

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) menggunakan jenis post test dengan kelompok kontrol (*Post Test, Control Group*). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin mengacu pada penelitian Zhang, (2008) induksi ini mampu membuat tikus model diabetes mellitus tipe 2. Sedangkan dosis ekstrak, mengacu pada penelitian Sukandar *et al.*, (2011) dengan pemberian ekstrak daun binahong 50 mg/kg BB didapatkan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan dan terjadi perbaikan pankreas pada mencit yang terinduksi aloksan. Selanjutnya dilakukan konversi dosis mencit ke tikus didapatkan dosis 35 mg/kg BB. Maka dilakukan variasi dosis 17,5 mg/kg BB, 35 mg/kg BB, dan 70 mg/kg BB.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus wistar (*Ratus norvegicus*) jantan model diabetes mellitus dengan induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin.

4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dan eksklusi ditentukan agar karakteristik sampel tidak menyimpang jauh dari populasi. Penentuan kriteria inklusi dan eksklusi ini juga dilakukan

agar anggota populasi memenuhi syarat untuk dijadikan sampel. Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi yang ditentukan:

4.2.1.1 Kriteria Inklusi

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

- Tikus jenis Wistar (*Ratus novergicus*)
- 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 anatomi
- Tikus mati

4.2.2 Sampel

Kelompok perlakuan berjumlah 6 (enam) yang dibagi secara acak, dengan ketentuan sebagai berikut :

- a) Kelompok kontrol normal : tikus tanpa induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dan tidak diberikan ekstrak daun binahong
- b) Kelompok kontrol DM2 : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35mg/kgbb tanpa diberikan ekstrak etanol daun binahong

- c) Kelompok perlakuan I : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35mg/kgbb dan diberikan ekstrak binahong dosis 17,5mg/kgbb setiap hari selama 2 minggu.
- d) Kelompok perlakuan II : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35mg/kgbb dan diberikan ekstrak binahong dosis 35mg/kgbb setiap hari selama 2 minggu.
- e) Kelompok perlakuan III : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35mg/kgbb dan diberikan ekstrak binahong dosis 70mg/kgbb setiap hari selama 2 minggu.
- f) Kelompok pembandingan : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 2 mg/kgbb dan diberikan glimerpiride dosis 0,216 mg/200 gram 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 (Arifiyah, 2007):

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

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok

t = jumlah kelompok

15 = nilai deviasi

Dari rumus tersebut, berikut penghitungan jumlah sampel penelitian

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan rumus tersebut, diperoleh perhitungan jumlah sampel dalam penelitian ialah 4 ekor tikus dan total 24 ekor tikus. Berdasarkan penelitian yang telah 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 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 novergicus*) wistar DM tipe 2 dengan *High Fat Diet* dan STZ, terdapat 2 ekor tikus yang mati pada kelompok perlakuan 4 dan 5 setelah mendapatkan perlakuan induksi STZ dan treatment ekstrak daun pare dengan dosis berbeda. Oleh karena itu, berdasarkan tingkat mortalitas yang telah diketahui dari penelitian-penelitian sebelumnya, maka ditambahkan 1 ekor tikus di setiap kelompok perlakuan. Sehingga, tikus yang akan dibutuhkan sebesar 30 ekor tikus dan di setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus untuk menghindari terjadinya *loss of sample*.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah ekstrak binahong yang diberikan dalam dosis 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, 70 mg/kgBB yang diberikan setiap hari selama dua minggu dengan sonde. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar serum insulin.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perawatan dan perlakuan hewan coba dan pengukuran kadar serum insulin. Pembuatan ekstrak daun binahong dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada Maret 2013 setelah mendapatkan persetujuan etik, dan berakhir pada akhir Mei 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

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

4.5.1 Bahan Penelitian

Berikut merupakan bahan – bahan yang digunakan selama penelitian disajikan pada table 4.1 :

Tabel 4.1. 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 Wagner Untuk uji flavonoid: methanol, larutan H ₂ SO ₄ Untuk uji saponin: air
5.	Induksi streptozotocin	100 gram streptozotocin, buffer sitrat 0,1 M
6.	Tes toleransi glukosa	7,2 gram glukosa dan 14,4 ml aquades destilata
7.	Pembuatan suspensi glimepiride	Glimepiride 5 tablet @4 mg, CMC Na, akuades
8.	Pengukuran kadar Serum Insulin	serum tikus, Insulin, ELISA kit unit

