

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang beserta tutup yang terbuat dari kawat, botol air minum, rak tempat kandang, gelas ukur, *beaker glass* 100 mL, 500 mL, dan 1000 mL, erlenmeyer 250 mL, kain blancu, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, bola hisap, spatula, timbangan digital, timbangan analitik, *slow juicer*, inkubator, *centrifuges*, *cuvet*, *cool box*, *freezer*, spektrofotometer UV-Vis Spectroquant phare 300 M, *glucometer*, *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 ± 10 nm, pipet presisi dan tip pipet sekali pakai, tube, dan kertas saring.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dari kepulauan Talango, Sumenep, Madura, tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*) umur 2-3 bulan, reagen *Follin-Ciocalteu* 50%, akuades, etanol 85%, floroglusinol, Na_2CO_3 5%, FeCl_3 1%, HCl, H_2SO_4 , Mg, KI, kloroform, Obat Hipoglikemik Oral (*Metformin*), *streptozotocin* (STZ), lemak babi, sekam, obat luka iodine, pakan broiler 1, asam sitrat, Na-sitrat, buffer sitrat pH 4,5, *phospat buffer sitrat* (PBS) Ph 7,4, *tetramethylbenzidine* (TMB), *stop solution* (HCl 2N), NaFis 0,9%, *xylo*, glukosa kit merk Glucodr AGM-2100, *Rat Insulin* ELISA Kit dari *Bioassay Technology Laboratory* No. E0707Ra, *Rat Nuclear Factor-RAGE* ELISA kit dari *Bioassay Technology Laboratory* No. E0928Ra dan air.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan metode deskriptif. Metode eksperimen menurut Jaedun (2011), adalah penelitian yang dilakukan terhadap variable yang data-datanya belum ada, sehingga dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian atau diukur dampaknya diamati. Penelitian eksperimen juga merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja, dilakukan dengan cara memberikan perlakuan tertentu terhadap subyek penelitian guna membangkitkan keadaan yang diteliti dan mengamati akibatnya.

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Sargassum* sp. dengan metode jus kepada tikus (*Rattus novergicus*) penyandang diabetes militus. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi jus untuk memperoleh kandungan optimum florotanin dari ekstrak yang dihasilkan. Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh jus *Sargassum* sp. terhadap penurunan kadar glukosa darah dan menurunkan ekspresi *Reseptor Advanced Glycation End-product* (RAGE) pada tikus penyandang diabetes melitus.

3.3 Rancangan Penelitian

Variabel adalah gejala, suatu fakta ataupun data yang sifatnya berubah berubah dan tidak tetap. Variabel dibagi menjadi dua yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas (*Independent variable*) merupakan variabel yang dilihat pengaruhnya terhadap variabel terikat (*dependent variable*), sedangkan variabel terikat adalah dampak dari variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah 7 perlakuan pada tikus dan lama waktu pengamatan. Sedangkan variabel terikat pada

penelitian ini adalah pengaruh jus *Sargassum* sp. menurunkan kadar glukosa darah dan menurunkan ekspresi IL-6 pada tikus penyandang diabetes melitus.

Rancangan penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena hanya memiliki satu faktor yaitu frekuensi jus *Sargassum* sp. yang meliputi tiga frekuensi berbeda yaitu; frekuensi 1 kali sehari, frekuensi 2 kali sehari, dan frekuensi 3 kali sehari, dengan tiga kelompok ulangan ($n=3$) untuk tiap perlakuan. Desain rancangan percobaan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Desain Rancangan Penelitian RAL

Perlakuan	Ulangan					Total (Σ)	Rerata (\bar{x})
	1	2	3	4	5		
A	A1	A2	A3	A4	A5	ΣA	$\bar{x}A$
B	B1	B2	B3	B4	B5	ΣB	$\bar{x}B$
C	C1	C2	C3	C4	C5	ΣC	$\bar{x}C$
D	D1	D2	D3	D4	D5	ΣD	$\bar{x}D$
E	E1	E2	E3	E4	E5	ΣE	$\bar{x}E$
F	F1	F2	F3	F4	F5	ΣF	$\bar{x}F$
G	G1	G2	G3	G4	G5	ΣG	$\bar{x}G$
Total						T_i	Y_{ij}

