

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus novergicus* galur wistar).

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus wistar/*Rattus novergicus*, usia 6-8 minggu dengan berat 150-200 gram. Jenis kelamin yang dipilih adalah jantan karena tidak ada pengaruh dari faktor hormonal seperti pada tikus betina. Tikus yang dipilih masuk ke dalam kriteria inklusi sebagai berikut :

Hewan coba yang digunakan tikus putih *Rattus novergicus* galur wistar,

- a. jantan
- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat 150-250 gram
- d. Dalam kondisi sehat dan aktif

Kriteria *drop out* adalah sebagai berikut :

- a. Tikus yang sakit dan asupan makanan kurang pada saat penelitian
- b. Tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu: kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif), kelompok C (antosianin 10 mg/kgBB), kelompok D (antosianin 20 mg/kgBB), dan kelompok E (antosianin 80 mg/kgBB) (Maharani *et al*, 2014). Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Perhitungan besarnya pengulangan sampel pada setiap kelompok adalah sebagai berikut: (Solimun, 2001)

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

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 hewan coba yang dibutuhkan adalah 4 ekor untuk setiap kelompok atau secara keseluruhan dibutuhkan 20 ekor tikus.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu: Laboratorium Farmakologi untuk tempat pemeliharaan hewan coba, pemeriksaan *Morris Water Maze*, dan pembedahan, Laboratorium Fisiologi untuk pegecatan imunohistokimia, pemeriksaan ekspresi TNF- α dan pemeriksaan TUNEL apoptosis, Laboratorium Patologi Anatomi untuk tempat pembuatan dan pembacaan hasil slide imunohistokimia. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan dari Mei-Juli 2016.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan dengan pemberian antosianin yang dibagi dalam kelompok:

- Kelompok A: merupakan kelompok kontrol negatif dimana sampel tikus tanpa diet tinggi lemak, tanpa injeksi streptozotocin dan tanpa antosianin.
- Kelompok B: merupakan kelompok kontrol positif dimana sampel tikus dengan diet tinggi lemak selama 6 minggu, injeksi streptozotocin dosis rendah 30 mg/kg pada akhir minggu ketujuh, kemudian injeksi streptozocin 30 mg/kg 24 jam setelah injeksi pertama tanpa diberi antosianin.

- Kelompok C: merupakan kelompok sampel tikus dengan diet tinggi lemak selama 6 minggu, injeksi streptozotocin dosis rendah 30 mg/kg pada akhir minggu ketujuh, kemudian injeksi streptozocin 30 mg/kg 24 jam setelah injeksi pertama dan antosianin 10 mg/kgBB mulai minggu ke 2-7.
- Kelompok D: merupakan kelompok sampel tikus dengan diet tinggi lemak selama 6 minggu, injeksi streptozotocin dosis rendah 30 mg/kg pada akhir minggu ketujuh, kemudian injeksi streptozocin 30 mg/kg 24 jam setelah injeksi pertama dan antosianin 20 mg/kgBB mulai minggu ke 2-7.
- Kelompok E: merupakan kelompok sampel tikus dengan diet tinggi lemak selama 6 minggu, injeksi streptozotocin rendah 30 mg/kg pada akhir minggu ketujuh, kemudian injeksi streptozocin 30 mg/kg 24 jam setelah injeksi pertama dan antosianin 80 mg/kgBB mulai minggu ke 2-7.

Dasar penentuan dosis pada penelitian ini berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai toksisitas antosianin pada berbagai organ tikus wistar dan penelitian mengenai efek antosianin pada tikus diet atherogenik. Antosianin diberikan secara peroral 1 kali perhari selama 6 minggu (Maharani *et al.*, 2014). Setelah injeksi streptozotocin intraperitoneal dilakukan pengukuran kadar gula darah yang diambil dari ekor sampel tikus kelompok kontrol positif dan perlakuan. Kejadian diabetes melitus pada tikus wistar/*(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).