4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standart peralatan laboratorium. Berikut alat-alat pada table 4.2 yang digunakan selama proses penelitian:

Tabel 4.2 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 <i>freeze dryer</i>
Uji Fitokimia ekstrak Binahong	Tabung reaksi, pipet tetes, tissue, plat porselin, pembakar spiritus
Penimbangan berat badan tikus	Timbangan digital
Alat pemberian ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i>) pada tikus	Timbangan digital, mortar, gelas ukur, pengaduk, sonde lambuing tikus.
Pemeriksaan glukosa darah tikus	Glukometer
Pemeriksaan serum insulin	ELISA reader

4.6 Definisi Operasional

- Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit kronik yang terjadi karena penurunan sensitifitas dan defisiensi insulin secara relatif.
- Serbuk daun Binahong dalam penelitian ini diperoleh dari Materia Medika Batu, Malang.
- Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berusia 75-90 minggu dengan berat badan antara 200-250 gram, karena hewan

coba ini dapat mensimulasikan kondisi diabetes melitus tipe 2 setelah dilakukan diet tinggi lemak dan induksi streptozotocin 35mg/kgbb.

- d. Diet tinggi lemak adalah pakan tinggi kolesterol yang dimodifikasi dengan formulasi tertentu untuk menghasilkan keadaan obesitas pada hewan coba tikus
- e. STZ adalah obat yang bekerja pada sel beta pankreas dengan cara merusak DNA (DNA *Alkylating*) yang mana ditandai dengan perubahan pada insulin darah dan konsentrasi glukosa.
- f. Insulin adalah hormon yang dihasilkan oleh sel beta pancreas yang berfungsi sebagai isyarat hormonal kenaikan glukosa darah (Dorland, 2006).
- g. Kadar insulin dalam serum adalah kadar insulin yang diukur dengan metode ELISA (ng/ml) pada setiap kelompok tikus (Shibayagi, 2009)
- h. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), merupakan metode yang digunakan untuk pengukuran kadar serum insulin. Prinsip metode ini adalah pengukuran yang dilakukan dengan mengikat serum insulin oleh anti-insulin.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1. Prosedur Penelitian

4.7.1.1 Persiapan Kandang

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

4.7.1.2 Persiapan Hewan Coba

1. Seleksi hewan yang digunakan sebagai model sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih strain wistar.
2. Tikus yang telah diseleksi, diadaptasi dengan cara tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dan diberi pakan normal serta minum selama 1 minggu.
3. 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

Sebelum pemberian diet tinggi lemak, tikus ditimbang terlebih dahulu untuk dapat menentukan diet yang akan diberikan. Penimbangan berat badan dengan menggunakan timbangan digital. Sebelum dilakukan penimbangan terhadap tikus, timbangan dinyalakan dahulu, kemudian diposisikan pada angka nol, kemudian 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 dan Pemberian Diet Tinggi Lemak

1. Jumlah makanan rata-rata 25 g/hari untuk setiap tikus.
2. 25 gram makanan mengandung konsentrat PARS 12,5 g/hari, tepung terigu 6,25 gram/hari, kolesterol 0,25 gram/hari, asam cholat 0,025 gram/hari, dan minyak babi 0,625 g/hari.

4.7.1.5 Pembuatan Larutan Streptozotocin

1. Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan dalam 3 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5.
2. Larutan divortex hingga homogen.
3. Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C.

4.7.1.6 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang.
2. Larutan STZ 35 mg/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal (IP) sekali setelah 5 minggu pemberian diet tinggi lemak.
3. Tikus diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya.
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan ethanol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya.
5. STZ diinjeksikan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.
6. Segera 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.

4.7.1.7 Pemberian Induksi Glukosa

1. Tikus dipuasakan selama 12 jam (H0) setelah mendapat induksi diet tinggi lemak selama 5 minggu dan injeksi tunggal STZ selama dua hari.

2. Induksi glukosa diberikan dengan menggunakan sonde.
 - Cara pembuatan larutan glukosa 20% untuk tes toleransi glukosa (Pasaribu *et al.*, 2012)
4. Menyiapkan glukosa sebesar 6,6 gram.
5. Glukosa dilarutkan dalam *water for injection* (WFI) sebesar 33 ml dan divortex hingga homogen.

