

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Ruang lingkup penelitian

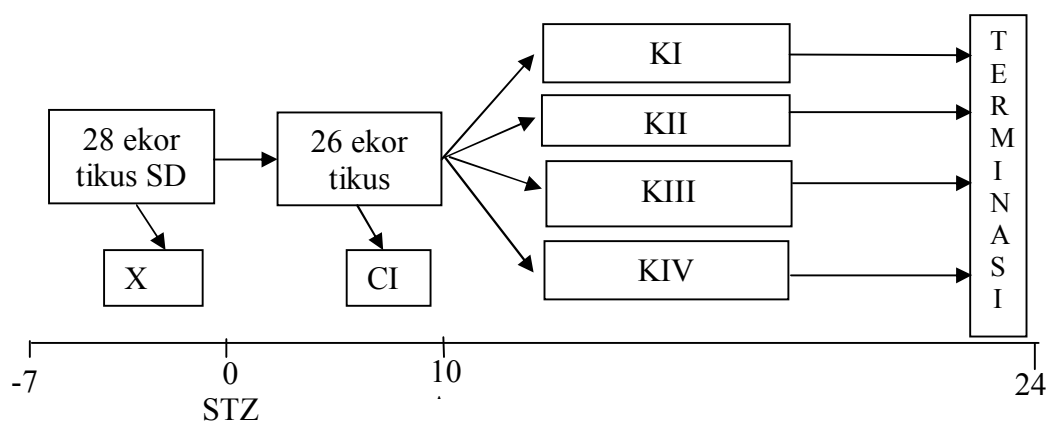
Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu patologi anatomi dan biologi molekuler.

#### 4.2 Waktu dan tempat penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM DIY. Waktu yang diperlukan untuk penelitian dan pengumpulan data lebih kurang 2 bulan.

#### 4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium, menggunakan desain *post test only controlled group* dengan hewan coba tikus jantan albino strain Sprague Dawley.



1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

X : kontrol sehat

CI : cuplikan kedua untuk pemeriksaan gula darah setelah induksi STZ

KI : kelompok perlakuan 1 (Allium sativum 0,10 g/kgbb/hari)

KII : kelompok perlakuan 2 (Allium sativum 0,25g/kgbb/hari)

KIII : kelompok perlakuan 3 (Allium sativum 0,50 g/kgbb/hari)

KIV : kontrol sakit

#### **4.4 Populasi dan sampel penelitian**

##### **4.4.1 Populasi penelitian**

Populasi penelitian meliputi tikus jantan albino strain Sprague Dawley yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

##### **4.4.2 Sampel penelitian**

###### **4.4.2.1 Besar sampel**

Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu setiap kelompok terdiri atas minimal 5 ekor tikus<sup>91</sup>, dengan 4 macam perlakuan, sehingga besar sampel minimal 20 ekor tikus. Besar sampel pada penelitian ini ditentukan 28 ekor tikus, dimana 2 ekor tikus akan diambil secara acak sebagai kontrol sehat, 2 ekor tikus diambil lagi secara acak setelah induksi STZ pada hari ke sepuluh sebagai kontrol tikus diabetes, sisanya 24 ekor tikus dirandom untuk masuk kelompok perlakuan.

#### 4.4.2.2 Cara pengambilan sampel

Sampel penelitian diperoleh dari populasi secara simple random sampling dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi :
  - a. Tikus jantan
  - b. Strain Sprague Dawley
  - c. Umur 1,5-2 bulan
  - d. Berat badan 150-200 gram
  - e. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal.
2. Kriteria eksklusi :
  - a. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif)
  - b. Selama observasi 7 hari tampak sakit (gerakan tidak aktif)
  - c. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*)

### 4.5 Variabel penelitian

#### 4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dosis bertingkat 0,1g/kgBB, 0,25g/kgBB, 0,5g/kgBB. Dosis ditentukan berdasarkan acuan penelitian sebelumnya.<sup>28</sup>

#### 4.5.2 Variabel tergantung

##### 1. Ekspresi insulin menggunakan *Allred score*

Skor *Allred* pada pemeriksaan imunohistokimia insulin merupakan penjumlahan sel  $\beta$  pankreas yang memberikan ekspresi insulin positif per 100 sel pada pulau-pulau langerhans (*Proportion score*) dan skor intensitas warna ekspresi insulin pada sel  $\beta$  pankreas (*Intensity score*).

Skala : Ratio

##### 2. Skor derajat insulitis pada pewarnaan hematoxylin-eosin berupa sebaran sel-sel radang mononuklear(limfosit) sekitar dan di dalam pulau-pulau langerhans pankreas.

