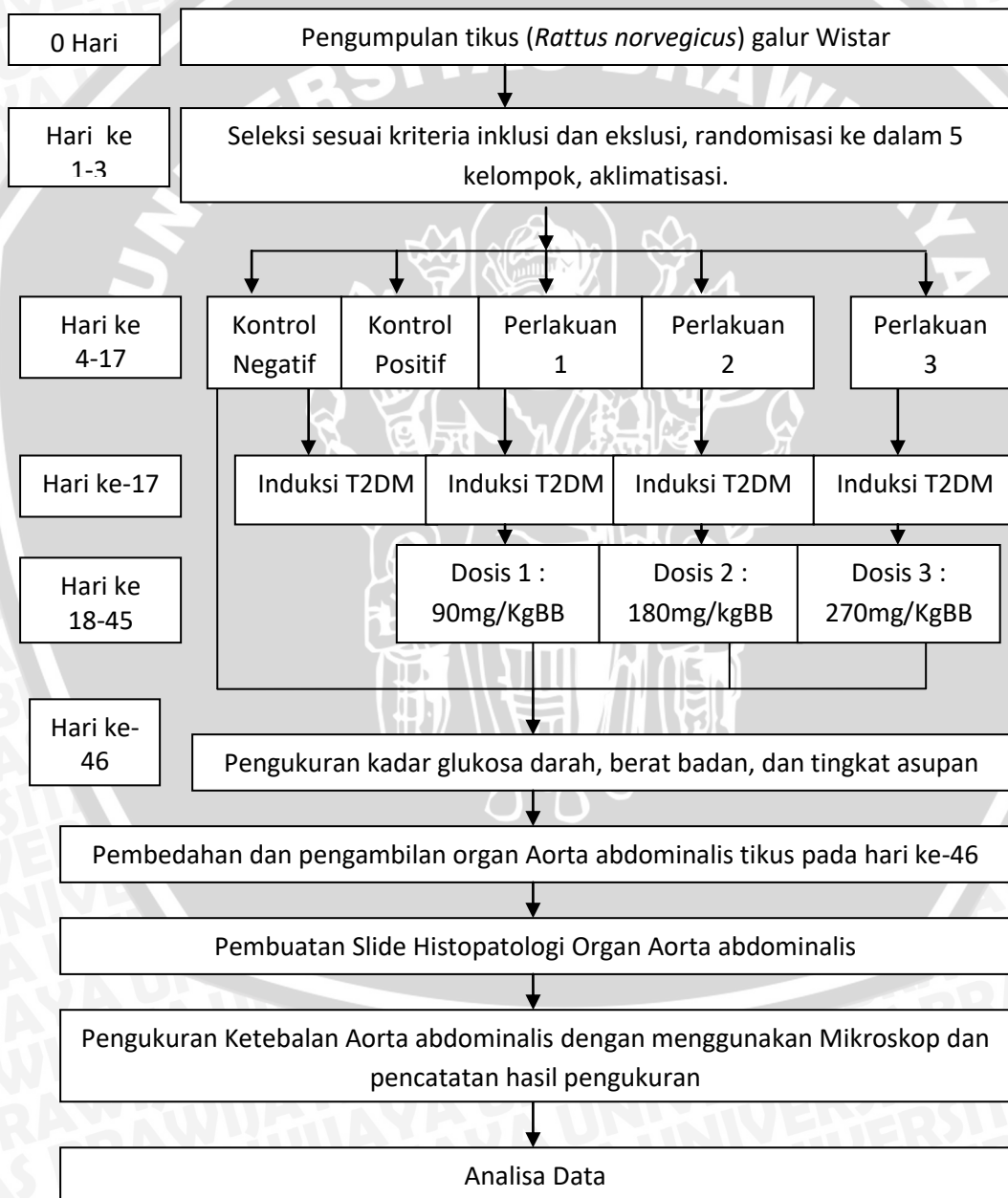


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*true Experimental design*) secara *in vivo* di laboratorium menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

