

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*. Desain penelitian ini memberikan efisiensi pelaksanaan penelitian dan memberikan peluang hewan percobaan akan baik selama percobaan relative tinggi, karena pengamatan dan pengambilan specimen penelitian hanya dilakukan di akhir penelitian. Penentuan sampel untuk tiap kelompok dilakukan dengan alokasi random.<sup>53</sup>

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus *Sprague Dawley* yang diinjeksi Streptozotocin dosis 40 mg/kgBB secara intraperitoneal.<sup>13,40,55</sup> Hewan coba dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan dilakukan pemberian ekstrak etanol daun salam, setelah 48 jam dilakukan uji pendahuluan (*preliminary test*) sebanyak 2-3 ekor tikus dan dicek glukosa darah setiap 2 hari sekali selama 1 minggu, dilanjutkan dengan pengukuran kadar HbA1c setelah 2 minggu (15 hari) untuk mengetahui kestabilan glukosa darah. Output yang diamati adalah ekspresi TGF- $\beta$  pada podosit glomerulus ginjal. Bagan desain penelitian ini dapat dilihat pada skema 4.

## 4.2. Pengolahan dan Analisis data

Data hasil penelitian yang berupa kadar glukosa darah, HbA1c dan ekspresi TGF- $\beta$  podosit glomerulus dilakukan *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisis data dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for windows release ver 17,0*.

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

Perbedaan data ekspresi TGF- $\beta$  glomerulus dianalisis dengan uji *Kruskall-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data ekspresi TGF- $\beta$  didapatkan dari 2 pembacaan sehingga dilakukan uji *kappa* untuk menentukan *agreement test* dan uji *reliabilitas*.

Penelitian ini hanya mengulang pada tiap kelompok dikarenakan kehabisan stok di LPPT-UGM.

## 4.3. Populasi dan sampel penelitian

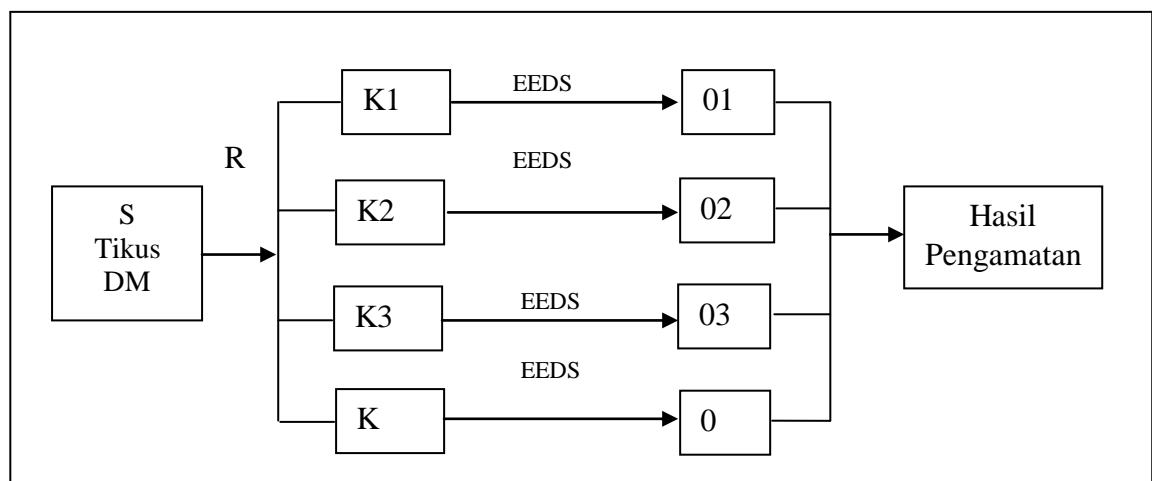
### 4.2.1. Populasi

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

#### 4.2.2. Sampel dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Sprague Dawley hiperglikemia, jenis kelamin jantan, berat badan 150 – 250 gram.

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 5 ekor, sehingga jumlah hewan coba yang digunakan adalah 20 ekor. Penentuan hewan coba untuk tiap kelompok dilakukan secara random ( *simple random sampling* )



Skema 4. Desain penelitian *the post test only control group design*

Keterangan :

- S: Sampel  
R: Randomisasi  
K1: Kelompok diabetic dengan pemberian EEDS dosis 150 mg/200grBB selama 15 hari  
K2: Kelompok diabetik dengan pemberian EEDS dosis 300 mg/200 grBB selama 15 hari  
K3: Kelompok diabetik dengan pemberian EEDS dosis 450 mg/200 gr BB selama 15 hari  
K: Kelompok kontrol ( diabetic tanpa pemberian EEDS)  
O1: Ekspresi TGF- $\beta$  K1  
O2: Ekspresi TGF- $\beta$  K2  
O3: Ekspresi TGF- $\beta$  K3  
O: Ekspresi TGF- $\beta$  K.

