

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) jenis seri waktu dengan kelompok kontrol (*Time Series, Control Group*) untuk pengukuran kadar glukosa darah. Sedangkan untuk pengukuran profil lipid menggunakan jenis post test dengan kelompok kontrol (*Post Test, Control Group*). Subjek dipilih dengan 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*) dengan angka acak (*Random Number*).

##### 4.1.1 Rancangan Post Test dengan Kelompok Kontrol (*Post Test, Control Group*)

Rancangan penelitian menggunakan *post test* dengan kelompok kontrol. Dalam rancangan ini dilakukan randomisasi untuk penentuan anggota kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dengan randomisasi, anggota kelompok diestimasi mempunyai sifat yang sama sebelum perlakuan. Kelompok eksperimen menerima perlakuan yang kemudian dilakukan pengukuran, hasil pengukuran ini dibandingkan dengan hasil pengukuran pada kelompok kontrol yang tidak menerima perlakuan.

#### 4.1.2 Rancangan Sampel Acak Sederhana (*Simple Random Sampling*)

Rancangan pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana, karena dalam setiap populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih menjadi sampel. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana ini menggunakan angka acak (*random number*). Angka acak ini digunakan dengan cara memasukkan masing-masing subjek ke dalam 6 kelompok yang terdiri dari:

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

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

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

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

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

Kelompok VI : tikus induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin dosis 35 mg/kgBB dan diberikan OAD Glimpiride dosis 1,08 mg/kgBB/hari tikus setiap hari selama 2 minggu sebagai kontrol pembanding.

## 4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar model diabetes mellitus tipe 2 dengan induksi diet tinggi lemak dan streptozotocin. Pada induksi penyakit kronis, perubahan fisiologis pada tikus menyerupai manusia.

### 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 (*Rattus norvegicus*) galur 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 yang ditunjukkan dengan kurang aktif, perubahan nafsu makan dan minum.
- Tikus dengan cacat fisik.
- Tikus mati.

#### 4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan tiga macam perlakuan dengan dua kelompok sebagai kontrol dan satu kelompok sebagai pembanding, 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

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

Hasil penghitungan sampel menunjukkan jumlah hewan coba untuk masing-masing kelompok sama dengan 4 ekor tikus. Setiap kelompok perlakuan ditambahkan 1 ekor tikus karena pada penelitian sebelumnya, 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 diabetes mellitus tipe 2 (Pranata, 2010). Selain itu, penelitian oleh Susilowati (2011), yang menguji efek ekstrak daun Pare (*Momordica charantia*) terhadap jumlah sel beta pankreas tikus (*Rattus novvergicus*) wistar DM tipe 2 dengan *High Fat Diet* dan STZ, mengatakan bahwa terdapat 2 ekor tikus

yang mati pada kelompok perlakuan 4 dan 5 dari 5 kelompok perlakuan dan 25 ekor tikus. Tikus yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan adalah 5 ekor tikus, sehingga untuk 6 kelompok perlakuan akan dibutuhkan 30 ekor tikus. Penambahan 1 ekor tikus pada masing-masing kelompok perlakuan ini untuk menghindari terjadinya *loss of sample*.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah ekstrak daun binahong yang diberikan dalam dosis 17,5 mg/kgBB/hari, 35 mg/kgBB/hari, dan 70 mg/kgBB/hari yang diberikan setiap hari selama dua minggu dengan sonde. Variabel terikat pada penelitian ini meliputi rasio berat badan, kadar glukosa darah dan profil lipid.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penetapan lokasi dan waktu penelitian bertujuan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut penetapan lokasi dan waktu penelitian:

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian disesuaikan dengan tahapan penelitian yang dilakukan. Berikut adalah tempat penelitian yang digunakan:

- Pembuatan ekstrak daun binahong dilakukan di laboratorium farmakognosi dan fitoterapi Prodi Farmasi FKUB.
- Uji kualitatif fitokimia ekstrak daun binahong dilakukan di laboratorium farmakognosi dan fitoterapi Prodi Farmasi FKUB.
- Pemeliharaan hewan coba dilakukan di laboratorium faal FKUB.
- Induksi diabetes mellitus tipe 2 dilakukan di laboratorium faal FKUB.

