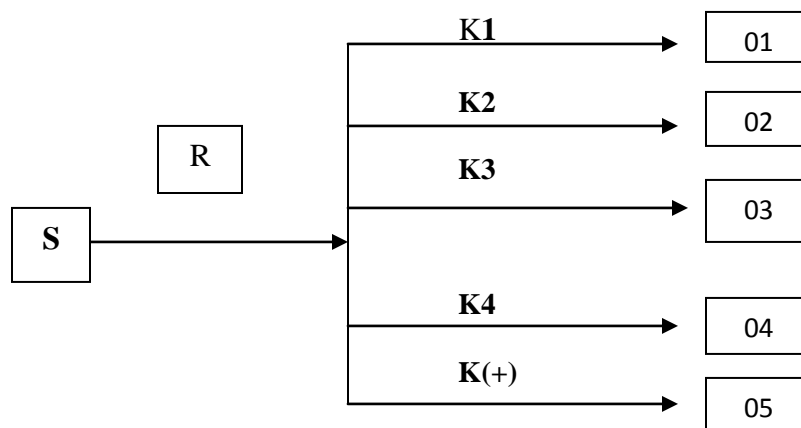


BAB IV

METODA PENELITIAN

4.1. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan pendekatan post test only control group design. Percobaan dilakukan menggunakan randomisasi sederhana. Penelitian menggunakan hewan coba yang diinjeksi Streptozotocin dalam dosis 40 mg/KgBB dosis tunggal. Hewan percobaan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu: kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan, dilakukan pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L, sedangkan keluaran yang diharapkan adalah gula darah, jumlah neutrofil dan ekspresi fibronektin glomerulus.



Gambar 7 : Desain penelitian the post test only control group design

Keterangan

- S : Sample
- R : Randomisasi
- K1 : Kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 10 mg/dl/hr
- K2 : Kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 20 mg/dl/hr
- K3 : Kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 40 mg/dl/hr
- K4 : Kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 80 mg/dl/hr
- K+ : Kelompok hewan perlakuan kontrol positif tanpa pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L
-
- O₁ : Hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 10 mg/dl/hr
- O₂ : Hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 20 mg/dl/hr
- O₃ : Hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 40 mg/dl/hr
- O₄ : Hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L sebanyak 80 mg/dl/hr
- O₅ : Hasil pengamatan kelompok hewan perlakuan kontrol positif tanpa pemberian ekstrak etanol Morinda citrifolia L

4.2. Populasi dan sampel penelitian :

4.2.1 Populasi :

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Sprague Dawley, jenis kelamin jantan, berat badan 180-220 gram. Tikus di inbreed dari LPPU UGM bidang layanan pra klinik dan pengembangan hewan percobaan.

4.2.2. Sampel penelitian

Besar sampel menurut WHO adalah 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 30 ekor, tiap kelompok 6 ekor. Randomisasi : 30 tikus dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok yaitu :

Kelompok Kontrol positif (K+) : 6 ekor

Kelompok Perlakuan (K1) : 6 ekor

Kelompok Perlakuan (K2) : 6 ekor

Kelompok Perlakuan (K3) : 6 ekor

Kelompok Perlakuan (K4) : 6 ekor

Untuk menjamin kecukupan jumlah tikus (dengan memperhatikan kriteria inklusi dan eksklusi) serta guna menjamin akurasi dan validitas dalam analisis inferensial data, dilakukan dengan meningkatkan derajat kebermaknaan dengan memperbesar nilai alfa dan beta, maka hewan coba yang digunakan masing-masing kelompok perlakuan sebanyak 6 ekor, sehingga jumlah yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor. Dengan menggunakan teknik pencuplikan (simple random sampling) dicuplik sebanyak 6 ekor.

4.2.3. Kriteria sampel

Kriteria inklusi :

- Berjenis kelamin jantan
- Berat badan: 180-220 gr
- Kondisi sehat dan tidak ada kelainan anatomik
- Kadar gula darah puasa > 200 mg/dl (tikus benar-benar diabetes mellitus)

Kriteria eksklusi :

- Tikus mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk
- Tikus mati selama perlakuan

4.3. Variabel Penelitian

- Variabel bebas (independent) : dosis ekstrak etanol *Morinda citrifolia*
- Variabel tergantung (dependent) : kadar gula darah, jumlah neutrofil, ekspresi fibronektin glomerulus

