

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus novogicus* strain wistar). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tapak liman yang diberikan peroral (metode sonde) terhadap ketebalan aorta dari tikus wistar diabetes Melitus yang diinduksi *streptozotocin* (STZ).

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian adalah tikus putih *Rattus Novegicus Strain Wistar* dengan ketentuan:

- Jenis kelamin jantan
- Usia 6-8 minggu
- Berat badan 120-180 gram
- Bulu putih dan bersih
- Dalam kondisi sehat dan aktif

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

- Mudah didapat dan jinak.
- Memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap obat.
- Lebih terstandarisasi dibandingkan dengan binatang percobaan lainnya.

- d. Tidak muntah karena memiliki pusat pengatur muntah.
- e. Tikus putih merupakan mamalia sehingga mirip dengan manusia.
- f. Dapat digunakan untuk penelitian pada bidang endokrinologi, nutrisi, metabolisme, dan fisiologi.

#### 4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

##### 1. Kriteria Inklusi

- Tikus jantan sehat, berbulu putih dan tampak aktif
- Umur 6 – 8 minggu
- Berat badan 120-180 gram
- GDA < 126 mg/dl

##### 2. Kriteria Eksklusi

- Tikus yang sakit dan asupan makanan kurang pada saat penelitian
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

#### 4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu : kelompok A (Kontrol negatif), kelompok B (Kontrol positif), kelompok C (Dosis I), kelompok D (Dosis II), dan kelompok E (Dosis III). Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut :

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

p : jumlah perlakuan (lima (5) : kelompok A,B,C,D,E)

n : jumlah ulangan

$$n(5 - 1) \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 3,75$$

Diperoleh hasil perhitungan 3,75 sehingga dibulatkan ke atas menjadi 4 pengulangan. Hewan coba yang dibutuhkan adalah minimal 4 ekor untuk setiap kelompok dengan cadangan sampel 2 ekor tiap perlakuan sehingga total sampel yang digunakan adalah 30 ekor sampel.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Tergantung**

Ketebalan dinding pembuluh darah aorta tikus wistar DM

#### **4.3.2 Variabel Bebas**

Ekstrak tapak liman dengan 3 dosis yang berbeda.

### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **4.4.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu: Laboratorium Farmakologi untuk tempat pemeliharaan hewan coba dan pembedahan, Laboratorium Farmakologi untuk ekstraksi tapak liman, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk tempat pembuatan slide penampang aorta.

#### **4.4.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 5 bulan, mulai dari bulan Februari sampai bulan Juni 2013.

### **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 120-180 gram dengan kondisi umum sehat yang dapat ditandai dengan gerakan tikus yang aktif. Tikus percobaan diperoleh dari Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. 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 tanaman tapak liman (*Elephantopus scaber*) dikeringkan dengan oven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai bebas kandungan air dan digiling sehingga menjadi serbuk.

#### 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%
- Glukose strip merek Easy Touch©
- Glukometer merek Easy Touch©
- Jarum

#### 4.5.1.5 Bahan untuk Pembedahan Tikus

- Kloroform 20 ml
- Alkohol
- Formalin 10% 200 ml

#### 4.5.1.6 Bahan untuk Pembuatan slide preparat Histo-PA Aorta Tikus

- Formalin 10%
- Etanol 70%
- Etanol 80%
- Etanol 99%

- Etanol absolut
- Xylol
- Parafin
- Hematoksin-Eosin (HE)

#### 4.5.2 Alat

##### 4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang tikus berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
- 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 Pembuatan Ekstrak Tapak liman

- Alat penggiling
- Etanol
- Rotator evaporator
- Oven

##### 4.5.2.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Tapak liman

Pemberian ekstrak akar tapak liman kepada tikus DM menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde.

##### 4.5.2.5 Alat untuk Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

- Glukose strip merek Easy Touch©
- Glukometer merek Easy Touch©
- Jarum

Glucose strip test dipakai sebagai metode pengukuran kadar gula darah dengan alasan lebih praktis dan lebih terjangkau daripada metode spektrofotometri. Glucose strip test memiliki skala presisi (CV) sebesar 5%.