#### Keterangan Pembagian Kelompok pada Tikus

1. Kontrol negatif (n=5) : Tikus sehat tanpa diberikan perlakuan apapun
2. Kontrol positif (n=5) : Tikus di induksi menjadi Diabetes melitus tipe 2 tanpa pemberian ekstrak *Tobacco nicotinia*
3. Perlakuan I/P1 (n=5) : Tikus di induksi menjadi Diabetes melitus tipe 2 dan diberikan *Tobacco nicotinia* dengan dosis 90 mg/kgBB
4. Perlakuan II/P2 (n=5) : Tikus di induksi menjadi Diabetes melitus tipe 2 dan *Tobacco nicotinia* dengan dosis 180 mg/kgBB
5. Perlakuan III/P3 (n=5) : Tikus di induksi menjadi Diabetes melitus tipe 2 dan diberikan *Tobacco nicotinia* dengan dosis 270 mg/kgBB

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Target

Populasi penelitian adalah tikus Wistar jantan dengan jenis *Rattus norvegicus*. Tikus dalam penelitian ini berusia 18-20 minggu.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

###### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur wistar berjenis kelamin jantan.
2. Usia 18-20 minggu, yang kemudian diaklimatisasi/diadaptasi selama satu minggu.
3. Kondisi tikus aktif, sehat, tidak ada kelainan anatomi kaki dan luka pada tikus.

###### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang mati dalam pemeliharaan penelitian
2. Tikus yang tidak mau makan, tidak mau minum
3. Tikus yang tampak sakit dan tidak aktif
4. Tikus yang keluar dan hidup di luar kandang pemeliharaan

5. Terdapat luka atau tanda radang pada tubuh tikus.

#### 4.2.3 Besar Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan teknik *random sampling*. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

$$(t-1)(r-1) \geq 15;$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(5-1)(r-1) \geq 15;$$

$$r-1 \geq 15:4;$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dari hasil perhitungan tersebut, dibutuhkan sampel sebanyak 5 ekor tikus pada setiap kelompok perlakuan. Sehingga keseluruhan jumlah tikus yang diperlukan untuk penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor.

#### 4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan menggunakan teknik *random sampling* pada tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi penelitian. Masing masing tikus diberi nomor identitas. Lalu nomor-nomor tersebut ditulis ulang di kertas kertas. Kemudian kertas dikocok dan lima kertas yang dijatuhkan dicocokkan dengan nomor tikus untuk menentukan pembagian perlakuan pada sampel per kelompok. Pengacakan ini juga dilakukan dalam pemilihan enam sampel hewan coba pada penelitian pendahuluan.



### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis nikotin yang diberikan per oral ke tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang di induksi menjadi Diabetes Melitus Tip II dengan injeksi STZ intraperitoneal serta diet tinggi kolesterol.

#### 4.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Histopatologi Anatomi Pembuluh Aorta abdominalis (melihat tingkat ketebalan pada dinding pembuluh darah Aorta abdominalis).

### 4.4 Lokasi dan waktu Penelitian

#### 4.4.1 Lokasi Penelitian

- Perawatan dan pemeliharaan hewan coba dilakukan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Proses Ekstraksi Nikotin dari Tumbuhan *Tobacco nicotinia* dan pengenceran Streptozotocin dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Proses pembuatan preparat histopatologi Organ Aorta abdominalis dengan pewarnaan *Hematoksillin Eosin* (HE) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Proses pengukuran ketebalan aorta pada slide preparata Histopatologi organ Aorta abdominalis menggunakan mikroskop cahaya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, dari bulan Maret hingga Juni tahun 2016.

#### 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

1. Perawatan Tikus

Kandang hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, dan pakan.