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung terdiri dari ekspresi TNF- α , apoptosis pada sel hipokampus otak tikus dan pemeriksaan *Morris Water Maze*.

4.5 Definisi operasional Variabel

1. Tikus model diabetes melitus diperoleh dengan cara membuat tikus tersebut mengalami resistensi insulin. Induksi resistensi insulin dilakukan dengan memberikan diet tinggi lemak selama 6 minggu dan injeksi streptozotocin intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg pada akhir minggu ketujuh dan 30 mg/kg 24 jam setelah injeksi pertama.
2. Diet tinggi lemak terdiri dari PARS 50%, tepung terigu 25%, kolesterol 1%, asam cholat 0,1%, minyak babi 2,5%, dan air 21,4%. Diet tinggi lemak diberikan pada minggu 2-7.
3. Antosianin yang digunakan didapatkan melalui proses purifikasi ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) yang berasal dari ubi jalar ungu kultivar Gunung Kawi yang dilakukan oleh Dr. Ciptati, MS., di Laboratorium Kimia FMIPA ITB Bandung dengan menggunakan kromatografi kolom flash termodifikasi dengan fasa diam poliamida CC-6 dan fasa gerak air dan etanol (Jadmiko, 2013). Pemberian ekstrak antosianin diberikan secara peroral satu kali setiap hari selama 3 minggu dengan dosis 10, 20 dan 80 mg/kgBB (Maharani *et al.*, 2014).
4. Ekspresi TNF- α adalah ekspresi TNF- α dari sel hipokampus jaringan otak tikus model diabetes melitus yang diukur dengan menggunakan metode imunohistokimia menggunakan antibodi TNF- α (Santa Cruz) yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan hasilnya di amati di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya oleh 2 orang peneliti dalam 1 pohon penelitian dan satu dokter ahli patologi anatomi.
5. Sel apoptosis adalah pengamatan jumlah sel apoptosis jaringan otak dengan teknik DNA terfragmentasi (TUNEL) yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan

hasilnya di amati di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya oleh 2 orang peneliti dalam 1 pohon penelitian dan satu dokter ahli patologi anatomi.

6. Fungsi memori spasial merupakan kemampuan untuk menentukan arah dan tujuan dinilai menggunakan alat *Morris Water Maze* dengan menghitung lama waktu tempuh (detik) dari empat rute yang ditentukan (Hou, 2012).

4.6 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

a. Perawatan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah: kandang berupa wadah yang terbuat dari plastik dengan ukuran 30x30 cm dengan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat sebanyak 30 buah, botol minum tikus 30 buah, timbangan analitik, *handscoon* dan pembersih kandang. Bahan yang digunakan berupa sekam dan air minum untuk tikus.

b. Induksi Diabetes Melitus

Bahan yang digunakan adalah streptozotocin 30mg/kgBB. Pemberian streptozotocin dilakukan secara intraperitoneal, dua kali pada akhir minggu ketujuh dan 24 jam setelah injeksi pertama. Kadar gula darah yang memenuhi kriteria DM yaitu kadar gula darah > 300 mg/dl (Hussain, 2002).

c. Pemberian antosianin

Alat yang digunakan adalah: *handscoon*, sonde, spuit 5 cc, botol untuk menyimpan antosianin dengan masing-masing dosis. Bahan yang digunakan adalah zat aktif antosianin dari ubi ungu kultivar gunung kawi.

d. Pembedahan tikus

Alat yang digunakan adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos es, kapas, wadah plastik + tutup