#### 4.5.2.6 Alat untuk Pembedahan Tikus

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

#### 4.5.2.8 Alat untuk Pengukuran Ketebalan Aorta

- Mikroskop
- Slide Histo-PA jaringan aorta
- Komputer

### 4.6 Definisi Operasional

#### 4.6.1 Tikus Model Diabetik Induksi Streptozotocin (STZ)

Tikus percobaan diberikan STZ dengan tujuan menciptakan kondisi Diabetes Melitus yang diakibatkan oleh kerusakan sel  $\beta$  pankreas. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yaitu 40 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, 20 mg/kgBB, 10 mg/kgBB, 10 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 1 ml aquades dengan pengasaman PH hingga PH 4-4.5 menggunakan asam sitrat. STZ 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  $\geq 200$  mg/dl (Akbarzadeh et al., 2007).

#### 4.6.2 Ekstrak Etanol Tapak liman (*Elephantopus scaber l*)

Tapak liman (*Elephantopus scaber l*) yang dipakai adalah tanaman yang diambil langsung dari Materia Medica Kota Batu. Tapak liman dibersihkan dari kotoran dengan cara direndam selama dua jam untuk meluruhkan sisa tanah, dicuci bersih dengan air mengalir, dan diulang sampai dua kali pembersihan. Tanaman tapak liman (*Elephantopus scaber l.*) dikeringkan secara *shadow drying* kemudian dipotong kecil, didapat berat kering 300 gram dan dihaluskan menggunakan alat penggiling. Pengikatan bahan aktif menggunakan pelarut etanol dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perendaman sehingga didapatkan *crude extract Elephantopus scaber l.*

#### 4.6.3 Ketebalan Aorta

Aorta yang diukur pada penelitian ini ialah aorta abdominalis tikus. Aorta didapatkan melalui proses pembedahan sampel setelah hari ke 60 induksi. Slide preparat berupa penampang lumen aorta. Ketebalan aorta yang diukur ialah jarak antara tunika intima dan tunika media dengan memakai mikroskop (Mello et al., 2004).

### 4.7 Prosedur Kerja Penelitian

#### 4.7.1 Aklimatisasi

Tikus dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama 1 minggu pada temperatur ruangan konstan (20-25°C) dengan siklus terang-gelap. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik berukuran cm<sup>3</sup>, masing-masing untuk 5-6 ekor tikus, ditutup dengan kawat kassa dan diberi alas sekam yang diganti setiap 3 hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 45gr/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 5 kelompok yaitu 2 (satu) kelompok kontrol dan 3 (tiga) kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 6 (enam) ekor tikus dengan rincian sebagai berikut :

Kontrol Negatif (K-) : Tikus normal atau tidak DM tanpa pemberian ekstrak tapak liman)

Kontrol Positif (K+) : Tikus DM tanpa pemberian ekstrak tapak liman

Perlakuan 1 (P1) : Tikus DM dengan pemberian ekstrak tapak liman dengan dosis 125mg/kgBB

Perlakuan 2 (P2) : Tikus DM dengan pemberian ekstrak tapak liman dengan dosis 250mg/kgBB

Perlakuan 3 (P3) : Tikus DM dengan pemberian ekstrak tapak liman dengan dosis 500mg/kgBB

#### 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 STZ dengan dosis rendah bertahap yaitu sebanyak 40 mg/kg/BB, 35 mg/kg/BB, 20 mg/kg/BB, 10 mg/kg/BB, dan 10 mg/kg/BB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 intra peritoneal (IP). Sebelum injeksi tikus wistar dipuasakan semalam.
3. Dilakukan perawatan tikus dan pemberian makanan seperti biasa. Kandang dan air minum diganti setiap hari
4. 3 x 24 jam setelah injeksi STZ, diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif DM jika kadar glukosa darahnya > 300 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
6. Pengukuran kadar glukosa darah tikus

#### 4.7.5 Ekstraksi Tapak liman

##### 4.7.5.1 Proses pengeringan

Tapak liman (*Elephantopus scaber L.*) dicuci sampai bersih kemudian dipotong kecil-kecil dan dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

##### 4.7.5.2 Proses ekstraksi

Setelah kering, dihaluskan dengan blender sampai halus. Kemudian ditimbang sebanyak 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Setelah itu direndam dengan etanol sampai volume 900 ml dan dikocok sampai benar-benar tercampur (+ 30 menit). Kemudian didiamkan 1 malam sampai mengendap. Lapisan atas/bagian pelarut diambil dan disaring menggunakan kertas saring.

