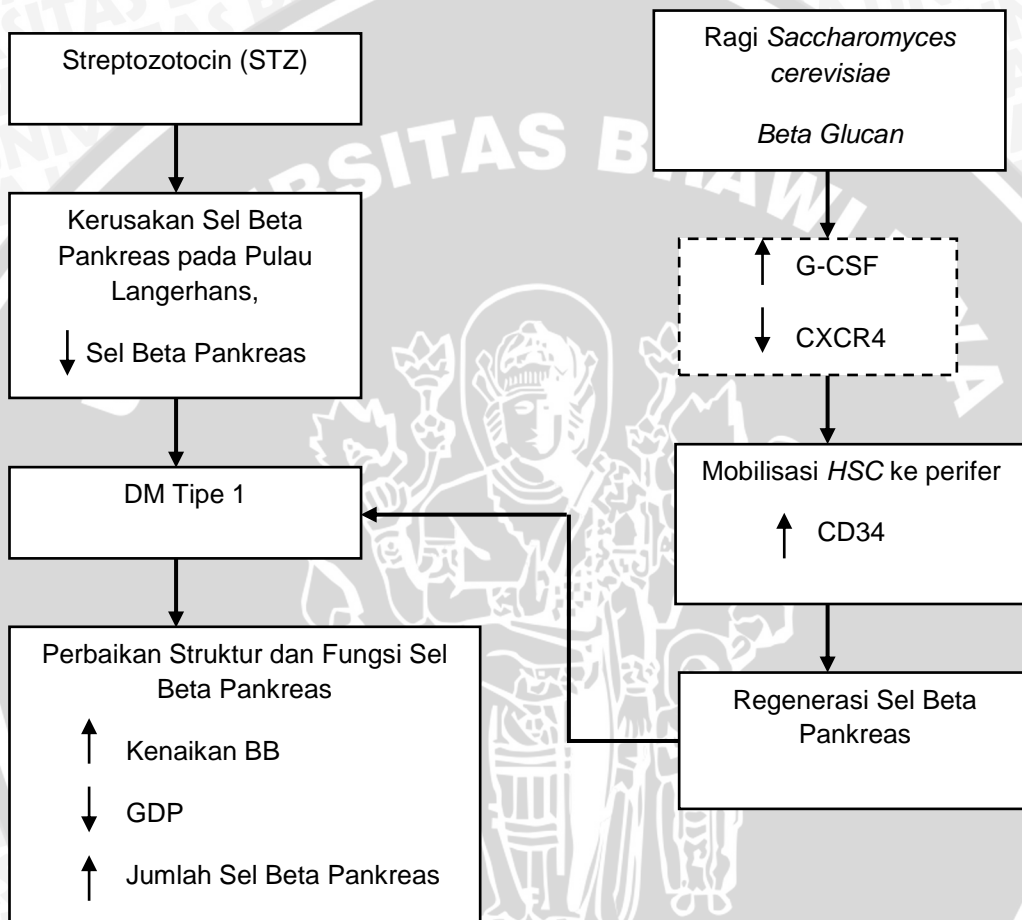


BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan

: Variabel tidak diteliti

: Variabel diteliti

G-CSF : *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*

HSC : *Hematopoietic Stem Cell*

STZ : *Streptozotocin*

CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*



3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Dalam penelitian ini, injeksi STZ sebanyak 40 mg/kgBB digunakan untuk membuat model DM tipe 1. Injeksi STZ tersebut menyebabkan destruksi dan penurunan jumlah sel beta pankreas yang mengakibatkan penurunan produksi insulin dalam darah, keadaan tersebut ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah. Penurunan produksi insulin menyebabkan gangguan pada metabolisme glukosa sehingga tubuh mengaktifkan jalur lipolisis untuk mendapatkan nutrisi sel, yang ditandai dengan adanya gejala klasik DM tipe 1, salah satunya adalah penurunan berat badan. Pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae*, dengan kandungan utama *beta glucan*, mempengaruhi peningkatan dan mobilisasi sel granulosit serta progenitorinya dengan menstimulasi produksi G-CSF. Peningkatan G-CSF menekan ekspresi CXCR4 pada permukaan HSC (Sel CD34) yang berperan dalam proses mobilisasi HSC dari sumsum tulang ke sirkulasi. Peningkatan HSC ke sirkulasi diharapkan dapat menginduksi proses regenerasi pada kerusakan sel beta pankreas yang ditandai dengan perbaikan berat badan, kadar glukosa darah, jumlah sel beta pankreas dan peningkatan ekspresi sel CD34 pada sirkulasi perifer.

3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* memperbaiki struktur dan fungsi jaringan pankreas pada mencit model DM tipe 1.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini berupa prospektif eksperimental laboratorium sungguhan dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang bersifat komparatif. Penelitian dilaksanakan selama \pm 9 minggu. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan galur Balb/C (*Mus musculus*) dengan berat \pm 30 gram. Hewan coba dibagi menjadi 5 (lima) kelompok secara acak, yaitu kelompok mencit tanpa diinjeksi STZ dan tanpa diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae* atau kontrol negatif (K (-)), kelompok mencit yang hanya diinjeksi STZ dosis rendah atau kontrol positif (K (+)), kelompok mencit yang diinjeksi STZ dosis rendah dan diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae* dosis 50 mg/kgBB (P1), kelompok mencit yang diinjeksi STZ dosis rendah dan diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae* dosis 100 mg/kgBB (P2), dan kelompok mencit yang diinjeksi STZ dosis rendah dan diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae* dosis 200 mg/kgBB (P3). Mencit diadaptasikan selama 1 (satu) minggu kemudian diinjeksikan STZ dosis rendah (40 mg/kgBB) selama 5 (lima) hari berturut-turut (Arora *et al.*, 2009). Kemudian dilakukan pemberian larutan ragi *Saccharomyces cerevisiae* selama 6 (enam) minggu, pemberian dimulai pada awal minggu ke-2 yaitu 1 minggu setelah injeksi STZ di hari pertama. Pemberian dosis ragi *Saccharomyces cerevisiae* mengacu pada Juarez *et al.* (2008) dan Robak & Bartnikowska (2009) yakni 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian ini adalah model mencit jantan galur Balb/C berusia 6-7 minggu dengan berat badan \pm 30 gram. Mencit galur ini dipilih sebagai sampel karena merupakan salah satu model hewan yang digunakan untuk studi perubahan morfologi, fisiologi, dan biokimia dalam suatu penelitian. Dan juga galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia. Pemilihan mencit jantan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Firdous *et al.* (2009).

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi:

- a. Jenis Kelamin Jantan.
- b. Usia 6-7 minggu.
- c. Berat badan \pm 30 gram.
- d. Sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.
- e. Kadar glukosa darah puasa pada awal pembelian $<$ 126 mg/dl.

2. Kriteria Eksklusi:

- a. Sakit yang ditandai dengan selama penelitian mencit tidak mau makan, gerak tidak aktif, tanda infeksi, mata tidak jernih, bulu tipis dan berwarna tidak putih mengkilap.
- b. Kadar glukosa darah puasa awal $>$ 126 mg/dl.

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Solimun, 2001):

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

Pada penelitian ini $p = 5$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$pn - p \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dibesarkan menjadi 4 pengulangan.

