

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2013 – Maret 2014 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Teknologi Reproduksi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Klinik Kawi 31 untuk pengukuran kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan pembuatan preparat di RS Dr. Soetomo Surabaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat Penelitian

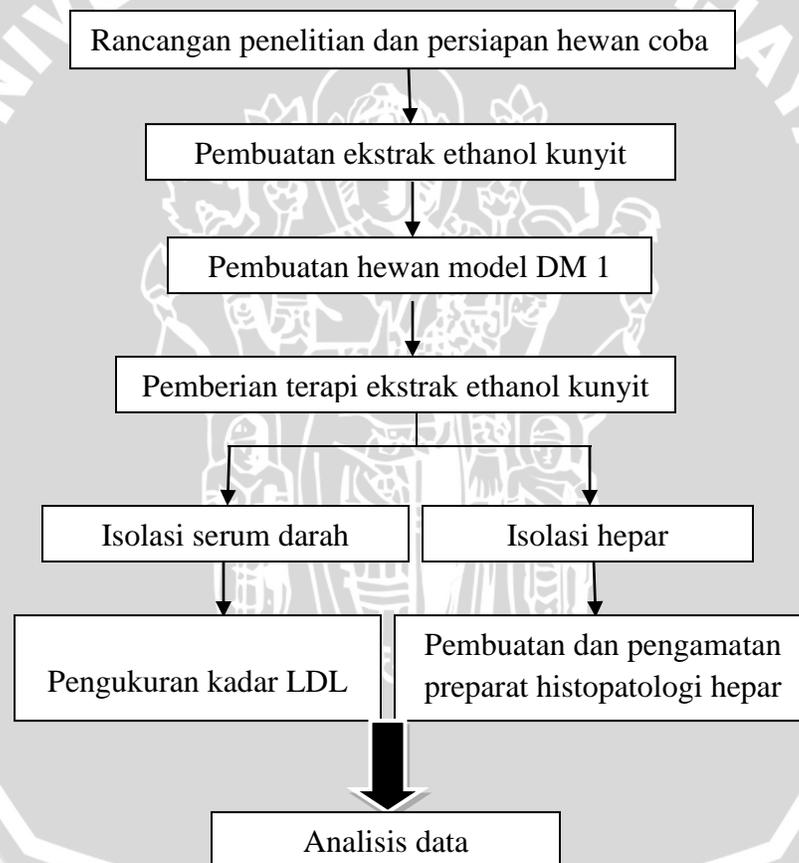
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, alat sonde, timbangan digital, mikrotube, spuit 5 ml, *Glucodr<sup>TM</sup> Blood Glucose Test Meter*, blender, oven, erlenmeyer, penangas air, *scalpel*, gunting bedah, mikroskop, mikropipet 10-100  $\mu$ L dan 100-1000  $\mu$ L, *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, *object glass*, lemari pendingin, mikrotom, cawan petri dan spektrofotometer.

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini, antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan 150 - 200 gram, kunyit (*Curcuma Longa L*), streptozotocin (STZ),

alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut, NaCl fisiologis, Paraformaldehid (PFA) 4%, PBS pH 7,4, cover glass, object glass, paraffin, xylol (I dan II), akuades, Hematoxylen, Eosin, entellan, Reagen 1 dan Reagen II.

#### 4.3 Tahapan Penelitian



**Gambar 4.1** Tahapan Penelitian

## 4.4 Prosedur Kerja

### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Hewan model dibagi menjadi lima kelompok, yaitu : kelompok (A) adalah kelompok kontrol negatif, kelompok (B) adalah kelompok positif diabetes mellitus 1, kelompok (C) adalah kelompok yang diterapi ekstrak ethanol kunyit (1,2 g/kg BB), kelompok (D) adalah kelompok diabetes mellitus yang diterapi ekstrak ethanol kunyit (1,8 g/kg BB) kelompok (E) adalah kelompok diabetes mellitus yang diterapi ekstrak ethanol kunyit (2,7 g/kg BB).

