

BAB III

CARA PENELITIAN

1.1 Rancangan Penelitian

1. Jenis penelitian : Eksperimental murni dengan pendekatan *post test-only control design*.
2. Identifikasi Variabel
 - a. Variabel bebas yang diteliti adalah minyak buah merah dan glibenklamid.
 - b. Variabel terikat, dirinci menjadi 2 kelompok.
 - b.1. Jumlah sel β pankreas.
 - b.2. Jumlah pulau Langerhans pankreas.
 - 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, dan 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.

3.2 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. Jumlah sel β pankreas adalah jumlah keseluruhan yang dihitung setelah diberi pewarnaan immunohistokimia menggunakan antibodi anti-insulin.
4. Jumlah pulau Langerhans pankreas adalah jumlah keseluruhan yang dihitung setelah diberi pewarnaan immunohistokimia menggunakan antibodi anti-insulin.

3.3 Bahan Penelitian

1. Hewan Percobaan

Hewan percobaan adalah 30 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat badan antara 175 – 200 g diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta.

2. Makanan

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

4. Minyak buah merah

Minyak buah merah diperoleh dari I Made Budi di Papua.

5. Glibenklamid

Glibenklamid 5 mg produksi PT. Kimia Farma.

6. Streptozotosin

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

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

8 Satu set reagen untuk pemeriksaan imunohistokimia sel β pankreas.

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 hematoxillin mayer sebagai counterstain, distrene plasticiser xylene sebagai bahan penutup, aquadest, antibodi monoclonal anti-insulin sebagai antibodi primer, normal rabbit serum sebagai blocking, larutan phosphat buffer saline/PBS 0,01 M pH 7,1, larutan H₂O₂ 3%, biotinylated secondary antibody, streptavidin peroxidase conjugated, DAB (3,3 Diaminobenzidine) sebagai cromogen (Novocastra).

3.4 Alat Penelitian

1. Kandang tikus.
2. Timbangan manual Sartorius (kapasitas maksimal 1000 gram).
3. Timbangan analitik Sartorius untuk menimbang glibenklamid.
4. Kanula pencekok tikus.
5. Tabung reaksi untuk menampung darah.
6. Satu set alat bedah minor.
7. Satu set alat untuk pemeriksaan glukosa darah.
8. Satu set alat untuk pemeriksaan imunohistokimia meliputi kotak preparat, disposable syringe (Terumo), blok paraffin, mikrotom, obyek glass poly-L-lysin, mikroskop cahaya, mikrowave, inkubator, tabung eppendorf..

3.5 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada beberapa tempat :

1. Laboratorium Gizi Pusat Antar Universitas UGM sebagai tempat pemeliharaan hewan percobaan dan pemeriksaan kadar glukosa darah.
2. Laboratorium Patologi Anatomi R.S. Dr. Sarjito sebagai tempat untuk pemeriksaan imunohistokimia.

3.6 Jalan Penelitian

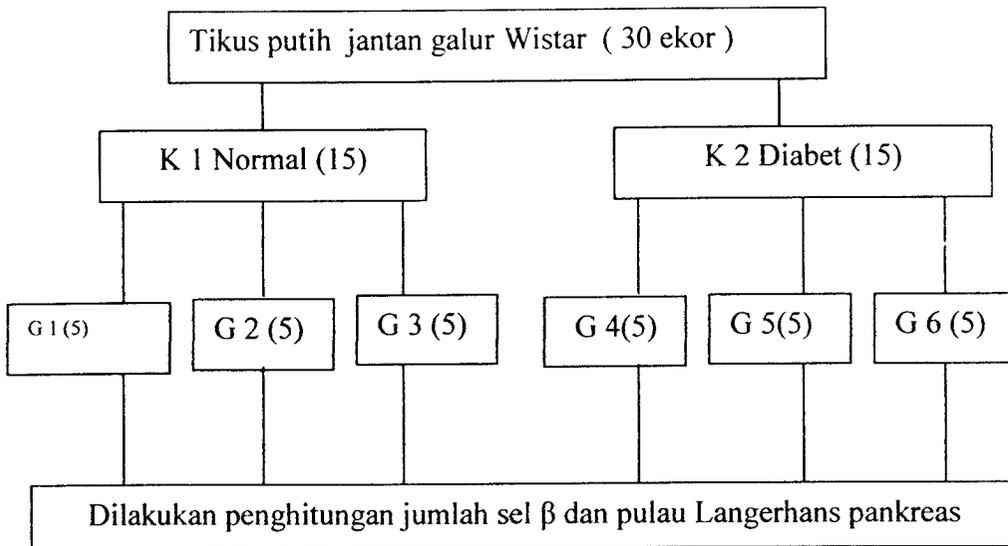
1. Persiapan Penelitian

1.1. 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.
- 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 6. Pengelompokan hewan coba

1.2. 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 °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 didapatkan minyak yang terbebas dari air dan ampas (Budi & Paimin, 2005; Anonim^a, 2005).

1.3. 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.

1.4. 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 streptozotocin 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 streptozotocin 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 streptozotocin. Kadar glukosa darah puasa lebih dari 200 mg/dl yang dipilih sebagai subjek penelitian. Kadar glukosa darah normal tikus adalah 50-135 mg/dl (Fox, 1984 *cit* Kusumawati, 2004).

1.5. Penentuan dosis dan lama perlakuan

3.7 Penentuan dosis minyak buah merah.

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).

