

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental*, metode yang digunakan adalah *posttest-only controlled design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar yang diinduksi DM tipe 2. Sedangkan sampel adalah tikus yang diinduksi diabetes melitus tipe 2 dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan penelitian.

a) Besaran Sampel

Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing perlakuan (6 perlakuan) dihitung menggunakan rumus Federer (David *et al.*, 2008):

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t: jumlah perlakuan

n: jumlah sampel

dengan demikian setiap kelompok uji dibutuhkan 4 tikus sebagai sampel. Sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

b) Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan berjumlah 6 (enam) yang dibagi secara acak (P_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_p), dengan ketentuan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif (P_n): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan aquadest dan tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
- b) Kelompok perlakuan (P_1): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari selama 30 hari.
- c) Kelompok perlakuan (P_2): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
- d) Kelompok perlakuan (P_3): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
- e) Kelompok kontrol positif (P_p): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan metformin 30 mg/kgBB.
- f) Kelompok normal (P_0) 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, tidak diinduksi DM tipe 2 dan tidak mendapatkan perlakuan.

Berdasarkan penelitian Ali Benhaddou-Andaloussi tentang aktivitas biji jintan hitam terhadap penurunan glukosa darah tahun 2011, didapatkan dosis efektif biji jintan hitam adalah 48mg/kg/hari, sehingga dalam penelitian ini digunakan dosis tersebut.

c) Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak, agar setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok perlakuan.

Metode yang digunakan adalah sistem lotre, sebanyak 2 kali. Lotre pertama menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan lotre kedua untuk mengelompokkan tikus.

Terlebih dahulu dilakukan lotre untuk menentukan perlakuan yang akan diambil terlebih dahulu. Dalam lotre ini terdapat 5 macam kertas, yakni P_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_p , P_0 kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dulu ditentukan anggotanya, lalu kertas yang telah keluar tidak dimasukkan lagi. Selanjutnya untuk menentukan pengelompokan hewan coba, terlebih dahulu hewan coba dipisahkan berdasarkan jenis kelamin. Masing-masing hewan coba dengan jenis kelamin yang sama diberi nomor 1-20. Selanjutnya setiap kelompok jenis kelamin dilotre untuk masuk ke kelompok tertentu. Nomor *lotree* yang sudah diambil tidak dimasukkan kembali.

d) Kriteria Subyek

Subyek dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar karena dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2, penanganan mudah dan harga terjangkau. Kriteria tikus yang digunakan sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- a) Berjenis kelamin jantan
- b) Usia 8 minggu, karena pada usia tersebut tikus telah dewasa.
- c) Berat badan 150-220 gram

Kriteria Eksklusi: Tikus dengan DM sebelum dilakukan induksi diabetes melitus tipe 2.

4.3 Variabel Penelitian

a) Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dosis 24 mg/kg/hari, 48 mg/kg/hari, 96 mg/kg/hari.

b) Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar GLUT-4 pada jaringan otot tikus model DM tipe 2.

4.4 Instrumen Analisis

Kadar GLUT-4 pada jaringan otot tikus dihitung menggunakan ELISA, yang selanjutnya diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer-vis pada panjang gelombang 450 nm. Kadar GLUT-4 diketahui dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam kurva baku.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba. Pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Sedangkan untuk mengujian kadar GLUT-4 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada Februari 2013 setelah mendapatkan persetujuan etik, dan berakhir pada pertengahan Mei 2013.

4.6 Instrumen penelitian

a) Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian dikelompokkan berdasarkan metode masing-masing, adalah sebagai berikut:

- a) Bahan untuk pemeliharaan tikus: sekam sebagai alas kandang tikus, alkohol 70% untuk memandikan tikus setiap hari, dan pakan *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 (makanan standar tikus). Adapun kandungan zat gizi dan energi per 100 gram bahan diet normal tikus adalah:

Tabel 4.1 Komposisi Energi dan Zat Gizi Diet Tikus Normal

Zat Gizi	Comfeed PAR-s	Tepung Terigu
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11
Lemak (gram)	4	0,9
Karbohidrat (gram)	58	72

