

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental khususnya *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana pada desain penelitian tidak dilakukan pre test. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akar putri malu yang diberikan peroral (metode sonde) terhadap kadar Malondialdehid (MDA) serum dari tikus wistar diabetes mellitus yang diinduksi *streptozotocin* (STZ).

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Penelitian yang akan dilakukan adalah menggunakan hewan coba, yaitu tikus putih *Rattus Novegicus Strain Wistar* dengan ketentuan :

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat badan 150-200 gram

Tikus jenis ini dipilih sebagai sampel karena tikus putih *Rattus Novegicus Strain Wistar* karena tergolong jinak dan mudah perawatannya. Selain itu alasan tikus putih sebagai hewan coba adalah sebagai berikut :

(Pagget et al., 1964).

- a. Ukurannya kecil.
- b. Memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap obat.
- c. Lebih terstandarisasi dibandingkan dengan binatang percobaan lainnya.
- d. Dapat dibiakkan untuk menjaga keaslian dan keseragaman strain.
- e. Sangat kuat jika digunakan percobaan dengan pemberian anastesi.

- f. Tidak muntah karena memiliki pusat pengatur muntah.
- g. Tikus putih merupakan mamalia sehingga mirip dengan manusia.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- Tikus jantan sehat, berbulu putih dan tampak aktif
- Umur 6 – 8 minggu
- Berat badan 150-200 gram
- GDA < 126 mg/dl

2. Kriteria Eksklusi

- Tikus yang selama percobaan tidak mau makan
- Tikus yang kondisinya menurun (lemas, tidak lincah) atau mati selama penelitian berlangsung

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Sampel penelitian adalah tikus galur wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan, umur 6-8 minggu, dengan berat rata-rata 150-200 gram, tampak sehat, tingkah laku normal (Kannan, 2009).

Jumlah sampel yang digunakan memakai rumus : $(t-1) (r-1) \geq 15$ (Hanafiah, 2005)

t : jumlah perlakuan, r : jumlah sampel

Pada penelitian ini t = 4 sehingga jumlah sampel adalah adalah:

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

$$r-1 \geq 15:3$$

$$r \geq 5+1$$

$$r \geq 6$$

Untuk 4 macam perlakuan diperlukan minimal sampel masing-masing 6 ekor dengan cadangan sampel 1 ekor tiap perlakuan sehingga total sampel yang digunakan adalah 28 ekor sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Perubahan pada kadar Malondialdehid serum tikus wistar DM

4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak akar putri malu 2 dosis. Skala yang digunakan skala nominal

4.3.3 Variabel Luar

- a. Jenis kelamin tikus → jantan
- b. Umur tikus → 6 – 8 minggu
- c. Berat badan tikus → 150-200 gram
- d. Waktu pengujian → lama paparan ekstrak akar putri malu
- e. Faktor lingkungan laboratorium

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 2 bulan, mulai dari bulan Februari sampai bulan Maret 2012.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

4.5.1.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rattus norvegicus strain wistar*, jenis kelamin jantan, berumur 6-8 minggu, berat badan 150-200 gram dengan kondisi umum sehat yang dapat ditandai dengan gerakan

tikus yang aktif. Tikus percobaan diperoleh dari Fakultas MIPA jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung. Hewan coba tersebut dipelihara dalam bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam dan penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius. Makanan hewan coba adalah makanan ternak PAR-S dicampur dengan terigu dan air. Minuman yang diberikan diambil dari PDAM.

4.5.1.2 Bahan untuk Perlakuan

Bahan yang digunakan adalah akar putri malu (*Mimosa pudica*) dikeringkan secara *shadow drying* selama 10 hari kemudian pada hari ke-11 akar dipotong kecil dan dihaluskan menggunakan alat penggiling.

4.5.1.3 Bahan untuk Perlakuan Model Tikus Diabetik

- Streptozotosin (STZ) dilarutkan dalam 1 ml akuades dengan pengasaman PH hingga PH 4-4.5 menggunakan asam sitrat.

4.5.1.4 Bahan untuk Pengukuran Gula Darah Tikus

- Kapas
- Alkohol 70 %.

