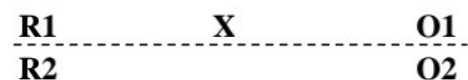


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan penelitian *true experimental* yang merupakan penelitian kuantitatif dengan desain penelitian *post-test only control group desain*. Terdapat 2 jenis kelompok dalam penelitian kuasi eksperimen yaitu kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Dalam rancangan penelitian *post-test only control group desain* dilakukan dengan secara bersamaan mengamati variabel hasil terhadap kelompok perlakuan dan kontrol, pengamatan dilakukan setelah perlakuan diberikan pada kelompok perlakuan. Kelompok eksperimen adalah kelompok yang diberikan *treatment*/perlakuan khusus, sedangkan kelompok kontrol tidak mendapatkam *treatment*/perlakuan khusus (Purwanto dan Sulistyastuti, 2011). Adapun bagan dari *after only control group desain* adalah sebagai berikut:



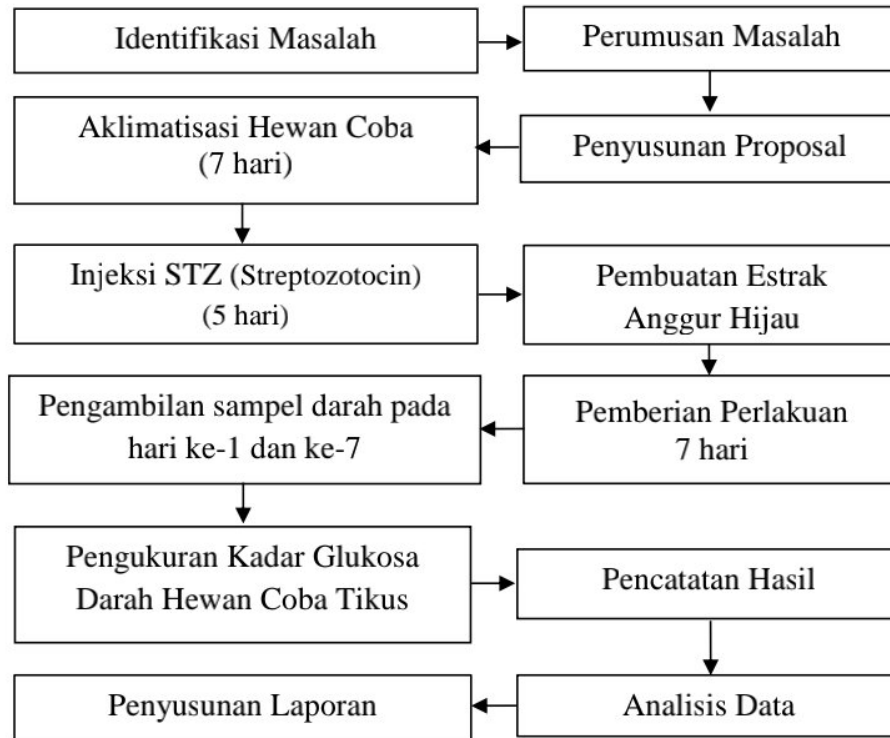
**Gambar 5 Desain Penelitian *after only control group***

Keterangan:

- R1 : Kelompok eksperimen
- R2 : Kelompok kontrol
- X : *Treatment*/perlakuan
- O1 : Hasil observasi setelah perlakuan kelompok eksperimen
- O2 : Hasil observasi setelah perlakuan kelompok kontrol

## B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini pada gambar dibawah ini :



Gambar 6 Alur penelitian

## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pemeliharaan dan Pembiakan Hewan Percobaan *Bio Mice and Rat* Denpasar dan Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar.

### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2023 hingga Februari 2024.

## D. Populasi dan Sampel Penelitian

### 1. Sampel penelitian

Kriteria eksklusi pada sampel penelitian ini yaitu tikus putih galur Wistar jantan dengan kondisi sakit. Tikus yang sakit ini dikeluarkan dari sampel sebelum diberi perlakuan. Kriteria *drop out* yaitu tikus putih galur Wistar jantan yang mati selama penelitian. Kriteria inklusi sampel adalah tikus putih galur Wistar jantan berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 130 – 200 gram.