Sumber: Adi, 2008

Tikus diet normal membutuhkan 102 kkal yang bersumber dari *comfeed* PAR-S dan tepung terigu (Anggraeni *et al.*, 2009). Sedangkan 1 gram fruktosa setara dengan 3,9 kkal energi (Roberfroid, 1999). Sehingga diet tinggi fruktosa yang diberikan kepada tikus adalah 60% dari 102 kkal, yaitu 61,2 kkal. Untuk mendapatkan 61,2 kkal maka dibutuhkan fruktosa sebanyak 15,66 gram. Setiap gram diet normal mengandung energi sebesar 6,8 kkal. Sehingga untuk mendapatkan 40% dari jumlah kalori yang dibutuhkan sehari (40,8 kkal) membutuhkan 6 gram diet normal dengan rincian 4 gram dari *comfeed* PAR-S dan 2 gram dari tepung terigu.

- b) Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Biji Jintan Hitam: Serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa*) didapatkan dari Batu Materia Medika, Kota Batu, Profinsi Jawa Timur sejumlah 1 kg. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol dan aquadest dengan perbandingan 80:20.
- c) Bahan Uji Standarsasi Ekstrak
- Parameter Susut Pengeringan: ekstrak biji jintan hitam 1 gram – 2 gram, silika pengering.
 - Parameter Kadar Abu: biji jintan hitam 2 gram – 3 gram, krus silikat, air panas, kertas saring.
 - Parameter Organoleptik: ekstrak biji jintan hitam secukupnya.
- d) Uji Fitokimia Kualitatif
- Minyak Atsiri: ekstrak biji jintan hitam, Sudan III
 - Protein: ekstrak biji jintan hitam, asam nitrat
 - Alkaloid: ekstrak biji jintan hitam, reagen Meyer, reagen Dragendroff, reagen wagner.
 - Saponin: ekstrak biji jintan hitam, aquadest
- e) Bahan untuk menstimulasi konsentrasi GLUT4 sebelum *euthanasia*: Insulin 10 IU/kg/BB
- f) Bahan untuk Prosedur *Euthanasia*: Natrium Pentobarbital 100 mg/kg/BB dan 60 mg/kg/BB
- g) Bahan untuk Pembuatan Homogenat Jaringan Otot: jaringan otot tikus, Buffer homogenitas (1% Triton X 100, 50 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM *sodium pyrophosphate*, 100 mM *sodium fluoride*, 10 mM EDTA, 10 mM *sodium vanadate*, 2 mM PMSF dan 0.1 mg/ml aprotinin).

- h) Bahan analisis protein metode Bradford: Supernatan sampel, *Coomassie Brilliant Blue*, etanol, fosfor, Bovine Serum Albumin (BSA).
- i) Bahan untuk Pengukuran Kadar GLUT-4 menggunakan ELISA: *rabbit IgG anti-GLUT4 antibodi*, antigen sampel, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Washing buffer* (PBS-T), *HRP labeled antibodi*, *,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)*, *HRP stop solution*.

b) Alat Penelitian

- a) Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan.
- b) Alat untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: timbangan digital untuk menimbang sampel, gelas beker sebagai wadah dalam proses maserasi, batang pengaduk, corong dan kertas saring untuk menghasilkan filtrat serta *rotary evaporator* untuk memekatkan ekstrak.
- c) Alat uji standarisasi ekstrak
- Parameter Susut Pengerinan: timbangan digital, oven, botol timbang, batang pengaduk.
 - Parameter Kadar Abu: timbangan digital, alat pemijar.
 - Parameter Organoleptik: cawan petri.
- d) Alat uji fitokimia kualitatif: tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, dan gelas arloji.