Keterangan : p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan

Dari perhitungan didapatkan jumlah pengulangan tiap kelompok sebanyak minimal 4 pengulangan. Dalam penelitian ini digunakan 5 (lima) ekor mencit untuk masing-masing kelompok dengan jumlah kelompok sebanyak 5 (lima) kelompok, sehingga dibutuhkan 25 (dua puluh lima) ekor mencit. Berikut ini adalah pembagian kelompok perlakuan:

1. Kelompok kontrol negatif : Mencit sehat tanpa diberikan perlakuan apapun.
2. Kelompok kontrol positif : Mencit diinjeksi STZ (*Streptozotocin*) dengan dosis multipel 40 mg/KgBB selama 5 hari berturut-turut tanpa diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Kelompok P1 : Mencit diinjeksi STZ (*Streptozotocin*) dengan dosis multipel 40 mg/KgBB selama 5 hari berturut-turut dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 50 mg/kg BB selama 6 minggu.
4. Kelompok P2 : Mencit diinjeksi STZ (*Streptozotocin*) dengan dosis multipel 40 mg/KgBB selama 5 hari berturut-turut dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 100 mg/kgBB selama 6 minggu.
5. Kelompok P3 : Mencit diinjeksi STZ (*Streptozotocin*) dengan dosis multipel 40 mg/KgBB selama 5 hari berturut-turut dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 200 mg/kgBB selama 6 minggu.

4.3 Variabel Penelitian

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dalam dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB
- Variabel terikat dalam penelitian ini adalah berat badan, kadar glukosa darah, jumlah sel beta pankreas dan ekspresi sel CD34 dari hewan coba.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini lebih kurang dilaksanakan selama \pm 9 (sembilan) minggu dan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Definisi Operasional

1. Ragi yang digunakan yaitu ragi *Saccharomyces cerevisiae* jenis yang digunakan untuk pembuatan roti. Ragi ini bisa dibeli dimana saja. Selanjutnya ragi ini dihomogenisasikan dahulu dengan aquades kemudian diberikan dengan disondekan pada hewan coba.
2. Hewan coba yang digunakan adalah model mencit galur Balb/C karena merupakan salah satu model hewan yang digunakan untuk studi perubahan morfologi, fisiologi, dan biokimia dalam suatu penelitian. Dan juga galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia. Mencit galur Balb/C diperoleh dari LPPT UGM (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada).
3. STZ (*Streptozotocin*) di dapat dari laboratorium farmakologi. Merupakan zat yang terbukti mampu menginduksi Diabetes Melitus.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang mencit dari baskom plastik, tutup kandang dari anyaman kawat kasa dengan sisi penutup kandang terbuat dari kayu, botol air minum, sekam, alat semprot, alcohol 70% sebagai disinfektan, spidol hitam untuk menandai mencit dan rak tempat menaruh kandang.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuat Makanan Hewan Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, pakan *cornfeed* (pakan standar tikus), air, tepung dan gelas ukur. Bahan pakan mencit berupa pakan standar. Adapun komposisi pakan normal menurut Ali dan Ketut (2004) adalah

terdiri dari PARS 53,87%, tepung terigu 26,94% dan air 19,18%. Adapun kandungan pakan normal yang diberikan adalah terdiri dari 63,8% karbohidrat, 5% lemak, 19% protein.

4.6.3 Alat dan Bahan Untuk Injeksi STZ

Sarung tangan karet medis (*Handscone*), spuit 1 cc, *alcohol* swab atau alkohol 70% semprot, STZ yang sudah dilarutkan dengan asam sitrat dan kain lap.

4.6.4 Alat dan Bahan Untuk Pemberian Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Sarung tangan karet medis (*Handscone*), alat sonde, kain lap, larutan ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang terdiri dari dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200mg/kgBB.

4.6.5 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan

Untuk menimbang berat badan mencit digunakan timbangan digital dan baskom plastik dengan menggunakan *handscone*.

4.6.6 Alat dan Bahan Untuk Pengambilan Sampel Darah dan Glukosa Darah

Sarung tangan karet medis (*Handscone*), *lancet pen*, *lancets*, dan *alcohol* swab, *glucometer*, *glucose sticks*, spuit 10 cc, dan *vacutainer EDTA*.

4.6.7 Alat dan Bahan Untuk Pengambilan Sampel Jaringan Pankreas

Sarung tangan karet medis (*Handscone*), larutan bius ether, alat bedah, wadah sampel, *cool box*, *dry ice* dan formalin.

