

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Designs*) jenis *post-test* dengan kelompok kontrol (*Post-test Only, Control Group*). Subjek dipilih secara acak untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan. Hal ini disebabkan hewan coba, tempat percobaan, dan bahan yang digunakan bisa dikatakan homogen sehingga setiap anggota populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel. Metode pemilihan subjek dilakukan secara acak sederhana (*Simple Random Sampling*) dengan angka acak (*Random Number*).

4.1.1 Rancangan *Post-test* dengan Kelompok Kontrol

Rancangan penelitian menggunakan *post-test* dengan kelompok kontrol. Dalam rancangan ini dilakukan randomisasi, penentuan anggota-anggota kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan dengan acak. Melalui randomisasi, kedua kelompok dipastikan mempunyai sifat sama sebelum dilakukan intervensi. Kelompok eksperimen menerima perlakuan (X) yang diikuti dengan pengukuran kedua. Hasil pengukuran dibandingkan dengan nilai pengukuran kedua pada kelompok kontrol yang tidak menerima intervensi. Dengan demikian, perbedaan hasil *post-test* disebabkan adanya pengaruh intervensi.

4.1.2 Rancangan Sampel Acak Sederhana (Simple Random Sampling)

Rancangan pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana karena setiap bagian dari populasi memiliki kesempatan untuk diseleksi sebagai sampel. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana dengan menggunakan angka acak (*random number*). Dengan menggunakan *random number*, masing-masing subjek dimasukkan ke dalam lima kelompok yang terdiri dari:

- Kelompok I : tikus tanpa induksi streptozotocin dan tidak diberikan suplemen ALA sebagai kontrol negatif (NTA)
- Kelompok II : tikus induksi streptozotocin tanpa diberikan suplemen ALA sebagai kontrol positif (DTA)
- Kelompok III : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 80 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu (DA80)
- Kelompok IV : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 200 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu (DA200)
- Kelompok V : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 500 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu (DA500)

Penetapan dosis ALA 80 mg/kg berat badan, 200 mg/kg berat badan, dan 500 mg/kg berat badan dari tiga penelitian yang menilai efek asam lipoat terhadap stres oksidatif di jantung. Dosis ALA 80 mg/kg per hari diberikan pada tikus wistar jantan diabetes dalam penelitian Shotton dkk. (2003) selama 8 minggu dapat mencegah penurunan norepinefrin pada atrium kanan

dibandingkan tikus wistar diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Dosis 200 mg/kg per hari diberikan pada tikus *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF) diabetes dalam penelitian Eun Lee dkk. (2012) selama 16 minggu menunjukkan berat jantung tikus secara signifikan lebih ringan dibandingkan tikus OLETF diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Selain itu, OLETF + ALA juga secara signifikan menurunkan ekspresi RAGE, meningkatkan ekspresi liver kinase B1 jantung, meningkatkan ekspresi antioksidan superoksida dismutase, dan menurunkan jumlah kolagen dibandingkan OLETF tanpa ALA. Dosis 500 mg/kg per hari diberikan pada tikus Sprague-Dawley diabetes dalam penelitian Midaoui dan Champlain (2002) selama tiga minggu yang secara signifikan mencegah peningkatan tekanan darah dan produksi O_2^- pada aorta dibandingkan dengan tikus Sprague-Dawley diabetes tanpa diberikan ALA. Pemberian ALA ditentukan dalam jangka waktu empat minggu berdasarkan penelitian Li Chun Jun dkk. (2009) karena penelitian ini bertujuan menilai efek asam alfa lipoat ketika digunakan dalam jangka waktu singkat.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Pada induksi penyakit kronis, perubahan-perubahan fisiologis pada tikus menyerupai perubahan pada manusia. Dalam penelitian sindrom metabolik, tikus juga menunjukkan tanda dan gejala yang sama ketika sindroma tersebut dialami oleh manusia. Oleh sebab itu, pemilihan tikus sebagai model diabetes mellitus tipe 1 pada penelitian ini tepat dalam menggambarkan diabetes mellitus pada manusia.

4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dan eksklusi ditetapkan agar karakteristik sampel tidak menyimpang dari populasi. Selain itu, penetapan kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan agar anggota populasi memenuhi syarat untuk diambil sebagai sampel.

