

4.1. Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*. Disain penelitian ini memberikan efisiensi pelaksanaan penelitian dan memberikan peluang hewan percobaan akan baik selama percobaan relatif tinggi, karena pengamatan dan pengambilan spesimen penelitian hanya dilakukan di akhir penelitian. Penentuan sampel untuk tiap kelompok dilakukan dengan alokasi random.

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus *Sprague dawley* yang diinjeksi *Streptozotocin* dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal. Pemberian STZ dosis 40-60 mg/kgBB secara intravena atau intraperitoneal mampu menginduksi tikus menjadi DM tipe 1.³⁸ Hewan coba dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu kelompok kontrol (diabetik non perlakuan) dan 3 kelompok perlakuan (diabetik dengan pemberian EEDS). Output yang diamati adalah kadar glukosa darah, kadar HbA1c dan ekspresi kolagen pada ekspansi mesangial ginjal. Bagan disain penelitian ini dapat dilihat pada gambar 7.

4.2. Populasi dan sampel penelitian

4.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* yang *diinbreed* dari LPPT UGM bidang layanan pra klinik dan pengembangan hewan percobaan.

4.2.2. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* DM . Jumlah sampel minimal untuk jenis penelitian ini menurut WHO adalah 5 ekor untuk tiap kelompok. Dalam penelitian ini untuk menjamin kecukupan jumlah tikus dengan memperhatikan kriteria inklusi dan eksklusi serta menjamin akurasi dan validitas dalam analisis inferensial data, jumlah hewan coba yang digunakan tiap kelompok adalah 6 ekor, sehingga jumlah hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor. Penentuan hewan coba untuk tiap kelompok dilakukan secara random (*simple random sampling*).

4.2.3. Kriteria sampel

Kriteria inklusi :

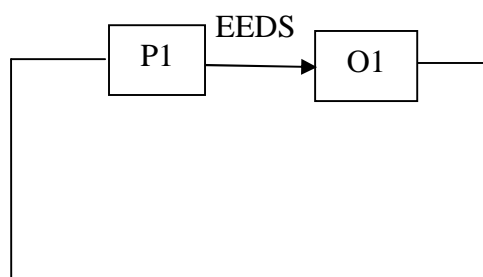
1. Jenis kelamin jantan
2. Usia 45 – 90 hari
3. Berat badan 50 - 200 gr
4. Kadar glukosa darah sewaktu > 200 mg/dl

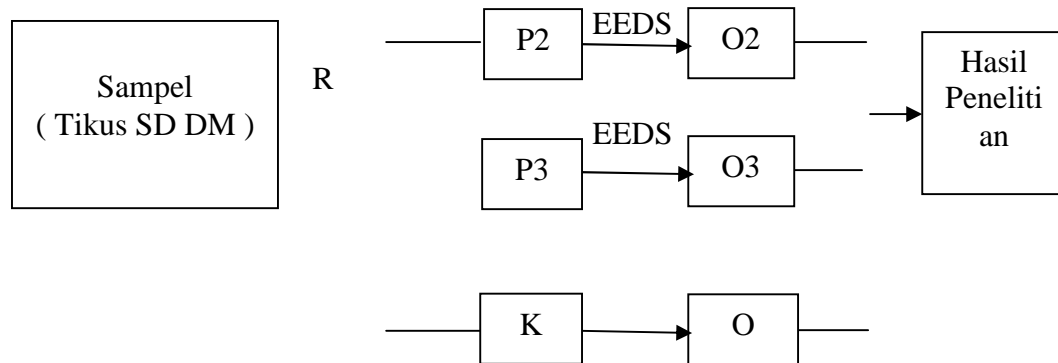
Kriteria eksklusi :

1. Tikus mengalami cacat fisik
2. Tikus mengalami infeksi

Kriteria *Drop Out* :

1. Tikus mengalami diare selama penelitian.
2. Tikus mati pada penelitian





Gambar 7. Bagan disain penelitian

Keterangan :

- S : Sampel
- R : Randomisasi
- P1 : Kelompok perlakuan dengan pemberian EEDS dosis 150 mg/200grBB selama 15 hari
- P2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian EEDS dosis 300 mg/200 grBB selama 15 hari
- P3 : Kelompok perlakuan dengan pemberian EEDS dosis 450 mg/200 gr BB selama 15 hari
- K : Kelompok kontrol (diabetik tanpa pemberian EEDS)
- O1 : Ekspresi kolagen mesangial P1
- O2 : Ekspresi kolagen mesangial P2
- O3 : Ekspresi kolagen mesangial P3
- O : Ekspresi kolagen mesangial K

4.3. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Ekstrak etanol daun salam (EEDS)

Variabel tergantung : Ekspresi kolagen mesangial glomerulus.

