

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan eksperimen yang 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, tidak diberikan suplemen ALA, diberikan minyak zaitun sebagai kontrol negatif
- Kelompok II : tikus induksi streptozotocin tanpa diberikan suplemen ALA, dan diberikan minyak zaitun sebagai kontrol positif
- Kelompok III : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 80 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu
- Kelompok IV : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 200 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu
- Kelompok V : tikus induksi streptozotocin dengan diberikan suplemen ALA dosis 500 mg/kg berat badan setiap hari selama empat minggu

Penetapan dosis ALA 80 mg/kg berat badan/hari, 200 mg/kg berat badan/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari dipilih berdasarkan tiga penelitian yang menilai efek asam lipoat terhadap stres oksidatif. Dosis ALA 80 mg/kg per hari diberikan selama 8 minggu pada tikus Wistar jantan diabetes dalam penelitian Shotton *et al.* (2003) dapat mencegah penurunan norepinefrin pada atrium kanan dibandingkan tikus Wistar diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Penurunan norepinefrin memicu deplesi sel *natural killer T* (NKT) pada hati. Penurunan NKT menyebabkan kerusakan organ dan kelainan, seperti diabetes dan kerusakan hati pada obesitas. Kerusakan organ disebabkan oleh sitokin proinflamasi yang berlebihan akibat deplesi NKT (Li *et al.*, 2004). Dosis 200

mg/kg per hari diberikan selama 16 minggu pada tikus *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF) diabetes dalam penelitian Lee *et al.* (2012) menunjukkan peningkatan AMPK (*adenosine monophosphate-activated kinase*) dibandingkan tikus OLETF diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Peningkatan aktivasi AMPK dapat menurunkan lipogenesis hepatic (Park *et al.*, 2008). Dosis 500 mg/kg per hari diberikan selama tiga minggu pada tikus Sprague-Dawley diabetes dalam penelitian Midaoui dan Champlain (2002), secara signifikan menurunkan tekanan darah dan mencegah penurunan glutathion peroksida pada plasma dibandingkan dengan tikus Sprague-Dawley diabetes tanpa diberikan ALA. ALA diberikan dalam jangka waktu empat minggu berdasarkan penelitian Midaoui dan Champlain (2002) karena penelitian ini bertujuan menilai efek asam alfa lipoat ketika digunakan dalam jangka waktu singkat, serta mengetahui pengaruh berbagai dosis yang digunakan pada hati tikus diabetes.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek yang dipilih pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Pemilihan subjek ini didasarkan karena 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 karena 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 dengan tujuan 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 norvegicus*) galur Wistar
- Jenis kelamin jantan

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

- Umur 75-90 hari

Umur berkorelasi dengan berat badan tikus berdasarkan penelitian (Sihombing dan Tuminah, 2011). 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

Dalam penelitian ini, bobot 180-300 g merupakan berat badan normal untuk tikus dewasa.

- Tikus aktif dan mau makan

4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang tidak dapat diambil sebagai sampel memiliki karakteristik berikut:

- Tikus tampak sakit yang ditunjukkan dengan tidak bergerak secara aktif
- Tikus dengan kelainan anatomi

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$p = 4,75 \approx 5$$

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 adalah suplemen asam alfa lipoat yang diberikan dalam dosis 80 mg/kg berat badan/hari, 200 mg/kg berat badan/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari yang diberikan sehari sekali selama empat minggu dengan sonde. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid (MDA) dan gambaran histologi hati.

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 Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya
- Induksi diabetes mellitus dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Pengambilan dan penimbangan hati dilakukan di Laboratorium Fisiologi-Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

- Pembuatan homogenat sampel dilakukan di Laboratorium Fisiologi-Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Fisiologi-Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Pembuatan preparat histologi hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Pengamatan histologi hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung mulai tanggal 21 Maret 2013 hingga 9 Mei 2014.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan alat digunakan untuk pemeliharaan hewan coba, induksi diabetes mellitus, pemberian suplemen ALA, pengambilan hati, penimbangan hati, pembuatan preparat histologi hati, pengamatan histologi hati, 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 15 g/100 g berat badan. Standar makanan tikus yang digunakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya menggunakan pakan ternak bermutu merk *COMFEED SUSU-PAP* dengan bahan baku jagung kuning, *wheat bran*, SBM,

tetes, *palm olein*, asam amino esensial, mineral esensial, dan vitamin. Nilai gizi yang terkandung dalam pakan ternak bermutu tersebut ialah :

