

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Model penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test* dan *controlled group design* pada hewan uji.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek dan subyek yang memiliki kualitas dan karakteristik sesuai dengan kriteria tertentu untuk dipelajari dan diambil kesimpulannya (Sugiyono, 2013). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley berjenis kelamin jantan.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang dianggap mewakili populasinya (Notoatmojo, 2010). Sampel penelitian ini adalah obyek yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi yang sudah ditetapkan.

a. Kriteria inklusi:

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley.
- 2) Jenis kelamin jantan.
- 3) Berat badan 150-250 gram.

4) Usia 2-4 bulan.

5) Kondisi sehat aktivitas dan tingkah laku normal.

b. Kriteria eksklusi:

1) Gula darah puasa setelah induksi *STZ* tidak mencapai kriteria DM.

3. Besar sampel

Sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu:

Keterangan :

n : jumlah obyek tiap kelompok penelitian

t : jumlah kelompok dalam penelitian

Perhitungan banyaknya obyek penelitian:

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

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel tiap kelompok pada penelitian ini sebanyak 5 ekor tikus ($n \geq 4$) dan ada 6 kelompok perlakuan. Penelitian ini membutuhkan 30 ekor tikus putih.

4. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT 4) Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2016.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Ekstrak akar *Dillenia suffruticosa* berbagai konsentrasi
- b. Variabel terikat : 1. Jumlah pulau *Langherhans* pankreas
2. Luas pulau *Langherhans* pankreas
- c. Variabel terkendali:
 - 1) Obyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Spargue Dawley.
 - 2) Proses pengelompokan menggunakan sistem randomisasi.
 - 3) Faktor hormonal menggunakan tikus jantan agar tidak terpengaruh oleh siklus reproduksi yang akan mengganggu hasil penelitian.
 - 4) Kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok.
 - 5) Lama penelitian adalah 30 hari.
 - 6) Suhu dan kelembaban udara diusahakan normal. Pengaturan suhu dan kelembaban menggunakan *air conditioner* dan *exhaust fan*.

2. Definisi Operasional

a. Ekstrak *Dillenia Suffruticosa* Berbagai Konsentrasi

Ekstrak akar simpur *Dillenia suffruticosa* diberikan dengan beberapa tingkatan dosis (Dosis 1 : 0.5mg/200gr BB; Dosis 2 : 1mg/200gr BB; Dosis 3 : 2mg/200gr BB) berdasarkan kelompok perlakuan, diberikan setiap hari selama 30 hari dan dimulai setelah induksi *Streptozotocin* secara per oral menggunakan sonde.

b. Jumlah Pulau *Langerhans* Pankreas

Pulau *Langerhans* berbentuk opoid dengan besar masing-masing pulau berbeda. Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE), akan terlihat pulau *Langerhans* lebih pucat dibandingkan dengan sel-sel kelenjar acinar di sekelilingnya. Pengamatan jumlah pulau *Langerhans* dilakukan dengan cara memfoto preparat menggunakan mikroskop pembesaran 100x sebanyak 5 lapang pandang.

c. Luas Pulau *Langerhans* Pankreas

Pengamatan luas pulau *Langerhans* dilakukan dengan cara mengukur hasil foto preparat di bawah mikroskop pembesaran 400x sebanyak 5 buah menggunakan aplikasi *ImageRaster* yang telah dikalibrasi.

D. Instrumen Penelitian

1. Bahan :

a. *Streptozotocin*; b. Aquades; c. Glibenklamid; d. *Dillenia suffruticosa*

2. Alat :

a. Spuit; b. Timbangan; c. Alat pengukur gula darah; d. Mikroskop;
e. Aplikasi *ImageRaster*

E. Cara Pengumpulan Data

1. Prosedur Pengambilan Data

a. Pembuatan Ekstrak Akar *Dillenia suffruticosa*

Akar Simpur (*Dillenia suffruticosa*) dikeringkan kemudian diblender dan disaring. Serbuk kemudian dimaserasi dengan menggunakan etanol. Serbuk tanaman dimasukkan ke dalam Erlemenyser

dan ditambahkan etanol sampai terendam sempurna, kemudian Erlemenyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil. Maserasi dilakukan selama 48 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 48 jam sampel disaring menggunakan corong Buncher yang telah dilapisi kertas saring, kemudian filtrat dipisahkan. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kemudian dikeringkan di oven hingga diperoleh ekstrak kering (Armania *et al*, 2013).

Dosis dibuat berdasarkan perbandingan volume. Dosis diambil dari dosis pada kultur, yaitu $12,5\mu\text{gr/ml}$ (Armania *et al*, 2013). Jika diasumsikan pada tikus 200gr, memiliki volume cairan ekstrak sebesar 40ml. Setiap tikus membutuhkan dosis $40\text{ml} \times 12,5\mu\text{gr} = 500\mu\text{gr}/200\text{grBB}$ sehingga dosisnya adalah:

- 1) Dosis 1 : $0.5\text{mg}/200\text{gr BB}$
- 2) Dosis 2 : $1\text{mg}/200\text{gr BB}$
- 3) Dosis 3 : $2\text{mg}/200\text{gr BB}$

b. Induksi *Streptozotocin* pada Tikus

Streptozotocin merupakan *glukosamin* dari derivat *N-nitro*, sebagai antibiotik *broad spectrum* dan sitotoksik pada sel *beta* pankreas tempat produksi insulin. Injeksi *STZ* sebesar 40mg/kgBB intravena atau intraperitoneal pada tikus dapat menyebabkan degenerasi sel *beta Langherhans* dan secara klinik menunjukkan tanda diabetes pada hari ke 4-6 (Szkuldelski, 2001).

