

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental*. Desain penelitian yang digunakan adalah Pre Test dan Post Test Control Group Design dengan pengamatan kadar glukosa darah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Ciri utama dari penelitian eksperimen sesungguhnya yaitu, sampel dan kelompok kontrol dipilih secara acak dari populasi tertentu.

#### **3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Waktu Penelitian Pelaksanaan penelitian ini akan dilakukan pada bulan Januari-Februari 2023. Tempat perlakuan dan pengukuran kadar glukosa darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) di laboratorium biomedik Universitas Muhammadiyah Malang, ekstraksi daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dilakukan di Laboratorium Materia Medica, dan pengecekan hasil histopatologi dilakukan di Laboratorium Klinik Hewan Satwa Sehat Indonesia.

#### **3.3 Populasi, Teknik Sampling, dan Sampel**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan umur  $\pm 2$  bulan dengan berat 200 gram sebagai hewan coba, dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang digunakan bagian 2-3 helai dari pucuk.

##### **3.3.2 Teknik Sampling**

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling* (acak sederhana) yaitu teknik pengambilan sampel dengan cara acak sehingga setiap sampling yang ada dalam populasi mempunyai peluang yang sama untuk dipilih menjadi sampel.

### 3.3.3 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus :

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

Jumlah ulangan pada penelitian ini yaitu:

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

$$(r-1)(4-1) \geq 15$$

$$(r-1)(3) \geq 15$$

$$r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 18/3$$

$$r \geq 6 \text{ (ulangan yang digunakan adalah 6 kali)}$$

jumlah sampel penelitian ini yaitu:

$$n = t \times r$$

$$n = 4 \times 6 = 24$$

**Keterangan:**

t= banyak kelompok perlakuan

r= jumlah ulangan

n= besar sampel minimum

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah minimum tikus yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu, 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan .

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Jenis Variabel

#### 1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*)

L.) dengan dosis 10,5 mg/KgBB, 21 mg/KgBB, dan 42 mg/KgBB

## 2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah dan histopatologi tikus putih jantan

## 3. Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini dihomogenkan yaitu makanan dan minuman tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan tikus, suhu tubuh tikus, serta kebersihan kandang tikus.

### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Agar tidak terjadi kesalahan makna dalam setiap variabel maka perlu didefinisikan tiap variabel yang digunakan dalam penelitian ini. Adapun operasional variabel tersebut, yaitu:

1. Ekstrak sirih hijau dalam penelitian ini didapatkan dari ekstraksi helai daun sirih hijau di setiap ujung tangkai daun yang tidak rusak dan tidak berlubang yang sudah dikeringkan menggunakan pelarut etanol 70% (Fitrianita et al., 2018) dengan metode maserasi.
2. Aloksan diberikan kepada tikus dengan dosis 150 mg/KgBB (Fitrianita et al., 2018).
3. Ekstrak sirih hijau diberikan kepada tikus dengan berbagai dosis (10,5 mg/kg BB, 21 mg/kg BB, 42 mg/kg BB) (Aprillia et al., 2020).
4. Kadar glukosa tikus putih dicek pada hari ke 14, setelah pemberian perlakuan (Priyoherianto et al., 2021) dengan menggunakan alat *Blood glucose stick meter Gluco DrTM*. Darah diambil melalui bagian ujung ekor tikus.
5. Jenis tikus pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar dari spesies *Rattus*

*norvegicus* berjenis kelamin jantan dikarenakan tidak dipengaruhi oleh hormon.

6. Tikus putih jantan yang digunakan dalam penelitian ini berumur  $\pm$  2 bulan dengan berat 150-200 gram.
7. Tikus diadaptasi selama 7 hari (Mutiarahmi et al., 2021)
8. Pakan tikus yang digunakan yaitu pakan BR-1
9. Sekam alas pada kandang tikus diganti setiap 3 hari sekali atau ketika keadaan sekam terlalu basah untuk menjaga kebersihan kandang.
10. Suhu dalam kandang dijaga pada suhu ruangan sekitar 25-27°C.
11. Histopatologi yang diamati adalah sel  $\beta$  pankreas
12. Parameter yang diamati pada gambaran histopatologi adalah nekrosis

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Penelitian

- a. Persiapan Alat & Bahan

**Tabel 3 1. Alat yang digunakan dalam penelitian**

Alat	Jumlah
Kandang hewan (30cm x 20cm x 10cm)	10 buah
Tempat minum	20 buah
Timbangan	1 buah
Sput	1 buah
Oven	1 buah
Corong kaca	1 buah
Kain saring	1 buah
Botol ekstrak	5 buah
Gelas ukur 100ml	3 buah
Spatula	1 buah
Toples kaca ukuran 4L	1 buah
Blood glucose stick meter	1 buah
Blender	1 buah
Gunting	1 buah
Sonde tikus	3 buah
Beaker glass 1000 ml	1 buah
Rotary evaporator	1 buah
Kandang hewan (30cm x 20cm x 10cm)	10 buah

