

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian kali ini dilakukan pada bulan Juni 2015 – Januari 2016 yang bertempat di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

### 4.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian kali ini sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 150 – 200 g dan dimintakan Sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB). Banyaknya sampel dapat dihitung dengan rumus menurut Kusriningrum (2008) sebagai berikut.

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

Ket:

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

t = jumlah kelompok perlakuan

$$3n - 3 \geq 15$$

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan diatas, dengan 3 kelompok perlakuan yang diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 6 kali setiap kelompok. Hewan coba yang dibutuhkan dalam penelitian ini berjumlah 18 ekor.

### 4.3 Rancangan dan Variabel Penelitian

Penelitian kali ini bersifat eksperimental menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Rancangan Acak Lengkap/RAL digunakan jika ragam satuan percobaan yang akan digunakan tersebut homogen/seragam. Pada penelitian ini hewan model dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok terapi yang masing – masing berisi 6 tikus yang homogen (6 ulangan). Kelompok kontrol negatif adalah kelompok tikus kontrol atau sehat yang tidak diberi perlakuan induksi streptozotocin maupun terapi. Kelompok kontrol positif adalah kelompok tikus sakit yang hanya diberi perlakuan induksi streptozotocin tanpa adanya perlakuan terapi. Sedangkan kelompok terapi adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan induksi streptozotocin dan terapi salep ekstrak tanaman krokot dengan pemberian 3 kali sehari.

Rancangan penelitian kali ini dapat dilihat rinciannya dalam tabel di bawah ini.

**Tabel 4.1** Rancangan penelitian

<b>Kelompok Perlakuan</b>	<b>Perlakuan Yang Diberikan</b>
K (-)	- Tanpa induksi STZ - Laparotomi
K (+)	- Induksi STZ
K (T)	- Induksi STZ - Laparotomi - Terapi salep ekstrak krokot

Keterangan:

K (-) = kelompok kontrol negatif

K (+) = kelompok kontrol positif

K (T) = kelompok terapi

Variabel yang akan diamati dalam penelitian kali ini ada 3 variabel yaitu:

Variabel bebas : Salep ekstrak tanaman krokot

Variabel tergantung : Ekspresi MMP-13, histopatologi pankreas

Variabel kendali : Berat badan tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus,  
dan dosis streptozotocin

#### 4.4 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikro pengaduk magnetik, kandang tikus kelompok, kandang tikus individu, botol minum tikus, *dispusible syringe*, *glucotest stripe (one touch)*, mikropipet ukuran 10 – 100  $\mu\text{L}$  dan 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, *object glass*, lemari pendingin, inkubator, plastik klip, mikrotom, cawan petri, plastik, pH meter digital, evaporator, botol salep, perangkat alat bedah yang dibutuhkan, mikroskop cahaya, *thermo scientific*, oven, erlenmeyer, penangas air, mikropipet, spidol, penggaris, *glove* (sarung tangan), masker *tissue*, dan timbangan.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dengan berat 150 – 200 g, streptozotocin, NaCl fisiologis, salep ekstrak krokot, antibodi primer *anti mouse* MMP-13, *cutgut plain*, *cutgut chromic*, makanan pellet, kertas saring, aquades, vaselin album, PFA

(paraformaldehida) 4 %, alkohol dengan konsentrasi bertingkat (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, dan 90 %), alkohol absolut, *xylol*, parafin cair, *plyelisin*, pewarna preparat HE (*Hematoxyline-Eosin*).

## **4.5 Prosedur Kerja**

### **4.5.1 Persiapan Hewan Coba**

Pada penelitian kali ini terdapat 18 ekor tikus (*Rattus novergicus*) strain Wistar berjenis kelamin jantan dengan berat rata – rata 180 g. Pertama – tama tikus diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan pada semua tikus. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dengan 6 ekor tikus pada masing – masing kelompok perlakuan.

Kandang tikus berukuran 20 cm x 30 cm x 17 cm dan terbuat dari plastik dengan tutup yang terbuat dari rangkaian kawat. Kandang tikus diletakkan pada tempat yang bebas dari polutan dan suara bising, lantai kandang yang mudah disanitasi, suhu ruangan berkisar 22 – 24<sup>0</sup>C, dan memiliki kelembaban udara 50 – 60 % dengan sirkulasi udara yang cukup.

### **4.5.2 Induksi *Multiple Low Dose* (MLD) Streptozotocin**

*Multiple Low Dose* (MLD) merupakan perlakuan induksi suatu obat dengan dosis rendah secara berulang. Induksi MLD STZ pada tikus dilakukan secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut – turut pada kelompok tikus kelompok kontrol positif dan kelompok terapi.

### **4.5.3 Pengukuran Kadar Glukosa Darah**

Pengukuran kadar glukosa pada tikus melalui darah. Darah tikus diambil melalui vena *coccygea*. Darah yang didapatkan diletakkan pada *glucostripe* yang sudah dimasukkan kedalam glukometer. Kadar glukosa akan dihasilkan otomatis setelah beberapa saat. Pengukuran kadar glukosa dilakukan pada hari pertama setelah tikus diadaptasi, dilakukan induksi STZ sampai kadar glukosa darah menunjukkan  $\geq 200$  mg/dL (Aulanni'am, 2014).