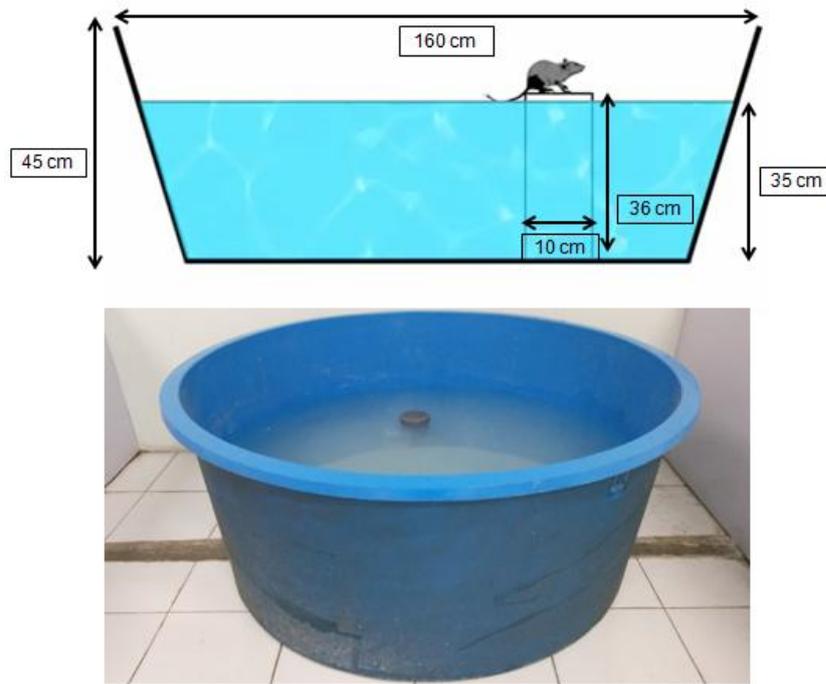
20 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, dan *vacuotainer* 20 buah. Bahan yang digunakan adalah: ketamine, xilase, 10% buffer-formalin 200 ml, alkohol.

e. Pembuatan slide histopatologi

Alat yang digunakan adalah kaca obyek (*object glass*), kaca penutup (*cover glass*), *paraffin block*, rotary mikrotom merek Leica. Bahan yang digunakan adalah jaringan hipokampus otak tikus wistar.

f. Pemeriksaan *Morris Water Maze*

Perangkat *Morris Water Maze* yang digunakan pada percobaan mempunyai dimensi ruang berupa: dasar maze yang berbentuk lingkaran dengan diameter 160 cm, dibagi menjadi lima kuadran (kuadran satu sampai lima), tinggi 45 cm, diisi air sampai setinggi 35 cm yang diambil dari pipa air laboratorium farmakologi fakultas kedokteran universitas brawijaya Malang dengan suhu air yang disesuaikan dengan suhu kamar. Landasan yang digunakan oleh hewan coba tikus terbuat dari pipa berdimensi alas dan atap 10 x 10 cm, tinggi 36 cm dan tebal 0,8 cm serta permukaan landasan terletak 1 cm diatas permukaan air dan diletakkan pada kuadran nomor lima (Huo, 2012).



Gambar 4.1. Perangkat morris water maze. (Modifikasi Huo, 2012)

4.7 Prosedur Penelitian

a. Pemeliharaan tikus wistar

Tikus wistar (*Rattus norvegicus* galur wistar) jantan sebanyak 20 ekor dibeli dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi FKUB. Tikus dipelihara dalam kandang ukuran 30x30 cm (satu kandang berisi 4 ekor tikus). Tikus diadaptasi selama 7 hari agar melakukan penyesuaian dengan lingkungan yang baru. Makan dan minum diberikan dengan jumlah yang cukup untuk setiap kandangnya. Untuk minum diberikan air matang yang diganti setiap harinya. Selama pelaksanaan penelitian, tikus diperlakukan dengan hati-hati dan memperhatikan kelayakan etik penelitian dengan hewan coba.

b. Pemberian antosianin

Antosianin dilarutkan dalam air dan dibagi ke dalam tiga dosis yakni 10 mg/BB, 20 mg/BB, dan 80 mg/BB. Antosianin diberikan secara peroral satu kali perhari selama 6 minggu (Maharani *et al.*, 2014).