4.7.1.8 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang dengan serbet.
2. Ujung ekor diberi alkohol 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 dilakukan pada H0. Pada H0, yaitu hari kedua setelah injeksi tunggal STZ, tikus dipuasakan selama 12 jam (mulai malam hari) dan dilakukan pengecekan glukosa darah. Dikatakan Diabetes Mellitus tipe 2 jika nilainya lebih dari 200 mg/dL (odeyi *et al.*, 2012). Pemeriksaan selanjutnya dilakukan pada H1, H7, H14, dan H15.
 - b. Pemeriksaan profil glukosa darah pada H1, H7, dan H14
 - 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 (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.

4.7.1.9 Pembuatan Ekstrak Binahong

1. Serbuk kering daun binahong ditimbang 400 gram dengan menggunakan timbangan digital.
2. Serbuk dimasukan dalam toples 1, ditambahkan 1 liter etanol 70%.
3. Campuran distirer selama 1 jam dengan kecepatan 450 rpm (dimatikan tiap 30 menit).
4. Setelah 1 x 24 jam toples 1 dibuka, maserat disaring menggunakan kain flanel dan hasil maserasi ditampung dalam toples 2.
5. Ampas hasil maserasi dimasukkan kembali ke toples 1 dan ditambahkan 1 liter etanol 70 % sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga merata (proses remaserasi pertama).
6. Toples ditutup kembali dan didiamnkan selama 1 x 24 jam.

7. Setelah 1 x 24 jam, maserat kembali disaring menggunakan kain flanel, dan hasil penyaringan dimasukkan ke dalam toples 2 (dicampur dengan hasil penyaringan pertama).
8. Prosedur 6 sampai 8 diulangi (remaserasi kedua).
9. Setelah didapatkan ekstrak etanol daun binahong berwarna hitam, kemudian ekstrak di *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dengan kecepatan 30 rpm selama 1 jam.
10. Ekstrak yang sudah kental dilakukan *freeze drying* hingga didapatkan serbuk ekstrak selama ± 24 jam.
11. Ekstrak disimpan dalam wadah tertutup rapat dan lemari es.

4.7.1.10 Uji Fitokimia Kualitatif

a. Alkaloid

Ekstrak ditambah dengan reagen Wagner (iodin dalam kalium iodida. Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna coklat atau kemerahan (Pharmaceutical Chemical Analysis, 2006).

b. 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 (Lailani, 2008).

c. Flavonoid

Flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 gram sampel dengan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan 5 tetes H₂SO₄

terbentuknya warna merah karena penambahan H₂SO₄ menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Lailani, 2008).

4.7.1.11 Dosis Daun Binahong Segar Pada Manusia

Dosis ekstrak daun binahong 17,5 mg/kgBb; 35 mg/kgBB; dan 70 mg/kgBB dikonversi ke dosis manusia berturut – turut sebesar 196 mg/70kgBB; 392 mg/70kgBB; dan 784 mg/70kgBB. Sebanyak 10 kg daun segar didapatkan 1 kg serbuk kering daun binahong. 400 gram serbuk daun binahong diekstraksi didapatkan ekstrak serbuk 37,69 gram. Selanjutnya, dihitung dosis daun segar binahong manusia didapatkan 20,8 gram/70kgBB; 41,6 gram/70kgBB; dan 83,21 gram/70kgBB.

4.7.1.12 Pemberian Ekstrak Binahong dan Glimepiride ke Tikus yang telah Diinduksi

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

a. Pembuatan larutan ekstrak daun binahong

Serbuk ekstrak daun binahong ditimbang 250mg, lalu dilarutkan dalam 25ml *water for injection* (WFI). Larutan divortex hingga homogen sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1% (diberikan pada

kelompok dosis 70 mg/kgBB sesuai dosis). Selanjutnya, dilakukan pengenceran dari larutan stok hingga didapatkan konsentrasi 0,5% (untuk kelompok dosis 35 mg/kgBB) dan 0,25% untuk kelompok dosis 17,5 mg/kgBB).

b. Pembuatan Suspensi Glibepride

CMC ditimbang sejumlah 350 mg lalu dikembangkan dalam akuades sebanyak 7 ml (20 kali berat CMC) selama kurang lebih 15 menit, kemudian dihomogenkan. Volume larutan dicukupkan hingga 70 ml kemudian dihomogenkan kembali. Selanjutnya glibenklamid disuspensikan dengan konsentrasi 0,9% b/v dalam larutan CMC 0,9%. Tiap 1 ml suspense glibenklamid mengandung 0,9 glibenklamid.