- Pengambilan sampel darah dilakukan di laboratorium faal FKUB.
- Pemeriksaan kadar glukosa darah di laboratorium faal FKUB.
- Pembuatan serbuk ekstrak daun binahong dengan teknik *freeze-drying* dilakukan di laboratorium penyakit tropis UNAIR Surabaya.
- Pemeriksaan profil lipid dilakukan di laboratorium patologi klinik Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung sejak tanggal 03 Maret 2014 hingga 12 Mei 2014.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan dan alat digunakan untuk pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus tipe 2, pemberian ekstrak daun binahong, pengambilan sampel darah, pemeriksaan kadar glukosa darah dan pemeriksaan profil lipid.

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan.

##### 4.5.1.1 Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor adalah 25 gram setiap hari. Dalam penelitian ini terdapat dua macam pakan tikus, yaitu diet tinggi lemak untuk perlakuan ekstrak daun binahong, serta kelompok tikus dengan diet tinggi lemak untuk kelompok kontrol positif dan diet normal untuk kelompok kontrol negatif. Adapun komposisi pakan normal dan diet tinggi lemak adalah sebagai berikut:

- a. Pakan normal, terdiri dari PARS 53,87 % (pakan ternak yang mengandung 63,8 % karbohidrat, 5 % lemak, 19 % protein), tepung terigu 26,94 %, dan air sebesar 19,18 %.
- b. Diet tinggi lemak yang terdiri dari PARS 50 %, tepung terigu 25 %, kolesterol 1 %, asam cholat 0,1 %, minyak babi 2,5 %, dan air sebesar 21,4 %.

#### **4.5.1.2 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong**

Bahan untuk pembuatan ekstrak daun binahong yaitu 400 gram serbuk kering daun binahong dan 6 liter etanol 70 %.

#### **4.5.1.3 Uji Kualitatif Fitokimia Ekstrak Daun Binahong**

Selain ekstrak daun binahong 0,5 gram, bahan yang diperlukan yaitu:

- Larutan HCl dan reagen Wagner untuk uji alkaloid.
- Metanol dan larutan  $H_2SO_4$  untuk uji flavonoid.
- Air untuk uji saponin.

#### **4.5.1.4 Induksi Streptozotocin**

Bahan yang dibutuhkan untuk menginduksi streptozotocin pada tikus yaitu larutan streptozotocin dan etanol 70 %. Untuk pembuatan larutan streptozotocin digunakan streptozotocin 312 gram dan aquabidest steril.

#### **4.5.1.5 Tes Toleransi Glukosa**

Bahan yang dibutuhkan untuk tes toleransi glukosa yaitu 6,6 gram glukosa dan 33 ml water for injection (WFI).

#### **4.5.1.6 Pemberian Terapi**

Untuk pemberian terapi digunakan serbuk ekstrak daun binahong dan tablet glimepiride 2 mg.

#### 4.5.1.7 Pemeriksaan Profil lipid

##### 1. Trigliserida

Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar trigliserida yaitu PIPES buffer pH (6,8), sodium kolat, ATP, 4-aminophenazone, 4-klorofenol, lipoprotein lipase, gliserokinase, gliserol fosfat oksidase, dan peroksidase.

##### 2. Kolesterol Total

Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar kolesterol total yaitu PIPES buffer pH (6,8), sodium kolat, 4-aminophenazone, *fatty alcohol polyglycol ether*, fenol, kolesterol oksidase, kolesterol esterase, dan peroksidase.

##### 3. High-density lipoprotein (HDL)

Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar kolesterol HDL yaitu HEPES Buffer, CHES pH 7,4, dekstran sulfat, magnesium nitrat heksahidrat, HSDA, sskorbat oksidase HEPES buffer (pH 7,0), PEG-kolesterol esterase, PEG-kolesterol oksidase, peroksidase, dan 4-aminoantipirin.

##### 4. Low-density lipoprotein (LDL)

Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar kolesterol LDL yaitu HSDA, dekstran sulfat, askorbat oksidase, MOPS (3-morfolinopropan asam sulfonat) buffer (pH 6,8),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 4-aminoantipirin, kolesterol esterase, kolesterol oksidase, dan peroksidase.