4.5.1.5 Bahan untuk Pengambilan Darah / Pembedahan Tikus

- Kloroform 20 ml
- Alkohol
- Vacuotainer 25 buah

4.5.1.6 Bahan untuk Pemeriksaan MDA

- TCA 100%
- HCL 1N
- Na-Thio 1%

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang tikus berukuran 36 x 30 x 12 cm³
- Tempat makan tikus
- Tempat minum tikus
- Kawat kassa
- Sekam

4.5.2.2 Alat untuk Pengukuran Berat Badan Tikus

- Neraca Sartorius

4.5.2.3 Alat Pembuat Ekstrak Akar Putri Malu

- Alat penggiling
- Methanol
- Rotator evaporator
- Oven

4.5.2.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Akar Putri Malu

Pemberian ekstrak akar putri malu kepada tikus DM menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde.

4.5.2.5 Alat untuk Perlakuan Model Tikus Diabetik

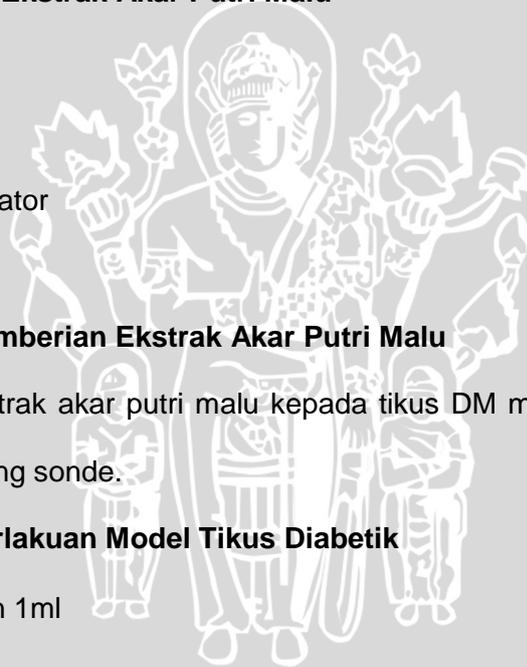
- Spuit tuberculin 1ml
- Kertas PH

4.5.2.6 Alat untuk Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

- Glucose blood monitoring
- Glucose test strip 120 buah
- Jarum

4.5.2.7 Alat untuk Pengambilan Sampel Darah

- 2 gunting bedah



- 2 pinset
- 2 set jarum pentul
- 2 steroform
- Kapas
- Spet 5cc
- Tabung gelas kecil untuk tempat darah yang akan diperiksa

4.5.2.8 Alat untuk Pengukuran Kadar MDA Serum

- Centrifuge
- Tabung reaksi
- Pemanas
- Spektrofotometer
- Pipet

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetik Induksi Streptozotocin (STZ)

Pada tikus percobaan dilakukan prosedur pemberian STZ mengakibatkan kerusakan sel β pankreas tikus coba. Aksi STZ intraseluler melalui gugus nitrosourea menghasilkan perubahan alkilasi DNA sel β Langerhans pankreas yang mengakibatkan kerusakan pada sel β Langerhans. STZ merupakan donor NO (*nitric oxide*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β Langerhans. Pembentukan anion superoksida karena aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β Langerhans (Skudelski, 2001).

Dosis yang digunakan adalah 55 mg/kgbb dilarutkan dalam 1 ml aquades dengan pengasaman PH hingga PH 4-4.5 menggunakan asam sitrat, diberikan secara intra peritoneal dan tikus dibiarkan selama 3 hari untuk proses induksi. Tikus dikatakan positif diabetes jika pada hari ke tiga setelah induksi STZ, kadar gula tikus ≥ 200 mg/dl (Akbarzadeh et al., 2007).

4.6.2 Ekstrak Akar Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Akar Putri malu (*Mimosa pudica*) yang dipakai adalah akar yang diambil langsung dari tanaman putri malu di dusun Ngepeh Desa Rejoagung Kecamatan Ngoro Kabupaten Jombang pada pagi hari. Bahan baku sebanyak 500 gram dibersihkan dari kotoran dengan cara direndam selama dua jam untuk meluruhkan sisa tanah, dicuci bersih dengan air mengalir, dan diulang sampai dua kali pembersihan. Akar Putri malu (*Mimosa pudica*) dikeringkan secara *shadow drying* selama 10 hari kemudian pada hari ke-11 akar dipotong kecil, didapat berat kering 300 gram dan dihaluskan menggunakan alat penggiling. Pengikatan bahan aktif menggunakan pelarut methanol dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perendaman selama 21 hari dan evaporasi dilakukan pada hari ke-22 sehingga didapatkan 5 gram *crude extract* akar *Mimosa pudica*. Dilarutkan dengan dosis 500 (mg/kgBB) dan 100 (mg/kgBB) untuk pemberian sonde (Paul, 2010).

