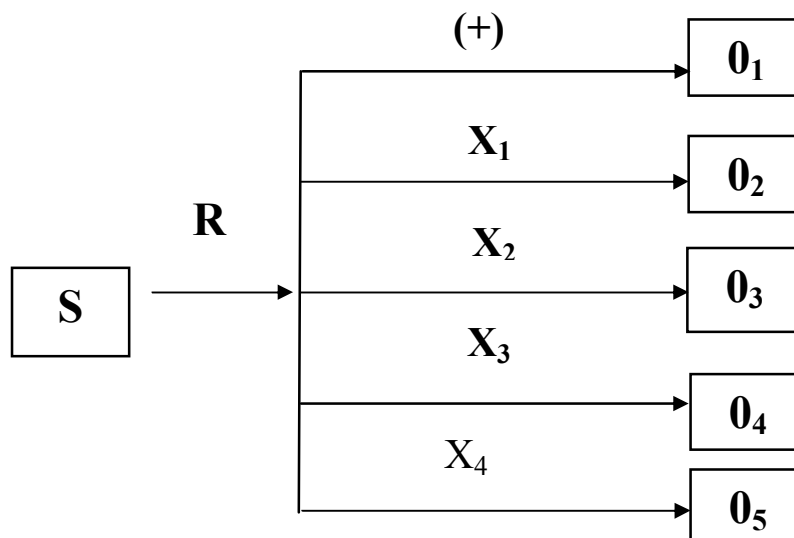


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment* menggunakan pendekatan *the post test only control group design*. Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (*Completely randomized design*) dan rancangan acak sederhana.



Gambar 6. Desain penelitian *the post test only control group design*.^{63,64}

Keterangan:

S : *Sample*

R : Randomisasi

(+) : Kelompok hewan coba kontrol positif tanpa pemberian MC

X₁ : Kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak 10mg/dL

X₂ : Kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak 20mg/dL

X₃ : Kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak 40mg/dL

X₄ : Kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak 80mg/dL

O₁ : Hasil pengamatan kelompok hewan coba kontrol positif tanpa pemberian
MC

O₂ : Hasil pengamatan kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak
10mg/dL

O₃ : Hasil pengamatan kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak
20mg/dL

O₄ : Hasil pengamatan kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak
40mg/dL

O₅ : Hasil pengamatan kelompok hewan coba dengan pemberian MC sebanyak
80mg/dL

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian :

1. Pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) Bidang Layanan Penelitian dan Pengembangan Hewan Percobaan. Pemeliharaan semenjak masa seleksi sampai perlakuan berlangsung dalam waktu 48 hari
2. Pemeriksaan mikroalbuminuria dilakukan di Laboratorium GAKI Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
3. Ekspresi VEGF secara imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS dr. Sardjito UGM Yogyakarta.
4. Penelitian telah dilakukan bulan Nopember 2010 – Maret 2011.

4.3. Populasi dan sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Populasi penelitian adalah tikus strain *Sprague Dawley*, jenis kelamin jantan, berat badan 150-250 gram. Tikus ini merupakan jenis tikus *inbreed* diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian terpadu (LPPT UGM) bidang layanan pra klinik dan pengembangan hewan percobaan.

4.3.2. Sampel Penelitian

Tikus dibagi secara random dalam 5 kelompok yaitu :

Tikus yang digunakan pada masing-masing kelompok perlakuan sebanyak 6 ekor, sehingga jumlah yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor.

Kelompok 1 : kelompok kontrol (+) kelompok tikus dengan induksi STZ tanpa pemberian MC.

Kelompok 2 s/d 5 : kelompok tikus yang diinduksi STZ dan diberi dosis bervariasi ekstrak *Morinda citrifolia* L.

Dengan menggunakan tehnik pencuplikan (*simple random sampling*) dicuplik sebanyak 6 ekor. Penetapan perlakuan terhadap sampel dilakukan secara acak dengan menggunakan table random.

