

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental*, metode yang digunakan adalah *posttest-only controlled design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK), yakni dengan membagi sampel dalam beberapa kelompok perlakuan secara acak.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

- Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar DM tipe 2.
- Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus model DM tipe 2 melalui induksi pakan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.
- Sampel dalam penelitian ini adalah tikus jantan model DM tipe 2 yang diinduksi dengan pakan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### 4.2.1 Besaran Sampel

Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing perlakuan (5 perlakuan) dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1991):

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 4,75 \approx 5$$

**Keterangan:**

t : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel

Dengan demikian setiap kelompok uji dibutuhkan 5 tikus putih jantan strain Wistar sebagai sampel, sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus putih jantan.

**4.2.2 Kelompok Perlakuan**

Kelompok perlakuan berjumlah 5 (lima) yang dibagi secara acak ( $P_n, P_1, P_2, P_3, P_p$ ), dengan ketentuan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif ( $P_n$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan 10% tween 80 dan tanpa ekstrak biji jantan hitam selama 30 hari.
- b) Kelompok perlakuan ( $P_1$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jantan hitam 24 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- c) Kelompok perlakuan ( $P_2$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jantan hitam 48 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- d) Kelompok perlakuan ( $P_3$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jantan hitam 96 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- e) Kelompok kontrol positif ( $P_p$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar model DM tipe 2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari.

Berdasarkan penelitian Andaloussi tentang aktivitas ekstrak biji jintan hitam terhadap penurunan glukosa darah tahun 2011, didapatkan dosis efektif ekstrak biji jintan hitam adalah 48 mg/kgBB/hari, sehingga dalam penelitian ini digunakan dosis tersebut. Selain itu, digunakan dosis ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari dan 96 mg/kgBB/hari untuk mengetahui dosis optimum yang dapat meningkatkan konsentrasi GLUT-4 pada jaringan otot tikus putih model DM tipe 2.

#### **4.2.3 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. Dalam lotre ini terdapat 5 macam kertas, yakni  $P_n$ ,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_p$  kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok perlakuan yang lebih dulu ditentukan anggotanya, lalu kertas yang telah keluar tidak dimasukkan kembali. Pada masing-masing kandang hewan coba diberi nomor 1-25, selanjutnya dilotre untuk masuk ke kelompok tertentu, nomor lotre yang sudah diambil tidak dimasukkan kembali. Teknisnya, siapkan 5 kertas bertuliskan  $P_n$ ,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_p$ , dan 25 kertas bertuliskan angka 1-25 lalu kemudian ditempel di masing-masing kandang dimana nomor tersebut menunjukkan nomor dari tikus yang terdapat di dalam kandang tersebut. Lotre pertama untuk menentukan kelompok kontrol dan perlakuan, misalnya setelah pengundian yang keluar adalah kertas bertuliskan  $P_1$ , lalu dilakukan lotre kedua untuk penentuan nomor tikus yang masuk ke



kelompok P<sub>1</sub>. Pada lotre kedua yang muncul adalah nomor 10 sehingga tikus dengan kandang nomor 10 dimasukkan ke dalam kelompok P<sub>1</sub>. Setelah jumlah anggota satu kelompok terpenuhi sesuai estimasi jumlah sampel, lakukan kembali lotre hingga semua tikus masuk dalam masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.

#### 4.2.4 Kriteria Subjek Penelitian

Pada penelitian ini digunakan hewan coba sebagai uji preklinik sebelum dilakukan penelitian pada manusia karena harus mengetahui peranan obat herbal yang akan direkomendasikan secara preklinik disamping mengetahui peranan obat standar. Subjek dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar karena dapat mensimulasikan kondisi DM tipe 2, penanganan mudah, mudah didapatkan, dan harga terjangkau.

##### 4.2.4.1 Kriteria Inklusi

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

- a) Tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar.
- b) Jenis kelamin jantan.
- c) Usia 12 bulan, karena pada tikus usia 12 bulan sepadan dengan manusia usia 30 tahun dimana insiden DM tipe 2 mulai meningkat jumlahnya (Aggarwal *et al.*, 2011; Andrello *et al.*, 2012; Sengupta, 2013;).
- d) Berat badan 250-550 gram.
- e) Tikus sehat, aktif, dan mau makan.