Berikut kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan:

4.2.1.1 Kriteria Inklusi

Tikus yang digunakan sebagai subjek penelitian harus memiliki ciri-ciri berikut:

- Tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar
- Jenis kelamin jantan

Jenis kelamin mempengaruhi perkembangan diabetes pada induksi streptozotocin karena tikus jantan lebih sensitif terhadap streptozotocin dibandingkan tikus betina (He-Lin Tian dkk., 2010).

- Umur 75-90 hari

Umur berkorelasi dengan berat badan tikus berdasarkan penelitian (Sihombing dan Tuminah, 2011). Oleh sebab itu, umur tikus 75-90 hari dianggap dewasa dan berat badan pada tikus tersebut besar sehingga tingkat kelangsungan hidup setelah diinduksi streptozotocin juga tinggi.

- Berat badan 180-300 gram
- Tikus aktif dan mau makan

4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang tidak dapat diambil sebagai sampel memiliki karakteristik berikut:

- Tikus dengan perubahan kondisi seperti sakit yang ditunjukkan dengan kurang aktif, perubahan asupan makanan dan minuman

- Tikus dengan kelainan anatomi
- Tikus mati sebelum perlakuan

4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan tiga macam perlakuan dengan dua kelompok sebagai kontrol, jumlah hewan coba untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer (Arifiyah, 2007):

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

Keterangan :

- n = jumlah sampel tiap kelompok
- t = jumlah kelompok
- 15 = nilai deviasi

Dari rumus tersebut, berikut penghitungan jumlah sampel penelitian

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

$$\{(n - 1) 4\} \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Hasil penghitungan sampel menunjukkan jumlah hewan coba bagi masing-masing kelompok lebih besar sama dengan lima. Kemudian, tingkat keberhasilan induksi diabetes mellitus tipe 1 dengan menggunakan injeksi streptozotocin di laboratorium farmakologi FKUB sebesar 90%. Penghitungan estimasi sampel menunjukkan jumlah sampel lima tiap kelompok sehingga tikus yang diabetes berjumlah dua puluh ekor. Jika dua puluh ekor tikus setara dengan tingkat keberhasilan 90% induksi diabetes, maka diperlukan 22 ekor tikus untuk mencapai tingkat keberhasilan 100%. Namun, 22 ekor tikus bukan jumlah

proporsional jika dimasukkan ke dalam empat kelompok. Oleh sebab itu, 24 ekor tikus digunakan untuk masing-masing kelompok yang diinduksi diabetes mellitus agar jumlah setiap kelompok proporsional. Dari 24 kelompok tersebut, setiap kelompok akan terdiri dari enam ekor tikus. Kelompok yang tidak diinduksi diabetes juga akan terdiri dari enam ekor sehingga secara keseluruhan jumlah hewan coba yang dibutuhkan sebanyak tiga puluh ekor.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini terdiri dari lima kelompok yaitu:

- Tikus normal dengan perlakuan olive oil tanpa ALA (NTA)
- Tikus diabetes dengan perlakuan olive oil tanpa ALA (DTA)
- Tikus diabetes dengan perlakuan olive oil dan ALA dosis 80 mg/kg berat badan (DA80)
- Tikus diabetes dengan perlakuan olive oil dan ALA dosis 200 mg/kg berat badan (DA200)
- Tikus diabetes dengan perlakuan olive oil dan ALA dosis 500 mg/kg berat badan (DA500)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah stres oksidatif meliputi rasio bobot jantung/berat badan, kadar malondialdehid, dan histologi jantung.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut lokasi dan waktu penelitian yang ditetapkan:

4.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan.

Berikut tempat penelitian yang digunakan:

- Pemeliharaan hewan coba dilakukan di laboratorium biosains Universitas Brawijaya
- Induksi diabetes mellitus dilakukan di laboratorium farmakologi FKUB
- Pengambilan dan penimbangan jantung dilakukan di laboratorium biosains Universitas Brawijaya
- Pembuatan homogenat sampel dan pemeriksaan kadar MDA dilakukan di laboratorium faal FKUB
- Pemeriksaan histologi jantung dilakukan di laboratorium patologi anatomi FKUB

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung antara bulan Maret hingga Juni 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan dan alat digunakan untuk pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus, pemberian suplemen ALA, pengambilan jantung, penimbangan jantung, pemeriksaan histologi jantung, pembuatan homogenat, dan pemeriksaan kadar MDA.