4.6.8 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan dan Pewarnaan Preparat Histologi Pankreas

Larutan fiksatif, xilol, etanol, alcohol, larutan Harris Hematoksilin, larutan eosin, blok paraffin, air hangat (38-40°C), *hot plate* (38-40°C), aquades, mikrotom, *beaker glass* 250 ml, pipet, kuas, entelan, *cover glass*, *object glass*, inkubator, wadah dan wadah sampel.

4.6.9 Alat Untuk Pemeriksaan dan Analisis Jaringan Pankreas

Untuk mengamati jaringan pankreas digunakan mikroskop cahaya OLYMPUS model CX21FS2 dan minyak inersi sedangkan untuk merekam gambarnya digunakan Mikroskop *Olympus Photo Slide BX51* dengan kamera DP71 12 megapixel.

4.6.10 Alat dan Bahan Untuk Pemeriksaan *Flow Cytometri*

Centrifuge tube, vacutainer EDTA, dan *disposable spuit*, *Phosphate Buffered Saline (PBS) Steril*, *Fetal Bovine Serum (FBS)*, dan *Lymphocyte Separation Medium (LSM)*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Tempat Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang hewan coba terbuat dari baskom plastik berukuran 15x30x45 cm³ sebanyak 5 (lima) buah yang diisi 5 ekor mencit. Tutup kandang terbuat dari anyaman kawat kasa dengan frame kayu dan sekam sebagai dasar dari kandang. Lubang pada anyaman kawat kasa dibesarkan sedikit untuk tempat botol air minum.

4.7.2 Persiapan Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang hewan coba diletakkan pada rak di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Mencit diadaptasikan selama minggu ditempatkan pada ruangan dengan suhu kamar (22-25°C) dan siklus gelap 12/12 jam di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan jumlah 5 ekor tiap kandangnya yang mewakili masing-masing kelompok. Mencit diberi pakan standar sebanyak 20 gr/ekor/hari dan diganti sekamnya setiap hari.

Apabila mencit dianggap sudah dalam kondisi diabetes melitus yang ditandai dengan gejala klasik diabetes melitus, pakan dan minum mencit dikontrol dengan ketat. Pakan dan minum dikontrol pagi dan sore setiap hari. Perlakuan pemberian pakan dan minum mencit secara adlibitum untuk menghindari keadaan polifagi dan polidipsi.

4.7.3 Penimbangan Berat Badan Mencit

Pengukuran berat badan mencit dilakukan untuk menentukan dosis STZ yang akan diinjeksikan dan mengetahui perubahan berat badan mencit setelah diberi perlakuan. Penimbangan berat badan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan menggunakan timbangan digital dengan satuan gram. Sebelum ditimbang, timbangan dihidupkan terlebih dahulu, pastikan muncul angka 0 (nol), kemudian melakukan kalibrasi pada wadah mencit. Setelah timbangan terkalibrasi yang ditandai dengan angka 0, mencit dimasukkan dalam wadah kemudian hasil penimbangan dicatat. Penimbangan berat badan mencit dilakukan sekali per minggu.

4.7.4 Pembuatan dan Perhitungan Dosis Injeksi *Streptozotocin*

STZ sebanyak 150 mg dilarutkan ke dalam 3 ml *citric acid buffer* (0,05 mol/l, pH 4,5). Selanjutnya divortex hingga homogen saat akan digunakan. Larutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C. Persiapan larutan STZ dibuat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Adapun perhitungan pemberian dosis sebagai berikut,

Dosis STZ 40 mg/kgBB

= 40 mg/kgBB x 30/1000 kgf

= 1.2 mg/mencit berat 30 g/cc (Sekali injeksi 1 cc)

4.7.5 Injeksi *Streptozotocin*

Setelah diadaptasikan selama 1 (satu) minggu mencit lalu diinjeksikan STZ intraperitoneal sebanyak 40 mg/KgBB/hari sebanyak 1 kali injeksi selama 5 (lima) hari berturut-turut (Arora *et al.*, 2009). Kerusakan sel beta pankreas ditandai dengan adanya kondisi hiperglikemi (Kadar glukosa \geq 200 mg/dl, pada manusia) pada 1 minggu pasca injeksi hari pertama (Zang *et al.*, 2006). Mencit dianggap mengalami diabetes apabila *fasting blood glucose* mencapai 150 mg/dL (Chairunnisa, 2012).