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain

Variabel bebas : Dosis ekstrak ethanol kunyit dan streptozotocin

Variabel tergantung : Kadar LDL dan histopatologi hepar

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

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2010):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = jumlah kelompok (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan jumlah ulangan di atas, maka perlakuan sebanyak 5 macam paling sedikit membutuhkan empat kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus rata-rata sekitar 150 – 200 gram. Hewan coba tersebut diadaptasikan selama 1 minggu dan diberi pakan berupa pakan ayam buras dewasa dari Wonokoyo Jaya Corpindo dan minum *ad libitum* pada semua tikus. Hewan coba dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bak plastik yang diberi penutup kawat, dengan ukuran kandang sekitar 30x50x10 cm dengan alas berupa sekam padi yang bertujuan agar kandang tidak terlalu lembab.

#### **4.4.2 Pembuatan Ekstrak Ethanol Kunyit (Gennaro, 2002)**

Pembuatan ekstrak ethanol kunyit ini menggunakan metode maserasi, tahap-tahap pembuatannya dimulai dengan mencuci kunyit sampai bersih dan dipotong tipis – tipis, kemudian dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C hingga kunyit kering. Tahap selanjutnya yaitu proses ekstraksi, kunyit yang kering dihaluskan dengan cara diblender sampai benar – benar halus, lalu ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Kunyit kering tersebut ditambahkan dengan ethanol 96% sampai menjadi 1 liter dan dikocok hingga benar – benar homogen. Rendaman kunyit dan ethanol didiamkan selama satu hari hingga ada endapan, kemudian diambil lapisan atas campuran ethanol (pelarut)

dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Larutan campuran ethanol dan zat aktif kunyit tersebut kemudian dievaporasi menggunakan penangas air dengan suhu 80°C hingga ekstrak menjadi kental (*gel*) dan ditimbang berat ekstraknya, kemudian dievaporasi kembali menggunakan oven untuk menghilangkan ethanol yang masih tersisa. Evaporasi dengan oven suhu 70°C, setiap 15 menit ekstrak ditimbang hingga sebanyak tiga kali penimbangan berat ekstrak sama. Ekstrak ethanol kunyit yang telah dievaporasi diencerkan dengan akuades dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> agar mudah untuk disondekan.

#### 4.4.3 Pembuatan Hewan Model DM 1

Tikus Wistar jantan berjumlah 20 ekor dengan umur 8 minggu diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu. Seminggu pasca adaptasi, dilakukan pengukuran kadar gula darah dengan menggunakan *glucometer* pada semua kelompok perlakuan. Induksi streptozotocin (STZ) pada 16 ekor tikus, empat tikus lainnya tidak dilakukan induksi STZ karena sebagai kontrol negatif. Induksi streptozotocin secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama lima hari berturut – turut, kemudian diinkubasi selama 14 hari (Aulanni'am *et al.*, 2005).

#### 4.4.4 Penentuan dan Pemberian Terapi Ekstak Ethanol Kunyit

Terapi mulai diberikan 14 hari setelah pemberian induksi streptozotocin (STZ) yang terakhir. Terapi ekstrak ethanol kunyit (*Curcuma*

*Longa L*) diberikan pada kelompok C, kelompok D, dan kelompok E. Pemberian terapi dilakukan secara per oral melalui sonde lambung selama 42 hari dengan konsentrasi ekstrak etanol kunyit. Pemberian terapi harus rutin dilakukan satu kali per hari sebelum hewan coba diberi pakan.

**Tabel 4.1** Pemberian perlakuan

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kel. A	Kontrol Negatif
2	Kel. B	Tikus DM 1
3	Kel. C	Tikus DM 1+Terapi Kunyit Dosis 1 (1,2 g/kg BB)
4	Kel. D	Tikus DM 1+Terapi Kunyit Dosis 2 (1,8 g/kg BB)
5	Kel. E	Tikus DM 1+Terapi Kunyit Dosis 3 (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 pada hari ke-42. Langkah pertama yaitu dilakukan dislokasi pada hewan coba tikus pada bagian leher. Setelah itu tikus difiksasi dengan diposisikan rebah dorsal di atas papan bedah, kemudian tikus dibedah mulai dari perut. Setelah itu darah 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 ependorf kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