### 2. Besar dan jumlah sampel

Jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus *Federer* (Susiloningrum & Mawarni, 2022).

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

Keterangan :

t : banyaknya perlakuan

r : ulangan

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok, sehingga perhitungan dengan rumus *Federer* dalam menentukan jumlah sampel disetiap kelompok sebagai berikut :

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

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

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka didapatkan jumlah sampel untuk setiap kelompok yaitu sebanyak 6 ekor tikus. Dengan demikian, sampel hewan uji pada penelitian ini sebanyak 24 ekor. Untuk mengantisipasi terjadinya tikus mati di

tengah penelitian berlangsung maka disediakan 28 ekor tikus dengan 4 ekor tikus sebagai cadangan.

### **3. Unit analisis**

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah sampel serum hewan coba tikus.

## **E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data yang dikumpulkan**

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer dan data sekunder.

#### **a. Data primer**

Data yang akan dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer melalui eksperimen laboratorium. Data primer didapatkan dari hasil pengukuran kadar glukosa darah tikus setelah dilakukan perlakuan.

#### **b. Data sekunder**

Data sekunder berupa jenis data yang digunakan dari studi literatur. Data sekunder yaitu data yang telah dipublikasikan dan tercatat dari beberapa sumber artikel penelitian.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini yaitu pengukuran melalui eksperimen laboratorium. Tikus jantan yang memenuhi syarat sebagai sampel berdasarkan kriteria inklusi dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling*. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode enzimatik kolorimetri terhadap serum tikus. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl).

### 3. Instrumen pengumpulan data

Instrument yang akan digunakan dalam pengumpulan data dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer, alat tulis, dan kamera.

## F. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Alat

Alat yang akan diperlukan dalam penelitian ini adalah tabung serologi (20 buah), tabung eppendorf (72 buah), mikropipet 500  $\mu$ l dan 5  $\mu$ l (SOCOREX) (masing-masing 1 buah), rak tabung serologi (1 buah), *beaker glass* 1000 ml, neraca analitik (KERN) (1 buah), *refrigerator* (1 buah), *coolbox* (MARINA) (1buah), tabung kapiler (MARIENFELD) (1 pk), *sprit* 1cc (1 buah), timer (1 buah), fotometer (ELITechGroup tipe Microlab 1000) (1 buah), sentrifus (GEMMY) (1 buah), yellow tip, *tissue* (1 pcs).

### 2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah anggur hijau, Obat Hipoglikemik Oral (OHO) (Glibenklamid), Streptozotosin (STZ), aquadest, reagen pemeriksaan kadar glukosa darah (ELITechGroup ):

- Reagen R1 (Monoreagen): *Buffer phosphate*, pH 7,4 = 13,8 mmol/L; *Phenol* 10 mmol/L; *4-Aminoanthipyrine* 0,3 mmol/L; *Peroxidase*  $\geq$ 700 U/L; Glukosa oksidase  $\geq$ 10.000 U/L; Sodium *azide* < 0,1%.
- Reagen standar
- Akuades.

### **3. Prosedur Kerja**

Prosedur kerja pada penelitian ini menggunakan 3 tahap, yaitu pra analitik, analitik dan pasca analitik.

#### **a. Pra analitik**

Tahapan pemeriksaan pra analitik meliputi :

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Dipersiapkan kondisi hewan coba tikus yang akan digunakan.
3. Menggunakan Alat Pelindung Diri (APD).
4. Diberikan perlakuan menjadi diabetes dengan induksi menggunakan STZ (Streptozotosin) dosis 60 mg/kgBB/hari melalui intravena.
5. Pembuatan ekstrak buah anggur hijau

Menurut (Salahudin dkk., 2020) prosedur pembuatan ekstrak buah anggur hijau sebagai berikut :

- (a). Buah anggur hijau dipetik sesuai kebutuhan, kemudian kotoran pada buah anggur dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir.
- (b). Dilakukan proses sortasi basah untuk memilih bahan sampel sesuai dengan kriteria yang digunakan dalam penelitian.
- (c). Buah anggur hijau ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- (d). Mengiris tipis-tipis buah anggur hijau, agar proses pengeringan dapat dilakukan dengan cepat.
- (e). Dilakukan penimbangan awal untuk mengetahui masa awal bahan sampel.
- (f). Buah anggur hijau dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terpapar sinar matahari secara langsung.
- (g). Buah anggur hijau yang sudah kering dikumpulkan dan ditimbang kembali.