##### 4.2.4.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang tidak dapat diambil sebagai sampel memiliki karakteristik berikut:

- a) Tikus yang sebelumnya pernah menjadi subjek penelitian.
- b) Tikus dengan kadar glukosa darah puasa (GDP)  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) pada saat sebelum induksi DM tipe 2.
- c) Tikus yang mengalami infeksi pada saat sebelum perlakuan, ditandai dengan pembengkakan nodus limfe, adanya luka, dan timbul kemerahan di daerah luka.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis 24 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dosis 48 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dosis 96 mg/kgBB/hari ekstrak biji jintan hitam, dan dosis 75 mg/kgBB/hari metformin.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

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

### 4.4 Instrumen Analisis

Konsentrasi GLUT-4 pada jaringan otot tikus dihitung menggunakan ELISA. Pada penelitian ini digunakan ELISA karena dapat melakukan *screening* dengan cepat atau kuantisasi sampel dalam jumlah yang banyak, mudah untuk dilakukan, otomatis, akurat, dan ketersediaan reagen yang relatif murah. Konsentrasi GLUT-4 diketahui dengan memasukkan nilai absorban ke dalam kurva baku dari larutan standar yang diperoleh dari ELISA *kit*.

### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi 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 pengujian konsentrasi GLUT-4 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dimulai pada bulan Maret 2014 setelah mendapatkan persetujuan etik dan berakhir pada bulan Juni 2014.

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 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 membersihkan tikus, pakan *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu untuk diet normal, lemak babi, serta sukrosa. 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	<i>Cornfeed</i> PAR-S	Tepung Terigu
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11
Lemak (gram)	4	0,9
Karbohidrat (gram)	58	72

(Adi, 2008)

Tikus diet normal membutuhkan 102 kkal yang bersumber dari *cornfeed* PAR-S yang mengandung jagung, lalu dicampur dengan tepung terigu (Anggraeni *et al.*, 2009). Untuk membuat diet normal dengan perbandingan *cornfeed* : tepung (2 : 1) dibutuhkan *cornfeed* sebanyak



19,77 gram (68 kkal) dan tepung sebanyak 10 gram (34 kkal). Untuk membuat pakan tinggi kalori maka perlu ditambahkan lemak babi sebanyak 10% dan 20% sukrosa dari total energi yang dibutuhkan pada pakan normal, yaitu 10,2 kkal dan 20,4 kkal (Wang *et al.*, 2007). Sukrosa sebanyak 1 gram setara dengan 3,87 kkal dan 1 gram lemak babi setara dengan 9,02 kkal energi (PERSAGI, 2005). Maka dibutuhkan lemak babi sebanyak 1,13 gram dan sukrosa sebanyak 5,27 gram.

- b) Bahan untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam yaitu serbuk biji jintan hitam (*Nigella sativa*) didapatkan dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Provinsi Jawa Timur sejumlah 1 kg dan pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol 80% sebanyak 900 mL, perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1 : 3.
- c) Bahan untuk uji fitokimia kualitatif
  - (i) Minyak atsiri : ekstrak biji jintan hitam, Sudan III ((1E)-1-[(4-phenyldiazenylphenyl)hydrazinylidene]naphthalene-2-one).
  - (ii) Alkaloid : ekstrak biji jintan hitam, HCl 2N, NaCl, reagen Mayer, dan reagen Wagner.
  - (iii) Saponin : ekstrak biji jintan hitam, HCl 2N.
- d) Bahan untuk pembuatan homogenat jaringan otot: jaringan otot tikus, Tris base (pH 8.0), NaCl, Nonidet P-40, *Ethylene Diamine Tetra Acetic* (EDTA), *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), *protease inhibitor cocktail*, dan *dionized water*.
- e) Bahan untuk pengukuran konsentrasi GLUT-4 menggunakan ELISA: *wash solution*, *HRP-conjugate solution*, *sample diluent*, *chromogen*

solution A, chromogen solution B, stop solution, standard 96 µg/L, standard diluent.