c. Pembedahan tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan dengan inhalasi ketamine. Setelah tikus dipastikan tidak sadar (tidak menunjukkan gerakan spontan), dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan otak tikus. Pembedahan tersebut dilakukan dengan cara menggunting kranium dengan arah sagital dari kaudal (oksipital) menuju ke rostral (frontal), tepat diantara kedua hemisfer otak tikus. Selanjutnya dilakukan pembebasan otak tikus pada regio basal dari jaringan ikat sekitarnya. Hemisfer otak sisi kiri diambil dan dimasukkan kedalam botol yang telah diisi larutan formalin 10%, sedangkan hemisfer kanan dimasukkan ke dalam plastik untuk dilakukan pemeriksaan MDA. Botol yang berisi jaringan otak dan larutan formalin tersebut selanjutnya ditutup rapat. Selanjutnya dilakukan pengirisan jaringan otak dan pembuatan slide dengan *paraffin block* (pengirisan preparat otak dan pembuatan *slide* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Saiful Anwar Malang).

d. Pembuatan slide histopatologi

Jaringan otak tikus yang telah dimasukkan dalam botol berisi formalin 10% harus segera diproses dalam waktu kurang dari 24 jam. Setelah itu jaringan hipokampus tadi dimasukkan ke *Tissue Tex Prosesor* selama 90 menit. Jaringan diambil dari alat tersebut dan dilakukan blok dengan menggunakan paraffin. Setelah itu, Jaringan hipokampus yang dalam *paraffin block* tadi dilakukan pemotongan menggunakan alat *microtome* dengan ketebalan 2-3 μm . Hasil irisan dipindahkan dengan kuas kedalam air hangat 38-40⁰C untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas obyek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan diatas hot plate 38-40⁰ sampai kering, selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator suhu 38-40⁰C selama 24 jam.

e. Pemeriksaan ekspresi TNF- α pada sel hipokampus otak

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking *unspesifik protein* menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti TNF- α , selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan anti rabbit HRP conjugated selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Ditetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan diinkubasi selama 10 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Dicuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. Dilakukan *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan tap water. Dibilas menggunakan dH₂O dan dikering anginkan. Dimounting menggunakan entelan dan ditutup dengan cover glass. Diamati pada mikroskop cahaya. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti yang lain dalam 1 pohon penelitian (2 orang) dan 1 orang ahli patologi anatomi.

f. Pengamatan sel apoptosis sel hipokampus otak dengan teknik DNA terfragmentasi (TUNEL)

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan dinkubasi menggunakan 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37⁰C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi pada 3% H₂O₂ selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labeling* (enogene) selama 60 menit pada 37⁰C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi dengan *peroksidase solution*

selama 40 menit pada 37⁰C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB-DiaminoBenzidine) selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan dilakukan *Counterstain* dengan *Mayer hematoxilen* selama 10 menit, dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH₂O, dikeringkan dan ditutup *cover glass*. Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x, kemudian 400x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti yang lain dalam 1 pohon penelitian (2 orang) dan 1 orang ahli patologi anatomi.

