

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2017 di laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan: alat-alat gelas, penangas air, spektrofotometer, pipet mikro, neraca analitik, tabung reaksi, sentrifugasi, vortex, lemari pendingin, glucometer (GCU), glukostick, *microtube*, spektrofotometer, alat pencekok syringe, kandang tikus berukuran 17,5x 23,75 x 17,5 cm bak plastik dan dilengkapi dengan penutup dari kawat, botol minum tikus, sekam, squid sonde, squid injeksi, sarung tangan, masker, rak tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, pH meter, gelas objek, *cover glass*, mikroskop cahaya, *microtome*, *tissue processor*, *tissue embedding*, *waterbath*, botol *schott* 1000 mL, tempat pewarnaan (*staining*), penangas air, *rotary evaporator*, gunting, pinset, pipet tetes, pipet ukur 5 dan 10 mL, spatula, *paraffin cassette*, batang pengaduk gelas, kit MDA, *petri disk*, inkubator, *magnetic stirrer*, *stirrer*, *hotplate*, tabung sentrifuge, mortar, kamera digital, palu, kuvet, *blood lancet*, nampan bedah, *yellow* dan *blue microtip*, gelas arloji, tabung ependorf, karet *bulb*, bunsen, kertas saring, kapas, aluminium foil, *cooler box*, botol sampel dan mikropipet 10-100 μ L.

3.3 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar usia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram, akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*), MLD-STZ dengan dosis 20 mg/bb sampel darah yang digunakan untuk uji kadar glukosa, sampel berupa jaringan ginjal yang diperoleh akan digunakan untuk uji kadar malondialdehida (MDA) pada tikus model diabetes mellitus.

Bahan lain yang digunakan adalah pakan standar, n-heksan, NaCl Fisiologis 0,9%, etanol 70% 80% 90% dan 95%, aquades, hidrobat, padatan asam sitrat, H₂SO₄ pekat, larutan asam sitrat 0,2 M, padatan natrium sitrat dihidrat, larutan natrium sitrat 0,2 M, larutan

buffer sitrat pH 4,5, padatan STZ, alkohol 70%, padatan NaCl, padatan KCl, padatan KH_2PO_4 , padatan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, larutan PBS, larutan PBS-azida 1%, asam trikloroasetat (TCA) 10%, HCl 1 N, Na-thio 1%, pasir kuarsa, padatan NaOH, larutan NaOH 1 M, xylol, parafin cair, parafin blok, formalin 37%, paraformaldehida (PFA) 10%, azida 1%, dan *hematoxyline-eosin* (HE).

3.4 Tahapan Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini meliputi beberapa tahapan kerja yaitu:

1. Preparasi hewan coba
2. Preparasi larutan buffer sitrat 0.2 M dengan pH 4.5
3. Pembuatan MLD-STZ
4. Preparasi hewan coba yang diinduksi MLD-STZ
5. Penentuan dosis terapi ekstrak akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)
6. Pembuatan ekstrak n-heksan akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)
7. Terapi ekstrak n-heksan tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)
8. Pengujian kadar glukosa darah hewan coba
9. Pembedahan tikus / Euthanasia
10. Pengujian kadar malondialdehida (MDA) ginjal tikus
11. Pembuatan preparat histopatologi ginjal tikus
12. Pewarnaan HE preparat histopatologi ginjal tikus
13. Analisa data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi hewan coba

Dua puluh ekor tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) wistar berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan 150 – 200 gram diadaptasikan selama 1 minggu sebelum diberikan perlakuan. Tikus dibagi ke dalam tiga kelompok:

1. Kelompok 1 (6 ekor tikus) sebagai kontrol normal tanpa diinduksi MLD-STZ dan tanpa pemberian ekstrak rimpang pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)
2. Kelompok 2 (6 ekor tikus) sebagai kontrol positif penyakit diabetes mellitus tanpa terapi ekstrak rimpang pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)

3. Kelompok 3 (6 ekor tikus) sebagai kontrol negatif yang diberikan terapi ekstrak akar rimpang pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) dengan dosis 250 mg/kg BB.

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Perhitungan jumlah dari sampel dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut: (Kusriningrum, 2008)

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan estimasi dari sampel di atas, maka untuk ketiga kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 6 kali dalam setiap kelompok sehingga total jumlah hewan coba yang dibutuhkan sebanyak 18 ekor.

Variable yang diamati dalam penelitian ini adalah:

1. Variable bebas: dosis ekstrak n-heksan rimpang pletekan (*Ruellia tuberosa L.*), induksi MLD-STZ
2. Variable terikat: kadar glukosa darah, kadar MDA dan gambaran histopatologi pada ginjal
3. Variable kontrol: jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus* strain wistar

Tikus dikandangkan sesuai dengan kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 26-27°C dengan kelembapan ruang 83%, dimana setiap kandangnya diisi dengan 5 ekor tikus. Kandang tikus terbuat dari bak plastik dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup dari kawat.

