

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Metode penelitian eksperimental merupakan salah satu metode kuantitatif yang bertujuan untuk mengidentifikasi hubungan sebab dan akibat dengan memanipulasi satu atau lebih variabel dalam satu atau lebih kelompok eksperimen dan membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami manipulasi. Eksperimen ini bertujuan untuk menguji hipotesis atau memahami adanya hubungan sebab-akibat dengan tujuan tertentu. Berdasarkan studi literatur, penelitian eksperimental secara sistematis mengubah nilai variabel bebas. Secara umum, metode ini digunakan untuk mengevaluasi dampak perlakuan tertentu terhadap perlakuan lainnya dalam kondisi yang telah dikendalikan (Sugiyono, 2015).

3.2 Desain Penelitian

Desain yang diterapkan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang merupakan salah satu desain paling sederhana dibandingkan dengan desain lainnya. Dalam rancangan ini, variasi yang diamati hanya berasal dari perlakuan dan galat. Karena itu, RAL biasanya cocok digunakan dalam kondisi lingkungan, alat, dan media yang homogen (Hanafiah, 2000) Pada penelitian ini variabel yang digunakan sebagai berikut:

- a) Variabel Bebas: Dosis ekstrak krokot dan waktu pemberian.
- b) Variabel Terikat: Nilai kadar glukosa darah pada glukometer dan nilai berat badan pada timbangan terhadap hewan uji.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini memiliki lima macam yaitu Dosis I: 125 mg/kg BB, Dosis II: 250 mg/kg BB, Dosis III: 500 mg/kg BB, kontrol positif glibendklamid, kontrol Negatif (Iryani & Indria, 2017; Samsul, 2020). Pemberian ekstrak krokot akan diberikan selama 14 hari pada mencit yang mengalami diabetes.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan penelitian ini adalah seluruh mencit yang digunakan sebagai subjek penelitian. Sampel penelitian yaitu berat badan dan gula darah

mencit 25 ekor yang diberikan ekstrak krokot pada dosis yang berbeda. Secara acak hewan dikelompokkan pada setiap kelompok variabel dan perlakuan dalam rentang waktu pemberian satu minggu dan dua minggu dengan masing – masing kelompok dilakukan lima kali pengulangan. Banyaknya pengulangan diperoleh dari rumus Federer 1983 :

$(n-1)(r-1) \geq 15$
$(5-1)(r-1) \geq 15$
$4r - 4 \geq 15$
$4r \geq 19$
$r \geq 5$ (untuk menambah keakuratan maka ditambah menjadi 6 ekor bersama kontrol negatif)

Keterangan :

$n = treatment$ (jumlah perlakuan)

$r = replication$ (jumlah pengulangan)

15= derajat kebebasan umum

Dari hasil pengulangan tersebut maka dibuat pengaturan denah percobaan perlakuan secara acak (*Random*) sebagai berikut:

Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi dan peta kandang mencit dalam Penelitian :

1C	2E	3A	4E	5E
6D	7A	8B	9A	10C
11A	12B	13D	14B	15A
16B	17C	18E	19D	20B
21D	22E	23C	24C	25D

H	A					B				
H0	3A	7A	9A	11A	15A	8B	12B	14B	16B	20B
H1										
H7										
H14										
H	C					D				
H0	1C	10C	17C	23C	24C	6D	13D	19D	21D	25D
H1										
H7										
H14										
H	E									
H0	2E	4E	5E	18E	22E					
H1										
H7										

H14					
-----	--	--	--	--	--

Keterangan :

A = perlakuan dosis I

B = perlakuan dosis II

C = perlakuan dosis III

D = Kontrol Positif Glibenklamid

E = Kontrol Negatif

Hn = Hari

1-25 = Nomor Mencit



a)



b)



c)



d)

Gambar 3.1 Peta Kandang dan Penomoran Hewan Uji

a) Kandang A dan B, b) Kandang C dan D, c) Kandang E dan Cadangan dan d)
Penomoran Mencit

(Dok. Pribadi, 2023)

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan dimulai dari bulan September – Oktober 2023. Pembuatan pakan berlemak, pra-penelitian di rumah peneliti dan aklimatisasi di rumah peneliti dan sebagian di kebun Botani FPMIPA UPI. Pengambilan tumbuhan

krokot (*Portulaca oleracea*) berasal dari kebun Margahayu Raya, sedangkan pengecekan kadar gula darah dan berat badan dilakukan di rumah peneliti.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Pra-Penelitian