- Air	: maks.	12 %
- Protein kasar	: min.	16 %
- Lemak kasar	: 3 -	7 %
- Serat kasar	: maks.	8 %
- Abu	: maks.	10 %
- Kalsium	: 0,9 -	1,2 %
- Fosfor	: 0,6 -	1,0 %

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
- Na sitrat
- *Water for injection*

4.5.1.2.2 Preparasi Buffer Natrium Sitrat

Preparasi buffer sitrat menggunakan protokol yang digunakan *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC). Tujuan pemberian

larutan penyangga untuk mempertahankan pH karena streptozotocin stabil pada pH 4 dalam larutan. Pembuatan buffer natrium sitrat yaitu dengan menimbang natrium sitrat sebanyak 962 mg kemudian dilarutkan dalam 50 ml *water for injection*. 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 and McCabe, 2009).

4.5.1.2.3 Preparasi Streptozotocin

Preparasi streptozotocin menggunakan protokol yang digunakan *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC). Streptozotocin ditimbang sebanyak 332 mg kemudian dilarutkan dalam 16 ml buffer Na sitrat pH 4,5. Larutan streptozotocin disaring dengan filter 0,2 μ untuk sterilisasi. Larutan streptozotocin dengan konsentrasi 11 mg/0,5 ml dimasukkan kedalam *disposable spuit* 1 ml.

4.5.1.3 Pemberian Suplemen ALA

Bahan yang digunakan diantaranya suplemen ALA dengan merk mecola forte dan minyak zaitun dengan dosis 80 mg/kg berat badan/hari, 200 mg/kg berat badan/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari.

4.5.1.3.1 Preparasi ALA

ALA ditimbang sesuai dengan perhitungan bobot masing-masing tikus. Kemudian minyak zaitun diukur sebanyak 2 ml dan dimasukkan kedalam vial vorteks. ALA yang telah ditimbang dilarutkan kedalam 2 ml minyak zaitun. Campuran ALA dan minyak zaitun kemudian divorteks hingga homogen. Larutan yang sudah homogen kemudian dimasukkan kedalam vial kosong.

4.5.1.4 Pembuatan Homogenat Hati

Pembuatan homogenat hati dilakukan setelah perlakuan selama empat minggu. Bahan yang digunakan dalam pembuatan homogenat hati diantaranya:

- Sampel jaringan hati
- Aquades

4.5.1.5 Pembuatan Preparat Histologi

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan preparat histologi diantaranya:

- Formalin 10 %
- Xylol
- Hematoksilin
- Eosin 1 %
- Alkohol asam 1 %
- Alkohol 96 %
- Amonia
- Alkohol 80 %



4.5.1.6 Pengukuran MDA

Bahan-bahan yang diperlukan dalam pengukuran MDA diantaranya:

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

4.5.2 Alat Penelitian

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

Tabel 4.1 Peralatan Penelitian

Tahap Penelitian	Alat
Pemeliharaan hewan coba	Kandang + tutup anyaman besi + penyaring udara, botol air, rak tempat kandang yang dilengkapi dengan alat untuk sirkulasi udara, serbuk kayu, timbangan (ketelitian 0,01 gram)
Induksi diabetes mellitus	<i>Disposable spuit</i> 1 ml, neraca analitik, batang pengaduk, pH meter, bunsen, aluminium foil, filter 0,2 mikron, label, kapas, bejana gelas, <i>glucose check test</i> , stik glukosa darah, povidon iodida 10% atau iodin 1%, pipet tetes, termometer
Pemberian suplemen ALA	Sendok besi, vortex, vial, batang pengaduk, gelas ukur, sonde, timbangan digital (ketelitian 0,0001 gram)
Pengambilan dan penimbangan berat hati	Timbangan digital (ketelitian 0,01 gram), pot untuk organ + label, gunting bedah, pinset, papan bedah, pin
Pembuatan preparat histologi	<i>Cover glass</i> , <i>slide glass</i> , pisau, kaset histologi, mesin <i>Tissue Tex Processor</i> ,

