

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 – Juni 2014 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Teknologi Reproduksi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Klinik Kawi 31 untuk pengukuran kadar Trigliserida serta pembuatan preparat di Laboratorium Patologi Klinik RS Dr. Soetomo Surabaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, kandang hewan coba, botol minum tikus, alat sonde, gunting bedah, pinset, timbangan digital, blender, spuit 1 ml, 5 ml, alat sentrifugasi, mikrotube, tabung reaksi, *GlucoDr<sup>TM</sup> Blood Glucose Test Meter*, oven, erlenmeyer, penangas air, mikroskop cahaya, mikropipet 10-100  $\mu\text{L}$  dan 100-1000  $\mu\text{L}$ , *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, *object glass*, lemari pendingin, inkubator, plastik klip, toples, tisu, pot salep, mortar, mikrotom, cawan petri, rak tabung reaksi dan Spektrofotometer Microlab 300 analyzer.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, kunyit (*Curcuma longa L.*), streptozotocin dari *nacalai tesque*, alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 100%, NaCl fisiologis, Paraformaldehid (PFA) 4%, PBS pH 7,4, paraffin, xylol, akuades steril, Hematoxylen, Eosin, entellan, dan reagen Trigliserida FS yang berisi *Good's puffer pH 7,2*, *4-Chlorphenol*, *ATP*,  $Mg^{2+}$  *Glycerokinase (GK)*, *Peroksidase (POD)*, *Lipoproteinlipase (LPL)*, *4-Aminoantipyrin*, serta *Glycerin-3-phosphatoxidase (GPO)*.

#### 4.3 Tahapan Penelitian

Skema kerja pada penelitian ini dapat dilihat pada **lampiran 1** dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan ekstrak ethanol kunyit
3. Pembuatan hewan model diabetes mellitus tipe 1 dengan streptozotocin
4. Pemberian terapi ekstrak ethanol kunyit
5. Isolasi serum darah
6. Isolasi pembuluh darah aorta
7. Pengukuran kadar trigliserida
8. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi pembuluh darah aorta
9. Analisis data

## 4.4 Prosedur Kerja

### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok (A) tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan, kelompok (B) tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus diabetes mellitus 1 tanpa diberi terapi ekstrak ethanol kunyit, kelompok (C) tikus diabetes mellitus 1 dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dengan dosis 1,2 g/kg BB, kelompok (D) tikus diabetes mellitus 1 dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dengan dosis 1,8 g/kg BB, kelompok (E) tikus diabetes mellitus 1 dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dengan dosis 2,7 g/kg BB.

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Streptozotocin dan ekstrak ethanol kunyit

Variabel tergantung : Kadar Trigliserida dan histopatologi aorta

Variabel kendali : Berat badan tikus, umur tikus, dan jenis kelamin tikus, suhu, pakan.

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa pakan ayam buras dewasa dari Wonokoyo Jaya Corpindo dan minum *ad libitum* pada semua tikus. Hewan coba dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang diberi penutup kawat, dengan ukuran kandang 30x50x10 cm dan diberi alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Komposisi pakan ayam buras dewasa dari Wonokoyo Jaya Corpindo yaitu jagung, pollar, katul, DDGS, rapeseed, copra meal, biji batu, CPO, vitamin dan mineral, yang mengandung air maksimal 12 %, protein kasar 12-14 %, lemak kasar minimal 4 %, serat

kasar maksimal 6 %, abu maksimal 7,5 %, kalsium 0,9-1,2 %, dan phosphor 0,6-08 %.

#### 4.4.2 Pembuatan Ekstrak Ethanol Kunyit

Ekstrak ethanol kunyit ini dibuat menggunakan metode maserasi, langkah – langkahnya pertama dimulai dengan membersihkan kunyit dengan air setelah bersih kunyit dipotong tipis – tipis dan dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C hingga kunyit kering. Langkah selanjutnya yaitu dengan proses ekstraksi, kunyit yang telah kering dihaluskan dengan cara di blender sampai halus, kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Selanjutnya kunyit yang kering tersebut ditambah dengan ethanol 96% sampai menjadi 1 liter kemudian dikocok hingga tercampur. Rendaman kunyit dan ethanol didiamkan selama 24 jam sampai mengendap, kemudian diambil lapisan atas campuran ethanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Selanjutnya larutan campuran ethanol dan zat aktif kunyit tersebut kemudian dievaporasi menggunakan penangas air pada suhu 80°C sampai ekstrak menjadi kental dan kenyal kemudian ditimbang berat ekstraknya dan di evaporasi kembali dengan menggunakan oven yang bertujuan untuk menghilangkan ethanol yang tersisa. Evaporasi dengan menggunakan oven tersebut dengan suhu 70°C, setiap 15 menit ekstrak ditimbang hingga sebanyak tiga kali penimbangan ekstrak dengan berat yang sama. Ekstrak ethanol kunyit

