

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) menggunakan jenis *pre-post test* dengan kelompok kontrol. 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 jantan model DM 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 putih (*Rattus norvegicus*) wistar
- 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 cacat fisik
- Tikus mati

4.2.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

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 K- : tikus tanpa induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dan tidak diberikan ekstrak daun binahong sebagai kontrol negatif.

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

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

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

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

Kelompok KP : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan Glimpiride 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 setiap kelompok 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 terdapat 2 ekor tikus mati dari 25 ekor tikus pada kelompok pemberian induksi DM tipe 2. Selain itu juga disebutkan oleh peneliti Susilowati (2011), yang menguji efek ekstrak daun Pare (*Momordica charantia*) terhadap jumlah sel beta pankreas tikus wistar DM tipe 2 dengan *High Fat Diet* dan STZ, terdapat 2 ekor tikus yang mati pada kelompok perlakuan induksi DM dari 25 ekor tikus yang digunakan. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Penambahan 1 ekor tikus di setiap kelompok perlakuan ini untuk menghindari terjadinya kekurangan data pada saat penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah ekstrak daun binahong dengan dosis 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, dan 70 mg/kgBB yang diberikan setiap hari selama dua minggu secara sonde. Dosis merupakan hasil konversi dari mencit ke tikus dari penelitian Sukandar *et al.* (2013) dan tercantum pada lampiran 7. Variabel terikat pada penelitian ini adalah glikogen hati.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga Mei 2014. Lokasi dari penelitian yang akan dilakukan tercantum pada tabel 4.1:

Tabel 4.1 Lokasi Penelitian

No.	Perlakuan	Lokasi
1.	<ul style="list-style-type: none">- Pembuatan ekstrak daun binahong- Uji Kualitatif senyawa binahong	Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Prodi Farmasi FKUB
2.	<ul style="list-style-type: none">- Pemeliharaan hewan coba- Pemberian diet tinggi lemak- Pengambilan dan penimbangan organ hati- Pembuatan homogenat sampel- Pemeriksaan kadar glikogen	Laboratorium Faal FKUB
3	<ul style="list-style-type: none">- Penginduksian streptozotocin dosis tunggal 35 mg/kgBB	Laboratorium Farmakologi FKUB



4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Tabel 4.2 Bahan-bahan Penelitian

Tahap Penelitian	Bahan
Pakan normal hewan coba (25 gram/ekor/hari)	PARS 53,87% (pakan temak yang mengandung 63,8% karbohidrat, 5% lemak, 19% protein), tepung terigu 26,94%, dan air 19,18%.
Diet tinggi lemak hewan coba (25 gram/ekor/hari)	PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1 %, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air 21,4%.
Pembuatan ekstrak daun binahong	400 gram serbuk kering daun binahong dan 6 liter etanol 70%.
Uji kualitatif senyawa binahong	Ekstrak daun binahong <ul style="list-style-type: none"> - Untuk uji alkaloid: larutan HCl, reagen Wagner - Untuk uji flavonoid: metanol, larutan H₂SO₄ - Untuk uji saponin: air
Induksi streptozotocin	312 gram streptozotocin, buffer sitrat pH 4
Tes toleransi glukosa	6,6 gram glukosa dan 33 ml <i>aqua pro injection</i>
Pembuatan suspensi glimepiride	Glimepiride 2 tablet, 11 ml <i>aqua pro injectio</i> , CMC-Na 50 g
Pengukuran kadar glikogen hati	Organ hati tiap sampel 1 gram, larutan KOH 30%, aquades, etanol 95%, anthrone-asam sulfat 0,2% (w/v), dan standart glukosa.

