

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental *in vivo* yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *post-test controlled group design*.

#### B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diperoleh dari PAU-UGM. Subyek penelitian memiliki kriteria sebagai berikut: usia sekitar 3-4 bulan, memiliki berat badan  $\pm 200$  gram, jenis kelamin jantan.

#### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium PAU UGM dan Laboratorium Biomedis-FKIK UMY. Waktu penelitian pada bulan Mei – Juli 2012.

#### D. Besar Sampel

Penentuan besar sampel pada penelitian ini menggunakan rumus dari Federer (1963), dengan rumus :

$$\begin{array}{ll} (t-1)(r-1) \geq 15 & t : \text{jumlah kelompok perlakuan} \\ (6-1)(r-1) \geq 15 & (6 \text{ kelompok}) \\ 5(r-1) \geq 15 & \\ 5r-5 \geq 15 & r : \text{jumlah sampel pada tiap} \\ 5r \geq 20 & \text{perlakuan} \\ r \geq 4 & \end{array}$$

Jadi jumlah mencit yang digunakan dalam setiap kelompok minimal

## **E. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel bebas**

Ekstrak etanol batang HF yaitu dosis 0,27 gram/Kg BB, 0,54 gram/kg BB, dan 1,08 gram/Kg BB

### **2. Variabel tergantung**

Perubahan struktural pankreas tikus, dilihat dari jumlah sel  $\beta$  pankreas.

### **3. Variabel terkendali**

Usia 3-4 bulan, jenis kelamin jantan, berat badan subyek  $\pm$  200 gram.

## **F. Definisi Operasional**

1. Ekstrak etanol batang HF adalah hasil ekstrak serbuk batang HF dengan menggunakan penyari etanol 70%. Pada orang dewasa 70 kg, kapsul yang berisi ekstrak air HF diminum 3 gram setiap harinya. Jika berat badan orang dewasa (70 kg) dikonversikan ke tikus 200 gram maka akan didapatkan nilai 0,018 (Lawrence & Bacharah, 1964). Dosis tersebut tersebut sama dengan 3 gram  $\times$  0,018 = 0,054 gram/ 200 gram BB atau 0,27 gram/kg BB. Sehingga dosis HF untuk tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis 0,135 gram/kg BB, 0,27 gram/kg BB dan 0,54 gram/kg BB.
2. Diabetes mellitus pada diabetes ini adalah diabetes aloksan yang merusak sel  $\beta$  pankreas sehingga menyebabkan Diabetes Mellitus tipe I.
3. Gambaran histologi pankreas merupakan pengamatan pada jumlah sel  $\beta$

## **G. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Kandang tikus, Timbangan tikus, Spuit injeksi, Spektrofotometer, Effendrof, Mikro haematokrit, Sentrifuge.

### **2. Bahan**

Serbuk *H.formicarum*, Etanol, Aloksan, dan Glibenklamid.

## **H. Prosedur Penelitian**

### **1. Pembuatan ekstrak etanol batang *H.formicarum***

Mengambil HF yang digunakan dari daerah Pegunungan Kubing, Kabupaten Belitung, Provinsi Kep. Bangka Belitung. Bagian tumbuhan yang digunakan adalah batang bagian bawah yang menggelembung dan berongga berisi sarang semut.

Mengupas kulit luarnya dari batang tersebut, lalu membelahnya menjadi beberapa bagian, membersihkan semut-semut yang terdapat didalamnya. Mengiris potongan batang tersebut menjadi sangat tipis lalu mengeringkannya di dalam oven pada suhu 60<sup>o</sup>c sampai kering. Mencacah umbi sarang semut yang telah kering lalu memblendernya sampai menjadi serbuk. Lalu ketika sudah menjadi serbuk, mengestraknya dengan penyari etanol 70% dengan teknik maserasi. Merendam (maserasi) serbuk batang HF dengan larutan etanol 70% selama 24 jam dan mengambil filtratnya dengan melakukan penyaringan. Kemudian, menguapkan hasil saringan dalam rotary-vacum evaporator pada

## 2. Pengelompokan hewan uji

Jumlah subjek penelitian adalah 30 ekor. Subyek dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok I :kelompok kontrol tanpa perlakuan
- b. Kelompok II :kelompok kontrol negatif, diinduksi aloksan dosis 130 mg/kg BB
- c. Kelompok III :kelompok kontrol positif, diinduksi aloksan dosis 130 mg/kg BB dan diberi glibenklamid dosis 0,5 mg/kg BB
- d. Kelompok IV :kelompok perlakuan diinduksi aloksan dosis 130 mg/kg BB dan diberi ekstrak etanol batang HF dosis 0,135 gram/Kg BB
- e. Kelompok V :kelompok perlakuan diinduksi aloksan dosis 130 mg/kg BB lalu diberi ekstrak etanol batang HF dosis 0,27 gram/Kg BB
- f. Kelompok VI :kelompok perlakuan diinduksi aloksan dosis 130 mg/kg BB lalu diberi ekstrak etanol batang HF dosis 0,54 gram/Kg BB