Keterangan :

- A = tikus normal + akuades
- B = tikus normal + jus *Sargassum* sp. frekuensi 1 kali sehari (3.398 mg/kg BB)
- C = tikus diabetes melitus + akuades
- D = tikus diabetes melitus + metformin 6,3 mg/kg BB
- E = tikus diabetes melitus + jus *Sargassum* sp. frekuensi 1 kali sehari (3.398 mg/kg BB)
- F = tikus diabetes melitus + jus *Sargassum* sp. frekuensi 2 kali sehari (3.398 mg/kg BB)
- G = tikus diabetes melitus + jus *Sargassum* sp. frekuensi 3 kali sehari (3.398 mg/kg BB)

3.4 Penelitian Pendahuluan

3.4.1 Pembuatan Jus *Sargassum* sp.

Pada penelitian ini *Sargassum* sp. yang digunakan diambil dari perairan kepulauan Talango, Madura. *Sargassum* sp. segera dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan menggunakan air tawar yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada *Sargassum* sp. *Sargassum* sp. yang digunakan berupa bagian daun. *Sargassum* sp. yang telah dicuci dikeringkan, pengeringan yang dilakukan tidak boleh terkena matahari secara langsung.

Pada penelitian ini pembuatan jus *Sargassum* sp. dengan metode jus (*juicing*) yaitu *Sargassum* sp. dicuci dengan air tawar yang mengalir kemudian ditimbang sebanyak 100 g, kemudian dilakukan penghalusan dengan *slow juicer*. Setelah itu disaring menggunakan kain blacu kemudian dilakukan pengenceran dengan aquades perbandingan 1:4 sehingga diperoleh filtrat dan residu. Proses pembuatan jus dapat dilihat pada lampiran 10.

3.4.2 Pembuatan Larutan Standar Floroglusinol

Larutan stok floroglusinol dengan konsentrasi 100 ppm (mg/L) dibuat dengan melarutkan 0,01 g floroglusinol dalam 100 mL etanol 85%. Larutan standar dibuat dari larutan stok dengan mengambil 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, dan 10 mL larutan stok kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda lalu ditambahkan etanol 85% sampai setiap larutan berjumlah 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 2,5 mL dan dilarutkan dalam 2,5 mL H₂O. Kemudian diambil masing-masing larutan sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL reagen *Follin-Ciocalteu* 50% dan 2 mL Na₂CO₃ 5%, lalu ditunggu selama 3 menit. Kemudian

diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu ruang selama 45 menit dan dilakukan absorbansi sampel dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 770 nm. Dari hasil pengukuran tersebut dapat dibuat persamaan regresi kurva hubungan antara konsentrasi floroglusinol (ppm) dengan absorbansi.

3.4.3 Penentuan Total Senyawa Florotanin pada Jus *Sargassum* sp.

Penentuan total senyawa florotanin dilakukan berdasarkan metode *Follin-Ciocalteu*. *Sargassum* sp. ditimbang sebanyak 20 g lalu diekstraksi dengan metode jus menggunakan pelarut akuades dengan perbandingan 1:4 (b/v). Diambil 2,5 mL ekstrak dan dilarutkan dalam 2,5 mL H₂O pada tabung reaksi. Diambil 1 mL larutan, kemudian ditambahkan 1 mL reagen *Follin-Ciocalteu* 50% dan 2 mL Na₂CO₃ 5% pada tabung reaksi, lalu ditunggu selama 3 menit. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu ruang selama 45 menit lalu disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 700 rpm hingga diperoleh supernatan. Kemudian diukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 770 nm dengan larutan standar floroglusinol dan dimasukkan hasilnya ke dalam kurva hubungan antara konsentrasi floroglusinol (ppm) dengan absorbansi.

3.4.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan terhadap kandungan polifenol, flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan steroid jus *Sargassum* sp. menggunakan metode yang didasarkan pada Harborne (1987).

a. Polifenol

Uji kandungan polifenol dilakukan dengan memasukkan 0,1 mL ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah akuades 5 mL. Kemudian dididihkan selama 5 menit menggunakan *hot plate* dan ditambah FeCl₃ sebanyak 5

tetes. Perubahan warna larutan menjadi biru sampai hitam menunjukkan adanya kandungan polifenol pada ekstrak.

b. Flavonoid

Flavonoid yang berupa glikosida termasuk senyawa polar sehingga dapat diekstrak dengan etanol, metanol, ataupun air. Jika ekstrak sampel terdapat senyawa flavonoid, maka setelah penambahan logam Mg dan HCl akan terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga (Septianingsih, 2010).

