

BAB IV

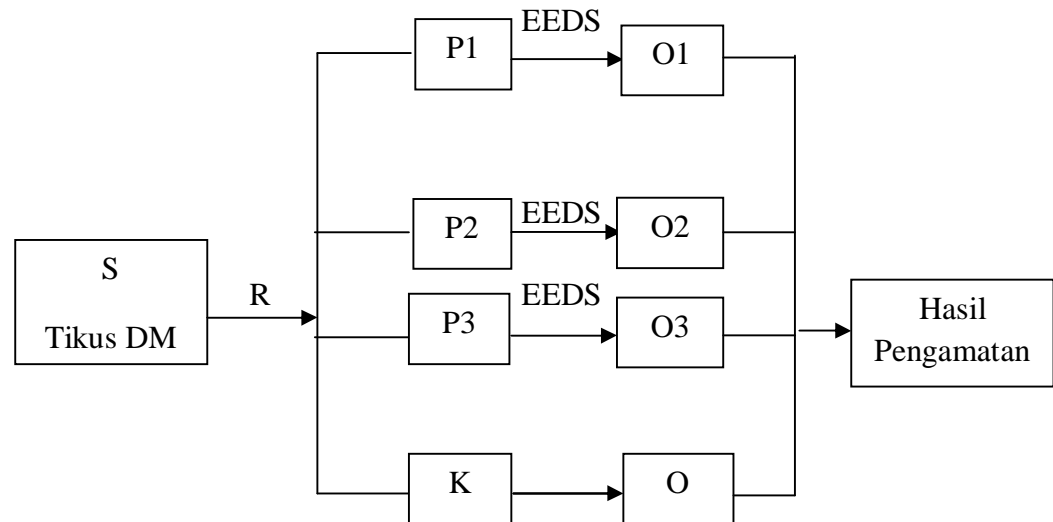
METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*. Desain penelitian ini memiliki kemampuan untuk mengukur terjadinya perubahan antar kelompok dengan baik, faktor-faktor yang diperkirakan dapat mempengaruhi hasil pengukuran telah dikendalikan diawal penelitian. Desain ini memberikan efisiensi pelaksanaan penelitian dan memberikan peluang hewan lebih baik selama percobaan karena pengamatan dan pengambilan spesimen penelitian hanya dilakukan di akhir penelitian. Penentuan sampel untuk tiap kelompok dilakukan dengan alokasi random.⁴⁸

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus *Sprague dawley* DM dengan diinduksi STZ dosis 40 mg/kgBB secara intra peritoneal (ip). Hewan coba dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, terhadap kelompok perlakuan dilakukan pemberian EEDS selama 15 hari. Dosis dihitung berdasarkan pemakaian daun salam pada manusia. Manusia dewasa di Indonesia (berat badan 50 kg) mengkonsumsi daun salam untuk pengobatan tradisional sebanyak 7 gram. Pada tabel konversi dosis dari manusia ke mencit 20 gram adalah 0,0026. Dosis EEDS yang diberikan pada penelitian ini dilakukan berdasarkan uji pendahuluan. Dosis pada uji pendahuluan dilakukan