**Tabel 3 2. Bahan yang digunakan dalam penelitian**

<b>Bahan</b>	<b>Jumlah</b>
Daun sirih hijau	600 g
Tikus putih jantan	24 ekor
Pakan	13 kg
Aquades	1 liter
Aloksan	1 g
Aluminium foil	1 lembar
Sekam	6 kg
Alkohol swab	1 kotak
Etanol 70%	2000 ml
NaCl 0,9%	20 ml

### 3.5.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan tersebut digunakan untuk penelitian yang lingkungannya memiliki sifat homogen sehingga penempatan setiap unit eksperimen pada petak dilakukan acak. Jumlah perlakuan dalam penelitian ini adalah 3 perlakuan uji dan 1 perlakuan kontrol masing-masing 6 kali pengulangan. Ragam unit eksperimen dari penelitian ini sebagai berikut:

- K → K1, K2, K3, K4, K5, K6
- P1 → P1 1, P1 2, P1 3, P1 4, P1 5, P1 6
- P2 → P2 1, P2 2, P2 3, P2 4, P2 5, P2 6
- P3 → P3 1, P3 2, P3 3, P3 4, P3 5, P3 6

#### Keterangan:

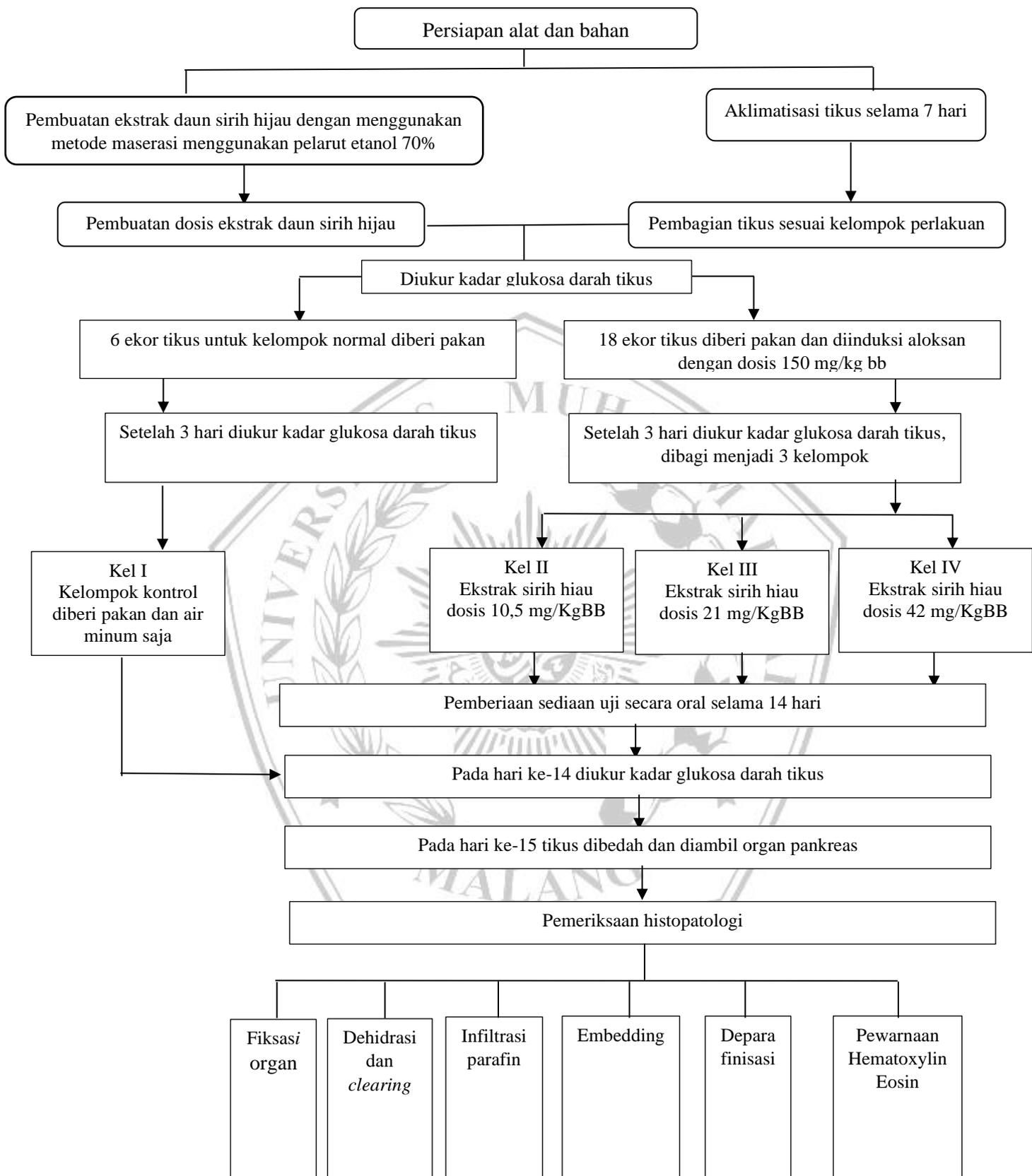
- K : air minum + pakan
- P1 : induksi aloksan + ekstrak daun sirih hijau 10,5 mg/ kgBB
- P2 : induksi aloksan + ekstrak daun sirih hijau 21 mg/ kgBB
- P3 : induksi aloksan + ekstrak daun sirih hijau 42 mg/ kgBB