Uji kandungan flavonoid dilakukan dengan mengambil 0,1 mL ekstrak *Sargassum* sp., dicampur dengan etanol 5 mL lalu dikocok, dipanaskan dan dikocok kembali. Kemudian ditambahkan Mg 0,2 g dan HCl 3 tetes. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kandungan flavonoid.

c. Alkaloid

Prinsip uji alkaloid adalah pengendapan alkaloid dengan logam-logam berat. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi Dragendorf, dikarenakan pereaksi ini mengandung bismut yang merupakan logam berat (Sirait, 2007). Uji kandungan alkaloid dilakukan dengan memasukkan 0,5 g ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah kloroform 5 mL dan amonia 3 tetes. Kemudian dipisah fraksi kloroform dan ditambah H₂SO₄ 2 M sebanyak 10 tetes, lalu dipisah menjadi bagian A, B dan C. Bagian A diberi pereaksi Mayer, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Bagian B diberi pereaksi Dragendorf, timbulnya warna merah menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Kemudian bagian C diberi pereaksi Wagner, timbulnya warna coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid.

d. Tanin

Tanin apabila direaksikan dengan FeCl_3 akan membentuk warna hijau. Hal ini terjadi karena, terbentuknya senyawa kompleks antara logam Fe dan tanin. Senyawa kompleks dapat terbentuk karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom non logam (Effendy, 2007). Uji kandungan tanin dilakukan dengan memasukkan 0,5 mL ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah akuades 5 mL. Kemudian dididihkan selama 5 menit menggunakan *hot plate* dan ditambah FeCl_3 sebanyak 5 tetes. Perubahan warna larutan menjadi biru tua dan hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin pada ekstrak.

e. Saponin

Pada uji saponin positif bila ditambahkan dengan akuades panas kemudian akan terbentuk buih atau busa selama 15 menit. Hal ini dapat terjadi karena adanya glikosida yang memiliki kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Uji kandungan saponin dilakukan dengan uji busa dalam air panas dengan melarutkan ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam 10 mL air panas lalu dikocok kuat-kuat. Adanya kandungan saponin dilihat dari busa yang tidak hilang setelah 5 menit dan setelah penambahan HCl 2N 1 tetes.

f. Steroid

Senyawa steroid/triterpeneoid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna (Robinson, 1995).

Ekstrak ditambahkan 3 tetes pereaksi Liebermen – Burchard (asam asetat glasial + H_2SO_4 pekat). Uji positif triterpenoid memberikan warna merahatau ungu dan uji positif steroid memberikan warna hijau atau biru.

3.5 Penelitian Utama

3.5.1 Pemodelan dan Perlakuan

Pemodelan tikus coba diawali dengan menempatkan tikus wistar jantan usia 2-3 bulan sebanyak 21 ekor dengan berat antara 200-250 g kedalam *individual cages*. Selanjutnya dilakukan adaptasi selama 7 hari untuk mengkondisikan semua tikus sebelum diberikan perlakuan. Selama masa adaptasi, tikus coba setiap hari diberi pakan dan minum tanpa batas (*ad libitum*). Kemudian tikus diberi pakan dengan campuran minyak babi yang bertujuan untuk meningkatkan kadar kolesterol tikus. Tikus coba dibagi kedalam 7 perlakuan, pada tiap perlakuan terdapat 5 ekor tikus coba.

Preparasi diabetogenik streptozotoksin (STZ) dilakukan dengan melarutkan STZ kedalam larutan *buffer sitrat* pH 4,5. Penggunaan *buffer sitrat* pH 4,5 bertujuan untuk mempertahankan pH asam. *Buffer sitrat* pH 4,5 dibuat dari campuran 26,5 mL larutan asam sitrat 0,1 M dan 23,5 mL larutan Na-sitrat 0,1 M yang ditambah akuades hingga volume larutan 100 mL. Sebelum diinduksi dengan STZ, tikus coba terlebih dahulu dipuasakan selama minimal 8 jam supaya terjadi metabolisme basal dan STZ dapat bereaksi secara optimal didalam tubuh. Dosis STZ yang disuntikkan pada tikus coba yaitu 20 mg/kg BB.