#### 4.5.2 Alat Penelitian

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

Tabel 4.1 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 tipe 2	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 appendorf, 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 drier</i> .
Uji Fitokimia ekstrak daun binahong	Tabung reaksi, pipet tetes, tissue, plat porselen, pembakar spiritus
Pemberian ekstrak daun binahong	Beaker glass, batang pengaduk, sonde
Pengambilan sampel darah	Syringe, tissue, jarum, kapas, tabung vial
Pemeriksaan profil lipid	Alat Cobas 6000, kuvet, sentrifugator, mikropipet, tabung appendorf

#### 4.6 Definisi Operasional

- a. Diabetes mellitus tipe 2 merupakan penyakit kronis yang ditandai dengan berkurangnya sensitivitas reseptor terhadap insulin atau resistensi insulin dan menurunnya fungsi pankreas untuk memproduksi insulin.
- b. Serbuk kering daun binahong diperoleh dari Materia Medica Batu (MMB), Batu, Malang.
- c. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar berusia 75-90 minggu dengan berat badan antara 200-250 gram. Tikus ini menunjukkan tanda dan gejala yang sama dengan manusia ketika menderita sindroma metabolik.

- d. Streptozotocin adalah antibiotik spektrum luas dan sitotoksik terutama pada pankreas. Dosis 35 mg/kg menyebabkan toksisitas pada sel beta pankreas.
- e. Diet Tinggi Lemak adalah pakan tinggi kolesterol yang dimodifikasi dengan formulasi khusus untuk menimbulkan obesitas pada hewan coba tikus yang terdiri dari konsentrat PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air 21,4%.
- f. Profil lipid adalah suatu gambaran profil lipid di dalam darah, meliputi kadar trigliserida, kadar kolesterol total, kadar *low density lipoprotein* (LDL), dan kadar *high density lipoprotein* (HDL).
- g. Memperbaiki profil lipid yaitu menurunkan kadar kolesterol total, kadar trigliserida, dan kadar LDL, serta meningkatkan kadar HDL.

#### 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Penelitian terdiri dari beberapa tahapan yang meliputi pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus tipe 2, pemberian ekstrak daun binahong, pengambilan sampel darah, pengukuran kadar glukosa darah dan pemeriksaan profil lipid. Kemudian, pengumpulan data meliputi berat badan tikus, kadar glukosa darah, dan profil lipid.

##### 4.7.1 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari berbagai prosedur dimulai sejak pemeliharaan hewan coba hingga pemeriksaan kadar lipid.

###### 4.7.1.1 Persiapan Kandang

- Menyiapkan rak besi untuk menempatkan 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 kriteria yang telah ditetapkan yaitu tikus putih strain wistar.
- Kemudian dilakukan adaptasi, yaitu tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dengan diberi pakan biasa dan minum selama 1 minggu.

#### 4.7.1.3 Penimbangan Berat Badan Tikus

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 Pakan Normal

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

#### 4.7.1.5 Pembuatan Diet Tinggi Lemak

- Jumlah makanan rata-rata 25 gr/hari untuk setiap tikus.

- 25 g makanan mengandung konsentrat PARS 12,5 g/hari, tepung terigu 6,25 g/hari, kolesterol 0,25 g/hari, asam cholat 0,025 g/hari, dan minyak babi 0,625 g/hari.

#### 4.7.1.6 Pembuatan Larutan Streptozotocin

Pembuatan larutan STZ sesuai dengan prosedur yang ada di laboratorium farmakologi FKUB, yaitu:

1. Streptozotocin (STZ) ditimbang sebanyak 312 mg, ditambahkan aquabidest steril kemudian dilarutkan hingga homogen. (sediaan larutan STZ 11 mg/0,5 mL).
2. Cek pH larutan menggunakan kertas pH, jika pH larutan sudah 4,5, bisa langsung disimpan, namun jika pH lebih dari 4,5 digunakan asam sitrat 0,1 M untuk menurunkan pH dan jangan sampai terlalu rendah dari 4,5 karena tidak bisa dinaikkan lagi.
3. Larutan STZ disimpan di kulkas sebelum diinjeksikan.