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan.

4.5.1.1 Makanan Tikus

Kebutuhan makanan tikus dewasa per ekor setiap hari adalah lima belas gram per 100 gram berat badan per hari. Makanan tikus berupa pelet dengan merk Comfeed susu PAP dengan komposisi air 12%, protein kasar 10%, lemak kasar 7%, serat kasar 8%, abu 10%, kalsium 0,9-1,2%, dan fosfor 0,6-1,0% yang dicampur air dihaluskan kemudian dibuat bulatan dan ditimbang dengan berat lima belas gram per berat badan.

4.5.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1

Induksi diabetes mellitus tipe 1 menggunakan bahan utama streptozotocin. Sebelum diinjeksikan, streptozotocin memerlukan preparasi dengan bahan dan prosedur tertentu. Berikut bahan yang diperlukan dan tahap preparasi streptozotocin untuk induksi diabetes mellitus tipe 1:

4.5.1.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam induksi diabetes mellitus tipe 1 diantaranya:

- Streptozotocin
- Asam sitrat
- *Water for injection*

4.5.1.2.2 Preparasi Buffer Asam Sitrat

Preparasi buffer sitrat menggunakan protokol dalam prosedur tetap induksi streptozotocin di laboratorium farmakologi FKUB. Tujuan pemberian buffer untuk mempertahankan pH karena streptozotocin stabil pada pH 4,5 dalam larutan. Pembuatan buffer asam sitrat yaitu dengan menimbang asam sitrat sebanyak 962 mg kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquades. Kemudian,

larutan diukur dengan pH meter dan digunakan bila menunjukkan pH 4,5. Dasar pemilihan pH 4,5 karena pada pH tersebut stabilitas streptozotocin akan meningkat (Motyl dan McCabe, 2009).

4.5.1.2.3 Preparasi Streptozotocin

Preparasi streptozotocin dilakukan sesuai prosedur tetap induksi streptozotocin di laboratorium farmakologi FKUB. Alat-alat (beaker glass, erlenmeyer, batang pengaduk, disposable spuit) yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan uap panas pada suhu 121 °C selama dua puluh menit. Streptozotocin ditimbang sebanyak 332 mg kemudian dilarutkan dalam 50 mL buffer Na sitrat pH 4,5. Larutan streptozotocin dengan konsentrasi 11 mg/0,5 mL diambil dengan disposable spuit 1 mL.

4.5.1.3 Pemberian Suplemen ALA

Bahan yang digunakan adalah asam alfa lipoat dan pembawa yaitu *olive oil* yang diberikan dengan dosis 80 mg/kg berat badan, 200 mg/kg berat badan, dan 500 mg/kg berat badan.

4.5.1.4 Pembuatan Homogenat Jantung

Pembuatan homogenat jantung dilakukan setelah jantung diperfusi dengan PBS dan dipisahkan bagian untuk pengukuran MDA dengan pemeriksaan histologi. Bahan yang digunakan dalam pembuatan homogenat jantung diantaranya:

- Sampel jaringan jantung (atrium dan bagian atas ventrikel)
- Akuades

4.5.1.5 Pemeriksaan Histologi Jantung

Pemeriksaan histologi jantung membutuhkan pewarnaan dengan hematoksilin dan eosin. Bahan-bahan yang diperlukan dalam pemeriksaan akumulasi kolagen diantaranya:

- Formalin 10%
- Parrafin
- Hematoksilin
- Larutan xylol
- Alkohol 96%
- Alkohol asam 1%
- Amonia air
- Eosin 1%
- Alkohol 80%

4.5.1.6 Pengukuran MDA

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pengukuran MDA diantaranya:

- Larutan TCA 100%
- Na tiobarbiturat 1%
- HCl 1 N
- Aquades

4.5.2 Alat Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standar peralatan laboratorium. Berikut alat-alat yang digunakan selama proses penelitian:

Tabel 4.1 Peralatan Penelitian

Tahap Penelitian	Alat
Pemeliharaan hewan coba	Kandang + tutup, botol air, rak tempat kandang, sekam, dan timbangan
Induksi diabetes mellitus	Disposable spuit 1 mL, labu ukur 50 mL, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, beaker glass, aluminium foil, pH meter, <i>glucose check test</i> , bunsen, milipore, label, dan termometer
Pemberian suplemen ALA	Vial vortex, vortex, batang pengaduk, timbangan digital, gelas ukur, dan alat sonde
Pengambilan dan penimbangan berat jantung	Timbangan digital (ketelitian 0,05 gram), pot untuk organ + label, gunting bedah, pinset, gelas arloji, cawan petri, papan bedah, pin, beaker glass, kertas saring, kamera digital
Pemeriksaan histologi	Pisau, kaset gross, mesin <i>tissue tex processor</i> , microtome, inkubator, <i>slide glass</i> , dan <i>cover glass</i>
Pembuatan homogenat	Tube 2 mL, mortir, stamper, timbangan, mikropipet, <i>blue tip</i> , <i>yellow tip</i> , <i>white tip</i> , dan vortex
Pengukuran MDA	Spektrofotometer uv-vis, kuvet, tissue, sentrifugator, mikropipet, inkubator, mikropipet, <i>blue tip</i> , <i>yellow tip</i> , dan <i>white tip</i>

4.6 Definisi Operasional

- Diabetes tipe 1 : abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein pada diabetes mellitus diakibatkan sekresi insulin inadekuat yang ditimbulkan oleh kerusakan sel beta pankreas.
- Asam alfa lipoat (ALA) : antioksidan yang telah digunakan sebagai pencegahan dan terapi diabetes neuropati. Dalam penelitian ini, suplemen ALA dilarutkan dalam *olive oil* yang diberikan dalam tiga dosis untuk tiga kelompok masing-masing 80 mg/kg, 200 mg/kg, dan 500 mg/kg berat badan.

- Streptozotocin : antibiotik spektrum luas dan sitotoksik terutama pada pankreas. Dosis 60 mg/kg menyebabkan toksisitas pada sel beta pankreas dan diabetes terjadi dua hingga empat hari setelah injeksi.
- Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar menunjukkan tanda dan gejala yang sama dengan manusia ketika menderita sindroma metabolik.
- Stres oksidatif : kondisi peningkatan radikal bebas tanpa diimbangi aktivitas antioksidan sehingga terjadi kerusakan sel dan jaringan. Penelitian ini menilai stres oksidatif pada jantung diabetes mellitus tipe 1 dengan mengukur kadar MDA, menimbang berat jantung, dan melakukan pemeriksaan histologi jantung.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

Penelitian terdiri dari beberapa tahap yang meliputi pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus, pemberian suplemen ALA, pengambilan jantung, penimbangan jantung, pemeriksaan histologi jantung, pembuatan homogenat, dan pengukuran kadar MDA jantung. Kemudian, pengumpulan data meliputi berat badan tikus, glukosa darah, rasio berat jantung terhadap berat badan, histologi jantung, dan kadar MDA.

4.7.1 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari berbagai prosedur dimulai sejak pemeliharaan hewan coba hingga pemeriksaan kadar MDA, penimbangan jantung, dan pemeriksaan histologi.

4.7.1.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama tujuh hari dengan tujuan untuk menyesuaikan diri dengan kondisi laboratorium.

Pemeliharaan tikus sesuai standar laboratorium yaitu:

1. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik yang dilengkapi ventilasi di bagian atas dan beralaskan serbuk kayu.
2. Setiap kandang berisi satu ekor tikus yang ditempatkan pada suhu 28 hingga 32 °C dan kelembaban ruangan 50-70%.
3. Lingkungan dikondisikan 12 jam terang dan 12 jam gelap dan kondisi terang antara pukul 07.00 hingga 19.00.
4. Pakan dan minum ditempatkan dalam kondisi mudah diakses oleh tikus.
5. Jumlah pakan 15 gram/100 gram berat badan per hari dan volum air minum 10 ml/100 gram berat badan yang selalu dipantau setiap hari.