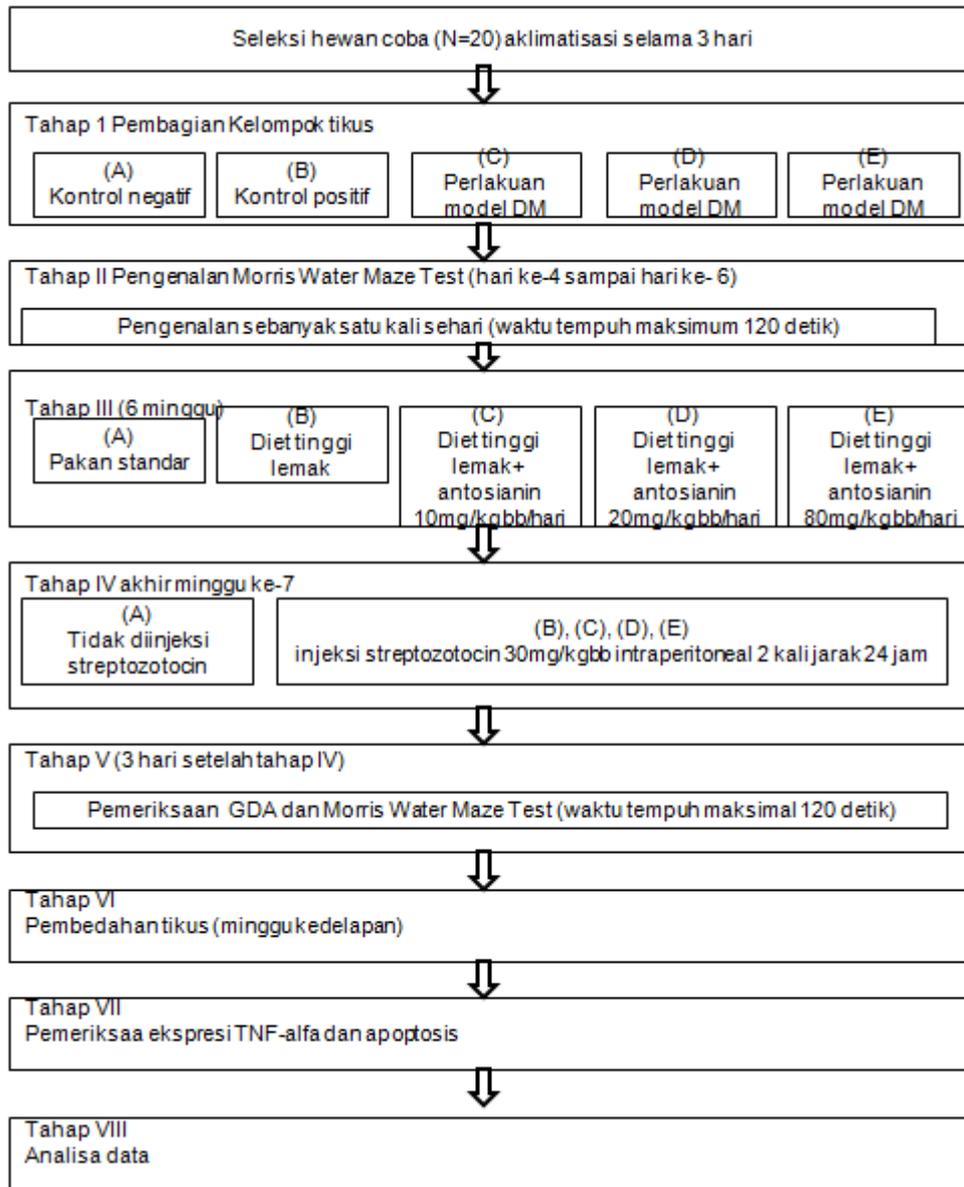
g. Pemeriksaan *Morris Water Maze*

Hewan coba tikus diberi perlakuan berupa pengenalan pada metode pemeriksaan berupa latihan sebanyak satu kali sehari dengan tempat yang dipindah-pindah, sedangkan posisi landasan yang dituju tetap (pada kuadran lima) sesuai dengan pembagian kuadran. Terdapat empat rute yang harus ditempuh masing masing tikus, yaitu I, II, III, IV dengan waktu tempuh maksimal dalam proses mencari landasan yang dituju adalah selama 120 detik, serta diperkenankan berada diatas landasan selama maksimal lima belas detik.

Tes pengenalan mula-mula dilakukan selama tiga hari, dan tiap usai melakukan tes maka tikus akan diletakkan dalam kandang transit yang diletakkan pada ruangan terbuka dan dikeringkan selama lima belas menit sebelum dimasukkan kembali kedalam kandang. Hal ini mempunyai tujuan agar menghindari terjadinya hipotermia. Sedang untuk kebersihan alat coba, air dalam bejana dibuang kemudian bejana dicuci dengan desinfektan serta dikeringkan untuk menghindari adanya organisme infeksius.

