

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Alat**

Alat - alat gelas, batang pengaduk, jarum, gunting bedah, *holder*, kawat, spuit injeksi oral (*Terumo*), ice box, inkubator 37°C (*Memmert*), timbangan tikus (*Ohhauss*), *mikropipet*, neraca analitik (*Mettler toledo*), pinset, spektrofotometer beserta kuvet Shimadzu UV-1800, sentrifugator mikro 22 R (*Hettich Zentrifugen*)

##### **3.1.2 Bahan**

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alkohol, akuades, alumunium *foil*, microtube (*eppendorf*), *blue tip*, kapas, heparin, hematocrit kapiler, YACONA<sup>®</sup>, reagen Glukosa (*Glucose Oksidase Phenol 4-Aminoantriptirin*), streptozotosin (*bioworld*), nikotinamid (*Sigma*), buffer sitrat, Na CMC 0,5%, glibenklamid, ketamin, sekam dan pakan AD-2.

##### **3.1.3 Subjek Uji**

Subjek uji yang digunakan adalah tikus Wistar jantan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu pada hari ke-0 menggunakan hewan uji yang berumur 1-2 bulan dengan berat badan 150-200 gram, kemudian dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah dengan metode GOD-PAP. Tikus yang memenuhi kriteria yaitu memiliki hasil kadar glukosa darah puasa  $\leq 120$ mg/dl. Selanjutnya, pada hari ke-1 dilakukan induksi diabetes menggunakan streptozotosin dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-5 untuk melihat tingkat keberhasilan setelah induksi. Hewan uji yang memenuhi kriteria untuk pemberian terapi

antihyperglykemi(hari ke-6 sampai hari ke-27) adalah tikus yang memiliki kadar glukosa darah  $\geq 126$ mg/dl. Kriteria eksklusi antara lain tikus yang mati sebelum dan selama mendapatkan perlakuan sesuai protokol serta tikus yang gagal diinduksi diabetes.

### 3.1.3.1 Pemeliharaan Hewan Uji

Sebelum pelaksanaan penelitian, tikus diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus Wistar jantan dipelihara dalam suatu ruangan dengan penerangan yang cukup dengan durasi siklus gelap-terang selama 12 jam. Hewan uji tersebut dibagi kedalam 6 wadah plastik berukuran (50x40x100)cm yang berisi sekam, kemudian ditutup dengan kawat. Wadah plastik dibersihkan setiap 3-4 hari sekali, diberi minum dan pakan sentrat AD-2 *ad libitum*.

## 3.2 Sistematika Kerja Penelitian

### 3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearance* (EC)

Mengajukan EC kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan mengisi dan menyerahkan formulir EC serta proposal tiga rangkap. Pengajuan tersebut bertujuan untuk memastikan metode penelitian yang digunakan telah memenuhi kaidah etik dalam perlakuan hewan uji.

### 3.2.2 Uji Antidiabetes

#### 3.2.2.1 Penentuan Dosis YACONA®

Dosis yang tertera pada produk YACONA® adalah 2 x sehari, tiap kali minum 2 kapsul (500mg/kapsul). Pada kelompok perlakuan, digunakan perbedaan dosis 1 x 2 (perlakuan I), 2 x 2 (perlakuan II), dan 3 x 2 (perlakuan III). Penentuan dosis tersebut berdasarkan acuan dosis produk, dimana dosis 2 x 2 (perlakuan II) dijadikan dosis tengah, kemudian 1 x 2 dosis bawah dan 3 x 2 adalah dosis atas. Peneliti ingin melihat pengaruh produk YACONA® ketika dibedakan konsentrasinya.

#### a) Kelompok perlakuan I

Kelompok perlakuan I diberikan dosis (1x2kapsul/hari) 1000mg/70kgBB. Diketahui faktor konversi dari dosis manusia ke hewan

uji adalah 0,018 dan volume pemberian berdasar hasil optimasi adalah 2ml/tikus.

$$\begin{aligned} \text{Konversi dosis} &= 1000 \text{ mg}/70\text{kg BB} \times 0,018 \\ &= 18\text{mg}/200 \text{ gr tikus} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi stok} &= \frac{18 \text{ mg}/200\text{gr tikus}}{2 \text{ ml}/200 \text{ gr tikus}} \\ &= 9 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 14 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total stok} &= 9 \text{ mg/ml} \times 14 \text{ ml} \\ &= 126 \text{ mg}/14\text{ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Labu takar yang tersedia } 25 \text{ ml} &= 9 \text{ mg/ml} \times 25 \text{ ml} \\ &= 225\text{mg}/25 \text{ ml} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya dengan melarutkan 225 mg produk YACONA® kedalam 25 ml akuades.