4.7.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1

Induksi diabetes mellitus menggunakan injeksi streptozotocin karena efek sitotoksik yang selektif terhadap sel β pankreas. Streptozotocin masuk ke dalam sel melalui *glucose transporter* (GLUT2) dan menyebabkan alkilasi DNA sehingga terjadi nekrosis secara cepat dan permanen. Metode ini telah digunakan secara luas dalam penelitian kesehatan untuk membuat diabetes mellitus pada hewan coba (Rodea dkk., 2010). Dosis streptozotocin digunakan 60 mg/kg karena pada dosis tersebut dapat menyebabkan reaksi autoimun yang merusak sel beta pankreas. Pada dosis tersebut, streptozotocin menyebabkan toksisitas pada sel beta pankreas dan diabetes terjadi dua hingga empat hari setelah injeksi (Akbarzadeh, 2007). Namun, dosis 60 mg/kg berat badan tidak menimbulkan ketosis dan tingkat kematian tikus rendah meskipun tidak

diberikan insulin selama percobaan (Wei dkk., 2003). Prosedur induksi diabetes mellitus menggunakan protokol dalam prosedur tetap induksi streptozotocin di laboratorium farmakologi FKUB. Berikut langkah-langkah induksi diabetes mellitus:

1. Tikus dipuasakan selama 20 jam dengan diberi pakan separuh dari jumlah pakan standar.
2. Tikus diinjeksi streptozotocin 60 mg/kg secara intraperitoneal dengan cara menyuntik pada bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.
3. Tikus dikembalikan ke dalam kandang dan kandang diberi label pada tikus yang diinduksi diabetes mellitus.
4. Dekontaminasi kandang menggunakan KOH 0,5% untuk menghilangkan metabolit toksik yang dikeluarkan dua hari setelah induksi streptozotocin.
5. Glukosa darah puasa diukur tujuh hari setelah injeksi.
6. Penetapan diabetes mellitus jika glukosa darah > 200 mg/dL.
7. Nyeri yang timbul setelah efek anestesi hilang diatasi dengan terapi nonfarmakologi sesuai *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits* yaitu dengan mengurangi stres pada tikus melalui pemeliharaan hewan sesuai standar laboratorium seperti suhu ruangan yang sesuai, makanan dan air tercukupi dan mudah diakses oleh hewan coba.

4.7.1.3 Pemberian Suplemen ALA

Suplemen ALA diberikan pada kelompok III, IV, dan V selama empat minggu yang dimulai tujuh hari sejak onset diabetes. Pemilihan durasi selama empat minggu berdasarkan penelitian Chun-Jun Li dkk. (2009) yang

menggunakan tikus wistar yang diinduksi diabetes melalui streptozotocin tanpa terapi setelah empat minggu menunjukkan peningkatan glukosa darah, pembentukan kolagen interstitial, apoptosis sel jantung, penurunan GSH, dan peningkatan kadar MDA pada jantung. Preparasi asam alfa lipoat dilakukan sesuai metode yang dilakukan oleh Sahin dkk. (2012) menggunakan ALA yang dilarutkan dalam *olive oil* karena ALA dapat larut dalam *olive oil*. Volum pelarut mempertimbangkan volum penyondean untuk tikus yaitu 10-20 mL/kg berat badan yaitu menggunakan volum yang sama yaitu 2 mL untuk masing-masing dosis.

4.7.1.4 Pembedahan Hewan Coba

Tikus dieutanasia setelah diberikan suplemen ALA selama empat minggu. Binatang dimatikan berdasarkan salah satu metode euthanasia yang dicantumkan dalam *AVMA Guidelines on Euthanasia* (2007) yaitu dengan inhalasi eter. Inhalasi eter dapat mendeprisi langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang kemudian menyebabkan hipoksia. Tikus yang telah dieutanasia dibedah berdasarkan protokol dalam prosedur tetap pembedahan hewan coba di laboratorium farmakologi FKUB

1. Tikus yang sudah mati diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
2. Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
3. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok
4. Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus.

5. Jantung diambil untuk pengukuran MDA dan pemeriksaan struktur jantung, sedangkan organ pankreas, hati, ginjal, limfa, dan lambung juga diambil untuk dilakukan pemeriksaan stres oksidatif.
6. Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan.
7. Organ dicuci dengan PBS 1x berulang-ulang hingga bersih dari darah.
8. Organ ditiriskan di atas kertas saring.
9. Setelah air berkurang, organ ditempatkan pada cawan petri kering kemudian ditimbang.
10. Masing-masing berat organ dicatat.
11. Organ yang telah ditimbang kemudian diperfusi dengan PBS hingga darah berhenti mengalir.
12. Bagian jantung dipisahkan yaitu ventrikel kiri bawah untuk pemeriksaan histologi dan bagian atrium hingga ventrikel kiri atas untuk pengukuran MDA.
13. Bagian untuk pemeriksaan histologi dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%.

