

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan 5 ulangan, perlakuan yang digunakan adalah mencit kontrol negatif (tanpa perlakuan), mencit kontrol positif (diabetes tanpa pemberian air perasan bawang lanang) dan mencit diabetes yang diberi air perasan bawang lanang dengan dosis yang berbeda.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas : air perasan umbi bawang lanang dengan dosis yang berbeda.
2. Variabel terikat: variabel yang diukur adalah kadar glukosa darah dan gambaran histologi pankreas mencit.
3. Variabel kendali: mencit jantan galur *Balb/c* yang berumur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 20 g

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosistematik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Nopember 2009-Januari 2010.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/c* jenis kelamin jantan, umur 3 bulan, dengan berat badan rata-rata 20 gram sebanyak 25 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat minum, tempat makan, glukometer, alat pencekok oral (gavage), disposable syringe 1 mL, micropipet, tabung tip, gelas ukur 100 ml, stirer, erlenmeyer 50 mL, *beacker glass*, kaca pengaduk, *deck glass*, *objek glass* blender, timbangan digital, kaos tangan, blender, kertas saring, papan sesi, alat bedah.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah umbi bawang lanang (*Allium sativum*), pakan mencit berupa pellet dengan kandungan protein 10%, lemak 3%, serat 8% dan kadar air 12%, streptozotocin, dionez, strip glukotest, aquadest, formalin 10%, chloroform, etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 96%), xylene, xilol, alcohol 70%

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, terlebih dahulu dipersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, minum dan pakan mencit. Setelah itu dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama 2 minggu. Mencit dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol mencit normal (tidak diabetes) dan kelompok mencit diabetes. Untuk menjadi diabetes, mencit diinduksi dengan streptozotocin dengan dosis tunggal yaitu 30mg/kg bb diinjeksikan 1 kali sehari selama 5 hari (Lee *et al*, 2009), jika dalam waktu 5 hari belum mengalami diabetes maka disuntik kembali dengan dosis tunggal 30mg/kg. Sebelum diinjeksikan stz dilarutkan dengan dionez dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer, pembuatan larutan stz dilakukan dengan penghitungan sesuai dosis injeksi dengan konsentrasi 1 mg/ 10 µl diinjeksi dengan cara intraperitoneal (Lee *et al*. 2009).

3.6.2 Pembuatan Air Perasan Bawang Lanang

Pembuatan air perasan bawang lanang melalui tahapan sebagai berikut:

1. Menyiapkan bawang lanang
2. Bawang lanang terlebih dahulu di kupas dan dibersihkan dengan menggunakan air mengalir.
3. Bawang lanang yang sudah dibersihkan ditimbang sebanyak 500 gr, dan di blender tanpa diberi air.

4. Hasil tersebut disaring menggunakan kain saringan tahu untuk diambil sarinya.
5. Setelah didapat sari nya diambil 5, 10, 15 ml dan ditambahkan aqudest sampai 100 ml untuk dosis 5%, 10%, 15%. Dosis perasan bawang lanang (*Alium Sativum*) yang digunakan berdasarkan pada uji pendahuluan sebelumnya. Pada penelitian ini dosis yang digunakan 5%,10%,15%, selama 21 hari dengan diberikan 2 hari sekali.

3.6.2 Kegiatan Penelitian

Sebelum pemberian air perasan bawang lanang, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sebelum perlakuan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan menggunakan glukometer dengan prosedur sebagai berikut:

- Persiapan glukometer, strip dipersiapkan untuk mengukur
- Pengambilan sampel darah, mencit diletakkan pada sungkup, ekor mencit dipegang diurut dan diberi alkohol, kemudian ujung ekor dipotong dan diambil darahnya dan diteteskan pada strip glukotest
- Hasil perhitungan kadar glukosa darah yang terbaca pada glucometer dicatat sebagai data.

3.6.3 Pembuatan Preparat Sayatan Pankreas

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai *obyek glass* yang akan digunakan dengan kikir kaca pada bagian tepi, kemudian direndam dalam alkohol 70% minimal semalam. Kemudian obyek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan

gelatin 0,5% selama 30-40 detik/slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan hingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata

2. Tahap kedua, organ pankreas yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3kali), xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit
3. Tahap ketiga, adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan paraffin sebanyak 3 kali selama 30 menit
4. Tahap keempat, *embedding*. Bahan beserta paraffin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap di dekat bahan. Blok paraffin dibiarkan semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga blok benar-benar keras
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga paraffin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk pankreas dipotong dengan ukuran μm , kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan gelas obyek yang sudah dicoating kemudian dikeringkan diatas *hot plate*.

6. Tahap diparafisasi, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 kali 5menit.
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquadest selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hematoxylin* selam 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selam 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertngkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing*, dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit, kemudian dikeringkan.
11. Tahap *mounting* dengan etilen.
12. Hasil akhir diamati dibawah mikroskop, untuk setiap ekor mencit, satu preparat dengan tiga bidang pandang pengamatan, dipotret kamudian dicatat data skor kerusakan islet pancreas

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian air perasan bawang lanang terhadap kadar glukosa darah mencit diabetes sebelum dan sesudah perlakuan yang diinduksi streptozotocin, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji

statistik dengan ANKOVA (*Analysis of covariance*) Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan pengujian BNT 5%. Untuk mengetahui derajat insulitis dilakukan melalui penghitungan tingkat kerusakan pulau Langerhans pada tiga luas bidang pandang setiap satu ekor mencit. Pemberian skor dapat dilakukan dengan cara memprosentase jumlah kerusakan yang terdapat setiap satu preparat. Nilai skor = 0, jika tidak terdapat kerusakan. Nilai skor = 1 jika terdapat $\frac{1}{4}$ kerusakan, nilai skor = 2 untuk $\frac{1}{2}$ kerusakan, dan nilai skor = 3 untuk kerusakan lebih dari $\frac{1}{2}$ dari islet. Kemudian data skor tingkat kerusakan pankreas dianalisis dengan non-parametrik *Kruskal Wallis*.