yang telah dievaporasi kemudian diencerkan dengan aquades dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  yang bertujuan untuk memudahkan untuk disonde pada tikus.

#### 4.4.3 Pembuatan Hewan Model DM 1 dengan Streptozotocin

Tikus putih jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan yang berjumlah 20 ekor diadaptasikan selama tujuh hari terhadap lingkungan laboratorium. Kemudian setelah tujuh hari adaptasi dilakukan injeksi streptozotocin pada 16 ekor tikus, serta sisanya empat tikus tidak diinjeksi karena digunakan untuk kontrol negatif. Pemberian injeksi streptozotocin dengan dosis 20 mg/kg BB selama lima hari berturut – turut, injeksi dilakukan dengan intraperitoneal (IP), kemudian diinkubasi selama 14 hari (Aulanni'am *et al.*, 2005). Selama pengondisian proses diabetes mellitus pada hewan coba, dilakukan pengamatan gula darah dengan menggunakan glukometer pada 7 hari pertama untuk memastikan tikus telah mengalami kenaikan kadar gula darah.

Pada penelitian ini rata-rata kadar gula darah tikus sebelum dilakukan induksi streptozotocin yaitu 90-135 mg/dl kemudian rata-rata kadar gula tikus setelah di induksi streptozotocin meningkat menjadi 400-600 mg/dl. Kejadian diabetes mellitus pada tikus (*Rattus norvegicus*) ditandai dengan kadar gula darah yaitu > 300 mg/dl (Hussain, 2002). Batas kadar gula darah tikus normal adalah 60-150 mg/dl (Butler, 1995).

#### 4.4.4 Pemberian Terapi Ekstrak Ethanol Kunyit

Terapi dimulai 14 hari setelah pemberian injeksi streptozotocin yang terakhir. Terapi ekstrak ethanol kunyit (*Curcuma Longa L.*) diberikan pada kelompok C, kelompok D, dan kelompok E. Pemberian terapi dilakukan secara per oral dengan melalui sonde lambung selama 42 hari. Pemberian terapi rutin dilakukan satu kali per hari. Perhitungan dosis dapat dilihat pada **lampiran 6**.

**Tabel 4.1** Pemberian perlakuan

No.	Kelompok	Perlakuan
1.	Kel. A	Kontrol Negatif
2.	Kel. B	Kontrol Positif (Tikus DM 1)
3.	Kel. C	Tikus DM 1+Terapi Ekstrak Ethanol Kunyit Dosis 1,2 g/kg BB
4.	Kel. D	Tikus DM 1+Terapi Ekstrak Ethanol Kunyit Dosis 1,8 g/kg BB
5.	Kel. E	Tikus DM 1+Terapi Ekstrak Ethanol Kunyit Dosis 2,7 g/kg BB

#### 4.4.5 Isolasi Serum Darah

Pengambilan serum darah dilakukan pada hewan coba tikus kelompok A, B, C, D, dan E. Langkah pertama yaitu dilakukan dislokasi pada hewan coba pada bagian leher tikus. Setelah tikus mati darahnya diambil melalui jantung dengan menggunakan spuit 5 ml kemudian darah dipindahkan dari spuit ke tabung reaksi, diletakkan dalam keadaan miring dan didiamkan  $\pm$  4 jam. Selanjutnya serum yang keluar diambil dengan mikropipet dan dipindahkan ke mikrotube

kemudian sisa pada tabung reaksi dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

#### 4.4.6 Isolasi Pembuluh Darah Aorta

Pengambilan pembuluh darah aorta dilakukan pada hewan coba tikus kelompok A, B, C, D, dan E. Langkah pertama yaitu dilakukan dislokasi hewan coba pada bagian leher tikus. Setelah mati tikus dibedah mulai dari linea alba sampai menemukan pembuluh darah aorta kemudian diambil dan diletakkan pada cawan petri yang berisi NaCl fisiologis 0,9 % dan dibersihkan. Selanjutnya aorta disimpan dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4% untuk pembuatan preparat histologi.