4.4. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Satuan	Skala
1	EEDS	Daun salam yang diekstrak dengan etanol 70% secara maserasi, dengan dosis : a. 150 mg /200 grBB b. 300 mg /200 grBB c. 450 mg/ 200 gr BB yang diberikan secara per oral.	Penentuan dosis EEDS berpedoman pada konversi dosis pada hewan percobaan (dosis mencit ke dosis tikus)	mg/200 gr BB	Nominal dengan 4 kategori
2	Ekspresi Kolagen mesangial glomerulus	Ekspresi Kolagen mesangial tikus SD DM kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diperoleh dari pengecatan mesangial glomerulus secara imunohistokimia dan diamati secara mikroskopi	Ekspresi Kolagen diukur dengan melihat intensitas kolagen dan proporsi mesangial glomerulus setelah pengecatan imunohistokimia secara mikroskopi dengan mikroskop cahaya. Ekspresi kolagen	Skor intensitas: 0=negatif 1=lemah 2=sedang 3=kuat Skor proporsi : 0= negatif 1=1/100 bagian terwarnai 2= 1/10 bagian terwarnai 3= 1/3 bagian terwarnai 4= 2/3 bagian	Numerik

dinyatakan dalam <i>Allred Score</i> yang merupakan penjumlahan dari skor proporsi dan intensitas.	terwarnai 5= seluruh bagian terwarnai
--	--

4.5. Pengolahan dan Analisis Data

Data data penelitian yang berupa kadar glukosa darah dan ekspresi kolagen mesangial glomerulus dilakukan *cleaning*, *coding* dan tabulasi.

Analisis data dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for widows release* ver 16,0

Analisis deskriptif dilakukan untuk menghitung nilai mean, median dan standar deviasi dari kadar glukosa darah, kadar HbA1c dan ekspresi kolagen mesangial glomerulus. Selanjutnya data disajikan dalam tabel grafik *boxplot* untuk melihat karakteristik tiap set data.

Data ekspresi kolagen yang dinyatakan dalam *proportion score*, *intensity score* dan *Allred score* kemudian dianalisis perbedaan antar kelompok dengan uji *Kruskall-Wallis* dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Data ekspresi kolagen didapatkan dari pembacaan oleh 2 pengamat sehingga dilakukan uji reliabilitas dan *Kappa* untuk kesesuaian antara kedua pengamat.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

1. Kandang hewan
2. Sonde Lambung
3. Spuit Injeksi
4. Neraca elektrik
5. Alat uji pengukuran glukosa darah (metoda heksokinase)
6. Alat uji pengukuran HbA1c
7. Mikroskop cahaya

4.6.2. Bahan

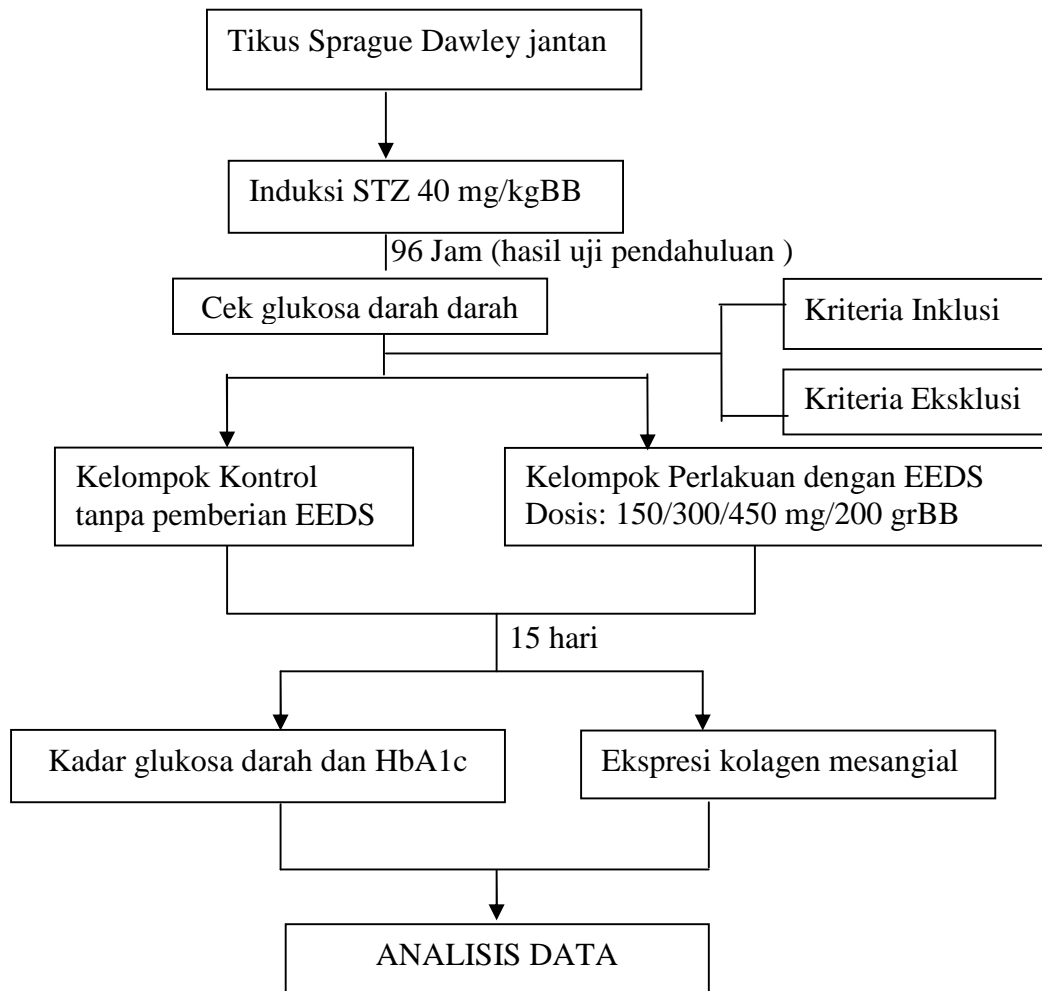
1. Streptozotocin (*Merek Nacalai, catalog 32238-91, Lot No M3P4239*)
2. Bufer sitrat
3. Serum darah hewan coba untuk diukur glukosa darah pada awal penelitian sebelum pemberian ekstrak daun salam untuk menentukan keberhasilan induksi STZ meningkatkan kadar glukosa darah.
4. Pakan standar hewan uji (*Comfeed AD II*)
5. Reagen untuk pengukuran kadar glukosa darah (metode heksokinase)
6. Reagen untuk pengukuran kadar HbA1c (metode turbidimetri)
7. Reagen immunohistokimia untuk pengecatan kolagen mesangial glomerulus hewan uji.

