

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) menggunakan jenis pre dan post test dengan kelompok control. Subjek dipilih secara acak untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan karena hewan coba, tempat percobaan, dan bahan yang digunakan dianggap sama. Metode pemilihan sampel dilakukan secara acak sederhana (*Simple Random Sampling*), karena setiap populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana ini menggunakan angka acak (*random number*).

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan model diabetes mellitus tipe 2.

##### 4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

###### 4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri:

- Tikus jenis Wistar (*Rattus norvegicus*)
- Jenis kelamin jantan
- Umur 75-90 hari
- Berat badan 200-300 gram
- Tikus aktif dan mau makan

#### 4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian tidak boleh memiliki ciri-ciri:

- Tikus dengan perubahan kondisi, seperti sakit
- Tikus dengan kelainan cacat fisik
- Tikus mati

#### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel tikus sebanyak 30 ekor diletakkan dalam satu wadah besar. Kemudian dilakukan pembagian kelompok dengan menggunakan teknik *simple random sampling*. Sampel dibagi menjadi 6 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus yang ditempatkan dalam wadah kecil. Pembagian kelompok ialah sebagai berikut:

Kelompok I : tikus tanpa induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dan tidak diberikan ekstrak etanol binahong sebagai kontrol negatif.

Kelompok II : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB tanpa diberikan ekstrak Daun binahong sebagai kontrol positif.

Kelompok III : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan ekstrak daun binahong dosis 17,5 mg/kgBB/hari setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok IV : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan ekstrak daun binahong dosis 35 mg/kgBB/hari setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok V : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan ekstrak daun binahong dosis 70 mg/kgBB/hari setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok VI : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan Glimepiride dosis 0,216 mg/200 g tikus setiap hari selama 2 minggu.

#### 4.2.3 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan tiga macam perlakuan dengan dua kelompok sebagai kontrol, jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer (Federer, 1991):

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

Keterangan :

- $n$  = jumlah sampel tiap kelompok
- $t$  = jumlah kelompok
- 15 = nilai deviasi

Dari rumus tersebut, berikut penghitungan jumlah sampel penelitian sebagai berikut:

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

$$\{(n - 1) 5\} \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan rumus tersebut, jumlah sampel dalam penelitian ialah 4 ekor tikus. Setiap kelompok perlakuan ditambahkan 1 ekor tikus, dikarenakan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pranata

(2010), menyatakan bahwa tikus yang diinduksi oleh diet tinggi lemak selama 5 minggu dan streptozotocin (STZ) 30 mg/kgBB/hari terdapat 2 ekor tikus mati dari 25 ekor tikus pada kelompok pemberian induksi diabetes mellitus tipe 2. Selain itu juga disebutkan oleh peneliti Susilowati (2011), yang menguji efek ekstrak daun Pare (*Momordica charantia*) terhadap jumlah sel beta pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) wistar DM tipe 2 dengan *High Fat Diet* dan STZ, terdapat 2 ekor tikus yang mati pada kelompok perlakuan 4 dan 5 dari 5 kelompok perlakuan dan 25 ekor tikus. Oleh karena itu dibutuhkan 30 ekor tikus yang dibagi menjadi enam kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Penambahan 1 ekor tikus di setiap kelompok perlakuan ini untuk menghindari terjadinya *loss of sample*.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah ekstrak daun binahong dengan dosis 17,5 mg/kgBB/hari, 35 mg/kgBB/hari, dan 70 mg/kgBB/hari yang diberikan setiap hari selama dua minggu secara sonde. Variabel terikat pada penelitian ini adalah MDA ginjal.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Waktu penelitian akan dilakukan pada bulan Maret hingga Mei 2014. Lokasi dari penelitian yang akan dilakukan tercantum pada tabel berikut :

Tabel 4.1 Lokasi Penelitian

No.	Perlakuan	Lokasi
1.	- Pembuatan ekstrak daun binahong - Uji Kualitatif senyawa binahong	Laboratorium Farma- kognosi dan Fitoterapi Prodi Farmasi FKUB
2.	- Pemeliharaan hewan coba - Penginduksian diet tinggi lemak - Pengambilan dan penimbangan organ ginjal - Pembuatan homogenat sampel	Laboratorium Faal FKUB
3.	- Injeksi streptozotocin - Pemeriksaan kadar MDA	Laboratorium Farmakologi FKUB