4.5.2 Alat Penelitian

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 daun binahong	Timbangan digital, kertas timbang, sendok penyusut, dua buah toples, batang pengaduk, corong, stirer, gelas ukur, tissue, kain flanel, kertas saring, cawan porselen, rotari evaporator dan <i>freeze dryer</i>
Pemberian ekstrak daun binahong, glimepiride, dan glukosa	Beaker glass, batang pengaduk, sonde
Uji kualitatif senyawa binahong	Tabung reaksi, pipet tetes, tissue, plat porselin, pembakar spiritus
Pengambilan dan penimbangan berat organ hati	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
Preparasi organ hati sebelum pengukuran	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 glikogen hati	Spektrofotometer uv-vis, kuvet, tissue, waterbath, sentrifugator, vial, pipet tetes, mikropipet, tabung reaksi, labu ukur, corong pisah

4.6 Definisi Operasional

- a) Serbuk kering daun binahong dalam penelitian ini diperoleh dari Materia Medika Batu, Malang.
- b) 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%.
- c) Streptozotocin (STZ) adalah obat yang bekerja pada sel beta pankreas dengan cara merusak DNA (*DNA Alkylating*) yang ditandai adanya perubahan pada insulin darah dan konsentrasi glukosa.
- d) Glikogen adalah sumber polisakarida utama pada sel manusia dan hewan atau merupakan suatu simpanan dari glukosa.
- e) Kadar glikogen hati adalah kadar glikogen dalam hati yang diukur dengan spektrofotometer dan menggunakan persamaan garis kurva standard glikogen pada setiap kelompok tikus (Suarsana *et al.*, 2010).

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Penelitian

4.7.1.1 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.

4.7.1.2 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.

4.7.1.3 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).

4.7.1.4 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.

4.7.1.5 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.

4.7.1.6 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Pembuatan larutan STZ sesuai dengan prosedur yang terdapat di Laboratorium Farmakologi FKUB, ialah sebagai berikut:

- 1) Streptozotocin (STZ) ditimbang sebanyak 312 mg, ditambahkan aquadest steril kemudian dilarutkan hingga homogen (sediaan larutan STZ 11 mg/0,5 mL).
- 2) Mengecek pH larutan STZ dengan menggunakan kertas pH, jika pH larutan sudah mencapai 4,5 maka larutan dapat langsung disimpan. Namun jika pH larutan lebih dari 4,5 maka digunakan asam sitrat 0,1 M untuk menurunkan pH dan tidak boleh lebih rendah dari 4,5 karena tidak dapat dinaikkan kembali.
- 3) Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C sebelum diinjeksikan.

4.7.1.7 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

- 1) Berat badan tikus ditimbang.
- 2) Larutan STZ dosis tunggal 35 mg/kgBB 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 dua hari, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah.

4.7.1.8 Pemberian Induksi Glukosa

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

4.7.1.9 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

- 1) Tikus dipegang dengan serbet.
- 2) Ujung ekor diusap dengan kapas mengandung etanol 70% dan ditusuk jarum.
- 3) Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka.
- 4) Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya.
 - a) Pemeriksaan glukosa darah puasa (GDP) dilakukan pada hari sebelum pemberian terapi (H0) dan hari setelah pemberian terapi

yaitu hari ketujuh (H7) dan hari ke-15 (H15). Pemeriksaan H0 untuk mengetahui kondisi tikus telah DM dengan kadar glukosa darah >200 mg/dL. Pemeriksaan H7 dan H15 bertujuan 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 dipuasakan selama 12 jam pada hari sebelumnya
- 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) melalui sonde.
- Pengukuran glukosa darah dilakukan setiap 2 jam setelah pemberian terapi ekstrak daun binahong dan glimepiride dalam rentang waktu 10 jam.

4.7.1.10 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong

- 1) Serbuk kering daun binahong ditimbang 400 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- 2) Serbuk dimasukkan dalam toples 1, ditambahkan 2 liter etanol 70%.
- 3) Campuran serbuk kering daun binahong dan etanol 70% distirer selama 30 menit pertama dengan kecepatan 500 rpm lalu dimatikan.