## 3. Induksi diabetes dengan aloksan

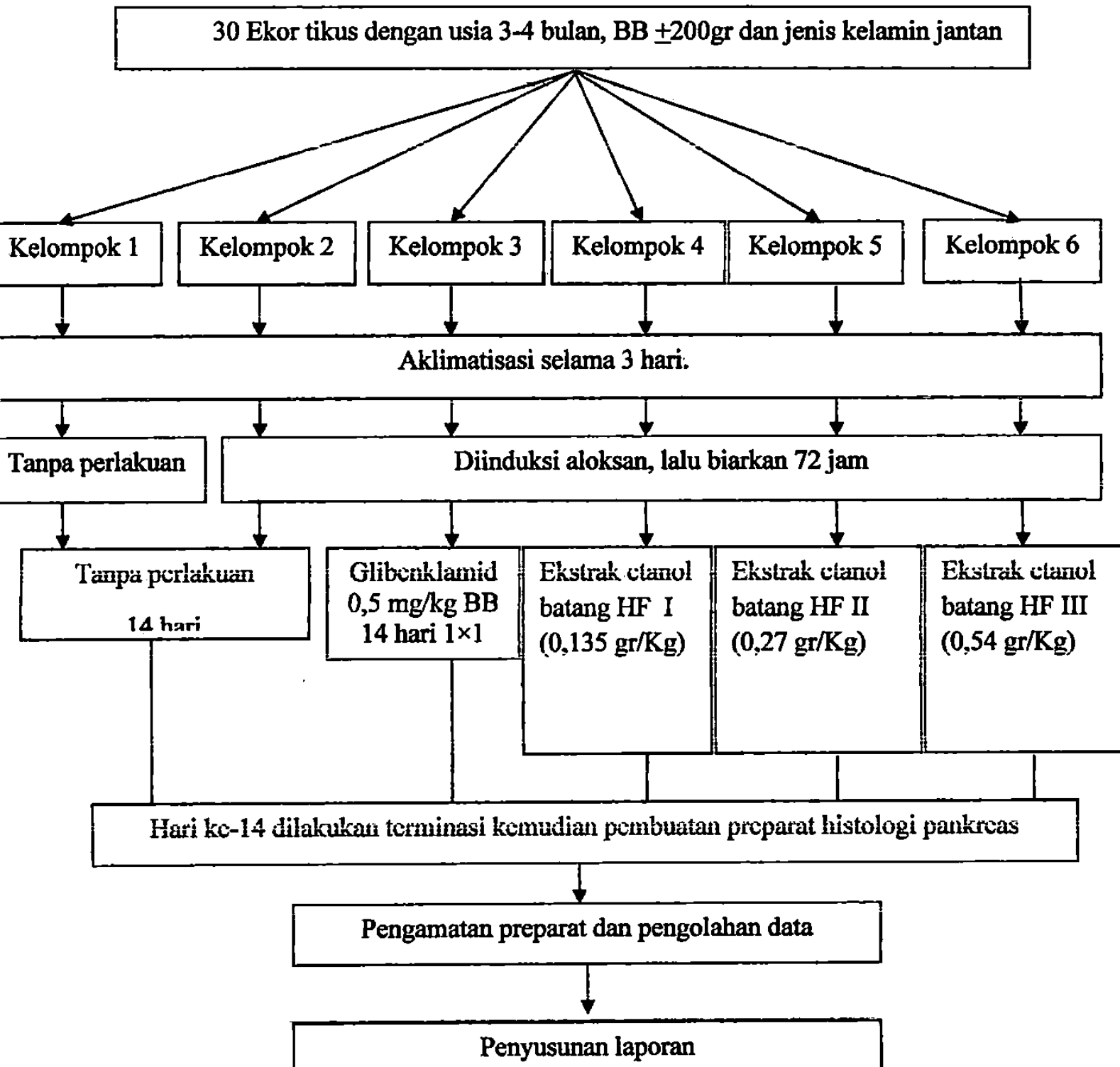
Subyek diaklimatisasi dalam kandang selama 4 hari dan diberi pakan dan minum seperti biasanya. Setelah itu, kelompok 2-6 diinduksi aloksan secara intraperitoneal dengan dosis 130 mg/kg BB, kemudian tikus dipuasakan selama 72 jam untuk membiarkan aloksan bekerja. Injeksi intraperitoneal sering dilakukan pada hewan laboratorium seperti mencit dan tikus. Aloksan yang

... dalam rongga peritoneum akan diserap cepat sehingga reaksi

#### 4. Uji efek ekstrak etanol batang HF

Kelompok 1 tanpa perlakuan. Kelompok 2 hanya diberi aloksan. Kelompok 3, setelah diinduksi aloksan diberi glibenklamid dengan dosis 0,5 mg/kg BB. Kelompok 4, 5 dan 6 setelah diinduksi aloksan, diberikan ekstrak etanol batang HF masing-masing kelompok dengan dosis 0,135 gram/kg BB, 0,27 gram/kg BB dan 0,54 gram/kg BB diberikan 1×1 hari selama 14 hari. Setelah itu organ pankreas diambil dari 30 tikus dengan melakukan *cervical dislocation* terlebih dahulu sebelum dilakukan pembedahan di bagian dada tikus sampai ke perut. Setelah organ pankreas diambil, pankreas tersebut difiksasi menggunakan formalin 10%. Pembuatan preparat histologi dengan metode parafin, pewarnaan Gomori Chromalum untuk melihat tingkat kerusakan sel  $\beta$  pulau langerhans. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop,

## I. Skema Prosedur Penelitian



## **J. Analisis data**

Data jumlah sel  $\beta$  pankreas menunjukkan distribusi normal dengan  $\alpha > 0.05$ . Data jumlah sel  $\beta$  pankreas dianalisis dengan uji one-way anova diikuti