

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam perlakuan dan empat ulangan. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian infusa daun murbei (*Morus alba*L.) terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) model Diabetes kronik. Penelitian ini terbagi atas 6 (enam) kelompok yang terdiri atas kontrol negatif (-) positif (+) dan tikus kelompok yang diberi infusa daun murbei dengan dosis 400 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 800 mg/kg BB, 800 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB.

3.2 Variable Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas : pemberian infusa daun murbei (*Morus alba* L.) dengan beberapa dosis pada tikus model Diabetes Mellitus.
- b. Variable tergantung : kadar antioksidan otak dan kemampuan daya ingat untuk mengingat kembali ruang terang dan gelap tikus putih (*Rattus norvegicus*) penelitian ini.
- c. Variabel terikat : jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin, umur dan berat badan tikus yang diberi makan pellet dan diberi minum secara ad libitum.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Biosistematik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan oktober tahun 2013 sampai januari tahun 2014.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan dengan berat badan antara 200-300 g sebanyak 24 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang pemeliharaan, tempat minum, tempat makan, glukometer (*Accu Check Active*), sonde lambung, timbangan analitik, disposable syringe 1 ml, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 50 ml, kertas saring, kaos tangan, papan sesi, alat bedah, dan panci perebusan, botol organ.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih galur wistar, umur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 g, aloksan, kapas, NaCl fisiologis, daun murbei (*Morus alba L.*), aquadest steril, formalin, kloroform,

pellet, paraffin, xylene, hydrogen peroksida, etanol (80 %, 90 %, 96 % dan absolut).

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum perlakuan, terlebih dahulu tikus diaklimatisasi selama 2 minggu dengan cara ditempatkan pada sebuah kandang kelompok berupa bak plastik. Selama diaklimatisasi tikus diberi makan berupa pellet dan minum at libitum. Tujuan aklimatisasi ini adalah untuk menyeragamkan cara hidup dan makanan hewan coba yang digunakan dalam penelitian.

3.6.2 Pembuatan Infusa Daun Murbei

Daun murbei yang digunakan merupakan daun ke-4 dan ke- 5 dari pucuk. Daun-daun tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan selama 5 hari. Setelah kering, daun murbei dijadikan serbuk dengan derajat kehalusan 5/8, kemudian ditimbang serbuk kering daun murbei sebanyak 10 gram ditambah 100 ml air suling dan dimasak selama 15 menit hingga suhu mencapai 90°C, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infuse sebanyak 100 ml (Sunarsih, 2009).

Berikut perhitungan dosis infusa daun murbei:

$$\begin{aligned} \text{BB Tikus} &= 250 \text{ gr} = 250/1000 \text{ kg} \\ &= 0,25 \text{ kg} \end{aligned}$$

$$\text{Dosis I} = 400 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis II} = 600 \text{ mg/kg BB}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis I} &= 0,25 \text{ kg} \times 400 \text{ mg} \\ &= 100 \text{ mg/ 250 g BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis II} &= 0,25 \text{ kg} \times 600 \text{ mg} \\ &= 150 \text{ mg/250 g BB} \end{aligned}$$

Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus dengan dosis 100 mg/ 250 g BB adalah 400 mg.

Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus dengan dosis 150 mg/ 250 g BB adalah 600 mg.

$$\text{Dosis III} = 800 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Dosis IV} = 1000 \text{ mg/kg BB}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis III} &= 0,25 \text{ kg} \times 800 \text{ mg} \\ &= 200 \text{ mg/250 gr BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis IV} &= 0,25 \text{ kg} \times 1000 \text{ mg} \\ &= 250 \text{ mg/250 gr BB} \end{aligned}$$

Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus dengan dosis 200 mg / 250 gr BB adalah 800 mg.

Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus dengan dosis 250 mg/ 250 g BB adalah 1000 mg

$$\begin{aligned} 1 \text{ tikus} &= 2,5 \text{ ml infusa daun murbei} \\ &= 2,5 \text{ ml} \times 4 \text{ tikus} \\ &= 10 \text{ ml} \end{aligned}$$

Stok infusa daun murbei sebanyak 100 ml diberikan kepada tikus perkelompok selama 10 hari. Sehingga pembutan infusa daun murbei dalam 30 hari adalah sebanyak 3 kali.

3.6.3 Persiapan Bahan Diabetogenik

Bahan diabetogenik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aloksan. Untuk membuat kondisi Diabetes Mellitus kronik, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada otak, tikus terlebih dahulu diinjeksi aloksan dengan dosis 100 mg/ kg BB secara intravena sebanyak 1 kali induksi dan telah

dipuasakan selama 24 jam. Sebelum diinjeksikan aloksan dilarutkan dalam aquabides dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer .

Dosis aloksan = 100 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Berat tikus} &= 250 \text{ gr} = 250/1000 \text{ kg} \\ &= 0,25 \text{ kg} \\ &= 0,25 \text{ kg} \times 100 \text{ mg} \\ &= 25 \text{ mg} \end{aligned}$$

Berdasarkan petunjuk penggunaan aloksan yang tertera pada kemasan diketahui setiap 1 gr aloksan dilarutkan ke dalam 5 ml aquadest, sehingga perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} 25 \text{ mg} &= 25/1000 \text{ g} \\ &= 0,025 \text{ g} \\ &= 0,025 \text{ g} \times 5 \text{ ml} \\ &= 0,125 \text{ ml} \end{aligned}$$

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan otak tikus dilakukan konversi usia manusia ke usia tikus. Ames (2002) menyatakan bahwa 75-80 tahun manusia 7-10 bulan pada tikus. Menurut Fioretto (2007) penyakit diabetes mellitus yang sudah mengalami komplikasi pada organ sekitar 5-10 tahun sehingga apabila dikonversikan ke tikus mencapai 4 minggu sudah mengalami kerusakan pada organ. Apabila sudah komplikasi tikus diberi infusa daun murbei (*Morus alba L.*)

3.6.4 Pembagian Kelompok

Setelah diinduksi dengan aloksan, maka tikus dibagi menjadi enam kelompok dengan masing-masing empat ulangan. Kelompok tersebut dibagi sebagai berikut:

- Kontrol (-) : tikus normal tanpa perlakuan.
- Kontrol (+) : tikus diinduksi aloksan tanpa diberi perlakuan infusa daun murbei.
- Perlakuan I : tikus diinduksi aloksan dan diberi infusa daun murbei dengan dosis 400 mg/ kg BB 1x sehari.
- Perlakuan II : tikus diinduksi aloksan dan diberi infusa daun murbei dengan dosis 600 mg/ kg BB 1x sehari.
- Perlakuan III : tikus diinduksi aloksan dan diberi infusa daun murbei dengan dosis 800 mg/ kg BB 1x sehari.
- Perlakuan IV : tikus diinduksi aloksan dan diberi infusa daun murbei dengan dosis 1000 mg/ kg BB 1x sehari.

3.6.5 Pemberian Perlakuan

Infusa daun murbei (*Morus alba L.*) diberikan 8 minggu setelah tikus diinduksi aloksan dengan dosis 100 mg/kg BB sebanyak 1 kali dan dibiarka selama 4 minggu. Pemberian infusa daun murbei (*Morus alba L.*) dilakukan secara oral dengan menggunakan sonde lambung dengan dosis yang telah ditentukan agar tidak melebihi kapasitas gastrik tikus. Pada akhir penelitian tikus dibedah untuk pengukuran kadar antioksidan (Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) dan tes kemampuan daya ingat ruang gelap dan terang.