Tikus putih dikondisikan menjadi diabetik maka tikus tersebut diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB secara intravena dalam waktu dua hari (Szkuldelski, 2001).

c. Pengujian Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah tikus sebelum diinduksikan *STZ* (hari ke-0) dan sesudah diinduksikan *STZ* (hari ke-6 dan ke-30). Sebelum diambil darahnya tikus dipuasakan 8 jam (Meiyandri, 2013).

d. Pembuatan Preparat Histologi Pankreas

1) Fiksasi

Jaringan biopsi eksisi dimasukkan kedalam larutan formalin *buffer* (larutan formalin 10% dalam *Phospate Buffer Saline* pada pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18 – 24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi (Meiyandri, 2013).

2) Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol-*xylol* selama 1 jam dan kemudian larutan *xylol* murni selama 2x2 jam (Meiyandri, 2013).

3) Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam.

4) *Embedding*

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58° C sampai parafin mencair (Meiyandri, 2013).

5) *Pewarnaan dengan Metode Hematoxylin-eosin*

Jaringan pada kaca obyek dilakukan deparafinisasi sampai alkohol 70%, kemudian dibilas dengan air bersih. Jaringan dioksidasi dengan Lugol's iodine selama 10 menit. Jaringan dibilas dengan air dan lakukan proses *decolourise* menggunakan 2,5 % sodium thiosulfat. Pembilasan dilakukan kembali dengan air, dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan alkohol 70 %. Lakukan pewarnaan dengan *Hematoxylin-eosin* selama 5 menit, lalu bilas di bawah air keran selama 1 menit. Dilakukan proses diferensiasi dalam asam alkohol (1 % HCl dalam 70 % alkohol) selama 10 menit. Jaringan dibilas lagi dengan air selama 5 menit dan akan terjadi perubahan warna jaringan menjadi merah. Berikan Canada balsem dan tutup dengan kaca penutup (Meiyandri, 2013).

e. *Cara Pengamatan Pulau Langerhans Pankreas*

Pengamatan jumlah pulau *Langherhans* pada satu sampel dihitung dengan cara mencari pulau *Langherhans* pankreas sebanyak 5

lapang pandang dari satu sediaan jaringan pankreas yang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Pulau *Langherhans* pankreas ditandai dan dijumlahkan setiap lapang pandang preparat

Pengamatan luas pulau *Langherhans* pada satu sampel diukur dengan cara mencari pulau *Langherhans* pankreas sebanyak 5 pulau *Langherhans* dari satu sediaan jaringan pankreas yang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Pulau *Langherhans* pankreas ditandai dan diukur luasnya menggunakan aplikasi ImageRaster. Hasil dari pengukuran luas pulau *Langherhans* pankreas dijumlahkan dan dihitung rata-ratanya.

2. Alur Jalannya Penelitian

- a. Pengadaan tikus. Tikus dibeli dari LPPT 4.
- b. Pengelompokan dilakukan secara acak.
- c. Pembuatan ekstrak akar simpur (*Dillenia suffruticosa*). Proses pembuatan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 1 (LPPT 1) Universitas Gadjah Mada.
- d. Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan masing-masing 5 ekor tiap kelompok.
- e. Masing-masing kelompok akan diberi perlakuan sebagai berikut :
 - 1) Kelompok 1 sebagai kelompok Kontrol Normal, hewan uji tanpa diinduksi *STZ* dan hanya diberikan perlakuan aquades dan makanan biasa selama 30 hari.

- 2) Kelompok 2 sebagai Kontrol Negatif (tanpa perlakuan), hewan uji yang sudah diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan hanya diberi perlakuan aquades dan makanan biasa selama 30 hari.
 - 3) Kelompok 3 sebagai Kontrol Positif, hewan uji yang sudah diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan glibenklamid 1 kali sehari selama 30 hari masing-masing 0,09 mg/200grBB/hari/tikus.
 - 4) Kelompok 4 sebagai kelompok uji yang diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak *Dillenia suffruticosa* 1 kali sehari selama 30 hari dengan dosis 1.
 - 5) Kelompok 5 sebagai kelompok uji yang diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak *Dillenia suffruticosa* 1 kali sehari selama 30 hari dengan dosis 2.
 - 6) Kelompok 6 sebagai kelompok uji yang diinduksi *STZ* 40 mg/kgBB sehingga menjadi diabetik dan diberikan perlakuan ekstrak *Dillenia suffruticosa* 1 kali sehari selama 30 hari dengan dosis 3.
- f. Tikus diadaptasikan selama 6 hari.
 - g. Tes darah – ukur gula darah puasa.
 - h. Tikus putih diinduksi pada kelompok uji dengan *STZ* 40 mg/kgBB.
 - i. Tes darah – ukur gula darah puasa.
 - j. Pemberian ekstrak akar simpur selama 30 hari.
 - k. Tes darah – gula darah puasa.

- l. Terminasi tikus dengan eter.
- m. Ambil pankreas, dimasukkan ke dalam formalin 10%.
- n. Dibuatkan preparat histologi sel β pankreas dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Universitas Gadjah Mada.
- o. Dilakukan pengamatan mikroskopis di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

F. Analisa data

Penelitian ini dilakukan analisis data secara statistik menggunakan aplikasi SPSS 17 *for Windows*. Data yang diperoleh dilakukan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Hasil uji normalitas data menunjukkan sebaran data tidak terdistribusi normal. Analisis jumlah dan luas pulau *Langerhans* pankreas menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk menilai perbedaan di semua kelompok, lalu dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk menilai perbedaan antar kelompok.

Hasil yang ada ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata dan standar deviasi. Nilai dikatakan berbeda jika tingkat signifikansi ($p < 0,05$).

G. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari komisi etika penelitian FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