4.4. Kriteria sampel

Kriteria inklusi:

- Umur 12 – 16 minggu
- Jenis kelamin jantan
- Berat badan : 150 – 250 gr
- Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik
- Kadar glukosa darah normal (80 – 120mg/dl)

Kriteria eksklusi :

- Tikus mengalami diare selama penelitian, aktivitas terlihat abnormal
- Kadar glukosa darah tikus tidak normal
- Tikus gagal menjadi tikus DN setelah diinduksi STZ.
- Tikus mati selama perlakuan

4.5. Variabel Penelitian**4.5.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

4.5.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mikroalbuminuria.

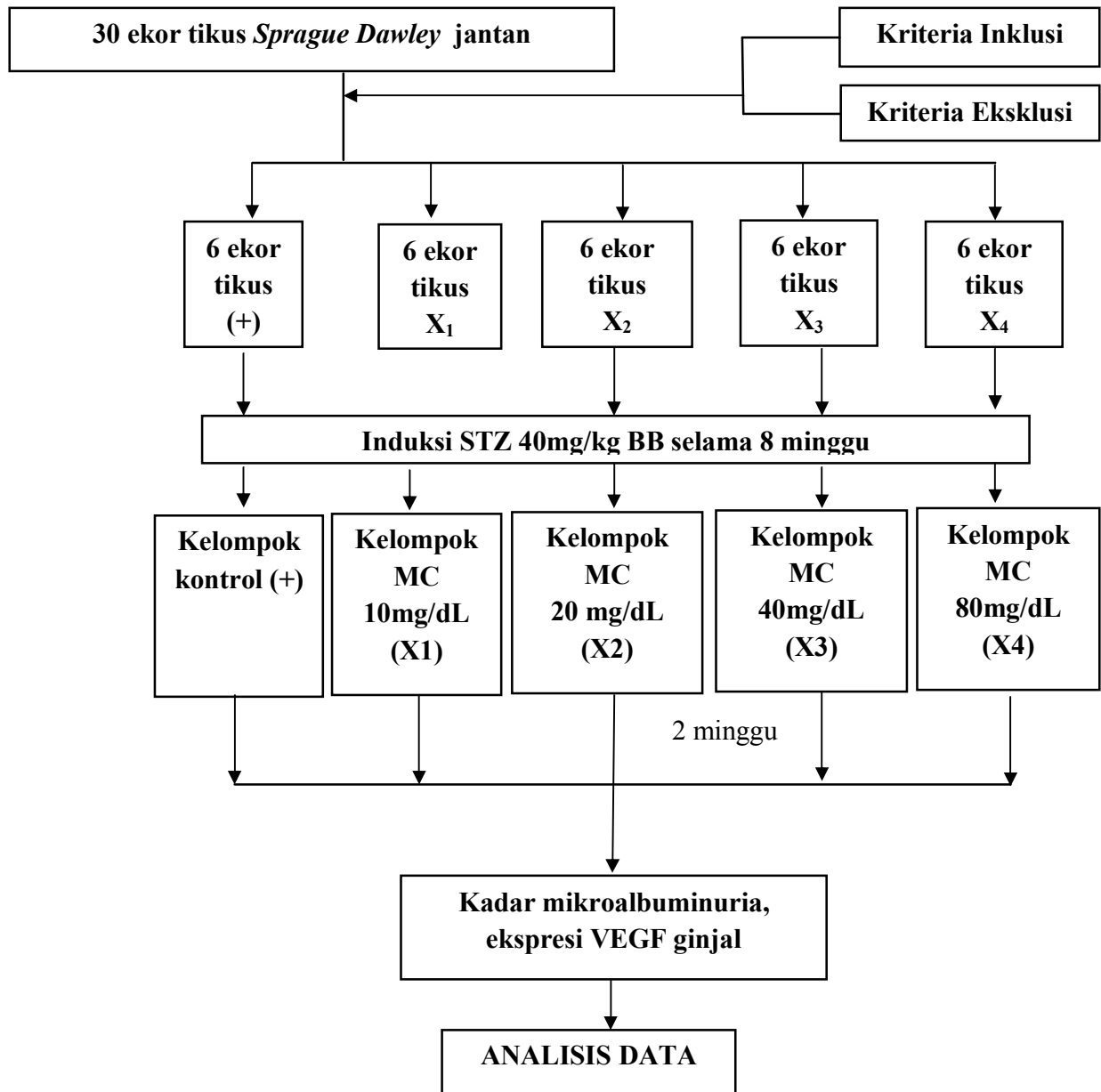
4.5.3. Variabel perantara

Variabel perantara dalam penelitian ini adalah ekspresi VEGF.

