BAB III

METODE PENELITIAN

3.1.Jenis penelitian : Eksperimental murni dengan pendekatan *post test-only control group design.*

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan bulan September 2011-Desember 2011 di :

1. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau.
2. Laboratorium Central Fakultas Kedokteran Universitas Riau

3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 30 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat badan antara 175 – 200 g .

3.4. Definisi Operasional

1. Minyak buah merah adalah minyak buah merah yang diberikan kepada tikus dengan dosis 0,3 ml/KgBB/hari pada grup 3 dan 6.
2. Glibenklamid adalah glibenklamid yang diberikan kepada tikus dengan dosis 0,09 mg/kgBB/hari pada grup 2 ,3, 5, dan 6.
3. Parenkhim ginjal adalah gambaran struktur mikroskopis yang membentuk lobus-lobus ginjal yang terdiri atas bagian korteks renalis dan medula renalis.
4. Parenkhim hepar adalah gambaran struktur mikroskopis dalam satuan asinus hepar.

3.5. Identifikasi Variabel

a. Variabel bebas yang diteliti adalah minyak buah merah dan glibenklamid.

b. Variabel terikat, dirinci menjadi 2 kelompok.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

b.1. Gambaran parenkhim ginjal

b.2. Gambaran parenkhim hepar.

c. Variabel pengganggu, dirinci menjadi 3 kelompok :

c.1. Variabel pengganggu subjek : berat badan, jenis kelamin, dan umur dikendalikan dengan cara memilih berat badan 175-200 g, jenis kelamin jantan, umur 3 bulan.

c.2. Variabel lingkungan : bentuk, ukuran dan penempatan kandang setiap subjek dikendalikan dengan cara dibuat sama.

c.3. Variabel perawatan : jenis, kuantitas, dan kualitas makanan dan minuman dikendalikan dengan cara yang sama.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat Penelitian

a. Kandang tikus.

b. Timbangan manual Sartorius (kapasitas maksimal 1000 gram) dengan pengukuran satu angka di belakang koma dalam satuan gram.

c. Timbangan analitik Sartorius untuk menimbang glibenklamid.

d. Kanula pencekok tikus.

e. Tabung reaksi untuk menampung darah.

f. Satu set alat bedah minor.

g. Satu set alat untuk pemeriksaan glukosa darah.

h. Satu set alat untuk pemeriksaan preparat dengan pewarnaan hematoksilin eosin meliputi kotak preparat, dissposible syringe (Terumo), blok paraffin, mikrotom, obyek glass, mikroskop cahaya, mikrowave, inkubator,

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.6.2. Bahan Penelitian

a. Makanan

Tikus diberi makan pakan ayam merk comfeed produksi PT. Japfa COMFEED.

b. Minyak buah merah

Minyak buah merah diperoleh dari I Made Budi di Papua.

c. Glibenklamid

Glibenklamid 5 mg produksi PT. Kimia Farma.

d. Streptozotosin

Streptozotosin (MP) dengan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 dibuat dari asam sitrat dan natrium sitrat (Merck, Darmstadt Germany).

e. Satu set reagen untuk pemeriksaan glukosa darah dengan menggunakan metode GOD-PAP (Human Germany).

f. Satu set reagen untuk pemeriksaan hematoksilin eosin.

Bahan pembuatan preparat, yaitu larutan buffer formalin 10% sebagai bahan fiksatif, paraffin sebagai bahan blok, alkohol 50%, 70%, 80%, 95%, alkohol absolut sebagai bahan dehidrasi, larutan .

3.7 Pelaksanaan Penelitian

3.7.1. Penyediaan hewan coba

a. Hewan percobaan adalah 30 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar umur 3 bulan diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta.