##### 4.7.5.3 Proses evaporasi

Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil. Kemudian dimasukkan dalam labu evaporator 1 liter. Labu evaporasi dipasang pada evaporator dan water bath diisi dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat termasuk evaporator, pemanass water bath (diatur sampai 90°C) dipasang kemudian disambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Kemudian ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (+ 1, 5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira 30% dari bahan yang digunakan. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan dalam freezer.

#### 4.7.6. Pembuatan Dosis Sonde (Per Oral)

1. Timbang semua berat badan masing-masing tikus P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3) dan catat kebutuhan dosis masing-masing tikus sesuai dengan berat badannya.
2. Berat badan masing-masing tikus dibuat satuan Kilogram dan dikalikan dengan dosis 125mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 1, 250mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 2, dan 500mg/KgBB untuk kelompok perlakuan 3.
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 Tapak Liman

Ekstrak tapak liman diberikan secara intragastric dengan menggunakan spuit yang pada ujungnya dipasang sonde yang dapat dimasukkan melalui mulut sampai ke lambung tikus. Pemberian ekstrak tapak liman dimulai pada hari ke-7 setelah tikus mengalami kondisi Diabetes Melitus menggunakan induksi STZ dan dilakukan setiap hari selama 60 hari.

#### 4.7.8 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara melakukan pembedahan pada semua kelompok tikus. Kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan ketiga perlakuan dibedah setelah mencapai 60 hari setelah induksi STZ. Pembedahan dilakukan pada hari ke 61 karena sudah memenuhi kondisi diabetes Melitus dikatakan dalam tahap kronis (Wilkes, 2013).

Semua kelompok tikus dianastesi dengan kloroform per inhalasi dalam wadah tertutup. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan thorax. Pertama, darah diambil dengan spuit 3 cc melalui jantung. Kemudian dilakukan pengambilan sampel berupa jaringan aorta abdominalis dari tikus. Selanjutnya

aorta disimpan dalam gelas plastik pada suhu 4°C. Organ lain seperti ginjal dan hepar juga diambil dan disimpan dalam formalin 10%. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam botol sampel yang sudah diisi dengan formalin sebelumnya. Botol sampel diberi label kelompok terlebih dahulu.