3.5.2 Pembuatan larutan asam sitrat 0.2 M sebanyak 100 mL

Asam sitrat ditimbang menggunakan neraca analitik seberat 4,2 gram dan dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL. Ditambahkan aquades secukupnya kedalam gelas kimia 100 mL hingga asam sitrat larut dan homogen. Larutan dipindahkan kedalam

labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan dikocok hingga homogen.

3.5.3 Pembuatan larutan natrium sitrat 0.2 M sebanyak 100 mL

Natrium sitrat ditimbang menggunakan neraca analitik seberat 5,88 gram dan dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL. Ditambahkan aquades secukupnya kedalam gelas kimia 100 mL hingga natrium sitrat larut dan homogen. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan dikocok hingga homogen.

3.5.4 Pembuatan buffer sitrat 0.2 M dengan pH 4.5

Larutan asam sitrat 0.2 M diambil sebanyak 27.5 mL dan larutan natrium sitrat sebanyak 22.5 mL dengan menggunakan pipet volume dan dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL. Diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer hingga larutan homogen. Diukur pH nya dengan menggunakan pH meter yang telah dikondisikan sebelumnya, ditetesi dengan natrium sitrat apabila pH masih terlalu asam. Jika pH terlalu basa maka ditetesi dengan asam sitrat sampai pH mencapai 4.5.

3.5.5 Pembuatan MLD-STZ

Padatan STZ ditimbang seberat 100 mg dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan kedalam tabung falcon 15 mL. Ditambahkan dengan 3 mL buffer sitrat 0.2 M dengan pH 4.5 kedalam tabung falcon 15 mL berisi padatan STZ. Larutan divortex hingga homogen dan disimpan dalam suhu 4⁰C.

3.5.6 Preparasi hewan coba yang diinduksi MLD-STZ

Setelah 1 minggu, tikus dengan kelompok yang telah dibagi diberikan perlakuan sakit dengan diinduksi dengan MLD-STZ. Pemberian dosis MLD-STZ ini sebanyak 20 mg/bb tikus selama 5 hari berturut-turut. Sebelum diinduksi dengan MLD-STZ, tikus diukur berat badannya dan dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Larutan STZ Total: } \frac{(BB \text{ Tikus}) / (1000 \text{ g}) \times 20 \text{ mg}}{0.033 \text{ mg}} \times 1 \mu\text{L}$$

Larutan STZ Stok: $\frac{(BB \text{ Tikus})/(1000 \text{ g}) \times 20 \text{ mg}}{0.067 \text{ mg}} \times 1 \mu\text{L}$

Buffer Sitrat yang ditambahkan: Larutan STZ Total-Larutan STZ Stok

Hewan coba tikus diinjeksi dengan MLD-STZ pada bagian tengkuk yang dicubit sehingga kulitnya terasa terpisah dari badan. Setelah hewan coba diinduksi dengan MLD-STZ, hewan coba di aklimatisasi selama 2 minggu sebelum diberikan perlakuan terapi.

3.5.7 Penentuan dosis terapi ekstrak n-heksan akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)

Terapi ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) diberikan pada tikus kelompok 3 dengan dosis 250 mg/Kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung sebanyak 2 mL dan dilakukan pada pagi hari selama 21 hari secara oral (sonde lambung).

3.5.8 Pembuatan ekstrak n-heksan akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)

Sejumlah 600 gram serbuk akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) dimaserasi dengan pelarut n-heksan sebanyak 5000 mL selama 48 jam, lalu maserat disaring. Filtrat yang terkumpul dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada 90 rpm dengan temperatur 50°C hingga diperoleh ekstrak berbentuk padatan.

3.5.9 Terapi ekstrak n-heksan akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)

Ekstrak n-heksan akar pletekan (*Ruellia tuberosa L.*) yang berupa padatan dilarutkan dalam minyak jagung sebanyak 2 mL. Campuran ini digunakan sebagai terapi pada hewan coba tikus. Dosis terapi ekstrak n-heksan akar pletekan ini sebanyak 250 mg/Kg BB pada masing-masing kelompok dan diberikan secara sonde lambung (oral).

3.5.10 Pengujian kadar glukosa darah hewan coba

Pengujian kadar glukosa ini dilakukan selama 7 hari sekali setelah tikus diberikan terapi ekstrak n-heksan akar pletekan dengan menggunakan glukometer dan glukostick untuk mengukur kadar

glukosanya. Tikus ditusuk di bagian ujung ekornya dan diteteskan di glukostick yang telah disambungkan dengan glukometer. Hasil angka kadar glukosa akan ditunjukkan di glukometer.