#### 4.4.7 Pengukuran Kadar Trigliserida

Pemeriksaan kadar trigliserida menggunakan uji spektrofotometri dengan menggunakan alat microlab 300 analyzer otomatis. Cara kerja alat ini yaitu dengan metode *end point*. Standard operasional prosedur alatnya dapat dilihat pada **lampiran 5**.

Prosedur untuk pemeriksaan trigliserida serum dengan uji spektrofotometri yaitu :

1. Siapkan alat dan bahan pengukuran.
2. Masukkan 10  $\mu\text{L}$  sampel serum ditambah reagen trigliserida 500  $\mu\text{L}$  pada tabung reaksi, lalu goyang-goyangkan agar tercampur.
3. Diamkan selama 10 menit
4. Baca masing – masing sampel pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 546 nm dengan cara meletakkan masing – masing sampel

campuran serum dan reagen trigliserida tersebut pada ujung selang aplikator, tunggu alat hingga memproses.

5. Hasil yang dikerjakan dapat langsung ditampilkan.

#### **4.4.8 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Pembuluh Darah Aorta**

##### **4.4.8.1 Fiksasi**

Jaringan pembuluh darah aorta dimasukkan ke dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4% untuk proses fiksasi. Proses fiksasi ini bertujuan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan.

##### **4.4.8.2 Dehidrasi**

Dehidrasi merupakan proses untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan yang telah difiksasi dengan menggunakan ethanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% sampai dengan konsentrasi absolut.

##### **4.4.8.3 Penjernihan (*Clearing*)**

Proses penjernihan merupakan proses yang bertujuan untuk menggantikan tempat ethanol dalam jaringan dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Larutan yang digunakan adalah xylol. Jaringan dipindahkan dari ethanol absolut ke larutan penjernih (xylol). Penjernihan dilakukan dalam xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

#### 4.4.8.4 *Embedding*

Proses *embedding* merupakan proses yang bertujuan untuk mengeluarkan *clearing agent* dari jaringan kemudian diganti dengan paraffin. *Embedding* ini dilakukan dengan cara jaringan aorta dimasukkan ke dalam paraffin cair yang telah disiapkan didalam suatu wadah dan dibiarkan hingga memadat.

#### 4.4.8.5 *Pemotongan (Sectioning) dan Penempelan pada Gelas Objek*

Proses pemotongan dimulai dengan memotong jaringan aorta dengan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom setebal 4 mikron, secara melintang. Kemudian irisan diletakkan pada poly-1-lysin slide. Selanjutnya potongan yang terpilih dikeringkan dengan cara diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C hingga kering. Setelah itu preparat disimpan di dalam inkubator pada temperatur 38-40°C dan preparat siap diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin.

#### 4.4.8.6 *Pewarnaan Hematoksilin-Eosin*

Pewarnaan Hematoksilin – Eosin dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin bertujuan untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, berfungsi untuk memulas sitoplasma sel serta jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Langkah pertama yaitu dengan memasukan preparat pada larutan xylol I, II, dan III selama

masing-masing 5 menit, kemudian dimasukan pada ethanol bertingkat dimulai dari ethanol absolut, 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Kemudian sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit serta dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit.

Selanjutnya sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, sediaan dimasukan pada ethanol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan ethanol 100% I, II dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup (Dewi, 2011).

#### **4.4.8.7 Pengamatan Histopatologi Pembuluh Darah Aorta**

Pengamatan histopatologi pembuluh darah aorta yaitu dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Gambar histopatologi diambil dengan menggunakan kamera setelah diperoleh gambar preparat yang diinginkan. Pengamatan histopatologi yang diamati yaitu

perubahan jaringan aorta berupa adanya infiltrasi lemak di tunika adventisia.

#### 4.4.9 Analisa Data

Pada percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan hewan model yang dikelompokkan menjadi lima perlakuan dan masing masing perlakuan dengan empat ulangan. Analisa data histopatologi dilakukan secara kualitatif deksriptif sedangkan untuk kadar trigliserida dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan ANOVA dan apabila terdapat perbedaan perlakuan nyata, maka perbedaan nilai tengah diuji dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ)  $\alpha = 0.05\%$ .