4.6. Definisi Operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	CARA UKUR	SATUAN	SKALA
1	Pemberian mengkudu	Mengkudu diberikan dalam bentuk ekstrak mengkudu dengan volume 10 mg/dl, 20 mg/dl, 40 mg/dl, dan 80 mg/dl yang diberikan secara sonde	Penentuan dosis mengkudu untuk tikus berpedoman dosis yang biasa dikonsumsi manusia dan telah disesuaikan dengan penelitian pendahuluan.	mg/dl	Nominal
2	Mikroalbuminuria (MAU)	Kadar ekskresi albumin dalam urin antara 30-300 mg/24 jam atau 20-200 µg/menit pada tikus DM	Perubahan MAU pada akhir penelitian diukur dengan metode ELISA	mg/dl	Nominal
3	Ekspresi VEGF mesangial ginjal	Gambaran VEGF pada sel mesangial ginjal tikus DN yang diperoleh dengan pengecatan imunohistokimia	Ekspresi VEGF pada akhir penelitian dengan pembacaan skoring preparat imunohistokimia dengan metode indeks sklerosis	skoring	Nominal

4.7. Alur Penelitian



Gambar 7. Bagan alur penelitian

4.8. Alat dan Bahan

- 1) Pemeliharaan dan pemberian perlakuan adalah kandang metabolik; kandang individual hewan dan sonde lambung.
- 2) Pemeriksaan kadar gula darah, MAU, VEGF adalah spektrofotometer, sentrifuge, *hooter*, *cooler*, tabung reaksi, pipet Ependorf dan pipet hematokrit.
- 3) *Streptozotocin* cat.#572201 dari Calbiochem^R.
- 4) Bahan: serum darah tikus percobaan di ukur diawal penelitian sebelum pemberian mengkudu untuk menentukan keberhasilan STZ dalam peningkatan kadar gula darah dan mikroalbuminuria.
- 5) Pakan standar *rodentia* PAR_G BR II diperoleh dari LPPT UGM bidang layanan penelitian pra klinik dan pengembangan hewan percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta, terdiri dari: jagung, bungkil kedelai, *wheat pollard*, bungkil kelapa, tepung ikan, tepung daging, tepung beras, tapioka, minyak kelapa, dan minyak ikan premix.
- 6) *Reagen kit* : gula darah, mikroalbuminuria, VEGF.
- 7) Reagen imunohistokimia: Pengecatan jaringan sel ginjal.

4.9. Prosedur Perlakuan:

4.9.1. Pemeliharaan hewan tikus percobaan :

Pemeliharaan tikus percobaan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian terpadu (LPPT UGM) dengan memperhatikan hal-hal sebagai berikut:

1. Tikus dipelihara dalam ruangan yang berventilasi cukup, dikandangkan secara individual dalam kandang metabolik.
2. Suhu ruangan berkisar 28 – 32⁰ C.
3. Makanan dan minuman diberikan *ad libitum* dalam bentuk pellet dan pakan tikus.
4. Kesehatan tikus, setiap hari dilakukan pembersihan kandang.
5. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai jam 06.00 pagi s/d 18.00 petang.)

4.9.2. Perlakuan pemberian *Streptozotocin* (STZ) :

Tikus menjadi hiperglikemia, diperlakukan:

1. Berat badan tikus *Sprague Dawley* jantan ditimbang.
2. Tikus yang terpilih dilakukan aklimatisasi untuk penyesuaian iklim dan keadaan lingkungan barunya.
3. Hewan dipuasakan 10 – 12 jam, diperiksa kadar gula darah.
4. Tikus dikelompokkan, diinduksi STZ 40 mg/kg BB dilarutkan dalam 10 mM sodium sitrat, pH 4,5; dengan cat.#572201 dari Calbiochem^R.