#### 4.6.2 Alat Penelitian

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

- a) Alat untuk pemeliharaan tikus: kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, timbangan tikus, dan tempat makan.
- b) Alat untuk pembuatan ekstrak biji jintan hitam: timbangan digital untuk menimbang sampel, toples sebagai wadah dalam proses maserasi, aluminium foil, stirer, kain saring, batang pengaduk, corong, dan *rotary evaporator* untuk memekatkan ekstrak.
- c) Alat uji fitokimia kualitatif
  - i) Minyak atsiri : tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, *plate*, dan gelas arloji.
  - ii) Alkaloid : pipet tetes, *plate*, cawan porselen, penangas air, batang pengaduk, kertas saring, dan corong.
  - iii) Saponin : pipet tetes dan gelas ukur.
- d) Alat pemberian ekstrak biji jintan hitam pada tikus: timbangan digital, gelas ukur, batang pengaduk, dan sonde lambung tikus.
- e) Alat pembedahan tikus: pisau bedah, papan bedah, pinset, dan gunting bedah.
- f) Alat pembuatan homogenat jaringan otot: mortar, stemper, timbangan digital, *vortex homogenizer*, dan sentrifuga.
- g) Alat pengujian konsentrasi GLUT-4: Instrumen ELISA.



#### 4.7 Definisi Operasional

- a) DM tipe 2 ditandai dengan peningkatan kadar GDP  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) setelah diinduksi dengan pakan tinggi kalori selama 2 bulan dan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal, karena STZ pada dosis 30 mg/kgBB dapat memberikan efek paling mendekati karakteristik DM tipe 2 dibandingkan dengan dosis 20 dan 60 mg/kg BB.
- b) Serbuk biji jintan hitam yang digunakan dalam penelitian ini diimpor dari Timur Tengah oleh UPT Materia Medika, Kota Batu.
- c) Ekstrak biji jintan hitam yang digunakan dibuat melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 80% sebanyak 900 mL, dengan perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1 : 3.
- d) Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berusia 12 bulan dengan berat badan antara 250-550 gram, karena hewan coba pada usia ini sepadan dengan usia 30 tahun pada manusia dimana pada usia tersebut memiliki risiko untuk mengalami DM tipe 2.
- e) Konsentrasi GLUT-4 diukur dari jaringan otot, konsentrasi GLUT-4 akan menunjukkan konsentrasi total GLUT-4 yang terdapat di jaringan otot.
- f) ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), merupakan metode yang digunakan untuk pengukuran konsentrasi GLUT-4. Prinsip metode ini adalah pendeteksian GLUT-4 yang dilakukan dengan mengikat GLUT-4 oleh antiGLUT-4.
- g) Glikogenolisis adalah proses perubahan glikogen menjadi glukosa.
- h) Induksi DM tipe 2 merupakan intervensi yang dilakukan oleh peneliti untuk membuat tikus mengalami DM tipe 2 yang sesuai dengan kondisi

DM tipe 2 pada manusia, ditandai dengan resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin. Kondisi resistensi insulin pada tikus diperoleh dengan cara memberi pakan tinggi kalori yang berisi *cornfeed* PAR-S, tepung terigu, sukrosa, dan lemak babi selama 2 bulan, kemudian kondisi penurunan sekresi insulin diperoleh dengan cara injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 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 hewan coba yang tertutup dengan anyaman kawat, dimana setiap kandang berisi 1 ekor tikus.
- b) Suhu ruangan kandang tikus adalah  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- c) Dalam kandang disediakan 1 botol minum sehingga tikus dapat minum *ad libitum*.
- d) Makan tikus berupa *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1 maka dibutuhkan *cornfeed* sebanyak 19,77 gram dan tepung sebanyak 10 gram.
- e) Sekam ditempatkan di kandang hewan coba.
- f) Tikus diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.