Skala : Ordinal

#### 4.6 Definisi operasional

##### Ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) :

Bawang putih yang dipakai dalam penelitian ini didapat dari pasar tradisional Bringharjo, berupa Bawang putih lanang kering diekstraksi di laboratorium LPPT UGM Yogyakarta dengan metoda sokletasi dalam ethanol 80%.

Larutan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) yang diberikan kepada kelompok perlakuan tikus jantan albino strain Sprague Dawley melalui sonde lambung dengan dosis 0,1 g/kgBB/hari, 0,25 g/kgBB/hari, dan 0,50 g/kgBB/hari selama 14 hari.

Skala : Ordinal

**Ekspresi Insulin :**

Dinilai dari jumlah sitoplasma sel  $\beta$  pankreas yang terpulas berwarna coklat (*proportion score*), dan derajat intensitas warnanya (*intensity score*). Jumlah sel dihitung secara manual dalam 100 sel pada pulau-pulau langerhans, sedangkan intensitas warna dinilai dengan kategori negatif, intensitas lemah, sedang dan kuat. Penilaian dengan menggunakan *Allred score* yaitu dengan menjumlahkan *proportion score* dan *intensity score*.

Skala : Ratio

**Derajat Insulitis pankreas :**

Dinilai dari sebaran sel-sel radang mononuklear sekitar pulau-pulau langerhans pankreas, dengan kategori: **negatif** bila tidak terjadi insulitis, **insulitis ringan** bila terdapat sebaran sel-sel radang mononuklear(limfosit) di sekitar pulau langerhans (*periinsulitis*), **insulitis sedang** bila sebaran sel-sel radang mononuklear(limfosit) menginfiltrasi sebagian kecil (<50%) pulau langerhans, **insulitis berat** bila sebaran sel radang mononuklear (limfosit) menginfiltrasi sebagian besar pulau langerhans (>50%), dan **end stage islet** bila seluruh bagian pulau langerhans mengalami nekrosis (*complete  $\beta$  cell loss*).

Skala : Ordinal

**Induksi Streptozotocin :**

Induksi dengan menggunakan streptozotocin dosis 40 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal.

**Glukosa Darah:**

Kadar glukosa darah pada hari kesepuluh, setelah induksi dilakukan untuk menilai keberhasilan induksi STZ, dengan menggunakan Spektrofotometri, kadar glukosa darah puasa dari kapiler > 110 mg/dl.

**4.7 Bahan dan alat****4.7.1 Bahan**

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bahan uji bawang putih (*Allium sativum*) yang diperoleh dari pasar tradisional setempat dan diekstraksi di LPPT UGM.
2. Streptozotocin ALX-380-010 dari ALEXIS Corporation.
3. Bahan-bahan untuk penatalaksanaan jaringan terdiri atas: formalin buffer, alkohol absolute pro analize, xylol, histoplas (parafin).
4. Pewarnaan Hematoxylin Eosin sediaan histopatologik.
5. Bahan-bahan pewarnaan Immunohistokimia dengan metode Peroksidase terdiri atas:

- a. Antibodi primer: *Mouse monoclonal antibody* Insulin Ab-5(Clone INSO5/2D11-H5) Cat.# 1378 dari NeoMarker Lab Vision
- b. KitStarII TrekHRP-D dari Biocare, terdiri atas: *Peroxidazed 1( endogenous peroxidase blocker), Reveal BORGDECLOAKER(or orther HIER buffers BACKGROUNDeraser( protein Blocker), 1X PBS wash buffer, TrekAvidin-HRP, CARDASSIAN DAB Chromogen Substrate*

#### 4.7.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Kandang tikus.
2. Spuit 3cc dengan sonde untuk memasukkan ekstrak per oral.
3. Seperangkat alat bedah minor.
4. Alat-alat ekstraksi bahan obat sesuai prosedur baku LPPT UGM.
5. Alat-alat penatalaksanaan jaringan, pembuatan sediaan histopatologik dan imunohistokimia.
6. Mikroskop binokuler.