2. Induksi Diabetes melitus tipe 2

Streptozotocin (STZ), Nikotinamide, spuit 3cc, normal salin, alkohol 70%

3. Ekstrak nikotin dari tanaman tembakau.

4. Pemeriksaan gula darah: Spuit 3cc, glucometer, kapas alcohol, vacutainer

5. Pembedahan Tikus: Gunting bedah, steroform, pinset, kapas, jarum pentul, kloroform, spuit insulin 1 ml, formalin 10%, wadah plastik dan tutup 25 buah, alkohol, vacutainer 25 buah.

6. Pewarnaan slide preparat pembuluh darah Aorta abdominalis dengan Hematoxylin Eosin.

#### 4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Nicotin berasal dari spesies *Tobacco nicotiana*, diperoleh dari Kabupaten Bondowoso, Provinsi Jawa Timur.

2. Hewan coba yang digunakan adalah model tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan karena galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia.

3. Metode Ekstraksi Metanol adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya, dengan bantuan pelarut methanol dengan metode maserasi.

4. Glukosa darah adalah hasil metabolisme karbihohidrat di dalam tubuh. Adapun satupun yang digunakan dalam penelitian ini adalah mg/dL.
5. Glukosa darah puasa adalah hasil pemeriksaan glukosa darah sampel setelah tikus dilakukan puasa 6 jam sebelum pemeriksaan. Pemeriksaan dilakukan dengan cara mengambil darah dari ekor lalu sampel ditetaskan pada strip glukometer. Alat yang digunakan adalah *Blood Glucose Test Meter GlucoDr<sup>TM</sup>* model AGM-2100.
6. Kadar normal Glukosa darah puasa pada tikus hampir sama seperti manusia dan mamalia lainnya, yaitu antara 50-109 mg/dL. Tikus dikatakan Diabetes melitus apabila kadar glukosa darah puasa tikus permanen diatas 109 mg/dL.

#### **4.7 Prosedur Penilitia/Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Pembuatan diet standart dan diet hiperkolesterol (aterogenik)**

1. Pakan standar yang terdiri dari pakan ayam/PARS 30 gram, air 20 cc, tepung terigu 30 gram.
2. Diet aterogenik yang terdiri dari pakan standart ( PARS 30 gram dan tepung terigu 30 gram) yang ditambahkan kuning telur bebek (2 gram ), asam kolat (0,06 gram ), minyak babi 3,22 gram (3,75 cc ), minyak kambing 4 gram (4 cc), minyak kelapa 0,4 gram (0,4 cc) , air (25cc).

##### **4.7.2 Pembuatan larutan Streptozotocin**

1. Melarutkan STZ 30mg/kgBB dengan normal salin 20 ml
2. Mengecek pH larutan (ph diharapkan antara 3,5-4)
3. Apabila pH belum sampai angka tersebut ditambahkan asam sitrat 0,01 M
4. Larutan STZ siap disuntikkan.



#### 4.7.3 Prosedur Pembuatan Tikus Diabetes Melitus Tipe 2

Tikus wistar dipilih berdasarkan kriteria inklusi sebanyak 25 ekor umur 2 bulan (150-200 gr). Kemudian dikondisikan di kandang tempat pemeliharaannya selama 1 minggu dengan diberikan diet *chow standart* pada kelompok kontrol negatif, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan pakan kaya lemak dengan komposisi pakan (80%), lemak babi (15%) dan kuning telur bebek (5%). Jumlah konsumsi makanan harian maksimum sebanyak 25 gr/tikus/hari. Pemberian diet tinggi lemak dilakukan selama 45 hari. Kemudian tikus dipuasakan selama 16 jam lalu diinjeksi nicotinamide 45mg/KgBB. 15 menit kemudian diinjeksi dengan STZ *low dose* 30 mg/kgBB intraperitoneal dan (Lab Farmakologi FKUB). Setelah 3 hari pasca induksi STZ dilakukan pemeriksaan gula darah setelah dipuasakan selama 6 jam. Bila kadar gula darah mencapai >250 mg/dl menggunakan glukometer dikategorikan hiperglikemia.