#### 4.7.1.7 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang.
2. Larutan STZ 35 mg/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal (i.p) sekali (Srinivasan *et al.*,2005) setelah 5 minggu pemberian diet tinggi lemak. Kemudian larutan STZ ini dimasukkan ke dalam *syringe* yang telah disiapkan.
3. Tikus diposisikan menghadap ke arah frontal hingga terlihat bagian abdomennya.
4. Pada bagian atas abdomen tikus diusap dengan kapas yang terbasahi etanol 70%.

5. *Syringe* dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.
6. STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus diusap dengan kapas yang telah diolesi etanol 70% kembali.
7. Setelah induksi STZ ditunggu selama 2 hari dan 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 STZ selama 2 hari.
2. Induksi glukosa diberikan menggunakan sonde dengan dosis 1 g/kgBB tikus (Siegel *et al.*, 1980).
  - Cara pembuatan larutan glukosa 50% untuk tes toleransi glukosa (untuk 30 tikus dengan berat @220 gram)
    - a. Disiapkan glukosa sebanyak 6,6 gram.
    - b. Glukosa dilarutkan dalam *water for injection* (WFI) sebanyak 33 ml lalu divortex hingga homogen.

#### 4.7.1.9 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang menggunakan serbet.
2. Ujung ekor tikus diberi alkohol dan ditusuk jarum.
3. Ekor diurut ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka.
4. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur glukosa darah digital, kemudian dilihat hasilnya.
  - a. Pemeriksaan glukosa darah puasa (GDP) dilakukan pada H0 (sebelum diberikan terapi hari pertama), H7, H15. Pemeriksaan glukosa darah

puasa pada H0 dilakukan untuk memastikan tikus sudah dalam kondisi DM dengan kadar glukosa > 200mg/dL. Pemeriksaan selanjutnya dilakukan untuk mengetahui efek dari terapi yang diberikan.

b. Pemeriksaan profil glukosa darah pada H1, H7, dan H14

- Pemeriksaan profil glukosa darah ini bertujuan untuk mengetahui toleransi glukosa pada tikus dan mengetahui efek dari ekstrak daun binahong setelah pemberian terhadap kadar glukosa darah tiap 2 jam selama 10 jam.
- Tikus dipuasakan selama 12 jam (mulai malam hari).
- Setelah puasa 12 jam dilakukan pemeriksaan GDP kemudian diberikan induksi glukosa oral (semua kelompok), setelah 30 menit dilakukan pemeriksaan glukosa darah lagi. Selanjutnya diberikan ekstrak daun binahong (kelompok III, IV, V), dan glibemipiride (kelompok IV) dengan sonde.
- Pengukuran glukosa darah dilakukan setiap 2 jam setelah pemberian terapi sebanyak lima kali dalam 10 jam.

c. Pemeriksaan profil glukosa darah selanjutnya dilakukan pada H1, H7, dan H14 untuk melihat progresivitas dari terapi yang diberikan, dengan pakan normal pada tikus.

#### 4.7.1.10 Pembuatan Ekstrak Daun Binahong

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

4. Setelah distirer pada 30 menit pertama, campuran serbuk kering daun binahong dan etanol 70 % distirer kembali dengan kecepatan 500 rpm selama 30 menit.
5. Toples 1 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 2 liter etanol 70 % sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga merata (proses remaserasi pertama).
8. Toples 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 (7) sampai (8) diulangi (remaserasi kedua).
11. Setelah didapatkan ekstrak daun binahong berwarna hitam, kemudian ekstrak di *rotary evaporator* dengan suhu 40° C dengan kecepatan 70 rpm selama 1 jam hingga didapatkan ekstrak kental.
12. Ekstrak yang sudah kental dikeringkan hingga menjadi serbuk dengan metode *freeze drying* selama ± 24 jam.
13. Ekstrak yang sudah menjadi serbuk diletakkan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan dalam lemari es.

#### 4.7.1.11 Uji Kualitatif Senyawa dalam Ekstrak Daun Binahong

Uji alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram yang akan diuji dalam HCl. Kemudian disaring, filtratnya diambil dan ditambahkan reagen Wagner, endapan coklat akan terbentuk (Pederson, 2006).