## **4.8 Cara kerja**

### **4.8.1 Ekstraksi Bawang putih (*Allium sativum*)**

Seratus gram umbi Bawang putih yang sudah dikeringkan diekstraksi dengan 1000 ml ethanol (80%) dalam Soxhlet apparatus selama 72 jam, kemudian larutan disaring dengan kertas saring dan diuapkan dengan evaporator. Ekstrak bawang putih yang diperoleh disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bahan uji diberikan dalam bentuk suspensi dalam 1 ml air dengan dosis 0,1 g/kgBB, 0,25 g/kgBB, 0,5g/kgBB.<sup>44</sup> Penentuan dosis ini berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.<sup>28</sup>

### **4.8.2 Induksi Streptozotocin**

Dosis yang digunakan pada penelitian ini 40mg/kgBB, intraperitoneal, dosis tunggal.<sup>36</sup>

### **4.8.3 Pemberian Ekstrak Bawang putih (*Allium sativum*)**

Ekstrak Bawang putih diberikan per sonde lambung dengan pelarut 1 ml quadest dengan dosis 0,1g/kgBB, 0,25g/kgBB, 0,5g/kgBB.

### **4.8.4 Pemeriksaan kadar glukosa darah**

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan satu kali pada hari ketiga perlakuan untuk menilai keberhasilan induksi STZ, dengan mengambil darah intraorbital memakai spuit 1cc yang selanjutnya kadar glukosa darah diperiksa dengan teknik spektrofotometri.



**4.8.5 Penatalaksanaan jaringan untuk sediaan histopatologi(Lampiran 3)**

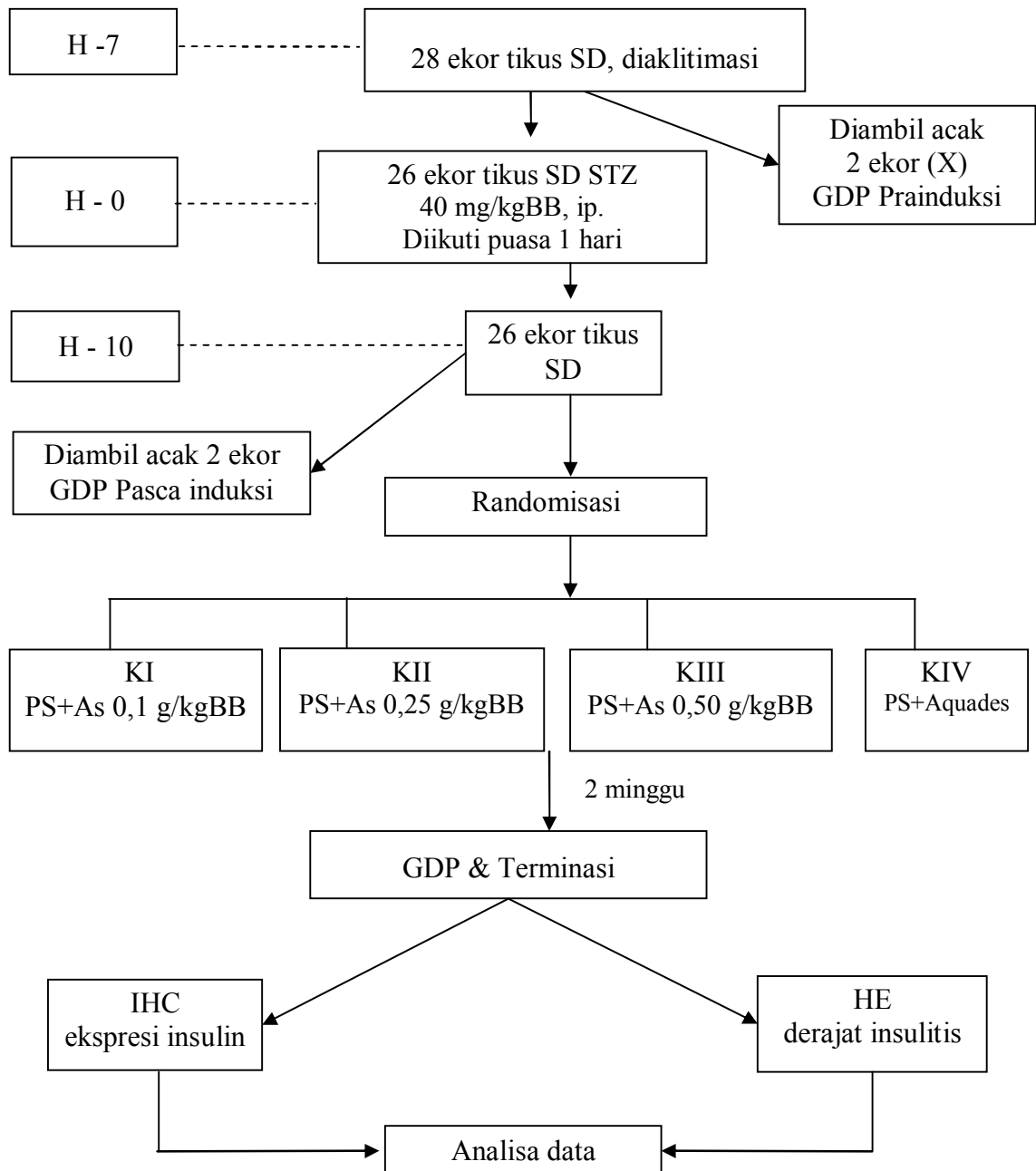
**4.8.6 Pengecatan rutin jaringan Hematoxylin-Eosin(HE)(Lampiran 4)**