dengan kadar ekstrak kering dalam serbuk daun salam adalah 10,27%, sehingga perhitungan dosisnya adalah sebagai berikut : manusia 50 kg mengkonsumsi serbuk kering daun salam sebanyak 7 gram. Manusia 70 kg mengkonsumsi serbuk kering daun salam $70/50 \times 7$ gram atau $10,27\% \times 70/50 \times 7$ gram = 1,006 gram ekstrak. Dosis untuk mencit $20 \text{ gram} = 0,0026 \times 1,006 \text{ gram} = 2,62 \text{ mg}$ ekstrak.⁴¹ Pada tikus SD dengan BB 200 gram maka dosis yang didapat adalah $0,018 \times 1,006 \text{ gram}$ ekstrak = 0,0181 gram ekstrak daun salam. Hasil uji pendahuluan tidak dapat meregulasi gula darah, sehingga dilakukan ekstraksi maserasi ulang daun salam dengan berat serbuk 700gr, dengan berat ekstrak daun salam 45,12 gr yang dilarutkan dalam etanol 70%. Dosis EEDS ditingkatkan pada perlakuan 1 sebesar 150 mg/ 200 grBB, perlakuan 2 sebesar 300 mg/ 200 grBB dan dosis perlakuan 3 sebesar 450 mg/ 200 grBB. Pemberian dosis ini dilakukan selama 15 hari dan pada dosis ini dapat menurunkan gula darah sewaktu, sehingga dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah perlakuan 1 sebesar 150 mg/ 200 grBB, perlakuan 2 sebesar 300 mg/ 200 grBB dan dosis perlakuan 3 sebesar 450 mg/ 200 grBB. Hasil yang diamati adalah kadar glukosa darah, kadar HbA1c dan ekspresi laminin mesangial glomerulus.



Gambar 8. Desain penelitian *post test only control group design*

Keterangan :

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

4.2. Pengolahan dan Analisis data

Data hasil penelitian yang berupa kadar glukosa darah dan ekspresi laminin mesangial glomerulus dilakukan *cleaning*, *coding* dan *tabulasi* selanjutnya di *entry* ke dalam komputer. Analisis data dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for windows release*.

Analisis deskriptif dilakukan untuk menghitung nilai mean, median dan standar deviasi dari kadar glukosa darah sewaktu dan ekspresi laminin mesangial glomerulus. Ekspresi laminin mesangial glomerulus dinilai dengan allred score. Allred score ekspresi laminin mesangial glomerulus dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan Allred Score yang dilakukan oleh 2 orang pembaca. Kesesuaian kedua pembaca dalam membaca allred score dilakukan uji statistik reliabilitas dan uji kappa terhadap hasil pembacaan allred score. Data perbedaan ekspresi laminin mesangial dianalisa dengan uji *Kruskall-Wallis* dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

4.3. Populasi dan sampel penelitian

4.3.1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Srague dawley* yang merupakan jenis tikus *inbreed* dari UGM bidang Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu unit IV.

4.3.2. Sampel dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* DM, jenis kelamin jantan, berat badan 50 - 200 gram. Jumlah sampel minimal untuk jenis penelitian ini menurut WHO adalah 5 ekor untuk tiap

kelompok.⁴⁹ 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. Penentuan hewan coba untuk tiap kelompok dilakukan secara random (*simple random sampling*).

4.3.3. Kriteria sampel

Kriteria inklusi :

1. Jenis kelamin jantan
2. Usia 45 – 75 hari
3. Berat badan 50 - 200 gr
4. Kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl

Kriteria eksklusi :

1. Cacat fisik
2. Infeksi

Drop Out :

1. Tikus mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses tidak terbentuk
2. Tikus tidak aktif selama diinduksi STZ
3. Tikus mati

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Pemberian ekstrak etanol daun salam (EEDS)

Variabel tergantung : Ekspresi laminin mesangial glomerulus.

4.5. Definisi Operasional Variabel

| No | Variabel | Definisi Operasioanl | Cara Ukur | Satuan | Skala |
|----|----------------------------------|---|---|---|----------------------|
| 1 | Ekstrak etanol daun salam (EEDS) | Daun salam yang diekstrak dengan etanol 70%, dengan dosis : a. 150 mg/200gr BB b. 300 mg/200 grBB c. 450 mg/200 gr BB yang diberikan dengan cara per oral. | Penentuan dosis EEDS berpedoman pada konversi dosis pada hewan percobaan (dosis mencit ke dosis tikus) | mg/200 gr BB | Nominal > 2 kategori |
| 2 | Ekspresi laminin mesangial | Ekspresi laminin dalam mesangial tikus diabetes melitus yang diperoleh dari pengecatan mesangial glomerulus secara imunohistokimia | Ekspresi laminin mesangial diukur dengan melihat intensitas score dan proportion score laminin mesangial glomerulus setelah pengecatan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya. ⁸ | Allred score : penjumlahan nilai proporsi dan intensitas. 1. Proporsi (0-5) 0 : tidak ada noda 1 : $\leq 1 / 100$ sel bernoda 2 : $\leq 1 / 10$ sel bernoda 3: $\leq 1 / 3$ sel bernoda 4 : $\leq 2 / 3$ sel bernoda 5 : semua sel bernoda 2. Intensitas (0-3) 0 : tidak ada pewarnaan 1: pewarnaan ringan 2: pewarnaan sedang 3: pewarnaan gelap | Ratio |