- e) Alat pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) pada tikus: timbangan digital, mortar, gelas ukur, pengaduk, sonde lambung tikus.
- f) Alat Pembedahan Tikus: pisau bedah, papan bedah, pinset, Potter-Homogenizer.
- g) Alat Pembuatan Homogenat Jaringan Otot: mortar, stemper, sentrifuga.
- h) Alat analisa protein metode Bradford: spektrofotometer-vis.
- i) Alat Pengujian Kadar GLUT-4: Instrumen ELISA

4.7 Definisi Operasional

- a) Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit kronik, terjadi karena insensitivitas atau resistensi insulin yang disebabkan oleh diet tinggi fruktosa, dimana 60% kebutuhan kalori tikus sehari dicukupi dari fruktosa. Dinyatakan mengalami diabetes jika kadar gula darah acak setelah 6 minggu diet ≥ 200 mg/dL.
- b) Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari UPT Batu Materia Medika.
- c) Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berusia 8 minggu dengan berat badan antara 150-220 gram, karena hewan coba ini dapat mensimulasikan kondisi diabetes melitus tipe 2 setelah dilakukan diet tinggi fruktosa.
- d) Konsentrasi GLUT-4 akan menunjukkan translokasi GLUT-4 yang terpapar di permukaan membran sel, translokasi GLUT-4 ke membran sel berfungsi untuk memasukkan glukosa ke dalam sel, sehingga konsentrasi GLUT-4 berbanding terbalik dengan resistensi insulin.

- e) ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), merupakan metode yang digunakan untuk pengukuran kadar GLUT-4. Prinsip metode ini adalah pendeteksian GLUT-4 yang dilakukan dengan mengikat GLUT-4 oleh anti-GLUT4.
- f) Glikogenolisis adalah proses merubah glikogen menjadi glukosa
- g) Glukoneogenesis adalah proses pembentukan glukosa yang berasal dari nonkarbohidrat.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Tahap ekstraksi biji jintan hitam (*Nigella sativa*) berdasarkan penelitian Ali Benhaddou-Andaloussi tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah pada tikus diabetes adalah sebagai berikut:

- a) Masukkan 400 gram serbuk biji jintan hitam ke dalam toples kaca tertutup.
- b) Tambahkan aquadest-etanol dengan perbandingan 80:20 sebanyak 4 liter ke dalam toples, aduk *ad homogen* lalu tutup toples. Diamkan hingga 24 jam.
- c) Saring hasil maserasi menggunakan corong dan kertas saring, residu penyaringan dimaserasi kembali dengan 50% etanol selama 2 jam, diulangi sekali lagi.
- d) Hasil ekstraksi pertama dan ekstraksi residu disatukan. Lalu dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* pada suhu kurang dari 40° C hingga pelarut menguap.

4.8.2 Uji Standarisasi Ekstrak

Uji standarisasi ekstrak penting dilakukan untuk menstandarkan ekstrak yang akan digunakan sebagai bahan baku obat, sehingga keamanannya terjamin. Dalam penelitian ini, tidak dapat dilakukan uji standarisasi secara mandiri karena kurangnya alat dan bahan. Oleh karena itu, uji standarisasi ekstrak akan dilakukan oleh Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur. Berikut metode uji standarisasi ekstrak berdasarkan buku panduan berjudul Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan obat yang diterbitkan oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) RI tahun 2000:

a. Parameter Susut Kering

- Timbang ekstrak 1 gram sampai 2 gram secara seksama.
- Masukkan ke dalam krus yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara.
- Sebelum ditimbang ratakan ekstrak dalam krus dengan menggunakan batang pengaduk hingga mencapai tebal 5 mm sampai 10 mm.
- Masukkan ke dalam ruang pengering dengan keadaan krus terbuka, keringkan pada suhu 105°C hingga krus tetap. Pengambilan krus yang telah dikeringkan menggunakan penjepit krus.
- Sebelum setiap pengeringan berikutnya, biarkan krus dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar.
- Jika ekstrak sulit kering dan mencair pada pemanasan, tambahkan 1 gram silika pengering yang telah ditimbang seksama setelah dikeringkan dan disimpan dalam eksikator suhu kamar.

- Campurkan silika ke dalam ekstrak, kemudian keringkan kembali pada suhu penetapan hingga krus tetap.
- b. Parameter Kadar Abu
 - Gerus ekstrak sejumlah tertentu.
 - Timbang ekstrak yang telah digerus sebanyak 2 gram sampai 3 gram.
 - Masukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan diratakan.
 - Pijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan lalu timbang.
 - Jika cara diatas tidak mampu menghilangkan arang, tambahkan air panas kemudian saring menggunakan kertas saring bebas abu.
 - Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama.
 - Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap kemudian timbang.
 - Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.
- c. Parameter Organoleptik Ekstrak
 - Siapkan sejumlah tertentu ekstrak
 - Gunakan pancaindera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa.