### 3.5.3 Pelaksanaan dan alur Penelitian

1. Menyiapkan hewan uji
  - a. Meletakkan hewan uji dalam masing-masing kandang sesuai dengan perlakuan
  - b. Mengadaptasikan hewan uji di laboratorium selama 7 hari
2. Menyiapkan sediaan uji
  - a. Mengumpulkan daun sirih hijau
  - b. Mencuci daun sirih hijau dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel
  - c. Mengeringkan daun sirih hijau dengan diangin-anginkan sampai kering
  - d. Menghaluskan daun sirih hijau yang telah kering hingga menjadi serbuk halus
  - e. Menimbang simplisia daun sirih hijau
  - f. Merendam simplisia daun sirih hijau dengan etanol 70% selama 3x24 jam
  - g. Menyaring rendaman daun sirih hijau
  - h. Melakukan destilasi sampai cairan sudah tidak menguap
  - i. Melakukan pengovenan pada suhu 70°C untuk menguapkan seluruh pelarut sehingga didapatkan ekstrak kental saja
  - j. Menampung cairan pekat pada botol gelap
  - k. Membuat ekstrak dengan dosis yang telah ditentukan (10,5 mg/KgBB, 21 mg/KgBB, dan 42 mg/KgBB) (Aprillia et al., 2020).
3. Tahap penginduksian aloksan
  - a. Menyuntikkan aloksan dengan dosis 150 mg/KgBB yang diinjeksi secara intraperitoneal dipilih karena dosis ini merupakan dosis optimal untuk menyebabkan kondisi diabetes.

- b. Mengecek kadar glukosa darah tikus setelah 3x24 jam penginduksian. Jika kadar glukosa darah tikus puasa  $>126$  mg/dL (Alza, 2013; Khairani, 2019) maka dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sirih hijau sesuai dengan kelompok perlakuan. Jika kadar glukosa darah belum mengalami kenaikan maka dilakukan penginduksian kembali.
4. Tahap pengecekan kadar glukosa darah (sebelum perlakuan)  
Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah penginduksian aloksan dan sebelum diberikan perlakuan ekstrak daun sirih hijau, dengan cara mengurut bagian ekor secara perlahan, membersihkan bagian ekor yang hendak dipotong dengan alkohol swab, memotong ujung ekor dengan gunting bedah. Selanjutnya meletakkan darah pada ujung *Blood glucose stick meter Gluco DrTM* dan membaca hasil kadar glukosa pada tikus putih.
5. Tahap pemberian ekstrak daun sirih hijau tikus diberi perlakuan sesuai dosis 1 kali dalam sehari selama 14 hari Ekstrak daun sirih hijau 10,5 mg/ kgBB (Dosis I), 21 mg/ kgBB (Dosis II), dan 42 mg/ kgBB (Dosis III)
6. Tahap pemeriksaan glukosa darah (sesudah perlakuan) Setelah pemberian ekstrak daun sirih hijau berbagai dosis pada hari ke-14, maka dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pada tikus putih dengan cara mengurut bagian ekor secara perlahan, membersihkan bagian ekor yang hendak dipotong dengan alkohol swab, memotong ujung ekor dengan gunting bedah. Selanjutnya meletakkan darah pada ujung *Blood glucose stick meter Gluco DrTM* dan membaca hasil kadar glukosa pada tikus putih.
7. Tahap pemeriksaan histopatologi sel beta pankreas