Penelitian ini melibatkan pra-penelitian untuk menentukan dosis pakan maksimal per hari. Jenis pakan yang digunakan dalam pra-penelitian adalah pakan standar kelinci, Vita Rabbit (Citrafeed). Pra-penelitian ini dilakukan selama dua minggu dengan lima ekor mencit betina galur Swiss Webster berusia dua bulan dan berat rata-rata 27 g untuk setiap kelompok perlakuan. Minuman diberikan secara *ad libitum*. Setiap hari, berat badan dan sisa pakan ditimbang. Dosis pakan maksimal per hari ditetapkan berdasarkan dosis yang habis dimakan tanpa sisa dan yang paling efektif dalam meningkatkan berat badan mencit. Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari, pada pagi dan sore hari, dengan jumlah pakan 52 g/kandang berdasarkan uji coba mandiri.

3.5.1.2 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit atau tikus putih (*Mus musculus domesticus var. Swiss Webster*) Betina. Hewan uji berasal dari Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi (PPBB) ITB. Mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan masing-masing terdiri lima ekor hewan uji yaitu mencit betina berusia dua bulan (delapan minggu) dengan berat badan antara 25-32 g dengan lima kelompok percobaan dengan jumlah 25 ekor mencit betina. Penelitian menggunakan kandang kaca dengan ukuran : panjang 60 cm, lebar 50 cm, dan tinggi 40 cm atau dengan luas 1.200 cm^2 . Kandang terdiri dari tiga unit yang setiap kandangnya dibagi dua dengan menggunakan sekat pembatas agar dapat digunakan lima kelompok perlakuan. Pakan yang diberikan yaitu Vita Rabbit (Citrafeed) dengan pemberian pakan sekali sehari satu genggam (± 52 g) setiap kelompok kandang dan air minum diberikan secara *ad libitum* (diberikan secara tak terbatas). Suhu lokasi sekitar 25 - 30° C pada siang hari dan suhu 20 - 24° C pada malam hari. Kandang dilengkapi dengan tempat bersembunyi yaitu kain sebagai selimut dan Kain besar untuk menutupi pada malam hari agar menjadi lebih hangat dalam kandang (Fernandez dkk., 2017). Setiap hewan uji diberikan tanda nomor urut 1-25

pada bagian perut. Kemudian setiap mencit dilakukan randomisasi dan taruh dalam kandang sesuai kelompok dosis masing-masing.



Gambar 3.2 Kandang Mencit

(Dok. Pribadi, 2023)

3.5.1.3 Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Pembuatan pakan mencit tinggi lemak, berbahan dasar kuning telur dan minyak kelapa. Adapun tehnik pembuatan pakan menurut Hernawati *et al.* (2013), sebagai berikut:

Pakan kelinci merek Vitta Rabbit (Citrafeed) dengan komposisi 15% protein, serat kasar 16%, dan lemak 5%. Pakan dihancurkan hingga bubuk serta tambahkan sedikit air, kemudian campurkan dengan minyak kelapa dan kuning telur menjadi adonan. Setelah itu cetak ulang dengan gilingan daging menjadi lembek seperti bubur. Adonan dipanaskan dalam oven bersuhu 100° C bertujuan agar menghilangkan air dan mengembalikan tekstur yang padat, sampai tekstur dirasa cukup. Adonan Pakan tinggi lemak setelah itu, disimpan dalam wadah plastik tertutup dan ditaruh pada ruangan gelap dan kering. Pakan yang telah tersedia didiamkan selama satu hari, kemudian diberikan sekali sehari pada pagi hari pada pukul 08.00 pada semua kelompok.

3.5.1.4 Aklimatisasi

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini menjalani proses aklimatisasi selama dua minggu sebelum perlakuan diberikan. Selama periode aklimatisasi dan perlakuan, kondisi lingkungan dijaga tetap stabil, yaitu di ruangan dengan pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap serta suhu berkisar antara 25° C hingga 30° C. Tujuannya adalah agar hewan uji dapat menyesuaikan diri dengan ritme biologis mereka dan kondisi yang akan mereka alami selama percobaan. Langkah ini diambil untuk meminimalkan tingkat stres selama penelitian. Pada kandang

ditaruh wadah berisi pakan 52 g/Kandang di bagian pinggir kanan dan botol minum sebelah kiri dengan pemberian minum secara *ad libitum* (diberikan secara tak terbatas), Pemberian pakan dilakukan tiga kali sehari pada pagi, siang dan sore hari agar mencit dapat minum dan makan dengan baik dan teratur. Setelah itu, dilakukan penimbangan berat badan dan pengecekan gula darah mencit awal untuk mengetahui kadar gula dan rentang berat badan mencit yang akan digunakan dalam penelitian.