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan dan alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini, antara lain:

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini tertulis pada tabel Tabel

##### 4.2.

Tabel 4.2 Bahan-bahan Penelitian

No.	Perlakuan	Bahan
1.	Pakan normal (25 gram/ekor/hari)	PARS 53,87 % (pakan ternak yang mengandung 63,8 % karbohidrat, 5 % lemak, 19 % protein), tepung terigu 26,94 %, dan air 19,18 %.
2.	Diet tinggi lemak (25 gram/ekor/hari)	PARS 50 %, tepung terigu 25 %, kolesterol 1 %, asam cholat 0,1 %, minyak babi 2,5 %, dan air 21,4 %.
3.	Pembuatan ekstrak daun binahong	200 gram serbuk kering daun binahong dan 3 liter etanol 70 %.
4.	Uji kualitatif senyawa binahong	Ekstrak daun binahong Untuk uji alkaloid: larutan HCl, reagen dragendorff Untuk uji flavonoid: methanol, larutan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Untuk uji saponin: air
5.	Induksi streptozotocin	100 gram streptozotocin, buffer sitrat pH 4
6.	Tes toleransi glukosa	7,2 gram glukosa dan 14,4 ml aquades destilata
7.	Perlakuan treatment glimepiride	Glimepiride 5 tablet @4 mg
8.	Pengukuran kadar MDA ginjal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pembuatan homogenat ginjal tikus: Ginjal tikus, NaCl 0,9 % dingin, Larutan Tris KCl (10mM ; pH 7,6).</li> <li>• Pemeriksaan MDA: TCA (Tri Chloride Acetid Acid) 100 %, Larutan HCl 1 N, Na Thiobarbiturat 1 %, akuades.</li> </ul>

#### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standart peralatan laboratorium.

Alat-alat yang digunakan selama proses penelitian terdapat pada Tabel 4.3 :

Tabel 4.3 Peralatan Penelitian

Tahap Penelitian	Alat
Pemeliharaan hewan coba	Kandang + tutup anyaman kawat, botol air, rak tempat kandang, sekam, timbangan merk <i>Sartorius melter</i> (ketelitian 0,1 kg)
Induksi diabetes mellitus	Disposable spuit 1 ml, disposable spuit 3 ml, labu ukur 50 ml, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, beaker glass, aluminium foil, tabung eppendorf, alat inhalasi, pH meter, vial kosong steril, <i>glucose check test</i>
Pembuatan ekstrak binahong	Timbangan digital, kertas timbang, sendok penyus, dua buah toples, batang pengaduk, corong, stirer, gelas ukur, tissue, kain flanel, kertas saring, cawan porselen, rotari evaporator dan oven
Pemberian ekstrak binahong	Beaker glass, batang pengaduk, sonde
Uji Fitokimia ekstrak Binahong	Tabung reaksi, pipet tetes, tissue, plat porselin, pembakar spiritus
Pengambilan dan penimbangan berat ginjal	Timbangan merk <i>Sartorius melter</i> (ketelitian 0,1 kg), pot untuk organ + label, gunting bedah, pinset, gelas arloji, cawan petri, papan bedah, pin, beaker glass, kertas saring, kamera digital
Pembuatan homogenate	Oven suhu 50° C, penangas air, tabung reaksi, pot untuk organ, pendingin suhu 4° C, beaker glass, sentrifugator, labu ukur, pelumat jaringan (blender), Erlenmeyer, labu semprot, sudip, pipet tetes, kaca arloji
Pengukuran kadar MDA	Spektrofotometer uv-vis, kuvet, tissue, waterbath, sentrifugator, vial, pipet tetes, mikropipet, tabung reaksi, labu ukur, corong pisah

#### 4.6 Definisi Operasional

- a) Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit kronik yang terjadi karena penurunan sensitifitas dan defisiensi insulin secara relatif.
- b) Daun Binahong dalam penelitian ini diperoleh dari Materia Medika Batu, Malang.