#### 4.8.2 Perlakuan pada Hewan Coba

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

- a) 25 ekor tikus jantan yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- b) Tikus diberi pakan tinggi kalori selama 2 bulan untuk mendapatkan kondisi resistensi insulin. Masing-masing tikus menggunakan satu kandang, karena perlu dilakukan kontrol pakan. GDP di cek setiap 2 minggu (pada hari ke-15, hari ke-30, hari ke-45, dan hari ke-60). Selanjutnya diinjeksi STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal pada akhir masa induksi pakan tinggi kalori untuk mendapatkan kondisi disfungsi sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi penurunan sekresi insulin lalu diberikan terapi sesuai masing-masing kelompok perlakuan selama 1 bulan dan diberikan pakan tinggi kalori.
- c) Tikus dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan melalui metode lotre, dengan pembagian kelompok sebagai berikut:
  - (i) Kelompok kontrol negatif ( $P_n$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan 10% tween 80 dan tanpa ekstrak biji jintan hitam selama 30 hari.
  - (ii) Kelompok perlakuan ( $P_1$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 24 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
  - (iii) Kelompok perlakuan ( $P_2$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kgBB/hari selama 30 hari.



- (iv) Kelompok perlakuan ( $P_3$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan ekstrak biji jintan hitam 96 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
  - (v) Kelompok kontrol positif ( $P_p$ ): 5 ekor tikus putih jantan strain Wistar jantan model DM tipe 2, diberikan metformin 75 mg/kgBB/hari selama 30 hari.
- d) Pakan yang diberikan selama perlakuan adalah pakan tinggi kalori, yang terdiri dari *cornfeed* PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2 : 1, dibutuhkan *cornfeed* sebanyak 19,77 gram dan tepung sebanyak 10 gram, 20% sukrosa, dan 10% lemak babi. Maka dibutuhkan lemak babi sebanyak 1,13 gram dan sukrosa sebanyak 5,27 gram.
- e) Kelompok  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  selain diberi pakan tinggi kalori juga mendapatkan ekstrak biji jintan hitam melalui sonde selama 1 bulan.
- f) Pada hari ke-95 tikus dibedah untuk diambil jaringan ototnya dan dilakukan pengukuran konsentrasi GLUT-4.

#### 4.8.3 Penyiapan Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Tahap ekstraksi biji jintan hitam berdasarkan penelitian Andaloussi tahun 2011 tentang efek ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah pada tikus DM tipe 2 adalah sebagai berikut:

- a) Serbuk biji jintan hitam sebanyak 300 gram dimasukkan ke dalam toples kaca bertutup.
- b) Etanol 80% sebanyak 900 mL dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1 : 3 ditambahkan ke dalam toples.

- c) Campuran serbuk biji jintan hitam dan pelarut diaduk dengan menggunakan stirer selama 30 menit, kemudian ditutup dengan aluminium foil, dan toples ditutup.
- d) Didiamkan selama 24 jam.
- e) Hasil maserasi disaring menggunakan corong dan kain saring, residu penyaringan dimaserasi kembali dengan etanol 80% sebanyak 900 mL dan didiamkan selama 24 jam, dilakukan maserasi kembali hari berikutnya.
- f) Hasil maserasi pertama dan remaserasi disatukan, lalu dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* pada suhu kurang dari 40°C hingga pelarut menguap.

#### 4.8.4 Uji Fitokimia Kualitatif

Prosedur uji fitokimia berdasarkan penelitian Marlina tahun 2005 dan Depkes RI tahun 1989 adalah sebagai berikut:

- a) Minyak atsiri
  - i) Ekstrak biji jintan hitam dilarutkan dalam aquades.
  - ii) Ditambah sudan III.
  - iii) Hasil positif jika terbentuk warna merah pada ekstrak.
- b) Alkaloid
  - i) Ekstrak biji jintan hitam ditambah HCl 2N, tujuan penambahan tersebut adalah karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang bersifat asam.
  - ii) Dipanaskan di atas penangas air agar proses ekstraksi berjalan lebih cepat.

- iii) Ditambah NaCl bertujuan untuk menghilangkan protein yang terdapat di dalam ekstrak.
  - iv) Disaring dengan kertas saring agar protein tidak ikut bereaksi dengan reagen yang akan ditambahkan, karena dengan adanya endapan protein pada saat penambahan reagen yang mengandung logam berat dapat memberikan hasil positif palsu.
  - v) Filtrat ditambah HCl 2N.
  - vi) Dibagi dalam 3 lubang pada *plate*, lubang A ditambah reagen Mayer, lubang B ditambah reagen Wagner, dan lubang C sebagai blanko.
  - vii) Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan kuning pada lubang A dan endapan merah kecoklatan pada lubang B.
- c) Saponin
- i) Ekstrak biji jintan hitam dilarutkan dalam aquades.
  - ii) Dikocok dengan kuat selama 10 menit.
  - iii) Ditambah HCl 2N untuk mempertahankan buih.
  - iv) Hasil positif jika terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm hingga 10 cm.