Saat injeksi, mencit diposisikan menghadap kearah frontal hingga terlihat abdomennya. Pada bagian atas abdomen mencit disemprot dengan alkohol 70%, kemudian kulit abdomen dicubit hingga terasa bagian otonya, *sputit* dimasukkan 30° pada bagian abdomen dan aspirasikan untuk memastikan tidak penetrasi ke pembuluh darah, usus, atau kandung kemih. Setelah yakin pada daerah intraperitoneal maka STZ diinjeksikan secara perlahan. Apabila didapatkan cairan pada saat aspirasi, ulangi langkah dengan *sputit* yang baru.

4.7.6 Perhitungan Dosis Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan larutan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Adapun perhitungan dosis pemberian sebagai berikut,

1. Dosis 50 mg/kgBB

$$= 50 \text{ mg/kgBB} \times 30/1000 \text{ Kg}$$

$$= 1.5 \text{ mg/mencit berat 30 gram}$$

Karena kapasitas lambung mencit $\pm 0,5$ cc dan menggunakan spuit 10 cc maka,

$$= 1.5 \text{ mg/mencit berat 30 gram} / 0.5 \text{ cc}$$

$$= 3 \text{ mg/mencit berat 30 gram/cc (untuk sekali sonde)}$$

$$= 3 \text{ mg/1 cc}$$

$$= 30 \text{ mg/10 cc}$$

2. Dosis 100 mg/kgBB

$$= 100 \text{ mg/kgBB} \times 30/1000 \text{ Kg}$$

$$= 3 \text{ mg/mencit berat 30 gram}$$

Karena kapasitas lambung mencit $\pm 0,5$ cc dan menggunakan spuit 10 cc maka,

$$= 3 \text{ mg/mencit berat 30 gram} / 0.5 \text{ cc}$$

$$= 6 \text{ mg/mencit berat 30 gram/cc (untuk sekali sonde)}$$

$$= 60 \text{ mg}/10 \text{ cc}$$

3. Dosis 200 mg/KgBB

$$= 200 \text{ mg}/\text{kgBB} \times 30/1000 \text{ Kg}$$

$$= 6 \text{ mg}/\text{mencit berat } 30 \text{ gram}$$

Karena kapasitas lambung mencit $\pm 0,5 \text{ cc}$ dan menggunakan spuit 10 cc maka,

$$= 6 \text{ mg}/\text{mencit berat } 30 \text{ gram} / 0.5 \text{ cc}$$

$$= 12 \text{ mg}/\text{mencit berat } 30 \text{ gram}/\text{cc} \text{ (untuk sekali sonde)}$$

$$= 120 \text{ mg}/10 \text{ cc}$$

4.7.7 Pemberian Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Pemberian ragi diberikan per oral melalui sonde sebelum mencit diberikan pakan, dengan harapan ragi dapat diserap secara maksimal pada saat perut mencit dalam keadaan kosong. Ragi diberikan secara terjadwal di sore hari dalam rentan waktu pukul (14:00 – 17:00). Pemberian ragi dimulai 1 (satu) minggu setelah hari pertama diinjeksi dengan STZ kemudian dilanjutkan dengan pemberian selama 6 minggu setiap hari (dengan rentan waktu mulai pukul 9:00-17:00) (Ebong, 2006). Pemberian ragi sebanyak $\pm 0,5 \text{ cc}$ sesuai dengan kapasitas lambung dari mencit.