**b) Kelompok perlakuan II**

Kelompok perlakuan II diberikan dosis (2x2kapsul/hari) 1000mg/70kgBB. Diketahui faktor konversi dari dosis manusia ke hewan uji adalah 0,018 dan volume pemberian berdasar hasil optimasi adalah 2ml/tikus.

$$\begin{aligned} \text{Konversi dosis} &= 1000 \text{ mg}/70\text{kg BB} \times 0,018 \\ &= 18\text{mg}/200 \text{ gr tikus} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi stok} &= \frac{18 \text{ mg}/200\text{gr tikus}}{2 \text{ ml}/200 \text{ gr tikus}} \\ &= 9 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \times 2\text{x pemberian} \\ &= 28 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total stok} &= 9 \text{ mg/ml} \times 28 \text{ ml} \\ &= 252 \text{ mg}/28\text{ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Labu takar yang tersedia } 50 \text{ ml} &= 9 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\ &= 450\text{mg}/50 \text{ ml} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya dengan melarutkan 450 mg produk YACONA® kedalam 50 ml akuades.

### c) Kelompok perlakuan III

Kelompok perlakuan III diberikan dosis (3x2kapsul/hari) 1000mg/70kgBB. Diketahui faktor konversi dari dosis manusia ke hewan uji adalah 0,018 dan volume pemberian berdasar hasil optimasi adalah 2ml/tikus.

$$\begin{aligned}\text{Konversi dosis} &= 1000 \text{ mg}/70\text{kg BB} \times 0,018 \\ &= 18\text{mg}/200 \text{ gr tikus}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi stok} &= \frac{18 \text{ mg}/200\text{gr tikus}}{2 \text{ ml}/200 \text{ gr tikus}} \\ &= 9 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \times 3\text{pemberian} \\ &= 42 \text{ ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume total stok} &= 9 \text{ mg/ml} \times 42 \text{ ml} \\ &= 378 \text{ mg}/42\text{ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Labu takar yang tersedia } 50 \text{ ml} &= 9 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\ &= 450\text{mg}/50 \text{ ml}\end{aligned}$$

Cara pembuatannya dengan melarutkan 450 mg produk YACONA® kedalam 50 ml akuades.

#### 3.2.2.2 Penentuan Dosis Glibenklamid

Dosis glibenklamid yang digunakan adalah 0,45mg/kgBB (Muhtadi *et al.*, 2017) dengan volume pemejanaan 2 ml/200g tikus. Untuk diberikan ke tikus terlebih dahulu di lakukan konversi dosis, sebagai berikut:

$$\text{Dosis pemberian} = \frac{4,5 \text{ mg}}{\text{kg}}$$

$$\begin{aligned}&= \frac{4,5\text{mg}}{1000\text{grBB}} \cdot \frac{x}{200 \text{ gr}} \\ &= \frac{0,09\text{mg}}{200 \text{ gr tikus}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi stok} &= \frac{0,09\text{mg}/200\text{gr tikus}}{2\text{ml}/200\text{gr tikus}} \\ &= 0,045 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 14 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total stok} &= 0,045 \text{ mg/ml} \times 14 \text{ ml} \\ &= 0,63 \text{ mg/14 ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume labu takar 25ml} &= 0,045 \text{ mg/ml} \times 25 \text{ ml} \\ &= 1,125 \text{ mg/25 ml} \end{aligned}$$

Volume labu takar yang tersedia 25ml, maka volume total yang dibutuhkan adalah 1,125 mg/25ml. Cara pembuatan larutan stok glibenklamid adalah dengan melarutkan 1,125 mg glibenklamid kedalam 25 ml Na CMC 0,5%.

### 3.2.2.3 Penentuan Dosis Streptozotosin (Sari *and* Budiasih, 2017)

Dosis streptozotosin yang diberikan pada tikus adalah 65 mg/kgBB

$$\text{Dosis pemberian} = \frac{65 \text{ mg}}{\text{kgBB}}$$

$$= \frac{13 \text{ mg}}{200 \text{ gr}}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi stok} &= \frac{13 \text{ mg/ 200gr tikus}}{2 \text{ ml/200gr tikus}} \\ &= 6,5 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Stok untuk 1 perlakuan

$$\begin{aligned} \text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 14 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total stok} &= 6,5 \text{ mg/ml} \times 14 \text{ ml} \\ &= 91 \text{ mg/14 ml} \end{aligned}$$

Stok untuk 5 kelompok perlakuan

$$\begin{aligned}\text{Volume yang dibutuhkan} &= 35 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 70 \text{ ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume total stok} &= 6,5 \text{ mg/ml} \times 70 \text{ ml} \\ &= 455 \text{ mg/70ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Labu ukur yang tersedia } 100 \text{ ml} &= 6,5 \text{ mg/ml} \times 100 \text{ ml} \\ &= 650 \text{ mg/100ml}\end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan stok streptozotosin adalah dengan melarutkan 650 mg streptozotosin kedalam 100 ml buffer sitrat pH 4,5 yang dibuat sesaat sebelum penelitian maksimal 15 menit.