#### 4.8.5 Induksi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Hewan Coba

Berdasarkan penelitian Wang tahun 2007, induksi DM tipe 2 pada tikus dilakukan dengan cara:

- a) Tikus putih jantan strain Wistar sejumlah 25 ekor dicek kadar GDP sebelum diberi pakan tinggi kalori.
- b) Pakan tinggi kalori diberikan selama 2 bulan, cek kadar GDP setiap 2 minggu, kemudian dilakukan injeksi peritoneal STZ 30 mg/kgBB satu kali sebagai dosis tunggal.



- c) Cek kadar GDP 3 hari setelah injeksi STZ. Tikus dikatakan DM tipe 2 jika nilai GDP  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) (Wang *et al.*, 2013).

#### **4.8.6 Pembuatan Larutan Ekstrak Biji Jintan Hitam dan Metformin serta Prosedur Pemberian Terapi**

Berikut ini merupakan prosedur pembuatan larutan ekstrak biji jintan hitam dan metformin berdasarkan berat badan hewan coba serta prosedur pemberian terapi:

- a) Ekstrak biji jintan hitam ditimbang sesuai kebutuhan untuk 15 ekor tikus dengan dosis 24, 48, dan 96 mg/kgBB/hari.
- b) Metformin dihaluskan dan ditimbang sesuai kebutuhan untuk 5 ekor tikus dengan dosis yang telah dikonversi.
- c) Masing-masing (a) dan (b) dilarutkan dalam 10% tween 80 hingga diperoleh konsentrasi tertentu.
- d) Larutan disonde pada masing-masing tikus sesuai kelompok perlakuan dan sesuai berat badan masing-masing tikus.

#### **4.8.7 Prosedur Pengorbanan Hewan Coba**

Pengorbanan hewan coba dilakukan untuk mengambil jaringan otot, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Dilakukan dislokasi cervical pada tikus.
- b) Jaringan otot diambil dari area paha dimana otot tersebut menempel pada tulang rangka hewan coba.

#### **4.8.8 Prosedur Penanganan Hewan Coba setelah Penelitian**

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu dengan penguburan.

#### 4.8.9 Pembuatan Homogenat Jaringan Otot

Cara pembuatan homogenat jaringan otot untuk analisa menggunakan ELISA adalah sebagai berikut:

- a) Jaringan otot diambil dari hewan coba.
- b) Ditimbang 100 mg dengan menggunakan timbangan digital.
- c) Jaringan otot 100 mg dihaluskan dengan mortar pada kondisi dingin.
- d) Ditambahkan larutan buffer lisis sesuai resep pada tabel 4.2 yang berfungsi menghancurkan jaringan dan sel otot sebanyak 1 ml ke dalam mortar.

**Tabel 4.2 Resep Buffer Lisis**

No.	Bahan	Jumlah	Fungsi
1.	Tris base (pH 8.0)	0,121 g	Mengatur pH antara 7-9 agar protein tidak rusak.
2.	NaCl	0,877 g	Mengendapkan protein.
3.	Nonidet P-40	0,125 mL	Detergen non ionik untuk melarutkan protein membran.
4.	EDTA	0,007 g	Melindungi protein dari ion logam.
5.	PMSF	0,009 g	Penghambat protease untuk trypsin, chymotrypsin, thrombin, dan papain.
6.	Protease inhibitor cocktail	50 µl	Menghambat enzim protease yang menyebabkan denaturasi protein.

- e) Campuran dimasukkan ke dalam *microtube*.
- f) Diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit dan diperoleh homogenat.
- g) Homogenat disentrifugasi selama 10 menit, 6000 rpm, pada suhu 4°C.
- h) Diambil supernatan sebanyak 200 µl.
- i) Dimasukkan ke dalam *microtube* baru.
- j) Dimasukkan *freezer* suhu -40°C hingga dilakukan uji.