	<i>oven, microtome</i>
Pengamatan Histologi	Mikroskop Olympus BX51
Pembuatan homogenat	Tube 2 ml, stemper, mortir, tabung timbangan, <i>blue tip, yellow tip, white tip</i> , dan vortex
Pengukuran MDA	Spektrofotometer <i>double beam</i> , kuvet, tisu, sentrifugator, vial, mikro pipet, inkubator

4.6 Definisi Operasional

- Diabetes tipe 1 : abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein pada diabetes mellitus yang diakibatkan karena sekresi insulin inadekuat yang ditimbulkan oleh kerusakan sel beta pankreas.
- Asam alfa lipoat (ALA) : antioksidan alami yang telah digunakan sebagai pencegahan dan terapi diabetes dengan komplikasi pada hati. Dalam penelitian ini, suplemen ALA yang digunakan dengan nama dagang Thiocetic Acid dalam bentuk serbuk yang digunakan dalam tiga dosis untuk tiga kelompok masing-masing 80 mg/kg/hari, 200 mg/kg/hari, dan 500 mg/kg berat badan/hari sehari sekali.
- Streptozotocin : antibiotik spektrum luas dan sitotoksik terutama pada pankreas. Dosis tunggal 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 yang menunjukkan tanda dan gejala yang sama dengan manusia ketika menderita sindroma metabolik.

- Kadar MDA hati tikus : pengukuran kadar MDA pada jaringan hati tikus untuk menentukan tingkat kerusakan akibat stres oksidatif. Pemeriksaan kadar MDA hati tikus dengan metode *Thiobarbiturat Acid Reactive Substances* (TBARS).
- Gambaran histologi hati : Pemeriksaan gambaran histologi hati diperiksa dengan sediaan histologi menggunakan pewarnaan HE dan dihitung jumlah hepatosit yang mengalami perlemakan.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

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

4.7.1 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari berbagai prosedur dimulai sejak pemeliharaan hewan coba hingga pemeriksaan kadar MDA, penimbangan hati, dan pengamatan 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 Sentral Ilmu Hayati UB yaitu:

- a. Tikus ditempatkan dalam kandang beralas serbuk kayu dengan bagian atas kandang ditutup anyaman besi berongga.

- b. Setiap kandang berisi satu ekor tikus yang ditempatkan pada suhu 28° C hingga 32° C dan kelembaban ruangan 50-70%.
- c. Lingkungan dikondisikan 12 jam terang dan 12 jam gelap dan kondisi terang antara pukul 07.00 hingga 19.00.
- d. Pakan dan minum ditempatkan dalam kondisi mudah diakses oleh tikus.
- e. Jumlah pakan 15 gram/kg berat badan dan volume air minum 200 ml yang selalu dipantau setiap hari. Air minum ditempatkan dalam tempat minum yang memiliki sedotan sehingga memudahkan tikus untuk minum.

4.7.1.2 Induksi Diabetes mellitus tipe 1

Induksi diabetes mellitus menggunakan injeksi streptozotocin karena efek sitotoksik yang selektif terhadap sel β pankreas. STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasikan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β pancreas (Nugroho, 2006). 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 tunggal 60 mg/kg berat badan tidak menimbulkan ketosis dan tingkat kematian tikus rendah meskipun tidak diberikan insulin selama percobaan (Wei *et al.*, 2003). Prosedur induksi diabetes mellitus menggunakan metode yang digunakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Berikut langkah-langkah induksi diabetes mellitus:

- a. Tikus dipuasakan selama ± 20 jam.
- b. Tikus diukur glukosa darah puasa sebelum induksi streptozotocin.
- c. Tikus diinjeksi streptozotocin 60 mg/kg secara intraperitoneal.