- 4) Setelah distirer 30 menit pertama, maka campuran serbuk kering daun binahong dan etanol 70% distirer kembali selama 30 menit kedua dengan kecepatan 500 rpm.
- 5) Toples 1 kemudian ditutup dan didiamkan selama 24 jam.
- 6) Setelah 1 x 24 jam toples 1 dibuka, maserat disaring menggunakan kain flanel dan hasil maserasi ditampung dalam toples 2.
- 7) Ampas hasil maserasi dimasukkan kembali ke toples 1 dan ditambahkan 1 liter etanol 70% sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga merata (proses remaserasi pertama).
- 8) Toples 1 ditutup kembali dan didiamkan selama 1 x 24 jam.
- 9) Setelah 1 x 24 jam, maserat kembali disaring menggunakan kain flanel, dan hasil penyaringan dimasukkan ke dalam toples 2 (dicampur dengan hasil penyaringan pertama).
- 10) Prosedur 6 sampai 9 diulangi (remaserasi kedua).
- 11) Setelah didapatkan ekstrak etanol daun binahong berwarna hitam, kemudian ekstrak di rotary evaporator dengan suhu 50° C dan kecepatan 120 rpm selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak kental.
- 12) Ekstrak yang sudah kental dikeringkan hingga menjadi serbuk dengan proses *freeze drying* selama ± 24 jam.
- 13) Ekstrak yang telah menjadi serbuk kemudian ditempatkan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan dalam lemari es.

4.7.1.11 Uji Kualitatif Senyawa dalam Ekstrak Daun Binahong

4.7.1.11.1 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).

4.7.1.11.2 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 ± 10 menit. Hasil positif adanya saponin ditunjukkan dengan timbulnya busa setelah dilakukan pengocok.

4.7.1.11.3 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).

4.7.1.12 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Binahong

1. Serbuk ekstrak daun binahong ditimbang 250mg.
2. Dilarutkan dalam 25ml *water for injection* (WFI).
3. Divortex hingga homogen sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1% (diberikan pada kelompok PC sesuai dosis).
4. Dilakukan pengenceran dari larutan stok hingga didapatkan konsentrasi 0,5% (untuk kelompok PB) dan 0,25% untuk kelompok PA).

4.7.1.13 Pembuatan Suspensi Glimepiride

1. 50 mg CMC-Na sebagai agen pensuspensi dilarutkan dalam 1 ml aqua pro injectio, diaduk hingga homogen, mengembang seperti gel.
2. Ditambahkan 10 ml aqua pro injectio lalu aduk hingga homogen.
3. Masukkan 2 tablet glimepiride 2 mg yang sebelumnya telah digerus halus ke larutan CMC-Na dan aqua pro injection tadi.
4. Aduk rata hingga homogen atau dapat menggunakan vortex.

4.7.1.14 Pemberian Ekstrak Daun Binahong dan Glimepiride ke Tikus yang Telah Diinduksi

Ekstrak daun binahong diberikan pada kelompok III, IV, dan V, sedangkan glimepiride pada kelompok VI. Pemberian ekstrak daun binahong dan suspense glimepiride dilakukan dengan menggunakan sonde setiap hari selama dua minggu. Pemberian ekstrak daun binahong dan glimepiride pada hari pertama terapi yaitu diberikan 30 menit setelah induksi glukosa. Ekstrak daun binahong dan glimepiride diberikan setelah dilarutkan dengan air secukupnya.

4.7.1.15 Pembedahan

Setelah dua minggu pemberian terapi, tikus dieuthanasia dengan inhalasi kloroform. Tikus yang telah dieutanasia dibedah berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di laboratorium FAAL FKUB. Tikus yang telah dilakukan euthanasia, selanjutnya dilakukan insisi pada daerah perut. Organ hati diambil 1 gram dari tiap sampel. Setelah itu, hati dikeringkan dalam oven pada suhu 50° C selama satu malam. Selanjutnya organ hati yang telah kering digerusan menjadi satu hingga menyerupai tepung (tiap sampelnya). Lalu dilakukan pengukuran kadar glikogen hati sesuai metode yang telah dilakukan oleh Suarsana *et al.*, (2010).