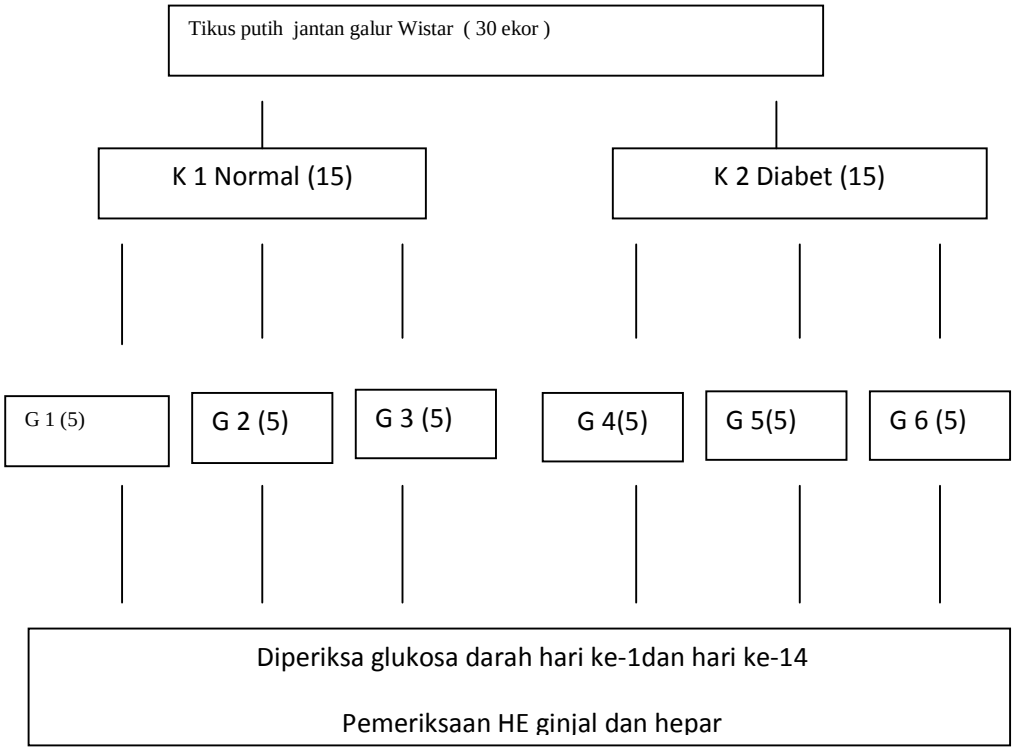
Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

b. Penimbangan berat badan tikus untuk mendapatkan berat badan yang sesuai kriteria yaitu 175-200 gram. Selanjutnya penimbangan berat badan dilakukan setiap satu minggu sekali selama perlakuan.

c. Hewan coba dilakukan adaptasi selama satu minggu sebelum perlakuan dan pemberian makan secara *ad libitum*. Jumlah makanan yang diberikan 5 mg/ 100 g BB/ekor/hari. Sisa makanan setiap hari ditimbang (Kusumawati, 2004).

d. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 2 yaitu kelompok tikus normal dan kelompok tikus diabetes, setiap kelompok berjumlah 15 ekor tikus. Kemudian setiap kelompok dibagi secara acak menjadi 3 grup masing-masing berjumlah 5 ekor. Kelompok tikus normal terdiri grup 1, 2, dan 3. kelompok tikus diabetes terdiri grup 4, 5, dan 6.

e. Hewan coba dalam satu grup dipelihara dalam satu kandang.



Gambar 14. Pengelompokan hewan coba

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.7.2. Pembuatan minyak buah merah

Pembuatan minyak buah merah dilakukan dengan cara sebagai berikut : (1) Penyiapan dan identifikasi buah merah (*P. conoideus* Lam.) : Buah merah dipilih yang sudah matang, ditandai dengan kulit buah berwarna merah menyala dan jarak antar tonjolan makin jarang. (2) Pembuatan simplisia buah merah (*P. conoideus* Lam.) : Simplisia berupa buah, dibelah kemudian dikeluarkan empulurnya (berupa kayu dibagian tengah). Kemudian dipotong – potong lalu dicuci dengan air bersih. (3) Pembuatan minyak buah merah : (a) Buah yang sudah dipotong–potong direbus menggunakan air mineral di atas api sedang selama 1–2 jam. Setelah matang (ditandai daging buah menjadi lunak) diangkat dan didinginkan. (b) Kemudian ditambahkan air sedikit, lalu diremas-remas dan buah merah diperas hingga daging buah terpisah dengan biji. Selanjutnya ditambah air lagi hingga ketinggian 5 cm diatas permukaan bahan. Lalu diremas kembali hingga biji benar–benar berwarna putih dan bersih dari daging. Proses ini akan didapatkan sari buah merah yang menyerupai santan. (c) Lalu sari buah merah disaring untuk memisahkan bijinya dengan saringan cendol. (d) Sari buah merah dimasak dalam wajan dengan api sedang (40 ^{o}C) selama 5 – 6 jam sambil diaduk-aduk. Bila sudah muncul minyak yang berwarna kehitaman di permukaan, api dimatikan dan pengadukan dilanjutkan selama 10 menit agar proses pendinginan lebih cepat. (e) Wajan diangkat dan didiamkan selama satu hari hingga terbentuk tiga lapisan, yaitu lapisan air di bagian paling bawah, ampas di lapisan tengah dan minyak di lapisan atas. Minyak diambil dengan sendok secara perlahan lahan. (f) Minyak dipindahkan ke dalam wadah transparan (gelas/mangkuk) lalu didiamkan selama 3 jam hingga minyak, ampas dan air benar-benar terpisah. Langkah ini bisa dilakukan beberapa kali hingga