4.8.3 Uji Fitokimia Kualitatif

- a. Minyak Atsiri
 - Ambil ekstrak biji jintan hitam, tempatkan dalam gelas arloji.
 - Tambahkan Sudan III, hasil positif jika terbentuk warna merah.

b. Saponin

- Ambil ekstrak, larutkan dengan 20 ml aquades di dalam tabung reaksi.
- Kocok selama 15 menit, lalu diamkan.
- Hasil positif jika terbentuk busa stabil setebal 1 cm di permukaan larutan.

c. Alkaloid

- a. Tes Meyer: ekstrak ditambah dengan reagen Meyer (*Potassium Mercuric Iodide*). Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna kuning.
- b. Tes Wagner: Ekstrak ditambah dengan reagen Wagner (iodin dalam kalium iodida). Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna coklat atau kemerahan.
- c. Tes Dragendorff: Ekstrak ditambah dengan reagen Dragendorff (larutan kalium bismuth iodida). Hasil positif jika terbentuk endapan merah.

d. Protein

Tes Xanthoproteic: ekstrak ditambah dengan beberapa tetes asam nitrat konsentrat. Hasil positif jika terbentuk warna kuning.

4.8.4 Pengkondisian Hewan Coba

Sebelum tikus diberi perlakuan, dilakukan pengkondisian terlebih dahulu yang bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dalam kondisi percobaan dengan cara:

- a) Tikus ditempatkan pada kandang coba yang tertutup dengan anyaman kawat. Setiap kandang berisi 4 ekor tikus dengan jenis kelamin yang sama dan perlakuan yang sama.
- b) Suhu ruangan kandang tikus adalah $23 \pm 1^\circ \text{C}$.
- c) Dalam kandang disediakan botol minum sehingga tikus dapat minum *ad libitum*.
- d) Makan tikus berupa *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- e) Sekam ditempatkan di kandang dan dilakukan penyemprotan dengan alkohol 70% setiap hari.
- f) Tikus diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.

4.8.5 Induksi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus

Berdasarkan penelitian B. Qin tahun 2004 tentang penggunaan ekstrak kayu manis untuk tikus resisten insulin, diketahui bahwa induksi DM tipe 2 pada tikus dilakukan dengan cara:

- a) Tikus wistar sejumlah 40 ekor diberi diet tinggi fruktosa.
- b) Selama diet, 60% kebutuhan kalori tikus diperoleh dari fruktosa selama 6 minggu. Fruktosa disonde sebanyak 16 gram setiap hari.
- c) Setelah 6 minggu, dilakukan cek kadar glukosa darah acak, dikatakan mengalami DM tipe 2 jika nilainya lebih dari 200 mg/dL (Odeyi *et al.*, 2012).

4.8.6 Euthanasia Tikus

Euthanasia dilakukan untuk mengambil jaringan otot tikus, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Hewan coba dianastesi menggunakan natrium pentobarbital sebanyak 60 mg/kg/BB
- b) Diinjeksi insulin sebanyak 10 IU/kgBB secara bolus melalui vena porta tikus.
- c) Ditunggu selama 120 detik.
- d) Tikus disuntik dengan natrium pentobarbital dosis letal secara intraperitoneal, yakni 100 mg/kgBB.

4.8.7 Pembuatan Homogenat Jaringan Otot

Cara pembuatan homogenat jaringan otot berdasarkan Edward W. Kraegen dalam jurnalnya berjudul *Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4* adalah sebagai berikut:

- a) Otot diambil dari tikus, disimpan pada keadaan beku hingga digunakan untuk analisis.
- b) Jaringan otot beku dihancurkan di mortar dan dihomogenkan dengan buffer yang berjumlah 6 kali jumlah jaringan pada suhu 4° C. Buffer homogenitas mengandung 1% Triton X 100, 50 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM natrium pirofosfat, 100 mM natrium florida, 10 mM EDTA, 10 mM natrium vanadat 2 mM PMSF dan 0.1 mg/ml aprotinin.
- c) Ekstrak jaringan disentrifugasi dengan kecepatan 10,000 g selama 20 menit pada suhu 4°C.
- d) Ambil bagian supernatannya, untuk analisa berikutnya.
- e) Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford.