#### 4.8.10 Pengukuran Konsentrasi GLUT-4 Menggunakan ELISA

Berikut ini merupakan prosedur pengukuran konsentrasi GLUT-4 di jaringan otot dengan menggunakan metode ELISA:

- a) Tujuh larutan standar yang berfungsi untuk membentuk kurva baku dibuat.

**Tabel 4.3 Larutan Standar ELISA**

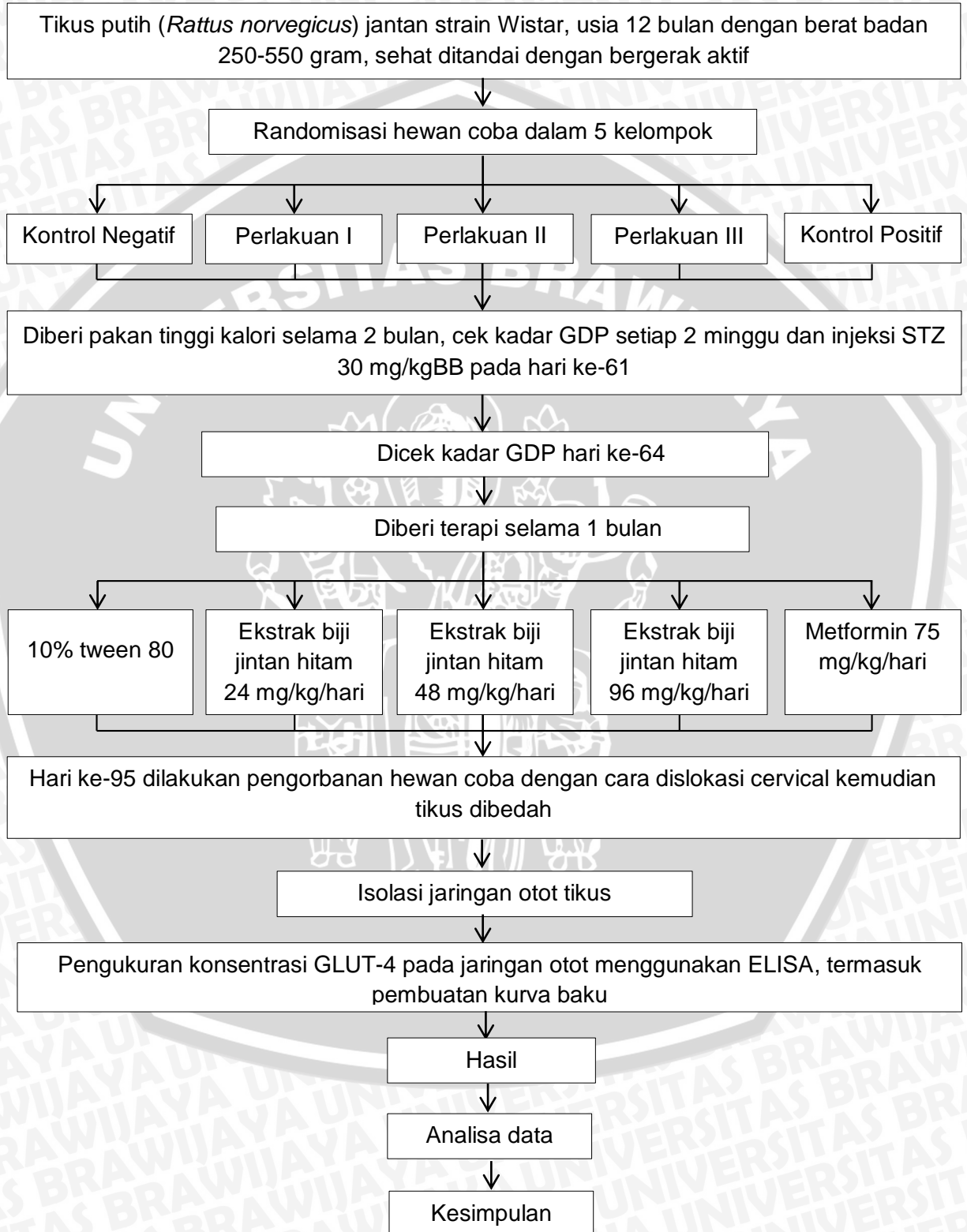
Konsentrasi ( $\mu\text{g/L}$ )	Nama	Bahan
96	Standar 6	50 $\mu\text{l}$ larutan stok
48	Standar 5	150 $\mu\text{l}$ larutan stok + 150 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>
24	Standar 4	150 $\mu\text{l}$ standar 5 + 150 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>
12	Standar 3	150 $\mu\text{l}$ standar 4 + 150 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>
6	Standar 2	150 $\mu\text{l}$ standar 3 + 150 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>
3	Standar 1	150 $\mu\text{l}$ standar 2 + 150 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>
0	Standar 0	50 $\mu\text{l}$ <i>standard diluent</i>