- c) Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berusia 75-90 minggu dengan berat badan antara 200-300 gram, karena hewan coba ini dapat mensimulasikan kondisi diabetes melitus tipe 2 setelah dilakukan diet tinggi lemak dan induksi streptozotocin 35 mg/kgBB.
- d) Diet tinggi lemak adalah pakan tinggi kolesterol yang dimodifikasi dengan formulasi tertentu untuk menghasilkan keadaan obesitas pada hewan coba tikus yang terdiri atas konsentrat PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air sebesar 21,4%.
- e) Malondialdehid (MDA) adalah produk dari peroksidasi lipid yang berguna sebagai penanda besarnya stress oksidatif.
- f) Kadar Malondialdehid (MDA) pada ginjal adalah parameter yang diukur untuk menentukan tingkat kerusakan oksidatif sel / jaringan akibat radikal bebas. Pengukuran dilakukan dengan metode thiobarbituric acid (TBA) (Widiyanto, 2002).

#### **4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Persiapan Kandang**

- Menyiapkan rak besi sebagai tempat kandang tikus.
- Menyiapkan kandang dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari kawat dan di dalamnya diberi sekam.
- Menyiapkan tempat minum tikus.

##### **4.7.2 Persiapan Hewan Coba**

- Seleksi hewan yang digunakan sebagai model sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih strain wistar.

- Tikus yang telah diseleksi, diadaptasi dengan cara tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dan diberi pakan normal serta minum selama 1 minggu.
- Dua kelompok tikus terdiri dari kelompok I dan kelompok II sebagai kontrol, sedangkan empat kelompok lainnya yaitu kelompok III, IV, V, dan VI mendapatkan intervensi.

#### 4.7.3 Penimbangan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan dengan menggunakan timbangan digital. Sebelum dilakukan penimbangan terhadap tikus, timbangan dinyalakan terlebih dahulu, kemudian diposisikan pada angka nol, selanjutnya wadah tikus diletakkan pada timbangan dan dikalibrasi. Setelah timbangan menunjukkan angka nol, maka tikus dimasukkan dalam wadah dan dibaca angka yang terdapat pada layar dengan satuan gram (g).

#### 4.7.4 Pembuatan Pakan Normal

- Jumlah makanan rata-rata 25 gram/hari untuk setiap tikus.
- 25 gram makanan mengandung konsentrat PARS 13,46 gram/hari dan tepung terigu 6,73 gram/hari.

#### 4.7.5 Pembuatan Diet Tinggi Lemak

- Jumlah makanan rata-rata 25 gram/hari untuk setiap tikus.
- 25 gram makanan mengandung konsentrat PARS 12,5 gram/hari, tepung terigu 6,25 gram/hari, kolesterol 0,25 gram/hari, asam cholat 0,025 gram/hari, dan minyak babi 0,625 gram/hari.

#### 4.7.6 Pembuatan Larutan Streptozotocin

1. Streptozotocin (STZ) 312 mg dilarutkan dalam aquabidest steril (sediaan larutan STZ 11mg/0,5ml)
2. Dilakukan pengecekan pH larutan menggunakan kertas pH; jika pH larutan 4,5 maka larutan dapat langsung disimpan, namun jika pH lebih dari 4,5 digunakan asam sitrat 0,1M hingga mencapai pH 4,5
3. Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C sebelum diinjeksikan.

#### 4.7.7 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang.
2. Larutan STZ 35 mg/kgBB/hari diinjeksikan secara intraperitoneal (IP) sekali (Srinivasan *et al.*, 2005) setelah 5 minggu pemberian diet tinggi lemak. Larutan STZ ini dimasukkan ke dalam spuit yang telah disiapkan.
3. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya.
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan etanol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian hatinya.
5. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.
6. STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan etanol 70% kembali.
7. Setelah induksi STZ ditunggu selama 1 minggu, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah.