#### 4.7.4 Ekstraksi Nikotin dari Tanaman Tembakau

Tembakau yang segar dipotong tipis-tipis dan digiling. 120 gr bahan baku dilarutkan dengan aquades dalam labu leher tiga. Setelah itu dinginkan dan maserasi dengan metanol selama satu hari. Saring bahan baku yang telah dimaserasi menggunakan kertas saring *whatman*. Ambil filtrat kemudian masukkan ke beaker glass. Filtrat diuapkan (dipanaskan) diatas *magnetic stirrer* dengan kecepatan *agitator* sedang hingga tercapai  $\frac{3}{4}$  volume mula-mula. Ekstrak metanol yang didapatkan dari penguapan filtrat dicampur dengan aquadest dan *n-hexane* didalam corong pemisah dengan perbandingan 2:1:2. Kocok ketiga campuran tersebut selama 10 menit hingga terbentuk dua lapisan tidak saling larut (*immiscible*) yaitu lapisan *n-hexane* dan lapisan campuran metanol air. Ekstrak metanol diasamkan dengan asam sitrat 0,2 N sampai pH yang

ditentukan. Ekstrak metanol yang telah diasamkan ditambahkan tawas dengan volume yang sama dengan ekstrak metanol. Ekstrak metanol yang telah ditambahkan akan membentuk garam alkaloid. Garam alkaloid yang terbentuk kemudian dibasakan dengan  $\text{NaHCO}_3$  hingga pH yang ditentukan, sehingga didapatkan ekstrak alkaloid yang kemudian disaring dengan pompa *vacuum* untuk mendapatkan kristal nikotin.

#### 4.7.5 Pemberian Ekstrak Nikotin

Nikotin berasal dari daun dan batang *Tobacco nicotiana* dari Bondowoso, Jawa Timur. Ekstraksi Nikotin diberikan secara oral melalui mulut dengan sonde.

#### 4.7.6 Pengukuran kadar glukosa darah tikus

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan dengan *Accu check<sup>(R)</sup> Blood Glucose Check* menggunakan darah dari vena ekor tikus (sebelum pembedahan) dan jantung tikus (pasca pembedahan). Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan saat

- Sebelum induksi dengan *Streptozotocin*
- Tiga hari setelah induksi dengan *Streptozotocin*, untuk menentukan status diabetes mellitus pada tikus.
- Setiap 7 hari setelah tikus dinyatakan diabetes mellitus.
- Dan pasca pembedahan tikus.

Pengambilan darah pada tikus dilakukan sebelum pemberian makanan pada tikus.



#### 4.7.7 Pengukuran tingkat asupan makan dan berat badan tikus

Pengukuran asupan makan dilakukan dengan cara mengukur berat pakan yang diberikan kepada tikus dan berat pakan yang tersisa. Pengukuran asupan makan dilakukan setiap hari sampai pembedahan tikus dilakukan.

Tingkat asupan makan = (Berat pakan yang diberikan – Berat pakan yang tersisa)

Pengukuran berat badan tikus dilakukan saat sebelum induksi dengan *Streptozotocin*, 3 hari setelah induksi dengan *Streptozotocin* dan setiap 7 Hari setelah tikus dinyatakan diabetes mellitus. Pengukuran berat badan tikus dilakukan sebelum pemberian makanan pada tikus.

#### 4.7.8 Pembedahan Tikus

Tikus diberi anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Taruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil aortanya dan fiksasi ke dalam formalin 10%.

#### 4.7.9 Prosedur Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu dengan penguburan.

#### 4.7.10 Prosedur Pembuatan Preparat

a. Memproses bahan/jaringan

1. Dehidrasi dengan tujuan untuk menarik air secara bertahap.

Dilakukan dalam 4 tabung. Tabung pertama berisi formalin 10%

direndam selama 5-8 jam, tabung kedua sampai keempat berisi aceton-1 – aceton-3 direndam selama 0.5 jam.