- d. Tikus dikembalikan ke dalam kandang.
- e. Glukosa darah puasa diukur setelah tiga hari injeksi.
- f. Penetapan diabetes mellitus jika glukosa darah > 200 mg/dl.
- g. 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 Li Chun Jun *et al.* (2009) yang menggunakan tikus wistar yang diinduksi diabetes melalui streptozotocin tanpa terapi setelah empat minggu menunjukkan peningkatan glukosa darah, apoptosis sel jantung, penurunan GSH, dan peningkatan kadar MDA. Sediaan asam alfa lipoat yang dipilih adalah Thioctic Acid berbentuk serbuk yang berasal dari Jiangsu Tohope Pharmaceutical CO., LTD, Changshu, Cina. Pemilihan merk dagang Thioctic Acid karena suplemen tersebut hanya mengandung asam alfa lipoat saja, sedangkan suplemen ALA lain mengandung beberapa zat aktif lain. Belum ada penelitian yang membandingkan potensi masing-masing sediaan di Indonesia sehingga pemilihan sediaan berdasarkan kandungan zat aktifnya saja. Preparasi asam alfa lipoat dilakukan sesuai metode yang dilakukan oleh Sahin *et al.* (2012) menggunakan ALA yang dilarutkan dalam minyak zaitun. ALA dapat larut dalam minyak zaitun. Volume pelarut mempertimbangkan volume maksimal untuk lambung tikus yaitu 2 ml minyak zaitun pada masing-masing dosis.

Binatang dikembalikan ke kandang setelah penyondean dan diamati 5 hingga 10 menit untuk mengetahui tanda-tanda distress atau kesulitan bernafas.

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 mendepresi langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang kemudian menyebabkan hipoksia. Tikus yang telah dieutanasia dibedah berdasarkan *Prosedur Tetap Pembedahan Hewan Uji Laboratorium Fisiologi-Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya* :

- a. Tikus yang sudah mati diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
- b. Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
- c. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok.
- d. Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus.
- e. Hati diambil untuk pengukuran MDA dan pengamatan histologi,
- f. Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan
- g. Organ dicuci dengan PBS 1x berulang-ulang hingga bersih dari darah.
- h. Organ ditiriskan di atas kertas saring.
- i. Hati diletakkan pada cawan petri kering kemudian ditimbang.
- j. Organ yang telah ditimbang kemudian diperfusi dengan PBS hingga darah berhenti mengalir.
- k. Hati yang telah ditimbang kemudian dipisah dengan memotong bagian yang akan digunakan untuk pengukuran MDA dan pengamatan histologi.

- I. Bagian hati yang digunakan untuk pengamatan histologi ditempatkan dalam pot yang berisi formalin 10%, sedangkan bagian organ yang digunakan untuk pengukuran MDA ditempatkan pada plastik kedap udara.

4.7.1.5 Penimbangan Organ

Hati diambil dan diletakkan di atas aluminium foil. Kemudian hati ditimbang dengan timbangan merk *KERN 440-33N* (ketelitian 0,01 gram) dan hasilnya dicatat.

4.7.1.6 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi berdasarkan prosedur *Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya*, yaitu:

1. Proses Pematangan Jaringan

Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang diteliti, selanjutnya dipotong dengan ketebalan $\pm 2-3$ milimeter. Lalu, jaringan dimasukkan ke dalam kaset histologi sesuai dengan kode. Kemudian kaset dimasukkan kedalam larutan formalin 10% untuk fiksasi. Tujuan fiksasi adalah mengawetkan dan mengeraskan jaringan

2. Jaringan diproses menggunakan mesin *Tissue Tex Processor*.

Dalam proses *tissue tex processor*, jaringan mengalami proses pencucian dan penjernihan. Jaringan dicuci dengan air untuk menghilangkan sisa kotoran. Kemudian, jaringan didehidrasi dengan alkohol. Selanjutnya, proses penjernihan dilakukan dengan perendaman jaringan ke dalam xylol. Proses penjernihan bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan.

3. Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

Jaringan kemudian diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor* dan diblok dengan paraffin sesuai dengan kode. Jaringan dipotong dengan mikrotom ketebalan \pm 3-5 mikron. Potongan jaringan terpilih direntangkan pada kaca objek.

4. Proses deparafinasi

Preparat diletakkan dalam oven selama 1-2 jam pada suhu 60-70°C. Kemudian, dimasukkan kedalam larutan Xylool masing-masing 15 menit sebanyak dua kali.

5. Proses Hidrasi

Preparat dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol 96% masing-masing \pm 3 menit kemudian dicuci dengan air selama 10 menit.

6. Pewarnaan dengan Hematoksilin-Eosin

Preparat yang sudah dicuci kemudian dicat dengan hematoksilin selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Kemudian jaringan dicuci dengan alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celup dan dicuci kembali dengan amonia air sebanyak 3-5 celup. Jaringan kemudian dicat kembali dengan eosin 1% selama 15 menit.