#### 4.7.8 Pemberian Induksi Glukosa

1. Tikus dipuasakan selama 12 jam (H0) setelah mendapat induksi diet tinggi lemak selama 5 minggu dan injeksi STZ selama dua hari.
2. Induksi glukosa diberikan secara sonde dengan dosis 1 g/kgbb tikus (Siegel *et al.*,1980).
  - Cara pembuatan larutan glukosa 20% untuk tes toleransi glukosa (untuk 30 tikus dengan berat @220gram):
    1. Menyiapkan glukosa sebesar 6,6 gram.
    2. Glukosa dilarutkan dalam *aqua pro injectio* sebesar 33 ml dan di-vortex hingga homogen.

#### 4.7.9 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang dengan serbet.
2. Ujung ekor diusap dengan kapas mengandung alkohol lalu ditusuk jarum.
3. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka.
4. Darah ditempelkan pada stik alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya.
  - a. Pemeriksaan glukosa darah puasa (GDP) dilakukan sebelum diberikan terapi hari pertama (H0), hari ketujuh (H7), dan hari ke-15 (H15). Pemeriksaan glukosa darah puasa pada H0 dilakukan untuk memastikan tikus telah dalam kondisi DM dengan kadar glukosa >200mg/dL. Pemeriksaan selanjutnya dilakukan untuk mengetahui progresivitas dari terapi yang diberikan.
  - b. Pemeriksaan profil glukosa darah pada H1, H7, dan H15

- Pemeriksaan profil glukosa pada hari pertama bertujuan untuk mengetahui toleransi glukosa pada tikus dan mengetahui efek dari ekstrak binahong setelah pemberian terhadap kadar glukosa darah tiap 2 jam selama 10 jam.
- Tikus dipuaskan selama 12 jam pada hari sebelumnya (mulai malam hari).
- Setelah puasa 12 jam dilakukan pengukuran GDP lalu diberikan induksi glukosa oral (semua kelompok), setelah 30 menit dilakukan pengecekan glukosa darah kembali. Selanjutnya diberikan terapi ekstrak binahong (kelompok III, IV, dan V), dan glimepiride (kelompok VI) dengan sonde.
- Pengukuran glukosa darah dilakukan setiap 2 jam setelah pemberian terapi dalam rentang waktu 10 jam.

#### 4.7.10 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong

- 1) Serbuk kering daun binahong ditimbang 200 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- 2) Serbuk dimasukan dalam toples 1, ditambahkan 2 liter etanol 70%.
- 3) Campuran serbuk kering daun binahong dan etanol 70% distirer selama 1 jam dengan kecepatan 450 rpm (dimatikan tiap 30 menit).
- 4) Toples 1 kemudian ditutup dan didiamkan selama 24 jam.
- 5) Setelah 1 x 24 jam toples 1 dibuka, maserat disaring menggunakan kain flanel dan hasil maserasi ditampung dalam toples 2.
- 6) Ampas hasil maserasi dimasukkan kembali ke toples 1 dan ditambahkan 2 liter etanol 70% sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga merata (proses remaserasi pertama).

- 7) Toples 1 ditutup kembali dan didiamkan selama 1 x 24 jam.
- 8) Setelah 1 x 24 jam, maserat kembali disaring menggunakan kain flanel, dan hasil penyaringan dimasukkan ke dalam toples 2 (dicampur dengan hasil penyaringan pertama).
- 9) Prosedur 6 sampai 8 diulangi (remaserasi kedua).
- 10) Setelah didapatkan ekstrak etanol daun binahong berwarna hitam, kemudian ekstrak dirotary evaporator dengan suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm hingga didapatkan ekstrak kental.
- 11) Ekstrak yang sudah kental dikeringkan hingga menjadi serbuk dengan proses *freeze drying* selama  $\pm 24$  jam.
- 12) Ekstrak yang telah menjadi serbuk ditempatkan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan dalam lemari es.

#### **4.7.11 Uji Kualitatif Senyawa dalam Ekstrak Daun Binahong**

##### **4.7.11.1 Uji Alkaloid**

Ekstrak dilarutkan dalam HCl lalu ditambahkan dengan reagen Wagner (iodin dalam kalium iodida). Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna coklat atau kemerahan (Pederson, 2006).