4.4. Definisi Operasional

Tabel 2 : Definisi operasional penelitian

NO.	Variabel	Definisi operasional	Satuan	Skala
	Dosis ekstrak etanol Morinda citrifolia L	Morinda citrifolia L diberikan dalam bentuk ekstrak etanol dengan dosis 10 mg/dl, 20 mg/dl, 40 mg/dl dan 80 mg/dl sebanyak 2 ml yang diberikan secara sonde.	mg/dl	Ratio
	Kadar gula darah	kadar gula dalam darah yang diperiksa dengan metode carik celup	mg/dl	Interval
	Jumlah neutrofil	Jumlah neutrofil diukur dengan metode Automatic Hematology Analyser CellDyn3700	Sel /ml	Interval
	Ekspresi fibronectin glomerulus	Ekspresi fibronectin glomerulus diukur dengan melihat ekspresi fibronectin glomerulus setelah pengecatan imunohistokimia skala 0- 4 (lampiran 3)	Skala intensitas dalam area 0 = < 5% 1=5-25% 2=25-50% 3=50-75% 4= >75%	Ordinal

4.5. Alat dan Bahan :

Alat :

1. Kandang
2. Glucocard, untuk pemeriksaan kadar gula darah
3. Hematology analyser Cell-Dyne 3700, untuk pemeriksaan darah rutin/
Neutrofil
4. Mikrotom, microwave, staining jarh : pengecatan imunohistokimia

Bahan :

1. Pakan standar rodentia PAR_G BR II
2. Streptozotocin cat.#572201 dari Calbiochem
3. Darah tikus SD
4. Ginjal tikus
5. Reagent Anti Fibronectin
6. Ekstrak etanol Morinda citrifolia L

4.6. Prosedur Perlakuan :

4.6.1. Pemeliharaan hewan tikus percobaan:

Guna menjamin aspek kesehatan hewan penelitian, 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. Suhu ruangan berkisar 28-32°C.

2. Makanan dan minuman diberikan ad libitum dalam bentuk pellet dan pakan tikus standar
3. Untuk kesehatan, setiap hari dilakukan pembersihan kandang.
4. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap siklus terang dimulai jam 06.00 pagi s/d 18.00 petang.

4.6.2. Prosedur pemberian pakan

Empat puluh delapan ekor tikus diadaptasikan terdahulu selama 7 hari diberi makan standar 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, minyak ikan premix. Selanjutnya di induksi STZ dan dibiarkan 72 jam, kemudian diukur kadar glukosa darah hingga ditemukan tikus hiperglikemia.

4.6.3. Perlakuan pemberian Streptozotocin (STZ):

Untuk memperoleh hewan percobaan tikus agar menjadi hiperglikemia, maka hewan diinduksi dengan STZ dengan perlakuan:

1. Berat badan tikus Spraque Dawley jantan diukur dengan ditimbang.
2. Tikus yang terpilih kemudian dilakukan aklimatisasi untuk penyesuaian iklim dan keadaan lingkungan barunya.
3. Hewan dipuasakan 10-12 jam kemudian diperiksa kadar gula darah

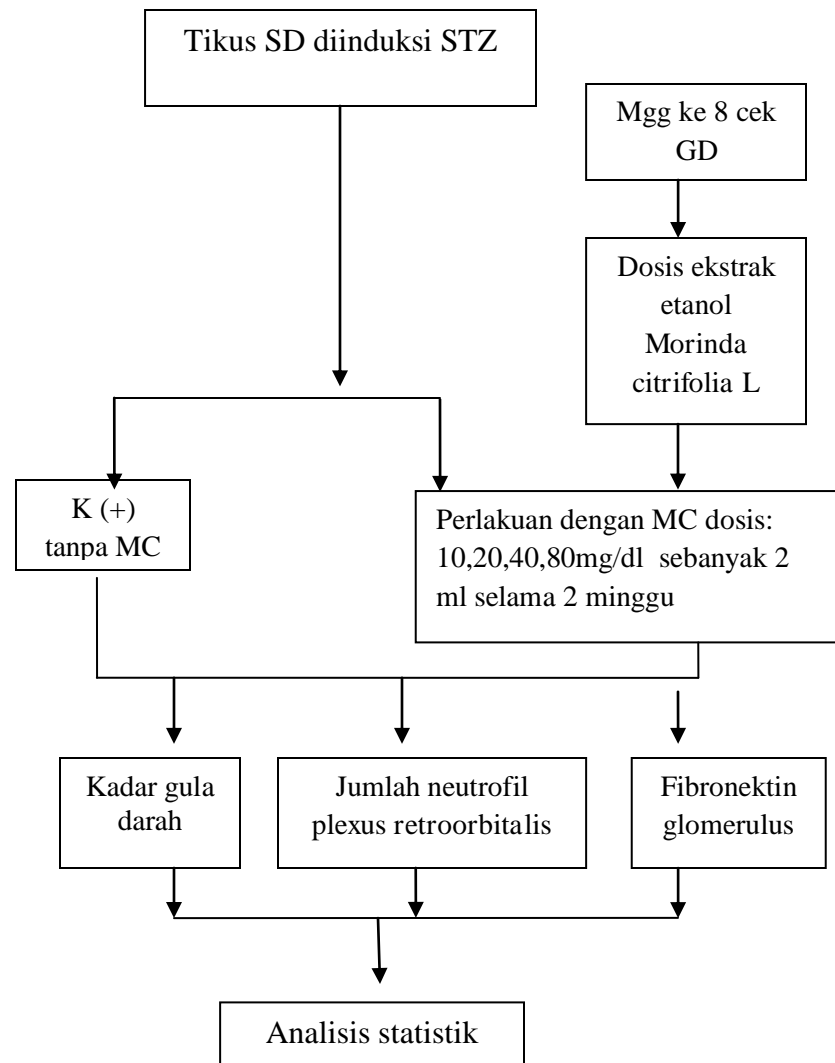
4. Hewan di induksi STZ 40 mg/kgBB dilarutkan dalam 0,1M sodium citrate, pH 5,5 : dengan cat.#572201 dari Calbiochem
5. Setelah 3 hari/72 jam hewan diperiksa kadar gula darah, dipilih hewan dengan kadar gula darah ≥ 200 mg/dl