**4.8.7 Pembuatan sediaan imunohistokimia (Lampiran 5)**

#### **4.9 Data yang dikumpulkan**

Data-data primer yang dikumpulkan pada penelitian ini meliputi hasil pemeriksaan kadar glukosa darah, pengamatan jumlah sel  $\beta$  yang terpulas warna coklat dan derajat intensitas warna coklat dengan pengecatan insulin pada sel  $\beta$  (*Allred Score*) dan derajat insulitis pankreas tikus Sprague Dawley, setelah mendapat perlakuan.

#### 4.10 Alur kerja



#### Keterangan:

X : Kontrol sehat

KI : Kelompok perlakuan 1 (dosis 0,1g/kgBB/hari)

KII : Kelompok perlakuan 2 (dosis 0,25g/kgBB/hari)

KIII : Kelompok perlakuan 3 (dosis 0,5g/kgBB/hari)

KIV : Kontrol sakit

Sebanyak dua puluh delapan ekor tikus Sprague Dawley diaklimatisasi di laboratorium, dengan dikandangkan secara individual serta diberi ransum pakan standar dan minum secara *ad libitum* selama satu minggu. Secara acak tikus-tikus tersebut diambil 2 ekor untuk kontrol sehat (X), kemudian hari ke sepuluh setelah induksi STZ diambil 2 ekor lagi secara acak, selanjutnya 24 ekor tikus sisanya dirandom dalam empat kelompok, setiap kelompok terdiri dari enam ekor tikus, yang masing-masing dikandangkan tersendiri, diberi pakan standar dan minum *ad libitum*, serta diberi perlakuan sebagai berikut :

Kelompok kontrol sehat (X):

Tikus Sprague Dawley dengan diet standar dan disonde dengan pelarut (aquadest) selama 1 minggu.

Kelompok I (perlakuan I) :

Tikus Sprague Dawley yang telah diinduksi STZ 40 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal, diberi diet standar dan sonde ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) 0,1 g/kgBB setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok II (perlakuan II) :

Tikus Sprague Dawley yang telah diinduksi STZ 40 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal, diberi diet standar dan sonde ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) 0,25g/kgBB setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok III (perlakuan III) :

Tikus Sprague Dawley yang telah diinduksi STZ 40 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal, diberi diet standar dan sonde ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) 0,50g/kgBB setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok IV (kontrol sakit) :

Tikus Sprague Dawley yang telah diinduksi STZ 40 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal, diberi diet standar dan disonde aquadest selama 2 minggu.

Setelah 2 minggu tikus-tikus diterminasi dengan cara dislokasi cervical dimana sebelumnya dilakukan anestesi dengan eter, menurut kelompoknya. Kemudian jaringan pankreas diambil dan dilakukan pemeriksaan terhadap gambaran histopatologik immunohistokimia insulin dan derajat insulitis.

#### 4.11 Analisis data

*Allred score* dari penilaian ekspresi insulin merupakan data dengan skala ratio. Analisis deskriptif ditampilkan dalam bentuk nilai maksimum minimum, rerata dan simpangan baku. Selanjutnya dilakukan uji distribusi dengan *Saphiro Wilk*, ternyata data berdistribusi tidak normal maka dilakukan transformasi data, tetapi distribusi data tetap tidak normal sehingga dilakukan uji hipotesis non parametrik *Kruskal-Wallis*, dilanjutkan dengan uji statistik *Mann-Whitney*.

Derajat insulitis pankreas merupakan data berskala ordinal. Analisis deskriptif ditampilkan dalam bentuk tabel frekuensi dan prosentase. diteruskan dengan uji hipotesis non parametrik *Kruskal-Wallis*, diteruskan dengan uji statistik *Mann-Whitney*. Nilai p dianggap bermakna bila  $p \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan dan power sebesar 80%.

#### **4.12 Etika Penelitian**

Implikasi etik pada hewan, merupakan pengelolaan binatang coba yang dipergunakan dalam penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Adapun hal-hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis dan pemusnahan.