##### **4.7.11.2 Uji Saponin**

Uji saponin dengan cara mencampurkan 0,5 gram sampel dengan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan tersebut didinginkan kemudian dikocok dan timbul busa selama  $\pm 10$  menit.

##### **4.7.11.3 Uji Flavonoid**

Uji flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 gram sampel dengan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan

lima tetes  $H_2SO_4$  terbentuknya warna merah karena penambahan  $H_2SO_4$  menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Kristina *et al.*, 2009).

#### 4.7.12 Pemberian Ekstrak Daun Binahong dan Glimepiride ke Tikus yang Telah Diinduksi

Terapi ekstrak daun binahong diberikan pada kelompok III, IV, dan V, sedangkan glimepiride pada kelompok VI. Pemberian ekstrak daun binahong dan glimepiride dilakukan dengan menggunakan sonde setiap hari selama dua minggu. Pemberian terapi diberikan 30 menit setelah pemberian pakan. Ekstrak daun binahong diberikan setelah dilarutkan dengan air. Glimepiride diberikan dalam bentuk suspensi dengan *suspending agent* carboxymethylcellulose (CMC).

- i. Pembuatan larutan ekstrak daun binahong
  - Serbuk ekstrak daun binahong ditimbang 250 mg.
  - Dilarutkan dalam 25 ml *water for injection* (WFI).
  - Divortex hingga homogen sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1% (diberikan pada kelompok PC sesuai dosis).
  - Dilakukan pengenceran dari larutan stok hingga didapatkan konsentrasi 0,5% (untuk kelompok PB) dan 0,25% untuk kelompok PA).
- ii. Pembuatan suspensi glimepiride
  - CMC ditimbang sebanyak 50 mg.
  - Dilarutkan dalam 1ml *water for injection* (WFI), diaduk hingga mengembang seperti gel.
  - Ditambahkan 10ml *water for injection* (WFI) dan diaduk hingga homogen.

- Ditambahkan tablet glimepiride 2mg yang telah digerus halus.
- Diaduk dan divortex hingga homogen.

#### 4.7.13 Pembedahan

Setelah dua minggu pemberian treatment, tikus dieuthanasia dengan inhalasi kloroform. Tikus yang telah dieuthanasia dibedah berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di laboratorium FAAL FKUB. Tikus yang telah dilakukan euthanasia, selanjutnya dilakukan insisi pada daerah perut sampai diafragma untuk pengambilan darah jantung sebanyak 10 ml (untuk penelitian kadar serum insulin dan lipid oleh peneliti lain). Selain itu, dilakukan insisi di bagian organ ginjal. Ginjal diambil untuk pengukuran MDA.

#### 4.7.14 Pembuatan Homogenat Ginjal

1. Ginjal tikus diperfusi dengan larutan BPS dingin
2. Ditimbang seberat 200 mg
3. Dihaluskan dengan mortar hingga homogen
4. Ditambahkan 1 ml buffer Tris *KCl* pH 7,6
5. Ditambahkan 100  $\mu$ L TCA 100 %, vortex hingga homogen
6. Ditambahkan 100  $\mu$ L Na-Thiobarbituric acid 10 %
7. Diinkubasi 25 menit pada suhu 105 °C, lalu biarkan dingin
8. Kemudian sentrifuse 2000 rpm selama 10 menit
9. Ambil supernatan, ukur secara spektrofotometer  $\lambda$  maksimum (532 nm).

#### 4.7.15 Pengukuran kadar MDA pada Ginjal

Tikus dimatikan menggunakan inhalasi kloroform, diperiksa kadar malondialdehyde (MDA) homogenat ginjal. Konsentrasi MDA pada homogenat ginjal ditentukan dengan metode thiobarbituric acid (TBA). Penentuan kadar

MDA jaringan menggunakan satuan png/100 mg jaringan, karena pada jaringan diperhitungkan kadar MDA per 100 mg jaringannya. Prinsip yang digunakan adalah adanya pengaruh asam dan panas akan menyebabkan dekomposisi lemak peroksida membentuk MDA. MDA direaksikan dengan TBA akan terjadi perubahan warna yang diukur melalui pemeriksaan spektrofotometer pada panjang gelombang 531 nm.