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

didapatkan minyak yang terbebas dari air dan ampas (Budi & Paimin, 2005; Anonim[a], 2005).

3.7.3. Pemeriksaan kadar glukosa darah puasa.

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan pada kedua kelompok tikus. Tikus dipuasakan selama satu malam (10-12 jam) kemudian dilakukan pengambilan darah pada jam 08.00 WIB untuk pemeriksaan kadar glukosa darah. Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui kadar glukosa darah tikus sebelum dilakukan perlakuan dan untuk mendapatkan sampel tikus dengan kadar gula darah yang masih normal.

3.7.4. Induksi diabetes pada kelompok II (grup 4, 5, dan 6).

Tikus putih jantan sebanyak 15 ekor dipuasakan selama satu malam (10-12 jam). Selanjutnya tikus diinjeksi streptozotosin dosis 60 mg/KgBB dalam buffer sitrat pH 4,5 secara intraperitoneal sebanyak satu kali. Tikus kontrol diinjeksi dengan buffer sitrat dengan dosis yang sama (Yavuz, 2003). Satu jam setelah tikus diinjeksi streptozotosin diberikan dextrosa 10% peroral untuk menghindari terjadinya hipoglikemik.

Cara penyuntikan : tempat penyuntikan di quadrant kiri abdomen bagian bawah dan jarum dimasukkan sejajar dengan kaki kiri kemudian didorong melalui dinding abdomen ke dalam rongga peritoneal (Kusumawati, 2004). Hiperglikemia terjadi setelah 2 hari diinjeksi streptozotosin. Kadar glukosa darah puasa lebih dari 240 mg/dl yang dipilih sebagai subjek penelitian. Kadar glukosa darah normal tikus adalah 50-135 mg/dl (Fox, 1984 *cit* Kusumawati, 2004).

3.7.5. Penentuan dosis dan lama perlakuan

a. Penentuan dosis minyak buah merah.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Dosis minyak buah merah yang digunakan adalah 0,3 ml/Kg BB/ hari. Dosis ini merujuk pada dosis yang paling adekuat yang dihasilkan pada penelitian sebelumnya (Wahyuniari, 2006).

b. Penentuan dosis glibenklamid

Dosis glibenklamid dihitung berdasarkan konversi perhitungan dosis menurut Ghosh (1971) :

$$\frac{\text{Dosis orang dewasa (70 Kg)}}{\text{Dosis tikus (200 g)}} = \frac{56,0}{1,0}$$

Maka bila dosis glibenklamid orang dewasa 5 mg/dose maka dosis glibenklamid untuk untuk tikus adalah :

Dosis tikus = (1: 56) X 5 mg

= 0,09 mg/Kg BB (Kusumawati, 2004).

3.7.6. Pemberian minyak buah merah dan glibenklamid

Kelompok tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar normal maupun diabetes diberi perlakuan sebagai berikut :

Grup 1 sebagai kontrol normal.

Grup 4 sebagai kontrol diabetes.

Grup 2 dan 5 diberikan glibenklamid 0,09 mg/Kg BB/hari.

Grup 3 dan 6 diberikan minyak buah merah 0,3 ml/Kg BB/hari dan glibenklamid 0,09 mg/Kg BB/hari.