Selama tiga hari pertama percobaan, hewan coba tikus hanya akan diberi pakan standar dan dibiarkan beradaptasi terhadap lingkungan kandang, dan pada hari keempat mulailah seluruh hewan coba diberi pengenalan pada perangkat *Morris Water Maze* sebanyak satu kali sehari selama tiga hari sesuai metode pengenalan terhadap lingkungan pada awal percobaan, serta pada akhir sesi pengenalan alat sebelum dilakukannya perlakuan dihitunglah rerata waktu tempuh oleh orang lain selain peneliti (untuk menghilangkan bias penelitian) dari masing masing kelompok pada hewan coba. Pada akhir perlakuan (pada minggu ke delapan) dilakukan perhitungan kembali rerata waktu tempuh dengan alat *Morris Water Maze* pada kelima kelompok hewan coba (Morris, 1981).

4.8 Alur penelitian



4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one-way Anova* yang dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test* untuk membandingkan perbedaan lebih dari dua kelompok. Apabila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk uji *one-way Anova*, maka sebagai alternatifnya akan digunakan uji *Kruskal-Wallis* yang kemudian akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk membandingkan perbedaan lebih dari dua

kelompok. Hasil uji statistik signifikan jika nilai $p < 0,05$. Uji korelasi dan regresi dilakukan untuk menentukan adanya dan kuatnya hubungan antara variabel independen terhadap variabel dependen.

4.10 Etika Penelitian pada Hewan Coba

Penelitian dengan menggunakan hewan coba harus dilakukan secara bertanggungjawab, menghormati kemaslahatan hewan sebagai makhluk hidup berdasarkan moralitas kemanusiaan tertinggi. Untuk mencapai hal tersebut peneliti menggunakan prinsip 3R, yaitu :

1. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan dengan seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction* adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal.

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu : kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif), kelompok C (antosianin 10 mg/kgBB), kelompok D (antosianin 20 mg/kgBB), dan kelompok E (antosianin 80 mg/kgBB). Total kelompok yang dibutuhkan adalah lima kelompok. Hewan coba yang dibutuhkan adalah 4 ekor untuk setiap kelompok atau secara keseluruhan dibutuhkan 20 ekor tikus.

3. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, tidak menyakiti hewan serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian (Santoso, 2013).

Selain prinsip 3R tersebut, peneliti dalam penelitian ini juga menggunakan prinsip 5F, yaitu :

a. Bebas dari rasa lapar dan haus

Dalam penelitian ini, kebutuhan makan dan minum menggunakan prinsip *ad libitum*.

b. Bebas dari rasa nyeri

Dalam perlakuan pemberian antosianin peroral dengan sonde pada hewan coba dilakukan oleh tenaga professional untuk menghindari aspirasi dan kemungkinan infeksi.

c. Bebas dari rasa stres dan tidak nyaman

Dalam penelitian ini, hewan coba diletakkan dalam kandang yang sesuai dengan besar dan jumlahnya (1 kandang berisi 4 ekor tikus wistar). Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 1,5-2 cm dan diganti sebanyak dua kali penggantian dalam seminggu.

d. Bebas dari perlukaan dan penyakit

Untuk menghindarkan terjangkitnya penyakit hewan coba, kandang dijaga kebersihannya dengan mengganti sekam dua kali dalam seminggu dan posisi kandang dijauhkan dari hewan coba lain yang diberi paparan penyakit tertentu serta dihindarkan dari predator. Sekam yang diberikan terlebih dahulu dibersihkan dan disaring dari debu maupun kotoran lainnya. Kandang dan tempat minum dicuci setiap tiga hari sekali.

e. Bebas untuk mengekspresikan perilaku normalnya

Tidak membatasi hewan coba untuk mengekspresikan perilaku normalnya (makan, minum, istirahat, aktivitas) (Santoso, 2013).

Pada akhir penelitian, hewan coba yang telah dilakukan pembedahan dan telah diambil jaringan otaknya dikumpulkan di dalam suatu wadah, untuk dibersihkan lalu dikuburkan dengan baik dan layak.