- a. Pertama, organ pankreas tikus yang telah didekapitasi diambil dan dimasukkan dalam pot plastik. Organ langsung difiksasi dengan menggunakan formalin 10%. Setelah itu, dilakukan pemotongan pada organ pankreas yang telah difiksasi tadi dan dimasukkan ke dalam tissue cassette dan dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit.
- b. Kedua, tahap dehidrasi yaitu proses penarikan cairan jaringan. Jaringan pankreas yang telah dimasukkan ke dalam tissue cassette direndam dengan menggunakan etanol secara bertingkat berurut-urutan etanol 70%, 80%, dan 90% masing-masing selama 1 jam, kemudian etanol absolut I selama 1 jam, etanol absolut II selama 1 jam dan etanol absolut III selama 1 jam.
- c. Ketiga, dilakukan proses penjernihan (*clearing*), dengan menggunakan larutan xylena, untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi). Dimulai dengan memasukan jaringan pankreas ke dalam xylena I selama 20 menit, kemudian xylena II selama 20 menit dan selanjutnya xylena III selama 20 menit.
- d. Keempat, dilakukan proses infiltrasi parafin. Organ dimasukkan ke dalam parafin panas, untuk membuat jaringan menjadi lebih keras dan lebih mudah dipotong dengan mikrotom.
- e. Kelima, dilakukan proses selanjutnya yaitu tahap embedding atau penanaman jaringan dalam parafin, dengan memasukan jaringan ke dalam blok parafin.
- f. Keenam, tahap pewarnaan hematoxylin eosin.



**Gambar 3. 1.** Skema alur penelitian

### **3.6 Metode Pengumpulan Data**

#### **3.6.1 Teknik Pengumpulan Data Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan Hiperglikemia**

Data yang diambil dalam penelitian ini adalah data penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan hiperglikemia menggunakan ekstrak daun sirih hijau (*Piper batle L*). Metode yang digunakan untuk pengambilan data dalam penelitian ini adalah observasi tak langsung. Observasi dilakukan dengan mengukur kadar gula darah tikus putih jantan dengan darah diambil melalui ujung ekor tikus yang sebelumnya dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diurut perlahan-lahan kemudian ujung ekor tikus dipotong menggunakan gunting. Darah yang keluar kemudian disentuh pada strip glukometer. Kadar glukosa darah akan terbaca di layar *GlucoDrÔ* setelah 5 detik dan kadar glukosa darah dinyatakan dalam mg/dl (Suarsana et al. 2010). Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0 sebagai data kadar gula darah puasa. Kemudian pada hari ke 3 setelah induksi mengukur kadar glukosa darah dengan glucotest untuk mendapatkan kondisi hiperglikemia dengan kadar  $\geq 126$  mg/dl sebagai data awal sebelum perlakuan dan kadar glukosa darah kembali diukur setelah 14 hari perlakuan sebagai data akhir.

#### **3.6.2 Teknik Pengumpulan Data Histopatologi Pankreas**

Pemeriksaan gambaran histopatologi dilakukan untuk mengetahui perbedaan gambaran struktur jaringan pankreas pada masing-masing perlakuan. Pemeriksaan gambaran histopatologi jaringan pankreas menggunakan metode pewarnaan Hematoxylin-Eosin. Preparat histopatologi pankreas diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan 100x kemudian direrata dan dicatat

perubahan mikroskopik yang ditemukan pada 5 lapang pandang. Menurut (Los, n.d, 1992) preparat histopatologi pankreas diamati dan diskoring berdasarkan kategori berikut :

Skor Edema	: 1 (ringan), 2 (sedang), 3 (berat)
Skor Infiltrasi Sel Radang	: 1 (ringan), 2 (sedang), 3 (berat)
Degenerasi melemak	: 3 (<2 bagian), 5 (3-5 bagian), 7 (> 5 bagian)
Nekrosis parenkim	: 3 (Fokal <5%), 5 (Sublobular <20%), 7 (Lobular > 20%)
Hemoragi	: 3 (Ringan), 5 (sedang), 7 (Berat)

### 3.7 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penurunan kadar glukosa darah meliputi beberapa uji menggunakan SPSS. Analisis yang digunakan adalah uji distribusi normal (uji Shapiro-Wilk), dan uji homogenitas. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, maka uji selanjutnya yang dilakukan adalah uji ANOVA 1 arah (*One Way Anova*) untuk melihat apakah ada atau tidaknya pengaruh dari perlakuan yang diberikan antar kelompok. Jika terdapat pengaruh, dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui beda nyata antar kelompok. Apabila data yang akan dianalisis tidak berdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji statistik nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Uji tersebut digunakan sebagai alternative jika *one-way ANOVA* tidak dapat dilakukan karena data tidak berdistribusi normal dan homogen. Setelah uji statistik nonparametrik *Kruskal-Wallis H* dilanjutkan dengan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan nyata antar kelompok. Analisis data pada gambaran histopatologi sel beta pankreas menggunakan metode deskriptif dengan melihat data rata-rata kerusakan sel dan rata-rata luas pulau Langerhans dinyatakan sebagai rata-rata.