4.6.4. Perlakuan pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L:

1. Hewan setelah diinduksi STZ, di lakukan randomisasi dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, 1 kelompok kontrol positif diberikan STZ dan 4 kelompok perlakuan STZ diberi ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L dengan berbagai dosis 10 mg/dl/hari; 20 mg/dl/hari; 40 mg/dl/hari; 80 mg/dl/hari.
2. Hewan dipelihara sampai minggu ke -8 kemudian dilakukan pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L sebanyak 2 ml secara sonde selama 2 minggu
3. Setelah 15 hari dilakukan pemeriksaan kadar gula darah, tikus diambil darah untuk pemeriksaan jumlah neutrofil, dan ginjal untuk pemeriksaan fibronektin glomerulus (immunohistokimia)

4.7. Alur Penelitian :

Alur penelitian disajikan dalam gambar sebagai berikut:



Gambar 8 : Bagan Alur penelitian

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian :

Penelitian dilakukan pada bulan November 2010 sampai dengan Maret 2011. Tempat penelitian pada pemeliharaan dan intervensi 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 150 hari.

Pemeriksaan gula darah dilaksanakan di LPPT UGM, pemeriksaan jumlah neutrofil dilaksanakan di LPPT Unit 1 UGM, Pembuatan preparat, pengecatan dan pembacaan fibronektin glomerulus dilakukan pada laboratorium Patologi Anatomi UGM .

4.9. Pengolahan dan analisis data :

Data hasil penelitian yaitu kadar gula darah, jumlah leukosit, dan fibronektin glomerulus setelah terkumpul dilakukan cleaning, coding dan tabulasi selanjutnya di entry ke dalam komputer.

Analisis deskriptif:

Analisis dilakukan secara univariat dengan menghitung nilai mean, median dan simpang baku terhadap, kadar gula darah, jumlah neutrofil, ekspresi fibronektin glomerulus ginjal, selanjutnya disajikan dalam tabel dan grafik.

Analisis analitik:

Analisis kadar gula darah, jumlah neutrofil, ekspresi fibronektin glomerulus setelah pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L meliputi analisis deskriptif yaitu nilai rerata, standar deviasi (SD). Analisis menggunakan uji beda/ ANOVA. Data

dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Shapiro-Wilk test. Analisis yang digunakan untuk mengukur kadar gula darah sebelum dan sesudah perlakuan dengan paired t test dengan uji alternatif Uji Wilcoxon. Untuk mengetahui perbedaan jumlah neutrofil, fibronectin glomerulus sesudah pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L diuji dengan uji Mann-Whitney.

Seluruh analisis dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas pengolah dan penyaji program statistical program for social studies (SPSS) for windows release SPSS versi 17.0

4.10.Etika Penelitian

Ethical clearance diajukan melalui Komite Etik Penelitian Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan No.13/ KEPK/FK.UNDIP-RSDK/2011. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung dengan ketua tim penelitian dr. Indranila KS, SpPK(K) yang meneliti tentang pengaruh pemberian *Morinda citrifolia* terhadap fungsi ginjal diabetes nefropati pada tikus Sprague dawley yang diinduksi STZ dengan kajian VEGF, TGF- β , NO, dan ekspansi mesangial. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan Efek ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L dapat menurunkan kadar gula darah, jumlah neutrofil, dan ekspresi fibronectin glomerulus pada tikus diabetes mellitus