#### 4.7.16 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya:

##### 4.7.16.1 Pengukuran Berat Badan Tikus

**Tabel 4.4 Pengukuran Berat Badan Tikus**

Waktu Kelompok	Fase Adaptasi (1 minggu)	Diet Tinggi Lemak (5 minggu)	Injeksi STZ (1 Minggu)	Fase Terapi (2 minggu)
I	dilakukan 1 kali (awal penelitian)	dilakukan 1 minggu sekali	dilakukan 1 minggu sekali	dilakukan 1 minggu sekali
II			dilakukan 1 hari sekali	dilakukan 1 hari sekali
III				
IV				
V				
VI				

- ✓ Penimbangan dilakukan pada awal penelitian (semua kelompok), lalu saat pemberian diet tinggi lemak dilakukan penimbangan setiap minggu. Penimbangan selanjutnya dilakukan sebelum injeksi STZ untuk menentukan dosis dari STZ, dan setiap dua hari sekali setelah injeksi hingga pada akhir fase pemberian terapi. Penimbangan pada fase pemberian terapi ditujukan untuk menentukan dosis ekstrak daun binahong (kelompok III, IV dan V) serta glimepiride (kelompok VI) yang akan diberikan.

4.7.16.2 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Tabel 4.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

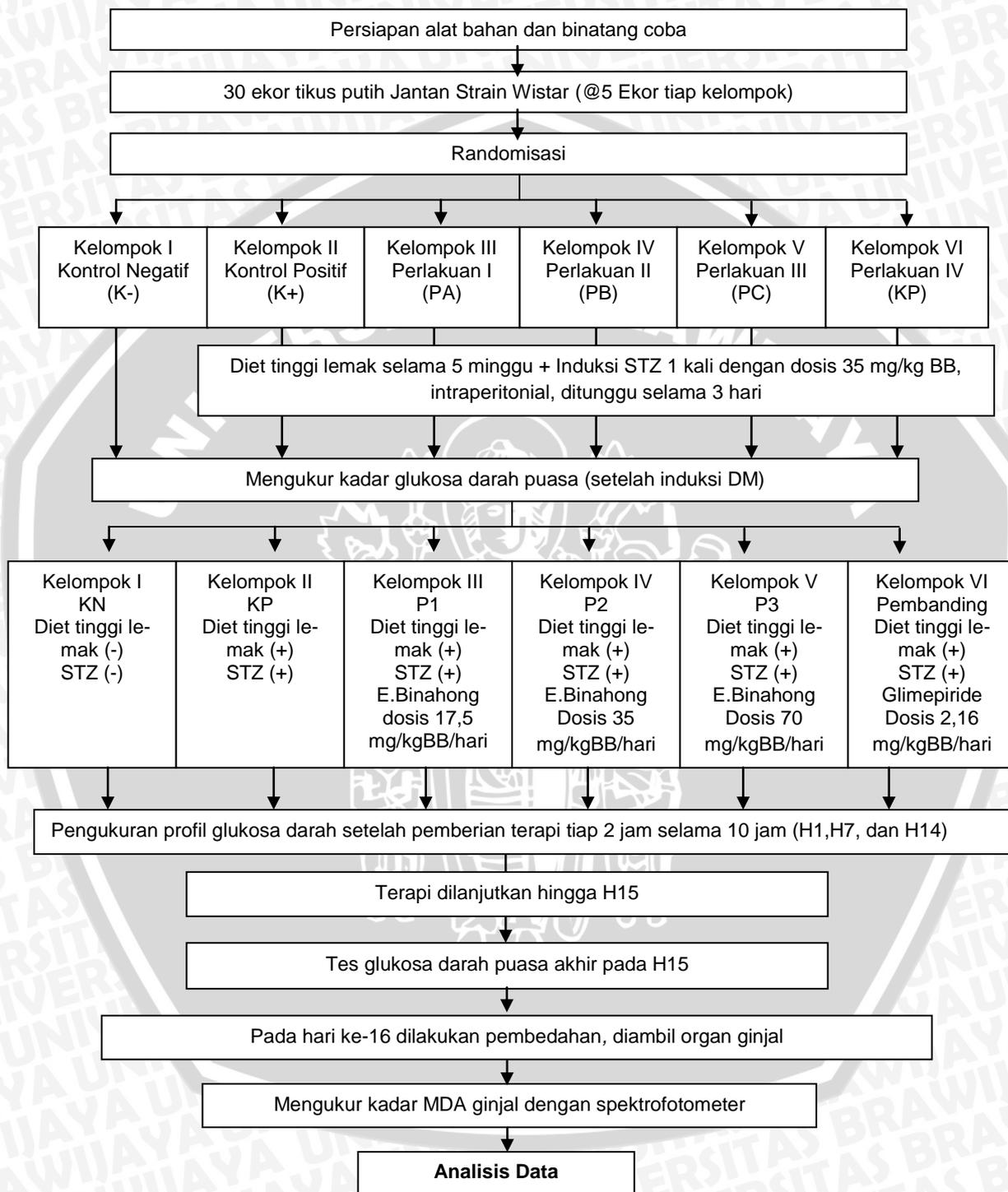
Waktu Kelompok	Fase Adap-tasi (Minggu ke-1)	Induksi DM 2 (Minggu ke-2 hingga ke-7)	Terapi (Minggu ke-8 dan ke-9)
I	sebelum pem-berian diet tinggi lemak	sebelum dilakukan injeksi stz dan dua hari setelah injeksi stz	GDP dan 6 kali setiap pengamatan profil glukosa darah pada H1, H7, H14, dan GDP sebelum dimat-ikan.
II			
III			
IV			
V			
VI			