Uji saponin dengan cara mencampurkan 0,5 gram sampel dengan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan tersebut didinginkan kemudian dikocok dan timbul busa selama  $\pm$  10 menit (Kristina *et.al.*, 2009).

Uji flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 gram sampel dengan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan 5 tetes  $H_2SO_4$  terbentuknya warna merah karena penambahan  $H_2SO_4$  menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Kristina *et.al.*, 2009).

#### 4.7.1.12 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 glimepiride dilakukan dengan menggunakan sonde setiap hari selama dua minggu. Terapi diberikan 30 menit setelah pemberian pakan. Ekstrak daun binahong diberikan dalam bentuk larutan yang dilarutkan dengan air. Glimepiride diberikan dalam bentuk suspensi yang menggunakan carboxymethylcellulose (CMC) sebagai *suspending agent*.

- a. Pembuatan larutan ekstrak daun binahong:
  - ✓ Serbuk ekstrak daun binahong ditimbang sebanyak 250mg.
  - ✓ dilarutkan dalam *water for injection* (WFI) sebanyak 25ml.
  - ✓ Lalu divortex sampai homogen sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1% (diberikan pada kelompok PC sesuai dosis).
  - ✓ Pengenceran dilakukan dari larutan stok hingga didapatkan konsentrasi 0,25% (untuk kelompok PA) dan 0,5% (untuk kelompok PB).

b. Pembuatan suspensi glimepiride (Ratimanjari, 2011):

- ✓ CMC ditimbang sebanyak 50mg lalu dilarutkan dalam *water for injection* (WFI) sebanyak 1ml dan diaduk sampai mengembang seperti gel.
- ✓ Ditambahkan *water for injection* (WFI) sebanyak 10ml dan diaduk sampai homogen.
- ✓ Ditambahkan tablet glimepiride 2mg yang sudah digerus halus.
- ✓ Diaduk dan divortex hingga homogen.

#### 4.7.1.13 Euthanasia dan Pengambilan Sampel Darah

Setelah dua minggu pemberian terapi, euthanasia tikus menggunakan inhalasi kloroform, kemudian tikus dibedah berdasarkan protokol pembedahan hewan coba di laboratorium Faal FKUB. Selanjutnya dilakukan insisi di daerah perut sampai diafragma untuk pengambilan darah dari jantung sebanyak 5 ml dari masing-masing sampel (Wulandari, 2011). Setelah itu, darah dimasukkan sentrifugator dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit. Serum diambil dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama siap untuk diukur (Shibayagi, 2009).

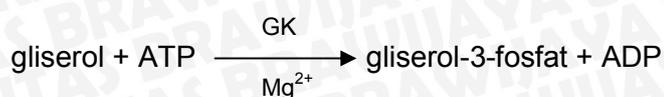
#### 4.7.1.14 Pemeriksaan Profil lipid

Untuk pemeriksaan kadar masing-masing lipid yaitu (Cobas, 2006):

##### 1. Triglicerida

Penentuan kadar triglicerida menggunakan metode *Enzymatic*

*Colorimetric Test*. Prinsip reaksinya, yaitu:





Intensitas warna yang terbentuk berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol.

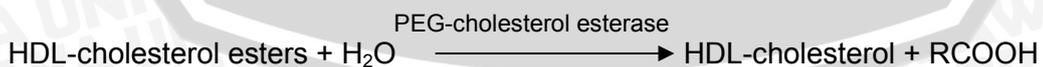
Hal ini ditentukan dengan mengukur peningkatan absorbansi.