4.7.1.13 Pembedahan

Setelah dua minggu, binatang dilakukan euthanasia dengan inhalasi gas kloroform. Tikus yang telah dilakukan euthanasia berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di Laboratorium FAAL FKUB, selanjutnya dilakukan insisi pada daerah perut sampai diafragma dan plasma darah diambil dari jantung sebanyak 5 ml. setelah itu, serum darah diputar menggunakan sentrifugator dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit. Serum diambil dan disimpan pada suhu -20°C selama siap untuk diukur. Pengukuran insulin menggunakan Rat Insulin ELISA Kit (Shibayagi, 2009).

4.7.1.15. Pemeriksaan Kadar Serum Insulin (ELISA)

Berikut ini adalah prosedur ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*) kit untuk mengukur kadar insulin pada tikus menggunakan uji Sandwich cepat dengan sensitivitas tinggi (Shibayagi,2009)

1. Cuci anti-insulin *coated plate* (A) 4 kali menggunakan *washing buffer* (I), menggunakan 250-300 $\mu\text{l/well}$
2. Tambahkan 100 μl *Biotin-conjugated anti-insulin* pada tiap *well*, dan kocok
3. Tambahkan sampel 10 μl atau standard insulin solution pada tiap *well* dan kocok
4. Biarkan dan ikubasi selama 1 jam pada suhu ruangan (20-25° C)
5. Cuci plate 4 kali menggunakan *washing buffer* seperti langkah 1.
6. Tambahkan 100 μl *HRP- conjugated streptavidin solution* pada tiap *well* dan kocok
7. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan (20-25° C).
8. Cuci *plate* 4 kali menggunakan *washing buffer* seperti pada langkah 1.
9. Tambahkan 100 μl *chromogenic substrate reagent* pada tiap *well* dan kocok
10. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan (20-25° C).
11. Hitung tiap absorban dari well pada 450 nm (dengan sub-wavelength pada 620 nm) menggunakan *plate reader* selama 30 menit

Selanjutnya dilakukan penghitungan konsentrasi insulin. Adapun prosedurnya sebagai berikut :

1. Siapkan kurva standar dengan *plotting absorbance* (Y-axis) pada insulin concentration (X-axis, pg/ml)
2. Baca konsentrasi insulin pada sampel absorbannya menggunakan kurva standar

3. Jika sampel pengujian menjadi tipis atau encer, kalikan konsentrasi dengan sampel *dilution rate* untuk memperoleh konsentrasi insulin dari sampel original
4. Jika konsentrasi insulin pada sampel lebih dari 2500 pg/ml, encerkan sampel untuk mendapatkan absorbansi pada kurva standard, dan ulangi pengujian
5. Untuk perlakuan pada pengujian data oleh komputer, direkomendasikan menggunakan order ketiga atau keempat parameter kurva regresi (Shibayagi, 2009)
6. Kadar serum insulin yang diperoleh kemudian dihitung HOMA-IR dan HOMA- β

4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian pada tabel 4.3 dan 4.4. :

4.7.2.1. Penimbangan Berat Badan Tikus

Tabel 4.3. Tabel Jadwal Penimbangan Berat Badan Tikus

Waktu Kelompok	Fase Adaptasi (1 minggu)	Diet Tinggi Lemak (2 Minggu)	Injeksi STZ (1 Minggu)	Fase Terapi (2 Minggu)
I	Sekali (awal penelitian)	Seminggu sekali	Seminggu sekali	Seminggu sekali
II				
III				
IV			Sehari sekali	Sehari sekali
V				
VI				

Berat badan kelompok III, IV, V dan IV diukur ketika awal penelitian, sebelum diet tinggi lemak, sebelum injeksi streptozotocin, setiap hari untuk penentuan dosis ekstrak daun binahong, dan akhir penelitian sebelum tikus dibunuh.