4.7.8 Pengukuran Glukosa Darah Mencit

Sebelum diukur kadar glukosa darahnya, mencit dipuaskan selama $\pm 10-14$ jam. Sampel darah mencit diambil dari vena pada ekor mencit. Ekor diurut ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung yang terluka. Sampel darah

ditempelkan pada stik dan kemudian kadar glukosa darah diukur menggunakan *Glucometer*.

Kadar glukosa darah mencit dikukur setelah adaptasi sesaat sebelum dilakukan injeksi STZ untuk mengetahui kadar glukosa darah puasa mencit normal. Pengukuran dilakukan lagi setiap seminggu sekali secara acak pasca pemberian STZ untuk mengetahui keadaan diabetes mellitus mencit dan perbaikan fungsi pankreas. Adapun kadar glukosa darah normal mencit jantan rata-rata adalah 71-124 mg/dl (Soemardji, 2004) dan mencit dianggap diabetes apabila *fasting blood glucose* mencapai > 126 mg/dL (Suryono *dkk.*, 2013).

4.7.9 Pembedahan Mencit

Setelah dilakukan pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* selama 6 (enam) minggu, mencit kemudian dibedah untuk diambil jaringan pankreas dan darahnya. Jaringan pankreas mencit digunakan untuk analisis histologi sedangkan darah mencit digunakan untuk analisis *flow cytometry*. Mencit dibius dengan ether yang dituangkan pada kapas dan dimasukkan ke dalam toples. Sekitar 2-3 menit sampai mencit dalam keadaan terbius dapat langsung dilakukan pembedahan. Bagian abdomen mencit di insisi dengan menggunakan gunting bedah kemudian diambil pankreasnya.

4.7.10 Analisis *Flow Cytometry*

Darah yang diambil pada proses pembedahan dimasukkan kedalam tabung EDTA kemudian dilakukan pengisolasian *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). Pada isolasi PBMC, dilakukan pencampuran 2,5 cc *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dengan 2,5 cc darah (1:1) pada tabung sentrifuge 15 mL dengan tujuan untuk mempertahankan pH. Setelah itu dihomogenkan. Campuran

sampel darah dengan PBS tersebut dilapiskan secara hati-hati melewati dinding tabung ke dalam tabung sentrifuge 15 mL yang telah berisi 500 mc *Limphosite Separation Medium (LSM)* atau disebut dengan *Ficoll* densitas 1,77 gr/ml sebanyak 2,5 cc. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit dengan posisi *brake off*. Setelah disentrifugasi akan terbentuk 4 lapisan berturut-turut dari bawah ke atas eritrosit, granulosit (PMN), *ficoll hypaque*, cincin *buffy coat* (limfosit dan monosit), plasma, dan PBS. Kemudian diambil cincin *buffy coat* dengan hati-hati lalu dipindahkannya ke dalam tabung baru. Sel dicuci dengan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 10 menit. Proses pencucian diulang 2-3 kali. Kemudian buang supernatan dan ambil palatennya yang merupakan PBMC terisolasi.

Setelah dilakukan isolasi PBMC, kemudian dilakukan *staining* pada sel CD34. Pada proses *staining* dilakukan pembuatan *Cell Staining Buffer*, yang isinya merupakan PBS dengan kandungan *Fetal Bovine Serum (FBS)* 2%. Kemudian campur dengan antibodi CD34 (*Santa Cruz*) dan FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) (*Bio Legend*) (1:10). Enceran antibodi diatas dimasukkan dalam pipet sebanyak 50 μ L, dicampurkan ke dalam palat PBMC. Setelah itu diinkubasi selama 20-30 menit dalam gelap dan suhu 4°C. Setelah inkubasi, lalu tambahkan *Cell Staining Buffer* sebanyak 300-400 μ L dan pindahkan ke dalam tube 5 mL. Kemudian dilakukan pembacaan CD34 pada *flow cytometri* dengan menggunakan program software *Cell Quest Pro*.