#### 4.4.6 Pengukuran Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL)

Pengukuran kadar kolesterol dengan menggunakan metode *direct* dan dibaca dengan spektrofotometer. Proses pengukuran pada alat ini menggunakan dua macam reagen. Reagen I : asam askorbat, *4-aminoatipyrene*, peroksidase, kolesterol oksidase, kolesterol esterase dan deterjen 1 yang melarutkan semua partikel non-LDL. Kolesterol non-LDL akan bereaksi dengan kolesterol esterase dan kolesterol oksidase menghasilkan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida akan berikatan dengan peroksidase karena adanya *4-aminiantipyrene* tanpa ada perubahan warna. Reagen II mengandung *4-aminiantipyrene*, *N,N-bis-(4-sulfobutyl)-m-toluidine disodium salt*, kolesterol oksidase, kolesterol esterase dan deterjen 2 yang akan secara spesifik melepaskan kolesterol dari partikel LDL. Kolesterol yang dilepas bereaksi dengan kolesterol esterase dan kolesterol oksidase menghasilkan hidrogen peroksida yang akan bereaksi dengan *N,N-bis-(4-sulfobutyl)-m-toluidine disodium salt* dan *4-aminiantipyrene* dan menghasilkan produk berwarna sebanding dengan LDL-C. Kemudian diukur dengan panjang gelombang 550 nm.

#### 4.4.7 Isolasi Hepar

Pengambilan organ hepar 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 ditaruh diatas papan bedah, difiksasi, lalu tikus dibedah, kemudian hepar diambil dan diletakkan

pada cawan petri yang berisi NaCl fisiologis 0,9 % dan dibersihkan. Selanjutnya hepar disimpan dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4% untuk pembuatan preparat histologi.

#### **4.4.8 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi Hepar**

##### **4.4.8.1 Pengambilan Sampel (*Sampling*) dan Fiksasi**

Tikus didislokasi pada daerah leher sebelum dilakukan pembedahan. Setelah tikus mati, pembedahan dilakukan dan hepar diambil. Sampel hepar dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% agar bersih dari darah dan lemak - lemak yang menempel. Kemudian hepar dimasukkan ke dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 4% untuk proses fiksasi dengan tujuan mengawetkan organ.

##### **4.4.8.2 Dehidrasi**

Proses dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan yang telah difiksasi menggunakan ethanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% sampai konsentrasi absolute, sehingga dapat diisi dengan parafin.

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

Proses penjernihan adalah proses yang bertujuan untuk menggantikan tempat ethanol dalam jaringan dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol 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* bertujuan untuk mengeluarkan *clearing agent* dari jaringan untuk diganti dengan paraffin. *Embedding* ini dilakukan dengan cara jaringan hepar dimasukkan ke dalam wadah yang berisi paraffin cair yang sudah disiapkan. Kemudian dibiarkan hingga memadat.

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

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

#### **4.4.8.6 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin**

Pewarnaan ini dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin 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. Tahapan pertama yaitu dengan cara

memasukkan preparat ke dalam larutan xylol I, II, dan III, masing-masing selama lima menit, kemudian dimasukkan pada alkohol bertingkat diawali dari alkohol absolut, 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Kemudian sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu preparat diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah preparat sudah diwarnai, preparat dimasukkan pada alkohol 80%, 90% dan 95% hingga alkohol absolute. Setelah itu dilakukan proses *clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup.

#### **4.4.8.7 Pengamatan Preparat Histopatologis**

Hasil pembuatan preparat histopatologi hepar menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 100 kali dilanjutkan dengan perbesaran 400 kali untuk melihat secara histopatologi adanya kerusakan sel hepar karena infiltrasi lemak lemak.

#### 4.5 Analisis Data

Pada percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat ulangan. Analisa data histopatologi kerusakan sel hepar dilakukan secara kualitatif deksriptif. Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dihitung dengan metode *direct* dan dibaca dengan spektrofotometer, 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)  $\alpha = 0.05$ .