4.7.1.5 Penimbangan Organ

Jantung diambil dan dicuci dengan PBS 1x dan diletakkan di atas kertas saring. Setelah kering, jantung ditimbang dengan timbangan digital dan hasilnya dicatat.

4.7.1.6 Pemeriksaan Histologi Jantung

Pembuatan dan pemeriksaan *slide* jaringan jantung dilakukan sesuai prosedur tetap pembuatan *slide* histologi laboratorium patologi klinik FKUB.

Prosedur tersebut yaitu:

1. Jaringan dipilih terbaik sesuai yang akan diteliti.
2. Jaringan dipotong dengan ketebalan 2-3 mm kemudian dimasukkan kaset sesuai dengan kode gross.
3. Jaringan dimasukkan larutan formalin 10%.
4. Jaringan diproses dengan mesin *tissue tex processor*.
5. Jaringan diangkat dari mesin *tissue tex processor* kemudian diblok dengan parafin sesuai kode jaringan.
6. Jaringan dipotong dengan mikrotom ketebalan 3-5 mikron.
7. Setelah disayat, jaringan dimasukkan inkubator selama 1-2 jam pada suhu 60-70 °C kemudian dilarutkan dalam larutan xylol masing-masing dua kali selama lima belas menit.
8. Jaringan dicelupkan ke empat wadah berisi alkohol 96% masing-masing selama empat menit.
9. Jaringan dicuci dengan air mengalir selama sepuluh menit.
10. Jaringan direndam dalam hematoksin selama lima belas menit.
11. Jaringan dicuci kembali dengan air selama lima belas menit.
12. Jaringan dicelupkan 2-5 kali dalam alkohol asam 1%.
13. Jaringan dicelupkan 3-5 kali dalam amonia air.
14. Jaringan direndam dalam eosin 1% selama lima belas menit.
15. Proses dehidrasi dengan mencelupkan jaringan dalam:
 - a. Alkohol 80% selama tiga menit
 - b. Alkohol 96% selama tiga menit
 - c. Alkohol 96% selama tiga menit
16. Proses penjernihan dilakukan dengan merendam jaringan dalam larutan xylol selama lima belas menit.

17. Slide jaringan ditutup dengan *cover glass*.

18. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop olympus dengan perbesaran 400x.

4.7.1.7 Pembuatan Homogenat Jantung

Pembuatan homogenat jantung berdasarkan metode pembuatan homogenat jaringan laboratorium faal FKUB, yaitu:

1. Jaringan diambil sebanyak 10 mg.
2. Jaringan digerus dengan stamper hingga halus dan ditambahkan aquades 1 mL.
3. Homogenat ditampung dalam tabung ependorf.

4.7.1.8 Pemeriksaan Kadar MDA

Pemeriksaan MDA berdasarkan reaksi antara MDA dengan molekul TBA dengan metode pemeriksaan MDA di laboratorium faal FKUB yaitu:

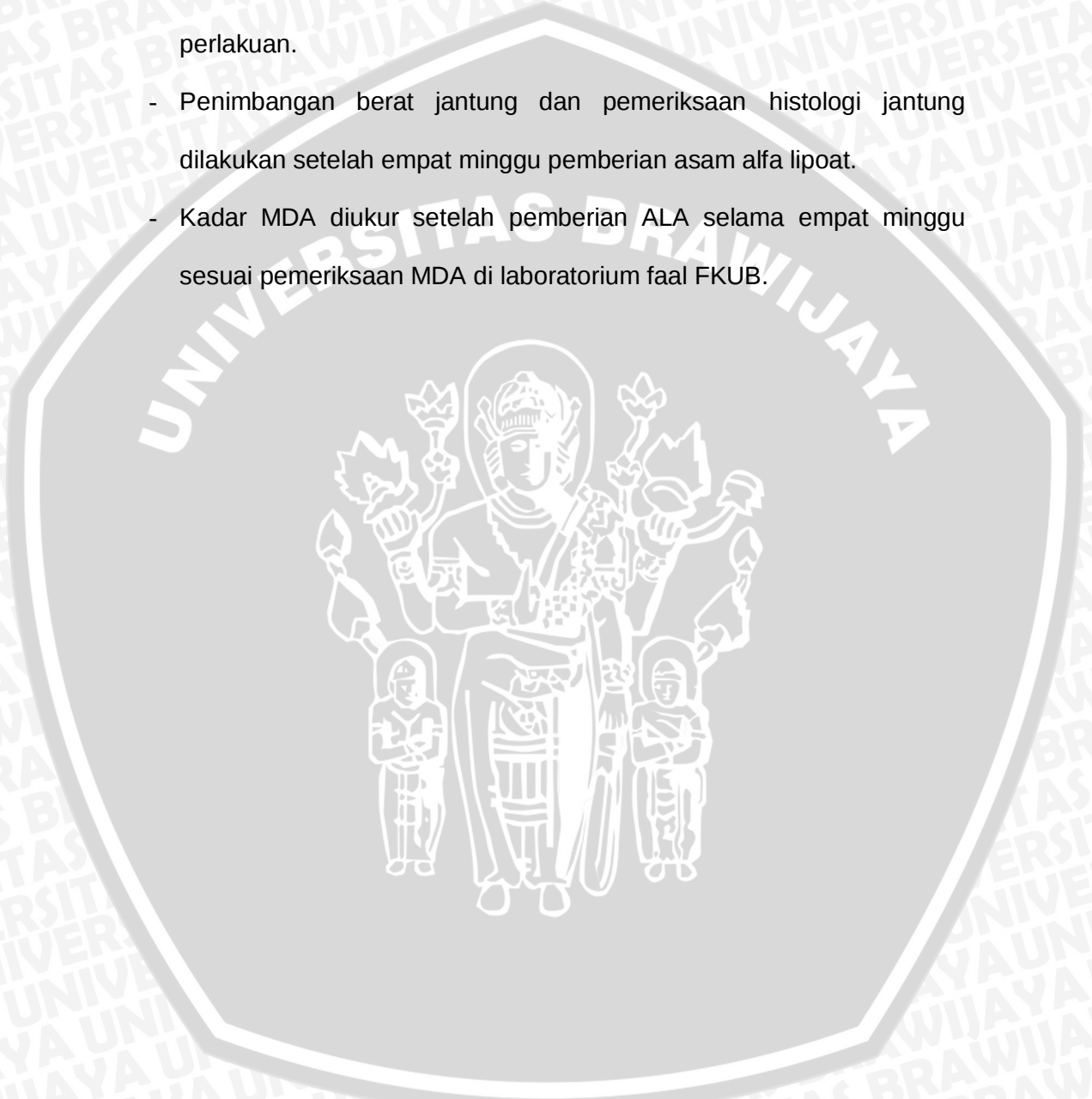
1. Homogenat ditambahkan 100 μ L TCA 100%.
2. Campuran ditambahkan 100 μ L Na tiobarbiturat 1%.
3. Campuran ditambahkan 250 μ L HCl 1 N.
4. Campuran dipanaskan pada suhu 100 °C selama 20 menit.
5. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit.
6. Supernatan diambil dan ditambahkan aquades sampai volum 3500 μ L.
7. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 532 nm.