3.8 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 tikus adalah :

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus} &= (1: 56) \times 5 \text{ mg} \\ &= 0,09 \text{ mg/Kg BB (Kusumawati, 2004).} \end{aligned}$$

1.6. Pemberian minyak buah merah dan glibenklamid

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

Grup 1 dan 4 tidak diberikan perlakuan

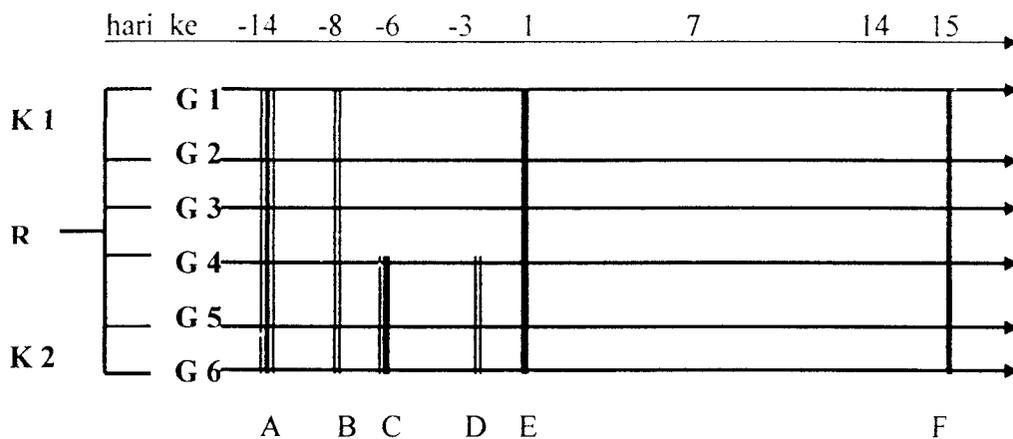
Grup 2 dan 5 diberikan glibenklamid 0,09 mg/Kg BB/hari.

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. 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 pelaksanaan 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 7. Skema alur penelitian. Keterangan gambar sebagai berikut:

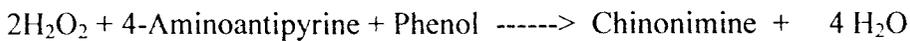
- A. Mulai adaptasi hewan coba hari ke -14 sebelum perlakuan.
- B. Pemeriksaan kadar glukosa darah grup 1-6 untuk menentukan bahwa kadar glukosa darah sampel masih normal.
- C. Induksi diabetes grup 4-6 dengan streptozotocin 60 mg/kaBB pada hari -6 sebelum perlakuan.
- D. Pemeriksaan kadar glukosa darah 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 diberikan dari hari pertama hingga hari ke-14. Pemeriksaan kadar glukosa darah puasa grup 1-6.
- F. Hewan coba dibunuh dengan cara didekapitasi, kemudian diambil pankreas untuk dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

2. Pelaksanaan Penelitian

2.1. 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 :



Setelah darah disentrifus, serum diambil sebanyak 10 µl untuk diperiksa GOD-PAP.

Kemudian larutan tersebut diinkubasi dengan suhu 28 °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.

2.2. Pembuatan sediaan imunohistokimia sel β pankreas

Pemeriksaan sel β pankreas dengan membuat preparat imunohistokimia 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%.

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.

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 °C.

e. Embedding

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

f. Sectioning

Blok paraffin yang sudah terbentuk dilakukan pemotongan dengan rotary mikrotom. Jaringan dipotong dengan ketebalan 3 – 4 μ m dan diletakkan di atas obyek glas poly-L-lysine, kemudian dibiarkan di inkubator selama semalam pada suhu 40° C.

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. Preparat dicuci dengan Phosphat Buffer Saline (PBS) 10% sebanyak 3 X 5 menit.

Kemudian ditetesi H₂O₂ 0,3% selama 20 menit

i. Kemudian dicuci dengan aquades kemudian PBS 3 X 5 menit kemudian buffer sitrat

dalam microwave selama 10 menit kemudian dibiarkan dingin

selama 20 – 30 menit kemudian dicuci lagi dengan PBS 10% 3 X 5 menit.

j. Kemudian dibloking dengan normal rabbit serum selama 5 menit.

k. Kemudian dibersihkan bagian tepi-tepinya saja tanpa dicuci

l. Kemudian diinkubasi dengan antibodi monoclonal anti-insulin selama satu jam.

m. Dicuci lagi dengan PBS 10% 3 X 5 menit.

n. Kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder biotynilated 100 μ l selama 10 menit.

o. Dicuci dengan PBS 10% 3 X 5 menit.

- p. Ditetesi dengan streptavidine peroxidase 100 μ l selama 10 menit.
- q. Dicuci dengan PBS 3 X 5 menit.
- r. Ditetesi Diaminobenzydin (DAB) selama 5 – 10 menit
- s. Dicuci dengan air kran mengalir selama 10 – 15 menit
- t. Diberi counterstain dengan hematoxylin mayer 3 –4 menit dilanjutkan cuci dengan air kran mengalir 10 - 15 menit.
- u. Dimasukkan alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol absolut xylol 2 kali
- v. Mounting dengan menggunakan E.Z mount

2.3. Pengamatan

Sediaan dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dan difoto dengan menggunakan kamera digital. Selanjutnya dihitung jumlah sel β dan pulau Langerhans pankreas pada seluruh sediaan.

3.7 Analisa Data

Data kuantitatif jumlah sel β dan pulau Langerhans pankreas dilakukan uji statistik menggunakan uji *analysis of varians* (anava) satu jalan dalam satu kelompok.