Reagensia:

- PIPES Buffer pH 6,8 10 mmol/l
- Sodium kolat 0,6 mmol/l
- 4-aminophenazone  $\geq 0,45$  mmol/l
- Phenol  $\geq 12,6$  mmol/l
- Fatty alcohol polyglycol ether 3 %
- Kolesterol oksidase  $\geq 7,5$   $\mu$ kat/l
- Kolesterol esterase  $\geq 25$   $\mu$ kat/l
- Peroksidase  $\geq 12,5$   $\mu$ kat/l

### 3. *High-density lipoprotein* (HDL)

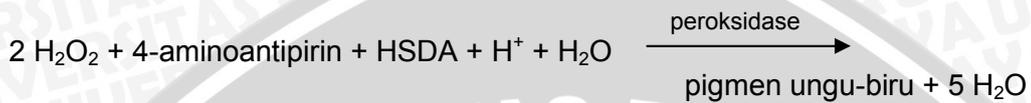
Penentuan kadar kolesterol total menggunakan metode *Homogenous Enzymatic Colorimetric Test*. Dengan adanya magnesium sulfat, dekstran sulfat selektif membentuk kompleks yang larut dalam air dengan LDL, VLDL dan kilomikron yang tahan terhadap enzim PEG-modifikasi. Konsentrasi HDL-kolesterol ditentukan oleh kolesterol esterase dan kolesterol oksidase digabungkan dengan PEG (sekitar 40%). Kolesterol ester dipecah menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kolesterol esterase. Prinsip reaksinya, yaitu:



Dengan adanya oksigen, kolesterol teroksidasi oleh kolesterol oksidase menjadi  $\Delta^4$ -cholestenone dan hidrogen peroksida.



Dengan adanya peroksidase, hidrogen peroksida yang dihasilkan bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan HSDA untuk membentuk warna ungu-biru. Intensitas warna ini berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol dan diukur secara fotometrik.



\*HSDA = Sodium N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetolsianilin

#### Reagensia R1

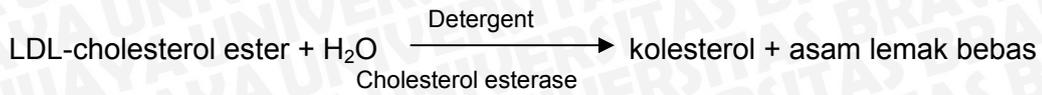
- HEPES Buffer 10,07 mmol/l
- CHES pH 7,4 96,95 mmol/l
- Dekstran sulfat 1,5 g/l
- Magnesium nitrat heksahidrat > 11,7 mmol/l
- HSDA 0,96 mmol/l
- Askorbat oksidase > 50 µkat/l
- Peroksidase > 16,7 µkat/l

#### Reagensia R2:

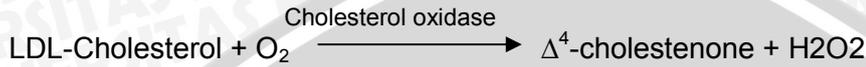
- HEPES Buffer pH 7,0 10,07 mmol/l
- PEG-cholesterol esterase > 3,33 µkat/l
- PEG-cholesterol oksidase > 127 µkat/l
- Peroksidase > 333 µkat/l
- 4-aminoantipirin 2,46 mmol/l

#### 4. *Low-density lipoprotein* (LDL)

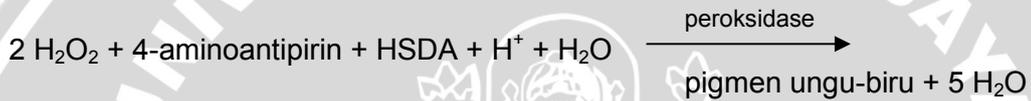
Penentuan kadar kolesterol total menggunakan metode *Homogenous Enzymatic Colorimetric Test*. Prinsip reaksinya, yaitu:



Kolesterol ester dipecah menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kolesterol esterase.



Dengan adanya oksigen, kolesterol teroksidasi oleh kolesterol oksidase menjadi  $\Delta^4$ -cholestenone dan hidrogen peroksida.



\*HSDA = Sodium N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetolsianilin

Dengan adanya peroksidase, hidrogen peroksida yang dihasilkan bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan HSDA untuk membentuk warna ungu-biru. Intensitas warna ini berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol dan diukur secara fotometrik.