Penginduksian STZ dilakukan secara intraperitoneal pada daerah dibawah rongga perut. Hasil dari penginduksian diabetogenik dapat diketahui dengan pada hari ke-7 setelah penyuntikan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Tikus yang dinyatakan positif diabetes harus memiliki kadar glukosa darah sesaat ≥ 200 mg/dL (Kustarini *et al.*, 2012), sedangkan tikus coba yang memiliki kadar glukosa darah \leq

200 mg/dL tidak digunakan. Setelah dilakukan pemodelan, tikus coba kemudian diberi perlakuan sesuai perlakuan masing-masing.

Perlakuan pada berbagai tikus coba yaitu sebagai berikut; pada perlakuan A, tikus yang diberi akuades. Pada perlakuan B, tikus dalam kondisi normal diberi jus *Sargassum* sp. satu kali sehari untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak *Sargassum* sp. dalam jumlah minimum terhadap kontrol negatif. Pada perlakuan C, tikus penyandang diabetes melitus yang diberi akuades. Pada perlakuan D, tikus penyandang diabetes melitus yang diberi metformin dengan dosis 6,3 mg/kg BB. Pada perlakuan E, tikus penyandang diabetes melitus yang diberi jus *Sargassum* sp. sebanyak satu kali sehari. Pada perlakuan F, tikus penyandang diabetes melitus yang diberi jus *Sargassum* sp. sebanyak dua kali sehari. Pada perlakuan G, tikus penyandang diabetes melitus yang diberi jus *Sargassum* sp. sebanyak tiga kali sehari. Perlakuan dilakukan selama 20 hari. Skema kerja pada berbagai perlakuan tikus coba dapat dilihat pada Lampiran 10.

Pada hari ke-20 setelah perlakuan, dilakukan pengamatan pada tikus coba, yang meliputi; pengamatan kadar glukosa darah, insulin dan ekspresi RAGE. Tikus dipuaskan selama 8 jam supaya terjadi metabolisme basal didalam tubuh tikus. Setelah pemuasaan, dilakukan *Oral Glucose Tolerant Test* (OGTT). Tikus coba diukur kadar glukosa darah pada menit ke-0 setelah pemuasaan, lalu disonde dengan larutan glukosa 10%, dilanjutkan dengan pengukuran kadar glukosa darah tikus pada menit ke-30, 60, 90 dan 120. Tikus coba kemudian dietanasi dengan cara dislokasi pada tulang leher, lalu dibedah dari bagian abdomen sampai toraks. Kemudian diambil serum darah dan organ dari tikus. Organ yang diambil dicuci dengan NaFis 0,9% untuk menghilangkan darah yang tersisa, dilanjutkan dengan penimbangan organ.

Kemudian dilakukan uji ekspresi IL-6 menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Skema kerja pada berbagai perlakuan tikus coba setelah 20 hari dapat dilihat pada Lampiran 10

3.5.2 Analisa Glukosa Darah

Pengukuran glukosa darah pada tikus coba dilakukan dengan pengambilan darah yang diambil dari bagian ekor tikus, dengan cara ekor tikus dibersihkan lalu dipijat dan diurut perlahan-lahan, kemudian bagian ujung ditusuk dengan jarum (lancet). Darah yang keluar kemudian ditempelkan pada strip glukometer. Kadar glukosa darah akan terukur dan nampak pada layar glukometer setelah 5 detik, dinyatakan dalam mg/dl. Kadar glukosa darah ditentukan dengan metode *glukose oxidase biosensor*. Dengan menggunakan alat “*One Touch Ultra*” (alat monitoring glukosa darah) (Unitly, 2012). Pengukuran glukosa darah dilakukan pada 5 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, 5, 10, 15, dan 20.