4.7.2 Pengumpulan Data

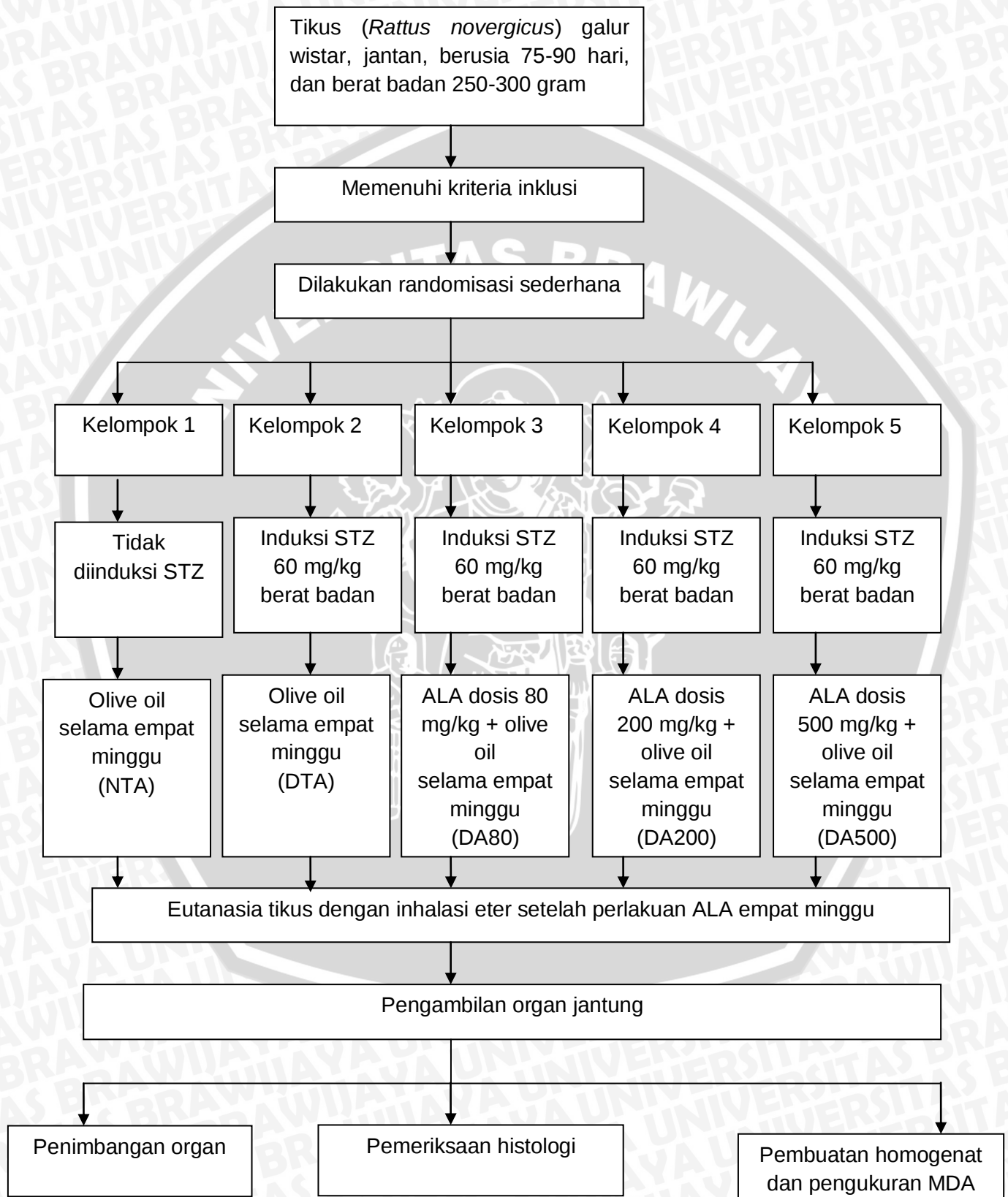
Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya:

- Berat badan masing-masing kelompok yang ditimbang setiap minggu selama perlakuan.

- Kadar glukosa darah masing-masing kelompok yang diukur setiap minggu selama perlakuan dengan menggunakan glucose *check test*.
- Tingkat survival setiap kelompok diamati setiap hari selama perlakuan.
- Penimbangan berat jantung dan pemeriksaan histologi jantung dilakukan setelah empat minggu pemberian asam alfa lipoat.
- Kadar MDA diukur setelah pemberian ALA selama empat minggu sesuai pemeriksaan MDA di laboratorium faal FKUB.



4.8 Kerangka Operasional



4.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 14.00. Data berat badan, kadar gula darah puasa, kadar MDA dan rasio bobot jantung yang didapatkan disajikan dalam *mean* $\pm$ standar deviasi (SD). Hubungan antara perlakuan dengan variabel dianalisis dengan uji korelasi *Pearson-Product Moment*. Lalu, uji beda statistik parametrik dengan *one way ANOVA* sedangkan statistik nonparametrik dengan Kruskal-Wallis. Hasil masing-masing uji dikatakan signifikan bila $p \leq 0,05$. Tingkat survival setiap kelompok dianalisis dengan Kaplan-Meier. Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

H_A = ada penurunan stres oksidatif pada jantung tikus wistar diabetes mellitus tipe 1 yang besarnya tergantung dosis ALA yang digunakan

H_0 = tidak ada penurunan stres oksidatif pada jantung tikus wistar diabetes mellitus tipe 1 pada masing-masing dosis ALA yang digunakan