#### **4.2.3. Kriteria sampel**

##### **4.2.3.1. Kriteria Inklusi :**

1. Jenis kelamin jantan
2. Usia 2 – 3 bulan (45-75 hari)
3. Berat badan 50-200 gram.
4. Kadar glukosa darah  $\geq$  200mg/dl

##### **4.2.3.2. Kriteria eksklusi :**

1. Tikus mengalami cacat fisik
2. Tikus mengalami infeksi

#### 4.2.3.3. Drop Out :

1. Tikus mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk
2. Tikus mati saat perlakuan (setelah induksi STZ dan pemberian EEDS)

#### 4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Ekstrak etanol daun salam (EEDS)

Variabel tergantung : Ekspresi TGF- $\beta$  pada podosit glomerulus.

#### 4.5. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 2. definisi operasional**

N o	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Satuan	Skala
1	Pemberian ekstrak etanol daun salam	Daun salam yang diekstrak dengan etanol 70%, dengan dosis 150 mg/200gr BB, 300 mg/200 grBB dan 450 mg/200 gr BB yang diberikan dengan cara per oral.	Penentuan dosis EEDS berpedoman pada hasil konversi dosis ekstrak etanol daun salam pada manusia yang dikonversikan terhadap dosis tikus. <sup>39</sup>	mg/200 gr BB	Nominal
2	Ekspresi TGF- $\beta$	Ekspresi TGF- $\beta$ dalam podosit tikus diabetes diperoleh dari pengecatan immunohistokimia.	Diukur dengan melihat intensitas Ekspresi TGF- $\beta$ glomerulus setelah pengecatan immunohistokimia Pengamatan	Scoring intensitas 0=sangat lemah/ tidak ada pewarnaan & tidak ada peningkatan	Ordinal

menggunakan	lokasi
mikroskop cahaya.	pewarnaan.
	1=diffus,
	pewarna lemah
	dengan 1%-25%
	glomerulus fokal
	dengan
	pewarnaan kuat.
	2=25%-50%
	glomerulus
	menunjukkan
	fokal dengan
	pewarnaan kuat.
	3=50%-75%
	glomerulus
	terwarna kuat
	menurut fokal
	4=>75%
	glomerulus
	tercat kuat. <sup>54</sup>

---

## 4.6. Alat dan Bahan

### 4.6.1. Alat

1. Kandang hewan
2. Sonde Lambung
3. Sduit Injeksi
4. POCT ( Point of Care Test) Supergluocard II
5. Mikroskop Cahaya

### 4.6.2. Bahan

1. Streptozotocin
2. Buffer 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
5. Reagen immunohistokimia untuk pengecatan TGF- $\beta$  glomerulus hewan uji.