Reagensia R1

- MOPS (3-morfolinopropan asam sulfat) buffer pH 6,5      20,1 mmol/l
- HSDA      0,96 mmol/l
- Dekstran sulfat      1,5 g/l
- Askorbat oksidase       $\geq 50 \mu\text{kat/l}$
- Peroksidase       $\geq 167 \mu\text{kat/l}$

Reagensia R2:

- MOPS (3-morfolinopropan asam sulfat) buffer pH 6,8      20,1 mmol/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$       8,11 mmol/l
- 4-aminoantipirin      2,46 mmol/l



- Kolesterol esterase  $\geq 50 \mu\text{kat/l}$
- Kolesterol oksidase  $\geq 33,3 \mu\text{kat/l}$
- Peroksidase  $\geq 334 \mu\text{kat/l}$

#### 4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya:

- ✓ Berat badan masing-masing tikus diukur berdasarkan tabel 4.2. Berat badan tikus ditimbang dengan timbangan merk *Sartorius melter* (ketelitian 0,1 kg).

Tabel 4.2 Pengukuran Berat Badan Tikus

Waktu Kelompok	Fase Adaptasi (1 minggu)	Fase Induksi Diet Tinggi Lemak (5 minggu)	Fase Induksi Streptozotocin	Fase Terapi (2 minggu)
I	1 kali (awal penelitian)	Seminggu sekali	-	Setiap 2 hari
II			Sebelum injeksi	
III				
IV				
V				
VI				

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

- ✓ Kadar glukosa darah tikus diukur berdasarkan tabel 4.3. Pengukuran glukosa darah pada bagian ekor dengan menggunakan *glucose check test* untuk memastikan tikus telah mengalami diabetes mellitus tipe 2.

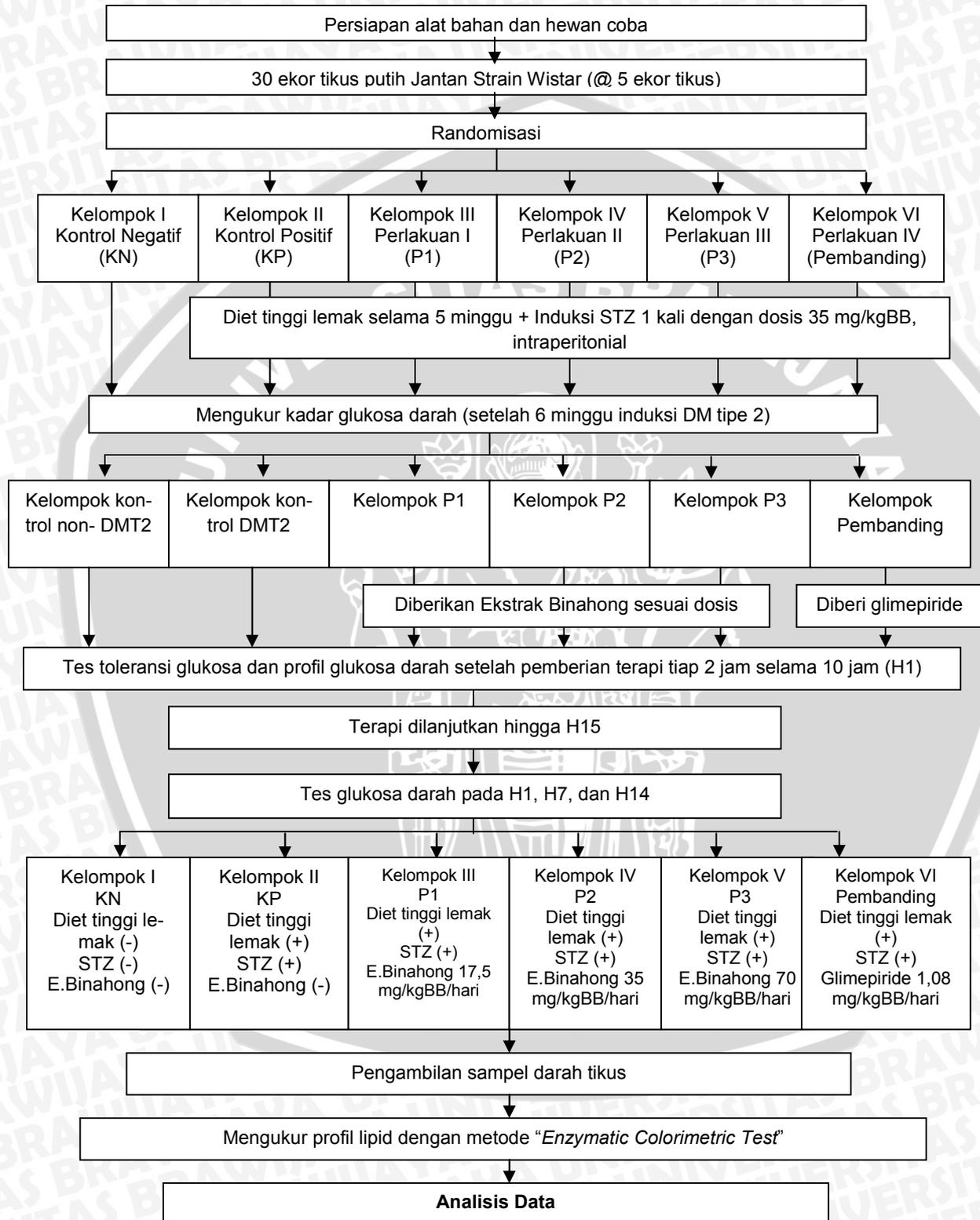
Tabel 4.3 Pengukuran Glukosa Darah Tikus