- (h). Proses sortasi dilakukan pada buah anggur hijau yang telah kering sebelum dilakukan penghalusan untuk memperkecil ukuran butiran bahan kering. Proses penghalusan menggunakan blender.
- (i). Buah anggur hijau yang telah dihaluskan kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran butiran yang seragam.
- (j). Ditimbang sebanyak 700 g bubuk simplisia Buah anggur hijau yang bebas dari kotoran kemudian letakkan dalam botol 1,5 L dan tambahkan pelarut etanol 96% hingga semua serbuk simplisia terendam pelarut (+700 ml).
- (k). Dilakukan proses perendaman selama 2 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
- (l). Ekstrak dipisahkan dengan residu dengan cara menyaring sampel dengan kertas saring.
- (m). Semua filtrat ditampung, kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan evaporator (suhu 70°C) hingga didapatkan ekstrak pekat.
- (n). Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam refrigerator.

#### 6. Pembuatan pelarut OHO (larutan CMC)

Dosis glibenklamid pada manusia dewasa adalah 5 mg, jika dikonversikan pada tikus dengan berat 200 gram adalah 18,9 mg/kgBB serbuk Glibenklamid.

- (a). Ditimbang CMC sebanyak 0,5 gram.
- (b). Dipanaskan aquadest dengan beaker glass diatas hotplate.
- (c). Memasukkan 30 ml aquadest yang sudah dipanaskan kedalam mortir yang kering dan bersih.
- (d). Ditaburkan 0,5 gr CMC kedalamnya.

- (e). Didiamkan ditempat yang gelap selama 15 menit.
  - (f). Diaduk hingga homogen, sampai terlihat menggumpal dan transparan.
  - (g). Dipindahkan kedalam labu ukur 100 ml.
  - (h). Ditambahkan 20 ml aquadest hingga larutan seperti gel.
  - (i). Ditambahkan aquadest hingga tanda batas.
  - (j). Disimpan dalam botol pada suhu kulkas (maksimal 1 minggu).
7. Pemberian perlakuan setiap hari secara intraperitoneal (IP) kepada masing-masing tikus perlakuan :
- (a). Perlakuan dengan Obat Hipoglikemik Oral (OHO) dengan dosis 0,80 mg/kgBB/hari,
  - (b). Perlakuan dengan ekstrak buah anggur hijau dengan dosis 200 mg/kg.
8. Persiapan spesimen :
- a). Pengambilan darah tikus
- Prosedur pengambilan darah hewan coba tikus menurut (Nugroho, 2018) sebagai berikut :
- (1). Hewan coba tikus dilakukan pembiusan.
  - (2). Menggoreskan salah satu ujung mikrohematokrit ke bagian *medial canthus* atau *sinus orbitalis* mata di bawah bagian bola mata ke arah *foramen opticus*, ujung yang lain diletakkan pada mulut tabung penampung darah.
  - (3). Memutar mikrohematokrit hingga melukai *plexus* tersebut, mikrohematokrit diputar dan dikembalikan sebanyak 4x (harus sama).
  - (4). Menampung darah yang keluar kedalam tabung dan siap digunakan untuk keperluan penelitian.
  - (5). Mengisi identitas pada setiap tabung penampung.

b). Pemisahan serum

Prosedur pemisahan serum dapat dilakukan dengan cara :

- (1). Darah yang sudah ditampung dalam tabung tanpa antikoagulan (tabung warna merah) didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar.
- (2). Disentrifus darah selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm.
- (3). Lapisan jernih dibagian atas yang berwarna kuning muda merupakan serum, segera ambil dengan menggunakan mikropipet.
- (4). Serum dimasukkan kedalam tabung lain yang kering dan bersih.
- (5). Beri label pada setiap tabung.

**b. Analitik**

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan metode enzimatik kolorimetri menggunakan spektrofotometer.