3.5.1.5 Pembuatan Ekstrak Krokot

Pembuatan ekstrak tumbuhan krokot (*Portulaca Oleracea*) mengadopsi dari Departemen kesehatan, (1995) dan WHO, (1998). Adapun langkah-lakah pembuatan ekstrak di bawah ini :

1. Preparasi sampel

Tumbuhan krokot (*Portulaca oleracea*) diperoleh dari kebun kelurahan manjahlega sebanyak 2 kg. Preparasi ekstrak dimulai dari pengambilan tumbuhan gulma dilokasi Jl. Merkuri selatan, Jawa Barat. Tanaman dilakukan proses determinasi dan pembersihan pada ruangan bersih dan steril, merkuri selatan. Setelah dibersihkan dan dikeringkan dibawah sinar matahari tidak langsung, kemudian krokot dipotong menjadi bagian yang lebih kecil, lalu simpan dalam ruangan terbuka dengan suhu ruangan selama sehari.

2. Pembuatan ekstrak krokot

Langkah selanjutnya, dilakukan perebusan 1 kg serbuk krokot dimasukan dalam kantung kain katun serta menambah lima liter air, perebusan dilakukan dua kali masing masing selama 30 menit sampai didapat ekstrak air. Ekstrak air telah didapat kemudian diuap dalam bejana pada suhu kurang lebih 80° C sampai diperoleh ekstrak kental, terakhir, keringkan dalam oven pada temperatur 60° C sampai didapat ekstrak kering dan serbuk. Selanjutnya, ekstrak yang sudah kering hancurkan kembali menggunakan herbal blender agar ekstrak kering semakin bubuk selama dua kali. Serbuk yang telah di hancurkan dimasukan dalam tempat khusus. Serbuk krokot kemudian ditimbang dan dilarutkan dalam air agar menjadi ekstrak cair yang akan diberikan pada hewan uji. Masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan proses pengenceran ekstrak dengan cara:

- 1) Dosis I 125 mg/kg BB/hari

12,5 gram ekstrak dilarutkan dalam air hingga 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,3 ml/hari/ ekor mencit.

- 2) Dosis II Sebanyak 250 mg/kg BB/hari
25 gram ekstrak dilarutkan dalam air hingga 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,3 ml/hari/ ekor mencit.
- 3) Dosis III Sebanyak 500 mg/kg BB/hari
50 gram ekstrak dilarutkan dalam air hingga 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,3 ml/hari/ ekor mencit.
- 4) Kontrol positif Glibenklamid 5 mg/kg BB/hari
 $\frac{1}{4}$ tablet atau 1,25 gram dilarutkan dalam air hangat hingga 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 0,3 ml/hari/ ekor mencit.
- 5) Kontrol negatif (tidak diberikan larutan apapun)

3.5.1.6 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini secara penjelasan dapat dilihat pada Lampiran 2. Pada lampiran tersebut diuraikan nama alat, spesifikasi dan jumlah yang digunakan.

3.5.2 Tahap Perlakuan

3.5.2.1 Perlakuan Hewan Uji

Setiap hewan uji sebelum diberi ekstrak krokot selama perlakuan dengan dosis berbeda ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dicek apakah terjadi perubahan, kemudian ditaruh pada wadah khusus untuk diperiksa pada tahap selanjutnya. Masing-masing hewan uji diberi tanda pada bagian perut menggunakan spidol permanen dan ditaruh dalam kandang kaca berukuran 50 x 60 x 40 cm. Setiap kandang dibagi dua oleh sekat agar menjadi enam tempat untuk enam kelompok (satu kelompok cadangan) dengan penutup ram kawat berbentuk jaring bagain sisinya di beri lubang penyimpanan air minum dan ditaruh lampu pijar agar menjaga suhu tetap hangat (25 - 28° C) dan kelembaban (74-85%). Sebelum perlakuan dilakukan tahap aklimatisasi selama 14 hari dengan pakan kelinci dan air secara *ad libitum*. Kandang mencit dibersihkan setiap hari senin pada siang hari dan dilakukan renovasi apabila terjadi kerusakan. Selanjutnya, mencit dicek gula darah terlebih dahulu dan diberi aloksan sebelum tahap pemberian ekstrak krokot. Kemudian pada tahap pemberian ekstrak krokot, setiap mencit ditimbang terlebih

dahulu. Pemberian ekstrak dilakukan dengan cara oral menggunakan jarum *gavage* sebanyak 0,3 ml setiap mencit pada semua dosis. Pengecekan gula darah dilakukan kembali pada hari ke-7 dan 14.