4.7.11 Pembuatan Preparat Histopatologi Pankreas

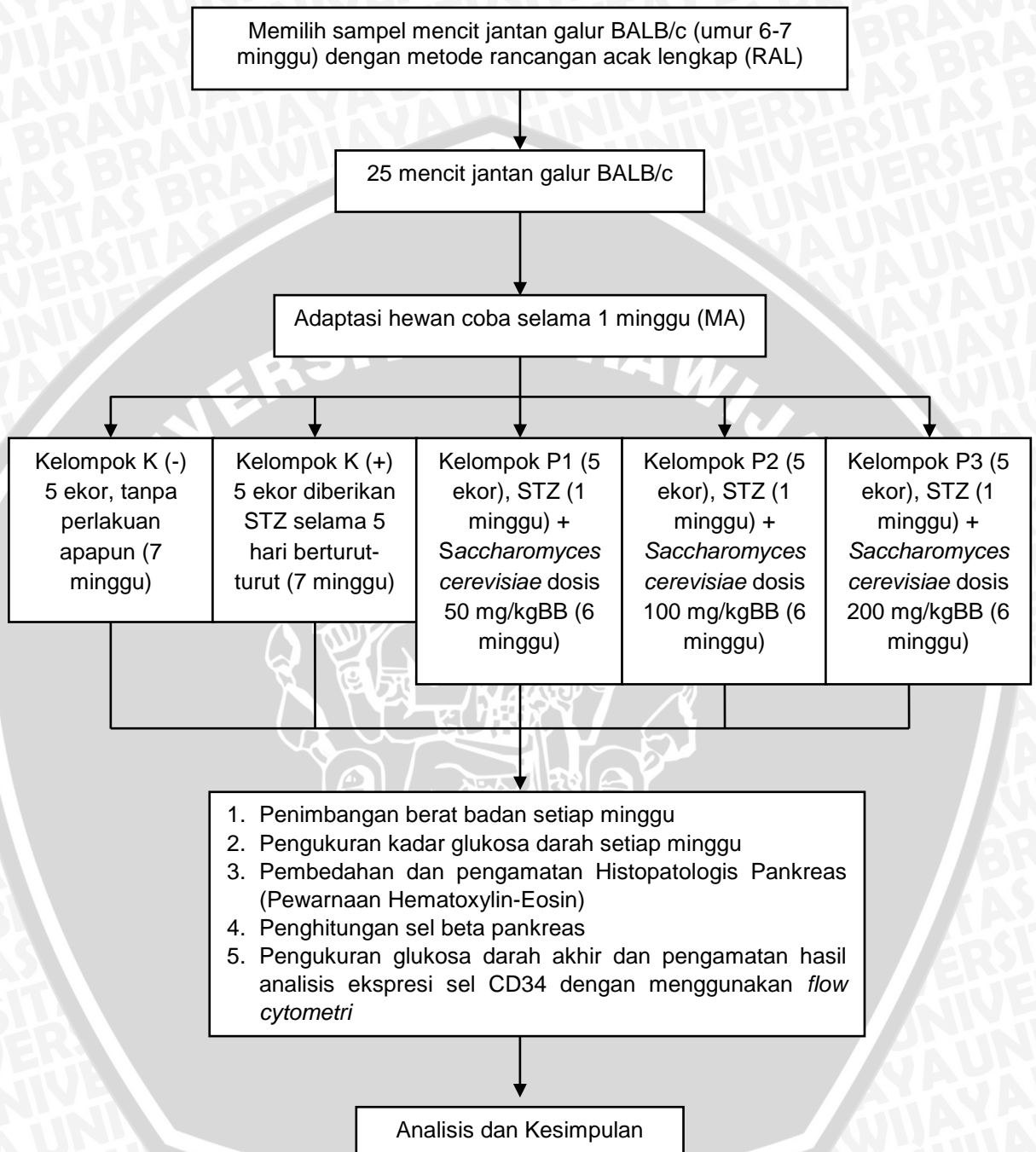
Setelah jaringan pankreas diambil melalui pembedahan, jaringan pankreas didekalsifikasi pada 5% (w/v) EDTA dan diembedding dengan *paraffin wax*. Selanjutnya dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μ m dan selanjutnya diwarnai dengan prosedur standar pewarnaan Hematoxylin-