1. Dikondisikan reagen dan sampel dalam suhu ruang  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Menyiapkan spektrofotometri pada absorbansi 0 dengan menggunakan aquadest.
3. Disiapkan 3 buah tabung reaksi yang telah diberi label blanko, standar, dan sampel.
4. Dipipet masing-masing ke dalam tabung sesuai dengan tabel 3.
5. Dihomogenkan campuran larutan, lalu inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
6. Dibaca absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 505 nm.
7. Dicatat absorbansi, lalu dilakukan pengukuran kadar glukosa pada sampel.

**Tabel 3**  
**Pemeriksaan Glukosa Darah**

|                 | Blanko      | Standard    | Sampel      |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Reagen</b>   | 500 $\mu$ L | 500 $\mu$ L | 500 $\mu$ L |
| <b>Standard</b> | -           | 5 $\mu$ L   | -           |
| <b>Sampel</b>   | -           | -           | 5 $\mu$ L   |

(ELITechGroup, 2021)

**c. Pasca-Analitik**

1. Mencatat dan menganalisis hasil yang didapatkan.

**5. Pengolahan dan Analisis Data**

**1. Teknik pengolahan data**

Data kadar glukosa yang diperoleh melalui eksperimen pengujian efektivitas ekstrak buah anggur (*Vitis vinifera L*) terhadap penurunan kadar glukosa darah pada hewan coba tikus model DM tipe 2 dinyatakan dalam satuan milligram per desiliter (mg/dl) dan diolah menggunakan teknik *tabulating* data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

**2. Analisis data**

Dengan bantuan *software computer*, data yang dikumpulkan kemudian dianalisis.

**a. Uji univariat**

Pada tahap awal pengolahan data analisis univariat dilakukan dengan menampilkan tabel-tabel frekuensi. Analisis univariat bertujuan untuk menggambarkan karakteristik sampel penelitian (Dwivedi, 2007). Analisis univariat yang akan dilakukan penelitian ini yaitu dengan menggunakan perhitungan rata-rata setiap kelompok kemudian dilihat persentase penurunan dari

setiap kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan analisis efektifitas terhadap kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol positif (OHO).

b. Uji bivariat

Data diuji menggunakan analisa bivariat, yaitu analisa yang dilakukan dengan menguji dua variabel yang diasumsikan berkorelasi atau berhubungan (Notoatmodjo, 2012). Dalam penelitian ini, analisis bivariat digunakan untuk menganalisis perubahan pemberian ekstrak buah anggur hijau terhadap efektifitas penurunan glukosa darah pada pada hewan coba tikus model Diabetes Melitus (DM) tipe 2.

Uji statistik yang digunakan pada penelitian ini yaitu :

a). Analisis distribusi data

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk*.

b). Uji statistik *Independent T-Test*

Pengujian ini digunakan jika data yang didapatkan berdistribusi normal. Teknik analisis pengujian ini untuk memastikan variasi kadar gula darah sebelum dan sesudah pemberian ekstrak anggur hijau.

c). Pengambilan keputusan

Pengambilan keputusan berdasarkan hasil uji statistik *Independent T-Test* dengan membandingkan nilai p (p value)  $\alpha = 0,05$  dengan ketentuan (Santoso, 2014) yaitu jika nilai Sig. (2-tailed)  $p < 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diterima.

## **G. Etika Penelitian**

Dalam melakukan penelitian, peneliti harus membuat protokol yang sesuai dengan standar ilmiah dan etik penelitian kesehatan. Etika penelitian kesehatan secara umum tercantum dalam *World Medical Association*, yaitu:

### **a) Menghormati**

Tujuan dari etika penelitian ini adalah menghormati hak dan martabat makhluk hidup, kebebasan untuk memilih dan berkeinginan, serta bertanggung jawab terhadap diri sendiri, termasuk melibatkan hewan coba.

### **b) Manfaat**

Penelitian yang akan dilakukan memberi manfaat bagi manusia dan makhluk lain, manfaat yang didapatkan harus lebih besar dari risiko yang mungkin terjadi, serta mengikuti prinsip tidak merugikan, dan *non maleficence* atau tidak memperburuk keadaan.

### **c) Adil**

Prinsip ini menegaskan bahwa peneliti harus bersikap adil dalam memanfaatkan hewan percobaan.