4.8.8 Penentuan Konsentrasi Protein dengan Metode Bradford

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Bradford tahun 1976 tentang kuantifikasi protein, prosedur penentuan konsentrasi protein dengan metode Bradford dimulai dengan menyiapkan bahan-bahan yang digunakan untuk analisa, terdiri dari:

a) Reagen Bradford, dibuat dengan cara:

- Timbang 10 mg *coomasie brilliant blue*
- Larutkan dalam 5 ml etanol 95%
- Tambahkan fosfor 85% sebanyak 10 ml
- Encerkan hingga mencapai volume 100 ml

b) Larutan Standar dan kurva baku, dibuat dengan cara:

- Timbang 10 mg Bovine Serum Albumin (BSA)
- Larutkan BSA dalam 10 ml aquadest, sehingga didapatkan BSA konsentrasi 1000 ppm (1 mg/ml) sebagai larutan stok.
- Ambil 0.5 ml larutan stok 1000 ppm (1 mg/ml), tambahkan dengan 4.5 ml aquadest. Sehingga terbentuk larutan stok 100 ppm (0.1 mg/ml).
- Lakukan pengenceran sehingga menghasilkan larutan 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm sebagai larutan baku.
- Masing-masing konsentrasi larutan, diambil 0.1 ml dan ditambahkan 5 ml reagen Bradford kemudian divortex dan diinkubasi di suhu ruang selama 10-60 menit.

- Selanjutnya ukur menggunakan spektrofotometer-vis dengan panjang gelombang perkiraan 595 nm, dilakukan pengecekan panjang gelombang maksimal terlebih dahulu.
- Buat kurva standar dari hasil pengukuran tersebut dan didapatkan persamaan liniernya.

Setelah dilakukan penyiapan bahan-bahan, analisa konsentrasi protein total ditentukan dengan cara:

- Ambil 0.1 ml supernatan homogenat
- Tambahkan dengan 5 ml reagen Bradford
- Inkubasi dalam suhu ruangan selama 10-60 menit
- Lakukan pembacaan nilai absorbansi pada spektro-vis dengan panjang gelombang 595 nm.
- Masukkan nilainya dalam persamaan kurva baku.

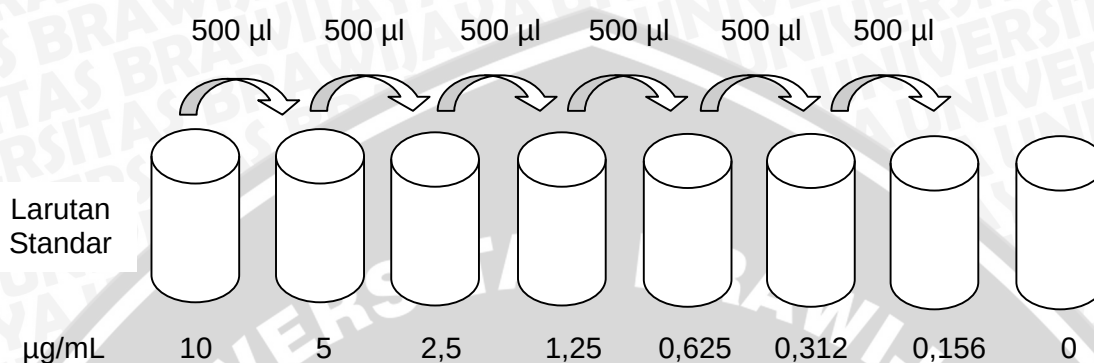
4.8.9 Pengukuran Kadar GLUT-4 Menggunakan ELISA

Siapkan terlebih dahulu reagen-reagen yang akan digunakan untuk pengukuran GLUT-4. Reagen yang perlu disiapkan dan cara penyiapannya adalah sebagai berikut:

a) Larutan Standar dan Kurva Baku

- Campurkan larutan *rabbit* IgG anti-GLUT4 antibodi konsentrasi 15 mg/mL sebanyak 0.1 ml, dengan PBS sebanyak 1,5 ml untuk mendapatkan larutan stok dengan konsentrasi 10 µl/ml.