4.6.3 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid adalah hasil peroksidasi asam lemak yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532nm. Kadar MDA dapat digunakan sebagai parameter tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh (Zakaria et al., 2000 ; Winarsi, 2007). Kadar MDA serum darah tikus galur Wistar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang ditentukan dengan metode thiobarbituric acid (TBA) yang dikembangkan oleh Laboratorium Farmakologi

Universitas Brawijaya. MDA digunakan sebagai indikator jumlah peroksida lemak yang terbentuk akibat pengaruh asam dan panas, dengan satuan $\mu\text{g}/100$ gr massa (Flower RJ et al., 1973).

4.7 Prosedur Kerja Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

Tikus dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama 1 minggu pada temperatur ruangan konstan ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) dengan siklus terang-gelap (Skett, 1994). Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik berukuran $36 \times 30 \times 12$ cm^3 , masing-masing untuk 2-3 ekor tikus, ditutup dengan kawat kassa dan diberi alas sekam yang diganti setiap 3 hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 50gr/hari/ekor. Diet normal terdiri 67% Comfeed PAR-S, 33% terigu dan air secukupnya (Anwari, 2003).

4.7.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 (satu) kelompok kontrol dan 3 (tiga) kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 6 (enam) ekor tikus dengan rincian sebagai berikut :

Kontrol (K) : Tikus normal atau tidak DM tanpa pemberian ekstrak akar putri malu

Perlakuan 1 (P1) : Tikus DM dengan pemberian ekstrak akar putri malu dengan dosis 100mg/kgBB

Perlakuan 2 (P2) : Tikus DM dengan pemberian ekstrak akar putri malu dengan dosis 500mg/kgBB

Perlakuan 3 (P3) : Tikus DM tanpa pemberian ekstrak akar putri malu

4.7.3 Prosedur Pemodelan Tikus Diabetik Induksi STZ

1. Tikus – tikus yang telah dipersiapkan diukur berat badannya dan diukur kadar glukosa darah sewaktu apakah normal atau tidak.

2. Tikus diinjeksi dengan STZ 55 mg/kg/BB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 intra peritoneal (IP). Dilakukan perawatan tikus dan pemberian makanan seperti biasa. Kandang dan air minum diganti setiap hari
3. 3 x 24 jam setelah injeksi STZ, diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif DM jika kadar glukosa darahnya > 200 mg/dl

4.7.4 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang dengan serbet
2. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum
3. Ekor diurut kedistal sehingga darah keluar melalui ujung luka
4. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital
5. Lihat hasilnya

4.7.5 Ekstraksi Akar Putri Malu

- Akar *Mimosa pudica* dikeringkan secara *shadow drying* selama 10 hari
- Pada hari ke-11 akar dipotong kecil dan dihaluskan menggunakan alat penggiling.
- Pengikatan bahan aktif menggunakan pelarut methanol dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perendaman selama 21 hari
- Evaporasi dilakukan pada hari ke-22 sehingga didapatkan 5 gram *crude extract* akar *Mimosa pudica*.

4.7.6. Pembuatan Dosis Sonde (Per Oral)

1. Timbang semua berat badan masing-masing tikus P1 (Perlakuan 1) dan P2 (Perlakuan 2), dan catat kebutuhan dosis masing-masing tikus sesuai dengan berat badannya.

2. Berat badan masing-masing tikus dibuat satuan Kilogram dan dikalikan dengan dosis 100mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 1 dan 500mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 2.
3. Larutkan dalam normal salin sebanyak 1 cc/hari/tikus dan pelarutan dosis dibuat untuk masing-masing tikus untuk keakuratan dosis

4.7.7 Pemberian Ekstrak Akar Putri Malu

Pemberian ekstrak akar putri malu secara intragastric dengan menggunakan spuit yang pada ujungnya dipasang sonde yang dapat dimasukkan melalui mulut sampai ke lambung tikus.