#### 4.7.9 Pembuatan Slide Histo Patologi Penampang Aorta

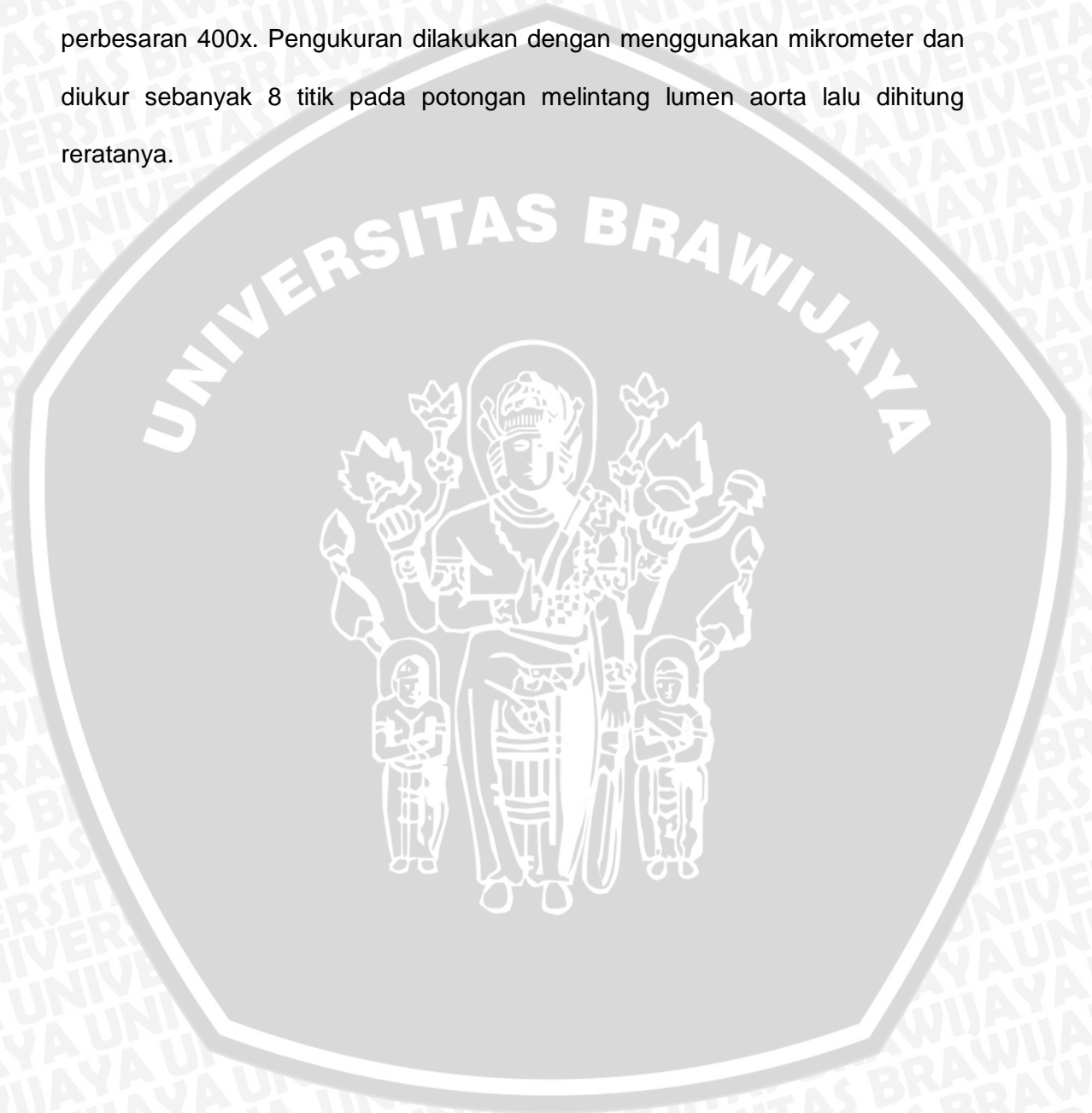
Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan aorta tikus dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam melted paraffin : xylene = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. Melted paraffin dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk kubus lalu ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam paraffin tersebut kemudian disiram lagi dengan melted paraffin secukupnya.

Blok paraffin dibiarkan sampai dingin dan dikeluarkan dari cetakannya. Bagian blok yang dibelakang dilekatkan pada kayu pemegang blok pada mikrotom kemudian posisi indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan (6-8 mikrometer) diatur. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita, ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan diatas permukaan air hangat (30-40°C) secara lembut dan tanpa lipatan. Gelas objek dilapisi dengan lapisan putih telur : gliserol = 1:1 sebagai lapisan tipis dan biarkan kering (untuk merekatkan sediaan). Pita paraffin dan pita tersebut diangkat dengan gelas objek. Gelas objek diletakkan di atas steamer hangat (agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan) kemudian dibiarkan kering dan sediaan melekat erat (1