7. Proses dehidrasi

Preparat yang sudah dicat dengan eosin kemudian dicuci dengan alkohol 80% selama 3 menit dan dicuci kembali dengan alkohol 96% selama 3 menit. Kemudian, dicuci lagi dengan alkohol 96% selama 3 menit.

8. Proses Penjernihan

Preparat yang sudah dicuci dengan alkohol 96% kemudian dijernihkan dengan merendam pada larutan xylool selama 15 menit.

9. Mounting dengan entelan dan *deckglass*

Pemasangan *deckglass* dengan menggunakan entelan sebagai perekat.

4.7.1.7 Pengamatan Histologi Hati

Pengamatan histologi hati dilakukan masing-masing pada 5 lapang pandang mikroskopik dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51. Pengamatan yang dilakukan untuk melihat sel hati normal dan sel hati yang mengalami perlemakan.

4.7.1.8 Pembuatan Homogenat Hati

Pembuatan homogenat hati berdasarkan metode Aulanni'am, et al., 2012, yaitu :

- a. Organ ditimbang sebanyak 10 mg.
- b. Organ dihomogenkan dengan cara digerus sampai halus dengan stemper.
- c. Organ yang halus ditambahkan dengan aquades dan dimasukkan kedalam tabung appendorf.

4.7.1.9 Pemeriksaan Kadar MDA

Pemeriksaan MDA berdasarkan reaksi antara MDA dengan molekul TBA yang digunakan dalam metode Aulanni'am, et al., 2012:

- a. Homogenat ditambahkan TCA 100% 100 μ L.
- b. Ditambahkan tiobarbiturat Na 1% 100 μ L.
- c. Ditambahkan HCl 1 N 250 μ L.
- d. Campuran divortex hingga homogen.
- e. Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 100°C.
- f. Disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit.
- g. Diambil supernatan dan ditambahkan aquades 3500 μ L kemudian dimasukkan dalam kuvet.
- h. Diukur dengan spektrofotometri pada λ 532 nm.

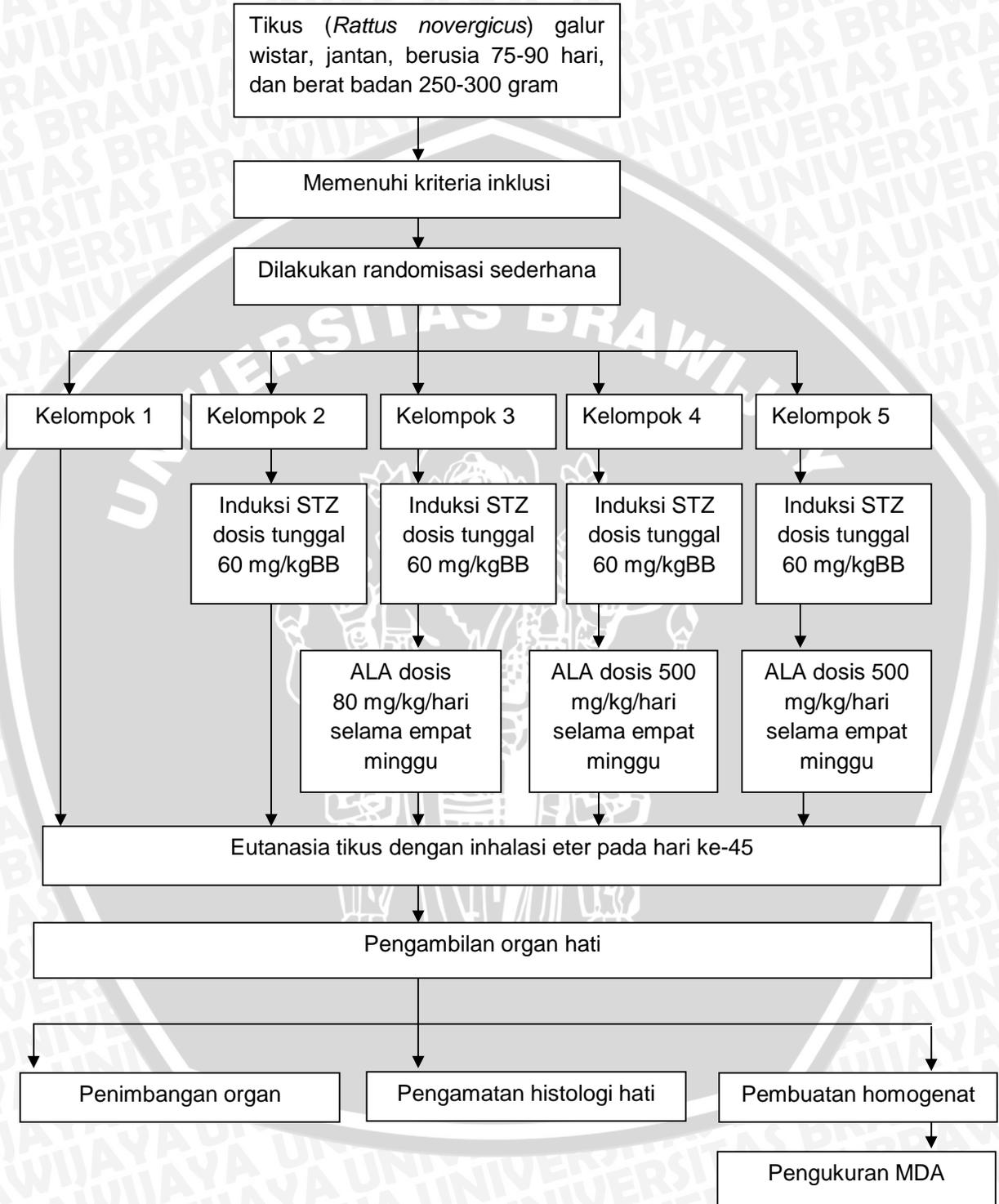
- i. Hasil absorbansi dimasukkan persamaan $y = 0,0004 x - 0,0126$ untuk mengukur kadar MDA.