Waktu Kelompok	Fase Adaptasi (1 minggu)	Fase Induksi DM tipe 2 (Diet Tinggi Lemak dan Streptozotocin) (5 minggu 2 hari)	Fase Terapi (2 minggu)
I	1 kali (sebelum pemberian diet tinggi lemak)	(sebelum dilakukan injeksi STZ dan dua hari setelah injeksi STZ)	GDP dan 6 kali setiap pengukuran profil glukosa darah pada H1, H7, dan H14 GDP sebelum dibedah
II			
III			
IV			
V			
VI			

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum induksi diabetes mellitus tipe 2. Selama induksi diabetes mellitus tipe 2 dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah setelah pemberian diet tinggi lemak selama 5 minggu (sebelum penginjeksian STZ) untuk memastikan bahwa tikus tidak dalam kondisi hipoglikemia ataupun hiperglikemia. Selanjutnya pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan setelah 2 hari injeksi STZ untuk mengetahui tikus sudah dalam kondisi diabetes atau belum. Pada saat H1, H7, dan H14 terapi dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa, 30 menit setelah induksi glukosa oral untuk mengetahui toleransi glukosa pada tikus, dan tiap 2 jam selama 10 jam yang bertujuan untuk mengetahui profil glukosa darah setelah pemberian ekstrak daun binahong. Pemeriksaan kadar glukosa darah selanjutnya dilakukan sebelum pembedahan tikus.

- ✓ Profil lipid diukur setelah penelitian selama sembilan minggu dengan metode *Enzymatic Colorimetric Test*.

### 4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Analisis statistik dengan *one way ANOVA* dengan menggunakan Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versi 20. Data berat badan, kadar glukosa darah, dan kadar lipid yang didapatkan disajikan dalam mean  $\pm$  standard deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Lalu, uji beda statistik parametrik dengan *one way ANOVA*. *One Way Anova* digunakan untuk menguji hipotesis komparatif lebih dari dua sampel secara serempak bila setiap sampel terdiri atas satu kategori (Sugiyono, 2007). Hasil masing-masing uji dikatakan signifikan bila  $p < 0,05$ . Jika hasil uji signifikan dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing kelompok. 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  $p < 0,05$ . Jika hasil uji signifikan dapat dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing kelompok. Uji korelasi dapat dilakukan menggunakan uji korelasi *Pearson* jika menggunakan *One Way Anova*, dan menggunakan uji korelasi *Spearman* jika menggunakan *Kruskal Wallis*.

Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

H1 = ada penurunan kadar glukosa darah dan profil lipid pada tikus wistar diabetes mellitus tipe 2 yang besarnya tergantung dosis ekstrak etanol binahong yang diberikan.

H0 = tidak ada penurunan kadar glukosa darah dan profil lipid pada tikus wistar diabetes mellitus tipe 2 pada masing-masing dosis ekstrak etanol binahong yang diberikan.