3.5.3 Analisa Insulin Darah

Pengukuran kadar insulin tikus coba ditentukan dengan metode ELISA menggunakan *Rat Insulin ELISA Kit* dari *Bioassay Technology Laboratory* No. E0707Ra, Shanghai China dan alat *microplate reader*. Prinsip uji ELISA adalah interaksi antigen dan antibodi suatu sampel dengan melibatkan peran enzim sebagai indikator dalam reaksi. Rat INS ditambahkan ke lubang yang telah dilapisi dengan *INS monoclonal antibody*, setelah penambahan *INS monoclonal antibody* dan akan diikat Rat INS, kemudian dilakukan inkubasi. Lalu, antibodi Rat INS yang tidak terikat setelah inkubasi akan dilakukan pencucian hingga bersih. Kemudian penambahan Streptavidin-HRP dan mengikat *biotin-conjugated anti-Rat INS antibody* dan diinkubasi, untuk Streptavidin-HRP yang tidak terikat dapat dilakukan pencucian.

Selanjutnya, ditambahkan larutan buffer solution containing H_2O_2 dan *tetramethylbenzidine* (TMB) sehingga akan terjadi perubahan warna dan reaksi akan berakhir dengan penambahan *stop solution* asam dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm.

Sampel yang akan digunakan adalah jaringan pada tikus coba. Dilakukan pembilasan jaringan dengan menggunakan PBS (*Phospat Buffer Saline*) pH 7,4 yang bertujuan untuk menghilangkan darah yang mungkin masih tersisa. Selanjutnya dilakukan penimbangan sebelum dihomogenkan. Kemudian jaringan dicacah dengan cara digerus didalam PBS pH 7,4 hal ini bertujuan agar tidak terjadi lisis. Penghomogenan dapat dilakukan dengan mortal alu diatas wadah yang berisi es. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 20 menit sehingga didapatkan supernatan. Untuk dapat menjaga kesegaran sampel maka dilakukan penyimpanan pada suhu 2-9°C untuk sampel yang akan digunakan dalam waktu 5 hari. Sementara itu untuk sampel yang akan digunakan pada waktu 1 bulan akan disimpan pada suhu -20°C.

Kemudian persiapan untuk seluruh reagen yang akan digunakan, larutan standar dan sampel. Semua reagen yang akan digunakan diletakkan pada suhu ruang terlebih dahulu sebelum digunakan. Kemudian menentukan jumlah stripe yang akan digunakan untuk pengujian dan masukan stripe pada frame yang akan digunakan. Kemudian mengambil larutan standar sebanyak 50µL dan sampel sebanyak 40µL ke dalam lubang *microplate*, lalu tambahkan 10µL antibodi INS dalam sampel. Selanjutnya menambahkan 50µL streptavidin-HRP dalam sampel dan standar lalu tutup *microplate* dan dilakukan pengocokan secara perlahan supaya homogen. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 50 menit. Setelah 50 menit buka

tutupnya dan mencuci *microplate* sebanyak 5 kali menggunakan *buffer*, perendaman dan pencucian lubang *microplate* dengan *buffer* selama 30 menit sampai dengan 1 menit, untuk setiap kali mencuci keringkan dengan tissue atau bahan penyerap. Lalu pada lubang *microplate* dilakukan penambahan substrat *Solution A* sebanyak 50 μ L dan substrat *Solution B* sebanyak 50 μ L. Selanjutnya penutupan *microplate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dalam kondisi gelap. Selanjutnya dilakukan penambahan *Stop Solution* dan akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Kemudian dilakukan penentuan nilai OD (*Optical Density*) menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan *Stop Solution*.

3.5.4 Gejala Diabetes Melitus

Pengukuran berat badan pada tikus coba dilakukan menggunakan timbangan digital. Tikus coba ditimbang dan angka yang muncul pada timbangan digital dicatat sebagai berat badan tikus. Pengukuran berat badan dilakukan 24 jam sekali setiap hari untuk mengetahui perubahan berat badan yang terjadi pada tikus coba.

Polifagia adalah gejala nafsu makan bertambah, sehingga pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah berat pakan yang dikonsumsi. Jumlah berat pakan yang dikonsumsi oleh tikus dihitung dengan menimbang jumlah berat awal pakan dan mengurangnya dari berat pakan yang tersisa dalam kandang setelah 24 jam pemberian (Okon et al., 2012). Pengukuran jumlah berat pakan yang dikonsumsi oleh tikus dilakukan setiap hari.