3.5.2.2 Pengukuran Berat Badan

Setiap mencit yang telah ditimbang dicek apakah terjadi perubahan. Kemudian bandingkan setiap kelompok dosis dan bagaimana pengaruhnya. Pengukuran dilakukan setiap hari dari hari ke 1 sampai ke 14. Berat badan hewan uji harus selalu dievaluasi dalam konteks riwayat berat badan yang meliputi pola perilaku hidup maupun status berat badan yang terakhir. Penentuan berat badan dilakukan dengan cara menimbang (Surono, 2000).

3.5.2.3 Pengukuran Kadar Gula

Setiap pengukuran kadar gula darah mencit dipuasakan terlebih dahulu agar meminimalkan kadar gula darah dengan mengurangi zat-zat seperti asupan makanan yang mempengaruhi kadar gula darah (Fika, 2016). Pengukuran kadar gula diukur terlebih dahulu dengan indikator kadar gula standar yaitu glukosa darah mencit normal berkisar antara 62,8 - 176 mg/dl (Nugrahani, 2012). kemudian mencit yang telah aklimatisasi dan tinggi gula darah menggunakan aloksan, langkah selanjutnya mengukur gula darah menggunakan alat glukometer digital. Sebelum dilakukan pengambilan darah, ekor pada mencit dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Kemudian, darah diambil pada ujung ekor mencit ditoreh dengan pisau bedah kecil sampai membentuk sayatan dan tusuk dengan lanset setelah itu, ambil darahnya kemudian letakan setetes darah pada strip tetes alat glukometer dan tunggu hasil selama 10 detik pembacaan konsentrasi glukosa darah pada glukometer. Nilai hasil pada glukometer menunjukkan konsentrasi glukosa darah dengan satuan mg/dL (Departemen kesehatan, 1995).

3.5.2.4 Perlakuan Uji Anti-Diabetes dengan Induksi Aloksan

Mencit yang akan diinduksikan aloksan, dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan dosis optimum aloksan yang dapat menyebabkan kondisi Diabetes Melitus pada mencit dengan kadar glukosa > 200 mg/dL. Adapun pembuatan larutan aloksan dengan menggunakan aloksan monohidrat dibuat dalam pelarut NaCl 0,9% b/v (Andreanus dkk., 2020).

Aloksan diinduksikan pada mencit secara intravena agar langsung mencapai dan merusakkan sel pankreas (Samsul dkk., 2020). Setiap mencit kelompok perlakuan dosis dan kontrol positif diinduksi aloksan dengan dosis 40 mg/Kg BB sesuai dengan berat badan masing-masing mencit. Kemudian diberikan larutan glukosa 5% selama 1 hari, bertujuan untuk mencegah fase hipoglikemia yang dapat menyebabkan kejang dan berakibat fatal terjadi 4-8 jam setelah pemberian aloksan (Lenzen, 2008). Kelompok glibenklamid sebagai pembanding penurunan dengan jumlah dosis 5 mg/kg BB (Lenzen, 2008). Masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan proses pengenceran aloksan sebelum pemberian pada mencit dengan cara sebagai berikut: dosis aloksan 40 mg/kg BB/hari dengan NaCl 0,9% 1,2 mg /30g BB tablet dalam air hangat hingga 100 ml ditambah larutan NaCl 0,9 gram yang telah dilarutkan dalam air hangat 100 ml, kemudian diberikan sebanyak 1 ml secara intravena mencit (Andreanus dkk., 2020).

3.6 Penelitian

Pemberian ekstrak krokot kepada mencit dengan cara oral menggunakan jarum gavage, Mencit diberi ekstrak krokot sesuai dosis dan waktu pemberian selama sekali dalam sehari pada pagi hari pada pukul 08.00 WIB. Dosis yang digunakan pada penelitian ini memiliki lima macam yaitu dosis I : 125 mg/kg BB, Dosis II : 250 mg/kg BB, Dosis III : 500 mg/kg BB, kontrol positif glibendklamid, kontrol negatif (Iryani & Indria, 2017; Samsul, 2020).