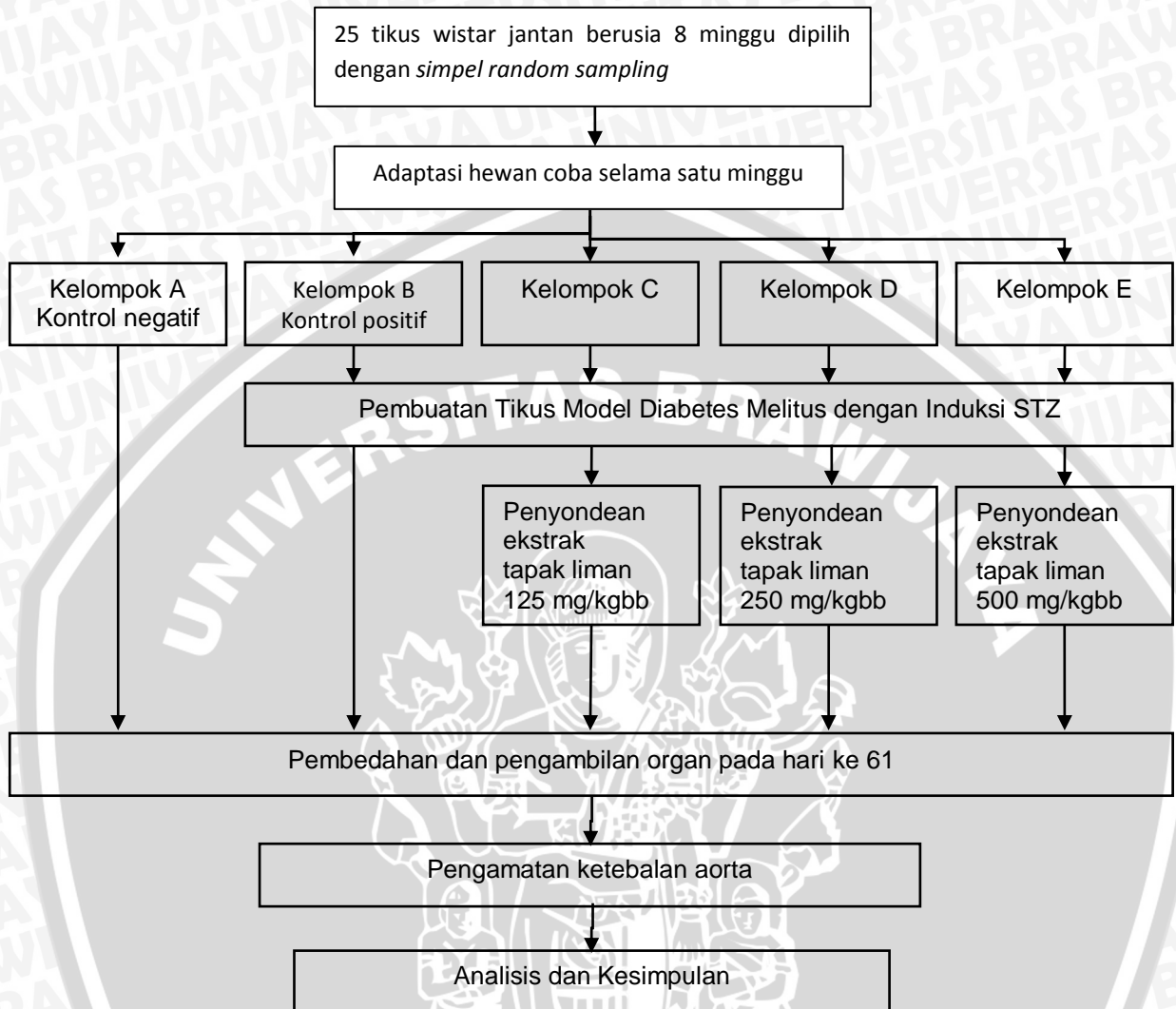
hari). Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan ke dalam xylol selama 3 x 5 menit lalu dikeringkan. Preparat siap untuk diamati dibawah mikroskop.

#### 4.7.10 Pengukuran Ketebalan Aorta

Penampang aorta diukur menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan mikrometer dan diukur sebanyak 8 titik pada potongan melintang lumen aorta lalu dihitung reratanya.



#### 4.8 Alur penelitian



**Gambar 4.1 Rancangan Penelitian**

Keterangan: Tikus wistar dibagi menjadi kelompok kontrol (A dan B) dan tiga kelompok perlakuan (C, D dan E) dan Induksi STZ diberikan pada kelompok B, C, D dan E. Ekstrak tapak liman diberikan secara peroral setiap hari selama 60 hari. Pada hari ke 61 dilakukan pembedahan dan pengambilan organ. Selanjutnya, dilakukan pengecekan terhadap ketebalan pembuluh darah aorta.

#### 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 ketebalan aorta antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4. Uji Post Hoc Multiple Comparison Equal Variance. 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 ketebalan aorta tikus.

Analisa data dilakukan dengan menggunakan program statistic SPSS pada Windows7.