2. *Clearing* (penjernihan) dengan tujuan untuk mentransparankan serta mengganti alkohol dari jaringan dengan menggunakan Xylol dalam tiga buah tabung dengan masing-masing perendaman selama 0.5 jam.
3. Impregnasi yang bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan dengan menggunakan paraffin cair (58-60°C) dalam dua tabung dengan durasi pertama selama 0.5 jam, dan kedua selama 1 jam.
4. *Embedding* (pengeblokan) yang bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan mikrotom dengan cara:
  1. Alat cetak disusun di atas alas yang permukaannya halus dan rata, misal kaca yang diolesi dengan gliserin.
  2. Siapkan paraffin cair dengan suhu optimum (cukup cair) tetapi tidak mengembangkan alat cetak blok (logam).
  3. Tuangkan paraffin cair ke dalam alat cetak hingga penuh.
  4. Bila paraffin pada alat pencetak sudah cukup keras, alat cetak dilepas dan dilakukan pemotongan blok dengan silet pada ukuran tertentu.

b. Pemotongan blok paraffin dengan mikrotome

1. Blok ditempatkan pada alat pemegang blok dengan bantuan lempengan besi tipis yang telah dipanaskan
2. Dinginkan pada suhu kamar sampai melekat erat.

3. Persiapkan Rotary Mikrotome, ketajaman pisau dan sudut kemiringan.
  4. Persiapkan Water Bath, kebersihan dan temperatur air (di bawah titik leleh paraffin).
  5. Persiapkan obyek glass, perekat (telur dengan gliserin), label.
  6. Blok yang sudah menempel pada alat pemegang blok dipasang pada mikrotom dan atur ketebalan sayatan.
  7. Lakukan penyayatan blok, lalu angkat sayatan dan masukkan ke dalam water bath agar sayatan mengembang dengan baik.
  8. Pilih sayatan terbaik dan angkat dengan obyek glass sesuai label, lalu keringkan pada suhu kamar.
- c. Deparafinisasi
1. Masukkan sayatan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 1 jam.
  2. Masukkan ke dalam Xylol sebanyak tiga kali, masing-masing 5 menit.

#### **4.7.11 Pewarnaan slide preparat pembuluh darah Aorta abdominalis tikus dengan hematoxylin eosin**

Pewarnaan *slide* preparat pembuluh darah Aorta abdominalis tikus dilakukan dengan metode paraffin. Hasil prepaat diamati dengan mikroskop.

#### **4.7.12 Pengukuran Ketebalan Aorta abdominalis menggunakan Mikroskop**

1. Slide preparat organ Aorta abdominalis yang telah selesai dibuat dengan menggunakan metode paraffin dan di cat HE, diamati dan dilakukan *Scan* slide preparat dengan menggunakan Mikroskop *Olympus Digital*



Camera. Pengukuran Ketebalan Aorta abdominalis dilakukan pada hasil scan penampang melintang slide preparat organ Aorta abdominalis dengan menggunakan *Olympus Digital Camera*.

2. Pengukuran ketebalan Aorta abdominalis dilakukan dengan cara mengukur ketebalan penampang lintang aorta, dari tunika intima sampai tunika adventitia pada 8 zona (jam 12.00, 13.30, 15.00, 16.30, 18.00, 19.30, 21.00, dan 22.30) secara membujur. (Tjarta & M.Kanoko, 1997).
3. Menghitung rata-rata ketebalan dinding penampang lintang Aorta abdominalis, dari tunika adventitia pada ke-8 zona tersebut.

#### 4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran morfologi pembuluh darah kontrol dari perlakuan dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 17.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) Langkah langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut: Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji One-way ANOVA, Post hoc test (uji Least Significant Difference) dan Uji korelasi Pearson.