4.7.2 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan selama penelitian diantaranya:

- Berat badan masing-masing tikus diukur sebelum pemeliharaan. Pada kelompok II, berat badan ditimbang diawal dan sebelum injeksi streptozotocin. Berat badan kelompok III, IV, dan V diukur ketika awal penelitian, sebelum injeksi streptozotocin, dan setiap hari untuk penentuan dosis ALA. Berat badan tikus ditimbang dengan timbangan merk *KERN 440-33N* (ketelitian 0,01 gram).
- Kadar glukosa darah diukur tiga hari setelah injeksi streptozotocin pada bagian ekor dengan menggunakan *glucose check test* untuk memastikan tikus telah mengalami diabetes mellitus. Untuk memastikan tikus tetap diabetes, pengukuran kadar glukosa darah diukur setiap minggu selama empat minggu.
- Penimbangan berat hati dan pengamatan histologi hati dilakukan setelah empat minggu pemberian asam alfa lipoat.
- Kadar MDA diukur setelah pemberian ALA selama empat minggu sesuai protokol *Standar Pengukuran MDA Laboratorium Fisiologi-Patofisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya*.

4.8 Kerangka Operasional



4.9 Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 20.00. Data kadar MDA yang didapatkan lalu diekspresikan dalam mean \pm *standard deviation* (SD). Uji normalitas data dilakukan dengan uji Shapiro-Wilk, hasilnya menunjukkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas dengan uji Levene, hasilnya menunjukkan data homogen ($p > 0,05$). Analisa data dilakukan dengan uji statistik menggunakan *ANOVA one way* (data normal dan homogen) untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar MDA terhadap perlakuan yang diberikan dengan kelompok kontrol dan perbedaan dikatakan signifikan bila $p \leq 0,05$. Apabila data signifikan, dilanjutkan dengan Post Hoc untuk mengetahui perbedaan bermakna antar lima kelompok perlakuan. Jika data tidak normal, maka menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

H_0 = ada penurunan kadar MDA dan perbaikan gambaran histologi pada hati tikus wistar diabetes mellitus tipe 1 yang besarnya tergantung dosis ALA yang digunakan

H_A = tidak ada penurunan kadar MDA dan perbaikan gambaran histologi pada hati tikus wistar diabetes mellitus tipe 1 pada masing-masing dosis ALA yang digunakan