- ✓ Kadar glukosa darah diukur sebelum induksi diabetes mellitus tipe 2, selama induksi diabetes mellitus tipe 2 dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah setelah pemberian diet tinggi lemak selama 5 minggu (sebelum penginjeksian STZ) untuk memastikan bahwa tidak dalam kondisi hipoglikemia ataupun hiperglikemia, pemeriksaan kadar glukosa darah selanjutnya dilakukan kembali setelah 2 hari penginjeksian STZ untuk mengetahui tikus dalam te-lah dalam kondisi diabetes atau tidak. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah pada saat pemberian terapi. Pada hari pertama (H1), hari ketujuh (H7), dan hari ke-14 (H14) dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa, 30 menit setelah induksi glukosa oral, dan tiap 2 jam selama 10 jam yang bertujuan untuk mengetahui toleransi glukosa pada tikus dan profil penurunan glukosa darah setelah pemberian ekstrak daun binahong. Pemeriksaan kadar glukosa darah selanjutnya dilakukan sebelum tikus di-matikan.
- ✓ Kadar MDA diukur langsung setelah pembedahan dan pembuatan homoge-nat ginjal.

#### 4.8 Pengolahan dan Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini akan diolah secara komputerisasi. Pertama dilakukan uji normalitas, karena data yang didapat normal, lalu analisis statistik dengan *one way* ANOVA dengan menggunakan SPSS 20. *One Way* Anova digunakan untuk menguji hipotesis komparatif lebih dari dua sampel secara serempak bila setiap sampel terdiri atas satu kategori (Sugiyono, 2006). *One Way* ANOVA digunakan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan atau tidak yaitu diet normal, diet tinggi lemak dan induksi STZ dengan pemberian ekstrak binahong pada dosis I, II, III. Variabel bebas yaitu pemberian ekstrak daun binahong per oral dan variabel tergantung yaitu kadar MDA ginjal kemudian dicari median dan standard deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) dimana apabila diperoleh  $p > 0,05$  artinya tidak ada perbedaan yang nyata, sebaliknya bila  $p < 0,05$  menunjukkan ada perbedaan yang bermakna. Pengujian *One Way* ANOVA tidak dilakukan jika dalam uji normalitas dan homogenitas data tidak mempunyai sebaran normal dan homogen, sehingga dapat dilakukan uji nonparamerik dengan uji Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis dikatakan signifikan apabila nilai  $p < 0,05$ .

### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Alur penelitian