

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorik secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Pada desain penelitian ini tidak dilakukan pre test. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kemiri yang diberikan per oral (metode sonde) terhadap kadar MDA pankreas tikus Wistar model diabetes melitus tipe II.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Penelitian dilakukan menggunakan hewan coba, yaitu tikus putih *Rattus norvegicus Strain Wistar* dengan ketentuan:

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Usia 2 bulan
- c. Berat badan 150-170 gram

Tikus jenis ini dipilih sebagai sampel karena tergolong jinak dan mudah perawatannya.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

- Tikus jantan sehat, berbulu putih, dan tampak aktif
- Umur 2 bulan
- Berat badan 150-170 gram

2. Kriteria Eksklusi

- Tikus yang selama percobaan tidak mau makan
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung.

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Sampel penelitian adalah tikus *strain* Wistar jantan umur 2 bulan, dengan berat badan 150-170 gram, tampak sehat, tingkah laku normal.

Jumlah sampel yang digunakan menggunakan rumus : $p(n-1) \geq 15$

Keterangan : p : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel tiap kelompok (Solimun, 2001)

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

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

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5, jumlah sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 4. Ditambahkan 2 sampel tiap perlakuan dengan pertimbangan terjadinya kriteria eksklusi setelah hewan coba diinduksi streptozotosin, maka jumlah hewan coba yang digunakan adalah 30 ekor.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Perubahan pada kadar MDA pankreas tikus Wistar model DM tipe II.

4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak daun kemiri 3 dosis (100, 200, dan 400 mg/kgBB/hari).

4.3.3 Variabel Luar

- a. Jenis kelamin: jantan
- b. Umur tikus: 2 bulan
- c. Berat badan tikus: 150-170 gram
- d. Waktu pengujian: lama paparan ekstrak daun kemiri
- 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. Pengukuran kadar MDA pankreas dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan, mulai dari bulan Maret 2015 hingga bulan Juni 2015

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 novergicus strain* Wistar, jenis kelamin jantan, berumur 2 bulan, berat badan 150-170 gram dengan kondisi umum sehat yang dapat ditandai dengan gerakan tikus yang aktif. Tikus percobaan diperoleh dari Institut Teknologi Bandung. Hewan coba tersebut dipelihara dalam bak plastik berisi sekam dengan tutup kandang terbuat dari kawat.

4.5.1.2 Bahan untuk Perlakuan

Bahan yang digunakan adalah daun kemiri (*Aleurites moluccana*) yang didapat dari perkebunan di Wonosalam Jombang.

4.5.1.3 Bahan untuk Perlakuan Model Tikus Diabetik

Bahan untuk perlakuan model tikus diabetik terdiri dari pakan diet tinggi lemak dan streptozotocin. Pakan tikus diet tinggi lemak mengandung: asam kolat, kuning telur, minyak kambing, minyak babi, dan PAR-S terigu. Streptozotocin (STZ) yang akan digunakan dilarutkan dalam 1 ml akuades dengan pengasaman pH 4,5 menggunakan asam sitrat

4.5.1.4 Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

Bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak daun kemiri adalah etanol 90%.

4.5.1.5 Bahan untuk Pembedahan Tikus

Bahan yang digunakan untuk pembedahan adalah ketamin sebagai anestesi dan alkohol 70% untuk desinfektan.

4.5.1.6 Bahan untuk Pemeriksaan Kadar MDA pankreas

Bahan untuk pemeriksaan kadar MDA pankreas antara lain pBS, NaCl 0,9%, TCA 4%, HCl 1 N, dan Na-Thiobarbiturat 1%., aluminium foil, dan *microtube*.

4.5.1.7 Bahan untuk Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Bahan untuk pemeriksaan kadar glukosa darah tikus adalah *glucose test strip* dan jarum untuk mendapat sampel darah dari ekor.

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba antara lain kandang tikus berukuran 20 x 30 cm, tempat minum tikus, dan kawat kassa sebagai penutup.

4.5.2.2 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kemiri

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun kemiri antara lain oven, blender, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, *rotary evaporator*, *water bath*, botol hasil ekstraksi

4.5.2.3 Alat untuk Pemberian Ekstrak Daun Kemiri

Pemberian ekstrak daun kemiri kepada tikus DM menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde.