- Tunggu 15 menit terlebih dahulu sebelum membuat seri larutan, sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Pembuatan Larutan Standar

- Lakukan pengukuran anbsorbansi masing-masing konsentrasi menggunakan spektro-vis pada panjang gelombang perkiraan 450 nm, dilakukan pengecekan panjang gelombang maksimal terlebih dahulu sebellumnya.
 - Buat kurva baku dari nilai pengukuran yang didapatkan, sehingga didapatkan persamaan liniernya.
- b) *Rabbit* IgG anti-GLUT4 antibodi : Encerkan antibodi dengan larutan dapar (PBS) pada perbandingan 1:5000.
- c) Sampel antigen: Larutkan sampel dengan PBS
- d) Larutkan *HRP labeled antibodi* dalam PBS dengan perbandingan 1:5000.

Semua reagen harus dicampur secara lembut sebelum dipipet, dan jangan sampai terbentuk busa. Setiap strip digunakan satu kali, tidak dianjurkan untuk diulang. Berikut prosedur pengukuran GLUT-4:

- a) Masukkan 200 μ l larutan *rabbit* IgG anti-GLUT4 antibodi ke dalam masing-masing sumur.
- b) Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C.
- c) Cuci sumur dengan PBS-T sebanyak 3 kali.
- d) Masukkan 200 μ l larutan sampel dan kontrol ke sumur.
- e) Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C.
- f) Cuci sumur dengan PBS-T sebanyak 3 kali.
- g) Masukkan 200 μ l larutan *rabbit* IgG anti-GLUT4 antibodi ke dalam masing-masing sumur.
- h) Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C.
- i) Cuci sumur dengan PBS-T sebanyak 3 kali.
- j) Masukkan 200 μ l *HRP-labeled detection* antibodi pada masing-masing sumur.
- k) Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C.
- l) Cuci sumur dengan PBS-T sebanyak 3 kali.
- m) Masukkan larutan 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) yang merupakan chromogenic substrat sebanyak 200 μ l, biarkan selama 30 menit.
- n) Masukkan HRP *stop solution* (HCl).
- o) Tentukan absorbansi cairan dengan spektrofotometer-vis dengan panjang gelombang 450 nm.