4.7. Tempat dan waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) unit IV. Pembuatan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dilakukan di LPPT Unit I UGM Yogyakarta. Analisis kualitatif zat bioaktif dari EEDS dilakukan di

Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Kimia Universitas Diponegoro Semarang. Pengukuran kadar glukosa darah, HbA1c dan Hb dilakukan di Laboratorium Klinik Pramita Yogyakarta. Pembuatan dan pembacaan preparat IHC kolagen mesangial glomerulus dilakukan di bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta dan Laboratorium Patologi anatomi Rumah sakit Dr. Sardjito Yogyakarta. Penelitian dilakukan selama 2 (dua) bulan .

4.8. Alur Penelitian



Gambar 8. Gambar bagan alur penelitian

4.9. Teknik Pengumpulan Data

4.9.1. Aklimatisasi

Uji pendahuluan (*pilot study*), empat ekor tikus jantan galur *Sprague dawley* usia 1,5 - 3 bulan, berat 50 - 200 gram diaklimatisasi laboratorium dengan cara dikandangkan dan diadaptasikan dengan diberi pakan standar secara *ad libitum*. Tikus diinjeksi dengan STZ dalam buffer sitrat 0,1N ph 4,5 dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal, diukur glukosa darahnya setiap 2 hari sekali selama satu minggu dengan sampel darah dari vena ekor. Diamati pada hari ke berapa tikus mengalami DM dengan kriteria kadar glukosa melebihi 200mg/dl dan stabil. Hasil dari uji pendahuluan digunakan untuk menentukan pada hari ke berapa setelah induksi dengan STZ 40 mg/kg BB tikus mengalami DM dan EEDS mulai diberikan pada kelompok hewan perlakuan.

Selanjutnya berdasarkan uji pendahuluan, dua puluh empat ekor tikus jantan galur *Sprague dawley* usia 1,5 – 3 bulan , berat badan 50 – 200 gram yang telah diaklimatisasi laboratorium diinduksi STZ dosis 40 mg/kgBB dimana STZ dalam buffer sitrat 0,1 N sampai pH 4,5 dan dibiarkan selama waktu tertentu (sesuai hasil uji pendahuluan) sampai mengalami DM. Dilakukan pengukuran kadar glukosa darah, dan selanjutnya tikus yang memenuhi kriteria DM dan selanjutnya dilakukan randomisasi kelompok.

4.9.2. Randomisasi

Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol (kelompok diabetik tanpa pemberian EEDS) dan 3 kelompok perlakuan (kelompok diabetik dengan pemberian EEDS 3 dosis bertingkat).

Hewan coba diberi pakan standar (*Comfeed AD II*) dan kelompok perlakuan diintervensi dengan pemberian ekstrak etanol daun salam selama 15 hari. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah tikus melalui *plexus retroorbitalis* sebanyak 2 ml untuk pengukuran kadar glukosa darah dan HbA1c . Hewan coba *disacrified*, dan ginjal diproses secara imunohistokimia untuk menentukan ekspresi kolagen mesangial glomerulus.

7.10. Ethical Clearence

Ethical Clearence diajukan melalui Komite Etik Penelitian Kedokteran Universitas Diponegoro di Semarang untuk memperoleh ijin menggunakan hewan coba sebelum penelitian dimulai.