4.7.1.16 Pengukuran Kadar Glikogen Hati

1. Sampel organ hati yang telah menjadi tepung diambil 100 mg.
2. Diekstraksi dengan 1 ml Larutan KOH 30% untuk melisiskan jaringan dan diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 20 menit, diletakkan pada suhu ruang hingga dingin.
3. Ditambahkan 1,5 ml etanol (95%) dingin ke dalam tabung sampel untuk melarutkan lemak dan disimpan suhu 4° C selama 30 menit.
4. Disentrifugasi kecepatan 2500 rpm selama 20 menit untuk memisahkan endapan yang mengandung glikogen dan filtrat yang mengandung lemak.
5. Endapan yang diperoleh diencerkan dengan 1 ml aquades, diambil 100 µL sampel lalu ditambahkan 3 ml anthrone-asam sulfat 0,2% (w/v) sampai timbul panas. Timbulnya warna hijau menunjukkan sampel positif mengandung glikogen.
6. Reaksi perubahan warna yang terjadi selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Kadar glikogen sampel diukur menggunakan persamaan garis kurva standard glukosa.
7. Hasil absorbansi selanjutnya dikonversi untuk mendapatkan data kadar glikogen hati (µg/100mg) dengan menggunakan persamaan (Seifter *et al.*,1949):

$$\text{Kadar Glikogen Hati } (\mu\text{g}/100\text{mg}) = \frac{100 \times U}{1,11 \times S}$$

Keterangan:

U = absorbansi dari sampel

S' = absorbansi dari 100 µg glukosa standard

1,11 = faktor ketetapan Morris untuk konversi glukosa menjadi glikogen

4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya :

a. Sisa Pakan Tikus

Sisa pakan tikus ditimbang setiap hari setelah pemberian diet tinggi lemak selama 5 minggu dan saat diberikan pakan normal pada masa setelah injeksi STZ hingga akhir masa terapi.

b. Berat Badan

Waktu pengumpulan data dengan parameter berat badan yang diukur tertera pada tabel 4.4 :

Tabel 4.4 Waktu Pengumpulan Data Parameter Berat Badan

Waktu Kelompok	Pengkondisian hewan coba (Minggu ke-1)	Induksi diet tinggi lemak (Minggu ke-2 hingga minggu ke-6)	Induksi STZ	Treatment (Minggu ke-8 dan ke-9)
K-	Awal minggu pertama (sebelum pengkondisian hewan coba di laboratorium)	Awal minggu ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, dan ke-6	-	Dua hari sekali
K+			Sebelum injeksi	
PA				
PB				
PC				
KP				

c. Kadar glukosa darah

Kadar glukosa darah tiap tikus dilakukan pada waktu yang tertera pada tabel 4.5.