Pembuatan buffer sitrat dengan melarutkan 4,2028 gram asam sitrat bersama 100 ml akuades dan melarutkan 5,882 gram natrium sitrat dalam 100 ml akuades. Kemudian, asam sitrat diteteskan pada larutan natrium sitrat hingga mencapai pH 4,5 yang diukur menggunakan pH meter serta magnetik stirrer guna menghomogenkan larutan buffer sitrat pH 4,5. Penyimpanan larutan buffer sitrat dilakukan pada suhu dingin yaitu 2-8° C.

#### 3.2.2.4 Penentuan Dosis Nikotinamid

Dosis nikotinamid yang diberikan pada tikus adalah 230 mg/kgBB

$$\text{Dosis pemberian} = \frac{230 \text{ mg}}{\text{kgBB}}$$

$$= \frac{46 \text{ mg}}{200 \text{ gr}}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi stok} &= \frac{46 \text{ mg/200gr tikus}}{2 \text{ ml/200gr tikus}} \\ &= 23 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

Stok untuk 1 perlakuan

$$\begin{aligned}\text{Volume yang dibutuhkan} &= 7 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 14 \text{ ml} \\ \text{Volume total stok} &= 23 \text{ mg/ml} \times 14 \text{ ml} \\ &= 322 \text{ mg/14 ml}\end{aligned}$$

Stok untuk 5 kelompok perlakuan

$$\begin{aligned}\text{Volume yang dibutuhkan} &= 35 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\ &= 70 \text{ ml} \\ \text{Volume total stok} &= 23 \text{ mg/ml} \times 70 \text{ ml} \\ &= 1.610 \text{ mg/70ml} \\ \text{Labu takar yang tersedia 100 ml} &= 23 \text{ mg/ml} \times 100 \text{ ml} \\ &= 2.300 \text{ mg/100ml}\end{aligned}$$

Cara pembuatan stok nikotinamid adalah dengan melarutkan nikotinamid 2.300 mg nikotinamid ke dalam 100 ml *Phosphat Buffered Saline*.

#### 3.2.2.5 Pembagian Kelompok Uji

Penelitian menggunakan 42 tikus Wistar jantan yang dibagi kedalam 6 kelompok, terdiri atas kelompok kontrol normal, kontrol positif, kelompok negatif dan 3 kelompok perlakuan. Pada kelompok normal tidak diberi perlakuan, kelompok positif diinduksi glibenklamid 0,09mg/200gr tikus, kelompok negatif diinduksi dengan streptozotosin 13 mg/200gr tikus, dan 3 kelompok perlakuan diinduksi YACONA® dengan perbedaan dosis masing-masing 18 mg/200gr tikus, 36mg/ 200 gr tikus dan 54 mg/200gr tikus.

#### 3.2.2.6 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-0, 5, 16 dan 28. Pengambilan darah dilakukan melalui sinus orbitalis tikus dan ditetapkan KGD nya menggunakan metode GOD-PAP (hari ke-0, 5 dan

28) dengan cara, darah tikus disentrifus pada kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit. Serum yang terbentuk diambil sebanyak 10µl dan ditambah reagen sebanyak 1000 µl kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Kemudian blanko, standar dan sampel dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer *visible* 500nm. Pada pertengahan waktu perlakuan (hari ke-16) pengukuran KGD menggunakan alat *glukometer*.

### 3.2.3 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data nilai absorbansi dari pembacaan spektrofotometer yang akan diolah menjadi data kadar glukosa darah puasa sesuai dengan perhitungan berikut:

$$\text{Kadar glukosa sampel (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standar}} \times \text{glukosa standar}$$

Untuk mengetahui persentase kenaikan kadar glukosa darah setelah diberikan terapi, menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{Kenaikan KGDP} = \frac{\text{KGDP hari ke-0} - \text{KGDP hari ke-5}}{\text{KGDP hari ke-0}} \times 100\%$$

Untuk mengetahui persentase penurunan kadar glukosa darah setelah diberikan terapi, menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{Penurunan KGDP} = \frac{\text{KGDP hari ke-5} - \text{KGDP hari ke-28}}{\text{KGDP hari ke-5}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan uji *paired sample test* untuk mengetahui signifikansi kenaikan setelah induksi STZ (hari ke-0 dan hari ke-5) dan penurunan KGDP tikus (hari ke-5 dan hari ke-28) setelah diberikan terapi. Untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan terhadap kadar glukosa darah, dilakukan uji *Oneway ANOVA*. Kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc* (Tukey HSD tes) untuk mengetahui signifikansi perubahan KGDP akhir antar kelompok.

### 3.2.4 Skema Penelitian

