

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah tikus K- (Kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak biji jintan hitam), KJ (Kontrol negatif dengan pemberian ekstrak biji Jintan Hitam 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BB), D0 (Kontrol positif tanpa pemberian ekstrak biji Jintan Hitam), D1 (tikus diabetes dengan pemberian ekstrak biji Jintan Hitam dosis 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BB), dan D2 (tikus diabetes dengan pemberian ekstrak biji Jintan Hitam dosis 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BB).

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel pada penelitian ini meliputi :

1. Variabel bebas : ekstrak biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan dosis yang berbeda.
2. Variabel terikat : variabel yang diukur adalah kadar glukosa darah dan gambaran histologis pankreas tikus
3. Variabel kendali : jenis tikus yang digunakan adalah tikus jantan strain Wistar yang berumur 6 minggu dengan berat badan berkisar antara 40-50 gram, dikondisikan menjadi hiperkolesterolemia dengan diet tinggi kolesterol (50% kalori dari lemak) dan diabetes dengan diinduksi Streptozotocin.

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Agustus - Nopember 2010. Pembedahan dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar dengan jenis kelamin jantan, umur 6 minggu dengan berat rata-rata 40-50 gr sebanyak 25 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Peternakan UNAIR – Surabaya.

### **3.5 Alat dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain kandang hewan coba (bak plastik), kawat, tempat pakan, tempat minum tikus, kertas label, glukometer (Easy Touch®), Strip glukotest, Objek glass, Deck glass, Mikrotom, kaset, paraffin oven, mikropipet (100-1000 µl), tip (blue tip), Timbangan digital, Erlenmeyer 50 ml, Gelas ukur, Beacker glass, Kaca pengaduk, alat pencekok oral, spuit 1 ml.

#### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain hewan coba berupa tikus putih (*Rattus Norvegitus* L) galur Strain wistar dengan usia 6 minggu dan berjenis kelamin jantan berat badan rata-rata 50 gr, Kolesterol bubuk, asam kolat, tepung ikan, minyak sapi, Streptozotocin (dilarutkan dalam 5 mmol/l buffer

citrate, pH 4.5), biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.), pakan tikus (521), Serbuk kayu, aquades, PBS (Phospat Buffer Saline), ketalar (ketamine), aluminium foil, ethanol 96%, n-heksan, aseton, formalin 10%, Etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%), xylene, xilol, methanol 70%

### 3.6 Kegiatan Penelitian

#### 3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus diaklimasi di laboratorium selama 1 minggu dengan pakan *ad libitum*, kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol tikus normal (tanpa kolesterol dan diabetes) dan kelompok hiperkolesterol yang nantinya akan dikondisikan menjadi tikus diabetes. Untuk menjadi hiperkolesterol tikus diberi pakan diet tinggi kolesterol (50 % kalori dari lemak) selama 30 hari. Kemudian tikus yang telah hiperkolesterol diinduksi dengan streptozotocin (dilarutkan dalam 5 mmol/l buffer citrate, pH 4.5) dengan dosis rendah berulang (*Multiple Low Dosis (MLD)*) sebesar 30 mg/kg BB sebanyak 3 kali secara intraperitoneal (i.p).

Tujuh hari setelah induksi streptozotocin, kelompok tikus diabetes dipuasakan selama 16-18 jam untuk diperiksa kadar glukosa darah puasa menggunakan Glukotest (Easy Touch<sup>(R)</sup>). Tikus diabetes dengan kriteria [glukosa] >135 mg/dl (Kusumawati, 2004) dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, yaitu D0 (kontrol positif), D1 (ekstrak biji Jintan Hitam dosis 150 µg/kg BB), dan D2 (ekstrak biji Jintan Hitam dosis 300 µg/kg BB).

Pembuatan larutan streptozotocin (STZ) untuk induksi diabetes dilakukan dengan melarutkan 100 mg STZ dalam 10 ml buffer sitrat (50 mmol sodium sitrat,

pH 4,5). Larutan disimpan dalam botol falcon 15 ml dan dibungkus aluminium foil. Penyimpanan larutan STZ dilakukan pada suhu rendah (4°C).

### 3.6.2 Pembuatan Ekstrak

Prosedur pembuatan ekstrak biji jintan hitam dilakukan sebagai berikut:

- a. Sebanyak 50 gr sampel biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dilarutkan dengan 200 ml ethanol p.a 96%
- b. Larutan dikocok dengan shaker selama 2 jam kemudian didiamkan.
- c. Larutan disaring dengan vakum Buchner. Filtrate ditampung dalam Erlenmeyer dan residu dimaserasi kembali sebanyak 2 kali.
- d. Filtrate hasil maserasi digabung, kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 60°C hingga tidak ada filtrate yang menetes.
- e. Diperoleh 20,148 gr ekstrak dari 50 gr sampel
- f. Perlakuan a-d diulang dengan menggunakan pelarut aseton dan n-heksan dengan volume yang sama.
- g. Diperoleh 19,348 gr ekstrak dari 50 gr sampel yang diekstrak dengan pelarut aseton
- h. Diperoleh 19,119 gr ekstrak dari 50 gr sampel yang diekstrak dengan pelarut n-heksan