### **4.5.4 Pembuatan Salep Ekstrak Krokot**

#### **4.5.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Krokot**

Ekstrak krokot diperoleh dengan ekstraksi metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96 %. Kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evapor* sehingga didapatkan ekstrak kental dengan konsentrasi 10 % (Zulaicha, 2011).

#### **4.5.4.2 Pembuatan Salep**

Terapi yang diberikan pada hewan coba pada penelitian kali ini adalah salep. Salep dibuat dengan bahan dasar hidrokarbon yaitu vaselin album. Salep yang berbasis hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi dibandingkan dengan basis yang lainnya. Selain itu, basis hidrokarbon pada salep menunjukkan daya antibakteri yang lebih besar jika dibandingkan dengan basis salep lainnya yang ditandai dengan penyembuhan luka infeksi pada kulit yang lebih cepat (Naibaho, 2013).

Pada penelitian ini salep ekstrak etanol daun krokot dibuat dengan konsentrasi 10% sebanyak 50 g. Banyaknya salep yang dibuat disesuaikan dengan perhitungan penggunaan salep setiap kali pemberian yang membutuhkan 150 mg untuk 6 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi sebanyak 3 kali/hari selama 14 hari.

$$\begin{aligned}\text{Volume total salep} &= 150 \text{ mg} \times 3 \text{ kali} \times 6 \text{ ekor} \times 14 \text{ hari} \\ &= 37,800 \text{ mg atau } 37,8 \text{ g}\end{aligned}$$

Sediaan salep dibuat dengan cara mengambil ekstrak etanol krokot sebanyak 5 g dan mencampurkannya dengan 45 g vaselin album sehingga akan didapatkan sediaan salep sebanyak 50 g (Agoes, 2008). Sediaan salep kemudian disimpan didalam wadah plastik tertutup rapat, terhindar dari sinar matahari, dan disimpan ditempat yang kering.

#### **4.5.5 Laparotomi pada Hewan Coba**

Sebelum dilakukan laparotomi, tikus disuntikkan ketamin sesuai berat badan dari tikus tersebut secara intramuscular (IM). Setelah tikus dalam kondisi tidak sadar, tikus dilaparotomi dengan metode laparotomi flank yaitu dengan merebahkan tikus dengan posisi *right-lateral* dan dibuat sayatan pada bagian antara *umbilicus* dan *cartilage xiphodeus* dengan panjang luka 3 cm. Luka laparotomi kemudian dijahit dengan benang *catgut plain* pada penjahitan bagian *musculus* dan *subcutan* serta benang *catgut chromic* pada bagian kulit. Tikus dikembalikan ke kandang individu dan dilabeli sesuai perlakuan pada kelompok.

#### **4.5.6 Pemberian Terapi Salep Ekstrak Tanaman Krokot**

Terapi dengan pemberian salep pada tikus diberikan secara topikal (oles) pada bekas luka tikus diabetes dengan pemberian terapi selama 3 hari sekali selama 14 hari pada kelompok terapi.

#### **4.5.7 Pengambilan Preparat**

Pertama – tama tikus dieutanasi dengan cara dislokasi pada leher pada os ontoideum, kemudian tikus diletakkan pada nampan bedah dan ditata pada posisi bagian ventral tikus berada diatas. Kulit diambil pada bagian bekas luka laparotomi kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis, kemudian direndam dalam larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7,4. Pankreas pada tikus diambil dan dicuci dengan NaCl fisiologis, kemudian direndam dalam larutan Paraformaldehid (PFA) 10 % dan disimpan dalam suhu ruang.

#### **4.5.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Pankreas**

Tahap pembuatan preparat histopatologi pankreas terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan preparat histologi pankreas pada *object glass* (**Lampiran 4**) serta digunakan metode pewarnaan *Hematoxyline-Eosin* (HE) (**Lampiran 5**). Penampang pankreas dilihat pada mikroskop dengan perbesaran 400x dan diamati tingkatan kerusakan pada pulau Langerhans pankreas.

#### **4.5.9 Ekspresi MMP-13 dengan Imunohistokimia**

Teknik imunohistokimia pada kulit untuk melihat ekspresi MMP-13 pada daerah insisi laparotomi dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Pengamatan pada ekspresi MMP-13 dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dengan lima bidang pandang pengamatan pada preparat. Hasil pengamatan difoto dan diproses dengan *software ImmunoRatio* untuk mengamati ekspresi MMP-13 yang ditandai dengan banyaknya daerah yang terwarnai dengan warna coklat.

#### **4.5.10 Analisa Data**

Dalam penelitian kali ini analisa data yang digunakan adalah analisa kualitatif deskriptif dan analisa kuantitatif statistik. Analisa kualitatif deskriptif digunakan untuk menganalisa gambaran histopatologi pada pankreas tikus. Analisa kuantitatif statistika digunakan untuk menganalisa data dari ekspresi MMP-13 dengan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan BNJ.