3.6.6 Pengukuran Kadar Antioksidan (Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)).

Aktivitas SOD diuji dengan menggunakan sampel berupa organ (otak) tikus putih (*Rattus novergicus*) Jantan. Pada tahap yang pertama, tikus dibius menggunakan klorofom, kemudian diambil organ (otak) sebanyak 100 mg. Ditambahkan 1 ml PBS kemudian hasilnya ditampung ke dalam ependorf. Kemudian 150 µl supernatan otak divorteks selama tiga detik dan disentrifus pada kecepatan 4400 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Sebanyak 2,9 ml larutan A (campuran larutan xantin) ditambah 50 µl larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks secara perlahan. Reaksi dimulai dengan menambahkan 50 µl larutan B (xantin oksidase) dan divorteks secara perlahan. Kemudian diletakkan di dalam kuvet. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan kecepatan 522 nm (Wresdiyati, 2007).

3.6.7 Pengamatan Kemampuan Daya Mengingat

Untuk mengukur perilaku belajar dan mengingat dari semua tikus digunakan alat uji menghindari pasif modifikasi dari Jarvik. Alat ini terdiri dari 2 ruangan, ruang kecil dan ruang besar. Ruang kecil (25 × 15 cm) transparan dan diterangi dengan lampu 25 Watt setinggi 50 cm dari lantai berkawat yang disusun paralel. Ruang besar berupa kamar gelap berukuran 50 × 50 × 50 cm yang berlantai dari anyaman kawat paralel berjarak 1 cm antar sesamanya yang dialiri arus listrik 5 mA. Kedua ruangan dihubungkan dengan sebuah pintu kecil (10 cm tinggi, 7,5 cm lebar). Tikus yang akan diukur perilakunya diletakkan dalam ruangan kecil dan secara pasif diharapkan akan memasuki kamar gelap lewat

pintu penghubung dan segera setelah masuk ke kamar gelap kakinya dikejutkan dengan arus listrik lemah yang dialirkan ke lantainya.

Pengukuran terdiri dari *learning trial* (LT) atau uji belajar dan *retention trial* (RT) atau uji retensi. Waktu antara uji belajar dan uji retensi adalah 24 jam, yang menggambarkan kemampuan mengingat jangka pendek dari objek. Waktu yang dibutuhkan oleh sampel mulai dari ruang kecil, lalu masuk ke dalam ruang gelap dicatat, kemudian diberi aliran listrik pada kakinya secara terkejut 1 kali 10 detik. Kemudian diberi suntikan skopolamin secara intraperitoneal lalu dimasukkan ke dalam kandang. Setelah 24 jam dilakukan uji RT 1 (daya ingat jangka pendek) dan RT 2 (daya ingat jangka panjang) dilakukan pada hari ke 7 setelah RT 1 (daya ingat jangka pendek).

Pengujian kemampuan daya ingat dilakukan dengan alat uji jarvik, langkah pertam tikus di masukan ke ruang kecil dengan mencatat berapa lama waktu yang dibutuhkan tikus masuk ke dalam ruang besar di ambil tikus dan dimasukkan ke kandang. Untuk menentukan kemampuan daya ingat yaitu dengan cara mengurangi RT (kemampuan daya ingat) dengan LT (uji belajar) tikus dikatakan memiliki kemampuan daya ingat baik apabila $RT - LT > 0$.

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh infusa daun murbei (*Morus alba L.*) terhadap kadar superoksida dismutase SOD dan kemampuan daya ingat tikus putih (*Rattus novergicus*) model diabetes. Dilakukan analisis statistik *ANOVA one Way*. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ 5%, maka H_0 ditolak. Apabila terjadi perbedaan signifikan 5%., menurut Ali (2008) untuk menentukan uji lanjut ditentukan dari nilai *koefisien*

keragaman KK apabila nilai KK besar (10% sampai 20%) digunakan uji duncan, KK sedang (5 % sampai 10%) uji BNT dan KK kecil (maksimal 5%) dilakukan uji BNJ.