Eosin (HE). Pankreas dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan kamera, selanjutnya dinilai prosentase kerusakan sel langerhans pada pankreas (Firdous *et al.*, 2009).

4.7.12 Penghitungan Sel Beta Pankreas

Preparat histologi pankreas yang sudah jadi diamati menggunakan mikroskop cahaya *OLYMPUS* model *CX21FS2* dengan perbesaran 400x. Pulau langerhans dalam preparat dicari dengan metode *zig-zag*. Jumlah pulau langerhans dalam setiap preparat dihitung dan dicatat, dilanjutkan dengan penghitungan dan pencatatan jumlah sel beta pankreas yang terletak pada pulau langerhans tersebut. Pada penelitian ini dibuat kesepakatan oleh penulis dalam menentukan kriteria pulau langerhans yang masuk dalam penghitungan. Adapun kriteria pulau langerhans yang masuk dalam penghitungan adalah yang memiliki jumlah sel beta pankreas ≥ 10 per pulau langerhans. Hasilnya berupa data kuantitatif rata-rata jumlah sel beta yang diperoleh dengan membagi jumlah sel beta pada preparat dengan jumlah pulau langerhans yang ada.

4.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian.

4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran berat badan mencit, kadar glukosa darah mencit, jumlah sel beta pankreas dan presentase ekspresi sel CD 34 pada hewan coba kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan software SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) 20.0 for Windows 8 dengan metode uji statistika *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)*. Sebelum melakukan analisa data dengan uji ANOVA, maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji *One-way ANOVA* yang digunakan untuk menguji tiga sampel atau lebih yang tidak saling berhubungan. Syarat uji *One-way ANOVA* adalah data yang akan diuji terdistribusi normal dan varian dari populasi tersebut adalah identik atau sama (homogen). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas Data : Uji normalitas data merupakan syarat pertama dalam melakukan uji ANOVA. Uji normalitas ini bertujuan untuk mengetahui distribusi data dalam variabel yang akan digunakan dalam penelitian. Penelitian ini menggunakan *shapiro-wilk* dan atau menggunakan *kolmogorov-smirnov* sebagai metode uji normalitasnya. Syarat data terdistribusi normal apabila nilai signifikansi data lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) maka data berdistribusi normal.
2. Uji Homogenitas Varian : Uji homogenitas varian merupakan syarat kedua dalam melakukan uji ANOVA. Analisis ini bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Dalam uji ini dilihat nilai signifikansi dari *Levene Test*. Apabila nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) maka varian populasi dinyatakan identik. Sehingga asumsi untuk menggunakan uji ANOVA telah terpenuhi dan analisis dapat

dilanjutkan. Apabila syarat dari uji ini terpenuhi maka analisa dengan uji ANOVA dapat dilanjutkan.

3. Uji *One Way ANOVA* : Analisis ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan ($p < 0,05$).
4. *Post Hoc test (Uji Tukey HSD)* : Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).
5. *Homogeneous Subsets* : Untuk melengkapi hasil dari uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey HSD*, digunakan *Homogeneous Subsets*. Analisis ini bertujuan untuk mencari kelompok atau subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$).
6. Uji Korelasi *Pearson* : Analisis ini bertujuan untuk menguji hubungan antara dua variable yang berdata rasio ataupun data kuantitatif memiliki hubungan yang berbeda secara signifikan. Analisis ini juga untuk mengetahui seberapa besar hubungannya yang telah ditentukan dari hasil uji *Post Hoc (Tukey HSD)*.