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat

1. Kandang hewan
2. Sonde Lambung
3. Spuit Injeksi
4. Mikroskop cahaya

4.6.2. Bahan

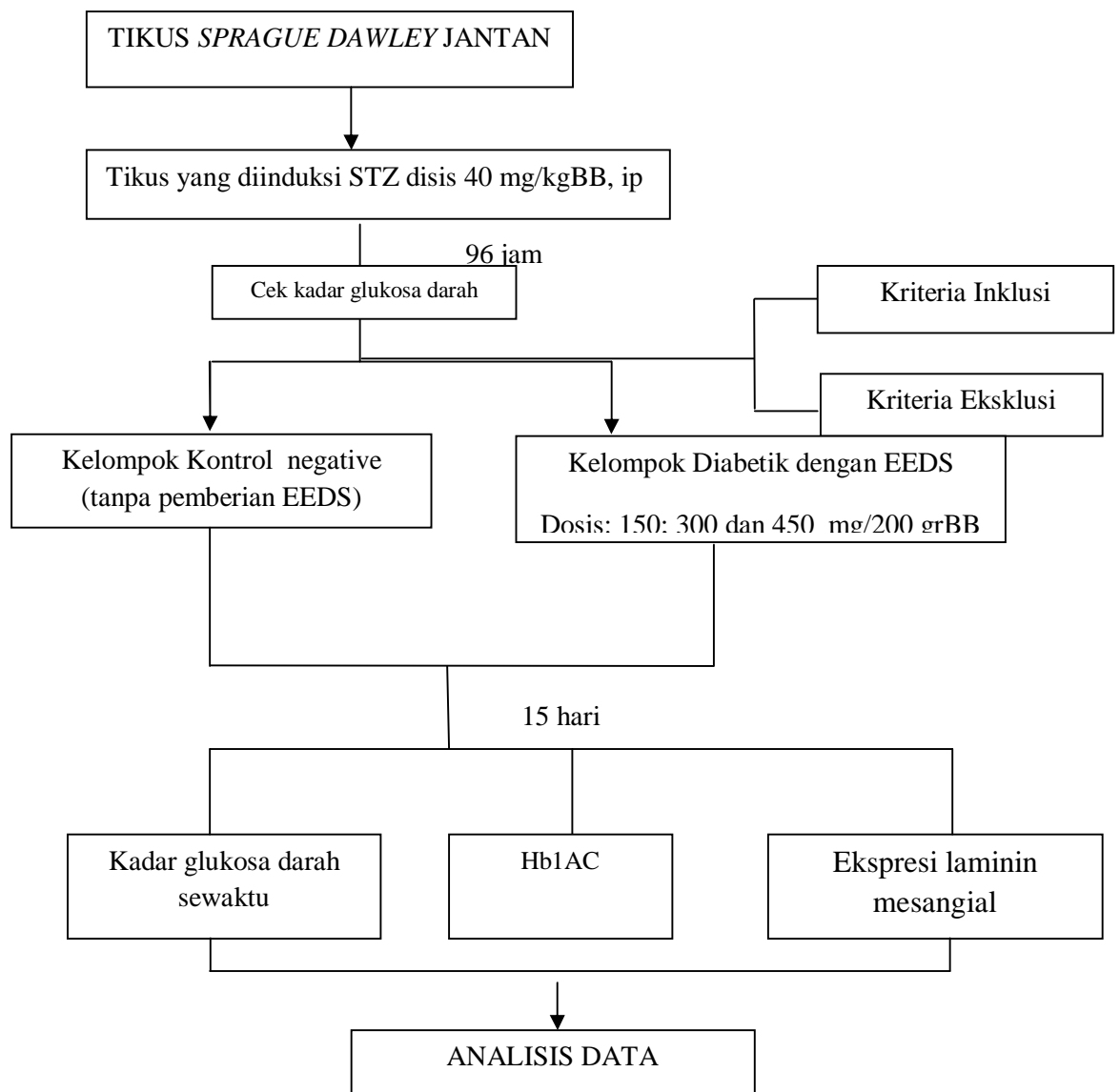
1. Streptozotocin
2. Serum darah hewan coba digunakan untuk mengukur glukosa darah pada awal penelitian sebelum pemberian ekstrak etanol daun salam untuk menentukan keberhasilan induksi STZ.
3. Pakan standar hewan uji
4. Reagen immunohistokimia untuk pengecatan laminin mesangial glomerulus hewan uji.

