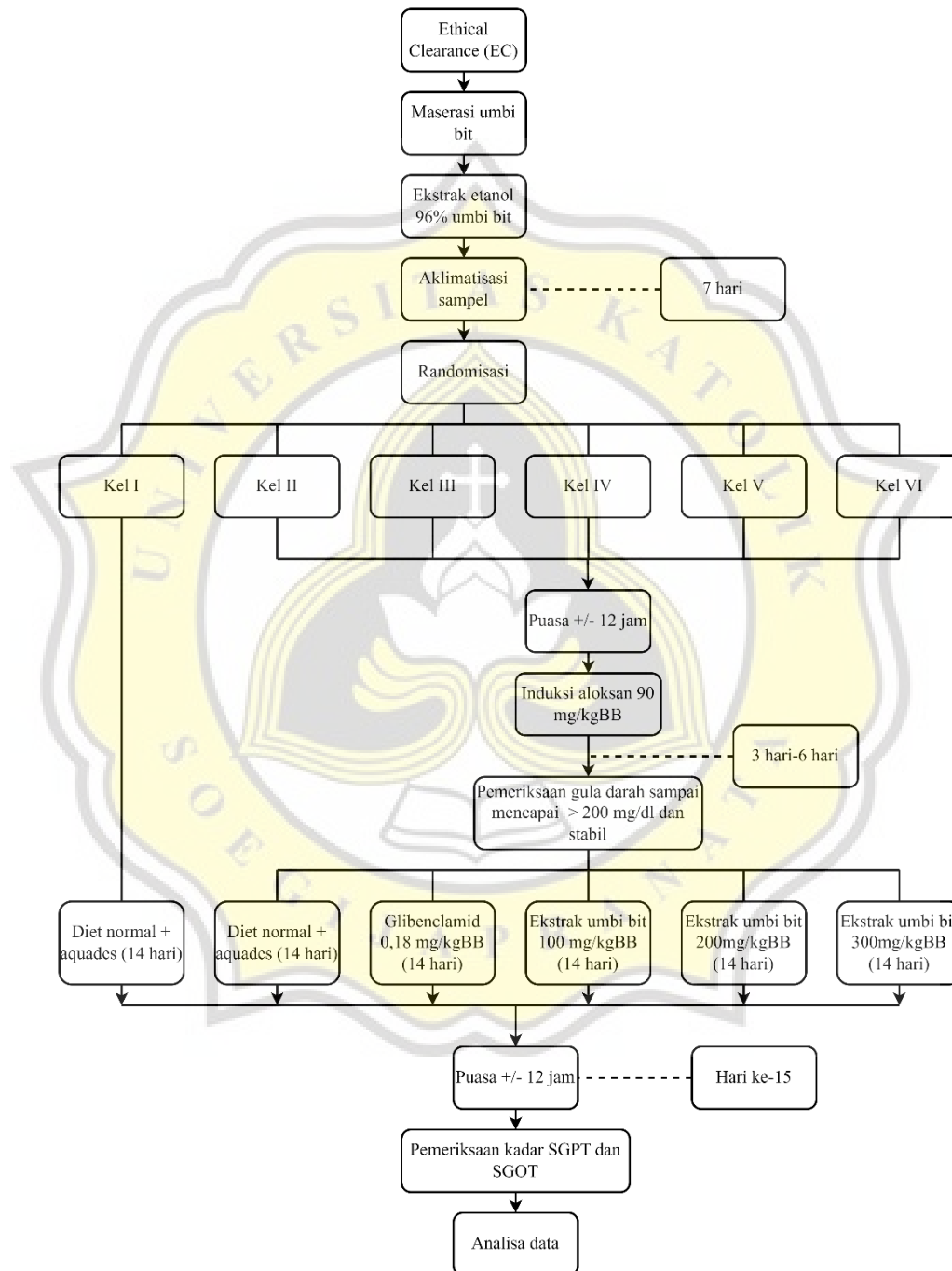
$$= \frac{(A1 - A2) + (A2 - A3)}{2}$$

$$F = \text{Faktor (971)}$$



### 3.6 Alur Penelitian

Berikut adalah skema alur penelitian :



**Gambar 3. 1 Alur Penelitian**

### 3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Pada penelitian ini akan dilakukan uji deskriptif untuk mendapatkan rata-rata yang akan dibuat dalam bentuk tabel atau grafik. Kemudian dilanjutkan dengan uji analisis bivariat dimana sebelumnya data dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Jika didapatkan distribusi normal dan homogen maka untuk mengetahui pengaruh ekstrak umbi bit terhadap kadar SGPT dan SGOT pada tikus yang diinduksi diabetes, maka dilakukan uji *One way annova* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok.

Jika didapatkan distribusi tidak normal dan tidak homogen maka untuk mengetahui pengaruh ekstrak umbi bit terhadap kadar SGPT dan SGOT maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* Mann-whitney untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok.