### 3.6.3 Penghitungan Dosis

Kusumawati (2004) menyatakan bahwa faktor konversi perhitungan dosis obat dari manusia (70 kg) ke tikus (200 gr) adalah 0,018. Untuk 1 gram sampel yang dikonversikan pada tikus (200gr)  $0,018 \times 1 \text{ gr} = 18 \text{ mg}/200 \text{ gr BB}$ . Ketika dikonversikan dengan hasil ekstraksi biji, maka diperoleh:

$$\frac{18 \text{ mg}}{150.000 \text{ mg}} \times 60.000 \text{ mg} = 7,2 \text{ mg}/200 \text{ gr BB}$$

$$= 3,6 \text{ mg}/100 \text{ gr BB}$$

Untuk menghitung dosis efektif ekstrak:

$$3,6 \text{ mg} \times 40 \% = 1,44 \text{ mg/ekor} \approx 1,5 \text{ mg/ekor} = 150 \text{ } \mu\text{g/kg BB}$$

Penelitian ini menggunakan dua dosis ekstrak yang berbeda, yaitu dengan menaikkan dosis efektif dengan deret hitung, maka diperoleh dosis sebagai berikut:

$$\text{Dosis 1} = 150 \text{ } \mu\text{g/kg BB}$$

$$\text{Dosis 2} = 300 \text{ } \mu\text{g/kg BB}$$

### 3.6.4 Prosedur Perlakuan

#### 3.6.4.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*), dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sebelum perlakuan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer (Easytouch ®) dengan prosedur sebagai berikut:

- a. Persiapan glukometer, strip dipersiapkan untuk mengukur.
- b. Pengambilan sampel darah, tikus diletakkan pada sungkup, ekor tikus dipegang, diurut, dan diberi alkohol. Kemudian ujung ekor dipotong  $\pm 0,5$  cm, darah diambil dan diteteskan pada *strip glukotest*.
- c. Hasil penghitungan kadar glukosa darah yang terbaca pada glukometer dicatat sebagai data.
- d. Prosedur yang sama dilakukan untuk mengetahui kadar glukosa darah setelah perlakuan.

Pemberian ekstrak biji Jintan Hitam untuk perlakuan dilakukan sebagai berikut:

- a. Ditimbang 20 mg *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC), diletakkan pada gelas arloji, ditambahkan sedikit aquades kemudian diaduk hingga homogen (transparan)
- b. Ditambahkan 45  $\mu$ l ekstrak ethanol 96%, diaduk hingga larut
- c. Ditambahkan 45  $\mu$ l ekstrak aseton, diaduk hingga larut
- d. Ditambahkan 45  $\mu$ l ekstrak n-heksan, diaduk hingga larut
- e. Ditambahkan aquades sedikit demi sedikit hingga volume mencapai 22,5 ml
- f. Diambil 15 ml untuk digunakan sebagai dosis 2 (300  $\mu$ g/kg BB)
- g. Sisa larutan sebanyak 7,5 ml diencerkan hingga 15 ml untuk digunakan sebagai dosis 1 (150  $\mu$ g/kg BB).
- h. Pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan dilakukan selama 45 hari secara oral sebanyak 0,5 ml/hari.

#### **3.6.4.2 Pembuatan Preparat Sayatan Pankreas**

Pembuatan preparat sayatan pankreas tikus dilakukan sebagai berikut:

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 absolute (3 kali), 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 ke dalam 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 5  $\mu\text{m}$ , 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 di atas *hot plate*.
6. Tahap parafisasi, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit.

7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat dimulai dari etanol absolute (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan hematoxylin selama 3 menit atau sampai diperoleh hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolute (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. Tahap akhir diamati di bawah mikroskop Nikon CX500 dengan perbesaran 400x. Untuk setiap ekor tikus, satu preparat dengan tiga bidang pandang pengamatan dipotret kemudian dicatat data skor kerusakan pulau pankreas.
13. Tahap lanjutan meliputi tahap pengamatan terhadap tingkat kerusakan jaringan di pulau langerhans pankreas. Kerusakan yang terjadi pada pulau langerhans pankreas akan menyebabkan kadar gula darah tinggi karena berkurangnya penghasil insulin, begitu pula sebaliknya.

### 3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap kadar glukosa darah tikus model diabetes tipe 2, data hasil pengamatan kemudian diuji statistik dengan menggunakan ANKOVA (*Analysis Of Covariance*). Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan pengujian BNT 5%.

Pengamatan berikutnya dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji jintan hitam terhadap gambaran histologis pulau langerhans pankreas tikus model diabetes tipe 2. Pengamatan dilakukan melalui penghitungan tingkat kerusakan organ dengan 3 bidang pandang dalam setiap preparat. Setiap ulangan dalam satu perlakuan terdiri atas 3 preparat. Selanjutnya tingkat kerusakan organ dinilai menggunakan skoring atau penilaian sebagaimana yang dilakukan oleh Mufarrichah (2011).

Tabel 3.1 Acuan penilaian atau skoring pada pulau langerhans pankreas tikus yang diamati secara histologis melalui mikroskop dengan perbesaran 400 x

Skor	Pulau langerhans pankreas
1	Tidak terdapat kerusakan
1,5	Kerusakan pada tahap piknosis mencapai $\leq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
2	Kerusakan pada tahap piknosis mencapai $> \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
2,5	Kerusakan pada tahap karioeksis mencapai $\leq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
3	Kerusakan pada tahap karioeksis mencapai $> \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
3,5	Kerusakan pada tahap kariolisis mencapai $\leq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
4	Kerusakan pada tahap kariolisis mencapai $> \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
4,5	Kerusakan nekrosis (ditandai dengan hilangnya inti) dan terbentuk vakuola ditengah pulau langerhans.

### 3.8 Skema Kerja Penelitian

