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 gambaran histologis otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model Diabetes Mellitus kronik. Perlakuan yang digunakan terdiri dari perlakuan kontrol negatif/ tanpa perlakuan, positif dan tikus diabetes yang diberi perlakuan infusa daun murbei (*Morus alba*L.).

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: gambaran histologis otak tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- 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, Laboratorium Biosistemik dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan juli sampai september tahun 2013.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah tikusputih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan dengan berat badan antara 100-200 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, object glass, deck glass, mikrotom, mikroskop.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih galur wistar, umur 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 g, aloksan, kapas, NaCl fisiologis, daun murbei (*Morus alba L.*), aquadest steril, formalin, kloroform, buffer sitrat, pellet, paraffin, xylene, eosin stain, 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 infusa sebanyak 100 ml (Sunarsih, 2009).

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 buffer sitrat pada pH 4,5 dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer.

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan otak tikus dilakukan konversi usia manusia ke usia tikus, dimana 10 tahun kurun waktu pada manusia sama dengan 1 bulan (4 minggu) kurun waktu tikus (Djari, 2008). Diperkirakan dalam kurun waktu 4 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada otak karena kerusakan mikrovaskular pada manusia terjadi pada kurun waktu 10-15 tahun. Pada penelitian ini tikus yang diinduksi aloksan, dibiarkan selama 4 minggu yang diperkirakan akan terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada otak. Pada periode tersebut, setelah itu tikus diberi perlakuan 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/ kgBB 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 dibiarkan 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 isolasi otak (hipokampus) untuk pembuatan preparat histologis.

3.6.6 Pembuatan Preparat Histologis otak tikus putih

1. Tahap pertama adalah coating. Dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam dalam alcohol 70% minimal semalam. Kemudian, objek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5 % selama 30-40 detik per slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan sehingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
2. Tahap kedua, masing-masing organ yang telah disimpan dalam larutan formalin 10 % dicuci dengan alcohol selama 2 jam. Dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alcohol yaitu dengan 90%, 95%, etanol absolute (3 kali), xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan parafin 3 kali 30 menit.
4. Tahap keempat, embedding. Bahan beserta paraffin dituangkan ke dalam kotak karton atau wadah yang telah dipersiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap di dekat bahan. Blok parafin dibiarkan semalam

dalam suhu ruang kemudian diikubasi 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. 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 dipilih diambil dengan gelas objek yang sudah dicoating lalu dikeringkan di atas hot plate.
6. Tahap deparafinasi yakni preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak dua kali menit.
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol (2 kali), etanol 95 %, 90 %, 80 % dan 70 % masing-masing selama lima menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan. Preparat ditetesi hematoxilen selama tiga menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama lima menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarnaan eosin alcohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama lima menit.
9. Tahap berikutnya adalah dehidrasi dengan memasukkan preparat pada seri ethanol bertingkat dari 80 %, 90 % dan 95 % hingga ethanol absolute (2 kali).

10. Tahap clearing dilakukan dengan memasukkan preparat pada xylol dua kali selama lima menit dan dikeringkan.
11. Selanjutnya dilakukan mounting dengan entellan. Hasil diamati di bawah mikroskop dengan 3 lapang pandang dan dipotret kemudian dihitung jumlah sel pyramid.

3.7 Analisis Data

Analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah *One Way Anava*. Apabila terbukti ada pengaruh perlakuan infusa Daun Murbei (*Morus alba* L.) terhadap jumlah sel pyramid maka dilakukan uji lanjut duncan α 1%.