4.7.2.2. Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

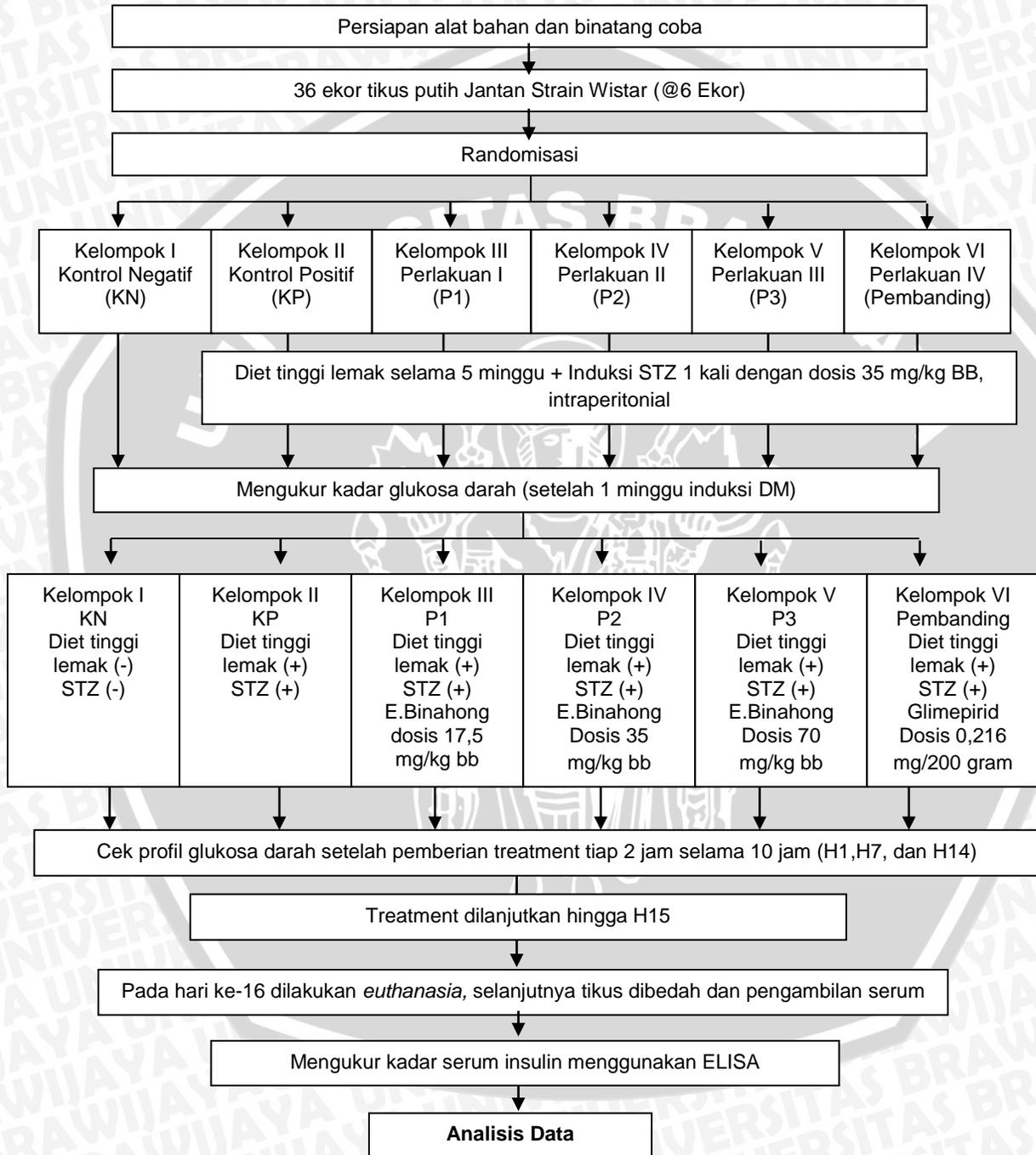
Tabel 4.4. Tabel Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Waktu Kelompok	Induksi DM tipe 2 (Diet Tinggi Lemak dan Injeksi STZ dosis rendah)	Fase Terapi			
I	Sekali (H ₀)	H15			
II		H1 (diukur tiap 2 jam selama 10)	H7 (diukur tiap 2 jam selama 10)	H14 (diukur tiap 2 jam selama 10)	H15
III					
IV					
V					
VI					

Pada H1, H7, dan H14 dilakukan tes glukosa darah tiap 2 jam selama 10 jam setelah induksi glukosa untuk mengetahui efek langsung ekstrak daun binahong.

- a. Kadar serum insulin diukur setelah penelitian selama delapan minggu dengan metode yang dilakukan oleh Shibayagi (2009).

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Pengolahan dan Analisa Data

One Way Anova digunakan untuk menguji hipotesis komparatif lebih dari dua sampel secara serempak bila setiap sampel terdiri atas satu kategori (Sugiyono, 2006). Hasil pengukuran kadar glukosa darah dan kadar serum insulin kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 20.0 for Windows 7* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf 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) dan Uji korelasi Pearson. Jika data merupakan non parametrik maka langkah – langkah yang dilakukan sebagai berikut : Uji Kruskal-Wallis, Uji Mann Whitney, Uji Korelasi Spearman Rho.