4.5.2.4 Alat untuk Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Alat untuk mengukur kadar glukosa darah tikus adalah *glucometer Accu Check Active* dari Roche.

4.5.2.5 Alat untuk Pembedahan

Alat yang dibutuhkan untuk pembedahan antara lain 2 gunting bedah, 2 pinset, 2 set jarum pentul, serta 2 sterofoam.

4.5.2.6 Alat untuk Pengukuran Kadar MDA pankreas

Alat yang digunakan untuk mengukur MDA pankreas adalah mortar, pipet, *microtube*, vortex, tabung ependorf, tissue, *water bath*, kuvet, dan spektrofotometer *double beam* 532 nm.

4.6 Definisi Operasional

a. Permodelan tikus model Diabetes tipe II

Pada penelitian ini, tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar diberikan diet tinggi lemak dan dipertahankan selama 28 hari. Setelah 28 hari, tikus yang akan dibuat model DM diinjeksi dengan streptozotosin dengan dosis 27,5 mg/kgBB secara intraperitoneal.

Pengecekan kadar glukosa darah dilakukan 3x24 jam setelah injeksi STZ. Tikus dinyatakan DM jika glukosa darah acak > 200 mg/dL atau glukosa darah puasa > 140 mg/dL. Tikus yang sudah dinyatakan DM dipertahankan selama 28 hari sebelum diberi perlakuan.

b. Pemberian ekstrak daun kemiri per oral

Ekstrak daun kemiri adalah hasil pembuatan ekstrak daun tua pohon kemiri yang didapatkan pada bulan Maret 2015 dari perkebunan kemiri Wonosalam, Jombang. Ekstrak ini dibuat secara perkolasi, yaitu dikeringkan, dihaluskan, dan diberi pelarut etanol 90%. Ekstrak ini berbentuk pasta, dan diberikan per oral menggunakan sonde lambung dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB/hari. Dosis ditentukan melalui eksplorasi dosis pada penelitian pendahuluan.

c. Kadar MDA pankreas tikus

Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) lalu diukur absorbansinya dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 532 \text{ nm}$) dan dicatat hasilnya. Satuan kadar hasil pengukurannya adalah ng/mL.

4.7 Prosedur Kerja Penelitian

4.7.1 Pengkondisian hewan coba

Tikus Wistar jantan dengan berat badan awal sekitar 150-170 gram ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 20 x 30 cm pada suhu ruang $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, serta dilengkapi dengan tempat minum, sekam, dan dan tutup yang terbuat dari anyaman kawat. Satu kandang berisi satu tikus untuk tikus kontrol positif dan perlakuan, sedangkan satu kandang untuk tikus kontrol negatif berisi maksimal 5 tikus. Diet normal terdiri dari 67% PAR-S, 33% terigu. Minum yang digunakan adalah air PDAM. Tikus ini diadaptasikan di laboratorium farmakologi selama 11 hari. Tikus diberi makanan sesuai dengan perlakuan sebanyak 40gr/hari dan minum satu botol dengan ukuran 65-70ml/tikus/hari.

4.7.2 Pembagian kelompok hewan coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, serta 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak daun kemiri dalam 3 dosis yang berbeda (100, 200, dan 400 mg/kgBB/hari per oral).

Kelompok 1 : Normal

Kelompok 2 : Kontrol DM

Kelompok 3 : DM + Ekstrak daun kemiri 100 mg/kgBB/hari

Kelompok 4 : DM + Ekstrak daun kemiri 200 mg/kgBB/hari

Kelompok 5 : DM + Ekstrak daun kemiri 400 mg/kgBB/hari

4.7.3 Prosedur permodelan tikus model DM tipe II

Menurut Kurniawan (2015), pembuatan tikus model DM yaitu dengan memberi diet tinggi lemak serta injeksi streptozotisin (STZ) intraperitoneal. Tikus diberi pakan diet tinggi lemak yang terdiri dari: asam kolat 0,06 gram, kuning telur

2 gram, minyak kambing 4 gram, minyak babi 3,22 gram, dan PAR-S terigu 30 gram. Diet tinggi lemak dipertahankan selama 28 hari. Setelah 28 hari, tikus yang akan dibuat model DM diinjeksi dengan streptozotisin dengan dosis 27,5 mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 intraperitoneal.