- b) Larutan standar dimasukkan ke dalam sumur, masing-masing sebanyak 50  $\mu\text{l}$ .
- c) *Sample dilution* sebanyak 50  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam 25 *microtube* lalu ditambahkan dengan 50  $\mu\text{l}$  sampel ke dalam masing-masing *microtube*.
- d) Campuran tersebut dihomogenasi, lalu dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 50  $\mu\text{l}$ .
- e) Piringan ELISA diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- f) Piringan ELISA dicuci selama 30 detik dan diulangi 5 kali lalu dikeringkan untuk menghilangkan kelebihan antigen yang tidak terikat pada antibodi yang telah menempel pada sumur.



- g) *HRP-Conjugate reagent* yang berfungsi memperkuat ikatan antara antigen dan antibodi ditambahkan ke dalam sumur masing-masing sebanyak 50  $\mu$ l.
- h) Piringan ELISA diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- i) Piringan ELISA dicuci selama 30 detik dan diulangi 5 kali lalu keringkan untuk menghilangkan kelebihan *HRP-Conjugate* yang tidak berikatan di sumur.
- j) *Chromogen solution A dan B* yang berfungsi untuk memberikan warna pada ikatan antigen-antibodi yang terjadi sehingga dapat dibaca oleh pembaca ELISA ditambahkan ke dalam sumur masing-masing sebanyak 50  $\mu$ l.
- k) Piringan ELISA diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- l) *Stop solution* sebanyak 50  $\mu$ l yang berfungsi menghentikan semua proses yang terjadi ditambahkan ke dalam sumur.
- m) Sampel dibaca absorbansinya yang diatur pada panjang gelombang 450 nm.

#### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



#### 4.10 Analisa Data

Hasil pengukuran konsentrasi GLUT-4 di jaringan otot kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan uji beda tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) Langkah-langkah uji hipotesis beda adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One way ANOVA*, dan uji *Post hoc*.

Pada penelitian ini terdapat > 2 kelompok tidak berpasangan dengan skala pengukuran numerik, sehingga dilakukan uji *One way ANOVA*, syarat untuk melakukan uji *One way ANOVA* adalah distribusi data normal dan homogen oleh karena itu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Namun apabila data tidak memenuhi syarat, dilakukan transformasi data hingga memenuhi syarat, dan jika masih belum memenuhi syarat dapat dilakukan uji nonparametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*. Setelah data memenuhi syarat, dilakukan uji *One way ANOVA* lalu dilihat signifikasinya apakah menolak  $H_0$  atau menerima  $H_0$ .  $H_0$  dalam penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan konsentrasi GLUT-4 yang signifikan pada jaringan otot tikus putih strain Wistar model DM tipe 2 yang mendapatkan terapi ekstrak biji jintan hitam, metformin, dan tanpa terapi sedangkan  $H_1$  dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan konsentrasi GLUT-4 yang signifikan pada jaringan otot tikus putih strain Wistar model DM tipe 2 yang mendapatkan terapi ekstrak biji jintan hitam, metformin, dan tanpa terapi. Jika menolak  $H_0$  yang berarti menerima  $H_1$ , maka dilanjutkan dengan analisis *Post hoc* untuk mengetahui dasar penolakan tersebut.