4.7. Tempat dan waktu Penelitian

Pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) unit 4 termasuk *study preeliminary*. Intervensi berupa pengukuran gula darah sewaktu, penimbangan berat badan, perlakuan selama 15 hari sampai dengan *disacrified* pengambilan organ ginjal. Daun salam diambil dari Desa Bojo Kendal, pembuatan ekstrak daun salam dilakukan di LPPT-UGM unit 1 dengan *determinant* di fakultas biologi farmasi UGM. Pengujian zat bioaktif (*flavonoid, polyfenol, antioksidan*) daun salam dilakukan di fakultas MIPA Universitas

Diponegoro. Pembuatan dan pembacaan preparat laminin mesangial glomerulus dilakukan di bagian Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Sardjito Yogyakarta. Penelitian ini akan dilakukan selama 2 bulan.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 9. bagan alur penelitian

4.9. Teknik Pengumpulan Data

4.9.1 Aklimatisasi

Penentuan waktu pemberian EEDS dan dosis yang diberikan pada tikus *Sprague-dawley* dilakukan berdasarkan *pilot study* / uji pendahuluan. Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui bahwa kondisi hewan coba tetap stabil mengalami DM dengan cara melakukan observasi GDS hewan coba pada hari ke-2, ke-4 dan ke-6. Penelitian ini menggunakan 4 sampel hewan coba yang terbagi menjadi 2 sampel puasa dan 2 sampel non puasa. Kelompok puasa, dipuasakan selama 12 jam sebelum induksi. Aklimatisasi dilakukan dengan cara dikandangkan dan diadaptasikan dengan cara diberi pakan standar secara *ad libitum*. Tikus diinjeksi dengan STZ dalam buffer sitrat 0,1N sampai pH 4,5 dengan dosis 40 mg/kgBB secara ip. Pengukuran glukosa darah dilakukan pada hari kedua diulang setiap dua hari sekali dilakukan sampai terjadi peningkatan kadar gula darah dan telah stabil.

Penelitian dilakukan dengan sampel tikus jantan galur *Sprague Dawley* sebanyak 16 ekor, berusia 45-75 hari, 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.

4.9.2 Randomisasi

Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol (diabetik tanpa perlakuan) dan 3 kelompok diabetik dengan perlakuan (3 dosis bertingkat EEDS). Hewan coba diberi pakan TLKT dan kelompok perlakuan diintervensi dengan pemberian EEDS selama 15 hari. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah tikus melalui *plexus retroorbitalis* sebanyak 3 ml untuk pengukuran kadar glukosa darah dan Hb1AC. Pengukuran dilakukan di laboratorium Pramita Yogyakarta. Hewan coba di *sacrified*, ginjal diproses secara imunohistokimia untuk menentukan ekspresi laminin mesangial glomerulus.

4.10. Ethical Clearance

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