Poliuria dapat diketahui melalui jumlah urin yang dikeluarkan tikus. Pengukuran volume urin dilakukan dengan cara menghitung selisih antara sekam basah dengan sekam kering. Sehingga didapatkan volume urin yang dikeluarkan oleh

tikus. Pengukuran ini dilakukan 24 jam sekali setiap hari. Polidipsia adalah gejala banyak minum, sehingga pengamatan dilakukan dengan pengukuran volume air minum yang diberikan pada tikus. Volume air minum yang dikonsumsi oleh tikus diukur dengan menghitung selisih volume air minum awal dengan volume air minum yang tersisa didalam botol setelah 24 jam pemberian (Okon et al., 2012). Pengukuran volume air minum yang dikonsumsi oleh tikus dilakukan setiap hari.

3.5.5 Tes Toleransi Glukosa Oral (OGTT)

Pengukuran tes toleransi glukosa darah (TTGO) dilakukan untuk melihat kemampuan tubuh dalam menggunakan glukosa yang merupakan sumber energi bagi tubuh (Islam *et al.*, 2009). Glukosa yang diberikan pada saat TTGO dapat meningkatkan kadar gula darah. Puncak kadar glukosa darah terjadi dalam 30 atau 60 menit dan akan kembali normal 2-3 jam. Pengukuran tes toleransi glukosa oral (TTGO) dilakukan pada hari ke-20 dan sebelum dilakukan pengukuran terlebih dahulu hewan uji dipuasakan selama \pm 8 jam (Ridwan *et al.*, 2012). Hewan uji dipuasakan terlebih dahulu untuk menghindari variasi kadar glukosa darah karena perbedaan masuknya makanan pada setiap hewan uji (Lidia, 2013). Tikus diberi larutan glukosa 10% secara oral 30 menit setelah diberi perlakuan. Pemberian larutan glukosa dilakukan menggunakan alat sonde. Kadar glukosa darah diukur setelah pemberian glukosa dengan menggunakan alat glukometer, darah diambil dari vena ekor pada masing-masing kelompok setelah 0, 30, 60, 90, dan 120 menit (Kumar *et al.*, 2014). Dilakukan pengamatan setiap 30 menit untuk mengetahui kemampuan tubuh mentoleransi pemberian larutan glukosa sehingga dapat diketahui ada tidaknya pengaruh frekuensi pemberian jus *Sargassum* sp. terhadap kemampuan tubuh mentoleransi glukosa.

3.5.6 Analisa Ekspresi IL-6

Sebelum dilakukan uji kadar IL-6 terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel organ mata dan otak tikus. Organ mata dan otak yang telah dipersiapkan dibersihkan dengan NaFis 0,9% dalam keadaan dingin. Kemudian ditimbang sebanyak 0,5 g dan ditambahkan 1 mL larutan PBS dingin lalu dihaluskan menggunakan mortal alu. Setelah itu organ mata dan otak dalam bentuk homogenat dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan ditambahkan PBS dingin 4 mL. Lalu di sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Kemudian hasil sentrifuse yang berupa supernatan digunakan untuk uji ELISA IL-6 dan residunya tidak digunakan. Skema kerja preparasi organ mata dan otak dapat dilihat di Lampiran 12.

Organ mata dan otak yang telah dipreparasi kemudian diuji kadar IL-6 menggunakan ELISA kit spesifik (*Specific sandwich enzyme-linked immunosorbent assays*) dan *Biossay Technology laboratory* No. E0707Ra, Shanghai China yang terdiri dari mikroplate yang di *coating* dengan monoklonal antibodi anti IL-6, *conjugate*, IL-6 standart, *diluent* RD1A, *calibrator diluent* RD5A, buffer pencuci, *color reagent* A, *color reagent* B, *stop solution* dan pita perekat. Pengukuran ELISA IL-6 dapat dilihat pada Lampiran 12.

3.6 Analisa Data

Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Di mana:

- Y_{ij} = Perlakuan ke-i ulangan ke-j
- μ = Rataan umum
- τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i
- ε_{ij} = Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Apabila hasil analisis keragaman (sidik ragam) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata/sangat nyata maka dilanjutkan dengan analisa Duncan menggunakan *software* SPSS. Taraf kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah $\alpha=0,05$.