4.7.8 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *simple random sampling* yang kemudian dibagi ke dalam 1 (satu) kelompok kontrol dan 3 (tiga) kelompok perlakuan.

Pada hari ke-11 atau sepuluh hari setelah induksi STZ, dilakukan pengukuran glukosa darah tikus untuk terakhir kalinya. Kemudian tikus semua kelompok dianestesi dengan eter per inhalasi, dan dilakukan pembedahan pada tikus. Kemudian dilakukan pengambilan darah langsung dari jantung tikus. Lalu, darah di sentrifuge, kemudian diambil serum yang berada di lapisan atas tabung, sedangkan endapannya dibuang. Jika tidak segera digunakan tabung reaksi berisi serum kemudian disimpan dalam refrigerator pada suhu 4°C. Tikus yang telah mati akan dimasukkan kedalam kantong kemudian dikubur di tanah.

4.7.9 Pemeriksaan MDA Serum

Serum dibagi ke dalam empat tabung reaksi masing-masing 0,25 cc, di mana tabung I sebagai tes, dan tabung II sebagai kontrol.

Menambahkan TCA 10% sebanyak 2,5 ml atau sebanyak 1,25 cc (diperoleh dari pengkalian volume serum, 0,25 cc dengan TCA 2,5 ml) ke dalam

kedua tabung, kemudian vortex hingga homogen. Menambahkan HCL 0,1 N sebanyak 200 μ L ke dalam kedua tabung, kemudian vortex hingga homogen. Kedalam tabung I (tes), tambahkan asam Na-Thiobarbiturat 100 μ L, kemudian vortex hingga homogen.

Memanaskan kedua tabung di dalam water bath dengan suhu 100°C selama 25 menit, kemudian mengangkat dan membiarkan pada suhu kamar. Mensentrifuse kedua tabung dengan kecepatan 300rpm selama 10 menit. Mengambil supernatan dalam tabung dengan pipet, kemudian menyaring dengan kertas saring yang diletakkan pada blue tip yang telah dipotong ujungnya, memisahkan tes dan kontrol. Menambahkan aquadest pada supernatan yang telah disaring hingga mencapai volume 3 cc, kemudian membaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

Pemeriksaan MDA ini menggunakan *Metode Thiobarbituric Acid (TBA)*. Prinsip *Metode Thiobarbituric Acid (TBA)*, yang dikembangkan oleh Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya adalah sebagai berikut :