4.8.10 Perlakuan pada Tikus

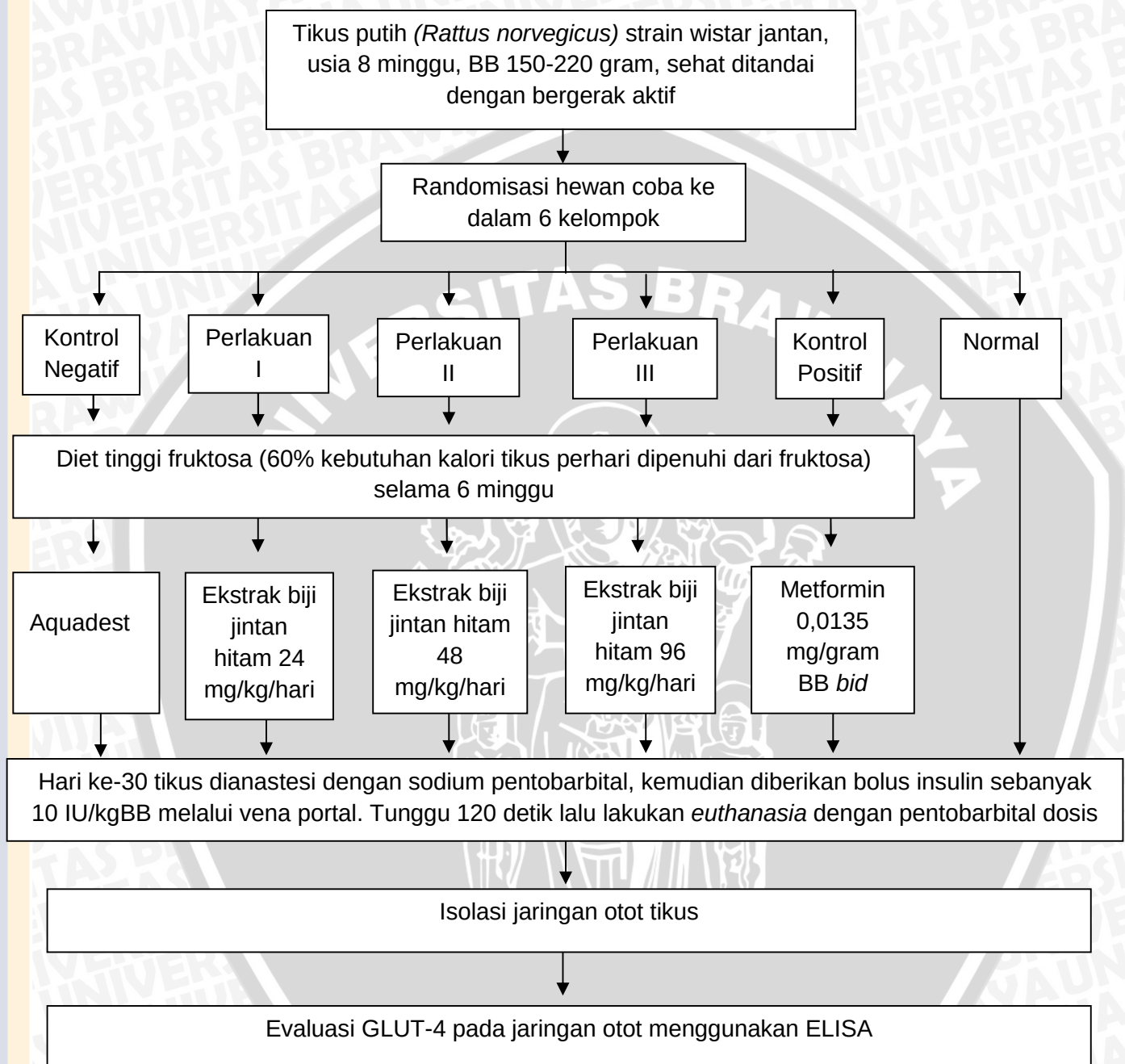
Selama proses penelitian, perlakuan yang diberikan kepada tikus adalah sebagai berikut:

- a) 24 ekor tikus yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- b) Tikus diberi diet tinggi fruktosa selama 6 minggu untuk mendapatkan kondisi resistensi insulin. Masing-masing tikus menggunakan satu kandang, karena perlu dilakukan kontrol pakan.
- c) Tikus dikelompokkan ke dalam 6 kelompok perlakuan melalui metode lotre, dengan pembagian kelompok:
 - Kelompok kontrol negatif (P_n): 4 ekor tikus model DM tipe 2, diberikan aquadest dan tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
 - Kelompok perlakuan (P_1): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - Kelompok perlakuan (P_2): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - Kelompok perlakuan (P_3): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kg/hari selama 30 hari.
 - Kelompok kontrol positif (P_p): 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, diberikan metformin 30 mg/kgBB.

- Kelompok normal (P_0) 4 ekor tikus wistar model DM tipe 2, tidak diinduksi DM tipe 2 dan tidak mendapatkan perlakuan.
- d) Makanan yang diberikan selama perlakuan adalah diet normal, yang terdiri dari *comfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1.
- e) Kelompok P_1 , P_2 , P_3 selain diberi diet normal juga mendapatkan ekstrak biji jintan hitam melalui sonde selama 30 hari.
- f) Pada hari ke-30 tikus dibedah untuk diambil jaringan ototnya dan dilakukan pengukuran kadar GLUT-4.



4.9 Alur Penelitian



4.10 Analisa Data

Hasil pengukuran kadar GLUT-4 dari jaringan otot kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : Uji Normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji One-way ANOVA, Post hoc test (uji Least Significant Difference) dengan $\alpha = 0,05$ sehingga perbedaan dinyatakan signifikan jika $\leq 0,05$ dan Uji korelasi Pearson.