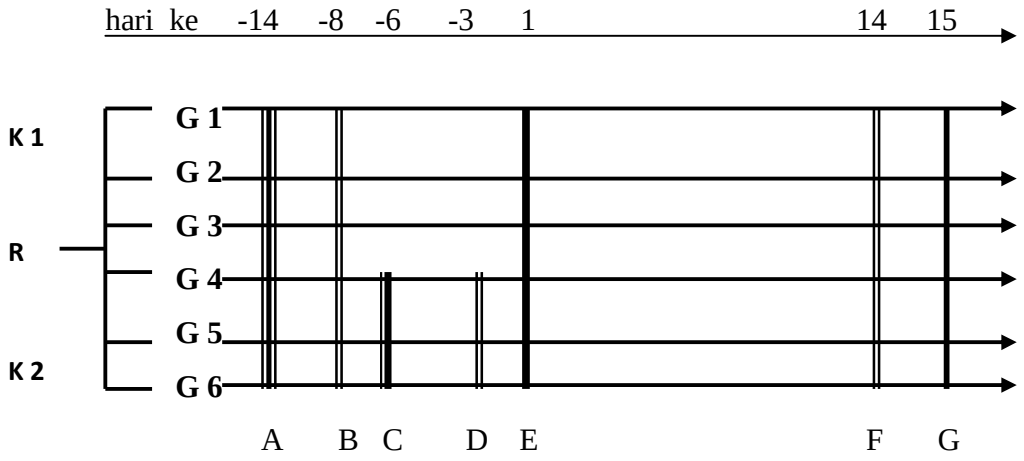
Pemberian minyak buah merah dan glibenklamid dilakukan secara per oral hingga hari ke-14. Kadar glukosa darah puasa diukur secara periodik pada hari ke-1, 7, dan 14, serta

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

secara serial pada hari ke-14 dari jam ke-0 (awal perlakuan) 1; 2; 4; 6. Setiap pemeriksaan kadar glukosa darah, tikus dipuasakan selama satu malam (10-12 jam), dan pada jam 08.00 WIB dilakukan pengambilan darah. Pada hari ke-15 tikus dibunuh dengan cara didekapitasi dan dilakukan pembedahan untuk mengambil pankreas.

Dikarenakan untuk melakukan pemeriksaan kadar glukosa darah serial dan pembedahan hewan coba sebanyak 30 ekor tidak mungkin dilakukan dalam satu hari, maka untuk memudahkan dalam pelaksaan penelitian, hari pertama perlakuan dilaksanakan pada hari yang berbeda setiap dua grup. Awal perlakuan dilakukan secara berurutan, dimulai dari grup G1 dan G2, hari berikutnya G3 dan G4, dan hari selanjutnya G5 dan G6.

Skema alur penelitian dirangkum dalam gambar dibawah ini.



Gambar 16. Skema alur penelitian. Keterangan gambar sebagai berikut:

A. Mulai adaptasi hewan coba hari ke -14 sebelum pelakuan.
B. Pemeriksaan kadar glukosa darah grup 1-6 untuk menentukan bahwa kadar glukosa darah sampel masih normal.
C. Induksi diabetes grup 4-6 dengan streptozotosin 60 mg/kaBB pada hari –6 sebelum perlakuan.
D. Pemeriksaan kadar glukosa darah grup 4-6 untuk menentukan bahwa sampel sudah menjadi diabetes.
E. Awal perlakuan yaitu grup 1 dan 4 tidak diberikan perlakuan; grup 2 dan 5 diberi glibenklamid 0,09 mg/kgBB/hari ; grup 3 dan 6 diberi minyak buah merah 0,3 ml/kgBB/hari dan glibenklamid 0,09 mg/Kg BB/hari. Perlakuan ini

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

diberikan dari hari pertama hingga hari ke-14. Pemeriksaan kadar glukosa darah puasa grup 1-6.

F. Pemeriksaan kadar glukosa darah puasa grup1-6 pada jam 08.00 WIB setelah dipuasakan 10-12 jam sebelumnya. hewan coba diambil darah dari sinus orbitalis
G. Hewan coba dibunuh dengan cara didekapitasi, kemudian diambil ginjal dan hepar untuk dilakukan pemeriksaan HE.