3.5.11 Pembedahan tikus / Euthanasia

Tikus dibedah dengan cara dislokasi leher. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen yaitu tikus diletakkan diatas papan pembedahan dengan posisi rebah dorsal untuk mengambil organ ginjal yang terletak pada dorsal tulang vertebrae. Organ ginjal yang telah diambil, dicuci dengan larutan PBS-azida dan dimasukkan dalam larutan *paraformaldehyde* (PFA) 1%.

3.5.12 Pembuatan kurva standar Malondialdehida (MDA)

Larutan standar Malondialdehid (MDA) dibuat dengan mengambil variasi konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing sebanyak 100 μL dan dimasukkan dalam tabung ependorf yang berbeda. Ditambahkan dengan 550 μL aquades pada masing-masing tabung. Larutan standar ditambahkan 100 μL TCA 10%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Natrium-Thiobarbiturat 1%. Setiap penambahan reagen, larutan dihomogenkan dengan cara vortex. Tabung eppendorf ditutup dengan aluminium foil. Diinkubasi dalam penangas air pada posisi mengapung dengan temperatur 100⁰C selama 30 menit. Larutan standar didinginkan pada suhu ruang. Kemudian MDA dengan konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$ diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-570 nm untuk menentukan λ_{maks} MDA. Dari λ_{maks} yang didapat, dapat dibuat kurva standar MDA dan didapatkan nilai absorbansi pada variasi konsentrasi tersebut.

3.5.13 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)

Dilakukan dengan metode TBA (*Thiobarbituric Acid*). Awalnya organ ginjal ditimbang seberat 0,5 gram, digerus dengan mortar hingga halus dan ditambahkan 100 μL NaCl fisiologis. Kemudian homogenate dipindahkan kedalam tabung eppendorf dan disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 25⁰C dan diambil supernatannya. Supernatan diambil sebanyak 100 μL dan ditambah dengan 550 μL aquades, 100 μL TCA 10%, 250 μL HCl 1 N dan 100 μL Natrium-thiobarbiturat 1%. Tabung Eppendorf ditutup dengan aluminium

foil. Larutan dihomogenkan dengan cara vortex setiap penambahan reagen. Larutan diinkubasi dalam penangas air pada posisi mengapung pada suhu 100°C selama 30 menit. Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan pada suhu 25°C. Sampel diukur absorbansinya pada λ_{maks} (530 nm) untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

3.5.13 Pembuatan preparat histopatologi ginjal

Proses pertama pembuatan histopatologi adalah organ ginjal direndam dalam PFA 1% selama 24 jam. Organ ginjal dicuci dengan aquades dan dilakukan proses dehidrasi yaitu dengan dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 24 jam, alkohol 80% selama 2 jam, alkohol 90% dan alkohol 95% selama 20 menit. Kemudian organ ginjal dimasukkan dalam *xylol* selama 20 menit dan 30 menit untuk proses *clearing*. Kemudian organ ginjal dilakukan infiltrasi parafin dengan dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan proses *embedding* (penanaman jaringan) yaitu dengan mencelupkan organ ginjal dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ ginjal berada dalam blok parafin. Kemudian dilakukan proses *sectioning* (pemotongan blok parafin) yaitu blok parafin dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalan 5 μm . Jaringan yang sudah dipotong direndam pada *waterbath* dengan suhu 38-40°C, diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C selama 24 jam.

3.5.14 Pewarnaan HE preparat histopatologi ginjal

Pewarnaan *Hematoxylen-Eosin* diawali dengan memasukkan preparat kedalam *xylol* bertingkat masing-masing selama 5 menit. Dilakukan tahapan rehidrasi preparat yaitu dengan memasukkan preparat kedalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) masing-masing selama 5 menit. Preparat direndam dalam aquades selama 5 menit. Preparat dimasukkan dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit, dicuci dengan aquades selama 5 menit. Dimasukkan ke dalam pewarna *eosin* selama 5 menit, dicuci dengan aquades. Dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat

ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%). Dilakukan proses *clearing* dengan memasukkan preparat dalam *xylol* dan dikeringkan. Tahap terakhir dilakukan proses *mounting* dengan menggunakan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat siap diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX 51* dengan perbesaran 40x dan 100x untuk melihat perubahan yang terjadi pada organ ginjal. Pengambilan gambar dengan histopatologi ginjal dengan menggunakan kamera digital, diamati pada mukosa dan jaringan epitel.

3.5.15 Analisa data

Untuk menentukan kadar Malondaldehyd (MDA) digunakan uji BNJ (Beda nyata jujur) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata menggunakan *Microsoft Office Excel* dan menggunakan uji statistik SPSS statistics 21.0. Untuk pengamatan histopatologi ginjal dianalisa secara deskriptif.