3.7 Pengambilan Data

Pengambilan data dilakukan terhadap sampel yang ditimbang terlebih dahulu. Setelah itu mencit ditusuk pada bagian ekor yang terdapat garis aliran darah (intravena) menggunakan lanset sampai mengeluarkan darah, kemudian dilakukan analisis kadar gula darah mencit. Data untuk total kadar gula adalah hasil pengukuran alat strip *autocheck glucose*. Data yang didapat dianalisis secara statistik. Parameter yang diukur adalah kadar gula darah mg/dl dan berat badan gram.

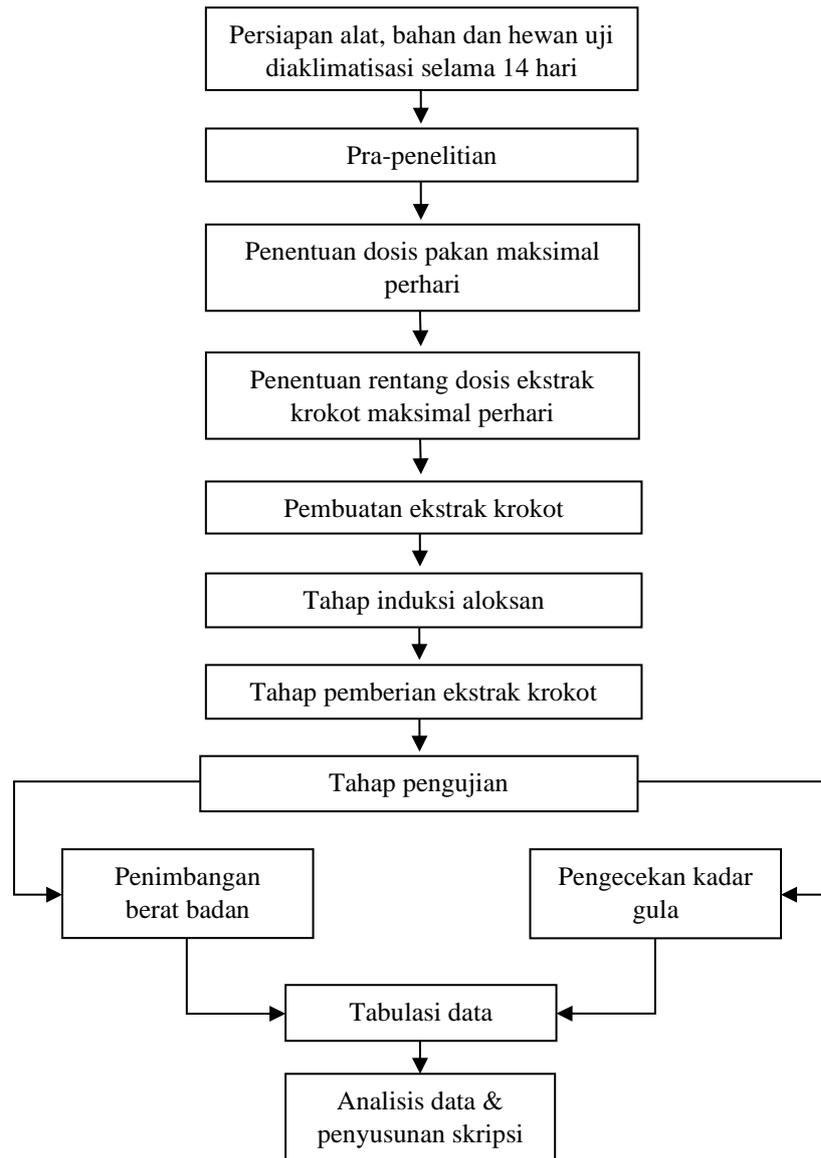
3.8 Analisis Data

Data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi dilakukan uji normalitas terlebih dahulu dengan jumlah data kurang dari 50 dari setiap kelompok data. Oleh karena itu menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk menghindari kesalahan pada pengujian

sebaran data pada sebuah kelompok dan uji homogenitas menggunakan Levene. Jika data tidak homogen digunakannya uji non-parametrik yaitu Uji Games Howells. selanjutnya dilakukan uji menggunakan *One Way ANOVA*, kemudian digunakan juga uji *Post Hoc Duncan (test) multiple comparasion*. Analisis data penelitian ini menggunakan program IBM SPSS versi 23 (Hastono, 2016).

3.9 Alur Penelitian

Alur penelitian dari “Pengaruh Tumbuhan Krokot (*Portulaca oleracea*) Terhadap Kadar Gula Darah dan Berat Badan Pada Mencit (*Mus musculus domesticus*) BETINA var. *Swiss Webster*” disajikan pada Gambar 3.3 tersedia pada halaman berikutnya:



Gambar 3.3 Bagan Alur Penelitian