

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang 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 jus jambu biji) dan mencit diabetes yang diberi jus jambu biji dengan volume yang berbeda.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas : pemberian jus jambu biji dengan volume yang berbeda.
2. Variabel terikat: variabel yang diukur adalah kadar glukosa darah dan gambaran histologi pankreas mencit.
3. Variabel kendali: mencit yang berumur 2-3 bulan, dengan berat rata-rata 20 gram.

#### **3.3 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosistematik Jurusan Biologi dan Laboratorium Optik Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari-April 2013.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

Hewan uji yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus*) umur 2-3 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, sonde lambung, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 50 mL, beacker glass, kaca pengaduk, deck glass, objek glass, blender, timbangan digital, kaos tangan, blender, kertas saring, papan sesi, alat bedah, mikroskop.

#### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan adalah mencit umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20 gram. Aloksan monohidrat, buah jambu biji, pakan mencit, strip glukotest, aquadest, kapas, formalin 10%, 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 aklimasi di laboratorium selama 3 minggu. Mencit dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol mencit normal (tidak diabetes) dan kelompok mencit diabetes. Untuk menjadi diabetes, mencit diinduksi dengan aloksan dengan dosis tunggal yaitu 64 mg/kg BB.

### 3.6.2 Pembuatan jus jambu biji

Pembuatan ekstrak air jambu biji melalui tahapan sebagai berikut:

1. Menyiapkan buah jambu biji
2. Buah jambu biji terlebih dahulu di kupas dan dibersihkan dengan menggunakan air mengalir.
3. Buah jambu biji yang sudah dibersihkan ditimbang sebanyak 500 gr, dan di blender tanpa diberi air.
4. Hasil tersebut disaring menggunakan kain saringan tahu untuk diambil sarinya.

### 3.6.3 Perlakuan Tikus Diabetes

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu: (1) Kelompok 1 sebagai kontrol negatif yaitu mencit yang hanya mendapat perlakuan diberi aquades 0,10 ml/mencit (2) Kelompok 2 sebagai kontrol positif yaitu mencit diabetes yang tidak diberi jus jambu biji melainkan diberi aquades 0,10 ml/mencit (3) Kelompok 3 yaitu mencit diabetes yang diberi jus jambu biji 0,5 ml/mencit/hari (4) Kelompok 4 yaitu mencit diabetes yang diberi jus jambu biji 0,10 ml/mencit/hari; (5) Kelompok 5 yaitu mencit diabetes yang diberi jus jambu biji 0,15 ml/mencit/hari

### 3.6.4 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit sebagai ulangan. Kelompok perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok I : Sebagai kontrol negatif, mencit diberi 0,10 aquades ml/mencit/hari

- b. Kelompok II : Sebagai control positif, mencit diinduksi aloksan 64 mg/kg BB + diberi 0,10 ml/mencit/hari aquades
- c. Kelompok III : Mencit diinduksi aloksan 64 mg/kg BB + 0,5 ml/mencit/hari
- d. Kelompok IV : Mencit diinduksi aloksan 64 mg/kg BB + 0,10 ml/mencit/hari
- e. Kelompok V : Mencit diinduksi aloksan 64 mg/kg BB + 0,15 ml/mencit/hari

#### 3.6.5 Kegiatan Penelitian

Sebelum perlakuan pemberian jus jambu biji, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk memastikan 25 mencit telah mengidap diabetes setelah diinduksi aloksan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah mencit melalui ekor yang dibersihkan dengan alkohol terlebih dahulu. Kemudian ekor diurut lalu di potong ujungnya. Setelah itu darah diteteskan pada strip glukotes dan dimasukkan ke glukometer untuk dibaca kadar glukosanya. Mencit yang kadar glukosa darahnya mencapai 150 mg/dl atau lebih dinyatakan sudah menderita diabetes mellitus. Setelah mencit menderita diabetes maka diberi jus jambu biji dengan menggunakan sonde lambung selama 40 hari. Kemudian mencit di bedah untuk diambil organ pankreasnya.

#### 3.6.6 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 parafin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap didekat bahan. Blok parafin 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 parafin sedikit meleleh. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk pancreas dipotong dengan ukuran  $\mu\text{m}$ , 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 5 menit.
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 jus jambu biji terhadap kadar glukosa darah mencit diabetes sebelum dan sesudah perlakuan yang diinduksi aloksan data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan *Analisis of Kovariance (Ankova)*. Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan

pengujian BNT 5%. Untuk mengetahui derajat insulitis dilakukan melalui penghitungan tingkat kerusakan pulau Langerhans. Ciri kerusakan pulau Langerhans ditandai dengan adanya ruang-ruang kosong pada area pulau Langerhans, dan ditentukan berdasarkan metode skoring. Skor 0, jika tidak terdapat kerusakan. Skor 1 jika  $\frac{1}{4}$  dari area yang ada di pulau Langerhans mengalami kerusakan, skor 2 jika  $\frac{1}{2}$  dari area yang ada di pulau Langerhans mengalami kerusakan, dan skor 3 jika lebih dari  $\frac{1}{2}$  area yang ada di pulau Langerhans mengalami kerusakan. Kemudian data skor tingkat kerusakan pankreas dianalisis dengan non-parametrik Kruskal Wallis.