Pengecekan kadar glukosa darah dilakukan 3x24 jam setelah injeksi STZ. Tikus dinyatakan DM jika glukosa darah acak >200 mg/dL atau glukosa darah puasa >140 mg/dL. Tikus yang sudah dinyatakan DM dipertahankan selama 28 hari sebelum diberi perlakuan.

4.7.4 Proses ekstraksi daun kemiri

Proses ekstraksi daun kemiri diawali dengan pencucian daun segar dengan air mengalir lalu dikeringkan dalam suhu ruang (bukan di bawah sinar matahari) selama 3-7 hari. Sebelum diekstrak, daun dioven dahulu pada suhu 60°C hingga benar benar kering. Daun yang telah kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk. Kemudian, daun yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Daun direndam dengan etanol sampai volume 1000 mL dan dikocok hingga tercampur (kurang lebih 30 menit), lalu direndam selama 3 hari.

Hasil rendaman disaring dengan kertas *Whatman* dan dimasukkan pada labu evaporasi yang disambung ke *evaporator* untuk menguapkan etanol. Setelah itu hasil ekstraksi diletakkan dalam oven 60°C semalam untuk proses penguapan etanol lebih lanjut. Dilakukan pengecekan bahwa dalam ekstrak sudah tidak ada lagi etanol dengan menimbang berat ekstrak secara berkala. Apabila berat sudah tidak berubah, maka etanol telah menguap sempurna. *Crude extract* yang sudah diuapkan etanolnya, diletakkan di cawan putih, dan kemudian ekstrak disimpan dalam botol dan disimpan dalam freezer.

4.7.5 Pemberian ekstrak daun kemiri

Pemberian ekstrak daun kemiri diberikan secara per oral dengan menggunakan spuit dengan ujung sonde sehingga dapat dimasukkan langsung ke dalam lambung tikus. Pemberian ekstrak daun kemiri dilakukan selama 28 hari.

4.7.6 Pemeriksaan glukosa darah tikus

Alat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah tikus adalah *glucometer Accu Check Active* dari *Roche*. Untuk mendapat sampel darah dari ekor, tikus harus dipegang dengan handuk, lalu pada ujung ekor tikus diberi alkohol dan kemudian ditusuk jarum. Selanjutnya, ekor diurut ke arah distal sehingga darah keluar melalui ujung luka. Darah yang keluar ditempelkan pada stik yang ditempelkan pada alat ukur digital. Hasil kadar glukosa darah dapat langsung dibaca pada alat.