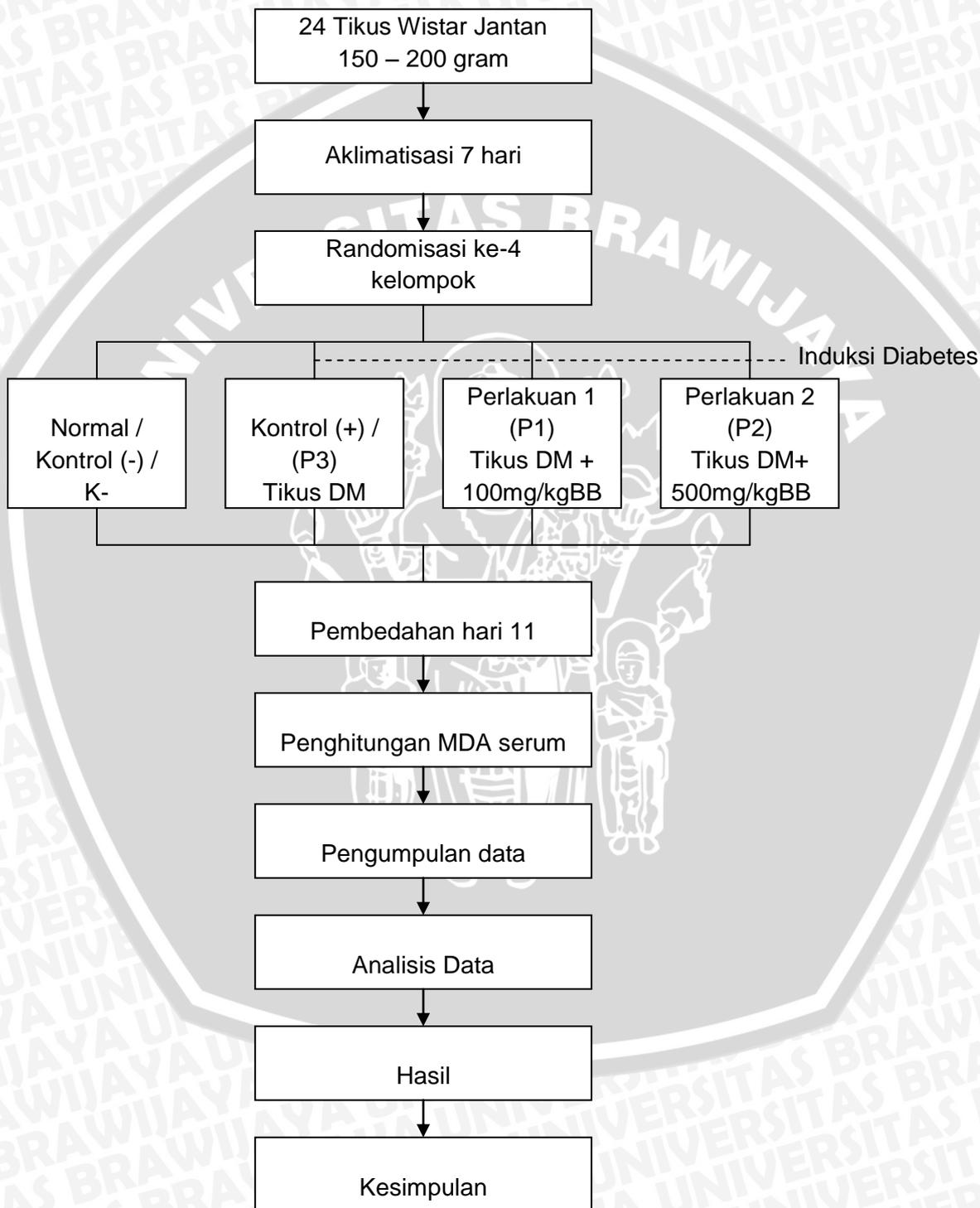
1. Pengaruh asam dan panas mempercepat dekomposisi lemak peroksida untuk membentuk MDA.
2. MDA direaksikan dengan TBA membentuk warna, perubahan warna diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang tertentu (nm). MDA yang merupakan produk sekunder dari lipid peroksidasi akan bereaksi dengan *Thiobarbituric Acid (TBA)* pada suasana asam (pH 2-3) dan temperatur 97-100°C memberikan warna merah muda.

Cara kerja pemeriksaan MDA dengan spektrofotometer adalah sebagai berikut :

1. Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum (nm).
2. Pembuatan kurva baku.

3. Lalu pengukuran kadar MDA pada sampel dengan satuan $\mu\text{g}/100 \text{ gr}$ massa

4.8 Alur penelitian



Gambar 4.1 Alur Operasional Penelitian

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh sesuai dengan pembagian kelompok dianalisa menggunakan:

1. Uji normalitas Shapiro-Wilk

Uji ini bertujuan untuk memperoleh sebaran data normal.

2. Uji homogenitas varian dan Distribusi normal

Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data yang telah diperoleh memenuhi syarat untuk uji ANOVA.

3. Uji statistik dengan metode one-way ANOVA (analisa varian satu arah)

Bertujuan untuk menilai apakah terdapat perbedaan yang bermakna dalam hasil MDA antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4. Uji Post Hoc Multiple Comparison Equal Variance by LDS. Uji ini dilakukan

untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna.

Apabila didapatkan $p < 0,05$, maka terdapat perbedaan yang bermakna.

Sebaliknya, bila $p > 0,05$, maka tidak didapatkan perbedaan yang bermakna

5. Uji korelasi Pearson

Bertujuan untuk menilai apakah terdapat hubungan yang nyata antara perbedaan dosis dengan kadar MDA.

Analisa data dilakukan dengan menggunakan IBM SPSS Statistic 19.0 pada Microsoft Windows 7.