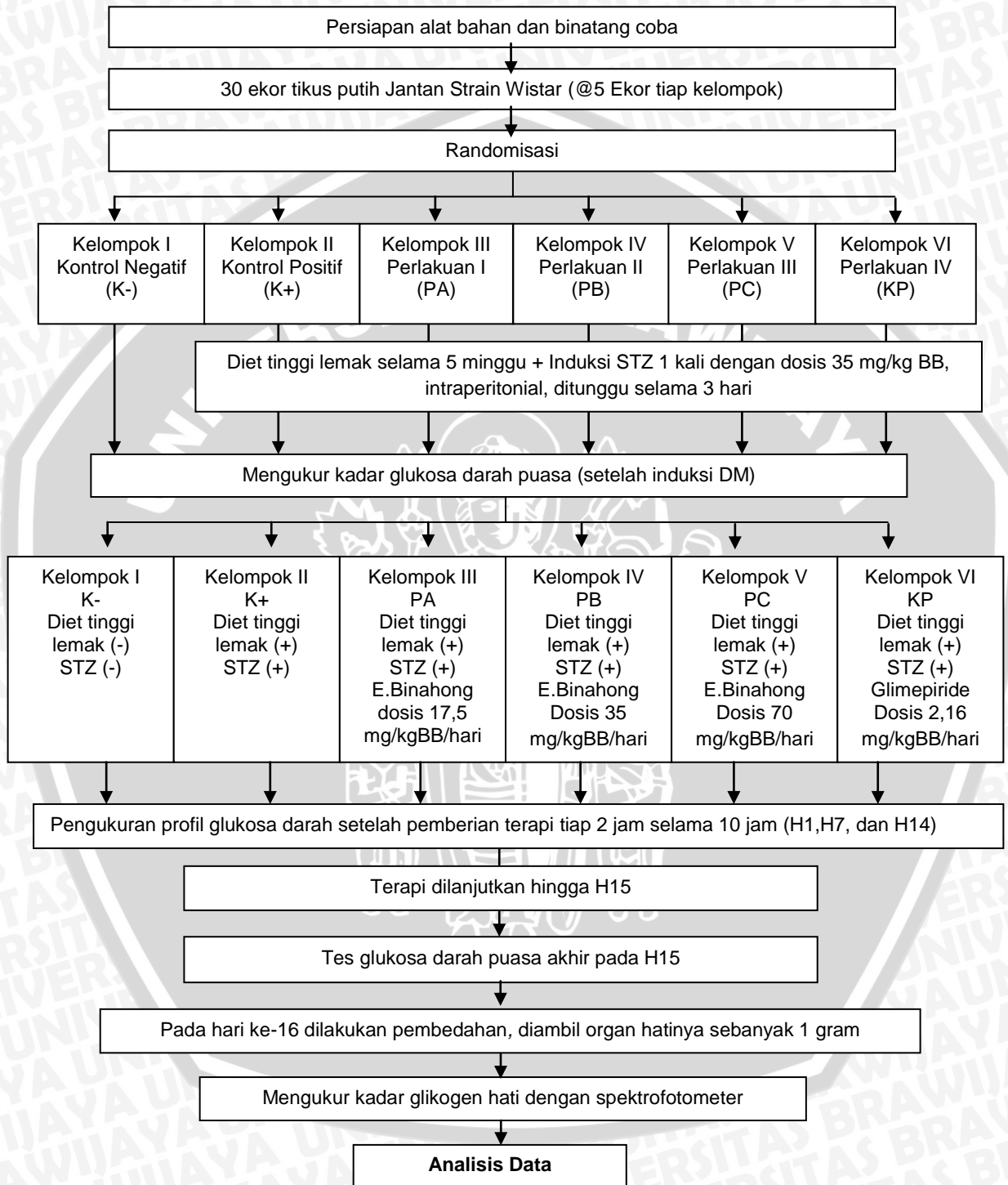
Tabel 4.5 Waktu Pengumpulan Data Parameter Glukosa Darah

Waktu Kelompok	Pengkondisian hewan coba (Minggu ke-1)	Induksi diet tinggi lemak (Minggu ke-2 hingga minggu ke-6)	Induksi STZ	Treatment (Minggu ke-8 dan ke-9)
K-	Sebelum pemberian diet tinggi lemak	Akhir minggu ke-6 sebelum injeksi STZ	Dua hari setelah injeksi STZ	GDP dan 6 kali setiap pengamatan profil glukosa darah pada H1, H7, H14, dan GDP sebelum dimatikan.
K+				
PA				
PB				
PV				
KP				

d. Kadar glikogen hati

Kadar glikogen hati diukur setelah penelitian selama sembilan minggu (akhir minggu ke-9) dengan metode spektrofotometri yang dilakukan oleh Suarsana *et al.* (2010).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis statistik dengan *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 pada penelitian ini untuk menguji apakah terdapat perbedaan secara signifikan atau tidak terhadap rata-rata dengan data lebih dari dua sampel yaitu kelompok normal, kelompok DM tipe 2, dan kelompok DM dengan pemberian ekstrak daun binahong pada dosis I, II, dan III. Variabel bebas yaitu pemberian ekstrak daun binahong per oral dengan dosis yang berbeda dan variabel tergantung yaitu kadar glikogen hati kemudian dicari mean dan standard deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), 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 nonparametrik dengan uji Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis dikatakan signifikan apabila nilai $p < 0,05$. Uji Mann Whitney digunakan untuk menguji dua sampel yang independen dan merupakan uji nonparametrik. Selanjutnya dilakukan uji Spearman untuk menguji hipotesis hubungan antara dua variabel, yaitu untuk melihat kuat lemahnya hubungan dan arah hubungan dua variabel.