#### **4.7. Tempat dan waktu Penelitian**

##### **4.7.1. Tempat Penelitian**

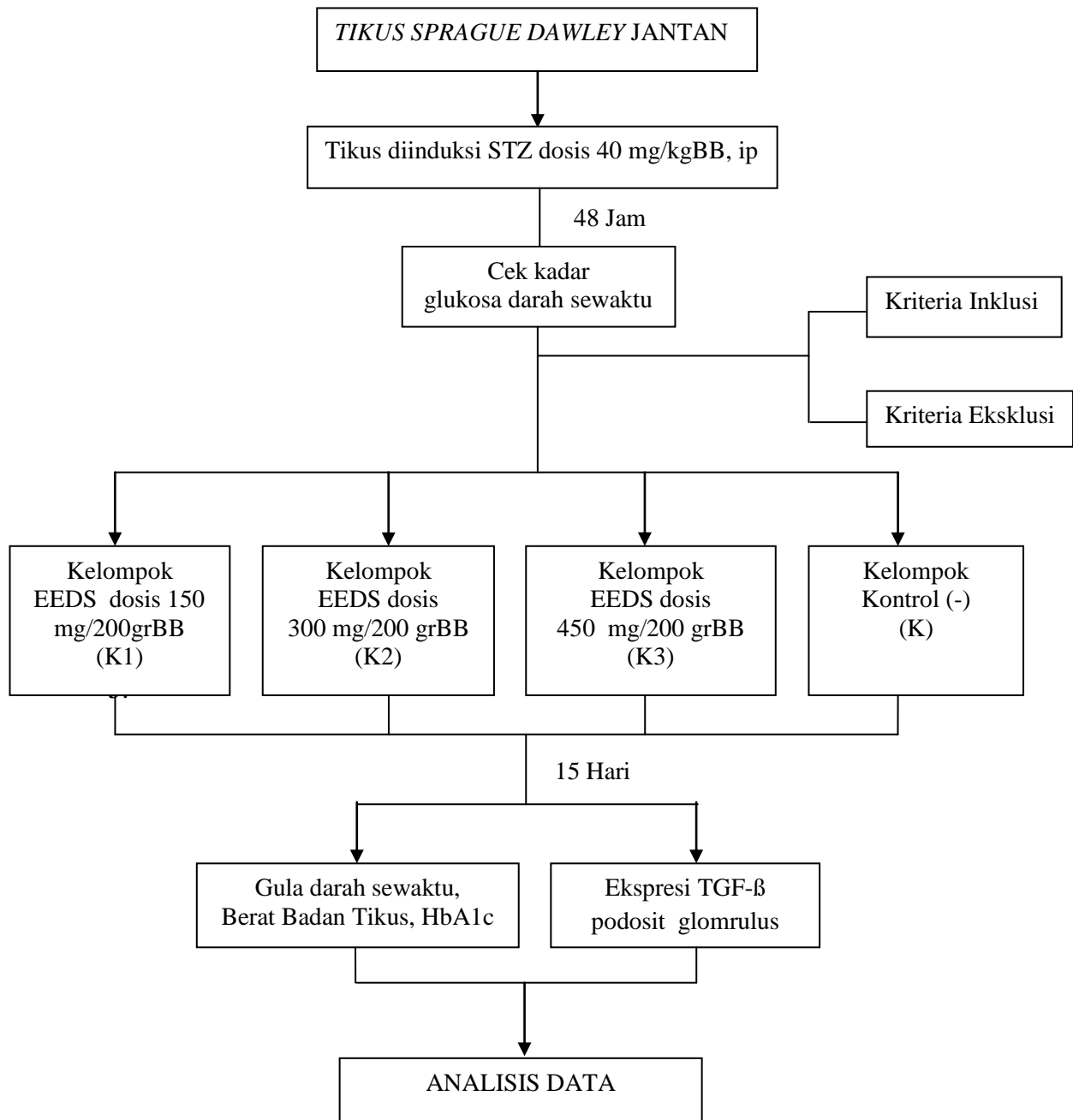
Pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) unit VI termasuk *study preliminary*. Intervensi berupa pengukuran gula darah sewaktu, penimbangan berat badan, perlakuan selama 15 hari pengukuran kadar HbA1c sampai dengan *disacrified* pengambilan organ ginjal.

Daun salam diambil dari Desa Boja Kendal, pembuatan ekstrak daun salam dilakukan di LPPT-UGM unit I dengan determinan di fakultas Biologi Farmasi UGM. Pengujian zat bioaktif (flavonoid, polyfenol dan antioksidan) daun salam dilakukan di fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Pembuatan dan pembacaan preparat TGF- $\beta$  podosit glomerulus dilakukan di bagian Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah sakit Dr. Sardjito Yogyakarta.

##### **4.7.2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada selama 2 bulan (bulan april-juni 2014)

#### 4.8. Alur Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Penelitian



## **5.1. Teknik Pengumpulan Data**

### **5.1.1. Aklimatisasi**

Penelitian dilakukan dengan sampel tikus jantan galur *Sprague Dawley* sebanyak 20 ekor, berusia 2 – 3 bulan, berat badan 50-200 gram diaklimatisasi laboratorium dengan cara dikandangkan dan diadaptasikan dengan diberi pakan standar secara *ad libitum* selama 5 hari. Selanjutnya diinduksi STZ dosis 40 mg/kgBB dalam buffer sitrat 0,1 N sampai pH 4,3 dan dibiarkan selama 48 jam, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sewaktu untuk mengetahui tikus telah mengalami DM selanjutnya dilakukan randomisasi kelompok.<sup>13,55</sup>

### **5.1.2. Randomisasi**

Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok diabetik dengan perlakuan (3 dosis bertingkat ekstrak daun salam). Hewan coba diberi pakan TLKT dan kelompok perlakuan diintervensi dengan pemberian ekstrak daun salam selama 15 hari.<sup>7</sup> Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah tikus melalui *plexus retroorbitalis* (vena mata) sebanyak 2-3 ml untuk pengukuran kadar glukosa darah dan HbA1c. Hewan coba *disacrified*, dan ginjal diproses secara imunohistokimia untuk menentukan ekspresi TGF- $\beta$  podosit glomerulus.

## 5.2. *ETHICAL CLEARANCE*

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