3.7.7. Pengambilan Darah

Dilakukan melalui sinus orbitalis. Canthus medialis mata ditusuk dengan menggunakan tabung mikrohematokrit sampai mengenai vena retro orbitalis. (Kusumawati, 2004). Sampel darah yang keluar ditampung dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm (*rounds per minute*) selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan metode GOD-PAP. Prinsip metode ini adalah :

Glucose + O_2 --------> Gluconic Acid + H_2O_2

$2H_2O_2$ + 4-Aminoantipyrine + Phenol ------> Chinonimine + 4 H_2O

Setelah darah disentrifus, serum diambil sebanyak 10 µl untuk diperiksa GOD-PAP. Kemudian larutan tersebut diinkubasi dengan suhu 28 ^{0}C selama 10 menit. Serapan larutan sampel ini dan larutan baku diukur terhadap blangko vitalab mikro pada panjang gelombang (λ) 500 nm, sehingga dapat diketahui nilai kadar glukosa darah.

3.7.8. Pembuatan sediaan hematoksilin eosin ginjal dan hepar

Pemeriksaan ginjal dan hepar dengan menggunakan metode paraffin. Tahap-tahap pembuatan preparat adalah sebagai berikut :

a. Fiksasi

Pankreas yang sudah diambil melalui pembedahan difiksasi dalam larutan buffer formalin 10%.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi dilakukan secara bertahap. Pertama dilakukan dehidrasi dalam larutan alkohol 50% , 70% , 80% , 95% , 100% dengan lama waktu yang sama untuk setiap kadar alkohol yaitu 90 menit sebanyak 2 kali.

c. Clearing

Pankreas dimasukkan ke dalam larutan yang berisi xylol selama 90 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali.

d. Infiltrasi

Proses infiltrasi dilakukan dengan memasukkan pankreas ke dalam larutan parafin 90 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali. Infiltrasi dilakukan di dalam oven dengan suhu 60 ^{o}C.

e. Embedding

Pankreas dan larutan paraffin dimasukkan kedalam cetakan blok paraffin dan dibiarkan selama ± 3 jam atau sampai paraffin membeku.

f. Sectioning

Blok paraffin yang sudah terbentuk dilakukan pemotongan dengan rotary mikrotom. Jaringan dipotong dengan ketebalan 3 – 4 µm dan diletakkan di atas obyek glas.

g. Deparafinisasi.

Preparat secara berurutan dimasukkan kedalam larutan xylol, alkohol 100%, alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 70%, alkohol 50%, selama masing-masing 90 menit sebanyak 2 kali.

h. Pewarnaan (Staining)

Preparat kita masukkan dalam larutan hematoksilin, kemudian dilanjutkan dalam larutan eosin. Preparat kemudian dijernihkan dalam larutan xylol.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

j. Preparat diberi balsam kanada dan kemudian ditutup dengan deck glass.

3.7.9. Pengamatan

Sediaan dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Ginjal diamati dengan melihat gambaran parenkhim ginjal secara kualitatif. Pengamatan difokuskan kepada perubahan struktur mikroskopis pada area korteks ginjal dan medula ginjal. Area korteks ginjal dilihat corpusculum renalis malphigi dan sistem tubulus. Area medula ginjal diamati sistem tubulus ginjal. Parenkhim ginjal juga diamati secara semikuantitatif, yaitu membandingkan jumlah corpusculum renalis malphigi pada area korteks. Corpusculum malphigi renalis dihitung secara selang seling dalam satu piramis renalis. Satu pramis renalis pada area korteks dibatasi oleh prosesus ferini atau medulla rays. Setiap satu piramis renalis diambil satu lapangan pandang dengan bagian tengah piramis korteks sebagai usat lapang pandang.

Hepar diamati secara kualitatif, yaitu dilihat perubahan parenkhim hepar. Pengamatan parenkhim hepar berdasarkan lobus hepar. Lobus hepar adalah satu lobus dengan pusat vena sentralis dan bagian tepi berupa jaringan pengikat tipis yang membatasi dengan lobus lainnya.

3.8. Analisa Data

Data kualitatif parenkhim ginjal dan hepar dianalisis dan diperbandingkan antar kelompok percobaan. Data semi kuantitatif corpusculum renalis malphigi dilakukan uji non parametrik Kruskall-Wallis.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/