5. Lakukan randomisasi dan dikelompokkan sesuai dengan perlakuan dan dilakukan uji kadar gula darah , MAU dan VEGF.
6. Tikus menjadi nefropati diabetes setelah minggu ke 8.
7. Tikus dipelihara sampai minggu ke 10 dan diperiksa (post test only) kadar gula darah, MAU dan ekspresi VEGF ginjal secara imunohistokimia.

4.9.3. Prosedur pemberian pakan

Tiga puluh ekor tikus diadaptasikan terdahulu selama 1 minggu diberi makan standar PAR_G BR II dan air *ad libitum*. Selanjutnya di induksi STZ , kemudian diukur kadar glukosa darah hingga ditemukan tikus hiperglikemia dan mikroalbuminuria. Tikus dibagi secara acak menjadi 5 kelompok: 1 kelompok kontrol positif diberikan STZ dan 4 kelompok perlakuan STZ diberi ekstrak mengkudu dengan berbagai dosis antara lain: 10mg/dL; 20mg/dL; 40mg/dL; 80mg/dL

4.10. Tehnik Pengumpulan Data

Tiga puluh tikus jantan galur *Sprague Dawley* umur 12 minggu, berat badan 150-250gram, dilakukan randomisasi, diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diadaptasikan dengan diberi pakan standar PAR-G BR II cara *ad libitum*, kemudian diinduksi STZ 40mg/kg STZ dalam 0,1 N Citrat buffer sampai pH 4,3.⁽²²⁾ dan dibiarkan terjadi hiperglikemia dan mikroalbuminuria (kelompok kontrol DN).

Tikus dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol positif dan 4 kelompok perlakuan yang terdiri subkelompok, tikus diberi pakan TLKT dan diberi *Morinda citrifolia*, L selama 2 minggu, ambil sampel darah tikus melalui *plexus retroorbitalis* sebanyak 2 ml. Untuk menentukan ekspresi ginjal secara imunohistokimia, sel ginjal tikus *disacrified*, ginjal diproses.

4.11. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian yaitu kadar mikroalbuminuria, ekspresi VEGF ginjal setelah terkumpul dilakukan *cleaning*, *coding* dan tabulasi selanjutnya di *entry* ke dalam komputer.

a. Analisis deskriptif

Analisis dilakukan secara univariat dengan menghitung nilai mean, median, dan simpang baku terhadap kadar gula darah, mikroalbuminuria, ekspresi VEGF ginjal/perbaikan yang selanjutnya disajikan dalam tabel grafik *boxplot*.

b. Analisis analitik

Analisis data meliputi analisis deskriptif yaitu nilai rerata, standar deviasi (SD), dan grafik. Analisis analitik menggunakan uji beda. Data dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Shapiro-wilk test*. Data tidak normal dilakukan transformasi data, kemudian dilakukan uji beda *one way anova* dan *Kruskal-Wallis*. Perbedaan antara mikroalbuminuria, ekspresi VEGF sesudah

pemberian *Morinda citrifolia* diukur dengan menggunakan *t-paired test*. Uji perbedaan kadar mikroalbuminuria, ekspresi VEGF ginjal diuji dengan uji *Mann-Whitney*. Korelasi mikroalbuminuria dan ekspresi VEGF diuji dengan korelasi *Spearman*.

Seluruh analisis dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas pengolahan dan penyaji *program statistical product and service solution (SPSS) for windows release* yang ada di fakultas kedokteran UNDIP.

4.12. Etika Penelitian

Ethical clearance diajukan melalui Komite Etik Penelitian Kedokteran Universitas Diponegoro di Semarang untuk memperoleh ijin menggunakan hewan coba sebelum penelitian dimulai. Penelitian ini merupakan penelitian dengan ketua tim penelitian dr. Indranila KS, Sp.PK (K) yang meneliti tentang pengaruh pemberian *Morinda citrifolia* terhadap fungsi ginjal nefropati diabetes pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi STZ dengan kajian VEGF, TGF- β , NO, dan ekspansi mesangial. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pemberian *Morinda citrifolia* dapat memperbaiki ginjal tikus Diabetes Nefropati.