4.7.7 Pengambilan sampel

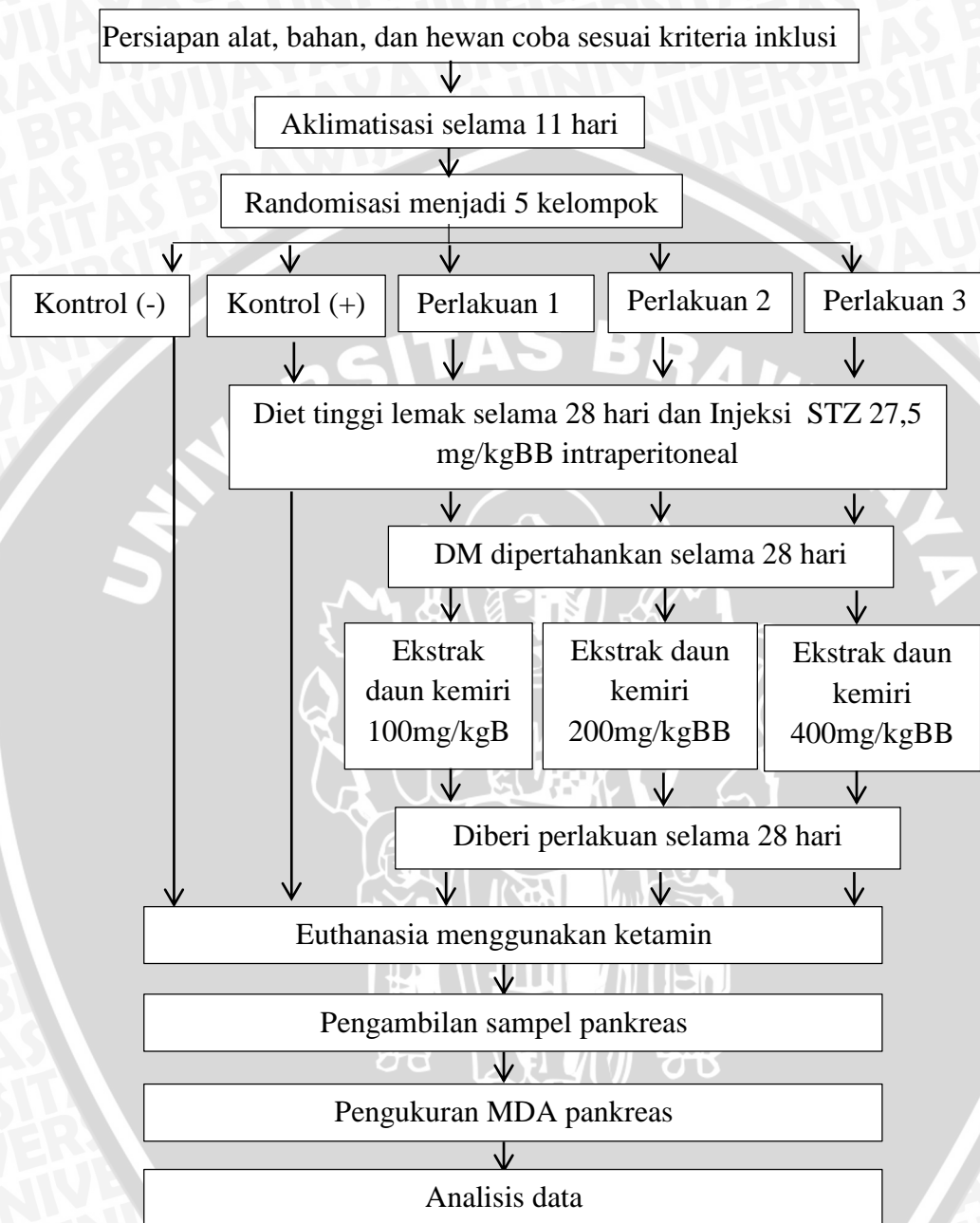
Pengambilan sampel dilakukan setelah pembedahan. Untuk proses pembedahan, tikus di euthanasia dengan injeksi ketamin dengan dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal. Setelah dilakukan pembedahan, sampel pankreas diambil kemudian dipisahkan dari fraksi lemaknya lalu dimasukkan di dalam tabung plastik terpisah dan disimpan didalam lemari pendingin. Pengukuran kadar MDA dilakukan metode *Thiobarbituric Acid (TBA)*, dengan penggerusan organ pankreas hingga halus setelah ditimbang sebesar 100mg dengan mortar dengan ditambahkan PBS. Lalu ditambahkan sedikit larutan NaCl 0,9%. Homogenat yang terbentuk disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Lalu diambil bagian teratasnya (supernatan) sebanyak 100 μ L dan dimasukkan ke dalam *microtube*. Kemudian ditambahkan 550 μ L aquades, 100 μ L TCA 4%, 200 μ L HCl 1N, serta 100 μ L Na-Thio dan dihomogenkan dengan vortex.

Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dengan *water bath* 105°C. Setelah sampel dingin, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit dan supernatan diambil untuk dipindah ke *microtube* baru, dan diukur absorbansinya dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 532 \text{ nm}$) dan dicatat hasilnya.

4.8 Rencana Analisis Data

Pertama, dilakukan uji distribusi yang akan dilakukan dengan metode Saphiro-Wilk dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Selanjutnya, analisis statistik dilakukan dengan metode *one way ANOVA* untuk menguji perbedaan rata-rata lebih dari 2 kelompok. Analisis selanjutnya yang dilakukan adalah Uji *Post hoc Tukey* untuk membandingkan perbedaan rerata setiap kelompok. Lalu, dilanjutkan dengan uji korelasi menggunakan metode *Pearson Correlation*. Hasil penelitian ini dianalisa secara statistik menggunakan software *SPSS* versi 20.

4.9 Skema Kerja Penelitian



Gambar 4.9 Skema Kerja Penelitian